



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií

FUNKCIONALIZACE TKÁŇOVÉHO NOSIČE ZALOŽENÉHO NA PVA POMOCÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály

Autor práce: **Bc. Barbora Kopřivová**
Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.





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

FUNCTIONALIZATION OF PVA BASED SCAFFOLDS BY THE GROWTH FACTORS

Diploma thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942T002 – Nanomaterials

Author: **Bc. Barbora Kopřivová**
Supervisor: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Kopřivová**
Osobní číslo: **M15000211**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Funkcionalizace tkáňového nosiče založeného na PVA pomocí
růstových faktorů**
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 a charakteristika roztoků pro zvláknění
3. Optimalizace přípravy PVA nanovláknenných vrstev s inkorporovanými proteiny
4. Charakteristika připravených materiálů morfologie, analýza obsahu proteinů, biologické testování
5. Zpracování výsledků



Rozsah grafických prací: **dle potřeby dokumentace**

Rozsah pracovní zprávy: **40-60 dle potřeby**

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

Seznam odborné literatury:

[1] Lukas D, Sarkar A, Martinova L, Vodsedalkova K, Lubasova D, Chaloupek J, Pokorny P, Mikes P, Chvojka J, Komarek M. Physical principles of Electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). Textile Progress: 41: 59-140: 2009.

[2] Freshney R. I. Culture of animal cells. 2010, ISBN 9780470528129.

[3] Diaz-Gomez Luis, Carmen Alvarez-Lorenzo, Angel Concheiro, Maite Silva, Fernando Dominguez, Faheem A. Sheikh, Travis Cantu, Raj Desai, Vanessa L. Garcia, Javier Macossay. Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. Materials Science and Engineering C: 40: 180-188: 2014.

[4] Sell, S. A., Ericksen, J. J. and Bowlin, G. L. (2012), The incorporation and controlled release of platelet-rich plasma-derived biomolecules from polymeric tissue engineering scaffolds. Polym. Int., 61: 17031709. doi:10.1002/pi.4372

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

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: **15. května 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. ledna 2018**

prof. Ing. Zdeněk Pliva, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 15. května 2017

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje 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 vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

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

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

Datum: 1.1.2018

Podpis:



Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Věře Jenčové, Ph.D., konzultantům Ing. Tereze Švarcové, Ing. Aleši Šamanovi a Ing. Petru Mikešovi, Ph.D. za jejich vstřícnost, cenné rady a návrhy, odborné konzultace v dané problematice. Velké díky patří také Katerzyne Solarske-Ściuk, Ph.D. za vychození testu proteinové aktivity a Lowryho metody. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a svému příteli za vytvoření podmínek pro psaní práce, trpělivost a podporu během celého studia.



Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou tkáňových nosičů z PVA metodou elektrostatického zvlákňování (electrospinningu) s inkorporovanými trombocytárními růstovými faktory. Čtenář je v teoretické části seznámen zejména s biologicky aktivními látkami, metodami výroby tkáňových nosičů a vodě rozpustnými polymery, především tedy polyvinylalkoholu. Experimentální část obsahuje přípravu nanovlákněných struktur z PVA o různých procentech hydrolyzy (88, 98 a 99%) s inkorporovanými růstovými faktory či s inkorporovaným enzymem křenové peroxidázy (HRP). Vytvořené vrstvy byly podrobeny morfologické analýze, testům pro detekci a kvantifikaci proteinů, sledování aktivity inkorporovaných proteinů včetně biologického in vitro testování na buněčných liniích 3T3-SA a MG-63.

Klíčová slova

Elektrostatické zvlákňování, Polyvinylalkohol, Růstové faktory, Cílené dodávání léčiv, Funkcionalizace scaffoldů, Trombocyty



Abstract

This diploma thesis deals with the preparation of tissue scaffolds from PVA by electrostatic spinning (electrospinning) with incorporated thrombocyte growth factors. In the theoretical part, the reader is familiar with biologically active substances, methods of production of tissue scaffolds and water-soluble polymers, especially the polyvinyl alcohol. The experimental part includes the preparation of nanofibrous structures from PVA with different percentages of hydrolysis (88, 98 and 99%) with incorporated growth factors or with horseradish peroxidase enzyme (HRP). The created layers were subjected to morphological analysis, assays for protein detection and quantitation, monitoring activity of incorporated proteins incl. biological in vitro testing on 3T3-SA and MG-63 cell lines.

Keywords

Electrospinning, Polyvinylalcohol, Growth factors, Drug delivery system, Functionalization of scaffolds, Platelets



Obsah

Obsah	- 8 -
Seznam zkratek	- 10 -
Úvod.....	- 13 -
Teoretická část	- 14 -
1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	- 14 -
1.1 Scaffoldy v TE – materiály a metody	- 14 -
1.1.1 Materiály	- 15 -
1.1.2 Polymery pro TE:.....	- 16 -
1.2 Polymery rozpustné ve vodě	- 17 -
1.3 Metody výroby scaffoldů	- 23 -
2 NANOVLÁKNA A TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	- 25 -
2.1 Tvorba polymerních nano/mikrovláken	- 26 -
2.2 Parametry elektrostatického zvlákňování	- 31 -
3 CÍLENÁ DOPRAVA LÉČIV	- 34 -
3.1 Biologicky aktivní látky	- 35 -
3.1.1 Růstové faktory	- 35 -
3.1.2 Růstové faktory v trombocytech.....	- 36 -
3.2 Trombocyty	- 37 -
3.3 Růstové faktory z trombocytů	- 38 -
Experimentální část.....	- 41 -
4 MATERIÁL A METODY	- 41 -
4.1 Použité materiály a chemikálie	- 41 -
4.2 Použité přístroje a programy	- 43 -



4.3	Metody a protokoly	- 44 -
4.3.1	Příprava trombocytárního lyzátu s obsahem růstových faktorů	- 44 -
4.3.2	Příprava roztoků PVA.....	- 44 -
4.3.3	Elektrostatické zvlákňování	- 45 -
4.3.4	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	- 46 -
4.3.5	Metody zjištění koncentrace proteinů.....	- 46 -
4.3.6	Měření enzymové aktivity peroxidázy (HRP)	- 49 -
4.3.7	Biologické testování in vitro.....	- 51 -
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	- 53 -
5.1	Optimalizace přípravy PVA vláknenných nosičů s obsahem trombocytárních růstových faktorů	- 53 -
5.2	Analýza proteinů ve vrstvách připravených z 12% PVA vrstev	- 58 -
5.3	Nalezení méně rozpustné vrstvy	- 63 -
5.3.1	Modifikace PVA vrstev	- 64 -
5.3.2	PVA 98% hydrolýza (MW 125000 g/mol).....	- 68 -
6	ZÁVĚR	- 78 -
7	Bibliografie	- 80 -
	Seznam obrázků.....	- 86 -
	Seznam grafů	- 88 -
	Seznam tabulek	- 88 -
	Přílohy.....	- 90 -
	A - Lowryho metoda.....	- 90 -
	B – PVA S HYDROLÝZOU NAD 98%.....	- 91 -
	C - Příloženého CD.....	- 92 -



Seznam zkratek

3T3-SA – Myší fibroblasty Swiss albino

ADP – Adenosindifosfát

ATP – Adenosintrifosfát

APS – Amonium persulfate, peroxidisíran amonný

BSA – Bovine serum albumin, hovězí sérový albumin

CAD/CAM – Počítačem podporovaný design a výroba

CBB – Coomassie Blue Brilliant

DDS – Drug delivery system, cílené dodávání léčiv

dH₂O – Destilovaná voda

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

DMEM – Živné médium pro buněčnou linii 3T3-SA

DMFM – Dimethylformamid

DMSO – Dimethylsulfoxid

ECM – Extracelulární matrix

EDTA – kyselinu ethylendiamintetraoctovou

ePTFE – Expandovaný polytetrafluorethylen

HA – Kyselina hyaluronová

HRP – Křenová peroxidáza

MEM – Živné médium pro buněčnou linii MG-63

MG-63 – Lidské osteosarkomální buňky

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

NC – Negativní kontrola

PAA – Polyakrylová kyselina



PAGE – Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAN – Polyakrylnitril
PBS – Fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PC – Pozitivní kontrola
PCL – Polykaprolakton
PE – Polyethylen
PEG – Polyethylenglykol
PET – Polyethylentereftalát
PGA – Polyglykolová kyselina
PLA/PLLA – Polymléčná kyselina
PLCL – Polymléčná kyselina-co-kaprolakton
PLGA – Polymléčná-co-glykolová kyselina
PPE – Polyfosfoester
PRP – Plasma bohatá na trombocyty, platelet-rich plasma
PS – Polystyren
PU – Polyurethan
PVA – Polyvinylalkohol
PVC – Polyvinylchlorid
PVP – Polyvinylpyrrolidon
RF/GF – Růstový faktor, Growth factor
RT – Pokojová teplota
SDS – Sodiumdodecylsulfát, dodecylsírán sodný
SEM – Skenovací elektronová mikroskopie
TA – Trombocyty z aferézy



TB – Trombocyty z buffy coatu

TE – Tkáňové inženýrství, tissue engineering

TEMED – Tetramethylethylenediamin

TL – Trombocytární lyzát

Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TRS/PRP – Roztok bohatý na trombocyty

UV – Ultrafialové záření

vWF – von Willenbrandův faktor

w/w – Hmotnostní procenta, hmotnost na hmotnost



Úvod

Poslední dobou je obrovský zájem o vodorozpustné polymery vhodné pro tkáňové inženýrství a cílené dodávání léčiv. Právě jejich schopnost se rozpouštět ve vodě je výborným řešením pro inkorporaci citlivých biologicky aktivních látek jako jsou proteiny. Čím dál častěji se taktéž využívá trombocytů a trombocytárních přípravků, které podporují především proliferaci buněk a další biochemické procesy, a již nyní se s některými lze setkat v praxi. V posledních letech roste zájem především o metody přípravy tkáňových nosičů z polyvinylalkoholu. Tento polymer je jedním z nejdostupnějších vodorozpustných polymerů.

Cílem této práce je vytvoření PVA nanovlákných vrstev s obsahem trombocytárních růstových faktorů a jejich následná analýza z hlediska morfologie a dále obsahu a kvality inkorporovaných proteinů.



Teoretická část

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství je multidisciplinárním oborem pro vývoj a výrobu nových tkání a tkáňových náhrad. Slučují se zde především obory medicíny, biologie, materiálových věd, biotechnologií a v posledních letech i nanomateriálů a nanotechnologií.

Principem tkáňového inženýrství je vyrobení a možné osazení scaffoldu buňkami, které se ve vhodném prostředí (buď in vivo či ex vivo) dále proliferují, popř. diferencují a tvoří tak postupně novou tkáň. Takto vyrobená tkáň se dále transplantuje pacientovi. Buňky jsou, pokud je to možné, odebírány pacientovi (autologní buňky), nakultivovány a nasazeny na vyrobený scaffold. Tím se zajišťuje nejlepší možná odpověď organismu na novou tkáň. Buňky jsou tělu vlastní a nevzniká imunologická odpověď. Dále je možné použít buňky stejného živočišného druhu, tedy jiného člověka (alogenní buňky), popřípadě buňky jiného živočišného druhu (xenogenní buňky). Dalším principem TE je pouze vyrobení a implantace scaffoldu do těla dárce. (Khademhosseini, 2005)

V tkáňovém inženýrství mohou být také použity kmenové buňky, což jsou nediferencované buňky, které mohou dále proliferovat a diferencovat se na potřebné specializované buňky. Podle původu se kmenové buňky dělí na dospělé a embryonální. (Typy kmenových buněk, 2013) Vzhledem k velkému etickému problému ohledně odebírání a využívání kmenových buněk se častěji diskutuje o možnosti implantace neosázených scaffoldů, které jsou schopny stimulovat růst buněk pacienta. Tyto scaffoldy jsou často funkcionalizovány biologicky aktivními látkami.

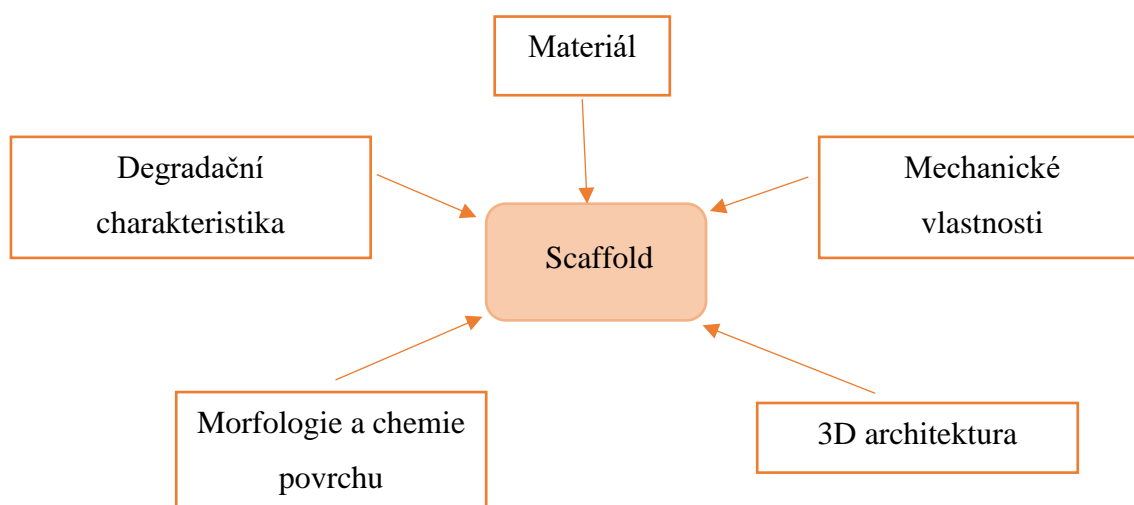
1.1 Scaffoldy v TE – materiály a metody

Scaffoldy jsou materiálová konstrukce a podpora růstu tkáně či orgánu. Scaffoldy musí splňovat požadavky odpovídající tkáni, kterou nahrazují či vytváří novou. Jiné vlastnosti mají scaffoldy pro měkké tkáně a jiné zase např. scaffoldy kostí a chrupavek. Mezi nejdůležitější kritérium pro výrobu scaffoldů patří jeho cytokompatibilita, což je schopnost nevyvolávat imunologickou odpověď a zároveň nesmí být toxický pro život buněk a tkání. Dalším kritériem je biodegradabilita, která představuje dobu, po kterou je scaffold v původním tvaru, nedegradován a nevytváří svou degradací toxické sloučeniny. U pevných tkání se častěji používají nedegradabilní materiály. U měkkých tkání dochází k vytvoření nové tkáně, případná doba degradace scaffoldu by měla být úměrná tvorbě nové tkáně tak, aby podporu (scaffold) tkáně



pomalu převzala extracelulární matrix. Degradovaný materiál ani jeho metabolity by neměly být toxické. Pro funkční scaffold jsou důležité i další parametry - jeho morfologie jako poréznost, struktura (2D/3D), ale též chemické a fyzikální povrchové vlastnosti. (Wei, 2007)

Poréznost vyrobeného scaffoldu, a především propojenost pórů, umožňuje transport živin, odpadních látek a penetraci buněk dovnitř scaffoldu. Další vlastnosti záleží na uplatnění daného scaffoldu – vodivé povrchy pro usnadnění buněčných interakcí, mechanická stabilita pro funkčnost materiálu, relativně jednoduchá výroba a cena, snadná sterilizace scaffoldu. (Boccaccini, 2007) (Wei, 2007)



Obr. 1: Vlastnosti tkáňového nosiče (scaffoldu)

aktivní látky. Mezi ně nejčastěji patří růstové faktory, cytokiny, určité proteiny, vitamíny, aminokyseliny aj. Tyto látky lze dále dopravovat a uvolňovat v určitém množství, scaffoldy proto mohou sloužit jako cílená doprava léčiv, též drug delivery systémy. (Boccaccini, 2007) (Yusop, 2012)

1.1.1 Materiály

Pro výrobu scaffoldů se používá mnoho materiálů. Od tvrdých kovů, křehké keramiky, různorodých polymerů až po jejich kombinace. Kovy se používají především pro tvrdé tkáně, jako jsou kosti a chrupavky, jelikož polymery nemají tak dobré mechanické vlastnosti. Pro kostní scaffoldy se dá použít např. degradabilní porézní hořčík či železo (Yusop 2012), titan, přírodní látky jako kolagen, algináty, kyselina hyaluronová, ale také syntetické polymery či jejich kombinace – PU, polyestery. (Woźniak, 2007) Srdeční scaffoldy se vyrábějí často z kolagenu,



alginátu, želatiny, degradabilní polyestery. (Chen, 2007) Náhrady či podpory nervové tkáně jsou tvořeny většinou polymery PE, PVC, ePTFE, PAN, PS, PGA, PLLA, PCL, silikony či přírodními látkami kolagenem, želatinou, deriváty HA, algináty. (Kingham, 2007)

Výhodou polymerů je jejich možná zpracovatelnost mnoha metodami a variabilita výsledných struktur, což dělá polymery velice atraktivními nejen v tkáňovém inženýrství. Použité polymery můžeme rozdělit na přírodní a syntetické. V posledních letech se čím dál častěji využívá tzv. hybridních polymerních scaffoldů, které kombinují přírodní a syntetické polymery. Výhodou těchto hybridních scaffoldů je napodobování extracelulární matrix a prostředí samotné přírodní tkáně. (Wei, 2007)

1.1.2 Polymery pro TE:

Dle původu se polymery rozdělují na přírodní a syntetické, v tkáňovém inženýrství se dále rozdělují degradabilní a nedegradabilní. Přírodními polymery jsou fibrin, kolagen, želatina, chitosan, algináty, celulóza, kyselina hyaluronová a další. Fibrin s kolagenem se běžně nacházejí v extracelulární matrix (ECM), proto dokáží skvěle napodobovat prostředí tkáně. Mezi syntetické biodegradabilní polymery řadíme převážně poly(α -hydroxyestery), polyanhydridy a polyorthoestery. Nejužívanější degradabilní polymery jsou PLA, PGA, PLGA, PEO, mezi nedegradabilními polymery pak patří PE, PET, PTFE₂ (Ramalingam, 2012)

Pro některé aplikace je důležitá také rozpustnost polymerů. Řada polymerů využívá jako rozpouštědlo vodu, což je nejen vhodnější pro lidský organismu, ale také velice důležité pro drug delivery systémy např. proteinů či dalších bioaktivních látek, které jsou často citlivé na okolní prostředí. Mezi polymery rozpustné ve vodě patří především polyvinylalkohol (PVA), rozpustné deriváty celulózy, želatina, PEG, PVP, PAA, deriváty chitosanu, kyselina hyaluronová, škrob.



Tabulka 1: Běžně využívané polymery pro výrobu tkáňových scaffoldů (Ramalingam, 2012) (Mohan, 2014)

	Materiál	Struktura	Vlastnosti
Přirodní	Fibrin	Pletivo polymerizovaných fibrilárních proteinů	Buněčné lepidlo Osteokonduktivita Laditelné mechanické vlastnosti
	Kolagen typ I	Podlouhlé proteiny z pevných fibrilárních svazků	Neimunogenní Buněčné lepidlo Slabé mechanické vlastnosti
	Chitosan	Polysacharid z D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu	Hemostatický V kombinaci s hydroxyapatitem dobrá osteokonduktivita a mechanické vlastnosti
	Alginát	Polysacharid z bloků β -D-mannuronátu a α -L-guluronátu	Hydrofilní Slabé mechanické vlastnosti
	Kyselina hyaluronová	Polymer nesulfátovaného glykosaminglykanu	Minimálně imunogenní Slabé mechanické vlastnosti Napodobující viskoelasticitu ECM
	Celulóza	Homopolymer z jednotek D-anhydroglukopyranózy (AGU)	Hydrofilní, vysoká reaktivita Netoxická, biokompatibilní
Syntetické	Poly(α -hydroxyestery) (PLA, PGA)	Alifatický polyester vzniklý polykondenzací či polymerizací otevřeného kruhu	Biodegradabilní Laditelné mechanické vlastnosti Degradace na kyselé sloučeniny
	Poly(ϵ -kapolakton)	Alifatický polyester připravený otevřením kruhu ϵ -kapolaktonu	Biodegradabilní Pomalá degradace Produkty degradace součástí citrátového cyklu Dobré mechanické vlastnosti
	Polyhydroxyalkanoáty (PHAs)	Polyestery	Biodegradabilní Netoxické Bioplast, dobré mechanické vlastnosti
	Polyvinylalkohol (PVA)	Hydrofilní lineární polymer	Rozpustný ve vodě Chemicky odolný Netoxický
	Polyethylenglykol (PEG)	Polyether, též polyethylenoxid (PEO)	Biodegradabilní Snadná modifikace Netoxický Dobré mechanické vlastnosti

1.2 Polymery rozpustné ve vodě

Jedním z typů polymerů, které mají uplatnění především ve farmaceutickém průmyslu, jsou polymery rozpustné ve vodě. Jejich výhoda tkví především v netoxickém rozpouštědle – vodě, která je tělu vlastní. Terapeutické látky (proteiny, DNA, a další) mohou být denaturovány toxickými rozpouštědly, proto se přiklání k použití polymerů rozpustných ve vodě, a to především



v cíleném dodávání léčiv. V této kapitole jsou vypsány některé nejužívanější přírodní i syntetické polymery a jejich vlastnosti.

PŘÍRODNÍ POLYMERY ROZPUSTNÉ VE VODĚ

a) Étery celulózy

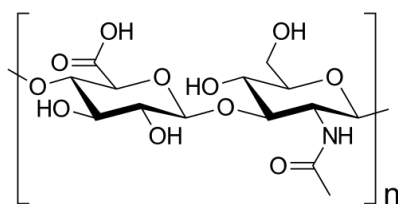
Samotná celulóza je ve vodě nerozpustná, proto se převádí na estery celulózy nebo deriváty etherů celulózy, které jsou již ve vodě rozpustné. Mezi výhody etherů celulózy patří především cytocompatibilita, díky čemuž jsou především uplatňovány v kosmetice a potravinách jako pojiva, emulgátory, stabilizátory či dezintegrační činidla pro tablety. Patří sem převážně hydroxypropyl, hydroxyethyl a hydroxypropylmethyl celulóza.

b) Škrob a jeho deriváty

Škrobem se rozumí směs polysacharidů glukozů, která je v čisté formě hůře zpracovatelná. Z tohoto důvodu se přistoupilo k využití jeho derivátů – biologicky rozložitelných polymerů na bázi škrobu, které jsou vhodné především pro scaffoldy kostních tkání a DDS ve formách kapslí a gelů. (Kadajji, 2011)

c) Kyselina hyaluronová (HA)

Přírodní polyaniontový polysacharid nacházející se běžně v ECM či v kloubní tekutině savců se skládá z jednotek kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. HA je netoxická, biokompatibilní, biologicky odbouratelná. Její vysoká rozpustnost ve vodě a schopnost tvorby gelu se uplatňuje v tkáňovém inženýrství kostí a chrupavek, DDS i kosmetice. Využívá se například jako nosič antibiotik pro oči i jiné dutiny, podporuje hojení ran a hojně se využívá v kosmetice jako plnivo v omlazujících léčích proti vráskám. (Kadajji, 2011)



Obr. 2: Vzorec kyseliny hyaluronové

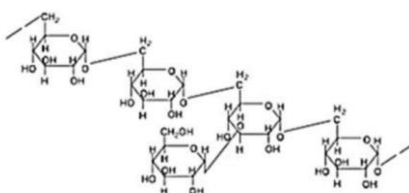
d) Chitosan

Jde o lineární polysacharid, biologicky odbouratelný, kompatibilní, málo toxický. Ve své čisté formě je špatně rozpustný ve vodě o neutrálním pH, proto se převážně využívají jeho deriváty. Ty se uplatňují v oblasti kontrolovaného dodávání léčiv, ortopedie a pojivové tkáně. (Kadajji, 2011)



e) Dextran

Z chemického hlediska se jedná o glukán spojený s α -D-1,6-glukózou, viz Obr. 3. Často se využívá jako makromolekulární nosič – hydrogel se začleněným léčivem. Používá se k léčbě akutního infarktu myokardu arteriální tromboembolie, žilní trombózy v kombinaci se streptokinázou, která díky vlastnostem dextransu dosahuje delší životnosti v oběhu pacienta. (Kadajji, 2011)



Obr. 3: Fragment dextransu

f) Karagenan

Karagenan je sulfátový polysacharid vyskytující se v červených mořských řasách. Svou schopností tvorby gelu je považován za dobrou náhražku želatiny. Uplatňuje se ve výrobě topických podkladů, při výrobě čoček, krytí ran či antikoncepčních gelů. (Kadajji, 2011)

g) Xanthanová guma

Směs polysacharidů glukopyranosilových, mamnopyranosilových a glukopyranosiluronových jednotek. Již při nízkých koncentracích se jedná o viskózní roztoky, proto je vhodné jako zahušťovadlo, stabilizátor i dodávání léčiv hydrogely. (Kadajji, 2011)

h) Guarová guma

Jedná se o polysacharid složený z jednotek galaktózy a manózy. Díky jeho degradaci v tlustém střevě je vhodný pro DDS se zpomaleným uvolňováním léčiva. Používá se také v tabletách jako pojivo či dezintegrační činidlo. (Kadajji, 2011)

i) Želatina

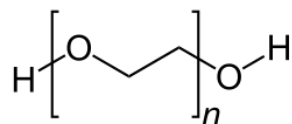
Želatina je přirozeným degradabilním, netoxickým biopolymerem odvozeným od kyselé hydrolyzy (želatina typu A) nebo alkalické hydrolyzy (želatina typu B) zvířecího kolagenu z kůže, kostí a šlach. Její fyzikální a chemické vlastnosti záleží na původu želatiny. Tento polymer se často využívá v potravinách, kosmetice, farmacii, a i pro drug delivery systémy. (Hoque, 2015)



SYNTECKÉ POLYMERY ROZPUSTNÉ VE VODĚ

a) Polyethylen glykol – PEG

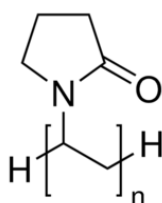
Polyethylenglykol se syntetizuje interakcí ethylenoxidu s vodou, ethylenglykolem nebo ethylenglykolovými oligomery. Vlastností PEG je dobrá rozpustnost nejen ve vodě, ale také v organických rozpouštědlech, proto je snadné modifikovat jeho koncové skupiny. PEG má široké použití ve farmacii a medicíně. Používá se například pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních léků, při skladování krve a orgánů, pro lepší stabilitu léčiv. PEG má uplatnění také jako konjugát s dalšími molekulami a léčivými látkami jako tzv. PEGylované molekuly. Hlavními výhodami PEG-léčivých konjugátů jsou snížená imunogenicita proteinu, zvýšená doba zdržení v těle a snížená enzymatická degradace. Většina drug delivery systémů, které jsou nyní na trhu, jsou PEGylované produkty. (Hoque, 2015)



Obr. 4: Vzorec polyethylen glykolu

b) Polyvinyl pyrrolidon – PVP

PVP je ve vodě rozpustný polymer s molekulovou hmotností od 40 000 do 360 000 g/mol. Jeho syntéza se provádí z monomeru vinylpyrrolidonu ve vodě či isopropanolu. Používá se hlavně jako pojivo v tabletových prostředcích, ale také pro zvýšení biologické dostupnosti některých ve vodě málo rozpustných účinných látek pomocí různých stupňů rozpustného PVP (jako tzv. solubilizačních činidel). (Hoque, 2015)

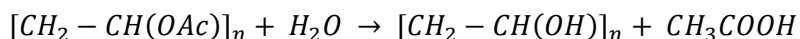


Obr. 5: Struktura polyvinyl pyrrolidonu

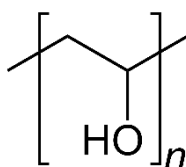


c) Polyvinyl alkohol – PVA

Jedná se o nejvíce vyráběný syntetický, ve vodě rozpustný polymer na světě. Komerčně se vyrábí hydrolyzou polyvinyl acetátu (viz rovnice níže – 100% hydrolyza), jelikož vinylalkohol nelze získat v dostatečném množství a čistotě pro polymeraci.



PVA disponuje skvělou chemickou odolností a fyzikálními vlastnostmi. Filmy z PVA vykazují vysokou pevnost v tahu, odolnost proti oděru a bariérové vlastnosti proti kyslíku, které jsou v suchých podmínkách lepší než vlastnosti většiny polymerů. (Herman, 2007)



Obr. 6: Vzorec polyvinylalkoholu

Rozpustnost polyvinylalkoholu je možná pouze ve velmi polárních rozpouštědlech, jako jsou voda, dimethyl sulfoxid (DMSO), acetamid, glykoly či dimethyl formamid (DMFM). Jeho rozpustnost ve vodě závisí na stupni polymerace a hydrolyzy. Plně hydrolyzovaný PVA je rozpustný pouze ve vroucí vodě, částečně hydrolyzovaný PVA s hydrolyzou v rozmezí 80-99 % je rozpustný při pokojové teplotě, polymer s nižší hydrolyzou (70-80 %) pak pouze ve vodě o teplotě 10-40°C. Nad tuto teplotu se již roztok zakalí (tzv. cloudy point) a následuje precipitace PVA. Tento jev je zapříčiněn přítomností acetátových skupin, které oslabují účinek silných vodíkových vazeb hydroxylových skupin a umožňují tak rozpouštění PVA ve vodě při nižších teplotách. (Herman, 2007) Pro aplikaci v cíleném transportu léčiv není dobrá rozpustnost výhodou, proto se PVA často síťuje či se vytváří DDS systémy v kombinaci s jinými nerozpustnými polymery.

Povrchové napětí PVA se mění podle koncentrace, hydrolyzy a teploty. Jeho hodnota se mírně snižuje s nižší molekulovou hmotností.

Viskozita polymerních roztoků závisí na molekulové hmotnosti a koncentraci. Viskozita roste v závislosti na hydrolyze a klesá se vzrůstající teplotou. Může být stabilizována



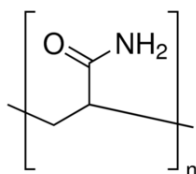
přidáním malého množství nízkomolekulárních alifatických alkoholů, močoviny či solí (př. thiokyanáty). Rozsah hydrolyzy a obsah acetátových skupin v PVA ovlivňuje také krystalinitu PVA. (Herman, 2007) PVA gely byly použity pro kontaktní čočky, obklady umělých srdcí a aplikace pro podávání léků. PVA se používá hlavně v topických farmaceutických a oftalmologických přípravcích, ale jeho využití se nachází také jako stabilizátor emulzí či v lepidlech. (Hoque, 2015)

d) Polyakrylová kyselina – PAA

Kyselina polyakrylová je biodegradabilní ve vodě rozpustný polymer s různými průmyslovými aplikacemi, jako například superabsorbent (jednorázové plenky), úprava vody atd. Kopolymery PAA modifikované blokovými kopolymery polyethylenoxidu a poly (propylenoxidu) mají širokou škálu lékařských aplikací, protože jejich složky jsou považovány za farmaceuticky bezpečné. Jedinečná vlastnost kyseliny polyakrylové spočívá v tom, že při pH 5 existuje jako kapalina a jako gel při pH 7. Je tak ideální pro oční podávání ribozymů¹ do epitelu rohovky jako nosiče léku. Polymery na bázi kyseliny polyakrylové se používají hlavně při ústním a slizničním styku, jako jsou tablety s řízeným uvolňováním a perorální suspenze. (Hoque, 2015)

e) Polyakrylamid

Polyakrylamid je syntetický polymer odvozený od akrylamidového monomeru, který byl původně zaveden pro použití jako nosná matrice pro elektroforézu. Široce se používá pro řadu aplikací od mikroanalýzy až po makrofrakcionování proteinů, nukleových kyselin a dalších biomolekul. Kromě elektroforézy byly polyakrylamidy také použity jako nosiče pro podávání léků a bioaktivních molekul. Polyakrylamid je polymer, který je tvořen z jednotek akrylamidu, známého neurotoxinu. Avšak samotný polyakrylamid je netoxický, ale je kontroverzní složkou kvůli své potenciální schopnosti vylučovat akrylamid. Polyakrylamid se používá v širokém spektru kosmetických přípravků (zvlhčovače, pleťové vody, krémy, přípravky na opalování apod.). Hydrogely polyakrylamidu a chitosanu jsou biokompatibilní a používají se k trvalému uvolňování antibiotik. (Hoque, 2015)



Obr. 7: Strukturální jednotka polyakrylamidu

¹ Ribozym – katalyticky aktivní molekula RNA, která funguje jako enzym.



f) Polyoxazolin

Stále častěji zkoumaný polymer se systematickým názvem poly (2-alkyl-2-oxazolin) v biomedicínské oblasti především pro svou strukturální podobnost k peptidům. Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti mohou být modulovány změnou alkylového substituentu, díky čemuž lze připravit polymery hydrofilní i hydrofobní. Jedná se o univerzální polymery mající schopnost vytvářet nanostruktury. (Hoque, 2015)

g) Polyfosfáty

Anorganický polyfosfát je řetězec desítek nebo mnoha stovek fosfátových zbytků spojených vysokoenergetickými fosfoanhydridovými vazbami. (Kornberg, 1999) Biologicky rozložitelné polyfosfoestery (PPE), jako polyfosfáty, polyfosfonáty jsou používány při podávání léků, dodávání genů a tkáňového inženýrství. Jedinečnost této třídy polymerů spočívá v chemické reaktivitě fosforu, což umožňuje připojení bočních řetězců, které mohou vést ke změně rychlosti biologické degradace a molekulové hmotnosti polymeru. Ve vodě rozpustné kladně nabitě polymery jsou užitečné pro transport genů. Pozitivně nabitý polymer interaguje s negativně nabitou DNA elektrostatickými interakcemi vedoucími k tvorbě komplexů a tím poskytuje ochranu DNA před enzymatickou degradací. (Hoque, 2015)

1.3 Metody výroby scaffoldů

V současné době již existuje mnoho metod pro výrobu porézních struktur, které jsou důležitou součástí tkáňových scaffoldů. Vlastnosti povrchu scaffoldů hrají obrovskou roli při osazování buňkami, vytváření nového orgánu a jsou specifické pro každou tkáňovou oblast. Pokud struktura scaffoldu tvoří systém propojených pórů, dochází lépe k prorůstání scaffoldu buňkami, transportu živin i odpadních látek. Výslednými strukturami mohou být vlákenné 2D/3D struktury, pěny a další. Mezi nejvyužívanější metody výroby scaffoldů patří následující metody: (Ramalingam, 2012)

- a) Solvent casting (lití rozpouštědla)
- b) Salt-leaching (vymývání soli)
- c) Gas foaming (pěna-plyn)
- d) Fázová separace
- e) Electrospinning
- f) Self assembly
- g) Rapid prototyping



- h) Membránová laminace
- i) Lyofilizace

Často se také používá kombinace těchto metod pro výrobu scaffoldů s lepšími funkčními vlastnostmi. V Tabulce 2 nalezneme výhody a nevýhody jednotlivých metod.

Tabulka 2: Přehled výrobních technik scaffoldů pro tkáňové inženýrství (Ramalingam, 2012)

Metoda	Typ	Výhody	Nevýhody
Solvent casting	2D/3D	Dobrá kontrola porozity	Slabé mechanické vlastnosti Zbytky rozpouštědla ve scaffoldu
Salt-leaching	3D	Kontrola porozity, velikosti a tvaru pórů	Malá interkonektivita pórů
Gas foaming	3D	Kontrola porozity a velikosti pórů, absence toxických organických rozpouštědel	Slabé mechanické vlastnosti Malá interkonektivita pórů
Fázová separace	2D/3D	Zachování aktivity molekul ve scaffoldu	Nedostačující kontrola tvaru scaffoldu
Elektrospinning	2D/3D	Kontrola porozity, velikosti pórů a průměru vláken	Slabé mechanické vlastnosti Tlustší vlákna -> menší póry
Self assembly	3D	Kontrola porozity, velikosti pórů a průměru vláken	Drahý materiál Složitě navrhování
Rapid prototyping	3D	Porozita a tvar scaffoldu přesně kontrolován	Pouze určité polymery Drahá zařízení
Membránová laminace	3D	Možná výroba rozměrnějších scaffoldů	Slabé mechanické vlastnosti Malá interkonektivita pórů
Lyofilizace	3D	Absence vysokých teplot, vymývání není potřeba	Dlouhá doba výroby Limitované velikosti pórů

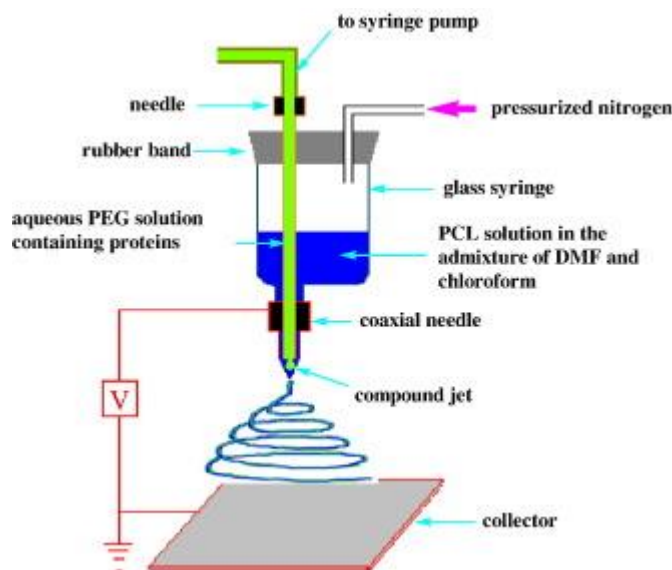


2 NANOVLÁKNA A TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Elektrospinning je jednou z několika metod výroby nanovláken. Nanovláknem se označuje ideálně nekonečně dlouhé vlákno s obvyklým průměrem desítek až několik stovek nanometrů. Výhoda nanovláken v tkáňovém inženýrství tkví především v podobnosti s nanofibrilárními proteiny, které jsou obsažené v extracelulární matrix. Tyto proteiny poskytují nejen biologické a chemické prostředí, ale také mechanickou podporu pro růst buněk. Nanovláknenné tkáňové nosiče mají daleko větší povrch než u nosičů vyrobených jinými metodami, což přispívá k lepší adhezi a proliferaci buněk na scaffoldu. Touto metodou se dají zvláknit přírodní i syntetické materiály, např. biodegradabilní PLGA, PCL, vodorozpustné polymery polyethylen oxid (PEO), polyvinylalkohol (PVA) či přírodní materiály jako kolagen, kyselina hyaluronová, fibrin a další. Nanovláknenné nosiče jsou vhodné především pro tkáňové inženýrství kostí, chrupavek, meniskusů, vazivové tkáně, (Ramalingam, 2012) ale také pro kožní kryty a cévní náhrady. (Xu, 2004) Nanovláknna jsou také vhodná pro transport biologicky aktivních molekul a slouží jako drug delivery systémy. Mohou obsahovat různé proteiny, vitamíny, růstové faktory, které poskytují nově tvořící se tkáni dostatek živin a potřebných látek pro růst. Bioaktivní komponenty mohou být v polymerním roztoku dispergovány nebo existuje možnost vytvoření bikomponentních vláken (core-shell) – koaxiální elektrospinning. Tato vlákna jsou tvořena dvěma materiály, kdy nejčastěji je vnitřní vrstvou (tzn. jádrem - core) roztok/polymer s biologicky aktivní látkou. Ta je postupně uvolňována do prostředí po dobu degradace svrchního materiálu (shell). Výhodou této metody je možnost inkorporovat do jádra roztok s bioaktivní látkou, který není zvláknitelný. Důležitou podmínkou je ale vzájemná stabilita jaderného roztoku s obalovým polymerním roztokem. Schéma koaxiální metody je zobrazen na Obr. 8.

Dispergace bioaktivních komponent v polymeru je založena na homogenním rozmíchání aktivní látky do celého obsahu polymeru, dále je polymer zvlákněn. Ve vzniklých vláknech by měly být molekuly rozloženy homogenně po celém vláknu. Uvolňování bioaktivních látek dochází prostou difúzí a zároveň i postupnou degradací materiálu.





Obr. 8: Schéma koaxiálního zvlákňování (Jiang, 2005)

2.1 Tvorba polymerních nano/mikrovláken

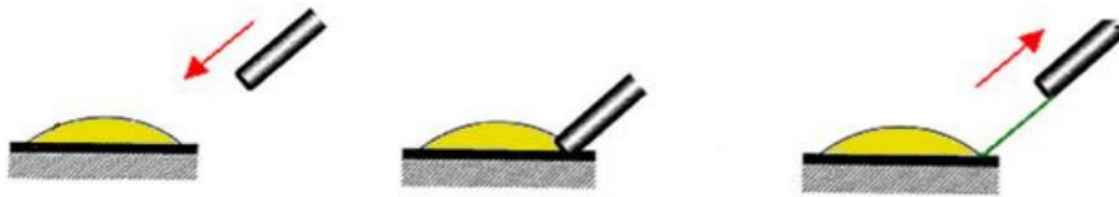
Nanovlákná jsou vlákna, jejichž délka je mnohonásobně větší než průměr vlákna. Samotná definice nanovláken je nejednotná, nejčastěji uváděné definice hovoří o průměru vláken (více než 50 % distribuce) do 100 nm, (Definition of nanomaterial, 1995-2017) popř. několik stovek nanometrů. (Charakteristika nanovláken, 2017) Průměr vyrobených nano/mikrovláken je velice závislý na výrobních podmínkách a použitém materiálu.

Mezi technologie pro výrobu nanovláknenných materiálů můžeme řadit drawing, fázovou separaci, self-assembly, template syntézu (šablonová), melt-blown, forcespinning, electrospinning a výrobu bikomponentních vláken formou island-in-the-sea.

DRAWING

Drawing je metoda tažení jednotlivých vláken z kapky či taveniny. Tažným procesem kapiláry (mikromanipulátoru) dochází ke vzniku vlákna, za současného tuhnutí a vypařování rozpouštědla vzniká pevné vlákno. Výhodou této metody je možnost vytvoření jednotlivých a orientovaných vláken, lze připravit i křížené struktury. Poměrně velkou nevýhodou může být nemožnost reprodukovatelně kontrolovat tloušťku vláken. V budoucnu by se takto vyrobená vlákna mohla uplatnit v nanooptice, nanoelektronice, tkáňovém inženýrství či ve výrobě příze s přesně definovaným počtem nanovláken. (Bajáková, 2011) (Petráš, 2009)

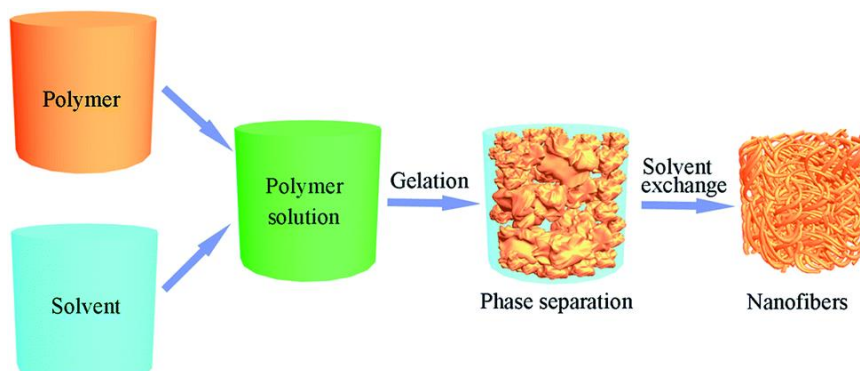




Obr. 9: Princip technologie drawing (Bajáková, 2011)

FÁZOVÁ SEPARACE

Laboratorní metoda využívající oddělení dvou fyzikálně odlišných fází. Nejprve se připravená homogenní fáze zchladí na teplotu, kdy dojde k vytvoření gelu. Dále je nutné odstranění stávajícího rozpouštědla a nahrazení jiným se zcela odlišnými vlastnostmi (příkladem může být např. voda a tetrahydrofuran). Během tohoto kroku se vytváří v původním gelu síť nanovláken. Materiál je pak ochlazen na teplotu tuhnutí druhého rozpouštědla, které je odstraněno desublimací za sníženého tlaku. Takto vyrobená vlákna mají strukturu nanovláknenné pěny. Tloušťka vláken se pohybuje v rozmezí 50 – 500 nm. (Petráš, 2009)



Obr. 10: Princip metody fázové separace (He, 2014)

SELF-ASSEMBLY

Metoda inspirovaná přirozeným skládáním molekul ve větší struktury. Často využívaná pro výrobu peptidových vláken nebo peptidových amfifilů. Proces samo-skladby je hnán mnoha silami, jako například hydrofobní interakce, elektrostatické síly, van der Waalsovy síly, dále je ovlivněn vnějšími podmínkami – pH, iontová síla. Tato metoda i přes poměrně dobré výsledky je velice náročná. Výsledné průměry vláken se pohybují již od několika nanometrů po zhruba 100 nm. (Zhang, 2012)

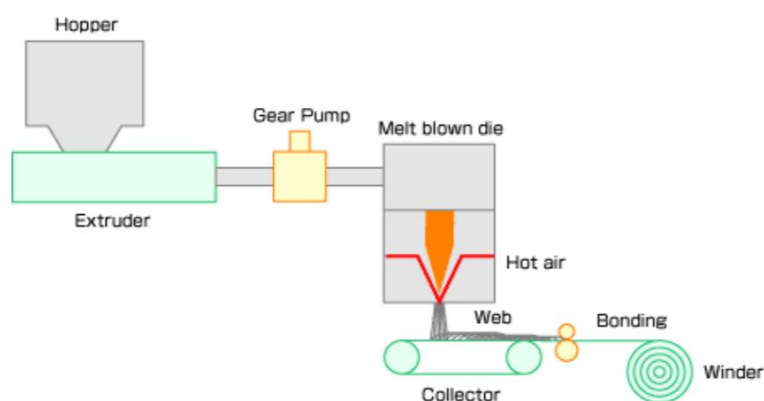


POUŽITÍ ŠABLON

Tato metoda využívá přesně definovaných vzorovacích membrán (template synthesis). Těmito membránami s velmi malými otvory je protlačován roztok polymeru do srážecí lázně. Díky využití membrán dochází k výborné reprodukovatelnosti, ovšem metoda je stále považována pouze za laboratorní. Průměry vláken závisí na použité membráně, často od 100 nm. (Petráš, 2009)

MELT-BLOWN

Tato metoda výroby nanovláken je založena na roztavení polymeru, který je dále hnán do trysek, k nimž je veden stlačený horký vzduch. Po vytlačení je tavenina unášena horkým vzduchem a dlužena do doby, než se zachytí vlákna na kolektor. Vlákna jsou pak dále zpracována. Schéma principu je zobrazeno na Obr. 11. Pro tuto metodu jsou vhodné pouze určité druhy polymerů a celá výroba je velice drahá. Průměry vláken se pohybují nad 250 nm, obvyklé průměry průmyslové výroby jsou ale v řádech mikrometrů. (Petráš, 2009) (Nayak, 2011)



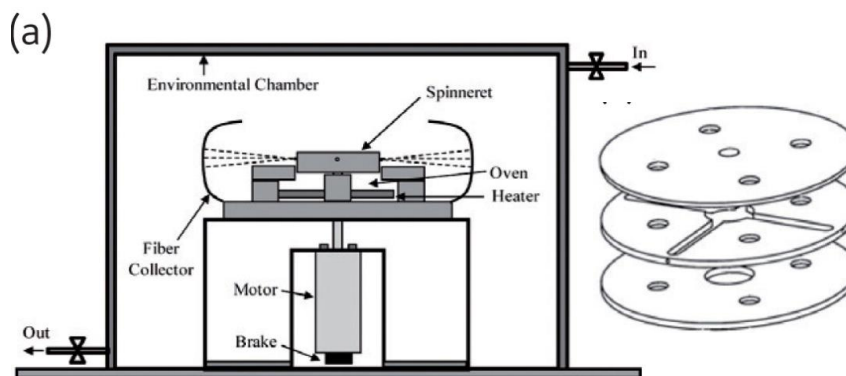
Obr. 11: Princip metody melt-blown

FORCESPINNING

Technologie výroby nanovláken je založena především na odstředivé síle. Polymer ve formě roztoku (popř. taveniny) je umístěn do duté spinnerety, která obsahuje otvory, jimiž se odstředivou silou vytvářejí vlákna. Tato vlákna jsou dále dlužena a zachytávána na kolektorech. Součástí přístroje je také ohřev a motor spinnerety. Schéma metody a spinnerety je zobrazeno na Obr. 12. Parametry vláken lze ovládat především rychlostí otáčení spinneretu, teplotou a systémem sběru vyrobených nanovláken. Touto metodou se dají získat vlákna s průměrem větším než 200 nm. Výhodou této metody je absence vysokého napětí, relativně jednoduché zařízení, velká produkce.



Pro určité typy polymerů je ovšem nutné zajistit vysoké teploty při procesu. (Sarkar, 2010) (Nayak, 2011)



Obr. 12: Schéma metody forcespinning (vlevo) a příklad spinnerety (vpravo) (Sarkar, 2010)

ELECTROSPINNING

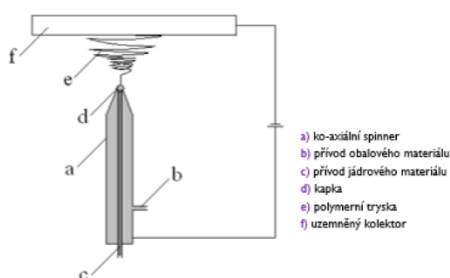
Electrospinning je metoda výroby ultra jemných vláken (nanovláken) pomocí aplikace vysokého napětí na polymer a v současnosti se jedná o jednu z nejčastěji využívaných metod. (Sarkar, 2010) Principem je přiložení vysokého napětí na polymerní roztok či taveninu, vytvoření trysky (Taylorova kuželu) a po přesažení kritické hodnoty napětí vznik bičujícího vlákna, který je sbírán na uzemněný kolektor. Častěji se využívá pro zvlákňování polymerního roztoku, jelikož zvlákňování z taveniny s sebou nese spoustu problémů, od horší produkce jemných vláken, až po problém s elektrickým vybitím. Díky dlouhému zkoumání tohoto jevu a snaze zvýšení produktivity se objevilo několik různých přístupů elektrostatičkého zvlákňování. Obecně je lze rozdělit na jehlové a bezjehlové techniky. Jehlové techniky mohou obsahovat jednu až několik jehel v různém postavení (lineární, čtverec, trojúhelník, elipsa, ..). (Nayak, 2011) Z bezjehlových technik lze jmenovat například zvlákňování z volné hladiny, z polymerní hladiny na otočném vodorovném válci (patentovaná metoda profesora Jirsáka z Technické univerzity v Liberci, základ pro vznik přístroje Nanospider™ od firmy Elmarco). Následovaly také pokusy o použití kuželů, disků a struny, která se v poslední době osvědčila nejvíce. Dalšími zkoumanými metodami jsou např. bubble-electrospinning a electroblowing.

Bubble-electrospinning je založen na vytváření bublin plynovou pumpou na volném povrchu polymerního roztoku, ke kterému je přivedeno elektrické napětí. Z bublin se po přiložení vysokého napětí stává kónický útvar podobný Taylorově kuželu a po překročení kritické hodnoty napětí vzniká mnoho trysek produkující nanovlákná, jež jsou sbírána na uzemněný kolektor. Průměr vláken roste s přiloženým napětím, což je pravým opakem při „klasickém“ elektrostatičském zvlákňování.

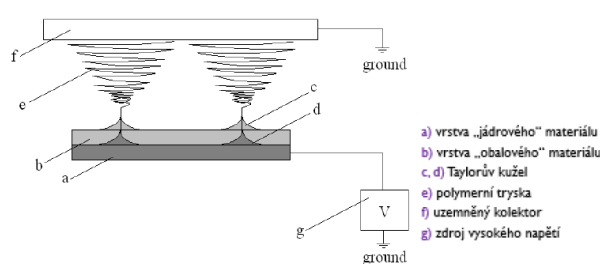


Electroblowingem rozumíme modifikaci, při které je proces zvlákňování podporován foukáním vzduchu. Vzduch se vstříkuje přes zvlákňovací trysku, na vznikající vlákno tak působí nejen síla elektrická, ale také smyková síla vzduchu. Touto metodou lze vyrábět např. nanovlákná termoplastických i termosetových pryskyřic. (Nayak, 2011)

Jednou z dalších metod je koaxiální elektrostatické zvlákňování, které využívá dvou různých roztoků. Koaxiální elektrostatické zvlákňování je unikátní a vysoce sofistikovaná metoda pro výrobu kompozitních (bikomponentních) nanovláken. Jednotlivá vlákna by měla mít přesně určenou strukturu, tzv. jádro-plášť. Plášť nanovlákná bývá ve většině případů tvořena polymerním materiálem, zatímco jádro může být tvořeno polymerem, ale i jiným roztokem. Z technologického pohledu vzniká plášť z elektrostaticky zvlákňitelného roztoku, zatímco roztok pro jádro nemusí být elektrostaticky zvlákňitelný. Koaxiální nanovlákná nabízejí neobvyklé možnosti kombinace vlastností a materiálů, které neposkytují žádná jiná doposud známá vlákna. Lze také vytvořit vlákna bez jádra (dutá vlákna, vymytím vnitřního voděrozpuštěného materiálu např. PVA). Použití koaxiálního elektrostatického zvlákňování je vhodné pro materiály, které je složité nebo nemožné zvláknit běžným způsobem. Této techniky lze využít k inkorporaci aktivních látek, jakými mohou být anestetika, antibiotika, imunosupresiva, přírodní látky (DNA, proteiny, lipozomy, aj), ale také růstové faktory do jádra koaxiálního biodegradabilního nanovlákná s výhodou vyšší koncentrace, než je tomu v případě klasických nanovláken. Tato metoda není natolik zkoumána a vyskytuje se mnoho problémů se zvlákněním, nevýhodou je také zatím nízká produkce, proto se upřednostňuje elektrostatické zvlákňování. Inkorporované aktivní látky mohou být následně cíleně a řízeně uvolňovány, což je s výhodou využíváno například u aplikací nanovláknenných vrstev v oblasti topické léčby a kosmetiky. (Nanopharma, 2015) Stejně jako u „klasického“ electrospinningu existují i zde dvě možnosti – jehlové a bezjehlové zvláknění. Schémata jednotlivých metod jsou zobrazeny na Obr. 13 a Obr. 14.



Obr. 13: Schéma jehlového koaxiálního zvlákňování (Vysloužilová, 2014)



Obr. 14: Schéma bezjehlového koaxiálního zvlákňování (Vysloužilová, 2016)



2.2 Parametry elektrostatického zvlákňování

Pro samotný proces výroby nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování ze struny je nutné znát důležité parametry. Tyto parametry se rozdělují do dvou základních skupin – materiálové a procesní.

Materiálovými parametry se rozumí vlastnosti polymerního roztoku jako jsou viskozita, koncentrace, molekulová hmotnost, elektrická vodivost roztoku a jeho povrchové napětí. Viskozita velice závisí především na koncentraci i molekulové hmotnosti použitého materiálu.

a) Viskozita

Fyzikální veličina popisující míru odporu roztoku se deformovat pod vlivem smykových sil. Tato veličina je úzce spojena s následujícími parametry koncentrace a molekulové hmotnosti polymeru.

b) Koncentrace

Koncentrace polymerního roztoku rozhoduje o tvorbě vláken. Pokud je koncentrace polymeru příliš nízká, nebude docházet ke vzniku vláken (electrospinningu), ale k elektrostatickému rozprašování (electrospraying). Při zvýšení bude docházet ke kombinaci electrospinningu a electrosprayingu (popř. vzniká „korálkové“ vlákno). Při vhodné koncentraci však dochází ke vzniku nano/mikrovláken. Pokud by koncentrace byla příliš vysoká, dochází již pouze k přesunu hmoty vlivem vysokého napětí mezi elektrodami. Pro každý polymer existuje jiná vhodná koncentrace pro zvlákňování. Podmínky jsou ale v závislosti nejen na koncentraci, ale i na molekulové hmotnosti polymeru. (Li, 2013)

c) Molekulová hmotnost

Molekulová hmotnost použitého polymeru, a tedy délka makromolekul má v zásadě přímý vliv na hodnotu viskozity. Nízká molekulová hmotnost polymeru je zodpovědná za vznik kapek a nikoliv vláken. Existují také hraniční molekulové hmotnosti, nad které se již metodou elektrostatického zvlákňování nevytváří vlákna, jen dochází k přesunu hmoty (tzv. mikro-pásy). Jednotlivé hraniční molekulové hmotnosti jsou specifické pro každý polymer. (Li, 2013)



d) Elektrická vodivost

Zvýšením elektrické vodivosti roztoku se zvyšuje povrchová hustota náboje, která má vliv na produkci hladkých vláken bez „korálkových“ defektů. Elektrická vodivost se dá zvýšit přidáním iontové soli, jako je například NaCl, KH_2PO_4 , nebo použitím organické kyseliny jako rozpouštědla, např. kyseliny mravenčí či octové. (Li, 2013)

e) Povrchové napětí

Povrchové napětí hraje roli při tvorbě Taylorova kužele, značí sílu, která je potřeba k protržení polymerního povrchu a jeho vzniku. Proto je nutné toto napětí snižovat. Snižování lze dosáhnout přidáním surfaktantu či jiné látky. Pro PVA se používá ethanol.

Pro výrobu nanovláken jsou nicméně důležité také samotné procesní parametry, mezi něž řadíme nejen přiložené napětí, dávkování a vzdálenost kolektoru, ale také okolní podmínky. Ty hrají v procesu zvlákňování nezanedbatelnou roli. Je důležité stále hlídat nejen teplotu, tlak, ale především vlhkost, proto se často využívá sušení/zvlhčování, topení či foukání pro podporu zvlákňování.

f) Napětí

Přivedené vysoké napětí má rozhodující vliv na samotný proces. Pro iniciaci zvlákňování je potřeba překročení prahové hodnoty napětí, kdy vznikají Taylorovy kužely a tvoří se z nich vlákna. Hodnota prahového napětí je u každého polymerního roztoku jiná. Pro zvlákňování polymerních roztoků PVA či PCL se obvykle používá napětí v rozmezí 30 - 60 kV.

g) Dávkování – rychlost cartridge

Rychlost dávkování pomocí cartridge by měla být o něco větší, než je relaxační čas, což je doba potřebná pro vznik Taylorova kužele a následné vytvoření bičujících vláken. Ideální rychlost pro největší produkci je taková, kdy má polymer čas vytvořit Taylorovy kužely, spotřebuje se většina polymerního roztoku na struně a dochází k dalšímu dávkování polymeru z cartridge (zásobníku polymerního roztoku).

h) Vzdálenost kolektoru

Vzdálenost kolektoru od elektrody je důležitá pro tvorbu hladkých vláken. Je potřeba zvolit takovou vzdálenost, která umožní vláknům zcela „uschnout“, resp. jde o odpaření rozpouštědla z vláken. Vlákna by měla na substrát/kolektor dopadat již suchá.



i) Okolní podmínky

Důležité jsou také okolní podmínky, jako například tlak, teplota, vlhkost. Každý polymer reaguje na tyto podmínky jinak. Některé polymery vyžadují při zvláknování vyšší vlhkost, jiné vyšší teplotu. Často se využívá i proud vzduchu, který podporuje tvorbu nanovláken (má blíže k electroblowingu). Teplota se sleduje z důvodu vlivu na rychlost odpařování rozpouštědla. Dlouhou dobu se nevěnovala pozornost relativní vlhkosti, která má ovšem na elektrostatický proces nezanedbatelný vliv. Příkladem mohou být hydrofobní polymery, které v kombinaci s vysokou relativní vlhkostí způsobí porozitu vláken. Pelipenko (Pelipenko, 2013) zkoumal vliv relativní vlhkosti (4-70%) na průměr vláken PVA při electrospinningu z jehly. Zjištěním bylo, že s rostoucí vlhkostí vznikají slabší vlákna. Jedním z vysvětlení může být rychlost odpařování rozpouštědla, která je mimo jiné hnána rozdílem tlaku par rozpouštědla a jeho parciálním tlakem v komoře. U vodných roztoků polymerů se tento gradient zvyšuje se sníženou relativní vlhkostí. Při nízké relativní vlhkosti dochází k rychlému odpařování rozpouštědla hned po vzniku vláken, které je pak natahováno pouze přiloženým napětím. (Pelipenko, 2013)



3 CÍLENÁ DOPRAVA LÉČIV

Cílená doprava léčiv, drug delivery systémy (DDS) jsou systémy dodávání léčiv, které mají za úkol zlepšit farmakokinetické a léčebné vlastnosti použitých léků. Hlavním cílem DDS je změna farmakokinetiky a biodistribuce použitého terapeutika nebo vytvoření lékového rezervoáru (pro trvalé uvolňování látky) nebo obojí. Snahou těchto systémů je jednodušší podání, transport a kontrola léčiva v těle. DDS jsou tvořeny nosiči a terapeutickými látkami. Terapeutickými látkami se rozumí nejen léčivo, ale také další biologicky aktivní látky. Mezi nejčastěji používané nosiče patří polymery, micely, lipidy a liposomy, různé ligandy, cyklodextriny, kalixareny aj. Polymery jsou využívány ve formě částic, dendrimerů, vláken, hydrogelů či vrstev. (Allen, 2004)

Dlouhá léta byly hlavními metodami tvorby polymerních DDS techniky komprese, sprejování a dip coating (ponoření) nebo enkapsulace. (Liechty, 2010) Nyní je poměrně velké množství různých technik. Příkladem mohou být nanočástice, které se dají vyrobit nanoprecipitací, emulsifikací, metodou layer-by-layer (vrstva po vrstvě), různými druhy tisknutí/litografií či electrospreyngem. (Zhang, 2012)

DDS systémy lze dále řadit z pohledu dodávání léčiv do 4 kategorií:

- a) Difúzně řízené systémy (monolitické)
- b) Systémy aktivované rozpouštědlem (bobtnající či osmoticky řízené)
- c) Chemicky řízené systémy
- d) Externě spouštěné systémy (teplota, pH, ..)

V posledních letech se v souvislosti s tímto tématem často hovoří o využití tzv. inteligentních či citlivých polymerech. Jedná se o polymery tvořené velkým množstvím lineárních či rozvětvených (ko)polymerů nebo zesíťovaných polymerních sítí. Charakteristickým znakem je jejich schopnost reagovat na vnější stimul (teplota, pH, elektromagnetické záření, ultrazvuk, biochemické/chemické činidla, redoxní potenciál, aj.) drastickou fyzikální či chemickou změnou, jako je například rozpustnost, hydrofilita/hydrofobita, změna konformace, integrita zesíťování apod. (Liechty, 2010)

Některé systémy jsou již schválené a mohou být dále použity, mnoho dalších je v rozsáhlých klinických studiích. Jedním ze schválených DDS je PEG stabilizovaný liposom pegylovaného liposomálního doxorubicinu (Doxil, Caelyx), který má uplatnění především v chemoterapii. (Allen, 2004)



3.1 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky jsou látky, které zasahují do vnitřního chodu organismu, mohou tak potlačovat či zlepšovat vzájemnou kooperaci v organismu. Mezi tyto látky můžeme řadit přírodní sloučeniny vyskytující se v organismu (např. hormony, vitamíny, esenciální aminokyseliny, určité proteiny aj.), ale také látky syntetické, které se nejčastěji podávají ve formě léčiv (chemoterapeutika, antibiotika aj.), pesticidů i toxických látek. (Waisser, 2001) Mezi často využívané látky v TE patří růstové faktory, kolagen, kyselina hyaluronová.

3.1.1 Růstové faktory

Růstové faktory (growth factors, GFs) jsou skupinou vysokomolekulárních bioaktivních látek. Z chemického hlediska se jedná o polypeptidy či proteiny, které jsou sekretovány různými druhy buněk. Tyto látky jsou důležité pro regulaci buněčných pochodů, mezi které patří především proliferace, diferenciaci, angiogeneze, zánět, regenerace tkáně a fibróza. Účinky vyvíjejí prostřednictvím aktivace signálních transdukčních cest vazbami na receptory na povrchu cílových buněk. (Islam, 2016)

Růstové faktory můžeme rozdělit do několika skupin, které obsahují několik podskupin proteinů s příbuznými primárními sekvencemi. Každá podskupina je dále složena členy. V Tabulce 3 jsou vypsány základní skupiny růstových faktorů. (Greene, 2017)

Tabulka 3: Základní skupiny růstových faktorů (Greene, 2017)

Zkratka RF	Název skupiny RF	
EGF	Epidermal growth factor	Epidermální růstový faktor
FGF	Fibroblast growth factor	Růstový faktor fibroblastu
NGF	Nerve growth factor	Nervový růstový faktor
TGFβ	Transforming growth factor beta	Transformační růstový faktor beta
INSULIN & IGF's	Insulin-like growth factor	Růstový faktor podobný inzulinu
PDGF	Platelet derived growth factor	Trombocytární růstový faktor

Růstové faktory jsou poslední dobou zkoumanými látkami, především pro jejich využití v regenerativní medicíně. Regenerativní medicína se snaží poskytovat alternativy k transplantacím orgánů, kde je vysoká možnost imunitní odpovědi, ale také nedostatek vhodných orgánů a tkání. Růstové faktory mají široké spektrum použitelnosti. (Lee, 2010) Růstové faktory jsou vhodné pro řešení problémů při léčbě hematologických, onkologických a kardiovaskulárních



problémů. (Ferrara, 1999) (Vose, 1995) V Tabulce 4 jsou zobrazeny nejčastěji používané růstové faktory v regenerativní medicíně s jejich funkcemi.

Tabulka 4: Populární růstové faktory v regeneraci tkání. (Lee, 2010)

Název	Ošetřovaná tkáň	Funkce
Ang-1 <i>angiopoietin 1</i>	Cévy, srdce, svaly	Stabilita cév
Ang-2 <i>angiopoietin 2</i>	Cévy	Destabilizace, regrese a disociace endotelové buňky z okolních tkání
FGF-2 <i>fibroblast growth factor</i>	Cévy, kosti, kůže, nervy, svaly, páteř	Migrace, proliferace a přežití endoteliálních buněk, inhibice diferenciac embryonálních kmenových buněk
BMP-2 <i>bone morphogenetic protein</i>	Kosti, chrupavky	Diferenciac a migrace osteoblastů
BMP-7 <i>bone morphogenetic protein</i>	Kosti, chrupavky, ledviny	Diferenciac a migrace osteoblastů, vývoj ledvin
EGF epidermal growth factor	Kůže, nervy	Regulace růstu, proliferace a diferenciac epiteliálních buněk
EPO Erythropoietin	Nervy, páteř, hojení ran	Podpora přežití červených krvinek a rozvoj prekurzorů červených krvinek
HGF hepatocyte growth factor	Kosti, játra, svaly	Proliferace, migrace a diferenciac mezenchymálních kmenových buněk
IGF-1 insulin-like growth factor	Svaly, kosti, chrupavky, játra, ledviny, plíce, nervy, kůže	Proliferace a inhibice buněčné apoptózy
NGF nerve growth factor	Mozek, páteř, nervy	Přežití a proliferace nervových buněk
PDGF-AB (nebo BB) platelet-derived growth factor	Cévy, svaly, kosti, kůže, chrupavky	Embryonální vývoj, proliferace, migrace, růst endotelových buněk
TGF α transforming growth factor α	Kůže, mozek	Proliferace bazálních buněk nebo neurálních buněk
TGF β transforming growth factor β	Kosti, chrupavky	Proliferace a diferenciac buněk tvořících kosti, antiproliferační faktor pro epiteliální buňky
VEGF vascular endothelial growth factor	Cévy	Migrace, proliferace a přežití endotelových buněk

3.1.2 Růstové faktory v trombocytech

Růstové faktory se vyskytují v různých typech buněk dle jejich funkcí. V trombocytech (krevních destičkách) se růstové faktory vyskytují převážně v α -granulích. Při aktivaci trombocytu dochází k vypuštění obsahu granul do prostoru, kde růstové faktory zajišťují převážně vytváření a proliferaci nových buněk, hojení a další mechanismy k rychlé obnově poškozené



tkáně. Trombocyty, resp. trombocytární lyzáty, obsahují v největším množství růstové faktory skupiny PDGF, TGF- β (Marx, 1998) a dále IGF-1, EGF a další. (Lee, 2010)

3.2 Trombocyty

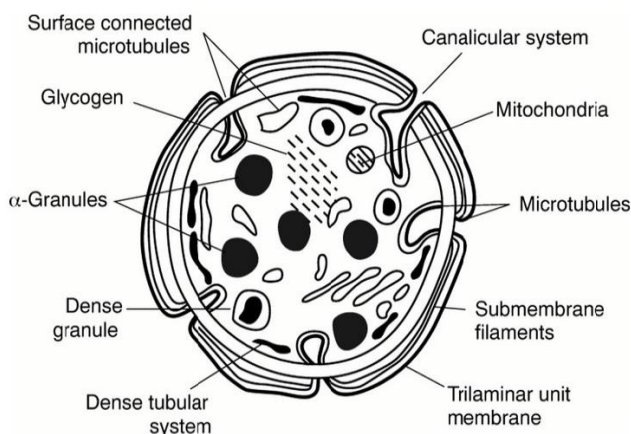
Krevní destičky, odborně trombocyty, jsou bezjaderné buněčné fragmenty diskoidního tvaru obsažené v krvi. Hrají zásadní roli při řízení vaskulární integrity a regulaci hemostázy. Ve zdravém lidském těle se pohybuje množství krevních destiček v rozmezí $75-200 \times 10^{10}$. (Deppermann, 2016) (Ghoshal, 2014) Vlastnosti krevních destiček, např. průměrný objem krevních destiček, šířka destiček a destičkový hematokrit², mohou poskytovat také informace o chorobných stavech. V budoucnu se očekává velký přelom v předvídání a diagnostice chorobných stavů právě pomocí biomarkerů krevních destiček. (Ghoshal, 2014)

Primární funkcí krevních destiček je iniciace koagulačních kaskád. Poškození v cévách způsobuje adhezi krevních destiček na subendoteliální povrch. Krevní destičky mění svůj tvar, uvolňují do okolí obsah granulí a agregují se. Takto krevní destičky minimalizují ztrátu krve. Mimo jiné přispívají také k patofyziologickým stavům, jako je trombóza, ateroskleróza či mrtvice. Agregaci krevních destiček mohou také spustit určité druhy bakterií, např. *Vibrio cholerae*, původce cholery). (Deppermann, 2016) (Ghoshal, 2014)

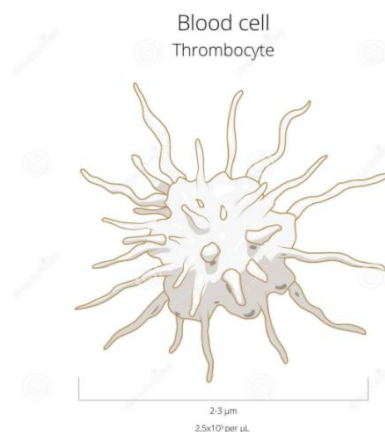
Granule trombocytů obsahují velké množství bílkovin, mezi ně patří cytokiny, zánětlivé mediátory, růstové faktory, antimikrobiální proteiny zvané trombocidiny. Krevní destičky obsahují tři základní druhy granulí – α -granule, denzní granule a lysosomy. Počet α -granulí v jedné krevní destičce (myši) se pohybuje v rozmezí 50-80 granulí s velikostí 200-500 nm, (Blair, 2009) což odpovídá přibližně 10 % hmotnosti a je tak nejčastějším typem granule. α -granule obsahují vonWillebrandův faktor (vWf), fibrinogen, velké množství koagulačních faktorů, integriny, imunoglobuliny, růstové faktory aj. Celkem je v α -granulích více než 300 různých proteinů zajišťujících široké spektrum procesů, např. adheze krevních destiček, koagulace, hemostáza, růst nádorů, hojení ran a obrana hostitele. (Blair, 2009) (Deppermann, 2016) Denzních granulí se vyskytuje v krevní destičce 10x méně než α -granulí, pouhých 5-7 kusů. Tyto granule obsahují vysoké množství ADP, ATP, Ca²⁺, Mg²⁺ a serotoninu. Posledním typem granulí jsou lysosomy, které obsahují různé proteolytické enzymy, jako jsou glykosidázy, proteázy a kationtové proteiny s baktericidní aktivitou. (Deppermann, 2016)

² Destičkový hematokrit – část objemu trombocytů v celkovém objemu systému

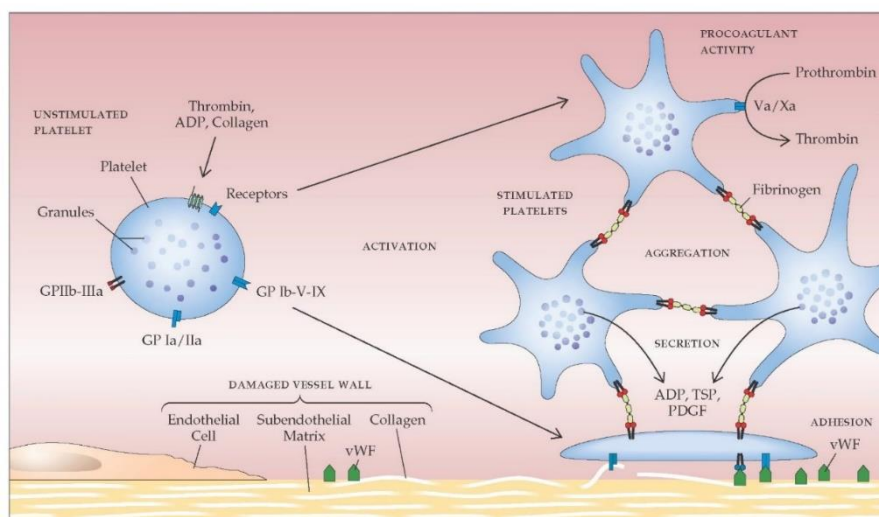




Obr. 16: Struktura krevní destičky, trombocytu



Obr. 15: Krevní destička



Obr. 17: Aktivace krevních destiček a jejich agregace

3.3 Růstové faktory z trombocytů

Stejně jako další krevní částice, dají se oddělovat i trombocyty. Takto odebraným krevním destičkám se říká trombocytární přípravky. V současné době se využívá dvou metod – aferézy (TA) či odebráním plné krve a následné získání krevních destiček z buffy coatu (TB). V klinické praxi (např. mikrochirurgii (Hersant, 2016)) se taktéž používají roztoky PRP (Platelet rich plasma, plasma bohatá na trombocyty), které obsahují vysoké množství růstových faktorů (především pro stimulaci buněčné proliferace) a další bioaktivní látky s různými terapeutickými účinky. Nevýhodou těchto roztoků je jejich krátká expirace trvající několik dní, proto se krevní destičky



skladují ve formě trombocytárních lyzátů, popř. lyofilizátů, při nízkých teplotách -30/-80°C. (Kopřivová, 2012) (Fekete, 2012)

Výroba trombocytárního lyzátu je rozdělena do dvou základních kroků. Nejprve dochází k výrobě PRP, popř. TRS (thrombocyte rich solution, roztok bohatý na trombocyty). Druhým krokem dále následuje samotná výroba trombocytárního lyzátu z PRP či TRS.

a) Výroba PRP/TRS (odběrem plné krve z buffy coatu)

V první řadě je nutné zajistit odběr od dárců. Využívá se vždy odběr od 4 dárců, aby se dosáhlo lepší reprodukce. Odebrané vzorky jsou dále testovány na infekční markery, především na hepatitidy (A, B, C), HIV a jiné. (Fekete, 2012)

Odběry jsou prováděny do vaků s antikoagulačními látkami, které se následně nechají minimálně po dobu 2 hodin odstát. Dochází k centrifugaci vaků a odseparování jednotlivých složek krve. Prostřední část obsahující krevní destičky a malé množství plasmy a červených i bílých krvinek se nazývá buffy coat. Buffy coaty jsou inkubovány přes noc v tromboagitátoru, druhý den následuje smíchání 4 různých vaků, buď pouze spolu a vzniká PRP, popř. s roztokem composolu (roztok sodné, draselné a hořečnaté soli, glukonáty aj.), kdy vzniká PRS. V poslední fázi se vaky zcentrifugují a na automatickém lisu dochází k separaci zbytků červených a bílých krvinek. Takto připravený vak je možné skladovat po dobu 24 měsíců při teplotě od -30 do -80 °C. (Fekete, 2012) (Kopřivová, 2012)

b) Výroba TL

Pro výrobu trombocytárního lyzátu z PRP či PRS neexistuje jeden univerzální postup, ale několik různých přístupů. Mezi nejčastější a nejvyužívanější patří metoda freeze-thaw, která využívá zamrazení při -80 °C a následné rozmrazení PRP (či PRS, dále jen PRP), kdy dochází k buněčné lyzy³, a následné centrifugaci a oddělení supernatantu od pelet obsahujících zbytky buněčných membrán. Podmínky těchto úkonů se ale navzájem liší. Capelli (Capelli, 2007) používá pouze rozmrazení PRP a centrifugaci roztoku při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Výsledný lyzát dále skladuje při teplotě -20 °C do použití. Chevallierová (Chevallier, 2009) rozmrazuje PRP a provádí centrifugaci při 1400 x g, supernatant skladuje při -80 °C. Výzkum vedený panem Schallmoserem (Schallmoser, 2009) je založen na několikanásobném rozmrazování a zamrazování PRP pro větší uvolnění

³ Buněčná lyze – narušení cytoplasmatické membrány a vylití obsahu buňky (cytoplasmy)



růstových faktorů minimálně při -20 °C a 37 °C (vodní lázeň). Centrifugace probíhá na 4000 x g při 4 °C po dobu 15 minut, následuje oddělení supernatantu a jeho skladování při minimálně -20 °C do použití.

Trombocytární lyzát je možné také koupit již připravený. Dodává se v několika objemech s heparinem pro inhibici koagulace, popř. i TL zbavený fibrinogenu (dodávají firmy STEMCELL, SigmaAldrich (PLTMax) a další).



Experimentální část

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité materiály a chemikálie

V následující tabulce byly vypsány všechny chemikálie, které byly potřeba pro tuto práci.

PŘÍPRAVA VRSTEV

Ethanol absolutní	Penta
HRP	Sigma-Aldrich
PVA Sloviol R 130000 g/mol, 88% hydrolýza	Novacké chemické závody
PVA Mowiol 125000 g/mol, 98% hydrolýza	Kuraray Europe
PVA 130000 g/mol, 99+% hydrolýza	Sigma-Aldrich
PVA 89-98000 g/mol, 99+% hydrolýza	Sigma-Aldrich
PVA 50-85000 g/mol, 98-98,9% hydrolýza	Acros Organics
TRS	Transfúzní oddělení KNL

SDS-PAGE

30% akryl-bisakrylamid mix	Amresco
APS – amonium persulfát	LachNer
Bromfenolová modř	Amresco
β -mercaptoethanol	Roth
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth
Dusičnan stříbrný AgNO_3	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma
Formaldehyd 37%	Penta
Glycerol	Roth
Glycin	VWR International
Chloroform 99,8%	Penta
Kyselina chlorovodíková	Penta



Kyselina octová	Penta
Methanol	Penta
Protein MW Marker, Wide Range K494	Amresco
Sodium dodecyl sulfát – SDS	Sigma-Aldrich
Thiosíran sodný pentahydrát	Lachema Neratovice
Tris	Amresco
TEMED	Sigma-Aldrich

STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

BSA – hovězí sérový albumin	VWR International
Činidlo Bradfordové	Sigma-Aldrich

ENZYMOVÁ ESEJ

HRP – křenuvová peroxidasa	Sigma-Aldrich
Octan sodný	Sigma-Aldrich
Kyselina octová	Penta
Peroxid sodný	Peroxides Sokolov
TMB – tetramethyl benzidin	Sigma-Aldrich
DMSO – dimethyl sulfoxid	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková	Penta

BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

3T3-SA	ATCC
DMEM	Lonza
Ethylenoxid – Anprolene	Andersen Sterilizers
FBS – fetální hovězí sérum	Biosera
FGM-2 Single Quots	Lonza
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich



Izopropylalkohol	Penta
KCl – chlorid draselný	Analytika Praha
K ₂ HPO ₄	Analytika Praha
MEM	Lonza
MG-63	ATCC
MTT	Amresco
NaCl – chlorid sodný	Analytika Praha
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Analytika Praha
Penicillin - Streptomycin - Amphotericin B	Lonza
Trypanová modř	Sigma-Aldrich
Trypsin	Biosera

4.2 Použité přístroje a programy

Nanospider™ NS 1WS500U	Elmarco
Rastrovací elektronový mikroskop Vega 3 SB	Tescan
Spektrofotometr ELx808	Biotek
pH metr pH700	Eutech Instruments
SDS-PAGE elektroforéza - miniprotean	Bio rad
LUNATM Cell Counter, model L10001	Logos Biosystems
Power Pac HC	Bio rad
Centrifuga Z36HK	Hermle Labortechnik
Cirkulovaná digitální vodní lázeň	Lab tech
Quorum Q50ES	Quorum technologies
Hlubokomrazící box MDF-033V	Sanyo Electric
Centrifuga 5414C	Gerätebau Eppendorf
CO ₂ inkubátor NB-203XL	N-biotek
Bio II Advance	Telstar
Spektrofotometr Spark	Tecan
HAAKE™ Roto Visco 1	Thermo Fisher Scientific



4.3 Metody a protokoly

V práci byly použity polymery PVA s molekulovou hmotností od 47 do 130 tisíc, s hydrolyzou 88 %, 98 % a 99+ %. Vyrobené PVA vrstvy obsahovaly také přidané látky – trombocytární lyzáty či enzym peroxidázu (HRP). Všechny vrstvy byly analyzovány z hlediska morfologie, obsahu a aktivity inkorporovaných proteinů. Některé byly dále podrobeny biologickému in-vitro testování s buňkami a otestovány MTT testem.

4.3.1 Příprava trombocytárního lyzátu s obsahem růstových faktorů

Trombocyty z transfúzního oddělení Krajské nemocnice v Liberci, získané odběrem z buffy coatu, byly rozlitý do 50ml centrifugačních zkumavek a zmrazeny při -80 °C, poté byly pomalu rozmrazeny (5 °C; ON). Po rozmražení byl roztok trombocytů centrifugován (2830 x g, 5 °C, 30 minut). Dále byl opatrně odpipetován supernatant (horní fáze obsahující růstové faktory) a uchován v 15ml centrifugačních zkumavkách při -80 °C do dalšího použití.

4.3.2 Příprava roztoků PVA

Při použití zásobního 16% (w/w) roztoku PVA o molekulové hmotnosti 130000 a hydrolyze 88 % se polymer ředil na 12 % (w/w). Pro přípravu 50 g 12% PVA (88 % hydrolyzy, MW 130000) bylo potřeba 37,5 g 16% PVA a 12,5 g destilované vody, takto připravený roztok byl míchán na magnetickém míchadle (RT, minimálně 4 hodiny). Ostatní PVA byly řešeny individuálně – od 6 do 15 hm. %. Jako rozpouštědlový systém byl použit systém voda-ethanol v poměrech 8:2 či 9:1.

a) Příprava roztoku s trombocytárními lyzáty (TL):

V případě přidaného trombocytárního lyzátu bylo množství TL přidané do roztoku odpovídající 10 % hmotnosti roztoku, toto množství bylo započítáváno jako vodná složka rozpouštědla. Deset procent trombocytárních lyzáatů bylo shledáno jako ideální množství v předchozích pokusech v práci Bc. Vojtěcha Hanzla. (Hanzl, 2017) Pro přípravu 50 g roztoku 12% PVA s TL bylo použito 37,5 g 16% PVA, 7,5 g destilované vody a 5 g



trombocytárního lyzátu. Tento připravený roztok byl dále míchán na magnetickém míchadle (RT, minimálně 4 hodiny). Pro potvrzení výsledků pana Hanzla byl proveden stejný pokus s obsahem 7,5 %, 10 % a 12,5 % TL.

b) Příprava roztoku s křenovou peroxidázou (HRP):

V případě přípravy roztoků s HRP pro testování enzymatické aktivity, byl do polymerního roztoku 12% PVA (88 % hydrolyzy, MW 130 000) přidán roztok HRP v acetátovém pufru (Tabulka 11), který odpovídá 1 mg peroxidasy na 1 g polymeru PVA. Koncentrace roztoku HRP byla 1 mg/ 100 µl acetátového pufru, přidané množství bylo opět započítáváno jako vodná složka rozpouštědla. Pro přípravu 50 g roztoku 12% PVA s HRP bylo použito 37,5 g 16% roztoku PVA, 11,9 g destilované vody a 600 µl roztoku HRP (koncentrace 1 mg/100µl v acetátovém pufru). Roztok byl míchán na magnetickém míchadle (RT, minimálně 4 hodiny).

4.3.3 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování polyvinylalkoholu bylo prováděno na přístroji Nanospider™ typu NS 1WS500U od firmy Elmarco. Tento přístroj umožňuje zvlákňovat polymerní roztoky ze struny, na kterou roztoky dávkuje cartridge (zásobník). Pro tuto práci byl použit menší zásobník o objemu přibližně 10 mililitrů. Pro dávkování byl obvykle použit průvlak velikosti 0,6 mm, u některých polymerů s vysokou hydrolyzou se využil větší (0,7/0,8 mm). Podmínky zvlákňování se lišily podle použitých polymerů a látek do nich přidaných. Nejčastěji využívaný polymerní roztok PVA (12%, MW 130.000 g/mol, 88% hydrolyza) zpravidla zvlákňoval za těchto podmínek:

Tabulka 5: Průměrné hodnoty nastavení a podmínek pro zvlákňování 12% PVA s 88% hydrolyzou (Sloviol R)

Parametr	Hodnota
Vzdálenost kolektoru	138-143 mm
Odtah struny	13-15
Odtah textilie (substrátu)	5-8 mm/min
Rychlost cartridge (dávkování)	140-200 mm/sec
Napětí	+40/-20 kV příp. i +40/-10 kV
Teplota	22-23 °C



4.3.4 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Příprava vzorku pro SEM spočívá v odstříhnutí malé části PVA vrstvy, která se nalepí pomocí oboustranné lepicí pásky na kovový terč. Takto připravený vzorek se musí nechat pozlatit (7 nm) na přístroji Quorum Q150ES. Po nazlacení je vzorek připraven k vložení do mikroskopu a focení povrchu vrstvy.

Morfologie vyrobených vrstev byla zkoumána skenovacím elektronovým mikroskopem VEGA 3 SB, kdy byly pořízeny snímky při použití vysokého napětí 20, popř. 30 kV v různých zvětšeních. Pro statistické vyhodnocení průměru vláken jednotlivých materiálů bylo použito 5 snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu ve zvětšení 5000x, kdy se pomocí obrazové analýzy v programu NIS-Elements AR 3.2 určovaly průměry vláken v jedné linii snímku, a to vždy 20 hodnot/snímek tak, aby konečné množství bylo 100 hodnot průměrů vláken.

4.3.5 Metody zjištění koncentrace proteinů

a) PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE)

Z vyrobené vrstvy se odstříhne část o určité hmotnosti (10/20 mg), rozpustí se v 0,5 ml (popř. 1 ml) destilované vody. Poté se část vzorku smíchá se vzorkovým pufrům 2x či 5x koncentrovaným a nechá se 10 minut vařit. Takto připravené vzorky se nanášely do 8% polyakrylamidového gelu. Pro určení molekulových hmotností proteinů byl použit proteinový marker Wide Range K494, který se připravoval stejně jako vzorky (s použitím pouze 2x koncentrovaného vzorkového pufru). Elektroforéza probíhala 20 minut při 70 V, dále při 100-120 V do okamžiku, kdy čelo dosáhne spodní části gelu.

Tabulka 6: Složení roztoků potřebných pro SDS-PAGE

Roztok	Složení	Roztok	Složení
10% SDS RT, 100 ml	10 g SDS (sodium dodecyl sulfát) 90 ml destilovaná voda (dH ₂ O)	8% polyakrylamidový rozdělovací gel 10 ml/gel	4,6 ml dH ₂ O 2,7 ml 30% akryl-bisakrylamid mix 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8) 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS 0,006 ml TEMED
1,5M Tris-HCl pH 6,8 RT, 50 ml	9,09 g Tris 40 ml dH ₂ O pH upraveno HCl	5% zaostrovací gel 4 ml/gel	2,7 ml dH ₂ O 0,67 ml 30% akryl-bisakrylamid mix 0,5 ml 1,5M Tris (pH 6,8) 0,04 ml 10% SDS 0,04 ml 10% APS 0,004 ml TEMED



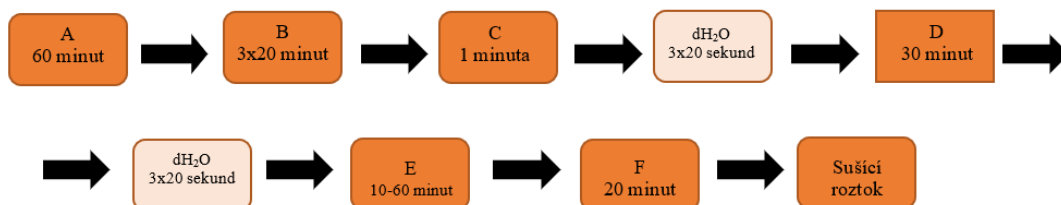
Roztok	Složení	Roztok	Složení
1,5M Tris-HCl pH 8,8 RT, 100 ml	18,7 g Tris 80 ml dH ₂ O pH upraveno HCl	10X SDS-PAGE pufr RT, 1 l	800 ml dH ₂ O 10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g glycin
10% APS -20°C, 10 ml	1 g APS (amonium persulfát) 8 ml dH ₂ O		
2X SDS-PAGE vzorkový pufr -20°C, 100 ml	10 ml Tris-HCl pH 6,8 12 ml 10% SDS 30 ml glycerol 15 ml β-merkapt ethanol 1,8 mg bromfenolová modř Doplňeno dH ₂ O	5X SDS-PAGE vzorkový pufr -20°C, 100 ml	12,5 ml 2M Tris-HCl pH 6,8 10 g SDS 30 ml glycerol 5 ml β-merkapt ethanol 52 ml 0,04% bromfenolová modř

Následné barvení gelů probíhalo pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) nebo barvením stříbrem. Barvení proteinů spočívá v obarvení gelů v barvicím roztoku CBB a následném omytí slabě navázané barvy odbarvovacím roztokem. Gely lze vyfotit nebo vysušit v celofánové folii.

Tabulka 7: Složení roztoků pro barvení Coomassie Brilliant Blue R-250 a vysušení gelů

Roztok	Složení	Roztok	Složení
CBB barvicí roztok Staining solution RT, 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 450 ml destilovaná voda 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250	CBB odbarvovací roztok Destaining solution RT, 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 450 ml destilovaná voda
Sušící roztok RT, 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 30 ml glycerol 420 ml destilovaná voda		

Citlivější barvení ovšem poskytovalo barvení stříbrem. Toto barvení spočívá v řadě několika roztoků (Tabulka 8), jimiž je gel postupně promýván a výsledkem je obarvení proteinů do hnědo-černé barvy. Gely lze vyfotit, případně následně vysušit a uchovávat. Celý proces je znázorněn níže na Obr. 18.



Obr. 18: Princip barvení gelů stříbrem



Tabulka 8: Tabulka složení jednotlivých roztoků pro barvení stříbrem

Roztok	Složení	Roztok	Složení
A 100 ml	50 ml ethanolu 12 ml kyselina octová 50 µl 37% formaldehyd	D 100 ml	100 mg dusičnan stříbrný 100 ml destilovaná voda
B 100 ml	50 ml ethanol 50 ml destilovaná voda	E 100 ml	3 g uhličitan sodný 2 ml roztoku C 50 µl 37% formaldehyd 98 ml destilovaná voda
C 100 ml	15,7 mg Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O (pentahydrát thiosíranu disodného) 100 ml destilovaná voda	F 100 ml	730 mg EDTA 100 ml destilovaná voda

b) METODA PODLE BRADFORDOVÉ

Zjištění koncentrace proteinů v PVA vláknech se provádělo jednoduchou kolorimetrickou metodou stanovení koncentrace podle Bradfordové. Tato metoda je založena na interakci proteinů s Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) v kyselém prostředí. Citlivá je především na bazické (arginin) a aromatické aminokyseliny. Po navázání CBB na protein se barva změní z červeno-hnědé na modrou a pomocí spektrofotometru se kvantifikuje koncentrace proteinů při vlnové délce 595 nm. (Bradford, 1976) Pro přípravu kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin (BSA), pro srovnání byla taktéž vytvořena ředící řada trombocytárních lyzátů. Příprava kalibrační křivky s BSA je popsána v Tabulce 9.

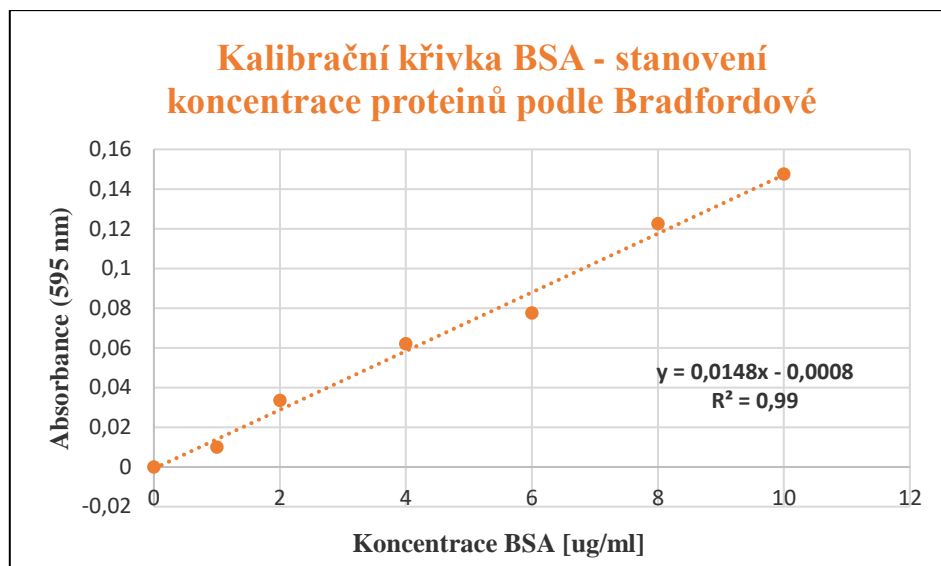
Tabulka 9: Příprava kalibrační křivky BSA

Roztok BSA [µl]	H ₂ O [µl]	Finální koncentrace [µg/ml]
10	90	1
20	80	2
40	60	4
60	40	6
80	20	8
100	0	10

Z toho 20 µl smíchat se 180 µl Brad. činidla

Výpočet koncentrace proteinů ve vzorku byl spočítán z hodnot absorbance jednotlivých vzorků, od kterých byla odečtena negativní kontrola (destilovaná voda či PVA bez obsahu proteinu). Z této hodnoty byla následně spočítána koncentrace dle kalibrační křivky s BSA a vynásobena ředěním roztoku. Koncentrace proteinu (ve vzorku o určité hmotnosti) je dále přepočítána na výslednou koncentraci proteinu na 1 g PVA vrstvy.





Graf 1: Kalibrační křivka BSA pro metodu podle Bradfordové

Vzorek vyrobené vrstvy o hmotnosti 0,0150 g (popř. 0,0200 g) byl rozpuštěn v 0,5 ml (popř. 1 ml) destilované vody, po dokonalém rozpuštění bylo odebráno 20 µl do 96 jamkové destičky, smícháno se 180 µl činidla Bradfordové a inkubováno (RT, 5 minut). Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm, která je závislá na celkové koncentraci proteinů ve vzorku. Výslednou koncentraci lze vyčíst z kalibrační křivky BSA.

4.3.6 Měření enzymové aktivity peroxidázy (HRP)

Z vyrobené PVA vrstvy obsahující enzym HRP bylo vystřiženo kolečko o průměru 1,5 cm a rozpuštěno v acetátovém pufru. Následně bylo 50 µl toho roztoku (či kalibračního roztoku - Tabulka 10) smícháno se 150 µl čerstvě připraveného Master mixu (viz Tabulka 12), po přesně 20 sekundách se reakce ukončila přidáním 50 µl HCl. Reakce s Master mixem probíhají velmi rychle, je nutné přesné a rychlé dávkování. Po přidání HCl se modrá barva roztoků změní ve žlutou. Aktivita enzymu se zjistí změřením absorbance při 450 nm.

Tabulka 10: Koncentrační řada pro HRP esej

Kalibrační řada HRP (zásobní roztok 10 mg/ml, acetátový pufr, 1000 U/ml)								
Aktivita [U/ml]	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	0,001563	0,000731	0,000391	0

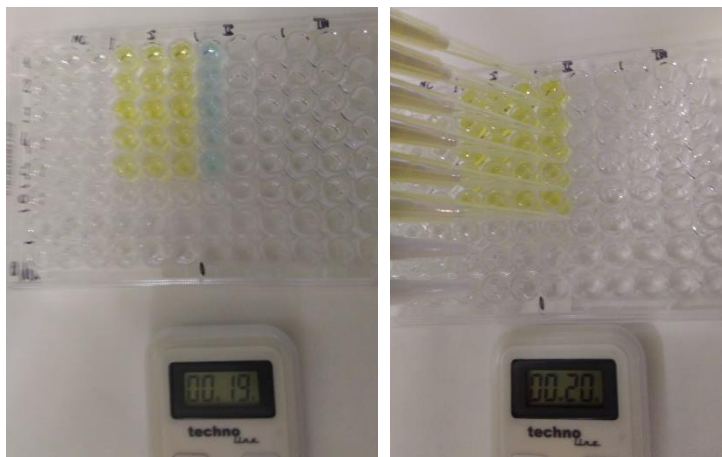


Tabulka 11: Složení roztoků potřebných pro enzymovou esej s HRP

Roztok	Složení
Acetátový pufr	1,64 g octan sodný / 100 ml destilovaná voda 228 µl kyselina octová / 19,772 ml destilovaná voda – postupně do pH = 6
H₂O₂	10 µl 30% H ₂ O ₂ / 9,990 ml acetátový pufr
TMB	50 mg TMB / 5 ml DMSO
HCl	3,1 ml 36% HCl / 6,9 ml destilovaná voda

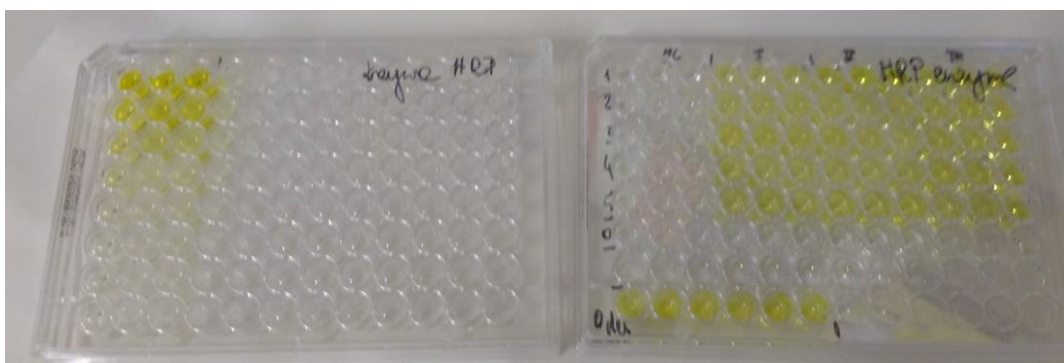
Tabulka 12: Složení Master Mixu

Master Mix 30 jamek 150 µl/jamka	Množství [µl]
Acetátový pufr	4 200
H₂O₂	240
TMB	60



Obr. 19: Enzymová esej HRP - zastavení reakce po 20 sekundách





Obr. 20: Enzymová esej s HRP - kalibrační křivka a vzorky - 12% PVA (NC) a 12% PVA s HRP (I,II,III)

4.3.7 Biologické testování in vitro

a) Nasazení buněk na materiál

Biologické testování probíhalo s buněčnými liniemi MG-63 (9. pasáž) a 3T3 SA (13. a 18. pasáž), v živných médiích (MEM pro lidské osteosarkomální buňky MG-63 a DMEM pro myší fibroblasty 3T3 SA). Potřebná koncentrace buněk na jamku je $5 \cdot 10^3$ (24 jamková destička), případně $(3-4) \cdot 10^3$ (96 jamková destička). Vzorky (kolečka o průměru 1,5 cm, příp. 6 mm) byly vysterilizovány ethylenoxidem (příp. UV z obou stran po dobu 20 minut), vloženy do 24 (96) jamkové destičky. Ve sterilním biologickém boxu bylo opatrně z kultivační destičky s buňkami odsáto médium, bylo připipetováno 2 ml pufru PBS (Tabulka 13), opatrně propláchnuto a odsáto do odpadu. Dále bylo připipetováno 1,5 ml roztoku trypsinu (37 °C) s 3 ml nového média, několikrát jemně promícháno, aby se buňky uvolnily ze dna kultivační destičky a inkubováno v inkubátoru CO₂ po dobu 3-5 minut. Po této době by již měly být buňky v suspenzi, která byla odpipetována do 15ml zkumavky. Do mikrozkušavky byl odebrán vzorek suspenze (10 µl), k němuž bylo přidáno 10 µl methylenové modři a dobře promícháno. 10 µl připravené směsi bylo nanášeno do destičky na automatické počítání buněk přístrojem LUNA. Na experiment bylo potřeba $5 \cdot 10^3$ buněk (MG-63) na jamku o objemu 1 ml ($3 \cdot 10^3$, příp. $4 \cdot 10^3$ buněk /jamka o objemu 300 µl pro 3T3 SA). V případě testování buňkami MG-63 pro vytvoření buněčné suspenze s médiem bylo potřeba 214,8 µl buněčné suspenze (koncentrace $9,3 \cdot 10^5$ buněk/ml) a 39,784 ml média. Do každé jamky bylo pipetováno 1 ml (pro 24 jamkovou destičku, 300 µl pro 96 jamkovou destičku) tohoto připraveného roztoku. Vzorky byly následně přeneseny do inkubátoru (37°/5% CO₂).



Tabulka 13: Složení fosfátového pufru PBS

Chemikálie	Množství
Destilovaná voda	800 ml
Chlorid sodný	8 g
Chlorid draselný	0,2 g
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	3,63 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,24 g
Upraveno pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl a doplněno na objem 1 l	
Přefiltrováno, v případě potřeby sterilizováno	

b) MTT test

Testování materiálu probíhalo formou MTT testu. MTT, neboli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid je tetrazoliové barvivo žluté barvy. Test kolorimetricky stanovuje metabolickou aktivitu buněk, tzv. viabilitu. MTT je buňkami redukován na fialový formazán, jehož množství se dá spektrofotometricky změřit (absorbuje při 570 nm). Po odsátí média z jamky kultivační destičky byl přidán roztok média (MEM pro MG-63 nebo DMEM pro 3T3 SA) s MTT v poměru 3:1 a následovala inkubace po dobu 4 hodin (37°C, 5% CO₂). Buněčným metabolismem je MTT redukován na fialový formazan ve formě malých krystalků, které je nutné po odsátí roztoku dokonale rozpustit v okyseleném isopropylalkoholu (1 ml/jamka). Z těchto roztoků přeneseme 200 µl do mikrotitrační destičky (96 jamek) a změříme absorbanci při vlnových délkách 570 nm a 650 nm, jejichž hodnoty mezi sebou odečteme. Získáme tak informaci o aktivitě buněk.



5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V práci byl použit polyvinylalkohol s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 47-130 tisíc g/mol s hydrolyzou 88%, 98% a 99+%. K přípravě funkcionalizovaných vrstev lidskými trombocytárními růstovými faktory byly použity trombocytární lyzáty vyrobené z TRS s obsahem trombocytů $(700-940) \cdot 10^6$ /ml. Pro zjištění aktivity inkorporované látky byl použit modelový systém s křenovou peroxidázou (HRP). Vrstvy vyrobené metodou elektrostatického zvláknění byly podrobeny mnoha testům zaměřených na morfologii vrstev, stanovení obsahu proteinů, aktivitu HRP a biologické in vitro testování s buněčnými liniemi 3T3-SA a MG-63.

5.1 Optimalizace přípravy PVA vláknenných nosičů s obsahem trombocytárních růstových faktorů

Příprava vláknenné vrstvy z PVA s obsahem TL byla popsána již v práci pana Hanzla (Hanzl, 2017) (konzultant B. Kopřivová). Nicméně tento experiment byl proveden v rámci bakalářské práce pouze jednou, vrstvy nebyly homogenní, a proto byla příprava vrstev s obsahem trombocytárních lyzátů dále optimalizována i v rámci této diplomové práce.

Pro přípravu vláknenných vrstev (viz kapitola 4.3.3) byl používán 12% roztok polyvinylalkoholu (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza) s obsahem TL 7,5%, 10% a 12,5% dle Tabulky 14.

Tabulka 14: Složení PVA roztoků s koncentracemi 7,5, 10 a 12,5 % TL

Polymerní roztok (40 g)	Složení
PVA	30 g 16% PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza) 10 g destilovaná voda
PVA + 7,5 % TL	30 g 16% PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza) 7 g destilovaná voda 3 g trombocytární lyzát
PVA + 10 % TL	30 g 16% PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza) 6 g destilovaná voda 4 g trombocytární lyzát
PVA + 12,5 % TL	30 g 16% PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza) 5 g destilovaná voda 5 g trombocytární lyzát

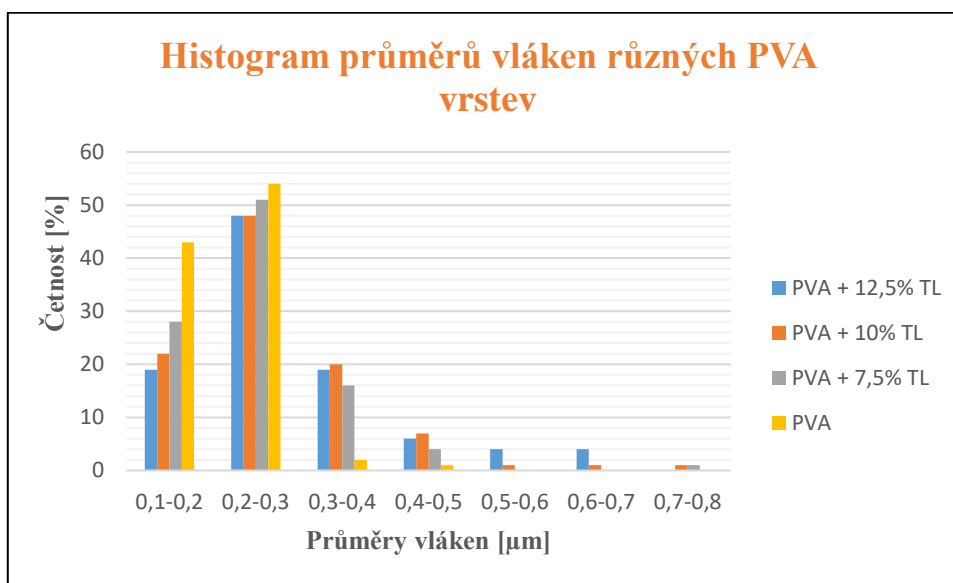
Zvláknění roztoků proběhlo na přístroji Nanospider™ NS 1WS500U (kapitola 4.3.3) za podmínek viz Tabulka 15. Pro zvláknění roztoků s trombocytárními lyzáty musely být částečně upraveny podmínky, a to především dávkování polymeru a aplikované vysoké napětí (Tabulka 15). Vytvořené vrstvy byly z makroskopického hlediska velice podobné.



Tabulka 15: Podmínky zvlákňování 12% PVA se 7,5, 10 a 12,5 % TL

Podmínky	12% PVA	12% PVA + 7,5 % TL	12% PVA + 10 % TL	12% PVA + 12,5 % TL
Napětí [kV]	+40,5/-19,5	46,6/-19,5		51/-19,5
Rychlost cartridge [mm/s]	205-209	156-158		
Odtah textilie [mm/min]	10			
Odtah struny [mm/min]	13,6-14,3			
Vzdálenost kolektoru [mm]	143			
Teplota [°C]	23,0			
Relativní vlhkost [%]	46,3			

Elektrostatické zvlákňování probíhalo dobře především u čistého roztoku PVA a roztoků s obsahem TL 7,5% a 10%. Příprava vrstvy s 12,5% TL byla na první pohled horší než vrstvy z čistého PVA. Vytvořené vrstvy byly z makroskopického hlediska velice podobné. Z měření průměrů vláken měla nejmenší rozptýl vrstva čistého PVA, viz Graf 2.

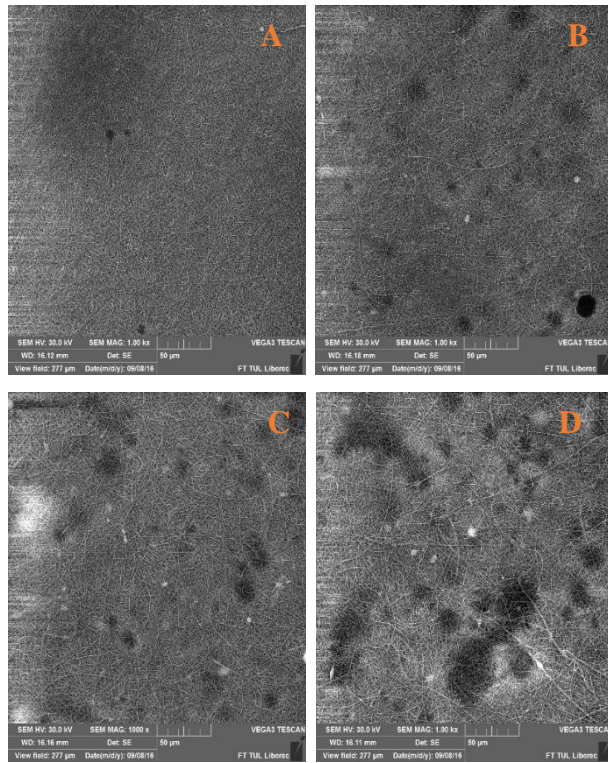


Graf 2: Histogram průměrů vláken PVA vrstev s trombocytárními lyzáty

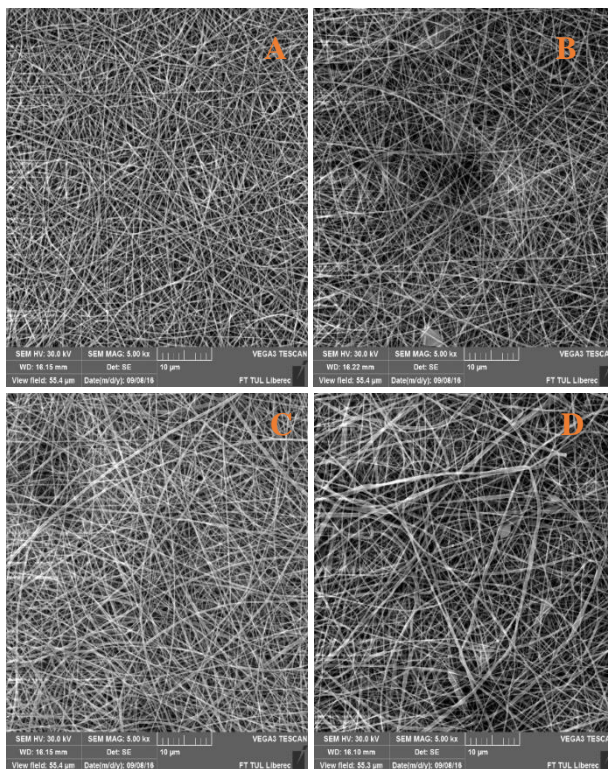
Tabulka 16: Průměry vláken připravených PVA vrstev

Průměry vláken [μm]			
PVA + 0% TL	0,21 ± 0,05	PVA + 10% PVA	0,28 ± 0,16
PVA + 7,5% TL	0,25 ± 0,09	PVA + 12,5% PVA	0,29 ± 0,12





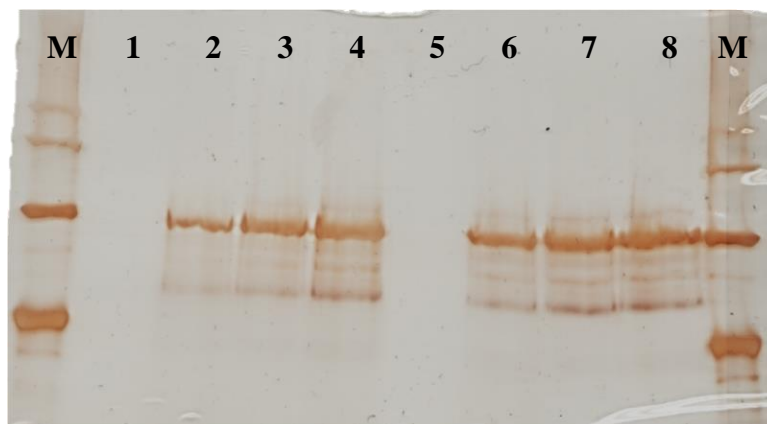
Obr. 21: Morfologie připravených PVA vrstev, zvětšení 1000x ,
 A-12% PVA, B-12% PVA + 7,5 % TL, C-12% PVA + 10 % TL,
 D-12% PVA + 12,5 % TL



Obr. 22: Morfologie připravených PVA vrstev, zvětšení 5000x ,
 A-12% PVA, B-12% PVA + 7,5 % TL, C-12% PVA + 10 % TL,
 D-12% PVA + 12,5 % TL



Pomocí SDS-PAGE (SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy, kapitola 4.3.5 a)) byla potvrzena přítomnost proteinů ve vzorcích jednotlivých vrstev. Pro srovnání byly taktéž použity vzorky pana Hanzla. Vzorky (0,0200 g) byly rozpuštěny v 0,5 ml destilované vody. Gely po elektroforéze byly obarveny stříbrem. Z výsledků elektroforézy je zřejmé, že proteiny byly inkorporovány do PVA vrstvy. Také je pozorovatelné zvýšení obsahu proteinů se zvyšujícím se procentem trombocytárního lyzátu ve vzorcích. Jako marker byl použit proteinový marker Wide Range K494. Bílá místa v gelu značí vzorky 12% PVA bez obsahu trombocytárních lyzátů.



Obr. 23: 8% SDS-PAGE se vzorky 12% PVA s různým obsahem TL ve srovnání se vzorky pana Hanzla

Jednotlivé vzorky:

1	12% PVA + 0 % TL - Hanzl	5	12% PVA + 0 % TL - Kopřivová
2	12% PVA + 7,5 % TL - Hanzl	6	12% PVA + 7,5 % TL - Kopřivová
3	12% PVA + 10 % TL - Hanzl	7	12% PVA + 10 % TL - Kopřivová
4	12% PVA + 12,5 % TL - Hanzl	8	12% PVA + 12,5 % TL - Kopřivová
M – Marker Wide Range K494 – 212 / 116 / 97,4 / 66,2 / 40 / 31 / 21 / 14,4 kDa			

Pro kvantifikaci proteinů ve vrstvách byla použita metoda podle Bradfordové, kdy se využily připravené vzorky k SDS-PAGE (0,0200 g/0,5 ml destilované vody). Výsledné hodnoty koncentrace jsou již uvedeny na 1 ml a na 1 g PVA vrstvy.

Tabulka 17: Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové pro 12% PVA s obsahem TL 7,5, 10 a 12,5 %

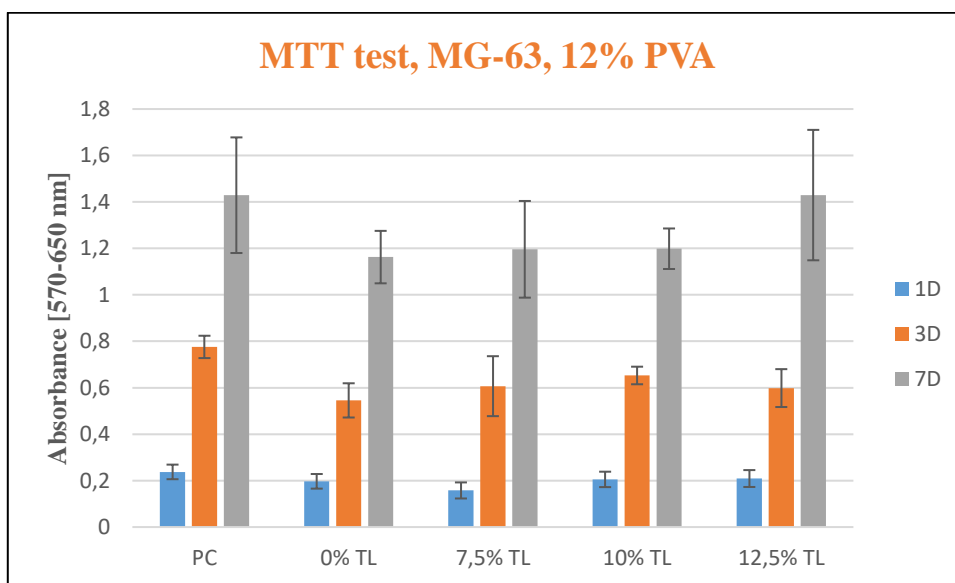
Vzorky	Koncentrace vzorku	Obsah proteinů na 1 g vrstvy
12% PVA + 7,5 % TL	71,2 ug/ml	3,56 mg
12% PVA + 10 % TL	128,4 ug/ml	6,42 mg
12% PVA + 12,5 % TL	150,8 ug/ml	7,54 mg



Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu potvrdily, že vrstva z PVA s 12,5 % TL má větší množství defektů, ostatní vrstvy z PVA s lyzáty jsou podobné, i když také obsahují defekty. Čisté PVA naopak tvoří homogenní vrstvu. Přídavek trombocytárního lyzátu ovlivňuje průměry vláken minimálně.

Výsledky koncentrace proteinů byly velice podobné výsledkům pana Hanzla, ovšem jeho vzorky nebyly homogenní. Po přepočtu na jeden gram vrstvy vychází obsah proteinů v rozmezí 3,56 – 7,54 mg/g PVA v závislosti na obsahu TL v roztoku (Tabulka 17). Je velice pravděpodobné, že se proteiny budou v připravených vrstvách vyskytovat rovnoměrně, pokud samotné elektrostatické zvláknování bude probíhat kontinuálně bez větších problémů. Množství proteinů vzrůstá se zvyšujícím se procentem použitých trombocytárních lyzátů v roztoku polyvinylalkoholu.

Nově připravené vrstvy dále byly podrobeny biologickému testování s buněčnou linií lidských osteosarkomálních buněk (MG-63). Stanovení viability (buněčné aktivity) bylo pomocí MTT testu (viz kapitola 4.3.7 b)).



Graf 3: MTT test 12% PVA s trombocytárními lyzáty, MG-63

Z Grafu 3 lze říci, že vyrobený materiál obsahující trombocytární růstové faktory není cytotoxický, u vyšších koncentracích TL byl pozorován pozitivní vliv na buněčnou viabilitu. Byly provedeny i další biologické testy s dalšími materiály, které pozitivní vliv růstových faktorů dále potvrzují. Vzhledem k dobré rozpustnosti materiálu dochází k bezprostřednímu uvolnění všech



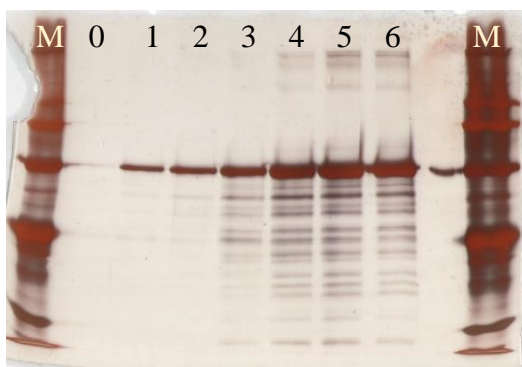
proteinů do roztoku, to má za následek především podporu adheze a proliferace buněk v prvních dnech testování.

Pro další testování byla vybrána 10% koncentrace trombocytárního lyzátu, a to z důvodu lepšího zvláknování a tvorby homogennější vrstvy.

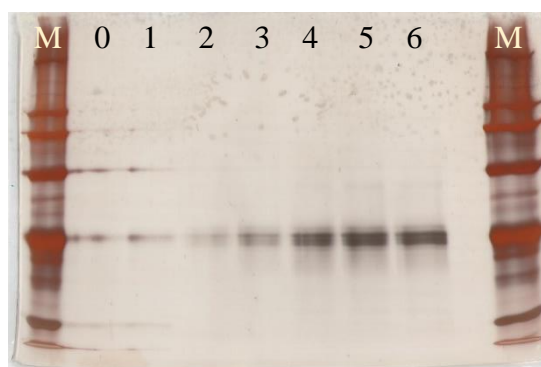
5.2 Analýza proteinů ve vrstvách připravených z 12% PVA vrstev

Již bylo zjištěno množství proteinů v připravených vrstvách 12% PVA s TL, otázkou zůstávala aktivita inkorporovaných proteinů a její změna v době skladování. Pro tento účel byl zaveden modelový systém s obsahem křenové peroxidázy (HRP). Byly vytvořeny vrstvy z 12% PVA o molekulové hmotnosti 130000 g/mol, 88% hydrolýzou a obsahem HRP. Připravené vrstvy byly analyzovány z morfologického hlediska, kvantitativního i kvalitativního hlediska, především pomocí SDS-PAGE, metodou stanovení proteinů podle Bradfordové a Lowryho metodou a eseje pro zjištění aktivity inkorporované křenové peroxidázy.

V předchozí kapitole 5.1. byla stanovena koncentrace proteinů ve vrstvě z 12% PVA s 10 % TL (MW 130000 g/mol, 88% hydrolýzy) a to 128,4 $\mu\text{g/ml}$ (z 0,020 g vzorku), což odpovídá 6,42 mg proteinů/g vrstvy. Pro zjištění koncentrace proteinů v TL byla připravena ředící řada trombocytárních lyzátů, kalibrační křivky HRP a BSA a jejich analýza SDS-PAGE a určení koncentrace proteinů podle Bradfordové.



Obr. 24: 8% SDS-PAGE dokumentující koncentrační křivku BSA použitou pro stanovení koncentrace inkorporovaných proteinů, 0 – destilovaná voda, 1 – koncentrace BSA 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 – 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 – 4 $\mu\text{g/ml}$, 4 – 6 $\mu\text{g/ml}$, 5 – 8 $\mu\text{g/ml}$, 6 – 10 $\mu\text{g/ml}$, M – marker K494, barveno Ag

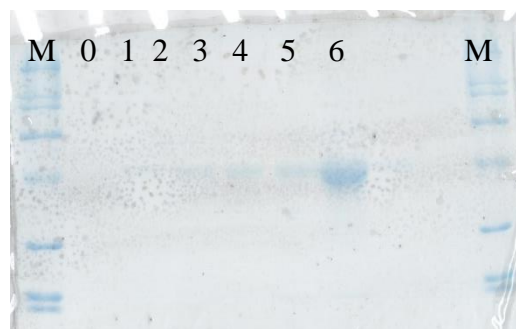


Obr. 25: 8% SDS-PAGE dokumentující koncentrační řadu HRP: 0 – destilovaná voda, 1 – koncentrace HRP 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 – 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 – 4 $\mu\text{g/ml}$, 4 – 6 $\mu\text{g/ml}$, 5 – 8 $\mu\text{g/ml}$, 6 – 10 $\mu\text{g/ml}$, M – marker K494, barveno Ag

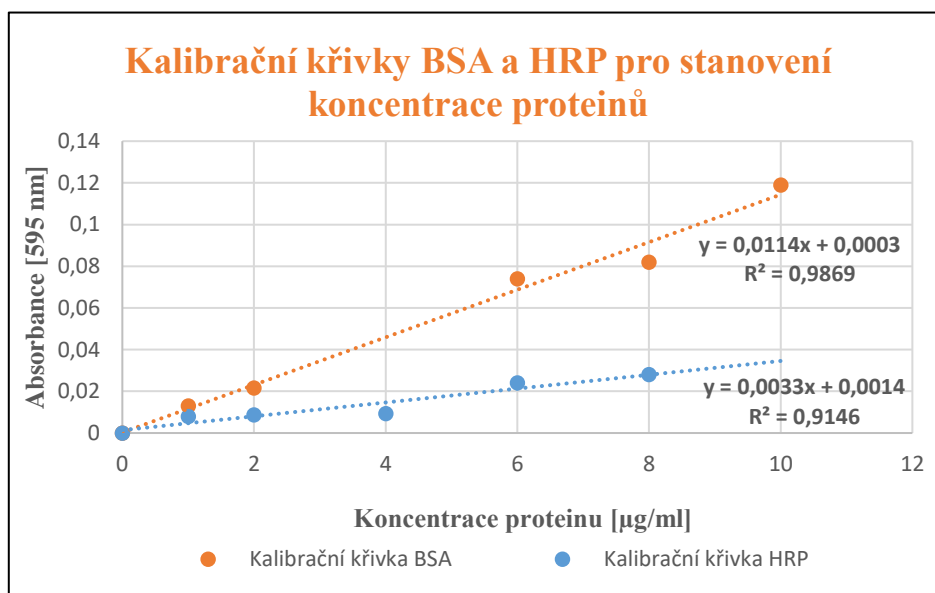




Obr. 27: 8% SDS-PAGE dokumentující homogenitu PVA vrstev s HRP (vzorky ze 3 oblastí (I,II,III) PVA vrstvy): 1 – NC (PVA bez TL, 2 – oblast I, 3 – oblast II, 4 – oblast III, 5 – NC, 6 – oblast I, 7 – oblast II, 8 – oblast III, M – marker K494, barveno Ag



Obr. 26: 8% SDS-PAGE dokumentující koncentrační řadu HRP: 0 – destilovaná voda, 1 – HRP 1 µg/ml, 2 – HRP 2 µg/ml, 3 – HRP 4 µg/ml, 4 – HRP 6 µg/ml, 5 – HRP 8 µg/ml, 6 – HRP 10 µg/ml, M – marker K494, barveno CBB



Graf 4: Kalibrační křivky BSA a HRP pro stanovení koncentrace proteinů

Pro zjištění koncentrace křenové peroxidázy ve vzorcích byla použita metoda stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové, kdy se 1 kolečko/5 koleček o průměru 1,5 cm rozpustilo v 1 ml destilované vody. Bohužel množství HRP ve vzorcích je minimální, resp. na spodní hranici detekovatelnosti (není rozdíl mezi 1 kolečkem a 5 kolečky, ani mezi materiálem bez/s HRP), proto není možné dopočítat jeho množství. Dá se ale částečně určit pomocí SDS-PAGE, kdy šíře bandu odpovídá koncentraci daného proteinu. Porovnáním bandů ze vzorků na Obr. 27 a kalibrační křivky na Obr. 25, by se dala odhadnout koncentrace HRP ve vzorcích kolem 4 µg/ml.



Podle výsledných gelů z SDS-PAGE je zřejmé, že barvení stříbrem dosahuje lepší citlivosti než barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue, viz Obr. 25 a 27.

Metodou podle Bradfordové byla stanovena koncentrace proteinů v trombocytárních lyzátech. Byla připravena následující ředící řada TL (o koncentraci TRS $715 \cdot 10^6$ /ml) a zjištěn obsah proteinů.

Tabulka 18: Ředící řada TL, 595 nm

Ředění TL	500x	1000x	5000x
Absorbance (bez blanku)	0,3887	0,1799	0,0494
Koncentrace [μl/mg]	Mimo kalibrační křivku		3,993

Pomocí této ředící řady lze stanovit celkové množství proteinu obsažené v jednom mililitru trombocytárního lyzátu, které se rovná 19,96 mg/ml. Při tomto experimentu byl použit trombocytární lyzát z TRS s koncentrací $715 \cdot 10^6$ trombocytů/ml. Pro experimenty byl ale použit TL z TRS s koncentrací $916 \cdot 10^6$ trombocytů/ml, lze tedy předpokládat i adekvátně vyšší obsah proteinů.

Peroxidáza byla přidána do 12% roztoku PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyzy) a zvlákněna obdobně jako roztok s trombocytárními lyzáty. Do roztoku PVA bylo přidáno množství HRP odpovídající 1 mg HRP / 1 g zvlákněného PVA. HRP bylo rozpuštěno v acetátovém pufru (mg/100 μl pufru) a přidáno do roztoku, viz kapitola 4.3.2 b). Aktivita HRP je 100 U/mg. Finální množství na vzorku o hmotnosti 1,5 mg (kolečko o průměru 1,5 cm) by mělo být 1,5 μg HRP, což odpovídá aktivitě 0,15 U.

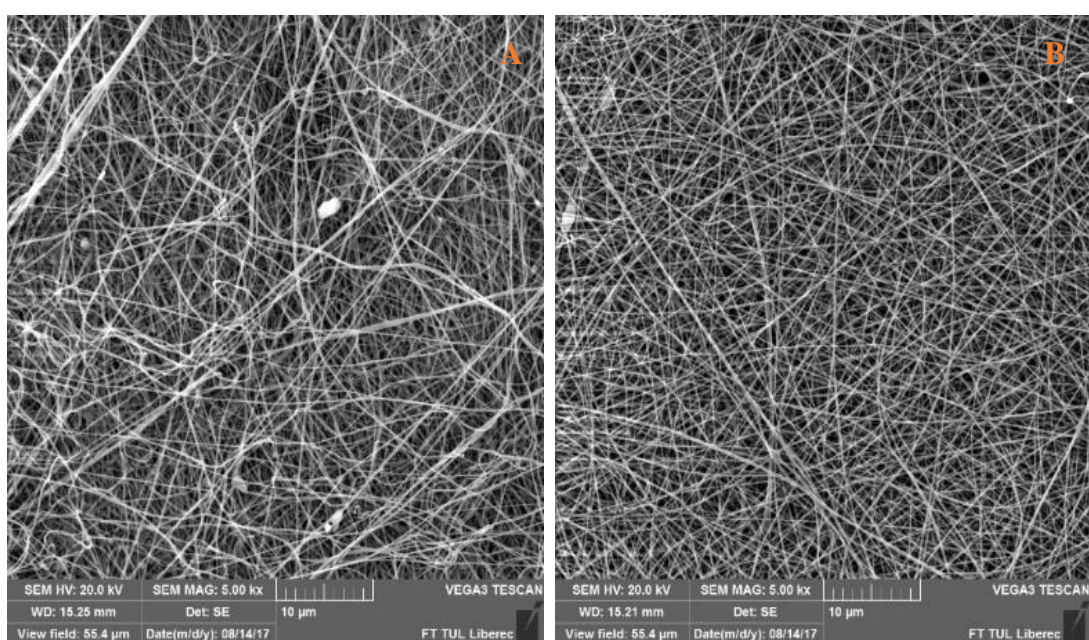
Vrstvy byly opět zvlákněny na Nanospider™ NS 1WS500U, za níže uvedených podmínek (Tabulka 19). Pro dosažení vyšší plošné hmotnosti, a tedy většího (detekovatelného) množství, byla vrstva nazvlákněna dvakrát – na vytvořenou první vrstvu byla nazvlákněna druhá. Výsledná vrstva byla kompaktní.



Tabulka 19: Podmínky zvláknování 12% PVA (+HRP), MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza

Podmínky	12% PVA	12% PVA + HRP
Napětí [kV]	47,7/-10,3	
Rychlost cartridge [mm/s]	136,-137,3	
Odtah textilie [mm/min]	2x 8-10	2x 9-11
Odtah struny [mm/min]	14,68-15,00	
Vzdálenost kolektoru [mm]	174	158
Teplota [°C]	23,5	
Relativní vlhkost [%]	42,6	

Z vytvořeného materiálu byly pořízeny snímky metodou SEM (kapitola 4.3.4), zjištěny průměry vláken a plošná hmotnost vrstev.



Obr. 28: Snímky ze SEM 12% PVA A-bez HRP B-s HRP, zvětšení 5000x

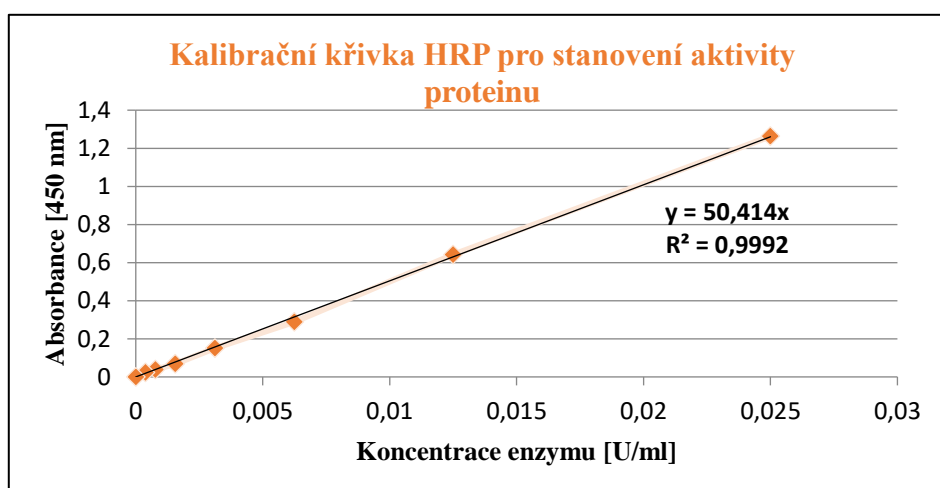
Tabulka 20: Charakteristika vrstev 12% PVA s/bez HRP

Materiál	12% PVA	12% PVA + HRP
Průměr vláken [μm]	$0,23 \pm 0,07$	$0,22 \pm 0,06$
Plošná hmotnost [g/m^2]	$6,20 \pm 0,28$	$6,28 \pm 0,11$



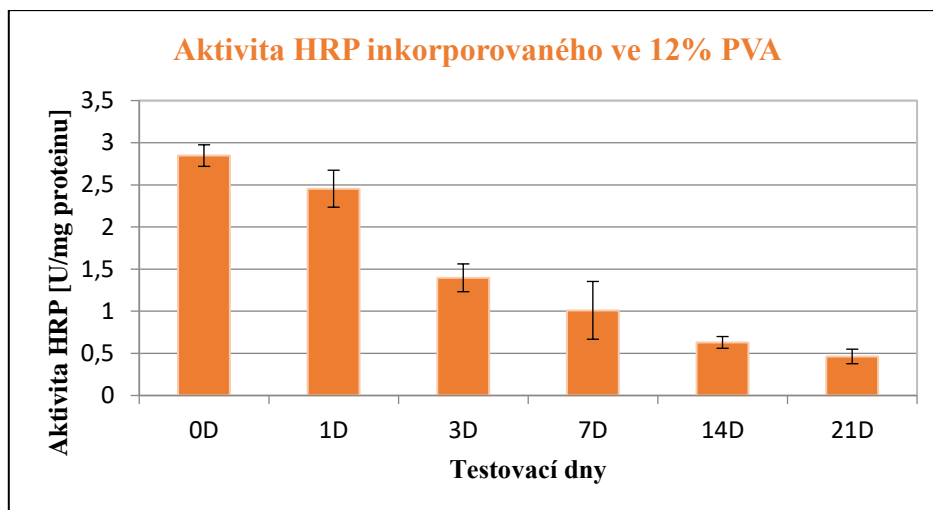
Připravená vrstva 12% PVA byla srovnatelná s vrstvou obsahující HRP, ze snímků z elektronového mikroskopu lze vidět, že čisté PVA tvořilo více defektů. To by mohlo být zapříčiněno nestabilními okolními podmínkami. Průměry vláken i plošná hmotnost materiálu jsou srovnatelné.

Vyrobené vrstvy z 12% polyvinylkoholu (MW 130000 g/mol, 88% hydrolyza) mají zpravidla podobné charakteristiky – průměr vláken se pohybuje v rozmezí 0,20-0,27 μm , plošná hmotnost je především závislá na rychlosti odtahu nosné textilie (spun bond) při elektrostatickém zvlákňování. Množství proteinů v trombocytárním lyzátu je velké, lze tedy ze vzorků určit koncentraci pomocí stanovení koncentrace podle Bradfordové a kalibrační křivky BSA. U vrstev obsahující HRP je koncentrace peroxidázy nízká, nelze ji tedy detekovat ani touto metodou. Množství HRP bylo vypočteno především pro metodu stanovené enzymatické aktivity (kapitola 4.3.6), a tedy aby výsledky byly v rozmezí kalibrační křivky. Tato esej byla provedena za účelem zjištění, zda a jak je ovlivněna aktivita proteinu po procesu zvlákňování a následného skladování materiálu s inkorporovanými proteiny po dobu 3 týdnů, kdy jsou vzorky uskladněny při 5°C.



Graf 5: Kalibrační křivka HRP pro stanovení aktivity proteinů





Graf 6: Aktivita HRP inkorporovaného do 12% PVA

Na Graf 6 vidíme aktivitu inkorporovaného HRP po zvláknění (0D) a dále následném skladování (až 21D). Ve vzorcích po zvláknění je aktivita HRP ($2,85 \pm 0,13$) U/mg proteinu. Po 3 dnech je již aktivita poloviční, po 7 dnech je téměř na třetině, po 14 dnech již na pětině aktivity a po třech týdnech již vzorky ztrácí 85 % své aktivity. Ve srovnání s experimenty (Buzgo, 2017), kde testovaly PCL vlákna s inkorporovaným HRP docházelo k rychlejšímu snížení aktivity enzymu. Již po 8 dnech ztrácela HRP v PCL vláknech svou aktivitu z více než 80 %, kdežto enzym křenové peroxidázy v PVA vláknech ztrácí svou aktivitu ve stejné míře až po 21 dnech. Lze tedy konstatovat, že proces elektrostatického zvláknění a aplikace vysokého napětí na polymerní roztok výrazně neovlivňuje funkčnost a aktivitu inkorporovaných proteinů. Z výsledků aktivity skladovaných materiálů s HRP lze předpokládat, že se podobně budou chovat i růstové faktory v trombocytárním lyzátu a budou postupně degradovat a ztrácet svou aktivitu.

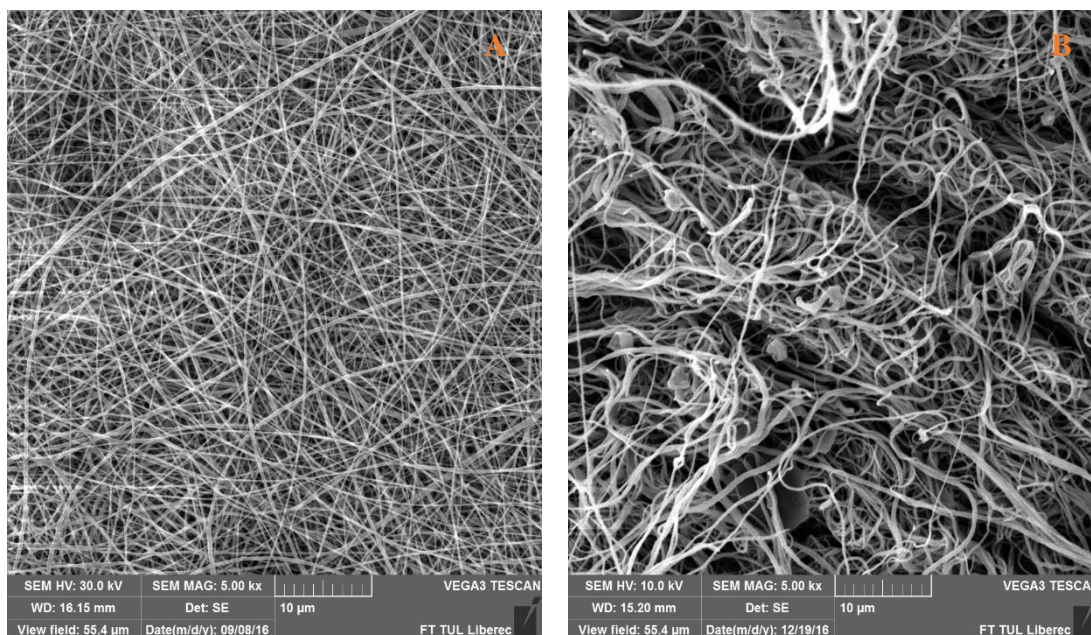
5.3 Nalezení méně rozpustné vrstvy

U předchozích vyrobených PVA vrstev (s 88% hydrolýzou) byla zvládnuta inkorporace proteinů do materiálu bez ovlivnění aktivity. Dalším krokem bylo zajištění postupného uvolňování aktivní látky. Polyvinylalkohol s hydrolýzou 88 % je výborně rozpustný ve vodě při pokojové teplotě. Snížit rozpustnost PVA lze například síťováním. Síťování se ale provádí toxickými látkami (glutaraldehyd) a silnými kyselinami, které by mohly denaturovat použité aktivní látky.



5.3.1 Modifikace PVA vrstev

Další možností je povrchová modifikace OH skupin, kdy jsou na povrch vrstvy kovalentně vázány skupiny snižující rozpustnost modifikovaného polymeru ve vodě. Vzorky byly odeslány na povrchovou modifikaci na univerzitu Palackého v Olomouci (katedra organické chemie). Pomocí kyseliny [2- [2- (Fmoc-amino) ethoxy] ethoxy] octové (FAEEAA) byla provedena acylace povrchu. (Buzgo, 2015)

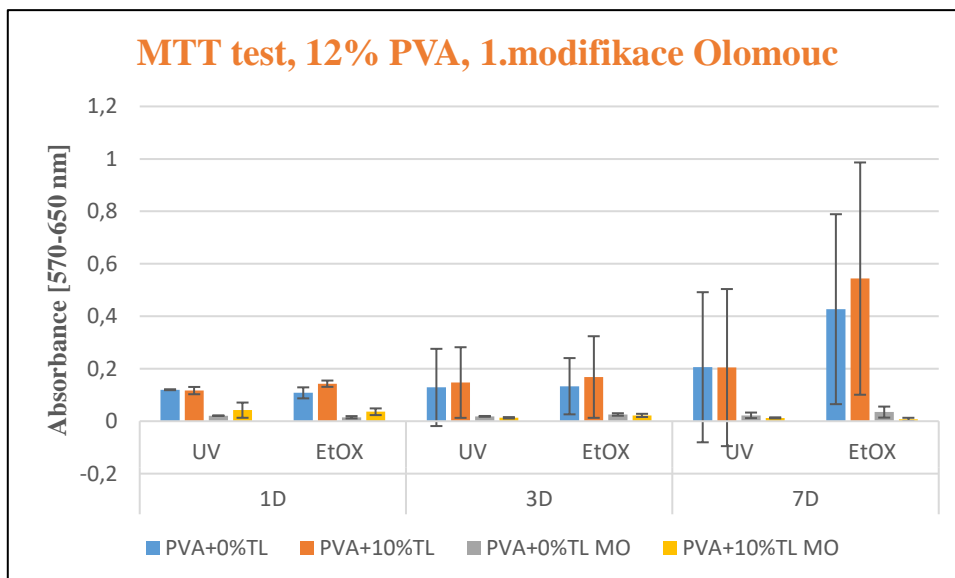


Obr. 29: SEM snímky PVA vrstev s 10 % TL A-nemodifikování, B-modifikace Olomouc, zvětšení 5000x

U modifikovaných vzorků nastává vlivem modifikace změna morfologie povrchu. Při manipulaci s modifikovanými vzorky bylo zřejmé, že docházelo ke srážení materiálu a ztrátě elasticity oproti původnímu materiálu. Modifikovaný materiál byl křehčí a hůře se s ním manipulovalo.

Byly vytvořeny 2 série modifikovaných PVA vrstev (12% PVA, MW 130000 g/mol, 88 % hydrolyza) s obsahem 10% TL a bez TL. Tyto modifikované vzorky byly následně biologicky testovány in vitro s buněčnou linií 3T3-SA i MG-63. Testování probíhalo v 96 jamkových destičkách v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). (Kapitola 4.3.7) Zároveň byla také řešena i možnost sterilizace vzorků pomocí UV a ethylenoxidu. Modifikované vrstvy byly taktéž zkoumány elektronovým mikroskopem. (Kapitola 4.3.4)



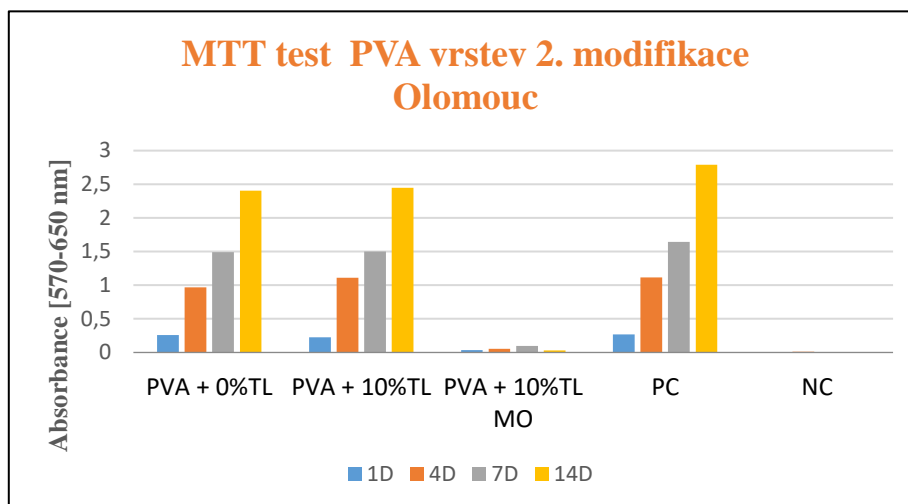


Graf 7: MTT test 12% PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolýza) 1.modifikace Olomouc, 3T3-SA (P18)

Z hodnot MTT testu můžeme vyhodnotit jako lepší metodu sterilizace ethylenoxidem (EtOx), což se nejvíce projevilo 7. testovací den. Zároveň tento MTT test potvrdil výsledek minulých testů, kdy obsah trombocytárních lyzátů pozitivně stimuluje růst buněk na materiálu. Co se týče modifikovaných PVA vrstev, lze vidět, že tato metoda modifikace není vhodná pro přípravu tkáňového nosiče, naopak se zdá silně cytotoxická.

Vzhledem k výsledkům biologického testování modifikovaných vzorků bylo provedeno ještě jedno kontrolní biologické testování u nové (již druhé) modifikace PVA vrstvy s buněčnou linií MG-63. Testování proběhlo ve 24 jamkových destičkách (vzorky o průměru 1,5 cm), nasazovalo se $5 \cdot 10^3$ buněk/jamka, ve stejných podmínkách jako předchozí pokus.

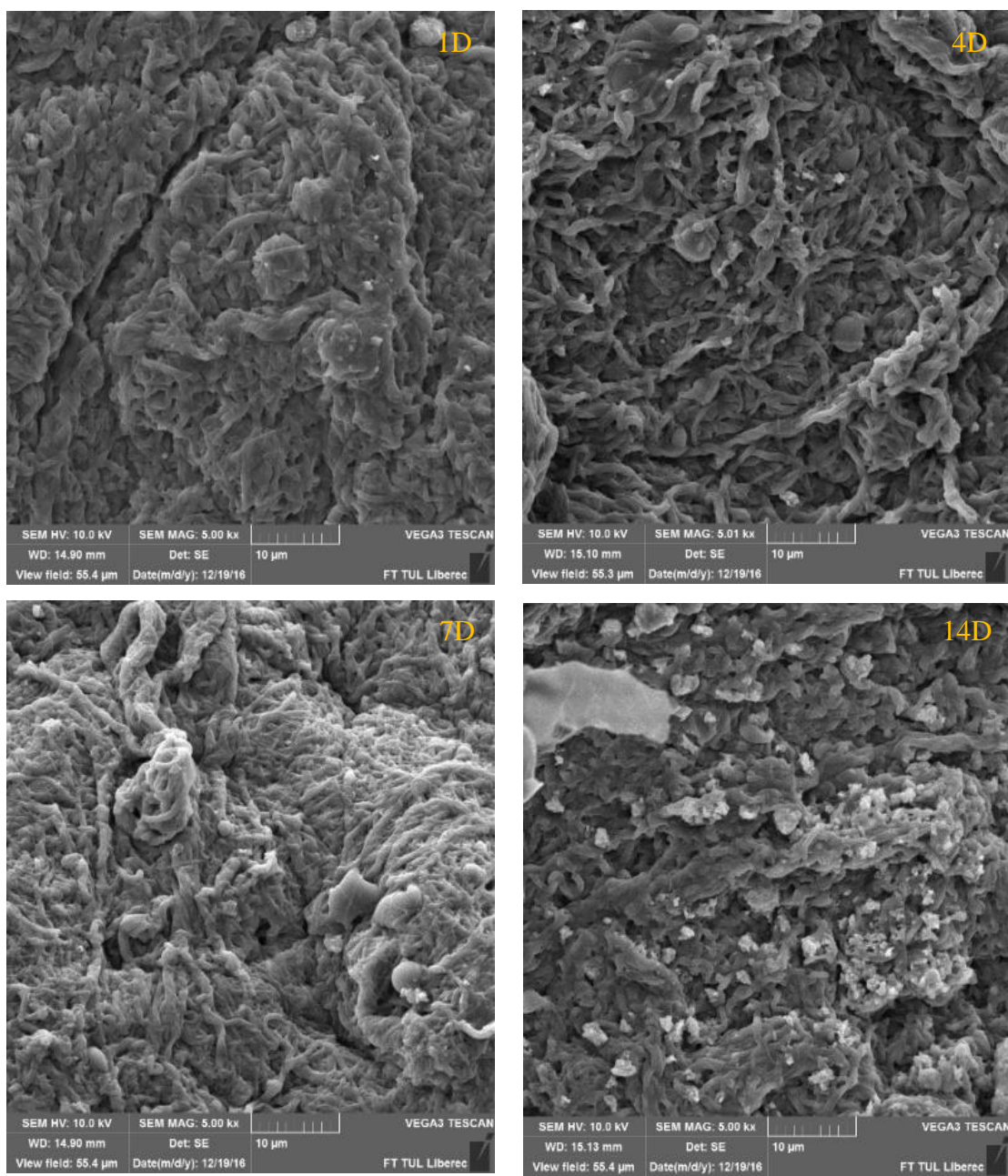




Graf 8: MTT test 12% PVA (MW 130000 g/mol, 88 % hydrolyza) 2. modifikace, MG-63 (P12)

MTT test potvrdil výsledky prvního testování, modifikované vrstvy i přes obsah trombocytárních lyzátů vykazují silnou cytotoxicitu.





Obr. 30: SEM snímky modifikovaných PVA vzorků s 10 % TL v průběhu biologického testování, MG-63, 5000x

Modifikace PVA vrstev acylací pomocí FAEEAA (Buzgo, 2015) není pro naše účely vhodná, jelikož je cytotoxická, a to na obou buněčných liniích 3T3-SA i MG-63. Již samotná modifikace vrstev mění nanovláknennou strukturu. Z tohoto hlediska je vhodné hledat jinou alternativu výroby částečně rozpustného PVA ve vodě. Z dalších výsledků biologických testů



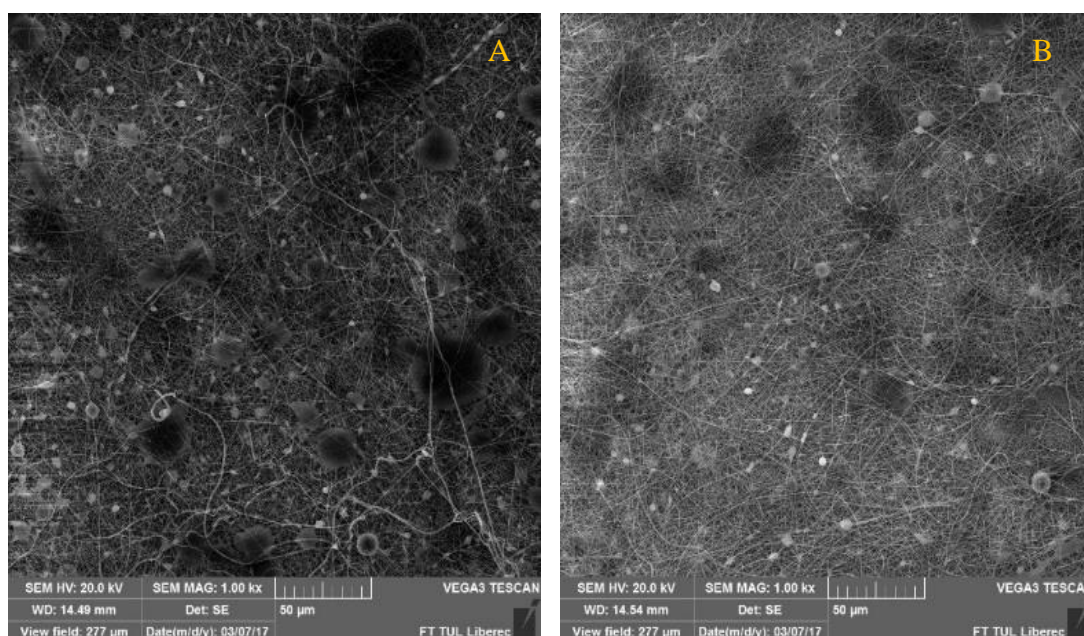
vyplývalo, že vhodnější sterilizace vzorku je pomocí ethylenoxidu, který nesnižuje viabilitu buněk. Z výsledků biologického testování vyplývá, že trombocytární lyzáty pozitivně ovlivňují růst buněk na materiálech.

5.3.2 PVA 98% hydrolýza (MW 125000 g/mol)

Další možností, jak zajistit částečnou nebo postupnou rozpustnost polyvinylalkoholu, je použití PVA s vyšší hydrolýzou (Kapitola 1.2). V našem případě byl nejprve zkoušen PVA se střední molekulovou hmotností 125000 g/mol a hydrolýzou 98 %. Pro snížení povrchového napětí byl použit rozpouštědlový systém voda:ethanol 9:1. U vytvořených vzorků z 10% PVA a z 10% PVA s obsahem 10 % TL byla testována morfologie, obsah proteinů, uvolňování proteinů a bylo provedeno biologické testování s buněčnou linií MG-63.

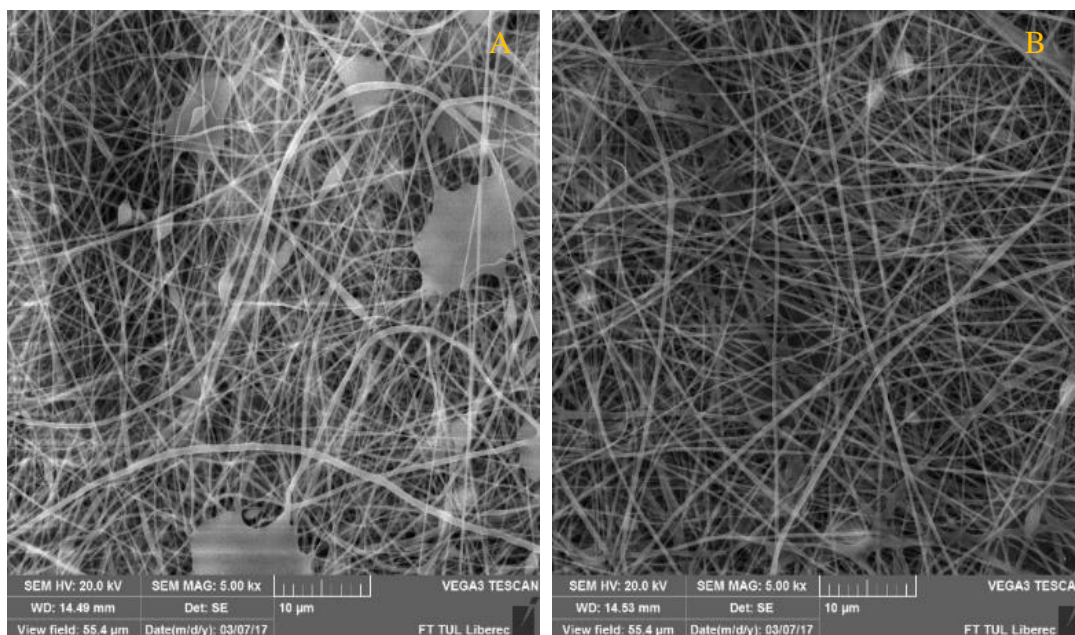
Tabulka 21: Podmínky pro zvláknění na Nanospideru pro 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolýza)

Podmínky	10% PVA	10% PVA + 10 % TL
Napětí [kV]	50,0/-20,0	
Rychlost cartridge [mm/s]	136,-137,3	
Odtah textilie [mm/min]	10-11	
Odtah struny [mm/min]	22,0	
Vzdálenost kolektoru [mm]	175	
Teplota [°C]	22,4	
Relativní vlhkost [%]	35,4	



Obr. 31: Snímky SEM pro 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolýza) A-bez TL, B-s 10% TL, zvětšení 1000x





Obr. 32: Snímky SEM pro 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolyza) A-bez TL, B-s 10% TL, zvětšení 5000x

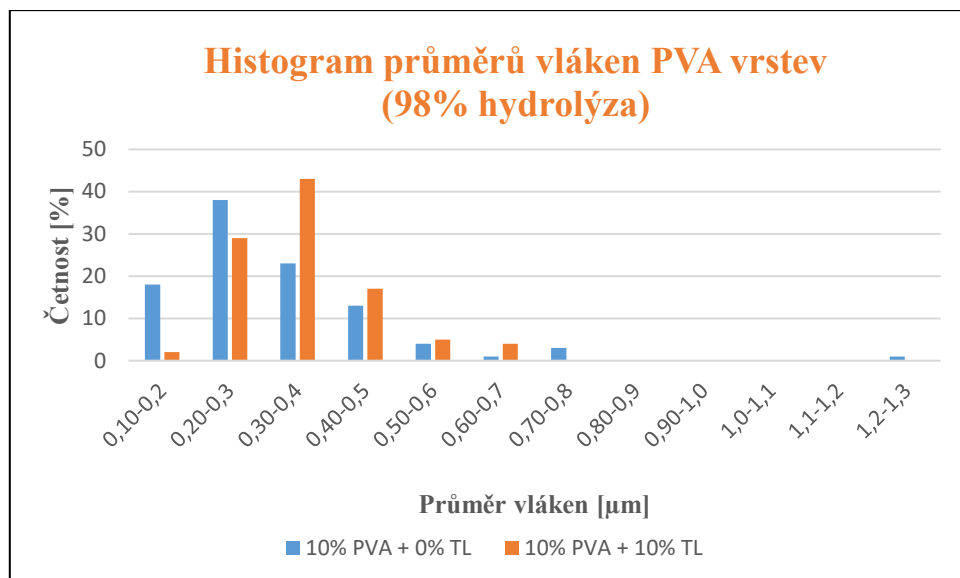
Ze snímků z elektronového mikroskopu lze pozorovat méně homogenní strukturu u vzorku čistého 10% PVA, což dokládá také menší plošná hmotnost vrstvy oproti vrstvě s TL, na které se nevyskytuje takové množství defektů.

Pro zjištění celkové koncentrace proteinů ve vzorku bylo nutné vzorky kompletně rozpustit. Vzhledem k vysoké hodnotě hydrolyzy vzorky nelze rozpustit při pokojové teplotě, proto byla použita vodní lázeň o teplotě 80 °C. Pro celkové stanovení množství proteinů byla použita metoda podle Bradfordové (kapitola 4.3.5 b)).

Tabulka 22: Charakteristika vrstev z 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98% hydrolyza)

Materiál	Průměr vláken [μm]	Plošná hmotnost [g/m ²]	Koncentrace proteinu [mg/g PVA vrstvy]
10% PVA + 0 % TL	0,31 ± 0,15	4,24	0
10% PVA + 10 % TL	0,35 ± 0,10	9,08	8,994 ± 0,417



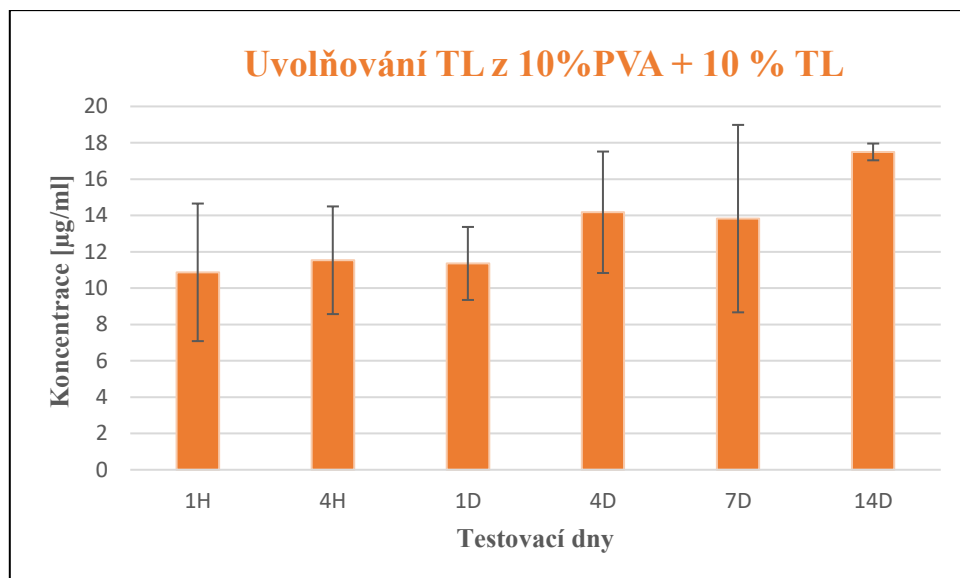


Graf 9: Histogram průměrů vláken 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolyza)

Průměry vláken vytvořených PVA vrstev jsou srovnatelné, i když vrstva bez obsahu TL má lehce větší distribuci průměrů vláken, za což mohou právě přítomné defekty na vrstvě. Výsledná koncentrace proteinů v 1 gramu PVA vrstvy odpovídala $8,994 \pm 0,417$ mg.

Dále byl proveden test postupného uvolňování proteinu ze vzorků obsahující trombocytární lyzát v inkubátoru při teplotě 37 °C. Vzorky (kolečka o průměru 1,5 cm a hmotnosti 2 mg) byly vloženy do mikroskopické kádinky a bylo připipetováno 0,2 ml sterilního PBS. Roztok (výluh) ze vzorků byl odebrán po 1 hodině, 4 hodinách, po 1,4,7 a 14 dnech. Vzhledem k předchozím výsledkům, kdy se částečně hovořilo o homogenitě vrstev, nebyl tento test kumulativní. Následně byly vzorky podrobeny stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové (kapitola 4.3.5 b)).



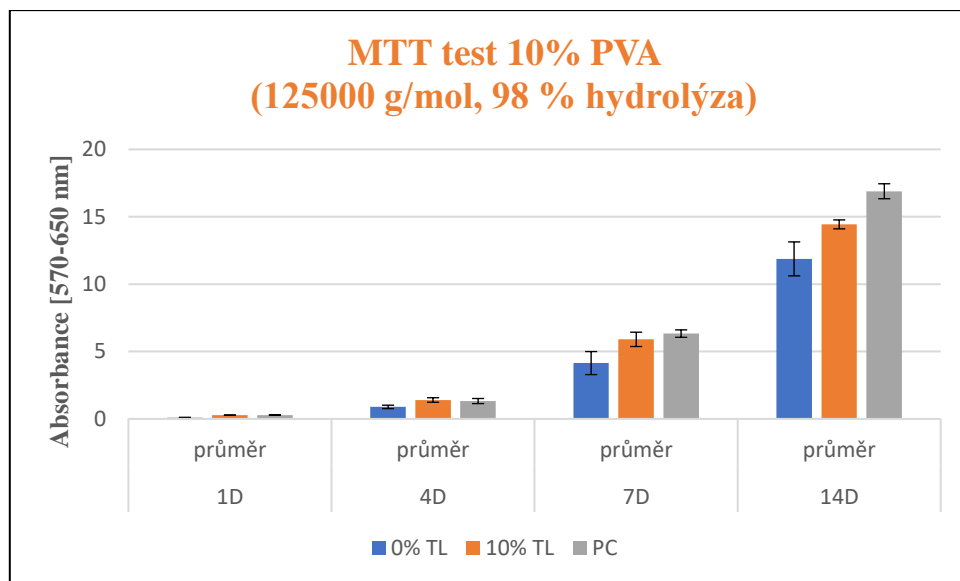


Graf 10: Uvolňování TL z 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98% hydrolyza) + 10% TL

Z výsledků uvolňování proteinů (TL) z vrstev 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolyzy) s obsahem 10 % trombocytárních lyzátů je vidět, že dochází k postupnému uvolňování proteinů. Některé vzorky (1D, 14D) ovšem vykazují snížené množství proteinů, což je zřejmě zapříčiněno nedostatečnou homogenitou vzorků. Homogenita vzorků by mohla být zajištěna další optimalizací elektrostatického zvlákňování, a především zajištěním stabilních zvlákňovacích podmínek. To by bylo možné použitím kvalitní klimatizace prostoru pro electrospinning. Bylo by tedy vhodné znovu provést tento experiment kumulativně a eliminovat tím vliv nehomogenity vrstvy. Nicméně z předchozího stanovení celkové koncentrace proteinu ve vzorku (8,994 mg proteinu/g PVA vrstvy) lze stanovit množství uvolněné do roztoku po jednotlivých testovacích dnech. Po prvním dnu bylo uvolněno přes 60 % proteinů, po 4 dnech téměř 80 % a po 14 dnech více než 97 %. Lze tedy předpokládat podporu adheze a proliferace buněk především v prvních 14 dnech.

Vrstvy byly dále podrobeny biologickému testování s buňkami MG-63 po dobu 14 dnů. Z vrstev byly vytvořeny vzorky ve tvaru kolečka s průměrem 1,5 cm, vysterilizovány ethylenoxidem, nasazeny do 24 jamkové destičky s koncentrací buněk $3 \cdot 10^3$ na jamku.





Graf 11: MTT test 10% PVA (125000 g/mol, 98% hydrolyza)

Z výsledků MTT testu vyplývá, že obsah trombocytárních lyzátů opravdu podporuje buněčnou adhezi a následnou proliferaci buněk.

Polyvinylalkohol s 98% hydrolyzou ukázal možnou cestu při přípravě pomalu rozpustných vrstev s postupným uvolňováním biologicky aktivní látky, trombocytárních růstových faktorů. Hlavním problémem polyvinylalkoholu s vysokým stupněm hydrolyzy je nejen jeho nerozpustnost ve vodě (rozpouští se až při vysokých teplotách kolem bodu varu), ale také špatná produkce nanovlákných vrstev. PVA s 99 % hydrolyzy obsahují 99 % hydroxylových skupin, což je příčinou tvorby silných mezimolekulárních sil, vodíkových můstků. Tyto vodíkové můstky zajišťují špatnou rozpustnost ve vodě. Rozpustnost je dále závislá na střední molekulové hmotnosti polymeru. Z toho důvodu byly vyzkoušeny další typy PVA, tentokrát s hydrolyzami nad 99 % s molekulovými hmotnostmi 50-85 tisíc g/mol, 89-98 tisíc g/mol a 130 tisíc g/mol. Nejprve bylo potřeba najít vhodnou koncentraci pro přípravu roztoku a jeho následné zvláknování.

Dále bylo potřeba do roztoků PVA přidat určité množství ethanolu pro snížení povrchového napětí polymerního roztoku, obvykle se to bývá 20 či 30 % rozpouštědlového systému (voda-ethanol). Pro biologické látky, jako jsou proteiny, které jsou citlivé na denaturační činidla, je vhodnější použití co nejmenšího množství ethanolu. Z tohoto důvodu byly zkoušeny roztoky s 10 a 20% ethanolu v rozpouštědlovém systému (tzv. poměr 9:1 či 8:2, voda:ethanol).



Pro přípravu vrstev byla testována zvláknitelnost roztoků s různými koncentracemi PVA, finální složení jednotlivých roztoků PVA je uvedeno v Tabulce 23.

Tabulka 23: Složení PVA roztoků, jejich charakterizace a podmínky zvláknění

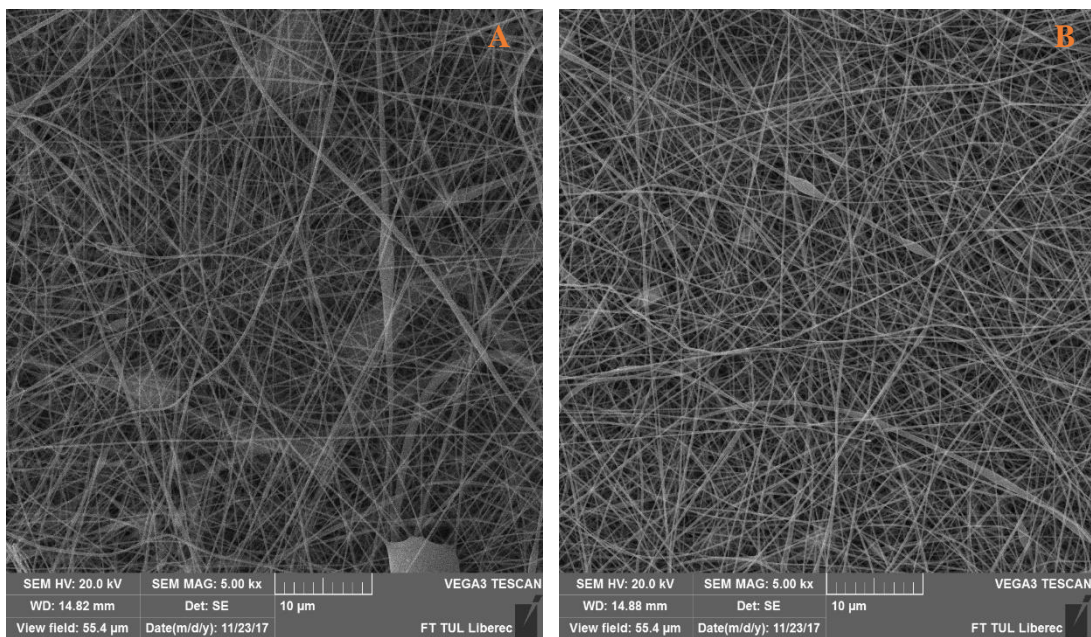
Koncentrace PVA	12 %		10 %		6 %	
MW [g/mol]	50-85 tisíc		89-98 tisíc		130 tisíc	
Hydrolyza	98-98,9 %		99+ %		99+ %	
Voda:ethanol	8:2	9:1	8:2	9:1	8:2	9:1
Složení	6 g PVA 35,2 g dH ₂ O 8,8 g EtOH	6 g PVA 39,6 g dH ₂ O 4,4 g EtOH	5 g PVA 36 g dH ₂ O 4 g EtOH	5 g PVA 40,5 g dH ₂ O 4,5 g EtOH	3 g PVA 37,6 g dH ₂ O 9,4 g EtOH	3 g PVA 42,3 g dH ₂ O 4,7 g EtOH
η [Pas] (100/s)	0,5223	0,3537	0,3354	0,2586	0,6433	0,3962
σ [mN/m] (25,2 °C)	67,99 ± 2,57	51,26 ± 0,17	60,28 ± 0,45	60,17 ± 0,48	47,58 ± 0,07	49,94 ± 0,22
Electrospinning	Vysoké napětí: 60,2/-10,0 kV Vzdálenost kolektoru: 159 mm Odtah struny: 23,87 mm/min Odtah textilie: 8 mm/min Rychlost cartridge: 250 mm/sec Teplota: 32,7 °C Relativní vlhkost: 25 %					NELZE ZVLÁKNIT
Průvlak	0,6 mm		0,7 mm	0,7 mm – nelze – gel 0,8 mm – nanáší hůře	0,8 mm – fyzikální gel Snaha zvláknovat, optimalizace	Tvorba fyzikálního gelu Nelze zvláknit

Bylo provedeno měření dynamické viskozity η a povrchového napětí σ připravených polymerních roztoků. Dynamická viskozita byla měřena na souosých rotačních válkách (Z20 DIN, Roto Visco 1, HAAKE) při lineárně rostoucí smykové rychlosti (Příloha B) Stanovení povrchového napětí roztoků probíhalo metodou zjištění maximálního tlaku v bublině pomocí přístroje Pocket Dyne od Krüss. Dále bylo změřeno povrchové napětí rozpouštědlových systémů pro potvrzení snížení povrchového napětí pomocí přidaného ethanolu (Příloha B). Důvodem měření dynamické viskozity a povrchového napětí polymerních roztoků byl předpoklad nějaké korelace mezi kvalitou elektrostatického zvláknování a těmito hodnotami. Bohužel s přihlédnutím k výsledkům zvláknování níže nelze tuto korelaci potvrdit.

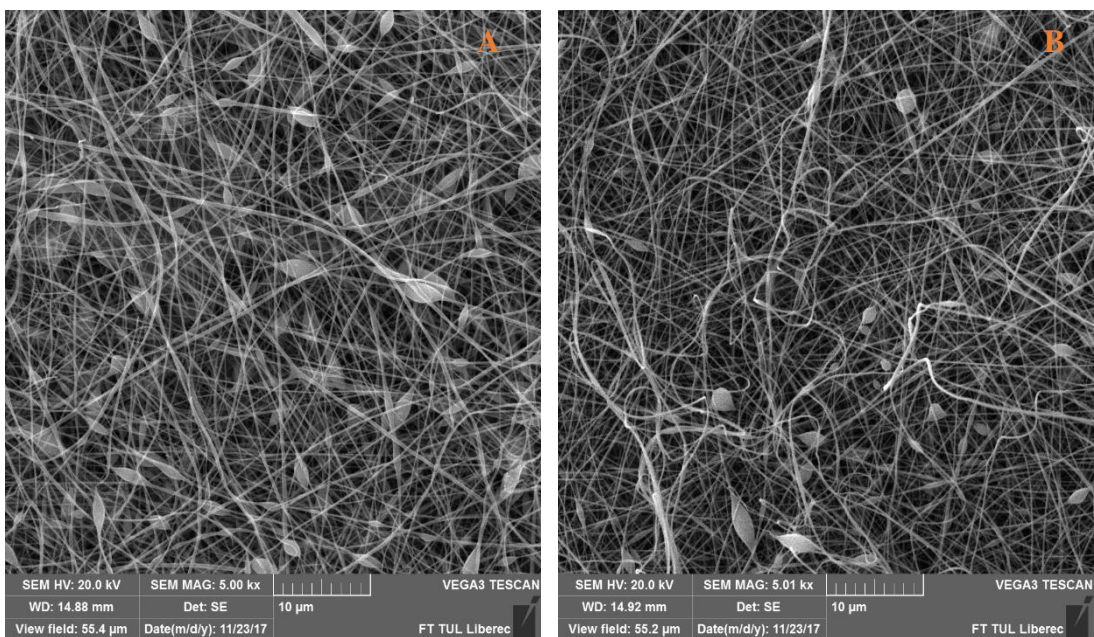


Při zvlákňování byl do komory hnán teplý vlhký vzduch, který by měl dle (Pelipenko, 2013) zvyšovat relativní vlhkost a zapříčinit vznik slabších vláken. Zvlákňování polymerních roztoků se střední molekulovou hmotností 50-85 tisíc g/mol probíhalo podle parametrů uvedených v Tabulce 23 bez větších problémů. Vytvořené vrstvy byly na první pohled homogenní a bez větších defektů. U molekulové hmotnosti 89-98 tisíc g/mol bylo nutné použít větší průvlak pro nanášení polymerního roztoku na strunu. U roztoku s poměrem voda:ethanol 9:1 nestačil ani průvlak 0,7 mm, kdy se tvořil u průvlaku fyzikální gel a polymerní roztok se dále nenanášel na strunu. Při použití průvlaku 0,8 mm docházelo k nanášení roztoku na strunu, ovšem zvlákňování neprobíhalo dobře a vrstva nebyla celistvá. U polymerních roztoků molekulových hmotností 130 tisíc g/mol docházelo opět k tvorbě fyzikálního gelu. Roztok s poměrem rozpouštědel voda:ethanol 8:2 vykazoval snahu zvlákňovat, je nutná ale další optimalizace procesu. Roztok tohoto PVA s poměrem rozpouštědel 9:1 již zvláknit nelze. Tvorba fyzikálního gelu je důsledek vysoké molekulové hmotnosti a vysoké hydrolýzy, kdy dochází k tvorbě vodíkových můstků mezi jednotlivými molekulami.



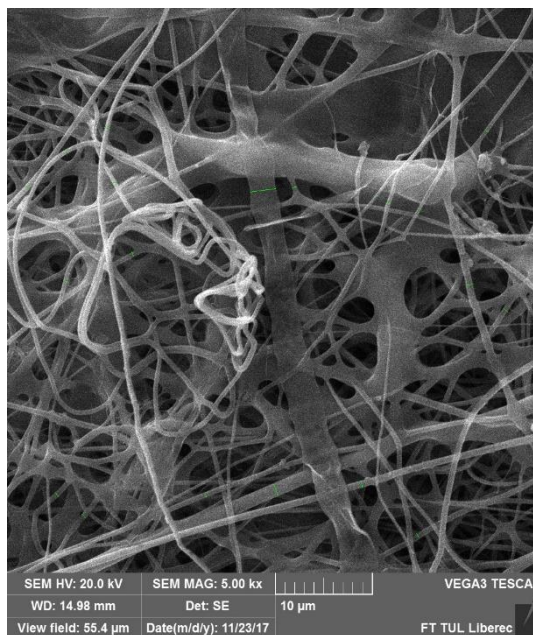


Obr. 33: Snímky SEM 12% PVA (MW 50-85000 g/mol, 98-98,9% hydrolyza) s rozpouštědlovým systémem A- voda:ethanol 8:2, B-voda:ethanol 9:1, zvětšení 5000x



Obr. 34: Snímky SEM 12% PVA (MW 89-98000 g/mol, 99+% hydrolyza) s rozpouštědlovým systémem A- voda:ethanol 8:2, B-voda:ethanol 9:1, zvětšení 5000x





Obr. 35: Snímek SEM 6% PVA (MW 130000 g/mol, 99+% hydrolyza) s rozpouštědlovým systémem voda:ethanol 8:2, zvětšení 5000x

Ze snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (Obr. 33-35) jsou materiály s různými poměry rozpouštědlového systému srovnatelné. Co se týče elektrostatického zvlákňování je vhodnější poměr 8:2, kdy dochází k lepší produktivitě, zároveň se vrstvy jeví jako kompaktnější a homogennější (obsahují méně defektů).

Tabulka 24: Průměry vláken a plošná hmotnost připravených vrstev PVA s 99% hydrolyzou

Polymer	Průměry vláken [μm]	Plošná hmotnost [g/m^2]
12% PVA 50-85 tisíc g/mol 99% hydrolyza, 8:2	(0,27 \pm 0,1)	1,316
12% PVA 50-85 tisíc g/mol 99% hydrolyza, 9:1	(0,26 \pm 0,09)	0,544
10% PVA 89-98 tisíc g/mol 99% hydrolyza, 8:2	(0,25 \pm 0,11)	1,148
10% PVA 89-98 tisíc g/mol 99% hydrolyza, 9:1	(0,23 \pm 0,08)	0,780
6% PVA 130 tisíc g/mol 99% hydrolyza, 8:2	(0,64 \pm 0,36)	NELZE
6% PVA 130 tisíc g/mol 99% hydrolyza, 9:1	NELZE	NELZE

Plošná hmotnost vzorků připravených s poměrem rozpouštědel 9:1 je nižší než u vzorků s poměrem 8:2, což vypovídá o horší produktivitě. Již makroskopickým pozorováním byly vrstvy



s poměrem 8:2 shledány jako pevnější a homogennější, na druhou stranu snímky z elektronového mikroskopu ukazují menší množství defektů u vrstev s poměrem rozpouštědel 9:1.



6 ZÁVĚR

Polyvinylalkohol je jeden z nejčastěji zkoumaných polymerů rozpustných ve vodě, a to především díky možnému uplatnění ve farmacii a medicíně. Díky rozpouštědlu je vhodný pro inkorporaci různých biologicky aktivních molekul, jako jsou například proteiny a růstové faktory v trombocytárních lyzátech. V rámci této práce byl připraven nanovláknenný materiál (scaffold) na bázi polyvinylalkoholu s inkorporovanými trombocytárními růstovými faktory z trombocytárního lyzátu (TL), a především jeho optimální množství. Použitý polyvinylalkohol se střední molekulovou hmotností 130 tisíc g/mol a 88% hydrolyzou byl vhodným modelem ke zkoumání chování procesu elektrostatického zvláknění a následné analýzy obsažených proteinů ve vyrobených PVA vrstvách. Připravené vrstvy vyrobené z roztoků PVA s různou koncentrací TL (7,5%, 10% a 12,5%) byly podrobeny několika testům. Vzhledem k morfologii vyrobených vrstev a obsahu inkorporovaných proteinů byla pro další experimenty vybrána vrstva PVA s obsahem 10 % TL. Obsah proteinů ve vzorku PVA s obsahem 10% TL odpovídá 6,42 mg proteinů/g vyrobené vrstvy. Pro zjištění aktivity proteinů po procesu zvláknění a aplikace vysokého napětí na polymerní roztok byl použit modelový systém s křenovou peroxidázou (HRP). Byly připraveny vláknenné vrstvy z PVA s obsahem HRP, které bylo do roztoku přidáno v poměru 1 mg HRP/1 g hmotnosti PVA. Aktivita enzymu byla měřena po zvláknění, a dále po 1,3,7,14 a 21 dnech. Aktivita HRP po zvláknění odpovídala $(2,85 \pm 0,13)$ U/mg proteinu. Po třech dnech uchovávání v lednici (5 °C) byla aktivita na polovině, po týdnu již byla na jedné třetině a po dvou týdnech jen na jedné pětině původní aktivity. Po třech týdnech ztrácí enzym 85 % své původní aktivity. Ve srovnání s pokusy (Buzgo, 2017), které taktéž řešily aktivitu HRP ve vláknech PCL, dochází k poklesu aktivity HRP ve vláknenné vrstvě PVA pomaleji než u PCL vláken, kde aktivita HRP po 8 dnech dosahovala méně než 20 % své původní aktivity. Z výsledků této práce vyplývá, že aktivita HRP po 7 dnech klesá na třetinu své původní aktivity.

Rozpustnost použitého typu PVA nám dovoľovala snadno zjistit koncentrace a aktivitu inkorporovaných proteinů, ale pro postupné uvolňování růstových faktorů bylo toto PVA nevhodné. Síťování polymeru, pro nutné použití denaturačních činidel, bylo zamítnuto, proto se přistoupilo k povrchové modifikaci PVA vrstev. S pomocí katedry organické chemie na univerzitě Palackého v Olomouci byly vzorky acetylovány FAEEAA. Modifikované vrstvy PVA (MW 130000 g/mol s 88% hydrolyzou) byly biologicky testovány pomocí buněk 3T3-SA i MG-63. Výsledky však prokázaly silnou cytotoxicitu modifikovaných vzorků. Nicméně se prokázal pozitivní vliv TL na adhezi a proliferaci buněk. V rámci in-vitro experimentů byla testována i sterilizace vzorků – výsledky prokázaly, že pro materiály s inkorporovanými proteiny je vhodná



sterilizace ethylenoxidem. Samotná modifikace taktéž měnila nanovláknennou strukturu vyrobených vrstev, z těchto důvodů není tato modifikace vhodná na výrobu tkáňových nosičů.

Další možností snížení rozpustnosti PVA je použití polyvinylalkoholu s vysokou hydrolyzou. Nejprve byl použit PVA s MW 125 tisíc g/mol a hydrolyzou 98% a byla zkoušena i inkorporace 10% TL jako v předchozích pokusech. Zvláknování probíhalo hůře, nicméně polymerní roztok s obsahem proteinů šel zvláknovat snáze, což lze potvrdit výsledky ze SEM (Obr. 31 a Obr. 32) i dvojnásobné plošné hmotnosti vrstvy. Je vysoce pravděpodobné, že proteiny zabraňují vzniku vodíkových můstků mezi hydroxylovými skupinami jednotlivých makromolekul polyvinylalkoholu a roztok je pak lépe zvláknitelný. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou podle Bradfordové na 8,97 mg proteinu / 1 g vrstvy. Test uvolňování proteinů v průběhu 14 dní prokázal postupné uvolňování proteinů, kdy uvolnění proteinů do roztoku po 14 dnech odpovídá 97% celkové množství. Při biologickém testování s MG-63 osteoblasty bylo prokázáno, že inkorporované trombocytární růstové faktory ovlivňují růst buněk minimálně po dobu 1 týdne. Tento materiál se za dobu 9 měsíců při teplotě 37 °C ve vodě zcela nerozpustil.

Je možné taktéž použití PVA i s vyšší hydrolyzou 99% a jiných molekulových hmotností. Prvotní výsledky ovšem ukazují obtížnější zvláknování takto vysokých hydrolyz PVA. Při optimalizování zvláknování těchto roztoků bylo zjištěno vhodnější použití systému voda:ethanol v poměru 8:2, kdy dochází k tvorbě homogennější nanovláknenné vrstvy. Ke zlepšení zvláknování mohou také pomoci trombocytární lyzáty, které naruší tvorbu vodíkových vazeb mezi makromolekulami jako v předchozím případě s PVA s 98% hydrolyzou. Bylo by vhodné pokračovat v hledání optimálního polyvinylalkoholu s vhodnou hydrolyzou a molekulovou hmotností. Další možností je vytvoření nanovláknenné struktury PVA vláken s TL v kombinaci s méně rozpustným polymerem (další PVA s vyšší hydrolyzou a obsahem TL, popř. např. PCL vláken) pro zajištění pevnější struktury. Pro zlepšení a stabilizaci elektrostatického procesu zvláknování by bylo vhodné pořízení klimatizační jednotky.



7 Bibliografie

- ALLEN, Theresa a Pieter CULLIS, 2004. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *SCIENCE*. **2004**(303), 1818-1822.
- BAJÁKOVÁ, Jana, David LUKÁŠ a Maxime LACARIN, 2011. Drawing the Production of Individual Nanofibers by Experimental Method. In: *NANOCON*. Brno.
- BLAIR, Price a Robert FLAUMENHAFT, 2009. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*. **2009**(234), 177-189. DOI: 10.1016/j.blre.2009.04.001.
- BOCCACCINI, Aldo, ed. a Julie GOUGH, ed., 2007. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing. Woodhead Publishing in materials. ISBN 978-1-4200-4454-6.
- BRADFORD, 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]. **72**(1-2), 248-254 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- BUZGO, Matej, Jarmila GREPLOVÁ, Miroslav SOURAL et al., 2015. PVA immunonanofibers with controlled decay. *Polymer*. **77**(10), 387-398. DOI: 10.1016/j.polymer.2015.09.018.
- BUZGO, Matej, Michala RAMPICHOVA, Karolina VOCETKOVA et al., 2017. Emulsion centrifugal spinning for production of 3D drug releasing nanofibres with core/shell structure. *RSC Advances*. **2017**(7), 1215-1228. DOI: 10.1039/c6ra26606a.
- CAPELLI, C, M DOMENGHINI, G BORLERI et al., 2007. *Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts*. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705798.
- Definition of nanomaterial, 1995-2017. *European Commission: Environment* [online]. European Union [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm



- DEPPERMAN, Carsten a Paul KUBES, 2016. Platelets and infection. *Seminars in Immunology*. **28**(6), 536-545. DOI: 10.1016/j.smim.2016.10.005.
- FEKETE, Natalie, Mélanie GADELORGE, Daniel FÜRST et al., 2012. *Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components*. DOI: 10.3109/14653249.2012.655420.
- FERRARA, Napoleone a Hans GERBER, 1999. Vascular Endothelial Growth Factor Molecular and Biological Aspects. *Coronary Angiogenesis*. Elsevier, 25-57. Advances in Organ Biology. DOI: 10.1016/S1569-2590(08)60162-7. ISBN 9780762303922.
- GHOSHAL, Kakali a Maitree BHATTACHARYYA, 2014. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. **2014**, 1-16. DOI: 10.1155/2014/781857.
- GREENE, Dr., 2017. GROWTH FACTORS AND DEVELOPMENT. In: *Columbia University* [online]. New York: Columbia university [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/humandev/2004/Chpt16-GrowthFactors.pdf>
- Growth Factors and Cytokines, © 1996-2017. *The Medical Biochemistry Page* [online]. LLC [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>
- HANZL, Vojtěch, 2017. *Funkcionalizace tkáňového nosiče trombocytárními růstovými faktory*. Liberec. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
- HE, Chuanglong, Wei NIE a Wei FENG, 2014. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. **45**. DOI: 10.1039/C4TB01464B.



- HERSANT, B., S. LA PADULA, M. SIDAHMED-MEZI, A.M. RODRIGUEZ a J.P. MENINGAUD, 2016. Use of platelet-rich plasma (PRP) in microsurgery. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*. **118**(4), 236-237. DOI: 10.1016/j.jormas.2017.05.009.
- HOQUE, M., T. NUGE, T. YEOW, N. NORDIN a R. PRASAD, 2015. Gelatin Based Scaffolds For Tissue Engineering - A Review. *Polymers Research Journal*. **9**(1), 15-32.
- Charakteristika nanovláken, 2017. *Elmarco* [online]. Liberec: Versoft.cz [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/technologie/nanovlakna/>
- CHEN, Q., S. HARDING, N. ALI, H. JAWAD a A. BOCCACCINI, 2007. Cardiac tissue engineering. In: BOCCACCINI, A.R. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Cambridge: Woodhead publishing limited, s. 335-356. ISBN 978-1-84569-176-9.
- CHEVALLIER, Nathalie, Fani ANAGNOSTOU, Sebastien ZILBER et al., 2009. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*. **31**(2), 270-278. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.043.
- ISLAM, Md, Stefania GRECO, Milijana JANJUSEVIC et al., 2015. *Growth factors and pathogenesis*. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2015.08.018.
- JIANG, Hongliang, Yingqian HU, Yan LI, Pengcheng ZHAO, Kangjie ZHU a Weiliam CHEN, 2005. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*. **108**(2-3), 237-243. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.08.006.
- KADAJJI, Veeran a Guru BETAGERI, 2011. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers*. **2011**(3), 1972-2009. DOI: 10.3390/polym3041972.
- KHADEMHOSEINI, A., R. LANGER, J. BORENSTEIN a J. VACANTI, 2005. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS*. **103**(8), 2480–2487. DOI: 10.1073/pnas.0507681102.



- KINGHAM, P. a G. TERENCE, 2007. Nerve bioengineering. In: BOCCACCINI, A.R. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Cambridge: Hoodhead publishing limited, s. 466-498. ISBN 978-1-84569-176-9.
- KOPŘIVOVÁ, Barbora, 2012. *Funkcionalizace tkáňového nosiče trombocytárními růstovými faktory*. Liberec. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
- KORNBERG, A., N.N. RAO a D. AULT-RICHÉ, 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 89-125. ISSN 0021-9193.
- LEE, K., E. SILVA a D. MOONEY, 2010. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the royal society Interface.* **8**(55), 153-170. DOI: 10.1098/rsif.2010.0223.
- LIECHTY, William, David KRYSCIO, Brandon SLAUGHTER a Nicholas PEPPAS, 2010. Polymers for Drug Delivery Systems. *Chemical and Biomolecular Engineering.* (1), 149-173. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847.
- LI, Zhenyu a Ce WANG, 2013. One-Dimensional nanostructures: Effects of Working Parameters on Electrospinning. *Springer*. ISBN 9783642364273, 15-28.
- MARX, Robert, Eric CARLSON, Ralph EICHSTAED, Steven SCHIMMELE, James STRAUSS a Karen GEORGEFF, 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **86**(6), 638-646.
- MOHAN, Tamilselvan, Rupert KARGL, Karin TRADT, Martin KULTERER, Matej BRAČIĆ, Silvo HRIBERNIK, Karin STANA-KLEINSCHEK a Volker RIBITSCH, 2014. Antifouling coating of cellulose acetate thin films with polysaccharide multilayers. *Carbohydrate Polymers.* **116**(2), 149-158. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.068.
- Nanopharma: Making nano your opportunity, 2015. *Nanopharma* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>



- NAYAK, Rajkishore, Rajiv PADHYE, Ilias KYRATZIS, Yen TRUONG a Lyndon ARNOLD, 2011. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal*. **82**(2), 129-147. DOI: 10.1177/0040517511424524.
- PELIPENKO, Jan, Julijana KRISTL, Biljana JANKOVIĆ, Saša BAUMGARTNER a Petra KOCBEK, 2013. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*. **456**(1), 125-134. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.078.
- PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER a Karel SOUKUP, 2009. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. **103**, 1009-1016.
- RAMALINGAM, Murugan, Ziyad HAIDAR, Seeram RAMAKRISHNA, Hisatoshi KOBAYASHI a Youssef HAIKEL, 2012. *Integrated biomaterials in tissue engineering*. Salem, Mass.: Scrivener Pub. ISBN 978-1-118-31198-1.
- SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO, 2010. Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today*. **13**(11), 12-14. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1.
- SCHALLMOSER, Katharina a Dirk STRUNK, 2009. Preparation of Pooled Human Platelet Lysate (pHPL) as an Efficient Supplement for Animal Serum-Free Human Stem Cell Cultures. *Journal of Visualized Experiments*. **1523**(32). DOI: 10.3791/1523.
- STOSCHECK, Christa, 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*. **182**, 50-68.
- Typy kmenových buněk, 2013. *CellMaGel* [online]. Art4web.cz [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <http://cellmagel.cz/cs/uvodni-stranka/typy-kmenovych-bunek>
- HERMAN, F., 2007. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Concise*.- Vinyl alcohol polymers, Third edition. USA: Wiley, s. 1308-1315. ISBN 978-0470073698.



- VOSE, J a J ARMITAGE, 1995. Clinical applications of hematopoietic growth factors. *Journal of clinical oncology*. **13**(4). DOI: 10.1200/JCO.1995.13.4.1023. Dostupné také z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1995.13.4.1023>
- VYSLOUŽILOVÁ, Lucie, 2016. *Development of Coaxial Electrospinning technology*. Liberec. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci.
- VYSLOUŽILOVÁ, Lucie a David LUKÁŠ, 2014. Coaxial needle less electrospinning. In: *Slideplayer* [online]. [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <http://slideplayer.com/slide/4428044/>
- WAISSER, K. a K. PALÁT, 2001. *Bioorganická chemie*. 2. vydání. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0382-9.
- WEI, G. a P. MA, 2007. Polymeric biomaterials. In: BOCCACCINI, A. R. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Cambridge: Woodhead publishing limited, 32.51. ISBN 978-1-84569-176-9.
- WOŹNIAK, P. a A.J. EL HAJ, 2007. Bone regeneration and repair using tissue engineering. In: BOCCACCINI, A.R. a Julie E. GOUGH. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Cambridge: Woodhead Publishing limited, s. 294-318. ISBN 978-1-84569-176-9.
- XU, Chengyu, Ryuji INAI, Masaya KOTAKI a Seeram RAMAKRISHNA, 2004. Electrospun Nanofiber Fabrication as Synthetic Extracellular Matrix and Its Potential for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. **10**(7-8), 160-1168. DOI: 10.1089/ten.2004.10.1160.
- YUSOP, A., A. BAKIR, N. SHAHAROM, M. ABDUL KADIR a H. HERMAWAN, 2012. Porous Biodegradable Metals for Hard Tissue Scaffolds: A Review. *International Journal of Biomaterials*. **2012**, 1-10. DOI: 10.1155/2012/641430.
- ZHANG, Ying, Hon CHAN a Kam LEONG, 2012. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **65**(1), 104-120. DOI: 10.1016/j.addr.2012.10.003.



Seznam obrázků

Obr. 1: Vlastnosti tkáňového nosiče (scaffoldu)	- 15 -
Obr. 2: Vzorec kyseliny hyaluronové	- 18 -
Obr. 3: Fragment dextranu	- 19 -
Obr. 4: Vzorec polyethylen glykolu	- 20 -
Obr. 5: Struktura polyvinyl pyrrolidonu	- 20 -
Obr. 6: Vzorec polyvinylalkoholu	- 21 -
Obr. 7: Strukturní jednotka polyakrylamidu	- 22 -
Obr. 8: Schéma koaxiálního zvlákňování (Jiang, 2005)	- 26 -
Obr. 9: Princip technologie drawing (Bajáková, 2011)	- 27 -
Obr. 10: Princip metody fázové separace (He, 2014)	- 27 -
Obr. 11: Princip metody melt-blown	
(dostupné z: http://www.kasen.co.jp/english/product/line/work.html)	- 28 -
Obr. 12: Schéma metody forcespinning (vlevo) a příklad spinneretu (vpravo) (Sarkar, 2010)	- 29 -
Obr. 13: Schéma jehlového koaxiálního zvlákňování (Vysloužilová, 2014)	- 30 -
Obr. 14: Schéma bezjehlového koaxiálního zvlákňování (Vysloužilová, 2016)	- 30 -
Obr. 16: Krevní destička	
(dostupné z: https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php)	- 38 -
Obr. 15: Struktura krevní destičky, trombocytu (dostupné z: http://www.doctorshangout.com/profiles/blog/list?tag=platelet)	- 38 -
Obr. 17: Aktivace krevních destiček a jejich agregace.. (http://what-when-how.com/acp-medicine/hemostasis-and-its-regulation-part-1/)	- 38 -
Obr. 18: Princip barvení gelů stříbrem	- 47 -
Obr. 19: Enzymová esej HRP - zastavení reakce po 20 sekundách	- 50 -
Obr. 20: Enzymová esej s HRP - kalibrační křivka a vzorky - 12% PVA (NC) a 12% PVA s HRP (I,II,III)	- 51 -
Obr. 21: Morfologie připravených PVA vrstev, zvětšení 1000x , A-12% PVA, B-12% PVA + 7,5 % TL, C-12% PVA + 10 % TL, D-12% PVA + 12,5 % TL	- 55 -



Obr. 22: Morfologie připravených PVA vrstev, zvětšení 5000x , A-12% PVA, B-12% PVA + 7,5 % TL, C-12% PVA + 10 % TL, D-12% PVA + 12,5 % TL	- 55 -
Obr. 23: 8% SDS-PAGE se vzorky 12% PVA s různým obsahem TL ve srovnání se vzorky pana Hanzla	- 56 -
Obr. 24: 8% SDS-PAGE dokumentující koncentrační křivku BSA použitou pro stanovení koncentrace inkorporovaných proteinů, 0 – destilovaná voda, 1 – koncentrace BSA 1 µg/ml, 2 – 2 µg/ml, 3 – 4 µg/ml, 4 - 6 µg/ml, 5 - 8 µg/ml, 6 - 10 µg/ml, M – marker K494, barveno Ag.....	- 58 -
Obr. 25: 8% SDS-PAGE dokumentující koncentrační řadu HRP: 0 – destilovaná voda, 1 – koncentrace HRP 1 µg/ml, 2 – 2 µg/ml, 3 – 4 µg/ml, 4 - 6 µg/ml, 5 - 8 µg/ml, 6 - 10 µg/ml, M – marker K494, barveno Ag	- 58 -
Obr. 27: 8% SDS-PAGE dokumentující koncentrační řadu HRP: 0 – destilovaná voda, 1 – HRP 1 µg/ml, 2 - HRP 2 µg/ml, 3 – HRP 4 µg/ml, 4 – HRP 6 µg/ml, 5 – HRP 8 µg/ml, 6 – HRP 10 µg/ml, M – marker K494, barveno CBB	- 59 -
Obr. 26: 8% SDS-PAGE dokumentující homogenitu PVA vrstev s HRP (vzorky ze 3 oblastí (I,II,III) PVA vrstvy): 1 – NC (PVA bez TL, 2 – oblast I, 3 – oblast II, 4 – oblast III, 5 – NC, 6 – oblast I, 7 – oblast II, 8 – oblast III, M – marker K494, barveno Ag-	- 59 -
Obr. 28: Snímky ze SEM 12% PVA A-bez HRP B-s HRP, zvětšení 5000x.....	- 61 -
Obr. 30: SEM snímky PVA vrstev s 10 % TL A-nemodifikování, B-modifikace Olomouc, zvětšení 5000x	- 64 -
Obr. 29: SEM snímky modifikovaných PVA vzorků s 10 % TL v průběhu biologického testování, MG-63, 5000x	- 67 -
Obr. 31: Snímky SEM pro 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolyza) A-bez TL, B-s 10% TL, zvětšení 1000x.....	- 68 -
Obr. 32: Snímky SEM pro 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolyza) A-bez TL, B-s 10% TL, zvětšení 5000x.....	- 69 -
Obr. 33: Snímky SEM 12% PVA (MW 50-85000 g/mol, 98-98,9% hydrolyza) s rozpouštědlovým systémem A-voda:ethanol 8:2, B-voda:ethanol 9:1, zvětšení 5000x-	75

-



Obr. 34: Snímky SEM 12% PVA (MW 89-98000 g/mol, 99+% hydrolýza) s rozpouštědlovým systémem A-voda:ethanol 8:2, B-voda:ethanol 9:1, zvětšení 5000x- 75 -

Obr. 35: Snímek SEM 6% PVA (MW 130000 g/mol, 99+% hydrolýza) s rozpouštědlovým systémem voda:ethanol 8:2, zvětšení 5000x.....- 76 -

Seznam grafů

Graf 1: Kalibrační křivka BSA pro metodu podle Bradfordové.....	- 49 -
Graf 2: Histogram průměrů vláken PVA vrstev s trombocytárními lyzáty	- 54 -
Graf 3: MTT test 12% PVA s trombocytárními lyzáty, MG-63.....	- 57 -
Graf 4: Kalibrační křivky BSA a HRP pro stanovení koncentrace proteinů	- 59 -
Graf 5: Kalibrační křivka HRP pro stanovení aktivity proteinů	- 62 -
Graf 6: Aktivita HRP inkorporovaného do 12% PVA	- 63 -
Graf 7: MTT test 12% PVA (MW 130000 g/mol, 88% hydrolýza) 1.modifikace Olomouc, 3T3-SA (P18).....	- 65 -
Graf 8: MTT test 12% PVA (MW 130000 g/mol, 88 % hydrolýza) 2. modifikace, MG-63 (P12).....	- 66 -
Graf 9: Histogram průměrů vláken 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolýza)-	70 -
-	
Graf 10: Uvolňování TL z 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98% hydrolýza) + 10% TL ...	71 -
Graf 11: MTT test 10% PVA (125000 g/mol, 98% hydrolýza)	- 72 -

Seznam tabulek

Tabulka 1: Běžně využívané polymery pro výrobu tkáňových scaffoldů (Ramalingam, 2012) (Mohan, 2014)	- 17 -
Tabulka 2: Přehled výrobních technik scaffoldů pro tkáňové inženýrství (Ramalingam, 2012)	- 24 -
Tabulka 3: Základní skupiny růstových faktorů (Greene, 2017).....	- 35 -
Tabulka 4: Populární růstové faktory v regeneraci tkání. (Lee, 2010).....	- 36 -



Tabulka 5: Průměrné hodnoty nastavení a podmínek pro zvláknování 12% PVA s 88% hydrolýzou (Sloviol R)	- 45 -
Tabulka 6: Složení roztoků potřebných pro SDS-PAGE.....	- 46 -
Tabulka 7: Složení roztoků pro barvení Coomassie Brilliant Blue R-250 a vysušení gelů	- 47 -
Tabulka 8: Tabulka složení jednotlivých roztoků pro barvení stříbrem.....	- 48 -
Tabulka 9: Příprava kalibrační křivky BSA	- 48 -
Tabulka 10: Koncentrační řada pro HRP esej	- 49 -
Tabulka 11: Složení roztoků potřebných pro enzymovou esej s HRP	- 50 -
Tabulka 12: Složení Master Mixu	- 50 -
Tabulka 13: Složení fosfátového pufru PBS.....	- 52 -
Tabulka 14: Složení PVA roztoků s koncentracemi 7,5, 10 a 12,5 % TL.....	- 53 -
Tabulka 15: Podmínky zvláknování 12% PVA se 7,5, 10 a 12,5 % TL.....	- 54 -
Tabulka 16: Průměry vláken připravených PVA vrstev	- 54 -
Tabulka 17: Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové pro 12% PVA s obsahem TL 7,5, 10 a 12,5 %	- 56 -
Tabulka 18: Ředící řada TL, 595 nm.....	- 60 -
Tabulka 19: Podmínky zvláknování 12% PVA (+HRP), MW 130000 g/mol, 88% hydrolýza	- 61 -
Tabulka 20: Charakteristika vrstev 12% PVA s/bez HRP.....	- 61 -
Tabulka 21: Podmínky pro zvláknování na Nanospideru pro 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98 % hydrolýza)	- 68 -
Tabulka 22: Charakteristika vrstev z 10% PVA (MW 125000 g/mol, 98% hydrolýza) ...	- 69 -
Tabulka 23: Složení PVA roztoků, jejich charakterizace a podmínky zvláknění	- 73 -
Tabulka 24: Průměry vláken a plošná hmotnost připravených vrstev PVA s 99% hydrolýzou	- 76 -



Přílohy

A - Lowryho metoda

Další metoda pro kvantifikaci proteinů je Lowryho metoda. Tato metoda vylepšuje méně citlivou biuretovou metodu, využívá dvou činidel – biuretového a Folin-Ciocalteu činidla. Nevýhodou Lowryho metody je závislost na složení proteinu – je citlivější na aminokyseliny tyrosin, tryptofan a cystein. (Stoscheck, 1990) Nicméně spolu s metodou podle Bradfordové zjišťují celkové množství proteinů, nikoliv jejich aktivitu.

Z vyrobené vrstvy bylo odebráno kolečko o průměru 1,5 cm a rozpuštěno v 1 ml destilované vody. 20 µl tohoto roztoku bylo odebráno do 96 jamkové destičky, přidáno a dobře promícháno s 200 µl činidla, které bylo připraveno v poměru 50:1 z roztoku A a B a necháno po dobu 10-20 minut inkubovat v temnu při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 20 µl roztoku Folin-Ciocalteu ředěného vodou v poměru 1:1 a nechalo se znovu inkubovat po dobu 30 minut v temnu a při pokojové teplotě. Měření absorbance probíhalo na spektrofotometru BioTek při vlnové délce 650 nm.

Tabulka A 1: Složení roztoků pro Lowryho metody stanovení koncentrace proteinů

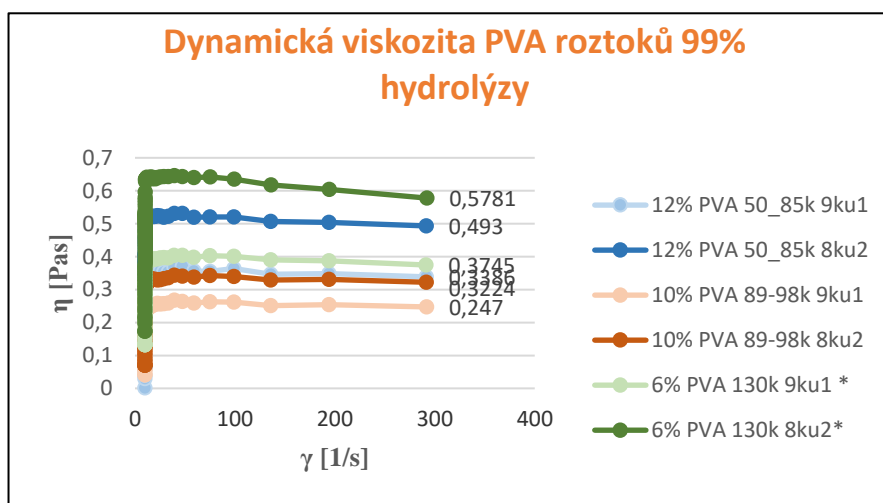
Roztok		Složení
A	0,74% Na ₂ CO ₃ v NaOH	0,74 g Na ₂ CO ₃ 0,4 g NaOH in 100 ml dH ₂ O
B	0,5% CuSO ₄ ·5H ₂ O v 1% dihydrátu citrátu sodného	0,5 g CuSO ₄ ·5H ₂ O 1,14 g C ₃ H ₄ OH(COONa) ₃ ·2 H ₂ O in 100 ml dH ₂ O



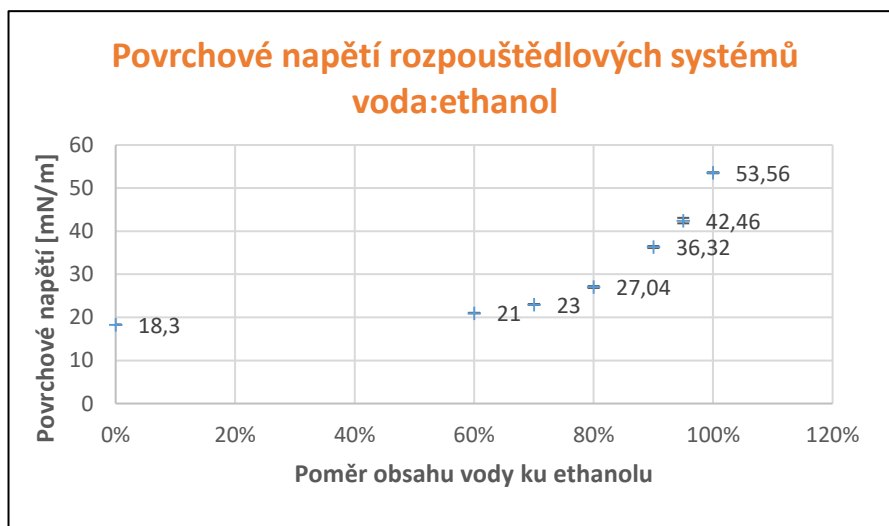
B – PVA S HYDROLÝZOU NAD 98%

Tabulka B 1: Test postupného uvolňování proteinů z PVA (125000 g/mol, 98% hydrolyza)

Testovací den	1H	4H	1D	4D	7D	14D
Absorbance [595 nm]	1,087	1,153	1,136	1,417	1,382	1,750
Koncentrace [mg/g PVA] (na 1 ml)	5,43	5,77	5,68	7,09	6,91	8,75



Graf B 1: Dynamická viskozita PVA roztoků 99% hydrolyzy



Graf B 2: Povrchové napětí rozpouštědlových systémů voda:ethanol



C - Příloženého CD

Obsah příloženého CD:

Kopřivová_Barbora_DP_2018.pdf

Kopřivová_Barbora_DP_2018.docx

