



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Funkcionalizace tkáňového nosiče trombocytárními růstovými faktory

Bakalářská práce

Studijní

program: B3942 – Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: Vojtěch Hanzl

Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Functionalization of scaffolds by the platelet derived growth factors

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials
Author: **Vojtěch Hanzl**
Supervisor: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Hanzl**
Osobní číslo: **M13000151**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Funkcionalizace tkáňového nosiče trombocytárními růstovými faktory**
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava trombocytárních lyzátů
3. Optimalizace přípravy kapslí obsahujících proteiny (příprava roztoků, podmínky enkapsulace)
4. Analýza obsahu proteinů v připravených kapslích (kvantitativní)
5. Zpracování výsledků

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. Langer, R., and J. P. Vacanti. 1993. 'Tissue engineering', Science, 260: 920-6.
2. Everts, P. A., J. T. Knape, G. Weibrich, J. P. Schonberger, J. Hoffmann, E. P. Overvest, H. A. Box, and A. van Zundert. 2006. 'Platelet-rich plasma and platelet gel: a review', J Extra Corpor Technol, 38: 174-87.
3. Sell, Scott A., Jeffery J. Ericksen, and Gary L. Bowlin. 2012. 'The incorporation and controlled release of platelet-rich plasma-derived biomolecules from polymeric tissue engineering scaffolds', Polymer International, 61: 1703-09.
4. Tayalia, P.; Mooney, D.J. 2009. Controlled growth Factor Delivery for Tissue Engineering. Advanced Materials, 21, 3269-85.
5. Bock, N., 2012. Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. Progress in Polymer Science. Vol. 37, no. 11. p. 1510-1551.
6. Jaworek, A., A. Krupa, M. Lackowski, A. T. Sobczyk, T. Czech, S. Ramakrishna, S. Sundarrajan, and D. Pliszka. 2009. 'Nanocomposite fabric formation by electrospinning and electrospaying technologies', Journal of Electrostatics, 67: 435-38.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **5. října 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2016**



prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 5. října 2015

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vzta-huje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL;; v tomto pří-padě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elek-tronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 16.5.2016

Podpis: 

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí své bakalářské práce Ing. Věře Jenčové Ph.D.a svým konzultantům Ing.Tereze Pavlíkové a Bc. Barboře Koprivové za nekonečnou trpělivost, cenné rady, připomínky a odborné konzultace v dané problematice. Také chci poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

V této práci je rozebíráno využití elektrostatického zvlákňování pro výrobu scaffoldů a jejich následná funkcionalizace růstovými faktory. V teoretické části jsou podány informace o tkáňovém inženýrství, materiálech a metodách výroby a funkcionalizace scaffoldů, biologicky aktivních látkách v čele s růstovými faktory a základní analytické metody užívané k jejich detekci.

V experimentální části je zkoumána optimalizace výroby polyvinylalkoholových vláken funkcionalizovaných trombocytárními přípravky a také je analyzována úspěšnost inkorporace použitých bioaktivních látek.

Klíčová slova: Elektrostatické zvlákňování, Růstové faktory, Funkcionalizace nanovláken, Plazma bohatá na trombocyty, Tkáňový nosič

Abstract

In this work, it's considered usage of electrospinning for scaffold preparation and their functionalization with growth factors. In theoretical part are given basic informations about tissue engineering, materials and methods usable for scaffold preparation, biologically active molecules, mainly growth factors and used analytical methods.

In experimental part is researched optimalization of preparation of PVA fibers and their functionalization with thrombocyte preparates. There is also analyzed successfullness of incorporation of used bioactive molecules.

Keywords: Electrospinning, Growth factors, Nanofiber functionalization, Platelet rich plasma, scaffold

Obsah

Obsah

Seznam obrázků

Seznam grafů

Seznam tabulek

Seznam zkratk

Úvod

Teoretická část

1 Tkáňové inženýrství

1.1 Scaffoldy pro tkáňové inženýrství

1.1.1 Materiály pro výrobu scaffoldů

1.1.2 Metody výroby scaffoldů

2 Elektrostatické zvlákňování

2.1 Princip elektrostatického zvlákňování

2.2 Zvlákňování technologií Nanospider

2.3 Parametry elektrostatického zvlákňování

2.3.1 Parametry polymerního roztoku

2.3.2 Parametry procesu

3 Biologicky aktivní látky

3.1 Proteiny

3.2 Metody analýzy proteinů

3.2.1 analýza proteinů pomocí SDS-PAGE

3.2.2 analýza koncentrace proteinů Metodou podle Bradfordové

3.3 Růstové faktory

3.4 Trombocyty

3.5 Plazma bohatá na trombocyty

3.5.1 Metody výroby PRP

4 Funkcionalizace scaffoldů pro tkáňové inženýrství

4.1 Funkcionalizace pomocí bioaktivních látek

4.1.1 Přímé smíchání bioaktivních látek s polymerem

4.1.2 Výroba kompozitních scaffoldů

4.1.3 Metoda koaxiálního elektrospinningu

4.1.4 Povrchové modifikace vláken

Experimentální část

5 Materiály a metody

5.1 Použité přístroje

5.2 Použité chemikálie

5.3 Použité roztoky

5.4 Metody

5.4.1 SDS-PAGE elektroforéza

5.4.2 Měření celkové koncentrace proteinů Metodou podle Bradfordové

5.4.3 Příprava vzorků pro rastrovací elektronový mikroskop

5.4.4 Příprava trombocytárního lyzátu

6 Výsledky a diskuze

6.1 Výroba vláken zvlákňováním z jehly

6.2 Výroba vláken technologií Nanospider

6.3 Analýza proteinů ve vláknech PVA

6.3.1 Analýza pomocí SDS-PAGE elektroforézy

6.3.2 Analýza celkové koncentrace proteinů Metodou podle Bradfordové

7 Diskuze

Reference

Přílohy

Seznam obrázků

Obrázek 1: Základní schéma elektrospinningu z jehly

Obrázek 2: základní struktura proteinů

Obrázek 3: Základní schéma SDS-PAGE

elektroforézy Obrázek 4: Schéma složení trombocytu

Obrázek 5: Schématické zobrazení základních metod funkcionalizace nanovláken

Obrázek 6: snímky ze SEM pro zvlákňování z jehly

Obrázek 7: snímky ze SEM zvětšeny 5000x a. PVA neobsahující TL b. PVA obsahující 5% TL
c. PVA obsahující 10% TL d. PVA obsahující 15% TL

Obrázek 8: snímky ze SEM zvětšeny 5000x a. PVA neobsahující TL b. PVA obsahující 7,5% TL
c. PVA obsahující 10% TL d. PVA obsahující 12,5% TL

Obrázek 9: snímky ze SEM zvětšeny 1000x a. PVA obsahující 7,5% TL b. PVA neobsahující
TL

Obrázek 10: 12% SDS-PAGE 20 (20 µl vzorku) M – marker Wide range K494 1 – 0% TL (voda) 2
– 5% TL (voda) 3 – 10% TL (voda) 4 – 15% TL (voda) 5 – 0% TL (chloroform) 6 – 5% TL

(chloroform) 7 – 10%TL (chloroform) 8 – 15%TL (chloroform)

Obrázek 11: 8% SDS-PAGE barvení stříbrem (20 µl vzorku) M-marker Wide range K494 1 – 0%TL (voda) 2 – 7,5%TL (voda) 3 – 10%TL (voda) 4 – 12,5%TL (voda) 5 – 0%TL (chloroform) 6 – 7,5%TL (chloroform) 7 – 10%TL (chloroform) 8 – 12,5%TL (chloroform)

Obrázek 12: 8% SDS-PAGE barvení stříbrem (20µl vzorku) M - Marker wide range K494 1 - 0%TL (voda) 2 - 5%TL (voda) 3 - 10%TL (voda) 4 - 15%TL (voda) 5 - 0%TL (chloroform) 6 - 5%TL (chloroform) 7 - 10%TL (chloroform) 8 - 15%TL (chloroform)

Seznam tabulek

Tabulka 1: některé polymerní scaffolds a jejich využití

Tabulka 2: některé růstové faktory a jejich využití

Tabulka 3: tabulka základních biologicky aktivních látek obsažených v PRP

Tabulka 4: použité přístroje

Tabulka 5: použité chemikálie

Tabulka 6: použité roztoky

Tabulka 7: složení roztoků PVA pro zvlákňování z jehly

Tabulka 8: složení roztoků PVA pro 1. zvlákňování Nanospider

Tabulka 9: parametry pro 1. zvlákňování Nanospider

Tabulka 10: průměry vláken pro 1. zvlákňování Nanospider

Tabulka 11: složení roztoků PVA pro 2. zvlákňování Nanospider

Tabulka 12: parametry pro 2. zvlákňování Nanospider

Tabulka 13: průměry vláken pro 2. zvlákňování Nanospider

Seznam grafů

Graf 1: průměrná velikost vláken a statistická odchylka podle koncentrace TL pro 1. zvlákňování

Graf 2: průměrná velikost vláken a statistická odchylka podle koncentrace TL pro 2. zvlákňování

Graf 3: 1. kalibrace metody podle Bradfordové pomocí BSA

Graf 4: Množství proteinů metodou podle Bradfordové 1. zvlákňování

Graf 5: množství proteinů metodou podle Bradfordové 1. zvlákňování 2. pokus

Graf 6: 2. kalibrace metody podle Bradfordové pomocí BSA

Graf 7: Množství proteinů metodou podle Bradfordové 2. zvlákňování

Seznam zkratek

ADP - adenosindifosfát

BCA – Bicinchonionvá kyselina
BSA – bovine serum albumin
CAD/CAM – počítačem podporovaná výroba
CBBG – Coomassie brilliant blue G250
CBBR – Coomassie brilliant blue R250
DMSO – dimethylsulfoxid
DNA – deoxyribonukleová kyselina
ECM – extracelulární matrix
EGF – epidermální růstový faktor
FGF – fibroblastový růstový faktor
HA – kyselina hyaluronová
HAP – hydroxyapatite
IGF – inzulínu podobný růstový faktor
PAGE – polyakrylamidový gel
PCL – polykaprolacton
PDGF – růstový faktor získaný z trombocytů
PDLLGA – poly(DL)glykolo-mléčná kyselina
PEO - polyethylenoxid
PGA – polyglykolová kyselina
PLA – polymléčná kyselina
PLGA – polyglykolo-mléčná kyselina
PLLA – poly(L)mléčná kyselina
PPP – platelet poor plasma / plazma chudá na trombocyty
PPF – polypropylenfumarát
PPZ – polyfosfazen
PRF – platelet rich fibrin / fibrin bohatý na trombocyty
PRP – platelet rich plasma / plazma bohatá na trombocyty
PU - polyuretan
PVA - polyvinylalkohol
RM – regenerativní medicína
RF – růstový faktor
SEM – rastrovací elektronový mikroskop
SDS – dodecylsírán sodný
TCP – trikalcium fosfát

TL – trombocytární lyzát

UV – ultrafialové záření

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor

Úvod

Díky rozmachu ve výzkumu nanomateriálů dochází k jejich průniku do různých odvětví, včetně tkáňového inženýrství. Jedná se především o nanovlákná a nanočástice, které značně rozšiřují možnosti pro výrobu scaffoldů (podpůrných lešení), které by byly schopné nahradit poškozené tkáně. Výzvou ale zůstává optimalizace jejich vlastností pro co nejlepší napodobení tkání, nezbytné pro jejich aplikaci. K tomuto cíli může napomoci jejich funkcionalizace biologicky aktivními látkami, zvyšujícími biokompatibilitu a urychlujícími regeneraci tkáně. V tomto ohledu se velmi perspektivně jeví použití trombocytů a z nich vyrobených preparátů, které představují snadno přístupný zdroj velkého množství biologicky aktivních látek v lidském těle relevantních poměrech.

1 Tkáňové inženýrství (TE)

Tkáňové inženýrství je rychle se rozvíjející multidisciplinární obor, který kombinuje poznatky z přírodních věd a materiálového inženýrství, za účelem pochopení biologických pochodů v tkáních a za kombinace scaffoldů, buněk a bioaktivních látek tvorby biologické náhrady umělého či přirozeného původu imitující nativní tkáně za účelem obnovy, zachování nebo vylepšení jejich funkce. [1] Metody TE skrývají velký potenciál jako alternativa k transplantaci cizí tkáně, která trpí řadou problémů jako jsou například akutní nedostatek dárců transplantovatelných orgánů nebo potřeba po zbytek života používat léky k potlačení imunity pacienta. [2],[3]

1.1 Scaffoldy pro tkáňové inženýrství

Jelikož většině nativních tkání jsou buňky zachyceny na struktuře extracelulárního matrixu (ECM), je důležitou součástí TE snaha o vytvoření umělých ECM podobných struktur. Takové struktury jsou nazývány scaffoldy (lešení). Podle žádaného použití je třeba, aby scaffold splňoval určité vlastnosti. Jejich splnění bývá často dosaženo jejich kombinací s biologicky aktivními látkami, které mohou sloužit jak k jejich optimalizaci tak přidání dalších (např. zrychlení regenerace tkáně inkorporací růstových faktorů). [4]

U scaffoldů jsou sledovány následující vlastnosti:

existence interakcí mezi scaffoldem a okolní tkání

biodegradabilita
biokompatibilita
mechanické vlastnosti
architektura podobná tkáni

Je nezbytné, aby byly posílány signály mezi scaffoldem a jeho okolím (ECM i buňkami). Bez existence takových interakcí by vůbec nebylo možné scaffold inkorporovat do okolní tkáně. Nedostatek takových interakcí bývá jedním z problémů při práci se syntetickými scaffoldy. Pro různé aplikace můžeme vyžadovat scaffoldy buď trvalé či dočasné a proto je dobré znát jejich degradabilitu. Pro dočasné scaffoldy je ideální aby samovolně degradovaly rychlostí co nejbližší regeneraci vlastní tkáně.

Velmi podstatnou podmínkou pro zavedení scaffoldu je, aby on ani produkty jeho degradace nebyly toxické a tím pádem nepoškozovaly okolní funkční tkáň. Také je důležité aby nebyl tělem hostitele rozeznán jako cizí, což by mělo za následek nežádoucí imunitní reakci způsobující zánět či odmítnutí, obvyklé u jiných forem náhrady tkání (transplantace).

Podle použití musí být scaffold vybrán tak, aby svými mechanickými vlastnostmi i celkovou architekturou odpovídal nahrazované tkáni a zachoval si stabilitu i při delším namáhání. Také je nezbytné aby architektura výsledného scaffoldu obsahovala dostatečné množství pórů, kterými by mohly být buňky zásobovány živinami, kyslíkem a různými enzymy a naopak mohly vypouštět odpadní látky.

Pro praktické využití je také důležité, aby výroba scaffoldu nebyla příliš časově ani procesně náročná a nevyžadovala finančně náročné suroviny a vybavení.

1.1.1 Materiály pro výrobu scaffoldů

V dnešní době máme na výběr s velkého množství vhodných polymerů, přičemž každý má své specifické výhody i nevýhody. Můžeme je dělit podle původu na přírodní či syntetické, podle typu na degradabilní či trvalé nebo třeba podle struktury, jestli jsou vláknenné (nanovláknna či kompozitní vlákna) či nikoliv (skla, hydrogely). Velká většina materiálů používaných v dnešní době je degradabilní. Mezi výhody přírodních materiálů patří biokompatibilita i degradabilita, nicméně výroba scaffoldů s homogenními vlastnostmi je problematická. Přírodní materiály můžeme dále dělit na proteiny (kolagen, elastin, keratin) a polysacharidy (celulóza, chitin). [5] Druhou možností je využití syntetických materiálů, mezi jejichž výhody patří jednoduchost jejich výroby a reprodukovatelnost vlastností s předpověditelnou degradabilitou. Problém představuje mnohdy nedostatečná biokompatibilita a případné produkty degradace (například kyselé produkty

hydrolyzy při rozkladu PGA,PLA nebo PLGA). Z polymerů jsou běžně používány polykaprolacton (PCL), polymléčná kyselina (PLA), polyvinylalkohol (PVA), polyethylenoxid (PEO) nebo polyglykolová kyselina (PGA). [6]

Další podstatnou skupinou scaffoldů jsou hydrogely. Ty jsou tvořeny 3-D polymerní strukturou, která je propojena kovalentními vazbami či nevazebnými interakcemi. Jsou hydrofilní a dokáží absorbovat velké množství vody bez poškození vnitřní struktury. Svou strukturou mohou být podobné ECM což napomáhá jejich biokompatibilitě. Podstatnou výhodou je též možnost vpravit je do těla injekčně a vyhnout se tedy chirurgickému zákroku. Mohou být tvořeny přírodními polymery jako HA, kolagen, fibrin tak i syntetickými jako jsou PLA nebo PVA.

Zvláštní skupinou jsou keramické materiály například TCP nebo HAP které jejich vlastnosti předurčují k náhradě tvrdých tkání jako jsou kosti a zuby. V poslední době se pro napodobení tvrdých tkání experimentuje také s kovovými scaffoldy, kde jsou nejvíce používány hořčík, železo a jejich slitiny.

| Polymer | Nahrazovaná tkáň |
|----------------|---------------------------------|
| PLLA | Kosti, chrupavky |
| PGA | Chrupavky, játra, kosti, střevo |
| PDLLGA | Kosti, chrupavky, močový epitel |
| PLGA+PEG | Měkké a tubulární tkáně |
| PVA+PLLA | játra |
| PPF+TCP | kosti |
| PPZ | nervy |
| PPF+EG | Srdeční tkáň |
| PLGA | Nervy, kosti, chrupavky |
| PU | cévy |
| PCL | cévy |
| PVA | Kosti, cévy |

Tabulka 1: některé polymerní scaffoldy a jejich využití [7]

1.1.2 Metody výroby vláknenných scaffoldů

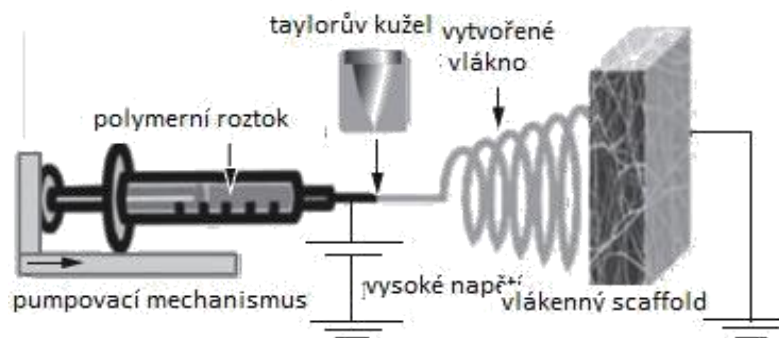
V dnešní době je k dispozici velké množství metod použitelných pro výrobu scaffoldů. Mezi nejznámější metody pro výrobu polymerních vláken patří electrospinning ve kterém je využíváno vysokého napětí, fázová separace, kde je využíváno termodynamické mísitelnosti roztoků ke tvorbě čisté polymerní fáze a self-assembly, ve které se komponenty skrze nevazebné interakce samy skládají do požadované struktury. Mezi další užitečné metody pro tvorbu vláknenných scaffoldů patří drawing, forcespinning, rotary jet spinning a rapid prototyping. [8] Každá metoda prezentuje určité výhody a nevýhody, například el.spinning vyniká finanční a procesní jednoduchostí ale neposkytuje zcela homogenní vlákna, zatímco self-assembly poskytuje přesnou strukturu ale příprava je výrazně složitější.

Pro tvorbu nevláknenných scaffoldů lze také použít metody freeze-drying, solvent casting-particulate leeching, high pressure processing nebo gas foaming. [9]

2 Elektrostatické zvláknování (electrospinning)

Elektrostatické zvláknování je metodou výroby velmi tenkých vláken, různých průměrů od mikro do nano rozměrů. Při této metodě se využívá silného elektrického pole, které překonává povrchové napětí nabitého polymeru. Tato metoda je velmi oblíbená díky své jednoduchosti, absenci nákladné aparatury, možnosti průmyslové výroby a schopnosti vytvářet vlákna podobných vlastností. Nejčastěji se pro tuto metodu používají roztoky polymerů, nicméně zvláknování (na rozdíl od sprejování) je možné i s různými taveninami. V laboratoři se při electrospinningu používají různé trysky ale v průmyslové výrobě se spíše používá válec smáčený v roztoku polymeru. [10]

Sesterskou metodou k elstat.zvláknování je rozprašování. Jejím výsledkem však nejsou vlákna ale částice s velikostí srovnatelnou či menší než 1 μm . Při rozprašování je použita stejná aparatura a jediný rozdíl je v rozdílné kohezi molekul polymeru, které je dosaženo změnou polymerního roztoku (např.nižší viskozita) nebo změnou parametrů (změnou napětí).



Obrázek 1: Základní schéma elektrospinningu z jehly [11]

2.1 Princip elektrostatického zvlákňování

Aparatura na el. rozprašování je jednoduchá a levná. Obsahuje zdroj vysokého napětí a dvě protilehlé elektrody, mezi nimiž je napětí vytvořeno. Kladná elektroda je tvořena zařízením na vypouštění roztoku, v našem případě se jedná o jehlu injekční stříkačky a záporná je kolektor určený k jeho zachycení. Při zvyšování napětí na hrotu jehly, bude postupně docházet k deformaci kapky roztoku až dojde k vytvoření Taylorova kuželu. Když dosáhne napětí kritické hodnoty, začne se z Taylorova kuželu vypouštět úzký, silně nabitý proud polymeru směřující ke kolektoru. Během cesty se z polymeru vypaří rozpouštědlo a dříve než dorazí ke kolektoru polymer ztuhne. Při electrospinningu se na kolektoru zachytí tenká vlákna, zatímco při electrosprayingu vlivem Rayleighovy nestability dojde k rozpadu proudu do malých částic. [12]

2.2 Zvlákňování technologií Nanospider

Nanospider je modifikovaná metoda výroby nanovláken patentovaná společností Elmarco. Na rozdíl od zvlákňování jehlou zde není využíváno kapiláry ale rotujícího válce nebo struny pokrytých tenkou vrstvou polymeru. Výhodou takového přístupu je, že vzniká větší množství Taylorových kuželů po celé délce válce a díky tomu se výrazně zvyšuje množství vyrobených vláken v čase. Díky automatizovanosti je výhodou také jednoduché a přesné nastavení různých parametrů, které umožňují vysokou reprodukovatelnost. Vzhledem k těmto výhodám je tato technologie vhodná hlavně pro průmyslové využití. [13]

2.3 Parametry electrospinningu

Pokud chceme pomocí metody electrospinningu vytvořit vlákna s požadovanými vlastnostmi, je zapotřebí zohlednit velké množství vzájemně propojených parametrů. [14] Lze je rozdělit na

vlastnosti polymerního roztoku, kam patří například viskozita, molekulární hmotnost polymeru, jeho koncentrace nebo typ rozpouštědla a vlastnosti procesní, tedy vlastnosti samotné technologie. [15] Mezi ně řadíme například elektrické napětí, dávkování polymeru nebo vzdálenost jehly od kolektoru. [16]

2.3.1 Parametry polymerního roztoku

Viskozita

Viskozita roztoku hraje klíčovou roli v určování morfologie vláken. Bylo zjištěno, že při nízké viskozitě nebude proud roztoku stabilní a bude docházet ke vzniku částic, zatímco při vyšší viskozitě dojde ke tvorbě vláken. Při extrémně vysoké viskozitě nemusí být electrospinning možný, protože přitažlivé síly v roztoku mohou být příliš silné. Tato veličina je ve vztahu s koncentrací a molekulární hmotností polymeru.

Koncentrace

Koncentrace roztoku polymeru je velmi významná pro kvalitní výsledek electrospinningu. Bylo dokázáno, že při nízkých koncentracích roztoku bude dosaženo výhradně částic (dojde k electrosprayingu) a se zvyšující se koncentrací se bude morfologie částic protahovat, až bude docházet ke kombinaci obou metod a získáme směs částic a vláken. Při vysoké koncentraci roztoku bude docházet výhradně ke tvorbě vláken. Při dalším zvyšování koncentrace bude růst tloušťka vláken.

Molekulární hmotnost

Molekulární hmotnost polymeru má díky svému vlivu na viskozitu a povrchové napětí velký vliv na vlastnosti vláken. S vyšší molekulární hmotností stoupá množství propojení v molekulárním řetězci, přičemž s tím stoupá i viskozita roztoku. Platí tedy, že s nízkou molekulovou hmotností polymeru získáme částice, zatímco s vysokou budou výsledkem vlákna.

Vodivost roztoku

Vodivost roztoku je dána primárně druhem polymeru i rozpouštědla a také množstvím dostupných iontů. Zvýšení vodivosti vede k tvorbě užších vláken bez korálků. Zvýšení dosáhneme přidáním iontové soli do roztoku např. NaCl nebo NaH₂PO₄. Pro PVA bylo použito NaCl. (stažené pdf) Vyšší vodivosti lze dosáhnout také použitím organické kyseliny jako rozpouštědla, např. kyseliny mravenčí.

Povrchové napětí

Ukázalo se, že vysoké hodnoty povrchového napětí mohou znemožňovat electrospinning. Proto je nutné do roztoku přidat látku která jej snižuje.

Rozpouštědlo (solvent)

Rozpouštědlo je nezbytně nutné aby solvatovalo řetězec polymeru a tím napomohlo jeho rozbalení. Teplota varu rozpouštědla je velmi důležitým faktorem electrospinningu, neboť rozpouštědla s nízkou teplotou varu (např. chloroform 61 °C) mají tendenci tvořit větší částice s členitějším povrchem, zatímco rozpouštědla s vysokou teplotou varu (DMF 146 °C) tvoří menší a hladší částice. Je to způsobeno rychlostí vypařování rozpouštědla, které se může odpařit rychleji, než se stihne polymerní řetězec změně přizpůsobit a tak může v polymeru zanechat trhliny nebo dokonce póry. Různá rozpouštědla také mají různé povrchové napětí, s čímž je třeba počítat při přípravě roztoku.

2.3.2 parametry procesu

Výsledek el.spinningu je také velmi závislý na procesních parametrech. Nejvýraznějším parametrem je elektrické napětí, při kterém ke zvlákňování dochází. Bez překročení minimálního napětí totiž nedochází vůbec ke vzniku Taylorova kuželu. Velikost napětí také ovlivňuje dochází-li ke spinningu nebo sprayingu. Dalším parametrem je dávkování, kde platí že při menším dávkování vznikají kvalitnější vlákna. Dalšími parametry jsou vzdálenost jehly od kolektoru a okolní podmínky, které musí být takové, aby polymer při cestě stihl vyschnout. Posledním podstatným parametrem je samotný kolektor, jehož úpravou lze jak zjednodušit následnou práci se vzorky tak docílit odlišných vlastností

3 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivními látkami jsou takové, které se nějakým způsobem podílejí na biologických procesech lidského organismu. Mohou být původu přírodního i syntetického stejně, jako se mohou lišit svou složitostí. Může se jednat o atomy nebo jednoduché molekuly, peptidové nebo sacharidové řetězce (sacharóza, inzulin) až po složité proteiny (růstové faktory).

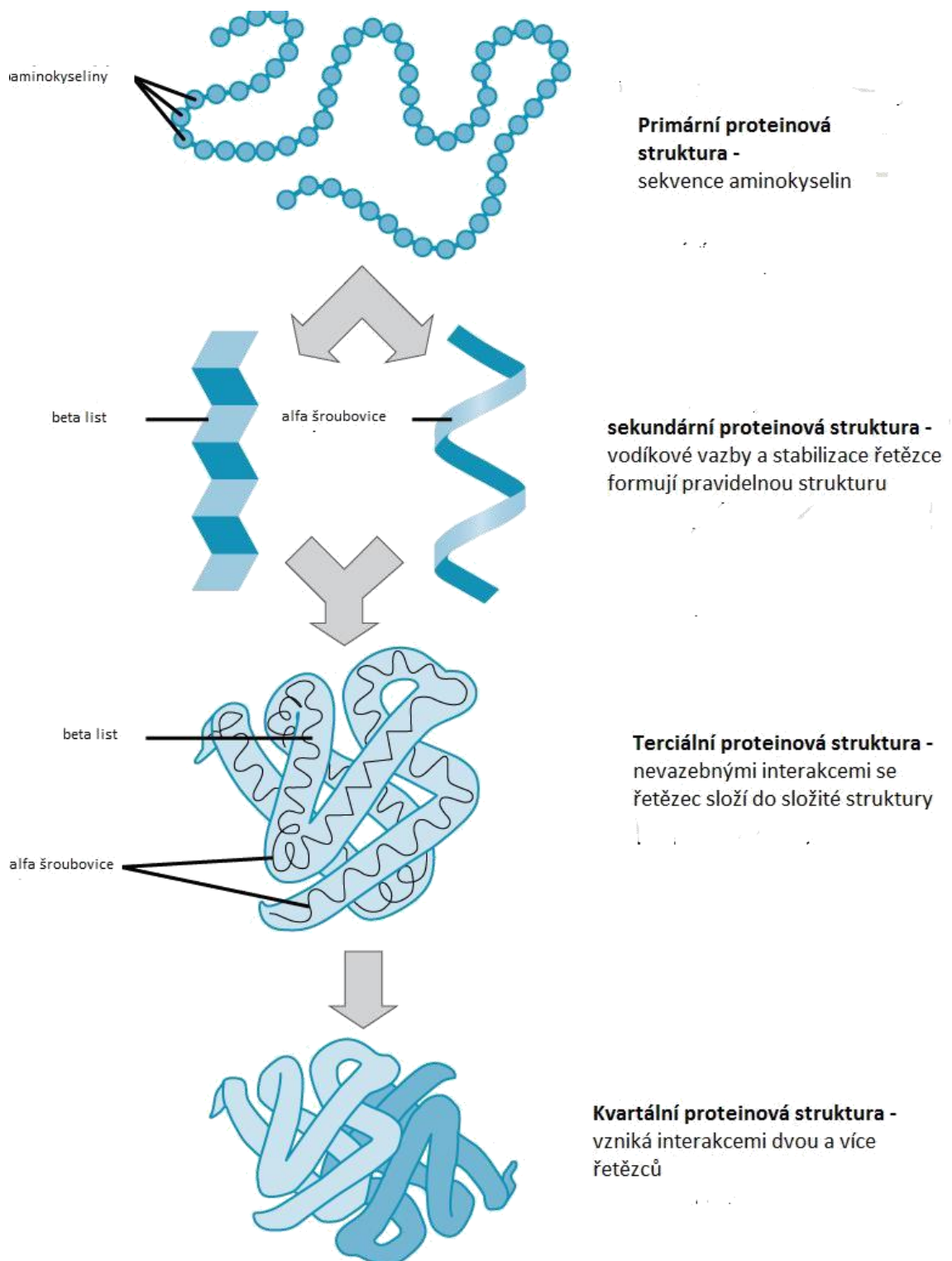
3.1 Proteiny

Proteiny, neboli bílkoviny jsou vysokomolekulární organické polymerní látky, skládající se z aminokyselin propojených peptidickou vazbou. Obsahují přes 100 jednotek aminokyselin a celková molekulová hmotnost přesahuje 10 000. Samotná peptidická vazba spočívá v kovalentní

vazbě karboxylové skupiny jedné molekuly s aminoskupinou molekuly druhé. V lidském těle jsou proteiny tvořeny výhradně aminokyselinami v L – konfiguraci a vznikají jejich polykondenzací. V lidském těle zastávají proteiny široké spektrum funkcí, například stavební (keratin kolagen), transportní (hemoglobin), regulační nebo signální (růstové faktory). [17]

Strukturu proteinů rozdělujeme na primární, sekundární, terciální a kvartérní.

Primární struktura je určena pořadím aminokyselin spojených kovalentními vazbami. Sekundární struktura je určena energetickou stabilizací primárních řetězců vodíkovými můstky. Taková struktura se uspořádá nejčastěji do α -helixu nebo β -listu. Terciální struktura určuje celkové prostorové uspořádání, které je závislé na interakcích vzdálených segmentů a postranních řetězců proteinu. Za příklad takových interakcí lze uvést disulfické můstky nebo Van der Waalsovy síly. Kvartérní struktura vzniká interakcí dvou a více různých polypeptidických řetězců.



Obrázek 2: základní struktura proteinů [18]

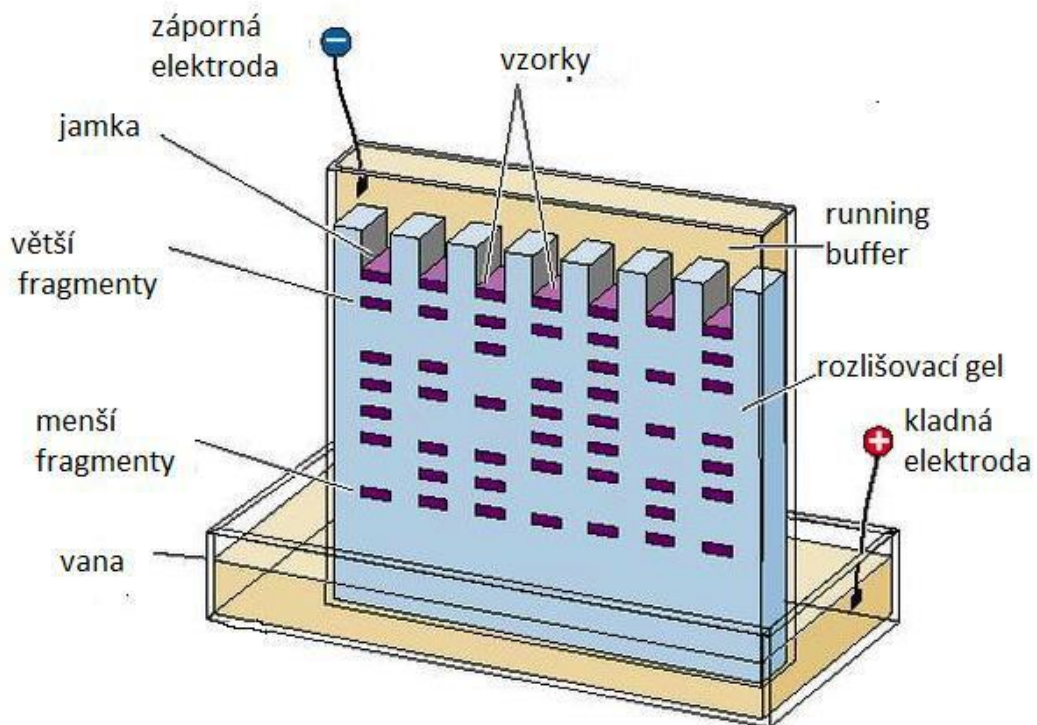
3.2 Metody analýzy proteinů

3.2.1 Analýza pomocí elektroforézy SDS-PAGE

Elektroforéza patří mezi elektromigrační metody, tedy metody využívající pohybu elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Pro analýzu proteinů je nejvhodnější elektroforéza v PAGE (polyakrylamidovém) gelu, který je tvořen dlouhými vlákny akrylamidu spojenými vlákny N-N methylen bisakrylamidu. Důležitou variací této metody je provádění elektroforézy za přítomnosti SDS (sodium dodecyl-sulfát), který se v jistém poměru váže na zkoumané bílkoviny, maskuje jejich vlastní náboj a přispívá i k jejich denaturaci. Je tedy možné provádět separaci pouze na základě molekulové hmotnosti proteinů.

Průběh samotné metody spočívá ve vložení gelu mezi dvě nádoby naplněné alkalickým pufrům, do kterého jsou poté ponořeny elektrody. Připravený vzorek je následně aplikován do jamek v horní části gelu. Vzhledem k bezbarvosti proteinů je třeba přidat barviva, jakým je například Coomassie brilliant blue. V případě potřeby detekce specifického proteinu je možné využít metody Western blot, kdy jsou po zkončení el.forézy proteiny přeneseny na povrch membrány, na které je hledaný protein identifikován specifickými protilátkami. [19]

Alternativou je barvení pomocí stříbrných iontů. Tato metoda pro některé proteiny může dosahovat vysoké citlivosti (do jednotek nanogramů), nicméně provedení je složitější a výsledný obraz může obsahovat různé chyby. [20]



Obrázek 3: Základní schéma SDS-PAGE elektroforézy [21]

3.2.2 Metoda podle Bradfordové

Jedná se o nejrozšířenější metodu pro měření koncentrace proteinů. Využívá změny absorbance světla barviva Coomassie brilliant blue G250. V kyselém pH se trifenylová skupina tohoto barviva váže na nepolární části proteinů a anion sulfokupiny na bazické skupiny na vedlejších řetězcích. Standardně se smíchá 20 μ l vzorku se 180 μ l činidla Bradfordové. Poté je měřena absorbance při 595 nm. Výsledek je poté porovnán s kalibrací provedenou na známém vzorku, kterým většinou bývá BSA. Výhodou této metody je jednoduchost, citlivost (3x-4x citlivější než Lowryho metoda) a také časová nenáročnost, kde inkubace vzorku trvá pouhých 5 minut. Nevýhodou je velké množství interferujících látek, například tenzidů, které už v malém množství znehodnocují měření. [22]

Mimo metody Bradfordové lze provádět řadu dalších analytických metod mezi které patří Biuretova a z ní odvozená Lowryho metoda, které jsou založeny na reakci peptidické vazby s měďnatými ionty v alkalickém prostředí nebo metoda BCA ve které je oproti předchozím použita i kyselina bicinchoninová. Různé proteiny lze také zjistit pomocí analýzy UV spektra. [19]

3.3 Růstové faktory

Růstové faktory (angl. growth factors) jsou biologicky aktivní polypeptidy, které hrají významnou roli v životním cyklu buněk. RF se váží na specifické receptory na povrchu buněk, ve které mohou indukovat velké množství pochodů například stimulaci či inhibici proliferace, diferenciaci, buněčnou adhezi nebo chemotaxi. Běžně se vyskytují v ECM nebo trombocytech odkud jsou dle potřeby uvolňovány. [23] Reakce buněk na RF a jejich účinnost je závislá na koncentraci, koncentračním gradientu, okolním prostředí a životnosti a kombinaci různých RF se kterými přijdou do styku. Některé růstové faktory mohou stimulovat více typů buněk zatímco jiné jsou specifické jen pro jeden typ. Díky širokému spektru jimi indukovaných dějů se v poslední době zvyšuje zájem o jejich využití v regenerativní medicíně. Problémem pro jejich aplikaci je však nedostatečná fyzikální a chemická stabilita, která vede ke snadné ztrátě biologické aktivity při manipulaci, komplikující jejich využití, stejně jako jejich krátká životnost po vypuštění do organismu.[24]

| | |
|--|--|
| Transformační růstový faktor, beta-I; TGFB1 | Kontrola proliferace a diferenciac různých typů buněk |
| Destičkový růstový faktor, alpha polypeptide; PDGFA | Spouští dělení pro pojivové tkáně |
| Destičkový růstový faktor, beta polypeptide; PDGFB | Vyvolává buněčnou proliferaci a potlačuje apoptózu |
| Destičkový růstový faktor C;; PDGFC | Zvyšuje pohyblivost mezenchymálních, endotelových a nervových buněk |
| Destičkový růstový faktor D;; PDGFD | Napomáhá při vývojových a fyziologických procesech |
| Inzulínu podobný růstový faktor I;; IGF1 | Napomáhá expresi růstových hormonů |
| Fibroblastový růstový faktor I;; FGF1 | Vyvolává expresi jaterních genů a proliferaci fibroblastu |
| Epidermální růstový faktor;; EGF | Vyvolává diferenciaci specifických buněk |
| vaskulární endotelový růstový faktor A; VEGFA | Podporuje dělení vaskulárních endotelových buněk, spouští angiogenezi |
| vaskulární endotelový růstový faktor B;; VEGFB | Reguluje fyziologii krevních buněk a vázání lipidů na periferní tkáně |
| vaskulární endotelový růstový faktor C; VEGFC | Vyvolává angiogenezi a růst endotelových buněk |

Tabulka 2: některé růstové faktory a jejich využití [25]

3.4 Trombocyty

Trombocyty (krevní destičky), jsou bezjaderná tělíška nacházející se v plazmě savců. Jejich průměr se obvykle pohybuje mezi 1 – 2 μm . Jejich tvar je v základu diskoidní, nicméně se mění podle úrovně jejich aktivace. V krvi se obvykle vyskytují v koncentracích $150 - 350 \times 10^9/l$ a jejich průměrná délka života je 8 – 10 dní. Trombocyty jsou tvořeny megakaryocyty uvnitř

dlouhých kostí.

Trombocyty mají tři hlavní funkce, jimiž jsou hemostáze (zástava krvácení), regenerativní procesy a ovlivňování funkce endotelu. Během jejich plnění dochází k interakci k porušenou tkání a následné aktivaci trombocytu. Aktivita trombocytů je závislá na jejich velikosti a stáří, kde větší a mladší trombocyty vykazují vyšší aktivitu. [26]

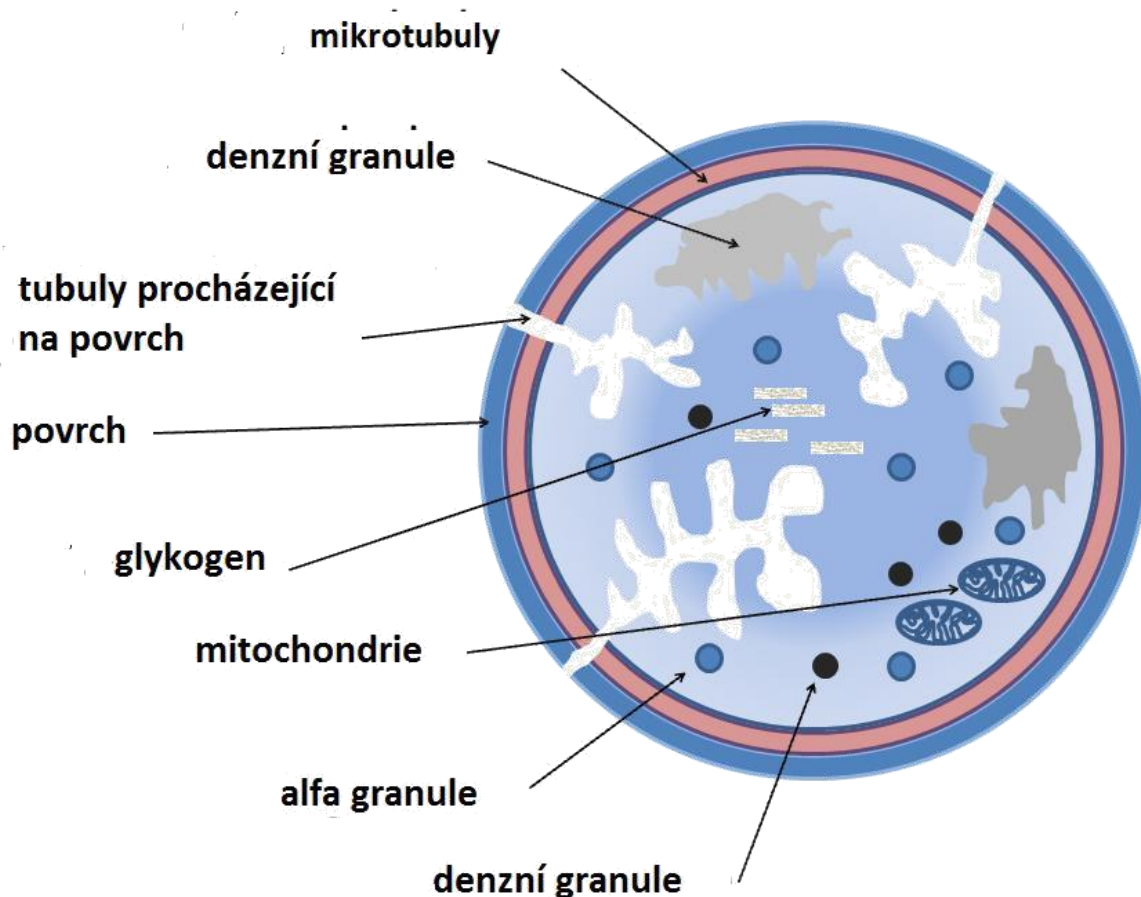
Proces aktivace sestává z několika podčástí, kdy první část spočívá v adhezi trombocytů ke složkám extracelulárního matrixu (např. kolagenu). V dalším kroku dojde k metabolickým a morfologickým změnám v trombocytu, které se projevují změnou jeho tvaru z diskoidního na kulatý, doprovázeného vysunutím panožek. [27]

Následně dojde k jejich agregaci, tedy vzájemnému shlukování, které je indukováno sekrecí aktivačních látek.

Poté dochází ke smrštění agregovaných trombocytů za současného tvoření fibrinové sítě (fibrinolýza). Také dochází k vypouštění bioaktivních látek účastnících se různých fází regenerace tkáně.

Biologicky aktivní látky jsou v trombocytu uchovávány ve formě granulí tří základních typů:

1. typem jsou α -granule. S velikostí 200-400 nm jsou to největší granule a vyskytují se v počtu 50-60 granulí na trombocyt. Obsahují látky účastnící se regenerace tkáně jako jsou Von Willebrandův faktor, destičkový faktor 4 a další růstové faktory a látky zajišťující interakci trombocytů s ECM např. Fibronectin nebo P-selectin.
2. Typem granulí jsou denzní granule. Mají velikost okolo 150 nm a v jednom trombocytu jich je obsaženo 3-8. Obsahují velké množství vápenatých a fosfátových iontů, ADP či serotoninu. Tyto látky napomáhají agregaci trombocytů a vazokonstrikci (stažení cév).
3. Posledním typem granulí jsou lysozomy, obsahující především lysozomální enzymy. Ty jsou spojovány s regulací tvorby trombu a remodelací ECM.



Obrázek 4: Schéma složení trombocytu [28]

3.5 Plazma pobahá na trombocyty (PRP)

Plazma bohatá na trombocyty (PRP) je roztok tvořený z krevní plazmy, obsahující vysokou koncentraci trombocytů. Je možné ji využít jako bohatý zdroj velkého množství biologicky aktivních látek včetně růstových faktorů obsažených v trombocytech v biologicky relevantních poměrech. [29] Kromě vhodných poměrů koncentrací mezi další výhody patří možnost vyrábět PRP z krevní plazmy pacienta a tím zabránit reakci imunitního systému a jednoduchá a velmi rychlá příprava. [30]

Při výrobě PRP je třeba vzít v potaz množství faktorů, které ovlivní vlastnosti produktu například způsob odebrání krve, použitá nádoba, výběr vhodného antikoagulantu a skladovací teplota. Všechny tyto parametry mohou mít vliv na aktivaci obsažených trombocytů, která nemusí být žádaná.

3.5.1 Metody výroby PRP

Jsou 2 základní metody výroby PRP, a to tzv. PRP metoda a Buffy coat metoda. Obě metody

využívají jako zdroj čerstvě odebranou lidskou krev.

Při PRP metodě je krev pacienta nechlazená a obsahující antikoagulanty (zabraňující aktivaci trombocytů) centrifugována za nižších otáček tak, aby došlo k separaci krevních frakcí. Frakce obsahující krevní destičky je následně odebrána a odděleně znovu centrifugována ale za vysokých otáček čímž dojde k dalšímu rozdělení, kde plazma chudá na trombocyty (PPP) zaujímá horní část nádoby, PRP je obsažena ve spodní části a na dně se tvoří usazenina tvořená trombocyty. Následně jsou vyšší frakce odebrány a usazenina je rozpuštěna v malém množství plazmy.

Další možností výroby PRP je Buffy coat metoda. Při ní je krev o pokojové teplotě centrifugována velmi vysokými otáčkami. Při ní je krev rozdělena na frakci červených krvinek u dna, buffy coat fázi obsahující trombocyty a leukocyty uprostřed a PPP frakci ve vrchní části nádoby. Buffy coat fázi odebranou z roztoku je následně třeba zbavit obsažených leukocytů. To je možné buď další centrifugací ale za nízkých otáček nebo použitím leukocytového filtru. [31]

Jsou rozeznávány 4 základní typy PRP v závislosti na koncentraci obsažených složek a vnitřní architektuře:

1. „čisté“ PRP – obsahuje nízkou koncentraci leukocytů a po aktivaci má jen slabou fibrinovou síť
2. PRP s leukocyty – obsahuje vyšší koncentrace leukocytů a slabou fibrinovou síť, je komerčně nejvyužívanější formou PRP
3. „čistý“ trombocyty obsahující fibrin (PRF) – v produktu je nízká koncentrace leukocytů a obsahuje hustou fibrinovou síť
4. leukocyty obsahující PRF – obdobný výše zmíněnému ale s vyšší koncentrací leukocytů

| General category | Specific molecules | Physiological role |
|--|--|---|
| Adhesive proteins | Fibrinogen, fibronectin, vitronectin, thrombospondin-1, von Willebrand factor, laminin-8 | Cell contact interactions, cellular adhesion, chemotaxis, ECM composition, clotting |
| Clotting factors and associated proteins | Factor V, factor XI, protein S, antithrombin, tissue factor pathway inhibitor | Thrombin activation and its regulation, eventual fibrin clot formation |
| Fibrinolytic factors and associated proteins | Plasminogen, plasminogen activator inhibitor, α -2 antiplasmin, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor | Plasmin production and regulation |
| Proteases and anti-proteases | Tissue inhibitor of metalloproteases 1-4 (TIMP 1-4), MMP-1, -2, -4, -9, α -1 antitrypsin | Regulation of matrix degradation, regulation of cellular behavior, etc. |
| Growth factors, cytokines and chemokines | TGF- β , PDGF, insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, FGF, EGF, VEGF, ECGF, KGF, GM-CSF, hepatocyte GF, TNF α , RANTES, IL-8, IL-1 β , BMP-2, -4, -6 | Chemotaxis, cell proliferation and differentiation, promotion of ECM production, regulation of inflammation, angiogenesis |
| Antimicrobial proteins | Thrombosclidins, kinocidins | Bactericidal and fungicidal properties |
| Membrane glycoproteins | α IIb β 3, α v β 3, CD-40 ligand, P-selectin, tissue factor, PECAM-1, CD63 | Platelet aggregation and adhesion, inflammation, platelet-leukocyte interactions |
| Lipids | Sphingosine-1-phosphate, HETES, thromboxane B ₂ , prostaglandin F _{2α} , leukotriene B ₄ , lipoxin A ₄ | Inflammation modulation, cell migration and proliferation, etc. |
| Basic proteins and others | Platelet factor 4, β -thromboglobulin, endostatin, connective tissue activating peptide III, chondroitin-4 sulfate, albumin, immunoglobulins G and M | Regulation of endothelial cell chemotaxis and angiogenesis, vascular modeling, platelet activation, etc. |

Tabulka 3: Tabulka základních biologicky aktivních látek obsažených v PRP [29]

4 Funkcionalizace scaffoldů pro TE

Vzhledem k mnohdy nedostačujícím vlastnostem čistých scaffoldů (biokompatibilita, mechanické vlastnosti) pro přímou aplikaci, je často nezbytné provést jejich funkcionizaci různými látkami za účelem jejich optimalizace. Do dnešní doby bylo vyzkoušeno velké množství fyzikálních, chemických i biologických metod k úpravě vlastností scaffoldů od jednoduchých povrchových úprav zvyšujících hydrofilicitu po výrobu několivrstvých scaffoldů obohacených různými biomolekulami.

4.1 Funkcionalizace pomocí bioaktivních látek

Podle požadovaného použití lze upravit scaffoldy pomocí širokého spektra biologicky aktivních látek od chemických sloučenin (např. Kyselina askorbová, DMSO, galaktóza), přes různé proteiny (kolagen, fibronectin, gelatin) nebo krátké proteinové řetězce až po růstové faktory nebo celé buňky. Kvůli problematické manipulaci s RF získává na oblibě také úprava pomocí DNA fragmentů. [30] Alternativou k používání specifických molekul je inkorporace PRP, která obsahuje široké spektrum bioaktivních látek v organismu přirozených poměrech. Ve funkcionizovaných vláknech je ovšem třeba brát ohled na koncentraci enkapsulovaných bioaktivních látek a rychlost jejich uvolňování, neboť při příliš rychlém uvolňování bývají organismem vyloučeny bez požadovaného efektu nebo mohou působit i škodlivě. [31]

4.1.1 Přímé smíchání bioaktivních látek s polymerem

Nejpřímochařejší možností je smíchat bioaktivní látky s roztokem polymeru ještě před jeho vytvrzením. Tato metoda se ovšem nevyhne problémům, mezi které patří změna mechanických vlastností a struktury výsledného scaffoldu nebo styk citlivých bioaktivních látek (např. Růstových faktorů) s rozpouštědlem, které může způsobit ztrátu jejich funkce. [33]

4.1.2 Výroba kompozitních scaffoldů

Vzhledem k povaze zvláknovacího procesu je možné vytvořit vlákna jen z PRP, růstových faktorů nebo jiných složitých biostruktur (např. buněk nebo bakterií). Taková vlákna jsou charakterizována vysokou biokompatibilitou ale jejich mechanické vlastnosti nesplňují požadavky pro přímou aplikaci. Řešením se jeví tvorba kompozitů vláken PRP s jiným polymerem zvyšujícím mechanickou odolnost výsledného scaffoldu. Pro náhradu tvrdých tkání je vhodné obohacení

scaffoldu biokeramickým materiálem. Další možností je uzavření bioaktivních látek do polymerních kapslí (např. metodou dvojité emulgace, freeze-dryingu nebo electrosprayingu), které mohou být následně inkorporovány do vláken stejně, jako samy vypuštěny do těla jako pouhé rezervoáry léčivých látek. [32]

4.1.3 Metoda koaxiálního elektrospinningu

Jedná se o metodu odvozenou od klasického el.spinningu, s tím rozdílem, že zvlákňování neprobíhá jen z jednoho polymerního roztoku ale ze dvou, přičemž jeden tvoří plášť výsledného vlákna a druhý jádro. Tato metoda nabízí využití v oblasti funkcionalizace snadno denaturujícími biomolekulami (růstové faktory nebo DNA) či dokonce živými buňkami, protože díky použití dvou roztoků nemusí biomolekuly v jádře vlákna přijít do styku s organickým rozpouštědlem použitým při tvorbě pláště, který by jinak mohl ohrozit jejich aktivitu. Vlákná vyrobená touto metodou také dovolují postupné uvolňování obsažených biomolekul. V poslední době se experimentuje i s tzv. triaxiálním el.spinningem, kde produkt není tvořen dvěma ale třemi polymery. [34]

4.1.4 Povrchové modifikace vláken

Vedle přímé inkorporace bioaktivních látek do scaffoldů je možné je vhodnou modifikací umístit jen na povrch materiálu. Toho lze dosáhnout buď kovalentním navázáním aktivních látek, či nekovalentní fyzickou adsorbci. [33]

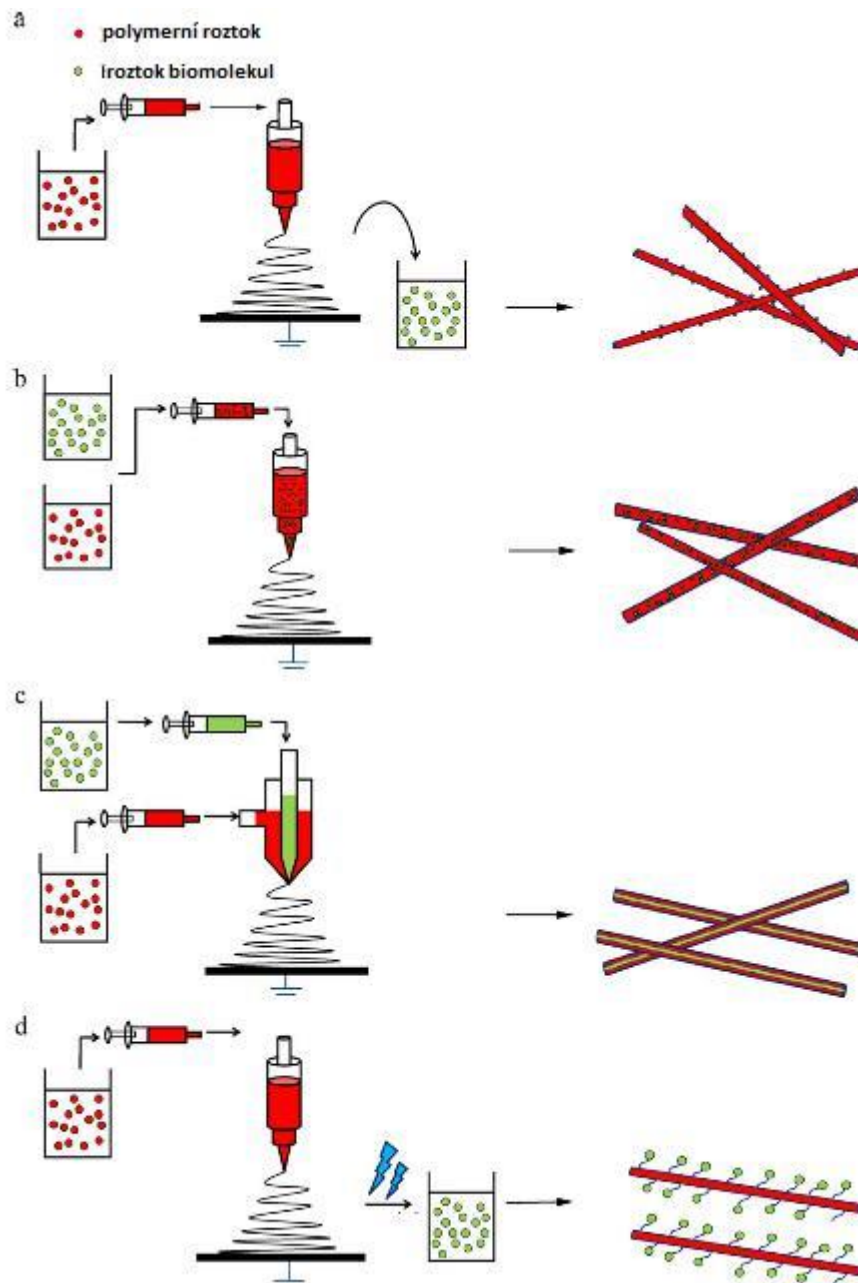
Kovalentní navázání

Tato metoda spočívá v navázání biologických látek kovalentní vazbou na povrch scaffoldu. Takto navázané účinné látky vykazují postupné uvolňování, které je úměrné přerušení vazeb závisících na rychlosti degradace. Často je před samotným navázáním třeba umístit na polymer funkční skupiny, přes které by mohlo dojít k navázání. K tomu je možné využít široké škály metod, například hydrolýzy, plazmových úprav, UV indukované polymerace či kopolymerace s látkou přirozeně obsahující požadované skupiny. Nejčastěji jsou používány karboxylové a amino skupiny.

Pro molekuly s velkým množstvím funkčních skupin může být problémem vznik vazby na různých místech, v některých případech narušující jejich funkci. Jako potenciální rozšíření lze uvést metodu cross-linking, ve které dochází ke vzniku vazby mezi navázanými aktivními látkami za vzniku polymerní sítě s odlišnými mechanickými vlastnostmi.

Fyzická adsorbce

Jedná se o nenáročnou metodu spočívající v inkubaci scaffoldu v roztoku obsahujícím bioaktivní látky. Ty se k němu navážou za pomoci nevazebných interakcí. Účinnost takového navázání lze zvýšit povrchovou úpravou zvyšující hydrofilicitu. Pozitivem této metody je jednoduchost a šetrnost přípravy, umožňující práci s méně stabilními látkami (např. RF), na druhou stranu díky slabším vazbám může docházet k nerovnoměrnému uvolňování uložených látek. Tato metoda je používána hlavně pro hydrogelové scaffoldy. Pro zvýšení účinnosti lze tuto metodu kombinovat s metodou kovalentního navázání.



Obrázek 5: Schématické zobrazení základních metod funkcionalizace nanovláken [33]

- a. Fyzikální adsorbce
- b. Přímé smíchání s polymerem
- c. Koaxiální elektrospinning
- d. Kovalentní navázání

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Materiály a metody

5.1 Použité přístroje

| přístroj | výrobce |
|---|-----------------------|
| Rastrovací elektronový mikroskop Tescan Vega 3 SB | Tescan Brno s.r.o |
| SDS-PAGE elektroforéza | VWR international |
| SDS-PAGE elektroforéza | Biorad |
| Elx808 absorbance microplate reader | Biotek |
| Centrifuga Z36HK | Hermle labortechnik |
| Zlatička Quorum Q150ES | Quorum technologies |
| Zdroj | Biorad |
| Vodní lázeň LCB-6D | Labtech international |
| Hlubokomrazicí box MDF-033V | Sanyo electric Co. |
| Nanospider NS1S500U | Elmarco |
| Váhy | |
| Centrifuga 5415C | Gerätebau Eppendorf |
| Lineární pumpa HDS 100 | KD Scientific |
| Zdroj vysokého napětí SL 150 | Spellman |
| NIS Elements (Software) | Nikon instruments |

Tabulka 4: použité přístroje

5.2 Použité chemikálie

| Chemikálie | Výrobce |
|--------------------------------|-------------------|
| 30% akryl-bisakrylamid mix | Amresco |
| Persulfát amonný | Lach:NER |
| Bromfenolová modř | Amresco |
| BSA – bovinní sérový albumin | VWR international |
| Coomassie brilliant blue G-250 | Sigma Aldrich |
| Coomassie brilliant blue R-250 | Roth |
| Ethanol 96,8% | Penta s.r.o |
| Glycerol | Roth |
| Glycin | VWR international |
| Chloroform | Penta s.r.o |
| Kyselina fosforečná | Penta s.r.o |
| Kyselina chlorovodíková | Penta s.r.o |
| Kyselina octová | Penta s.r.o |

| | |
|--|-------------------------|
| Methanol | Penta s.r.o |
| Protein MW marker Wide range K494 | Amresco |
| PVA Mowiol 18 000 MW | Kurakay |
| PVA Mowiol 37 000 MW | Kurakay |
| PVA Mowiol 130 000 16% | Novácké chemické závody |
| SDS – dodecylsírán sodný | Sigma Aldrich |
| TRIS – Tris(hydroxymethyl)amino-methan | Amresco |
| B-merkptoethanol | Roth |

Tabulka 5: použité chemikálie

5.3 Použité roztoky

| Roztoky | Složení | Poznámka |
|----------------------------------|---|-------------------------------------|
| 10% SDS | 10 g SDS 90 ml dH ₂ O | později doplněno na 100 ml |
| 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 | 9,09 g Tris 40 ml dH ₂ O HCl | doplněno dH ₂ O na 50 ml |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 18,7 g Tris 80 ml dH ₂ O HCl | |
| 10% amonium persulfate | 1 g APS 9 ml dH ₂ O | |
| 2x SDS-PAGE vzorkový pufr | 10 ml Tris-HCl pH 6,8 12 ml 10% SDS 30 ml glycerol 15 ml beta-merkptoethanol 1,8 mg bromfenolová modř | |
| 10x SDS-PAGE procesní pufr | 800 ml dH ₂ O 10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g glycin | |
| Coomasie blue barvicí roztok | 450 ml methanol 100 ml octová kyselina 400 ml dH ₂ O 2,5 g CBBR | |
| Coomasie blue odbarvovací roztok | 450 ml methanol 100 ml kyselina octová 400 ml dH ₂ O | |
| Coomasie blue sušící roztok | 450 ml methanol 100 ml kyselina octová 30 ml glycerol 370 ml dH ₂ O | |
| barvení stříbrem roztok A | 50 ml ethanol 12 ml kyselina octová 38 ml dH ₂ O | trvanlivost max. 1 měsíc |

| | | |
|---------------------------|--|--|
| | 50 ul 37% formaldehyd | |
| barvení stříbrem roztok B | 15,7 mg pentahydrát thiosíranu sodného 100 ml dH ₂ O | |
| barvení stříbrem roztok C | 100 mg dusičnan stříbrný 100 ml dH ₂ O | třeba chránit před světlem trvanlivost 1 měsíc ale optimální vždy mít čerstvý |
| barvení stříbrem roztok D | 3 g uhličitan sodný 50 um 37% formaldehyd 2 ml roztok na barvení stříbrem C 98 ml dH ₂ O | trvanlivost 1 měsíc |
| 25 mM EDTA | 730 mg EDTA 100 ml dH ₂ O | |
| Činidlo Bradfordové | 10 mg 5 ml ethanol 10 ml kyselina fosforečná 10 mg CBBG | doplnit dH ₂ O na 100 ml a skladovat při 4°C |
| Standard BSA | 10 mg BSA 90 ml dH ₂ O | Zamrazit na -20°C |

Tabulka 6: použité roztoky

5.4 Metody

5.4.1 SDS-PAGE elektroforéza

V této práci byla pro analýzu proteinů využívána vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Koncentrace použitého gelu byla 8 a 12%. Každá koncentrace je vhodná k detekci proteinů jiných molárních hmotností. Pro přípravu gelu jsou použity destilovaná voda, 10% SDS, Tris-HCl 8,8 pH, 30% akryl-bisakryl roztokem, 10% ammonium persulfátem (APS) a TEMEDem. Ty jsou podle tabulky (viz příloha 1) smíchány. [36] APS a TEMED jsou přidány jako poslední protože spouští polymeraci. Roztok je ihned napipetováno mezi připravená skla. Ve skle jsou ponechány cca 3 cm místa, kam je prozatím napipetována voda, aby se hladina gelu vyrovnala. Po ztvrdnutí gelu je voda odstraněna a na její místo je napipetován zaostrovací gel vyrobený podle tabulky (viz příloha 2). Ihned po napipetování zaostrovacího gelu je do něj vložen hřeben, který připraví jamky pro nanesení vzorku.

Vzorku je připravováno 20 μ m (16 μ m vzorku a 4 μ m sample bufferu). Markeru je připraveno 10 μ m (5 μ m Wide range K494 markeru a 5 μ m sample bufferu). Poté jsou připravené vzorky i marker 10 minut vařeny při 90°C. Skla s gely jsou vložena do elektroforetické vany, do které je nalit running buffer (viz tabulka 6). Do jamek v zaostrovacím gelu jsou potom pomocí loadovacích špiček napipetovány připravené a povařené vzorky. Poté může dojít k zapojení elektroforézy ke zdroji napětí. Pro elektroforézu od WVR International se nejvíce osvědčilo napětí 200V, zatímco pro elektroforézu Biorad je lepší použít 120V. Elektroforéza může trvat od 40 do 120 minut podle zvoleného napětí. Elektroforéza je ukončena když se vzorky přiblíží konci

skel. Po konci elektroforézy jsou gely vyjmuty a je odstraněn zaostřovací gel. Pak je možné přistoupit ke zvolené metodě barvení.

Barvení proteinů pomocí Coomassie brilliant blue

Při barvení Coomassie brilliant blue je gel vložen do nádoby s barvicím roztokem, kde je ponechám přes noc. Poté je přesunut do odbarvovacího roztoku, kde zůstane dokud nedojde k odbarvení gelu (kromě požadovaných proteinů) což může trvat odhadem 14 hodin. Pokud při odbarvování roztok sám zmodrá je vhodné jej nahradit čerstvým.

Barvení proteinů pomocí stříbra

Během barvení stříbrem je vyjmutý gel umístěn do roztoku A (viz. tabulka 6) po dobu 1 hodiny. Poté je třikrát po dvaceti minutách promyt roztokem ethanolu a následně 1 minutu v roztoku B. Pak je třikrát 20 vteřin promyt destilovanou vodou, 30 minut uložen v roztoku C a znovu promyt třikrát destilovanou vodou. Následně je vložen do D roztoku, kde se ponechá dokud se na gelu neobjeví viditelné bandy (doba reakce může být několik minut až 2 hodiny). Když jsou obarvené proteiny viditelné, gel je přesunut do roztoku E pro zastavení vyvolávání. Je třeba gel přemístit z roztoku D do roztoku E ještě když zaznamenaná maxima nejsou příliš sytá, protože reakce ještě v roztoku E krátce pokračuje a kdyby trvala příliš dlouho elektroforeogram by mohl celý zčernat.

5.4.2 Měření celkové koncentrace proteinů Metodou podle Bradfordové

Pro zjištění koncentrace proteinů byla využívána metoda podle Bradfordové, spočívající v měření změny absorbance pro 595 nm tvorbou komplexů proteinů s činidlem Bradfordové. Před samotným měřením je třeba provést kalibraci s nějakým roztokem o známé koncentraci proteinů, aby se z měření dala určit reálná koncentrace proteinů. K tomu je vhodný standard BSA (viz tabulka 6), který byl napipetován postupně v množství 0, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μl a do 100 μl doplněn destilovanou vodou. Poté bylo z každého roztoku napipetováno 20 μl a smícháno se 180 μl činidla Bradfordové. Takto připravené vzorky se nechaly 5 minut inkubovat a následně byla změřena jejich absorbance a v Excelu byla z naměřených dat vypočítána kalibrační křivka. Poté bylo možné přejít k samotnému měření absorbance vzorků, kde bylo opět 20 μl z každého vzorku smícháno se 180 μl činidla Bradfordové, vzorky se nechaly 5 minut inkubovat a poté byla změřena jejich absorbance. Přepočtem z rovnice kalibrační křivky lze poté vypočítat hodnotu koncentrace obsažených proteinů.

5.4.3 Příprava vzorků pro Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

Po přípravě textilie byly z materiálu vystřiženy čtverce odhadem 2x2 mm, které byly nalepeny

na terčík, který je následně vložen do SEM. Vzhledem k nevodivosti PVA je však nezbytné na vzorky nejdříve naprášit vrstvu zlata o tloušťce 7 nm.

5.4.4 Příprava trombocytárního lyzátu

Lyzát byl připravován z roztoku bohatého na trombocyty (TRS), který byl připraven z krve 4 zdravých pacientů v Krajské nemocnici v Liberci. Tento roztok obsahoval koncentraci trombocytů $931 \cdot 10^6/l$. Roztok byl na 12 hodin zamrazen při -80°C a poté ve vodní lázni ohřát na 37°C . Díky zjištění z minulých prací byl proces zamražení prováděn pouze jednou. Poté byl takový roztok centrifugován za podmínek $900x\ g/30\ \text{min}/20^\circ\text{C}$. Tím se na dně usadily pelety obsahující buněčné membrány od supernatantu obsahujícího převážně proteiny. Následně byl tento supernatant odpipetován do nové zkumavky a uložen při -80°C . [37]

6 Výsledky a diskuze

V této kapitole se věnuji optimalizaci výroby nanovláken PVA funkcionalizovanými trombocytárním lyzátem, které slouží jako model pro optimalizaci výroby vlákenných scaffoldů. Na vyrobených vláknech byla následně zkoumána morfologie vzniklých vláken a také byly prováděny analýzy elektroforézou SDS-PAGE a metodou Bradfordové ke zjištění obsahu proteinů v připravených vláknech.

6.1 Výroba vláken zvlákňováním z jehly

Během prvních experimentů bylo používáno zvlákňování z jehly. Pro něj bylo připraveno několik roztoků, kdy jsme se snažili připravit co nejkonzentrovější roztoky PVA, které by přitom obsahovaly co nejnižší poměr vody k ethanolu (byly zkoušeny poměry 7:3, 8:2, 9:1). Pro přípravu vláken touto metodou se nejvíce osvědčily PVA o molekulové hmotnosti 18 000 a 47 000. Obecně lze říci, že se zvyšující se koncentrací PVA a nižší koncentrací ethanolu byla příprava roztoků komplikovanější až do bodu, kdy nebylo možné jednotlivé složky navzájem smíchat. Nakonec byly připraveny 4 roztoky (viz tabulku 7). Samotné zvlákňování probíhá z injekční jehly umístěné v konstrukci zvyšující stabilitu, kde k vypouštění polymeru byla použita lineární pumpa. Na použitou stříkačku je připojen kladný pól vysokého napětí, zatímco na kolektor kterým byla aluminiová fólie je připojen záporný pól. Parametry procesu byly často upravovány, přesto docházelo k problémům, kdy polymery tuhly na jehle a tím bránily vypouštění polymeru a výsledná vrstva byla kombinací vláken a kapslí.

| Poměr voda:ethanol | 8:2 | | 9:1 | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 18000 | 47000 | 18000 | 47000 |
| Mr PVA | 18000 | 47000 | 18000 | 47000 |
| PVA [g] | 1,4 | 0,75 | 1,6 | 0,85 |
| Destilovaná voda | 2,88 | 3,4 | 3,06 | 3,74 |
| ethanol | 0,72 | 0,85 | 0,34 | 0,42 |

Tabulka 7: složení roztoků PVA pro zvláknování z jehly

6.2 Výroba vláken pomocí technologie Nanospider

Jako alternativa k zvláknování z jehly bylo pro následující experimenty používáno zvláknování technologií Nanospider. Vzhledem k rozdílným možnostem Nanospideru bylo využito PVA o Mw 130 000, které je takto možné zvláknovat i bez použití ethanolu poškozujícího růstové faktory. Cílem byla výroba vláken obsahujících různé koncentrace proteinů. Pro tento účel byly připraveny čtyři roztoky, každý o hmotnosti 100g s koncentracemi TL 5%, 10%, 15% a slepý vzorek neobsahující žádné proteiny. Při samotné výrobě je polymer nalit do nádoby uvnitř „jezdce“, který opakovaně přejíždí po napnuté struně sloužící jako kladný pól a ze které je zvlákněný polymer zachycován na textílii, za kterou je umístěn záporný pól.

| | 0% TL | 5% TL | 10% TL | 15% TL |
|------------------------|-------|-------|--------|--------|
| 12% PVA 130 000 MW | 75g | 75g | 75g | 75g |
| Destilovaná voda | 25g | 20g | 15g | 10g |
| Trombocytární lyzát | 0g | 5g | 10g | 15g |

Tabulka 8: složení roztoků PVA pro 1. zvláknování Nanospider

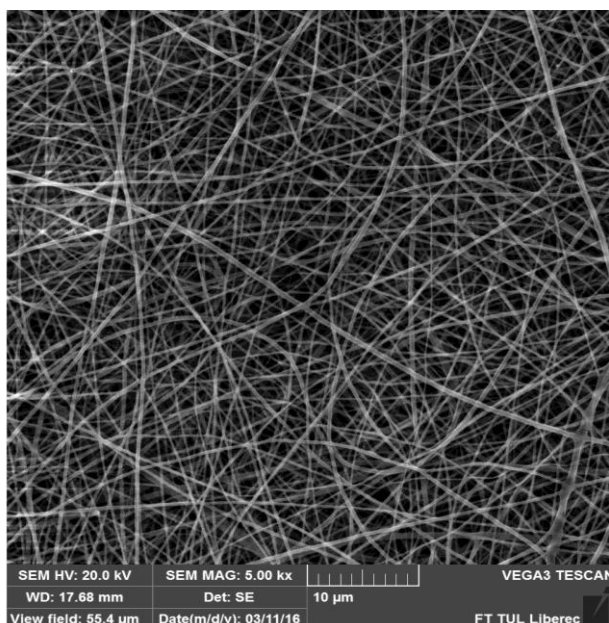
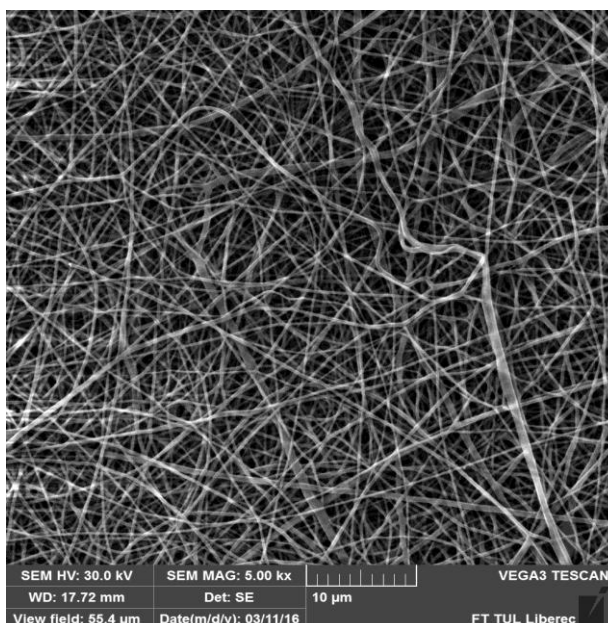
Na rozdíl od minulého experimentu, se namíchání roztoků obešlo bez vážnějších problémů. Samotný proces zvláknování byl však pro roztoky obsahující vyšší koncentrace TL obtížný a bylo třeba upravit několik parametrů (viz tabulku 9).

| | 0% TL | 5% TL | 10% TL | 15% TL |
|-----------------------------------|-------|-------|--------|--------|
| Napětí [kV] | 40 | 45 | 45 | 55 |
| Rychlost cartridge [mm/sec] | 200 | 65 | 60 | 60 |
| Vzdálenost [mm] | 140 | 140 | 140 | 140 |
| Odtah textilie [mm/min] | 20 | 8 | 8 | 8 |
| Vlhkost [%] | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Teplota [°C] | 22 | 22 | 22 | 22 |

Tabulka 9: parametry pro nastavení Nanospideru

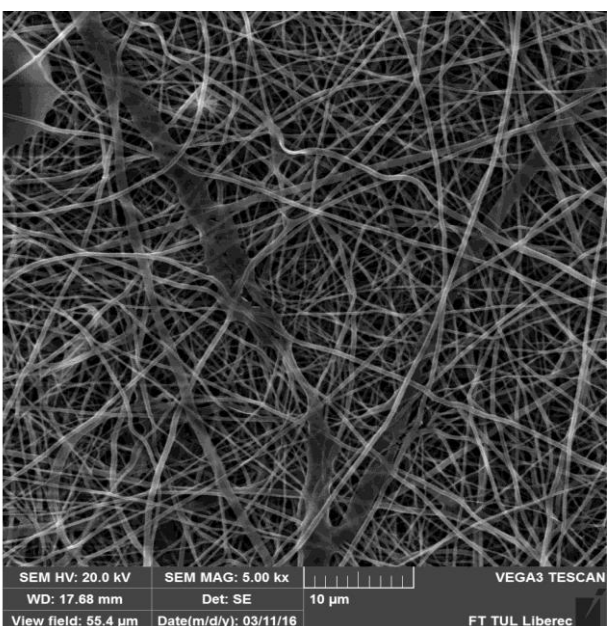
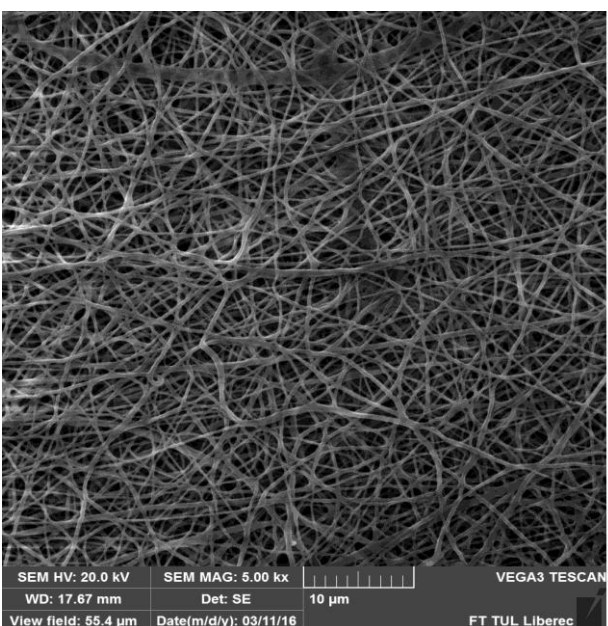
A.

B.



C.

D.



Obrázek 7: snímky ze SEM zvětšeny 5000x A. PVA neobsahující TL B. PVA obsahující 5% TL C. PVA obsahující 10% TL D. PVA obsahující 15% TL

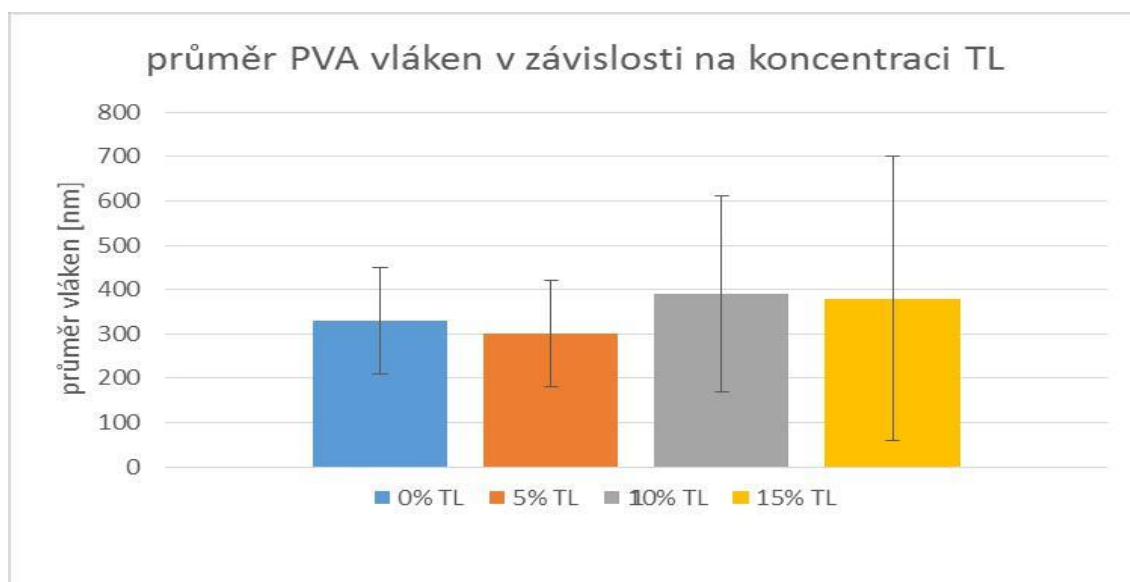
Ze snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) je patrné, že při zvyšující se koncentraci proteinů dochází ke zvyšování množství defektů, jakými jsou shluky vláken a vlákna velkých průměrů. Při zvláknování roztoků o vyšší koncentraci proteinů docházelo k problémům, kdy se vlákna ještě před zachycením na textilií navzájem zachytávala za vzniku velkých shluků, které bránily jejich homogennímu rozložení. Nejvíce se to projevilo u vláken s 10% TL, jejichž rozložení bylo silně nehomogenní, což mohlo ovlivnit následné analýzy uložených proteinů.

Pro zhodnocení výsledků zvlákňování byla vyrobená vlákna analyzována obrazovým softwarem NIS Elements. V něm byly ze snímků pořízených na SEM změřeny průměry 100 náhodných vláken, z nichž byl vypočítán průměr a statistická odchylka.

| koncentrace TL | průměr Vláken [nm] | směrodatná Odchylka [nm] | Minimum [nm] | Maximum [nm] |
|----------------|--------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| 0% TL | 330 | 120 | 170 | 900 |
| 5% TL | 300 | 120 | 120 | 840 |
| 10% TL | 390 | 220 | 180 | 1840 |
| 15% TL | 380 | 320 | 140 | 2970 |

Tabulka 10: průměr vláken pro 1. zvlákňování Nanospider

Tato analýza prokázala, že koncentrace použitého TL nemá vliv na průměr vyrobených vláken. Bylo však zjištěno, že koncentrace TL výrazně ovlivňuje homogenitu vláken, kdy vlákna bez růstových faktorů a s jejich nízkou koncentrací (5% TL) vykazují vysokou homogenitu, která se však s rostoucí koncentrací TL ve vláknech snižuje.



Graf 1: průměrná velikost vláken a statistická odchylka podle koncentrace TL pro 1. zvlákňování

Vzhledem k provedeným analýzám obsažených proteinů (viz kapitolu 6.2), kdy nejvyšší koncentrace byly pro několik nezávislých sad vzorků naměřeny pro vlákna s 10% TL byly pro další zvlákňování upraveny koncentrace výchozích roztoků na 7,5% TL, 10% TL, 12,5% TL a opět slepý vzorek bez trombocytárního lyzátu.

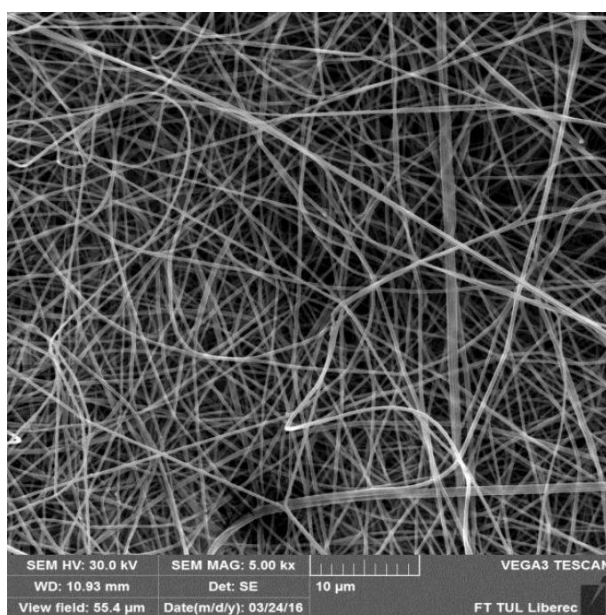
| | 0% TL | 7,5% TL | 10% TL | 12,5% TL |
|---------------------|-------|---------|--------|----------|
| 12% PVA 130 000 MW | 75g | 75g | 75g | 75g |
| Destilovaná voda | 25g | 18,5g | 15g | 12,5g |
| Trombocytární lyzát | 0g | 7,5g | 10g | 12,5g |

Tabulka 11: složení roztoků PVA pro 2. zvlákňování Nanospider

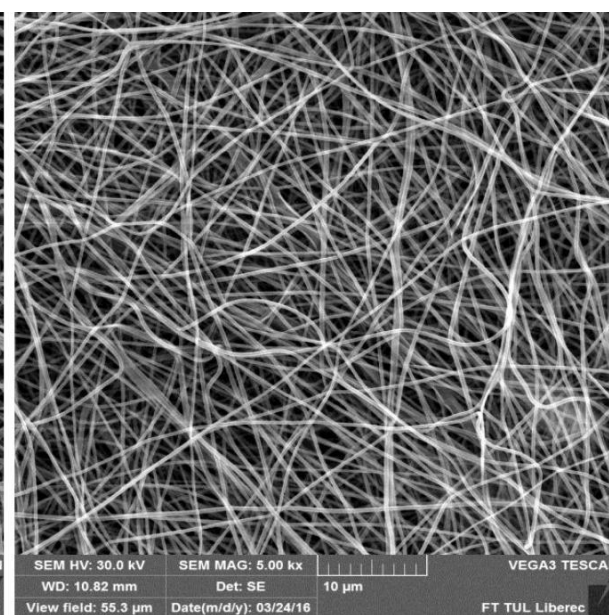
| | 0% TL | 7,5% TL | 10% TL | 12,5% TL |
|-----------------------------|-------|---------|--------|----------|
| Napětí [kV] | 40 | 40 | 50 | 55 |
| Rychlost cartridge [mm/sec] | 205 | 150 | 250 | 300 |
| Vzdálenost [mm] | 136 | 136 | 136 | 136 |
| Odtah textilie [mm/min] | 20 | 10 | 10 | 10 |
| Odtah struny | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Vlhkost [%] | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Teplota [°C] | 22 | 21 | 21 | 21 |

Tabulka 12: parametry pro 2. zvlákňování Nanospider

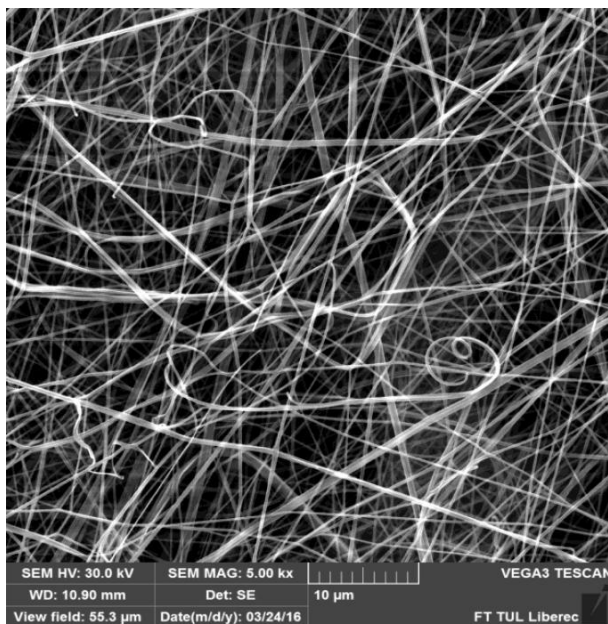
A.



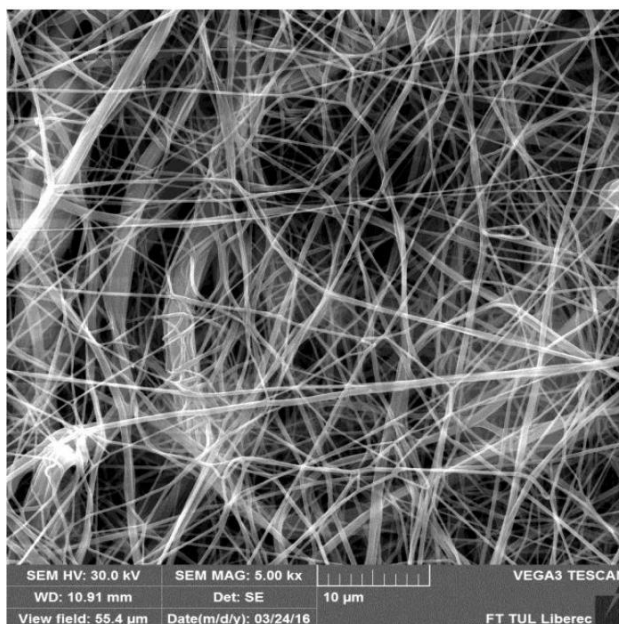
B.



C.



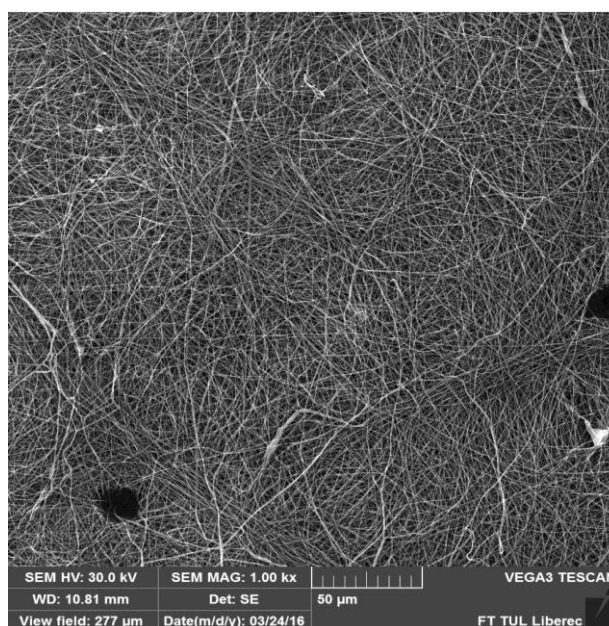
D.



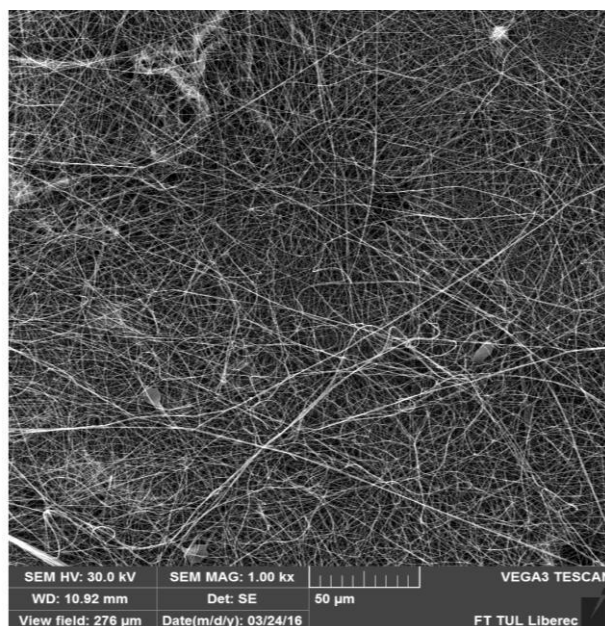
Obrázek 8: snímky ze SEM zvětšeny 5000x a. PVA neobsahující TL b. PVA obsahující 7,5% TL c. PVA obsahující 10% TL d. PVA obsahující 12,5% TL

Stejně jako v minulém zvlákňování lze sledovat, jak se homogenita vláken snižuje s rostoucí koncentrací obsaženého trombocytárního lyzátu. Při zvlákňování PVA s vyšší koncentrací TL docházelo opět k problémům, kdy vlákna tvořila shluky ještě před zachycením na textilií, což vedlo k tomu, že se zachytávala na válec, na který je namotávána záchytná textilie.

A.



B.



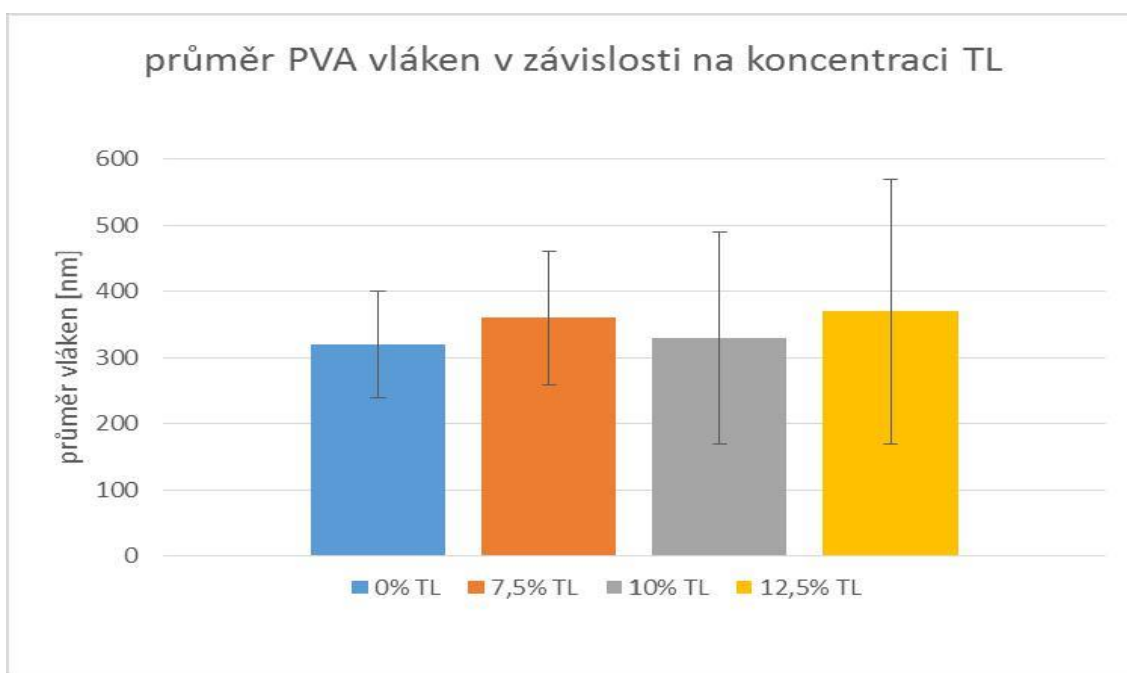
Obrázek 9: snímky ze SEM zvětšeny 1000x a. PVA obsahující 7,5% TL b. PVA neobsahující TL

Během analýzy snímků ze SEM bylo pozorováno, že vlákna obsahující 7,5% TL se samovolně skládají do organizovaných svazků (viz přílohu C). Tento jev byl pozorován jen pro tuto koncentraci a ve dvou na sobě nezávisle vyrobených materiálech.

| Koncentrace TL | Průměr vláken [nm] | Směrodatná odchylka [nm] | Minimum [nm] | Maximum [nm] |
|----------------|--------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| 0% TL | 320 | 80 | 190 | 710 |
| 7,5% TL | 360 | 100 | 190 | 1020 |
| 10% TL | 330 | 160 | 180 | 1090 |
| 12,5% TL | 370 | 200 | 120 | 1640 |

Tabulka 13: průměry vláken pro 2. zvláknění Nanospider

Dle zpracovaných dat lze potvrdit zjištění z předchozí analýzy průměrů vláken, že koncentrace TL v roztoku polymeru nemá vliv na průměr vzniklých vláken. Naopak bylo potvrzeno, že přídavek TL v polymeru zvyšuje nehomogenitu rozložení vláken.



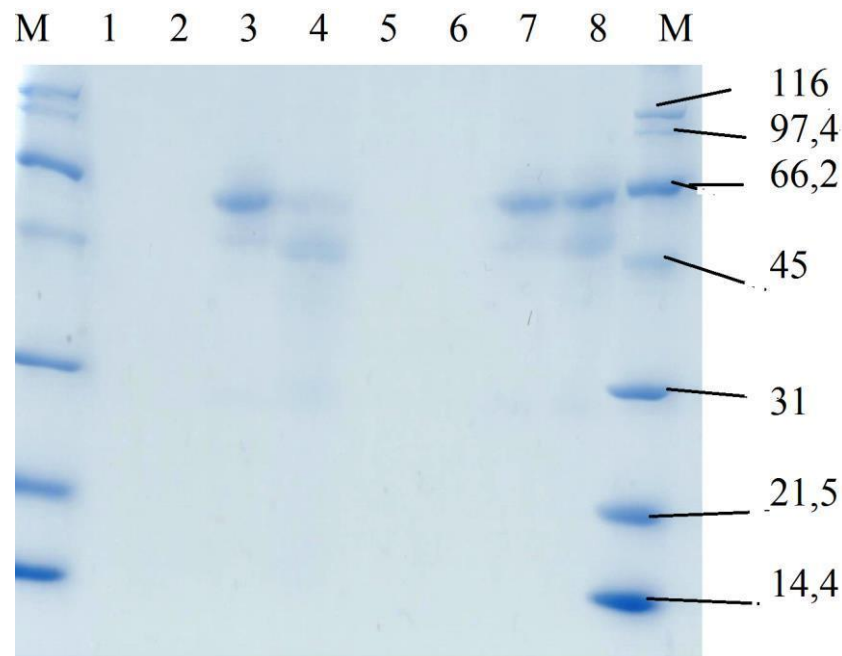
Graf 2: průměrná velikost vláken a statistická odchylka podle koncentrace TL pro 2. zvláknění

6.3 Analýza proteinů ve vláknech PVA

V další části experimentu byla analyzována úspěšnost inkorporace proteinů do vyrobených vláken. Z tohoto důvodu byla připravena sada vzorků, pro kterou bylo z každého polymeru naváženo dvakrát 0,0103g. Jedna sada navážených polymerů byla rozpuštěna ve vodě, takže vzorky obsahovaly všechny proteiny, zatímco v řadě druhé byl polymer nejprve omyt v čistém

chloroformu, a teprve poté rozpuštěn v destilované vodě. Oplach v chloroformu měl zajistit odplavení proteinů z povrchu vláken tak, aby připravený vzorek obsahoval pouze proteiny uložené uvnitř vláken.

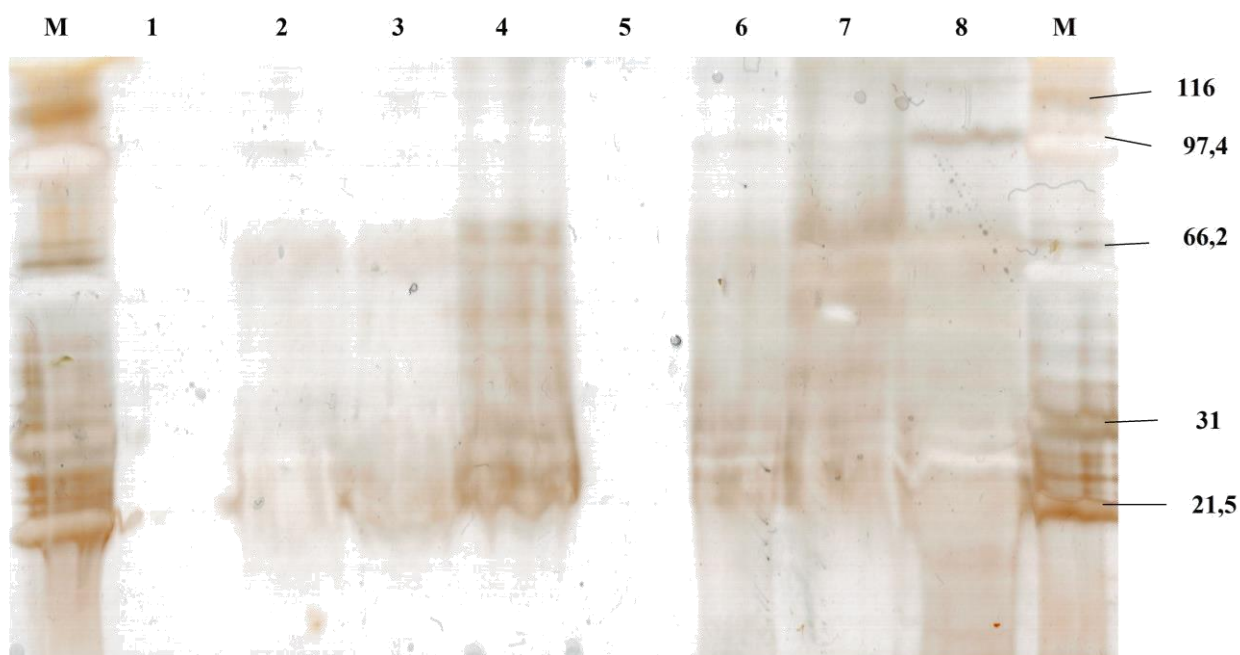
6.3.1 Kvalitativní analýza proteinů elektroforézou SDS-PAGE



Obrázek 10: 12% SDS-PAGE barvení Coomassie blue (20 μ l vzorku) M – marker Wide range K494; 1 – 0% TL (voda); 2 – 5% TL (voda); 3 – 10% TL (voda); 4 – 15% TL (voda); 5 – 0% TL (chloroform); 6 – 5% TL (chloroform); 7 – 10% TL (chloroform); 8 – 15% TL (chloroform)

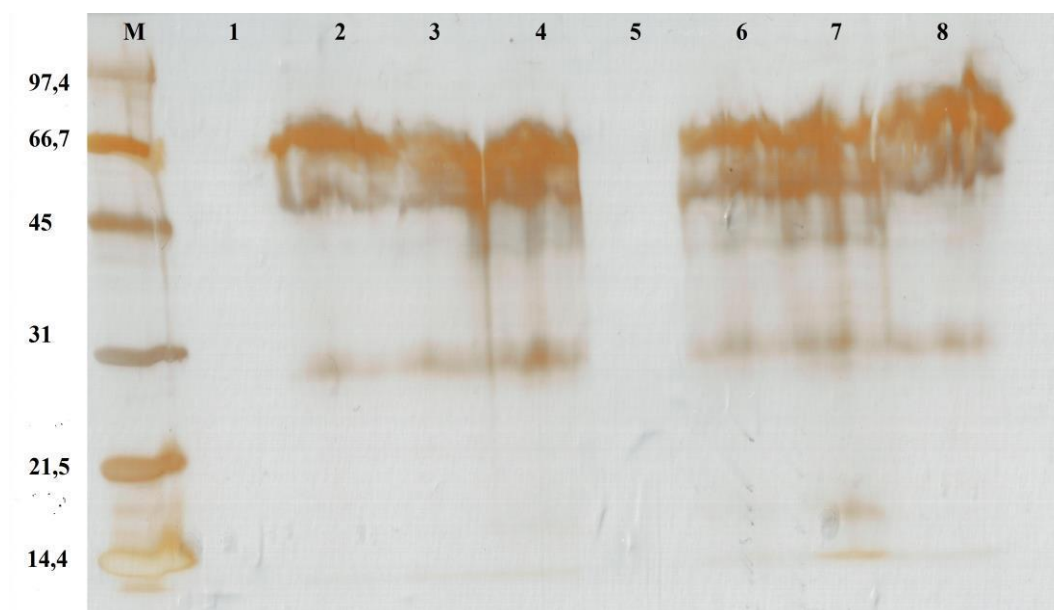
V této elektroforéze se nám podařilo prokázat přítomnost proteinů pro vzorky obsahující 10% TL a 15% TL. Vzhledem k tomu že i detekované vzorky se pohybují na detekčním limitu pro barvení Coomassie blue je možné, že pro 5% roztok není tento způsob barvení dostatečně citlivý. Vzhledem k tomu že všechny zaznamenané proteiny jsou separovány již na začátku gelu, je nadále místo 12% gelu využíván gel 8%.

Kvůli špatné detekci proteinů SDS-PAGE elektroforézou s barvením Coomassie brilliant blue bylo přistoupeno k metodě barvení stříbrem, která pro některé proteiny vykazuje výrazně vyšší citlivost.



Obrázek 11: 8% SDS-PAGE barvení stříbrem (20 μ l vzorku) M-marker Wide range K494; 1 – 0%TL (voda); 2 – 7,5%TL (voda); 3 – 10%TL (voda); 4 – 12,5%TL (voda); 5 – 0%TL (chloroform); 6 – 7,5%TL (chloroform); 7 – 10%TL (chloroform); 8 – 12,5%TL (chloroform)

Na rozdíl od barvení Coomassie blue lze pozorovat separované proteiny hned několika molekulárních hmotností jak v markeru tak ve vzorcích. Hranice obarvených proteinů nejsou ostré, což lze vysvětlit. Na druhou stranu jde podle sytosti zabarvení na vzniklých sloupcích dobře vidět postupně se zvyšující koncentraci na vzorcích 2 – 4 a 6 – 8 s prázdnými sloupci ve vzorcích 1 a 5, které neobsahovaly žádné proteiny. Vzhledem k sytějšímu zabarvení vzorků po chloroformu i pro novou metodu barvení, na kterou by chloroform neměl mít vliv jsem došel k závěru, že chloroform musí ovlivňovat samotné PVA.



Obrázek 12: 8% SDS-PAGE barvení stříbrem (20 μ l vzorku) M - Marker wide range K494; 1 - 0% TL (voda); 2 - 7,5% TL (voda); 3 - 10% TL (voda); 4 - 12,5% TL (voda); 5 - 0% TL (chloroform); 6 - 7,5% TL (chloroform); 7 - 10% TL (chloroform); 8 - 12,5% TL (chloroform)

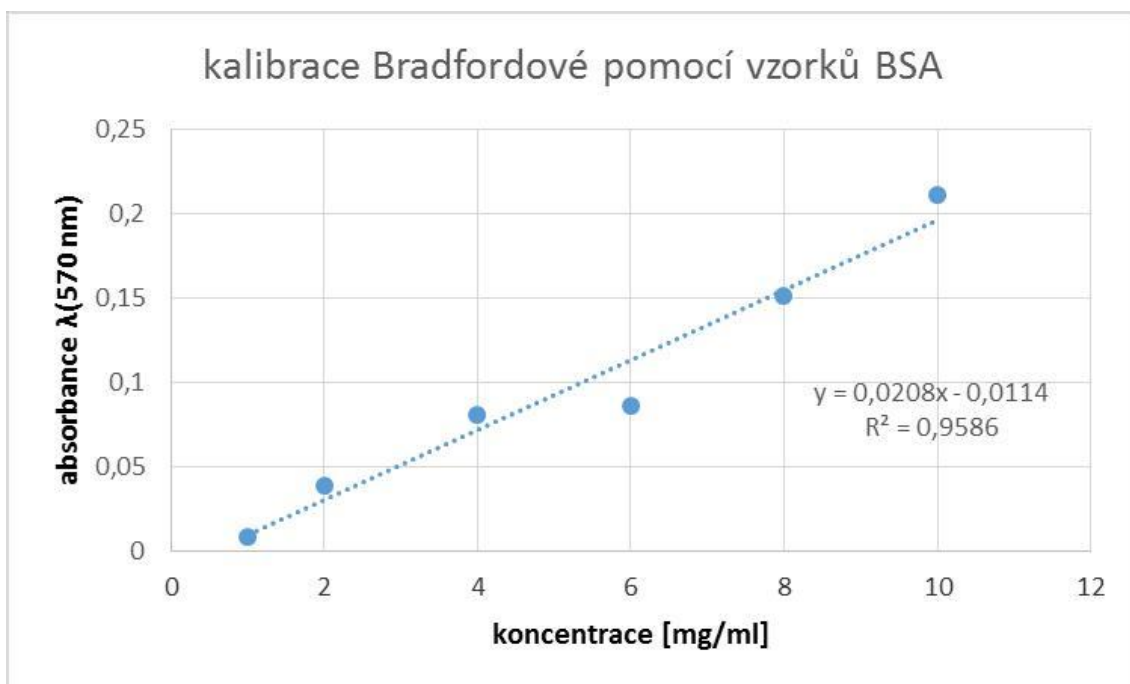
I při dalším barvení stříbrem bylo detekováno hned několik proteinů o vysokých koncentracích pro všechny vzorky obsahující TL. Opakované měření tedy podává důkaz o úspěšné inkorporaci proteinů. Není znám důvod zvlnění zaznamenaných maxim. Pravděpodobně bude třeba dále metodu optimalizovat.

6.3.2 Kvantitativní analýza celkového množství proteinů metodou podle

Bradfordové

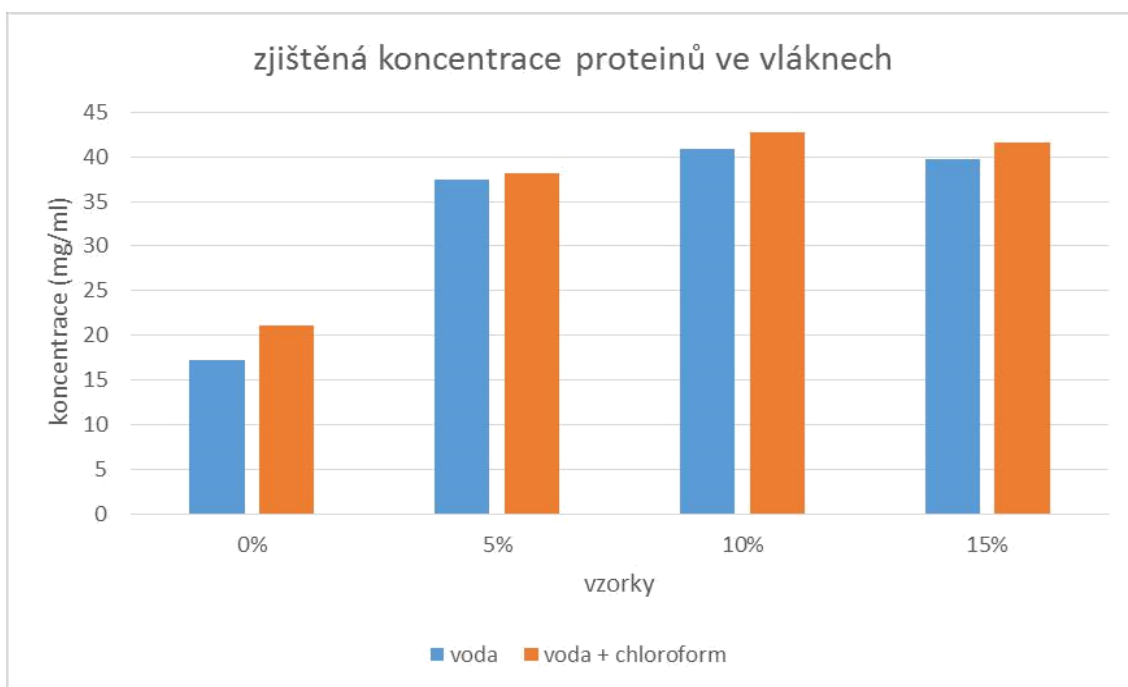
Pro zjištění koncentrace proteinů bylo nezbytné vytvořit kalibrační křivku. K tomu byl využit roztok BSA o známé koncentraci (0,1 mg/ml), ze kterého bylo vytvořeno několik roztoků (viz metody) a z jejich hodnot sestrojena kalibrační křivka.

Z každého z takto připravených roztoků bylo odebráno 20 μ l, které byly smíchány se 180 μ l činidla Bradfordové v mikrotitrační destičce. Po 5-ti minutové inkubaci byla měřena absorbance při 570 nm.



Graf 3: 1. kalibrační křivka pro metodu podle Bradfordové pomocí BSA

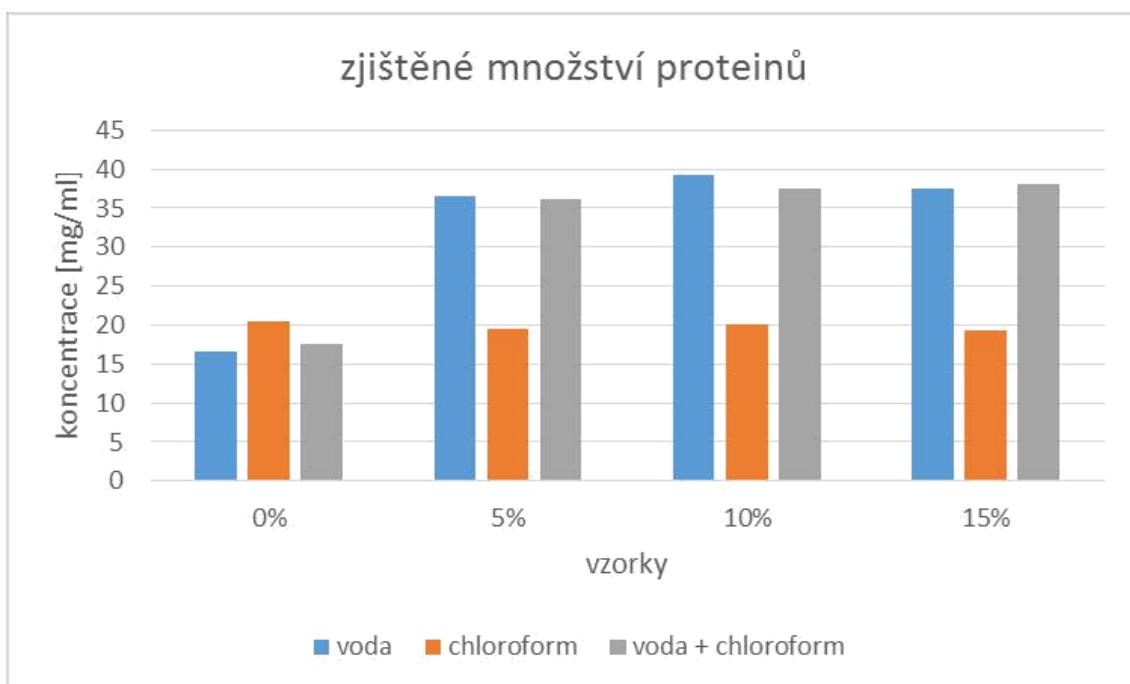
Při prvním pokusu o změření koncentrace proteinů byly použity stejné vzorky jako pro SDS-PAGE elektroforézu, tedy koncentrace 0% TL, 5% TL, 10% TL, 15% TL. Z těchto vzorků je vytvořena sada obsahující textilií rozpuštěnou v destilované vodě a sada s textilií před rozpuštěním opláchnutou v chloroformu. Pro upřesnění výsledků byl experiment třikrát opakován.



Graf 4: Koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

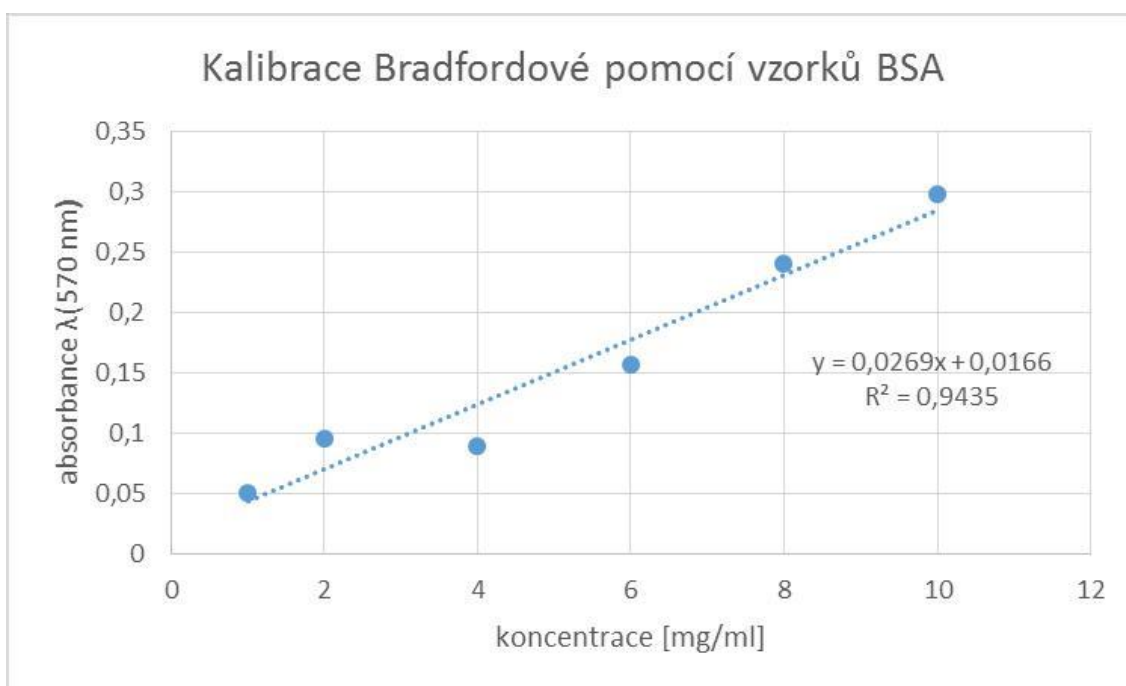
Z přiloženého grafu je možné prokázat přítomnost proteinů ve vyrobených vláknech. Také je patrné, že koncentrace proteinů stoupá s množstvím použitého trombocytárního lyzátu. Nejvyšší koncentrace proteinů byla změřena pro vzorek s 10% TL po oplachu chloroformem a činila 42,7 mg/ml. Nicméně při srovnání se vzorkem neobsahujícím TL, který ale také vykazuje přítomnost proteinů je možné odhadovat, že reálná koncentrace proteinů je nižší. Mírný pokles koncentrace u vzorku s 15% TL by mohl znamenat, že existuje limitní množství proteinů které je možné uložit v PVA.

Vzhledem k výsledkům prvního měření, kde vzorky po oplachu chloroformem vykazovaly vyšší koncentraci proteinů byla pro další měření přidána série vzorků čistého chloroformu, který byl použit pro oplach vláken, aby bylo možné sledovat jeho vliv na změnu absorbance.



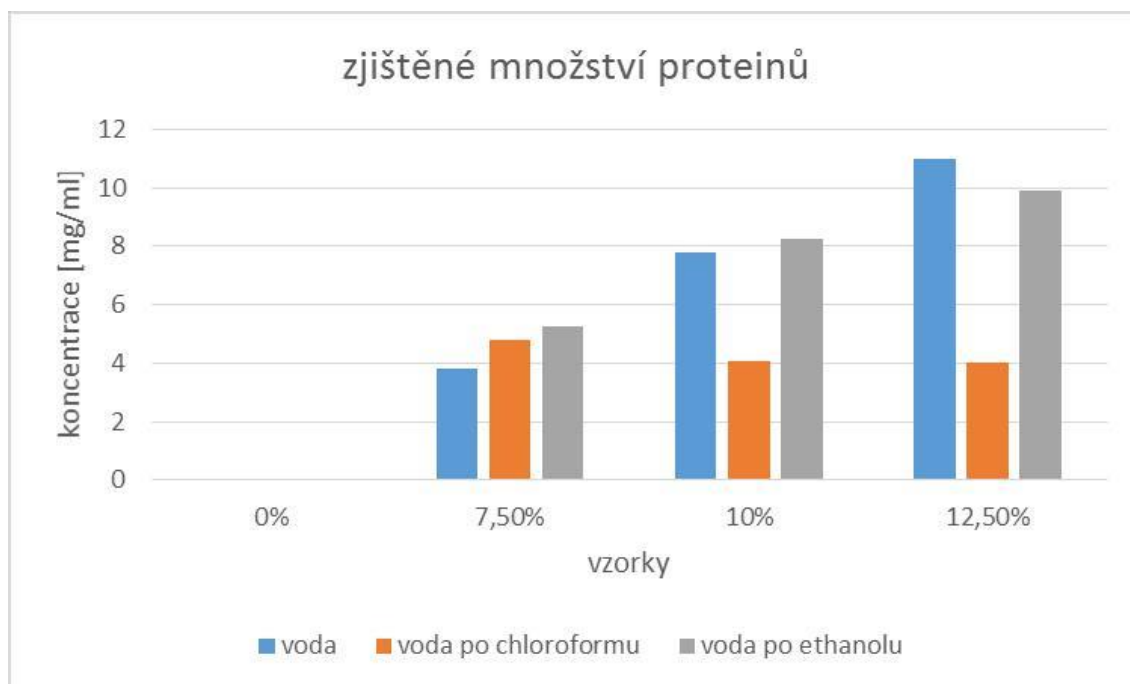
Graf 5: koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové 2. pokus

Při tomto měření vycházela zjištěná koncentrace pro vzorky rozpuštěné ve vodě a vzorky opláchnuté chloroformem a poté rozpuštěné velmi podobně. Nejvyšší koncentrace byla ovšem opět zaznamenána pro vzorky s 10% TL, což potvrzuje domněnku, že existuje limitní koncentrace mezi 10 a 15% TL, nad kterou nemohou být proteiny inkorporovány do vláken. Z měření chloroformu lze vidět, že vnáší stabilní chybu měření která znemožňuje číselné zjištění koncentrace ale nebrání v porovnávání různých vzorků.



Graf 6: 2. kalibrační křivka pro metodu podle Bradfordové pomocí BSA

Metoda podle Bradfordové byla použita i pro druhou sadu vyrobených materiálů, tedy 7,5% TL, 10% TL, 12,5% TL a slepý vzorek neobsahující proteiny. Stejně jako při předchozích měřeních byla vytvořena kalibrační křivka za pomoci známého roztoku BSA a poté měřeny vzorky rozpuštěné ve vodě, opláchnuté chloroformem a teprve poté rozpuštěné. Byla také vytvořena nová sada vzorků, kde jako alternativa k oplachu chloroformem byl využit čistý ethanol.



Graf 7: Množství proteinů metodou podle Bradfordové

Z výše uvedeného grafu lze vyčíst hodnoty oplachu ethanolu podobné pouhému rozpuštění ve vodě. To by potvrdovalo, že většina proteinů je obsažena uvnitř vláken. Naopak zvláště vychází vzorky po oplachu chloroformem, kde hodnoty nerostou. Pro výše uvedený graf bylo třeba změnit metodu výpočtu, protože slepé vzorky bez TL vykazovaly vysokou koncentraci proteinů a vnášely do měření chybu. Jejich absorbance proto byly od ostatních odečteny.

Z výsledků analýzy množství proteinů metodou podle Bradfordové se nám podařilo prokázat, že ve výrobních vláknech jsou obsaženy proteiny a že většina z nich se nachází uvnitř vláken. Také bylo zjištěno, že chloroform použitý k oplachu vláken může mít vliv na výsledky měření tím, že naleptává materiál ze kterého jsou vyrobeny mikrotitrační destičky a bude pravděpodobně nutné najít alternativní metodu oplachu. V tomto ohledu se jako vhodná alternativa jeví oplach pomocí ethanolu. Jako vhodnou náhradu lze doporučit oplach ethanolem. Problémem také je použitý spektrofotometr, který neměří při 595 nm, kde je absorbance nejvyšší ale při 570 nm. To může do

měření také vnášet chyby.

Závěr

Cílem práce byla optimalizace výroby vláken PVA obsahujících trombocytární lyzát a analýza proteinů v nich obsažených. Vláknina byla vyrobena dvěma metodami, z nichž se osvědčila výroba technologií Nanospider. Byly zkoušeny různé parametry elektrosponingu, které bylo potřeba volit podle koncentrace lyzátu v polymeru. Dále byla diskutována morfologie vzniklých vláken, kde vlákna s vyššími koncentracemi lyzátu vykazovala nižší homogenitu. K analýze proteinů byla použita elektroforéza SDS-PAGE a Metoda podle Bradfordové. Pro první měření SDS-PAGE byla použita metoda barvení pomocí Coomassie brilliant blue, nicméně kvůli nízké koncentraci proteinů nebyla detekce proteinů vždy úspěšná. Následně tedy byla vyzkoušena metoda barvení stříbrem, která nabízí vyšší citlivost. I když tuto metodu bude třeba ještě optimalizovat, úspěšně se nám s její pomocí podařilo detekovat proteiny různých molekulových hmotností. K analýze byla využita i metoda podle Bradfordové. S její pomocí se podařilo zjistit koncentraci proteinů ve vláknách a co je důležitější i uvnitř vláken. Tako metoda se však nevyhla komplikacím. Pro její optimalizaci bude třeba využít mikrotitračních destiček odolných vůči použitým chemikáliím a spektrofotometr měřící při absorbančním maximu činidla Bradfordové, tedy 595 nm. Bylo také zjištěno, že chloroform používaný během oplachu může ovlivnit strukturu PVA, které poté může vykazovat zvláštní hodnoty při dalších analýzách. Bude tedy nezbytné vyzkoušet jiné látky pro oplach vláken i se zohledněním vlivu na jejich strukturu.

Budoucí práce by měly být zaměřeny na optimalizaci výroby nanovláken s vyššími koncentracemi trombocytárního lyzátu, možná za použití PVA o jiné molekulární hmotnosti. Také bude třeba vyrobené materiály podrobit biologickému testování, které by zkoumalo biologickou aktivitu použitých proteinů za pomoci sledování změny proliferace buněk. Pro lepší analýzu proteinů bude nezbytné vyřešit problémy provázející metodu dle Bradfordové, nebo přejít na jinou metodu analýzy proteinů.

Reference

- [1] LANGER, Robert a Joseph P. VACANTI, 1993. Tissue Engineering. *Science*. roč. 260, č. 5110, s. 920–926. ISSN 00368075, 10959203.
- [2] KATARI, Ravi S., Andrea PELOSO a Giuseppe ORLANDO, 2014. Tissue Engineering. *Advances in Surgery* [online]. 9., roč. 48, č. 1, Advances in Surgery, s. 137–154. ISSN 0065-3411. Dostupné z: doi:10.1016/j.yasu.2014.05.007
- [3] BOOS, Anja M., Annika WEIGAND, Rebekka BRODBECK, Justus P. BEIER, Andreas ARKUDAS a Raymund E. HORCH, nedatováno. The potential role of telocytes in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. [vid. 2016-03-27]. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2016.01.021
- [4] ANDERSON, J. M., 2001. Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research* [online]. roč. 31, s. 81–110. ISSN 1531-7331. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.matsci.31.1.81
- [5] DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA, D. Sakthi KUMAR, Brahatheeswaran DHANDAYUTHAPANI, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA a D. Sakthi KUMAR, 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science, International Journal of Polymer Science* [online]. 11. 9., roč. 2011, 2011, s. e290602. ISSN 1687-9422, 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2011/290602, 10.1155/2011/290602
- [6] AAMODT, Joseph M. a David W. GRAINGER, 2016. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* [online]. 4., roč. 86, s. 68–82. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.003
- [7] BABENSEE, Julia E., James M. ANDERSON, Larry V. MCINTIRE a Antonios G. MIKOS, 1998. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 3. 8., roč. 33, č. 1–2, Tissue Engineering, s. 111–139. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(98)00023-4
- [8] WADE, Ryan J. a Jason A. BURDICK, 2014. Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly. *Nano Today* [online]. 12., roč. 9, č. 6, s. 722–742. ISSN 1748-0132. Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2014.10.002

- [9] CHUNG, Hyun Jung a Tae Gwan PARK, 2007. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 30. 5., roč. 59, č. 4–5, Matrices and Scaffolds for Drug Delivery in Tissue Engineering, s. 249–262. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.03.015
- [10] JIANG, Tao, Erica J. CARBONE, Kevin W. -H. LO a Cato T. LAURENCIN, 2015. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science* [online]. roč. 46, s. 1–24. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001
- [11] DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yoshida YASUHIKO, Toru MAEKAWA a D. Sakthi KUMAR, 2011. Fabrication and characterization of nanofibrous scaffold developed by electrospinning. *Materials Research* [online]. 9., roč. 14, č. 3, s. 317–325. ISSN 1516-1439. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-14392011005000064
- [12] HUANG, Zheng-Ming, Y. -Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA, 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. 11., roč. 63, č. 15, s. 2223–2253. ISSN 0266-3538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7
- [13] JAWOREK, A., A. KRUPA, M. LACKOWSKI, A.T. SOBCZYK, T. CZECH, S. RAMAKRISHNA, S. SUNDARRAJAN a D. PLISZKA, 2009. Nanocomposite fabric formation by electrospinning and electrospraying technologies. *11th International Conference on Electrostatics* [online]. 5., roč. 67, č. 2–3, s. 435–438. ISSN 0304-3886. Dostupné z: doi:10.1016/j.elstat.2008.12.019
- [14] ROŽEK, Z., W. KACZOROWSKI, D. LUKÁŠ, P. LOUDA a S. MITURA, 2008. Potential applications of nanofiber textile covered by carbon coatings. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*. roč. Vol. 27, č. nr 1, s. 35–38.
- [15] BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU, 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. 5., roč. 28, č. 3, s. 325–347. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- [16] BOCK, N., T. R. DARGAVILLE a M. A. WOODRUFF, 2012. Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Progress in Polymer Science* [online]. 11., roč. 37, č. 11, Topical Issue on Polymeric Biomaterials, s. 1510–1551. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.03.002

- [17] ŘEZÁ?OVÁ, Martina a Alena STOKLASOVÁ. Základy biochemie lidského organismu. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008, 123 s. ISBN 978-802-4615-103.
- [18] ANON., nedatováno. *MLA CE Course Manual: Molecular Biology Information Resources (Genetics Review: 3-D Protein Structures)* [online] [vid. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/structure.html>
- [19] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2
- [20] CHEVALLET, Mireille, Sylvie LUCHE a Thierry RABILLOUD, 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols* [online]. roč. 1, č. 4, s. 1852–1858. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.288
- [21] ANON., nedatováno. *regentsgeneticstechnology - Gel Electrophoresis 3-4* [online] [vid. 2016-03-30]. Dostupné z: <https://regentsgeneticstechnology.wikispaces.com/Gel+Electrophoresis+3-4>
- [22] BRADFORD, Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [online]. 7. 5., roč. 72, č. 1, s. 248–254. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [23] FREI, R., F. E. BIOSCA, M. HANDL a T. TRC, 2008. [The role of growth factors in the human organism and their use in medicine, especially in orthopedics and traumatology]. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae Et Traumatologiae Cechoslovaca*. 8., roč. 75, č. 4, s. 247–252. ISSN 0001-5415.
- [24] TAYALIA, Prakriti a David J. MOONEY, 2009. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* [online]. 4. 9., roč. 21, č. 32–33, s. 3269–3285. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200900241
- [25] SPORN, Michael B. a Anita B. ROBERTS. 2012. Peptide Growth Factors and Their Receptors II [online]. [cit. 2015-05-14]. 727 str
- [26] RUMBAUT, Rolando E. a Perumal THIAGARAJAN, 2010. General Characteristics of Platelets [online]. [vid. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53455/>
- [27] KAMATH, S., A. D. BLANN a G. Y. LIP, 2001. Platelet activation: assessment and

quantification. *European Heart Journal* [online]. 9., roč. 22, č. 17, s. 1561–1571. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1053/euhj.2000.2515

[28] ANON., 2016. *Platelet* [online]. [vid. 2016-03-30]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Platelet&oldid=710949131>

[29] SELL, Scott A, Jeffery J ERICKSEN a Gary L BOWLIN, 2012. The incorporation and controlled release of platelet-rich plasma-derived biomolecules from polymeric tissue engineering scaffolds. *Polymer International* [online]. 1. 12., roč. 61, č. 12, s. 1703–1709. ISSN 1097-0126. Dostupné z: doi:10.1002/pi.4372

[30] CHOI, B. -H., S. -J. ZHU, B. -Y. KIM, J. -Y. HUH, S. -H. LEE a J. -H. JUNG, 2005. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [online]. roč. 34, č. 4, s. 420–424. ISSN 0901-5027. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijom.2004.10.018

[31] GOBBI, Giuliana a Marco VITALE, 2012. Platelet-Rich Plasma Preparations for Biological Therapy: Applications and Limits. *Operative Techniques in Orthopaedics* [online]. 3., roč. 22, č. 1, Platelet Rich Plasma, Part I, s. 10–15. ISSN 1048-6666. Dostupné z: doi:10.1053/j.oto.2012.01.002

[32] TALLAWI, Marwa, Elisabetta ROSELLINI, Niccoletta BARBANI, Maria Grazia CASCONI, Ranjana RAI, Guillaume SAINT-PIERRE a Aldo R. BOCCACCINI, 2015. Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Journal of the Royal Society Interface* [online]. 6. 7., roč. 12, č. 108 [vid. 2016-04-04]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2015.0254

[33] LIU, Xiaohua, Jeremy M. HOLZWARTEH a Peter X. MA, 2012. Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* [online]. roč. 12, č. 7, s. 911–919. ISSN 1616-5195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201100466

[34] JI, Wei, Yan SUN, Fang YANG, Jeroen J. J. P. VAN DEN BEUCKEN, Mingwen FAN, Zhi CHEN a John A. JANSEN, 2011. Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications. *Pharmaceutical Research* [online]. 6., roč. 28, č. 6, s. 1259–1272. ISSN 0724-8741, 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-010-0320-6

[35] JIANG, Hongliang, Liqun WANG a Kangjie ZHU, 2014. Coaxial electrospinning for

encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release* [online]. 10. 11., roč. 193, s. 296–303. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.025

[36] ROCHE APPLIED SCIENCE. Lab FAQs: Find a Quick Solution. 3rd Edition. Mannheim. ISBN 3-88630-245-8

[37] KOPŘIVOVÁ, Bc. Barbora. *Funkcionalizace tkáňového nosiče trombocytárními růstovými faktory*. Liberec, 2015. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Vedoucí práce Ing. Věra Jenčová, Ph.D

Přílohy:

A

| % Gel | Components | Volume of components (ml) per gel mold volume of | | | | | | | |
|-------|-----------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 20 ml | 25 ml | 30 ml | 40 ml | 50 ml |
| 6% | H ₂ O | 2.6 | 5.3 | 7.9 | 10.6 | 13.2 | 15.9 | 21.2 | 26.50 |
| | 30% acryl-bisacrylamide mix | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 8.0 | 10.00 |
| | 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.50 |
| | 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | 10% ammonium persulfate | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | TEMED | 0.004 | 0.008 | 0.012 | 0.016 | 0.02 | 0.024 | 0.032 | 0.04 |
| 8% | H ₂ O | 2.3 | 4.6 | 6.9 | 9.3 | 11.5 | 13.9 | 18.5 | 23.20 |
| | 30% acryl-bisacrylamide mix | 1.3 | 2.7 | 4.0 | 5.3 | 6.7 | 8.0 | 10.7 | 13.30 |
| | 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 1.0 | 12.50 |
| | 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | 10% ammonium persulfate | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | TEMED | 0.003 | 0.006 | 0.009 | 0.012 | 0.015 | 0.018 | 0.024 | 0.03 |
| 10% | H ₂ O | 1.9 | 4.0 | 5.9 | 7.9 | 9.9 | 11.9 | 15.9 | 19.80 |
| | 30% acryl-bisacrylamide mix | 1.7 | 3.3 | 5.0 | 6.7 | 8.3 | 10.0 | 13.3 | 16.70 |
| | 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.50 |
| | 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | 10% ammonium persulfate | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | TEMED | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |
| 12% | H ₂ O | 1.6 | 3.3 | 4.9 | 6.6 | 8.2 | 9.9 | 13.2 | 16.50 |
| | 30% acryl-bisacrylamide mix | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 | 10.0 | 12.0 | 16.0 | 20.00 |
| | 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.50 |
| | 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | 10% ammonium persulfate | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | TEMED | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |
| 15% | H ₂ O | 1.1 | 2.3 | 3.4 | 4.6 | 5.7 | 6.9 | 9.2 | 11.50 |
| | 30% acryl-bisacrylamide mix | 2.5 | 5.0 | 7.5 | 10.0 | 12.5 | 15.0 | 20.0 | 25.00 |
| | 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.50 |
| | 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | 10% ammonium persulfate | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.50 |
| | TEMED | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |

B

| Components | Volume of components (ml) per gel mold volume of | | | | | | | |
|-----------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml | 6 ml | 8 ml | 10 ml |
| H ₂ O | 0.68 | 1.4 | 2.1 | 2.7 | 3.4 | 4.1 | 5.5 | 6.8 |
| 30% acryl-bisacrylamide mix | 0.17 | 0.33 | 0.5 | 0.67 | 0.83 | 1.0 | 1.3 | 1.7 |
| 1.5 M Tris (pH 6.8) | 0.13 | 0.25 | 0.38 | 0.5 | 0.63 | 0.75 | 1.0 | 1.25 |
| 10% SDS | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| 10% ammonium persulfate | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| TEMED | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.008 | 0.01 |

C

