

# Nanovlákenné cévní náhrady

Diplomová práce

Studijní program:N3106 – Textilní inženýrstvíStudijní obor:3106T018 – Netkané a nanovlákenné materiály

Autor práce: Vedoucí práce: **Bc. Patrik Novák** Ing. Petr Mikeš, Ph.D. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI Fakulta textilní

Akademický rok: 2013/2014

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	Bc. Patrik Novák
Osobní číslo:	T12000498
Studijní program:	N3106 Textilní inženýrství
Studijní obor:	Netkané a nanovlákenné materiály
Název tématu:	Nanovlákenné cévní náhrady
Zadávající katedra:	Katedra netkaných textilií a nanovlákenných materiálů

#### Zásady pro vypracování:

Vypracování rešerše na dané téma
Příprava nanovlákenných cévních náhrad, hodnocení morfologie vrstev a optimalizace vlastností vnitřní a vnější vrstvy cévní náhrady
In vitro testování vhodných vrstev

4. Zpracování výsledků

Shiu hind adda. Shiu hind adda

Liberei due 18. října 2013 -

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

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: Psysical principles of Electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). Textile Progress: 41: 59-140: 2009.

2. Ramakrishna, S. Fujihara, K. Teo, W. et al. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. 2005, ISBN 9812564543. 3. Freshney R. I. Culture of animal cells. 2010, ISBN 9780470528129.

4. ZHANG H, JIA X, HAN F, ZHAO J, ZHAO Y, FAN Y, YUAN X: Dual delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. Biomaterials: 34: 2202-12: 2013.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petr Mikeš, Ph.D. Katedra netkaných textilií a nanovlákenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: Termín odevzdání diplomové práce: 8. ledna 2015

18. října 2013

Ing. Jana Drašarová, Ph.D. děkanka



prof. RNDr. David Lukáš, CSc. vedoucí katedry

V Liberci dne 18. října 2013

# Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou 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 diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom 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.

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

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

Datum:

Podpis:

# PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucímu své diplomové práce Ing. Petru Mikešovi Ph.D. za poskytnutí svého času, cenných rad a věcných připomínek, při vypracování této diplomové práce

Poděkování patří také celé katedře netkaných textilií a nanovlákenných materiálů na Technické univerzitě v Liberci, a to především Mgr. Janě Horákové za odborné konzultace. Dále bych rád poděkoval Ing. Alešovi Šamanovi, Mgr. Kateřině Pilařové a Ing. Věře Jenčové Ph.D. za vstřícnou pomoc v laboratořích a poskytnutí cenných rad pro vypracování experimentální části této práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině a blízkým přátelům za velkou psychickou podporu po dobu mého studia.

# **ANOTACE**

Tato práce se zabývá studiem maloprůměrových nanovlákenných cévních náhrad. V současné době neexistuje dostatečná cévní náhrada s průměrem menším než 6 mm a to z důvodu její trombotizace. Vytvořením umělé cévy s malým průměrem se zabývá mnoho výzkumných pracovišť. Nanovlákenné cévní náhrady se jeví být velmi slibnou cestou pro vyřešení tohoto problému. V této práci byly vyráběny a optimalizovány dvouvrstvé cévní náhrady vyrobené metodou elektrostatického zvlákňování. Byla hlavně optimalizována vnitřní simulující vrstva "tunica intima", která byla následně testována in vitro na růst endotelových buněk. Tyto výsledky budou sloužit dále pro vývoj komplexní cévní náhrady a pro jejich in vivo testování.

#### <u>Klíčová slova</u>

cévní náhrady, elektrostatické zvlákňování, tkáňové inženýrství, nanovlákna

# **ANNOTATION**

This work concerns with the study of small-diameter, nanofibrous vascular grafts. There is lack of vascular grafts with a diameter of less than 6mm a this moment due to problems with thrombogenicity. The process of creation of artificial blood vessels with small diameters has engaged many research groups. Nanofibrous vascular grafts have proven to be very auspicious way for solution of this problem. In this work we produced and optimized double layer vascular grafts using the electrospinning method. The inner layer was mostly optimised, the "tunica intima" which was then tested by the endothelial cells in vitro. These results will be used for further development of complex vascular grafts and its testing in vivo.

#### Key words

Vascular grafts, electrospinning, tissue engineering, nanofibrous

# Obsah

1	Úvo	od		9
2	Teo	eoretická část		10
	2.1 Ka		rdiovaskulární soustava	10
	2.1.1		Srdce	10
	2.1	.2	Krev	10
	2.1	.3	Cévy	11
	2.2	Ex	tracelulární matrix	14
	2.3	Cé	vní náhrady	15
	2.3.1		Historie umělých cévních náhrad	15
	2.3	.2	Biologické náhrady	15
	2.3	.3	Umělé náhrady	17
	2.4	Ele	ektrostatické zvlákňování	19
	2.4	.1	Speciální kolektor	21
	2.5	Tk	áňové inženýrství	23
	2.5	.1	Scaffold	25
	2.6	Bu	něčné testování	25
	2.6	.1	MTT test	26
	2.6	.2	Elektronový mikroskop	26
	2.6	.3	Fluorescenční mikroskop	26
	2.7	Ma	ateriály pro výrobu cévní náhrady	27
	2.7	.1	Přírodní polymery	27
	2.7	.2	Syntetické polymery	29
3	Exp	erin	nentální část	34
	3.1	Ma	ateriál	34
3.2 Zařízení na výrobu scaffoldu		řízení na výrobu scaffoldu	36	
3.3 Výroba scaffoldu		roba scaffoldu	38	

	3.4 St	ruktury vytvořených vlákenných vrstev scaffoldu	39
	3.4.1	Přídavný plochý kolektor	40
	3.4.2	Výsledky s přídavným plochým kolektorem	43
	3.4.3	Nerezová a uhlíková rotující tyčka	45
	3.4.4	Vybraný scaffold pro biologické testování	48
	3.5 Bi	ologické testování na vlákenné vrstvě scaffoldu	49
	3.5.1	Příprava vzorků	49
	3.5.2	Osazení scaffoldu buňkami	49
	3.5.3	Testování viability, adheze a proliferace buněk	50
4	Shrnut	í	57
5	Závěr.		59

# Seznam zkratek a symbolů

3T3	Linie 3T3 myších fibroblastů
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – kultivační médium pro fibroblasty
EBM – 2	Endothelial Cell Basal Medium – kultivační médium pro endotelové buňky
Gt	želatina
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells – lidské endotelové buňky 3-(4,5-dimethylthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2 <i>H</i> - tetrazolium bromide
MTT	test buněčné viability
P(LLA – CL)	kopolymer kyseliny mléčné a polykaprolaktonu
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové
PTFE	polytetrafluorethylen
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEM in vitro	transmisní elektronová mikroskopie testování v laboratorních podmínkách
TEM in vitro in vivo	transmisní elektronová mikroskopie testování v laboratorních podmínkách testování prováděné na zvířatech

# 1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění je jednou z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Jen v Evropě kvůli tomuto onemocnění každý rok zemřou 4 miliony osob a v USA 1 milion obyvatel. Těmto úmrtím lze předcházet použitím vhodné cévní náhrady a to buď cévou autologní, nebo umělou.

Na trhu je mnoho umělých implantátů s různými průměry a to řádově od 7 mm výše. Cévní implantáty jsou většinou vyrobeny z polytetrafluoretylenu metodou pletení, tkaní nebo extruzí a jsou hojně využívány. Problém nastává v případě, kdy pacient potřebuje maloprůměrovou (< 6 mm) náhradu. Náhrady těchto průměrů se nesetkávají s úspěchem při transplantaci a ne vždy je možné použít autologní transplantace. Jedním z největších problémů je vznik krevních sraženin uvnitř cévy a jejich následné ucpání nebo uvolnění sraženiny do krevního řečiště.

Možnou odpovědí na otázku, jak vyrobit spolehlivou maloprůměrovou cévní náhradu, je tkáňové inženýrství, které se zabývá výrobou tkáňových nosičů, tzv. scaffoldů. Důležité je vyrobit dostatečně porézní, orientovanou vlákennou strukturu a osadit ji autologními buňkami pacienta, nebo buňky mohou kolonizovat samotný scaffold až po implantaci. Tyto nároky na výrobu by mohla splnit technologie elektrostatického zvlákňování vhodného polymeru se správnou orientací vláken na kolektoru.

Cílem této diplomové práce bylo připravit nanovlákenné cévní náhrady pomocí elektrostatického zvlákňování s optimální strukturou nanovlákenné vrstvy pro úspěšnou adhezi a proliferaci příslušných buněk. Dále tuto vrstvu podrobit *in vitro* testování.

V teoretické části byla popsána kardiovaskulární soustava s důrazem kladeným na druhy a histologii cév. Dále byly popsány druhy cévních náhrad, tkáňové inženýrství, elektrostatické zvlákňování se speciálním cylindrickým kolektorem. V neposlední řadě byly studovány možné materiály pro výrobu cévních náhrad. Experimentální část obsahuje výrobu scaffoldů a následné *in vitro* testování. Součástí této pasáže je popis zvlákňovacího zařízení, příprava roztoků, hodnocení a optimalizace vlákenné vrstvy, získané výsledky z buněčného testovaní vlákenné vrstvy a jejich vyhodnocení.

# 2 Teoretická část

Jedna z podmínek výroby vhodného cévního tkáňového nosiče zahrnuje studii cév samotných. Z tohoto důvodu je v teoretické části popsána kardiovaskulární soustava s důrazem kladeným na strukturu biologických cév. Následující kapitoly se zabývají výrobou scaffoldů elektrostatickým zvlákňováním na cylindrický kolektor a možnými materiály pro výrobu cévních náhrad.

#### 2.1 Kardiovaskulární soustava

Ke správné funkci lidského těla slouží kardiovaskulární (oběhová) soustava, která zajišťuje transport látek v těle. Skládá se ze srdce, které má funkci tzv. pumpy a pohání celou soustavu. Dále z krve, která je transportním mediem a cév, které tento transport zajišťují.

#### 2.1.1 Srdce

Srdce je dutý svalový orgán s tvarem připomínající nepravidelný kužel. Je umístěné v dutině hrudní ze 2/3 mezi levou a 1/3 pravou plící a udržuje cirkulaci krve v cévách. Skládá se ze čtyř dutin a to z pravé předsíně, pravé komory, levé předsíně a levé komory. Tyto dutiny jsou v srdci odděleny chlopněmi z důvodu zpětného toku krve. Srdce je okysličováno pomocí věnčitých cév, vycházejících z aorty. Srdeční činnost je rytmická a automatická, řízená impulsy, které vznikají přímo v srdci [1].

#### 2.1.2 Krev

Krev je viskózní, neprůhledná červená tekutina, kolující v krevních cévách. Zajišťuje dopravu látek a živin do tkání, následně také odvádí odpadní látky. Objem krve u dospělého člověka činí asi 5,5 1 [2].

Skládá se z krevní plazmy, jejíž obsah je 55 % z celkového objemu a krevních buněk (červené krvinky, bíle krvinky a krevní destičky). Krevní plazma má transportní funkci, obsahuje více než 90 % vody a 7–8 % proteinů (bílkoviny, glukóza, močoviny, kyselina močová, hormony, enzymy, vitamíny atd.). Červené krvinky (erytrocyty) vznikají z kmenových buněk kostní dřeně. Jsou to bezjaderné elementy, které neprostupují stěnou krevních cév a dožívají se 110–120 dnů. Jejich hlavní funkce je přenos kyslíku. Bíle krvinky (leukocyty) na rozdíl od červených prostupují stěnou cév

a mají jádro. Jsou součástí imunitního systému a plní obranou funkci při infekcích nebo onemocnění, kdy jejich počet stoupá. Krevní destičky (trombocyty) jsou bezjaderná tělíska, která se účastní zástavy krvácení a reparace poškození tkáně [2].

#### 2.1.3 Cévy

Jak již bylo řečeno výše v kapitole 2.1, hlavním úkolem cév je transport krve. Krev opouští levou komoru srdce vždy pouze jedinou aortou (tepnou). Poté se tepna postupně větví a vznikají z ní cévy o menším průměru, až do úrovně arteriol (tepének) o velikosti 20 µm. Na ně navazuje síť kapilár (vlásečnic), ve kterých dochází k výměně látek mezi tkáněmi a krví. Venulami (žilkami) začíná návrat k srdci. Žilky se postupně spojují v silnější žíly, které odvádějí produkty metabolismu směrem k srdci [3].

Všechny cévy mají společné strukturální vlastnosti a jsou tvořeny podle hlavního stavebního plánu. Stěny cév se skládají ze tří hlavních vrstev, které se nazývají tunica intima, tunica media a tunica adventitia. Tyto jednotlivé vrstvy jsou znázorněny na obrázcích 1, 2 a popsány níže. Dle fyziologických podmínek se individuální části cévního systému liší v úpravě jednotlivých vrstev své stěny. V místech, kde je střední vyšší tlak, je vrstva tunica media silnější a bohatší na hladkosvalové buňky a elastická vlákna [3] [4].



Obrázek 1. Jednotlivé vrstvy cévy. Zdroj: http://emergencyus.wikispaces.com/introduction



Obrázek 2. Barvený vzorek řezu cévy v hematoxylinu a eosinu, znázorňující jednotlivé vrstvy. TI – tunica intima, TM – tunica media, TA – tunica adventitia Zdroj: Krajská nemocnice v Liberci

#### Tunica intima

Tunica intima je vnitřní vrstva cév. Obsahuje vrstvu endotelových buněk, které vystýlají vnitřní povrch cév. Tyto buňky jsou uloženy na bazální lamině. Pod endotelem se nachází subendotelová tenká vrstva, která převážně obsahuje extracelulární matrix a téměř žádné buňky [3].

Endotel je jednovrstevný, celistvý povlak bez štěrbin z plochých polygonálních buněk, ležících na bazální rovině. Přes endotel probíhá transport a vylučování látek. Buňky jsou obvykle protažené ve směru toku krve. Jejich ploché jádro je umístěno v centrální oblasti buňky. V okolí jádra se nachází Golgiho aparát, několik mitochondrií, endoplazmatické retikulum a nepříliš ribozomů. Endotelové buňky se řadí mezi dlouho žijící elementy a vykazují jen nízkou mitotickou činnost. Dále mají tyto buňky antitrombogenní účinek. Brání před stykem subendotelové tkáně s krevními destičkami, jejich shlukování a vzniku trombů. Subendotelová vrstva sestává z řídkého kolagenního vaziva a může obsahovat jednotlivé hladkosvalové buňky. Extracelulární matrix subendotelové vrstvy zahrnuje kyselinu hyaluronovou, proteoglykany, kolagenní a elastická vlákna, mikrofibrily a kolagen IV [3] [5].

#### Tunica media

Jako tunica media je označována střední vrstva cév, ve které vynikají veškeré mechanické vlastnosti cév, jako je její pružnost a pevnost. Tato nejmohutnější vrstva je tvořena hladkou svalovinou a extracelulární matrix (proteoglykany, kolagenní a elastická vlákna, kolagen I a III), kterou vytvářejí hladkosvalové buňky. Tyto buňky jsou urovnány do nižších nebo vyšších spirál. Díky kolagenu a elastinu má vrstva dobré mechanické vlastnosti. Elastin zajišťuje pružnost cévy a kolagen její pevnost v tahu. Dále elastická vlákna vytvářejí ve střední vrstvě cév blanky nebo jemné sítě, v nichž jsou vytvořené otvory (membrane fenestratae), které zajišťují prostupnost vyživovací látky do hlubších partií stěny cév. V některých případech se elastické struktury vyskytují na mezích tunica media, tvoří membrana elastica interna a membrana elastica externa a oddělují vrstvy tunica media od tunica intima i od tunica adventitia [3] [5].

#### Tunica adventitia

Vnější vrstva cévy tunica adventitia je tvořena kolagenním vazivem, které ukotvuje cévy do prostředí organismu. V této vrstvě se nacházejí fibroblasty a adipocyty. Zřídka se zde nacházejí i hladkosvalové buňky. Převažují zde podélně orientovaná uspořádaná kolagenní a elastická vlákna. V tunica adventitia je obsažen kolagen typu I [3] [5].

Cévy, které mají průměr větší než 1 mm, mají ve stěnách vyvinutý systém vlastních cév zvané vasa vasorum. Vasa vasorum zásobují metabolity do adventicie a medie. Tyto cévy se častěji vyskytují ve stěnách vén a arterií [3] [5].

V zásadě rozlišujeme tři typy krevních cév: artérie (tepny), vény (žíly) a kapiláry (vlásečnice). Každý z těchto typů má obecnou stavbu cév, popsanou výše. Liší se tedy podle toho, jakou funkci v lidském těle vykonávají.

#### Artérie

Artérie vedou krev směrem od srdce a přivádějí ji do tkání. Ve výchozích úsecích odolávají pravidelným změnám krevního tlaku a v koncových úsecích regulují průtok krve. Vnitřní povrch tvoří jednovrstevný epitel a vnější povrch silná, elastická vazivová tkáň. Artérie dělíme podle velikosti na tři skupiny. Arterioly, artérie malého, středního (svalové) a velkého kalibru (elastické). Arterioly (< 0,5 mm) mají v tunica media 1–5 vrstev hladkosvalových buněk. U artérií malého a středního kalibru (0,5–10 mm) je media tvořena ze 40 vrstev hladkosvalových buněk. U artérie velkého kalibru (> 10 mm) je tunica media tvořena až ze 70 uspořádaných elastických membrán a má silnější vnitřní vrstvu tunica intima než arterie svalového typu [4].

#### Vény

Vény na rozdíl od artérií vedou krev zpět směrem k srdci, z tohoto důvodu mají chlopně, které zpětnému toku krve zabraňují. Od arterií se výrazně liší v tloušť ce střední vrstvy tunica media, neodolávají takovému tlaku jako arterie. Podobně jako u arterií se vény dělí na venuly (0,2–1 mm) a vény malého, středního (1–9 mm) a velkého kalibru [4].



Obrázek 3. Porovnání arterie a vény. Zdroj: http://didsom.webnode.cz/obehova-soustava/

## Kapiláry

Ze všech třech typů krevních cév jsou kapiláry nejtenčí (7–9 μm). Kapiláry, jejichž stěnu tvoří jednovrstevný epitel, umožňují metabolické výměny mezi krví a okolními tkáněmi. Dále propojují arterie a vény, jak je znázorněno na obrázku 3 [4].

# 2.2 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix neboli mimobuněčná hmota je materiál, který se nachází v mezibuněčných prostorech. Extracelulární matrix společně s buňkami tvoří tkáň. Skládá se z vláknitých proteinů (kolagenu), elastinu, kyseliny hyaluronové, glykosaminoglykanů a proteoglykanů. Tato mimobuněčná hmota nejen že drží buňky pospolu, dále podporuje adhezi, proliferaci, diferenciaci, apoptózu buněk a přísun živin. Extracelulární hmota zároveň zajišťuje odolnost proti mechanickému namáhání, zejména elastická vlákna zajišťují odolnost proti namáhání tlaku, kterému je céva vystavena. Jak již bylo popsáno v kapitole 2.1.3, každá ze tří vrstev cév má jiné složení mimobuněčné hmoty [6] [7].



Obrázek 4. Extracelulární matrix vrstvy tunica media [7]

#### 2.3 Cévní náhrady

Cévní náhrady mají sloužit k překonání různých onemocnění a defektů původních cév. Bohužel ne v každém případě lze provést obnovu původní tkáně a tím zajistit potřebnou funkci. Z tohoto důvodu se lékaři a vědci snaží hledat vhodné materiály a náhrady, které budou mít takové vlastnosti, jež budou co nejvíce podobné vlastnostem původních cév. Cévní náhrady můžeme rozdělit na biologické a umělé.

#### 2.3.1 Historie umělých cévních náhrad

U zrodu rekonstrukční cévní chirurgie stál Dr. Charles Claude Guthiere. On a jeho kolega Alexis Carrel se zabývali všemi dostupnými aspekty cévní chirurgie. Za tuto snahu byla Carrelovi udělena vůbec první Nobelova cena za lékařství v roce 1912. Od té doby prošel vývoj cévních náhrad mnoha změnami a inovacemi. Jako první cévní implantáty byly odzkoušeny nepropustné trubice z materiálu jako sklo nebo kov. Tyto materiály se ale setkávaly s neúspěchem, protože v hostiteli byly funkční jen po krátký časový úsek a to především v oblasti průtoku krve. Lépe na tom nebyly ani pokusy s celistvými plastovými náhradami. Velký rozkvět cévní chirurgie byl zaznamenán v roce 1952, kdy Vooheerses a kolektiv zavedli porózní textilní náhradu Vinion – N, což je směs vinylchloridu a akrylonitrilu. Ovšem v případě, kdy byla tato cévní náhrada implantována na dolní končetinu, došlo k selhání z důvodu pevnosti v tahu a pacient zemřel do 30 minut po implantaci [8]. Další produkty, které selhaly v důsledku svých mechanických vlastností, zejména v pevnosti tahu, byly Valon (vinylchlorid), Fortisan (regenerovaná celulóza), nylonové a polyakrylonitrilové náhrady. V roce 1954 byl objeven materiál PTFE (polytetrafluorethylen) neboli teflon ve formě multifilamentních vláken. Společně s polyesterem nedegenerovaly po implantaci a začaly se používat jako primární materiály pro kardiovaskulární náhrady [9] [8].

### 2.3.2 Biologické náhrady

Tyto cévní náhrady bývají vhodným východiskem pro vyřešení cévního defektu. Mezi typy biologických cévních náhrad řadíme autotransplantáty, alotransplantáty a xenotrasplantáty. Za autotransplantáty označujeme cévy pocházející z vlastního organismu. Alotransplantáty pocházejí ze stejného živočišného druhu a xenotrasplantáty z jiného živočišného druhu. Z těchto tří náhrad se nejvíce používají autotransplantáty, z důvodu větší pravděpodobnosti přijmutí náhrady organismem [10].

#### Tepenné autotransplantáty

První tepenný autotransplantát byl použit v roce 1896 Jaboulayem a Briaou, kteří byli následováni ostatními chirurgy. Bylo zjištěno, že při šetrném odběru a implantaci se náhrada chová jako původní tepna a histologicky se po přechodném zesílení intimy postupně sama přizpůsobí [10].

Největším problémem je ovšem jejich získávání v potřebných rozměrech. Kterékoli větší tepny jsou významné pro zásobovaný orgán a nelze je bez následku odebrat. Bylo navrženo několik postupů, jak rozšířit či prodloužit tenké nebo krátké tepny, ale tyto postupy se neosvědčily. Dále je nutno brát v úvahu, že většina cévních transplantací se provádí z důvodu aterosklerotického tepenného postižení, které není otázkou jednoho tepenného úseku, ale celkového tepenného postižení. V dnešní době jsou tepenné autotransplantáty rovnocenně zastoupeny autotransplantáty žilními [10].

#### Žilní autotransplantáty

V roce 1951 Kunlin ukázal, že pro řadu tepenných rekonstrukcí je vyhovující autologní žilní náhrada. Bohužel vztah chirurgů v této době byl k jeho názoru velice odtažitý a nadále se preferovaly tepenné alotransplantáty. V průběhu let se vzrůstajícím počtem komplikací tepenných alotransplantátů se začaly více používat žilní autotransplantáty [10].

Pro transplantaci je výhradně užívaná žíla vena saphema magna, popřípadě vena saphema parva. Tyto žíly jsou velice dobře přístupné, protože se nacházejí v podkoží. Odebírají se pouze zdravé žíly nebo zdravé úseky [10].

Při změně tlaku v žilních autotransplantátech dochází k histologickým a mechanickým změnám. Postupně se adaptují na nové fyzikální poměry a dochází k jejich rozšíření. Žilní autotransplantáty mají své výhody a nevýhody. K výhodám patří vynikající chirurgické vlastnosti, jako je vláčnost a přilnavost, což umožňuje velice dobré provedení anastomózy. Dále mají nulovou implantační porozitu. Mezi nevýhody patří fakt, že téměř 30 % nemocných má velkou i malou safénu příliš tenkou nebo znehodnocenou, například trombózou. Dále se k nevýhodám řadí časově náročná

příprava štěpu a dlouhodobý malý příčný odpor proti vysokému tepennému tlaku, který omezuje použití této náhrady pouze na některé oblasti [10].

## 2.3.3 Umělé náhrady

Umělé cévní náhrady se vyrábějí všemi textilními postupy, jako je tkaní, pletení a netkaná cesta. Již zvolení dané metody ovlivňuje výsledné vlastnosti, ty jsou však dále ještě ovlivněny použitým materiálem a přízí nebo určitou konečnou úpravou. V dnešní době je výroba za pomocí tkaní na ústupu a používají se spíše pletené cévní náhrady a cévní náhrady vyrobené za pomocí extruze (lité). Cévní náhrady jsou hojně používány. Problém nastává v případě, kdy pacient potřebuje nízkoprůměrovou (< 6 mm) náhradu. Náhrady těchto malých průměrů se nevyrábějí, protože se setkávají s neúspěchem po transplantaci například v podobě trombotických komplikací a ne vždy se může využít možnost žilních autotransplantátů z důvodů popsaných výše v kapitole 2.2.2 [8] [10].



Obrázek 5. Cévní implantát v lidském těle. Zdroj: http://www.goremedical.com/propaten/

### Tkané cévní náhrady

Náhrady vyráběné tkaním jsou soustavou navzájem kolmých nití, které se kříží ve vazných bodech, kde dochází ke vzájemnému tření nití a tím u takto vyrobených náhrad roste jejich ohybová tuhost. To také závisí na volbě vazby, v jaké je textilie utkána a dále na typu použité příze. Za hlavní výhodu se považuje možnost jemného odstupňování hustoty tkaniny a možnost hustého úpletu. To znamená, že tkané náhrady jsou minimálně prodyšné a nedochází ke krvácení stěnou. Nevýhodou je třepení okrajů

cévní náhrady při přestřižení, zvláště pak při šikmém přestřižení. K výrobě těchto náhrad se používají teflonová vlákna [8] [10].

#### Pletené cévní náhrady

V případě pletených náhrad je céva tvořena navzájem propojenými očky z jedné soustavy nití a tvoří tak souvislou strukturu. Výsledná textilie je oproti tkané vysoce porézní, s menší tahovou pevností, ale vyšší tažností. Nejčastěji používanými vazbami je oboulícní pletenina nebo trikot. Z důvodu velké pórovitosti je nutné takto vyrobené cévy před implantací předsrážet pacientovou vlastní krví, aby došlo ke snížení průsaku a byla dočasně zrušena porozita stěny. V dnešní době je technika předsrážení nahrazena za impregnaci kolagenem nebo jinou biologickou látkou. U pletených protéz nedochází ke třepení konců ani při šikmém přestřižení náhrady, a proto se lépe spojují s biologickou cévou, než jak je tomu u tkaných náhrad. K výrobě pletených cévních náhrad se používají polyesterová vlákna [8] [10].

#### Lité cévní náhrady

Lité cévní náhrady patří do způsobu výroby netextilní cestou. Tento způsob výroby zahrnuje přípravu polytetrafluoretylenové (PTFE) pasty, která je po dalších úpravách protlačována přes vytlačovací hubici. Ta určí průměr cévní náhrady a jádro v ní poté určí tloušťku stěny cévy. Samotný proces lze přirovnat k výrobě syntetických dutých vláken pouze s tím rozdílem, že vytlačovací hubice je větších rozměrů. Vytlačený polotovar je ještě dále upravován. Musí se odstranit alkohol, který byl použit k výrobě PTFE pasty a v dalším kroku náhrada prochází procesem slinutí, kde dostává potřebné výsledné vlastnosti. Výsledná náhrada má mikroporézní strukturu houbovitého charakteru. Mikropóry nejsou celou vrstvou propojeny. Pokud není náhrada druhotně upravena, objevuje se po obnovení krevního proudu v otvorech podél stehu krvácení. Tento problém se do jisté míry může vyřešit použitím speciálního šicího materiálu [8] [10].

#### Konečné úpravy

Jak již bylo zmíněno výše, dopad na výsledné vlastnosti mají i konečné úpravy náhrad. Mezi nejčastější úpravy patří vrapování, nanášení kolagenu, povrstvení stříbrem, cévy s heparinem nebo cévy s výztuhou [8]. *Vrapování* – Používá se především u pletených náhrad. Vrapování zde zajišťuje, aby kvůli vysoké tažnosti nedocházelo ke zmenšení průřezu a tím k omezení průtoku krve [8].

*Povrstvení stříbrem* – Stříbro má výborné antibakteriální účinky a to již ve stopovém množství. U náhrad se nanese na povrch vláken vhodná sůl stříbra, čímž se snižuje počet výskytu infekce [8].

*Cévy s heparinem* – Cílem je snížit trombogenicitu a zároveň zlepšit funkčnost náhrady a klinické výsledky. Použití heparinu zvyšuje propustnost, zamezuje krvácení z otvorů po šití a jsou výborně přijímány pacientem [8].

*Cévy s výztuhou* – Výztuha snižuje riziko snížení průtoku krve v důsledku zploštění při ohybu nebo stlačením okolních tkání [8].



Obrázek 6. Nevrapovaná cévní náhrada [10]

Obrázek 7. Vrapovaná cévní náhrada [10]

Pokud budeme uvažovat výrobu nanovlákenných cévních náhrad, můžeme použít metodu výroby pomocí elektrostatického zvlákňování, a proto bude dále podrobněji popsána v následující kapitole.

# 2.4 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování neboli electrospinning je jedna z nejrozšířenějších metod, jak připravit nanovlákna. Pomocí této technologie je možné vyrobit vhodné vlákenné a nanovlákenné materiály pro tkáňové inženýrství, ve kterém může například nahradit extracelulární matrix. O nanovláknech můžeme hovořit v případě, že jejich průměr je menší než 1 µm. Pomocí metody elektrostatického zvlákňování můžeme připravit vlákna o průměru 50–900 nm, ale při vytvoření určitých podmínek

zvlákňování, zejména vhodné volbě páru polymer/rozpouštědlo, je možné vytvořit i vlákna silnější a to mezi 1–3  $\mu$ m. Electrospinning je v dnešní době využíván i pro průmyslovou výrobu vysoce účinných filtrů a v menším měřítku pro výrobu kompozitů a membrán. Zmiňovaná technologie, která spočívá v samoorganizaci polymerního roztoku do formy vláken pouze s pomocí elektrostatického pole, sahá až do roku 1934, kdy Formhals publikoval několik patentů na výrobu polymerních vláken [8] [11] [12].

Elektrostatické zvlákňování popsal prof. Lukáš takto: "Z fyzikálního hlediska se elektrostatické zvlákňování podobá stromu neobvyklého tvaru. Vyrůstá z ,kořenů v tenké povrchové vrstvě polymerního roztoku (sloužící jako jedna ze dvojice elektrod) a pokračuje ,kmenem představovaným stabilní části proudu polymeru. Následující bičující zóna proudu polymeru vytváří jednotlivé ,větve tohoto stromu. Jeho plody, tedy nanovlákna, jsou zachytávána na druhé z elektrod spojené se zdrojem vysokého napětí" [11].

Na obrázku 8 je znázorněn princip jehlového elektrostatického zvlákňování. Na pumpě vytlačující dané množství roztoku polymeru je injekční stříkačka s jehlou, která je připojena ke zdroji vysokého napětí. Naproti jehle se nachází kolektor, který uzemněný nebo k němu může připojeno může být být opačné napětí. Proces zvlákňování začíná tak, že při spuštění vysokého napětí se kapka polymeru z injekční stříkačky přeformuje do tvaru Taylorova kužele, z jehož vrcholu vytryskne proud polymeru, tento kužel se hned po vytrysknutí polymeru rozpadne. Mezi jehlou a kolektorem dochází k odpařování rozpouštědla z roztoku polymeru a vzniklá vlákna dopadají na kolektor, kde vytvoří vlákennou vrstvu.



Obrázek 8. Elektrostatické zvlákňování na plochý kolektor [12]

Elektrostatické zvlákňování může být ovlivněno celou řadou faktorů, mezi které patří okolní teplota a vlhkost prostředí, vzdálenost elektrod, použitá hodnota napětí, vodivost a povrchové napětí polymerního roztoku a další. Tyto faktory mohou uživateli umožnit různé modifikace vlákenné vrstvy [8]. Více o elektrostatickém zvlákňování píše Lukáš a kol. v publikaci Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century).

#### 2.4.1 Speciální kolektor

Pokud chceme vytvořit tubulární scaffold (tkáňový nosič) ve tvaru cévy za pomocí elektrostatického zvlákňování, musíme k tomu použít vodivý kolektor válcového tvaru o průměru požadovaného průsvitu tkáňového nosiče. První, kdo použil metodu elektrostatického zvlákňování na válcový kolektor, byl již zmiňovaný Formhals v roce 1934, ovšem v té době nenašel tento způsob průmyslové uplatnění [11].

Mimoto, že válcový kolektor je schopný vytvořit tvar cévní náhrady, může též poskytnout námi požadovanou orientaci vláken. Vlákno se při zvlákňování přichytí na válcovém kolektoru a dojde k navíjení vlákna na tento kolektor, zároveň může docházet k prodloužení tažením. Proces takového způsobu zvlákňování je znázorněn na obrázku 9.



Obrázek 9. Elektrostatické zvlákňování na rotující válcový kolektor. Zdroj: <u>http://m.iopscience.iop.org/1748-605X/8/1/014102/article</u>

Kolem roku 2004 připravil Xu a kolektiv tkáňový nosič se zarovnanými vlákny pomocí elektrostatického zvlákňování na rotující disk o průměru 200 mm. Ke zvlákňování byl použit 5% roztok kopolymeru kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu P(LLA – CL) (75:25) v acetonu při rychlosti otáčení kolektoru 11 m/s. Následně byly na vzorky tkáňového nosiče nasazeny hladkosvalové buňky. Bylo zjištěno, že buňky proliferují podél vláken. Tyto výsledky jsou příhodné z důvodů orientace hladkosvalových buněk i v původní biologické tkáni ve vrstvě tunica media [13].



Obrázek 10. Snímky z elektronového mikroskopu po kultivaci hladkosvalových buněk na scaffold po 3 dnech (a) kultivace a po 7 dnech (b) kultivace [13]

Pouze orientaci vláken na rotujícím kolektoru zkoumali Edwards a kolektiv v roce 2010 [14], kteří zvlákňovali 30% polykaprolakton v dichlorethanu na válcový kolektor o průměru 3,2 cm a při různých rychlostech otáčení kolektoru hodnotili uspořádání vláken. Zjistili, že vlákna dosahují určité orientace při rychlosti 2,5 m/s. Pokud byla rychlost otáčení kolektoru menší, byla vlákna neuspořádaná, naopak při překročení rychlosti nad 5 m/s docházelo k trhání vláken [14].

Další, kteří se zajímali o orientaci vláken na rotujícím kolektoru, byli Hu a kol. v roce 2012 [15]. Pro svůj výzkum použili 13% roztok polykaprolaktonu v dichlormethanu a N,N – dimethylformamidu v poměru 8:2. Hu zjistil, že zvlákněná nanovlákna na tyčku o průměru 3 mm dosahují největší orientace při obvodové rychlosti 10,7 m/s, jak je znázorněno na obrázku 11. Dále byl také zkoumán vliv uspořádanosti vláken na nasazené myší 3T3 fibroblasty. Fibroblasty se přichytávaly podél vláken (obrázek 12) a vytvářely tak pravidelnou strukturu. Studie tedy prokázala, že orientace vláken má značný vliv na orientaci buněk. Dále ve své studii poukazuje na to, že průměr vláken, orientace a pórovitost záleží na vzdálenosti jehly (elektrody) od kolektoru, rychlosti otáčení kolektoru a rychlosti dávkování roztoku [15].



Obrázek 11. Zarovnání vláken v závislosti na rychlosti otáčení válcového kolektoru [15]



Obrázek 12. Myší 3T3 fibroblast zachycený podél vlákna [15]

#### 2.5 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je obor využívající znalostí inženýrství a přírodních věd, jehož cílem je oprava, vývoj tkání nebo plně funkčních biologických náhrad za použití buněk a vhodných biomateriálů. Tento obor pomáhá řešit krizové problémy s nedostatkem dárců tkání a orgánů. Tkáňové inženýrství je stále rozvíjejícím se oborem a má do budoucna velký potenciál v oblasti regenerační medicíny [16].

Princip tkáňového inženýrství je znázorněn na obrázku 13. V první řadě se izolují vhodné buňky. Kultivace buněk s vhodným mediem probíhá v kultivačních lahvičkách, kde se buňky množí a rostou. V momentě, kdy buňky dosáhnou

požadovaného množství, nasadí se na předem vytvořený scaffold, který má požadovaný tvar a vlastnosti. Na scaffoldu by mělo dojít k buněčné adhezi a proliferaci. Po určité kultivační době se tkáňový nosič implantuje na postižené místo do těla pacienta. Tímto způsobem se může vytvořit například náhrada chrupavky, kosti a námi požadované cévy.



Obrázek 13. Princip tkáňového inženýrství. 1) Odběr buněk. 2) Kultivace buněk. 3) Nanesení buněk na scaffold. 4) Kultivace buněk na scaffoldu. 5) Implantace do těla pacienta. Zdroj: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/web/index.php?option=com\_docman&task=doc\_download&gid=256&Itemid=36

V případě cévních náhrad se buňky nasadí na připravený trojrozměrný scaffold vyrobený z biologicky degradabilního polymeru. Předpokládá se, že buňky vyprodukují vlastní extracelulární matrix během degradace scaffoldu. Tímto si buňky vytvářejí novou tkáň [17]. Trendem poslední doby je přímá implantace neosazeného scaffoldu do těla pacienta, kde buňky přímo adherují na scaffold a odpadají tak předchozí popsané kroky.

#### 2.5.1 Scaffold

U tkáňových nosičů (scaffoldů) je kladen důraz na mnoho vlastností. Do těchto vlastností se řadí vysoká porozita, interkonektivita pórů, dobré mechanické vlastnosti a sterilizovatelnost tkáňového nosiče. Tyto vlastnosti musí jít zároveň ruku v ruce s biokompatibilitou a vhodnou dobou biodegradability scaffoldu [16].

Ve své podstatě scaffold nahrazuje mimobuněčnou hmotu, která má svůj tvar, strukturu a vlastnosti dané dle toho, jakou tkáň nebo orgán nahrazuje. Pokud je takovýto scaffold co nejvíce podobný původní tkáni, může zajistit pro buňky již zmiňovanou dobrou adhezi, proliferaci a přísun látek. Z tohoto důvodu jsou i odlišné požadavky na jeho výrobu. Tkáňové nosiče můžeme rozdělit na vlákenné a nevlákenné. Pro výrobu vlákenných nosičů se mohou využívat všechny textilní procesy jako tkaní, pletení, výroba netkaných textilií mokrou i suchou cestou, kompozitní materiály a další. Pro výrobu nevlákenných nosičů se využívají takové metody, jako je vymývání částic, solvent casting, rapid prototyping, výroba hydrogelu, zpěňování mechanické a plynem, lyofilizace (sušení za mrazu) a separace fází, v některých případech jejich kombinace. Více o těchto metodách výroby nevlákenných nosičů je napsáno v knize od Roberta P. Lanza a spol. *Principles of tissue engineering* [16].

Anthony Ratcliffe ve svém článku *Tissue engeneering of vascular grafts* zmínil obrovskou budoucnost pro tkáňové nosiče cévních náhrad, pokud budou mít tyto náhrady vhodné mechanické vlastnosti [18].

### 2.6 Buněčné testování

Nedílnou součástí výzkumů tkáňového inženýrství je in vitro testování. Pomocí buněčného testování můžeme zjistit cytotoxicitu scaffoldu. Zejména se zjišťuje buněčná adheze, viabilita, proliferace, diferenciace, migrace a další. Dále budou v podkapitolách popsány pouze metody testovaní pomocí MTT testu, elektronová a fluorescenční mikroskopie, které jsou využívány v experimentální práci.

#### 2.6.1 MTT test

MTT test se používá pro určování viability buněk. Metoda je založena na redukci žlutého MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný fialový formazan. Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Po přidání isopropanolu (okyselený HCl) se formazan rozpustí a vzniklé fialové zabarvení se vyhodnocuje spektofometricky při vlnové délce 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm). Výsledná hodnota absorbance roztoku odpovídá metabolické aktivitě živých buněk. Platí čím vyšší naměřená absorbance, tím více živých buněk [19].

#### 2.6.2 Elektronový mikroskop

Pomocí elektronového mikroskopu můžeme pozorovat adhezi buněk na vlákenné struktuře scaffoldu, nejlépe v porovnání s původním nosičem bez buněk. Ve své podstatě je elektronový mikroskop obdobou optického mikroskopu. Místo světelného svazku využívá elektrony urychlené elektrickým polem a místo skleněných čoček jsou použity elektromagnetické čočky. Pozorovaný objekt musí být umístěn ve vakuu, aby nedocházelo k interakcím elektronů s atmosférou, která by ovlivňovala dráhu letících elektronů. Největším rozdílem oproti světelným mikroskopům je jejich veliká rozlišovací schopnost, může tak dosáhnout mnohem většího zvětšení a to až 1 000 000×. Podle pozorování objektu se elektronové mikroskopy dělí na rastrovací elektronové mikroskopy (SEM), které umožňují sledovaní povrchu objektu a transmisní elektronové mikroskopy (TEM), které mohou analyzovat vnitřní strukturu vzorku [20].

#### 2.6.3 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie se používá při studiu adheze a proliferace buněk. Zobrazuje jiný pohled než elektronový mikroskop, který umožňuje pozorovat buňky společně s vlákennou strukturou. Tato mikroskopie je jedna z nejpoužívanějších pro zviditelnění určité látky a struktury v buňce. Základem je fluorescenční barvivo (fluorofor, fluorochrom), což je látka schopná, po ozáření světlem určité vlnové délky, absorbovat energii a uvolňovat energii, která se projeví jako světlo o delší vlnové délce. Struktury, které obsahují fluorochromy září v obraze mikroskopu v různých barvách na temném pozadí [21].

## 2.7 Materiály pro výrobu cévní náhrady

Všeobecně materiály pro výrobu tkáňového nosiče musí splňovat širokou škálu nároků, které jsou na ně kladeny. Mezi tyto látky patří zejména přírodní a syntetické polymery nebo jejich kombinace. I když je na trhu celá řada polymerů, ne každý polymer je vhodný pro určitý typ scaffoldu.

Chceme-li uvažovat o vhodných materiálech tkáňového nosiče pro výrobu cévní náhrady, musíme zohlednit několik důležitých vlastností, které by měla látka splňovat. Mezi tyto vlastnosti se samozřejmě řadí biokompatibilita, což znamená, že v daném místě nesmí být toxický vůči organismu a nevyvolávat zánětlivou reakci. Dále biodegradabilita, která určuje rychlost rozpadu tkáňového nosiče. Jak je již popsáno v kapitole 2.4, při tomto rozpadu si buňky tkáňový nosič nahrazují vlastní mezibuněčnou hmotu a rozpadové produkty jsou z těla vyloučeny. V tomto případě je obzvlášť důležitá právě jeho biokompatibilita. Zároveň musí umožnit interakci buněk, jako je adheze, proliferace, diferenciace a produkci extracelulární hmoty [22].

Kromě toho by také materiál měl splňovat mechanické vlastnosti dané tkáně. V případě cévních náhrad to jsou zejména mechanické vlastnosti, které již byly zmíněny jak u biologických cév, tak u cévních umělých náhrad. Mezi ně zejména patří pevnost v tahu a tlaku, které dodávají tkáňovému nosiči cévních náhrad jeho pružnost a pevnost. Těchto vlastností je zapotřebí nejen pro funkčnost náhrady, ale také při její implantaci.

#### 2.7.1 Přírodní polymery

V této kapitole jsou popsány biodegradabilní a biokompatibilní přírodní polymery, které byly použity v různých experimentech při vývoji cévní náhrady. Tyto polymery jsou a mohou být samozřejmě aplikovány i v jiných odvětvích tkáňového inženýrství, vyskytují se i jako součást biologických tkání. V případě cév se jedná hlavně o kolagen a elastin.

#### Kolagen

Kolagen je hlavní složka extracelulární matrix pojivové tkáně. Jedná se o nerozpustný skleroprotein, zajišťuje celistvost a pevnost tkání, ve kterých je obsažen. Je to jeden z nejvíce se vyskytujících proteinů v živých organismech. V těle savců tvoří 25–30 % všech proteinů. Kolagen je obsažen v chrupavkách, kloubech, kostech, kůžích, cévách atd. Zároveň je to velmi trombogenní materiál, ze kterého by nebylo vhodné vyrábět vnitřní vrstvu cév. V současné době je známo nejméně 27 typů kolagenů, ale 80–90 % kolagenu v lidském těle se skládá z typů I, II a III. Skládá se z řetězců alfa 1 a alfa 2, které se málo liší pořadím aminokyselin. Tyto řetězce tvoří trojitou spirálu, která se nazývá tropokolagen a je základní jednotkou kolagenu. Pomocí hydrolýzy lze z kolagenu získat želatinu. Vařením se kolagen přeměňuje na glutin, což je látka s rosolovací schopností a důležitá složka želatiny [23] [16].

Kolagen typu I, II, III a IV je obsažen v jednotlivých vrstvách cév, jak již bylo popsáno v kapitole 2.1.3.

K přípravě kolagenních vláken pomocí elektrostatického zvlákňování se používá lyofilizovaného kolagenu v 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-olu, 2,2,2roztok trifluorethanolu 1,1,1,3,3,3-hexaflouropropan-2-onu. nebo Nevýhoda těchto rozpouštědel je v jejich ceně a ekologické šetrnosti. Bohužel při použití jiných rozpouštědel dochází k porušení kolagenní struktury a tím pádem ke ztrátě jeho vlastností, jako je například jeho nerozpustnost ve vodném prostředí a mechanická pevnost. Tato fakta komplikují přípravu nanovláken z kolagenu v laboratorním prostředí a zároveň zavrhují jejich případnou průmyslovou výrobu. Řešením by byla příprava směsných vláken, kde by kolagen zastupoval sekundární složku a primární složkou by byl jiný, lépe zvláknitelný, polymer [24].

#### Elastin

Elastin je téměř nerozpustný protein vyskytující se v mimobuněčné hmotě společně s kolagenem. Má elastické schopnosti, díky nimž pomáhá navrátit tkáň do původního tvaru. Z důvodu jeho nerozpustnosti se používá jeho forma alfa – elastin, eventuálně tropoelastin, což jsou bílkoviny tvořící elastin. Použití tropoelastinu v tkáňových náhradách s malým průsvitem může být velice přínosné z hlediska jeho elestatických vlastností, které studoval Li a kolektiv [25]. Elastin je považován za netrombogenní materiál a lze ho, na rozdíl od kolagenu, použít pro výrobu vnitřní vrstvy tunica intima.

Li a kol. v roce 2005 [25] ve svém článku popisují, že tropoelastinu má po zvláknění velice dobré mechanické vlastnosti. Je pružnější než alfa – elastin, želatina a kolagen. Porovnání těchto elastických vlastností dokazuje, že tropoelastin je nejvhodnější pro výrobu tkáňového nosiče [25].

#### 2.7.2 Syntetické polymery

Na syntetické polymery jsou kladeny podobné nároky jako na přírodní polymery. Výhoda syntetických polymerů spočívá ve snadnějším zpracování a lepší skladovatelnosti, než je tomu u polymerů přírodních. Scaffoldy mohou být vyrobeny s požadovanými vlastnostmi, jako je například reprodukovatelnost díky zachování molekulové hmotnosti v jednotlivých šaržích. K syntetickým materiálům patří například kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymléčná (PLA), polykaprolakton (PCL) a další, o kterých se zmiňují například Lanza a Langer ve své knize *Principles of tissue engineering* [16].

#### Kyselina polyglykolová (PGA)

Kyselina polyglykolová je tuhý termoplastický materiál s vysokou krystalinitou 46–50 %, skelným přechodem pohybujícím se okolo 35–40 °C a teplotou tání okolo 230 °C. PGA je biodegradabilní polymer a může být využíván v medicínských aplikacích. Produktem degradace je kyselina glykolová, což je přirozený metabolit, to ovšem nemusí být výhodou, protože při vyšších koncentracích může dojít k okyselení a k poškození tkáně. Konečnými rozpadovými produkty PGA je oxid uhličitý a voda. Tyto složky poté tělo vyloučí přes dýchací systém či močí. Kyselina polyglykolová se může zpracovávat výrobou extruze, vstřikováním, lisováním, avšak je vysoce citlivá na hydrolytickou degradaci, proto by se měly pečlivě kontrolovat a řídit výrobní podmínky [16].

#### Kyselina polymléčná (PLA)

Jelikož má molekula kyseliny mléčné chirální centrum, vyskytuje se ve dvou izomerních formách d (-), l (+) a v racemiské směsi (d, l). Polymery z této sloučeniny jsou obvykle označovány právě pomocí jejich chirality. U tohoto polymeru se teplota skelného přechodu pohybuje mezi 60–65 °C a teplota tání kolem 155 °C. PLA je více hydrofobní než PGA a zároveň tak odolnější při styku s vodou, než je tomu u PGA. Podobně, jako tomu je u kyseliny polyglykolové, tak i u kyseliny polymléčné

je produktem degradace kyselina mléčná, která se běžně nachází v lidském organismu a je vylučována ve formě vody a oxidu uhličitého [16].

#### **Polykaprolakton (PCL)**

Polykaprolakton je v dnešní době jeden z nejpoužívanějších syntetických polymerů v oboru tkáňového inženýrství. Jedná se o semikrystalitický polymer s teplotou skelného přechodu přibližně okolo –60 °C. Polykaprolakton se vyznačuje nízkou teplotou tání a to kolem 60 °C, což není vhodné pro všechny sterilizační metody (může tak dojít ke znehodnocení povrchu tkáňového nosiče). Původně bylo PCL zkoumáno jako možný biomateriál. Bylo zjištěno, že tento materiál degraduje za pomocí mikroorganismů a byl vyhodnocen jako biodegradabilní pro obalové materiály. Později bylo zjištěno, že degradace polykaprolaktonu probíhá jak hydrolytickou, tak i enzymatickou degradací v lidském těle. Rychlost degradace tohoto materiálů je výrazně menší, než tomu je u PLA, a proto se s oblibou využívá na dlouhotrvající tkáňové nosiče buněk či aditiv v podobě léků. Jako ostatní polymery, tak i polykaprolakton může být kombinován s dalšími polymery. Vznikem takového kopolymeru je možno ovlivnit jeho degradaci [16].

Milleret a kolektiv v roce 2012 [26] ke svému výzkumu na téma *Vliv průměru vláken povrchu cévní náhrady na krevní činnost* využili kopolymeru kyseliny glykolové a mléčné PLGA v porovnání s DP (polyester-uretan) ve dvou koncentracích (15% a 25%). DP byl rozpuštěn v hexafluorpropylenu a chloroformu v poměru 25:75. Naopak PLGA pouze v chloroformu. V obou koncentracích byla naměřena vlákna s menším průměrem u roztoku s PLGA. Vlákna pod 1 µm byla naměřena z výsledků 15% koncentrace jak v případě PLGA, tak i DP. Studie prokázala, že u vláken s průměrem pod 1 µm nevzniká tolik trombů, jako tomu je u vláken s průměrem nad 1 µm. Tato studie poukazuje na to, že z tohoto důvodu by první vrstva tkáňového nosiče měla být s co nejmenším průměrem vláken [26].

Kopolymer kyseliny mléčné a polykaprolaktonu P(LLA – CL) (70:30) využil ve své práci Dong a kolektiv v roce 2008 [27]. Zabývali se dlouhodobou viabilitou hladkosvalových buněk prasat na nanovlákenném nosiči po dobu 105 dnů. Výsledky ukázaly, že buňky rostly velice dobře a výrazně nezvýšily rychlost degradace kopolymeru. Dále byla dokázána produkce extracelulární matrix buňkami [27].



*Obrázek 14. Kultivace hladkosvalových buněk po (A) 5, (B) 17, (C) 70 a (D) 105 dnech na nanovlákenném nosiči* [27]

Cottam a kolektiv v roce 2009 [28] provedli studii zaměřenou na sterilizaci polykaprolaktonu pomocí gama záření. Bylo zjištěno, že sterilizace gama zářením nemá nepříznivý vliv na povrchové vlastnosti tkáňového nosiče a že nemá vliv na adhezi ani proliferaci buněk. Buňky se chovaly stejně, jako by byl tkáňový nosič sterilizován v laboratoři, například za pomocí ethanolu. Dále bylo zjištěno výrazné snížení rychlosti degradace polykaprolaktonu po účinku sterilizace gama zářením [28].

Kombinaci syntetického polymeru PCL a přírodního kolagenu (1:1) zkoumali Tillman a kolektiv v roce 2009 [29]. Ve své práci se zabývali stabilitou in vivo zvlákněného cévního tkáňového nosiče. Podrobněji zjišťovali mechanické vlastnosti a chování buněk po měsíci v králičím organismu. Kolagen typu I byl použit z telecí kůže, endotelové a hladkosvalové buňky pak z ovce. Tyto buňky byly nasazené na scaffold a 5 dní kultivovány za pomocí bioreaktoru. Bylo zjištěno, že kombinace materiálu polykaprolakton/kolagen podporuje adhezi a proliferaci jak endotelotelových, tak i hladkosvalových buněk. Dále se prokázala vyšší pevnost v tahu před implantací než u biologické králičí tepny. Po měsíci v králičím organismu tato pevnost klesla až pod pevnost normální králičí tepny. Na konci tohoto výzkumu zůstala céva průchozí a celistvá, což je důkazem toho, že i když pevnost po implantaci klesla, stále byla dostatečná, aby vydržela tlak, který na ni působil v organismu [29].

Ju a kolektiv roku 2009 [30] využili ve své práci PCL a kolagen I 1:1. Práce byla založena na přípravě dvouvrstvého tkáňového nosiče. Bylo zjištěno, že hladkosvalové buňky lépe proliferují na scaffold s většími póry a většími průměry vláken. Naopak vlákna malého průměru svědčí endotelovým buňkám a podporují jejich růst a adhezi. Aby bylo vyhověno oběma typům buněk, byl vytvořen dvouvrstvý tkáňový nosič, který měl vnitřní stěnu s vlákny o průměru 0,27 µm a vnější stěnu s vlákny o průměru 4,45 µm. Výsledky ukázaly, že takto vyrobený tkáňový nosič vyhovuje oběma typům buněk, podporuje požadovanou adhezi a proliferaci, je biokompatibilní, biodegradabilní s dobrými mechanickými vlastnostmi [30].



Obrázek 15. Snímky z fluorescenčního mikroskopu. (A) Endotelové buňky na vnitřní straně scaffoldu (označeny zeleně) a (B) hladkosvalové buňky na vnější straně scaffoldu (označeny červeně). Modře odbarvena buněčná jádra (DAPI). Čára stupnice značí 500µm (zvětšení 100×) [**30**]

Další práci, která byla tentokrát zaměřena na strukturu povrchu tkáňového nosiče a proliferaci krysích endotelových buněk provedl Xiang a kol. roku 2011 [31]. Xiang mezi sebou porovnával vlákenný nosič pouze z polykaprolaktonu (PCL), z kombinace pavoučího hedvábí (pNSR32)/PCL v poměru 5:95 a kombinace pNSR32/PCL/ želatina (Gt) v poměru 5:85:10. Ze strukturálního hlediska byla hodnocena porozita a tloušťka vlákna. Tkáňový nosič pNSR32/PCL/Gt měl větší porozitu (86 %) než nosič z kombinace pavoučích pNSR32/PCL a samotného PCL, které měly porozitu shodnou (82 %). Tento nosič měl zároveň i vlákna o větším průměru (116 nm) než scaffoldy z pNSR32/PCL (113 nm) a samostatného PCL (111 nm). Dále byla dokázána i větší proliferace endotelových buněk na scaffoldu ze všech

zmíněných složek použitých materiálů. Otázkou jsou však mechanické vlastnosti tkáňového nosiče, které nebyly zjišťovány [31].



*Obrázek 16. Snímky řezů tkáňových nosičů po 7 dnech kultivace krysích endotelových buněk (400×): (A) PCL, (B) pNSR32/PCL, (C) pNSR32/PCL/Gt* **[31]** 

# 3 Experimentální část

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit tkáňový nosič cévní náhrady skládající se ze dvou vrstev simulujících vrstvu tunica intima a tunica media pomocí elektrostatického zvlákňování na kolektor v podobě rotující tyčky. Tato výroba probíhala za předpokladu, že pro vytvoření náhrady vnitřní vrstvy je potřebná tvorba bazální laminy, na které porostou endotelové buňky. Tato bazální lamina by měla být tenká, neorientovaná vlákenná vrstva s malými póry a vlákny o malém průměru, z důvodu dobré adheze endotelových buněk, které rostou ve směru toku media (krve). Dále by neorientovaná vlákenná vrstva měla zamezit prorůstání hladkosvalových buněk vnitřní vrstvy. Ve vrstvě nahrazující střední vrstvu je naopak potřebná orientace vláken s většími póry pro hladkosvalové buňky. Následně byla nanovlákenná vrstva podrobena in vitro buněčnému testování.

#### 3.1 Materiál

Ke zvlákňování byl použit syntetický polymer polykaprolakt (Sigma – Aldrich, Mn = 45000) rozpuštěný v chloroformu (Penta), ethanolu (Penta) a kyselině octové (Penta).

$$\overset{O}{\underset{\scriptstyle ||}{+}C-(CH_2)_5-O]_{\overline{n}}}$$

Obrázek 17. Polykaprolakton [16]

Jak již bylo řečeno v úvodu experimentální části, pro náhradu bazální laminy jsou důležitá vlákna s malým průměrem. Kvůli této skutečnosti musela být nalezena správná koncentrace roztoku polykaprolaktonu s vhodným rozpouštěcím systémem. Zvlákněné byly tři koncentrace PCL (16%, 17% a 18%) v různém poměru složek v rozpouštěcím systému chloroform – ethanol – kyselina octová v poměrech 6-1-3, 7-1-2, 8-1-1. Jelikož se jednalo pouze o porovnání a nalezení vhodné vlákenné vrstvy, probíhalo zvlákňování na plochý kolektor. Zvlákňování probíhalo při napětí 20kV, v 15cm vzdálenosti kolektoru od jehly, dávkování roztoku 2 ml/h. při teplotě 21 °C a relativní vlhkosti vzduchu 30 %. Průměrná tloušťka vláken byla vyhodnocována v programu *NIS Elements Ar*. Následně z těchto výsledků byly vytvořeny histogramy, které jsou v příloze 1.

Pro zvlákňování na rotující tyčky byl vybrán roztok 16% koncentrace PCL v rozpouštěcím systému 8-1-1, jehož histogram je vyhodnocen v grafu 1. Z grafu je patrné, že z větší části průměr vláken dosahoval hodnoty v rozmezí 100–200 nm. Dále podle snímků z elektronového mikroskopu nastaly nejmenší deformace vláken právě při použití tohoto roztoku. Tato zvlákněná struktura na plochý kolektor je znázorněna na obrázku 18. Snímky z elektronového mikroskopu těchto a ostatních vlákenných struktur jsou v příloze 2. Při koncentracích PCL nižších než 15 % již docházelo k tvorbě defektů.



Graf 1. Histogram naměřených vláken 16% PCL v 8-1-1



Obrázek 18. Zvlákněné 16% PCL 8-1-1 na plochý kolektor. Zvětšení 1500×; měřítko 8µm
## 3.2 Zařízení na výrobu scaffoldu

Na Technické univerzitě v Liberci byla navrhnuta a postavena stabilní konstrukce zařízení pro výrobu cévních náhrad. Jedná se o zařízení, které je tvořeno hliníkovými profily, vzájemně pospojovanými tak, aby byla zajištěna jeho požadovaná tuhost. Ve spodní části zařízení jsou umístěny čtyři výškou regulovatelné stojiny, zaručující jeho vyváženost. Pro stejnoměrnost tloušťky cévní náhrady je zajištěn lineární pohyb jehly (elektrody) v horizontálním směru. Jehla je poháněna pneumaticky zařízením dodaném firmou Festo (obrázek 19A), které je umístěno ve spodní části stroje. Dva přepínače polohy umístěné na pohonné jednotce umožňují přepínání lineárního posuvu tam a zpět pomocí pneumatického systému. Těmto dvěma přepínačům polohy je možno nastavit libovolnou vzdálenost mezi sebou, která určuje vzdálenost lineárního posuvu. Na pohonné části lineárního posuvu je umístěna zvlákňovací jehla (obrázek 19B), do které vede hadička s roztokem zvlákňovacího polymeru z plastové stříkačky. Dávkování roztoku je řízeno elektrickým lineárním pohonem pomocí lineární pumpy (kd - Scientific 100, USA). Další pohonná část této konstrukce je již zmiňovaný uzemněný rotující kolektor nad jehlou. Rotující kolektor je ve tvaru tyčky z nerezové oceli o průměru 1–6 mm. Z jedné strany je pohon tyčky zajištěn zařízením Dremel (Model 4000) a jeho sklíčidlem. Z druhé strany je tyčka zajištěna pomocí dvou ložisek, která jsou usazená v pouzdru. Zařízení Dremel je volně položeno vedle celé konstrukce a pomocí ohebné hřídele přenáší požadovanou rychlost otáčení ke kolektoru. Rotující kolektor umožňuje uživateli nastavení různých vzdáleností od elektrody. Elektroda je napájena vysokonapěťovým zdrojem (Spellman SL150). Zařízení na výrobu scaffoldu, jenž je možné vidět na obrázku 20, bylo umístěno do digestoře vybavené odvětráváním, kvůli dostatečnému odvodu výparů z rozpouštěcího systému.



Obrázek 19. A)Posuvné zařízení. B) Zvlákňovací jehla na pohonné části lineárního posuvu



Obrázek 20. Zvlákňovací zařízení a jeho 3D schéma 1) Injekční stříkačka s polymerem 2) Pohonná část lineárního posuvu 3) Jehla 4) Rotující kolektor 5) Přepínač polohy.

## 3.3 Výroba scaffoldu

V prvé řadě byla vyráběna náhrada bazální laminy jako první vrstva tkáňového nosiče. Cílem bylo prozkoumat cílenou neuspořádanou strukturu vláken, která byla zajištěna minimálními otáčkami tyčky. Dále průměr a případné deformace vláken vzniklé při zvlákňování na rotující tyčku. Tloušťka scaffoldu byla přibližně 800 µm, aby se dala bezpečně bez poškození stáhnout z tyčky. U této první vrstvy byla zkoumána pouze její vnitřní strana z důvodu proliferace endotelových buněk na této straně nosiče.

Po vyrobení vlákenné vrstvy zastupující bazální laminu se na její vnější část pokračovalo ve zvlákňování druhé vrstvy nahrazující vrstvu tunica media. Jak bylo řečeno v úvodu experimentální části této diplomové práce, je důležitá orientace vláken z důvodu úspěšné proliferace hladkosvalových buněk. Tuto orientaci je možné ovlivnit regulováním otáček rotujícího kolektoru. Z důvodu vzniklých obtíží optimalizace výroby bazální laminy, které budou popsány v kapitole 3.4, nebyla tato problematika detailně řešena. Pokus o výrobu samotné vrstvy byl již na Technické univerzitě v Liberci úspěšně proveden v roce 2013. Tehdy bylo na 6mm rotující tyčku zvlákňováno 18% PCL rozpuštěné v chloroformu a ethanolu v poměru 9:1 a největší orientace vláken bylo dosaženo při obvodové rychlosti 282,6 m/min [32].

Jak bylo řečeno v kapitole 2.1.3, cévy se skládají navíc ze třetí vrstvy, která se nazývá tunica adventitia. Tato vrstva nebyla vyráběna z důvodu předpokladu samovytvoření v organismu.

### Parametry výroby

Parametry výroby, jako je zvolené napětí, průměr jehly, vzdálenost jehly od kolektoru, rychlost dávkování polymeru v plastové stříkačce a otáčky rotující tyčky, byly nastavovány a měněny podle vzniklé vlákenné struktury. Proces zvlákňování probíhal 70–80 minut při 21–23 °C a relativní vlhkosti vzduchu 40 %.

### Analýza vlákenné struktury

Po sejmutí tkáňového nosiče z tyčky byly zhotoveny vzorky, které se následně nalepily na terčík. Terčík se vložil do zlatičky (Quantum, Q150R – ES) a byl potažen vrstvou zlata o tloušťce 5 nm. Poté byl vložen do skenovacího elektronového

mikroskopu (Phenom, FEY), z jehož snímků byla pozorována vlákenná struktura vzorků.

# 3.4 Struktury vytvořených vlákenných vrstev scaffoldu

První dva nosiče byly vyrobeny dle podmínek zvlákňování uvedených v tabulce 1. Jak je vidět na obrázku 21A, u prvního nosiče na vnitřní straně vlákenné vrstvy začalo docházet k deformacím vláken. Naopak tomu bylo na jeho vnější straně (obrázek 21B), proto byla dále věnována pozornost pouze vnitřním stěnám, které přicházejí do styku s rotujícím kolektorem (tyčkou). Pro eliminaci těchto deformací byly upraveny podmínky zvlákňování druhého nosiče. Eliminace těchto defektů však nebyla úspěšná, jak je vidět na obrázku 22. Byly tedy zkoumány jiné důvody vzniku těchto deformací.

Tubuha 1.1 buhany 2raano rana nosteu					
Označení nosiče	Napětí [kV]	Vzdálenost jehly od tyčky [cm]	Dávkování [ml/h]	Průměr jehly [mm]	
1	15	15	2-3	0,7	
2	8	17	2-3	0,7	

Tabulka 1. Podmínky zvlákňování nosičů



Obrázek 21. První vyrobený nosič. A) Vnitřní strana nosiče. B) Vnější strana nosiče. Zvětšení 1000×; měřítko 110µm



Obrázek 22. Vnitřní stěna druhého nosiče. Zvětšení 1000×; měřítko 110 μm

# 3.4.1 Přídavný plochý kolektor

Jedním možným důvodem, proč se první vrstva vláken při styku s rotující tyčkou deformuje, je vysoká intenzita elektrického pole v okolí cylindrického kolektoru s malým průměrem. Z tohoto důvodu bylo navrhnuto nad rotující tyčku umístit uzemněný plochý kolektor (obrázek 23), který by částečně tuto vysokou intenzitu elektrického pole kolem rotující tyčky narušil a tyčka se chovala jako sběrač vláken.



Obrázek 23. Zvlákňovací zařízení s přídavným plochým kolektorem

Pro představu velikosti a rozložení intenzity elektrického pole v okolí rotující tyčky bylo zvlákňovacího zařízení bez i s přídavným plochým kolektorem v různých vzdálenostech od tyčky vymodelováno v programu *COMSOL Multiphysics*. Zařízení bylo konstruováno v řezu ve čtyřech uspořádáních, a to: bez přídavného kolektoru a s přídavným plochým kolektorem ve vzdálenostech 5 cm, 1 cm, 0,5 cm od rotující tyčky. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 24, 25 a 26.



Obrázek 24. Zvlákňovací zařízení bez přídavného kolektoru



Obrázek 25. Zvlákňovací zařízení s přídavným kolektorem ve vzdálenosti 5 cm od rotující tyčky



Obrázek 26. Zvlákňovací zařízení s přídavným kolektorem ve vzdálenosti 1 cm od rotující tyčky

42

Na obrázcích 24–26 jsou zobrazeny výsledky z programu *COMSOL Multiphysics*. Z těchto výsledků můžeme vidět výrazně vyšší intenzitu elektrického pole v okolí cylindrického kolektoru oproti uspořádání experimentu s deskovým kolektorem. A tím bylo potvrzeno, že umístěním přídavného deskového kolektoru na rotující válcový kolektor dojde ke snížení intenzity elektrického pole.

## 3.4.2 Výsledky s přídavným plochým kolektorem

Na základě výsledků z programu *COMSOL Multiphysics* bylo dále zvlákňováno na rotující tyčku s přídavným plochým kolektorem ve vzdálenostech 0,5–3 cm. Podmínky, za kterých zvlákňování probíhalo, jsou zaznamenány v tabulce 2.

Označení nosiče	Napětí [kV]	Vzdálenost jehly od tyčky [cm]	Vzdálenost tyčky od plochého kolektoru [cm]	Dávkování [ml/h]	Průměr jehly [mm]
3	10	20	3	2 - 3	0,7
4	10	20	1	2 - 3	0,7
5	20	20	1	2 - 3	0,7
6	20	20	0,5	2 - 3	0,7
7	10	25	1	2 - 3	0,7
8	10	25	0,5	2 - 3	0,7

Tabulka 2. Podmínky zvlákňování nosičů s přídavným kolektorem

Jak je zaznamenáno v tabulce 2, byla vyzkoušena výroba náhrady bazální laminy při různých uspořádáních experimentu. Většina výsledných snímků z mikroskopu ovšem ukázala, že dochází k podobným deformacím, jaké jsou znázorněny na obrázku 21A a 22. Výjimka nastala v případě nosiče s označením 4, jehož struktura je zobrazena na obrázku 27 a podmínky zvláknění v tabulce 2. Přesto, že na této struktuře došlo k malým deformacím vláken, byla tato struktura podobná té zvlákněné na plochý kolektor, zobrazené na obrázku 18 v kapitole 3.1. Kvůli dobrému výsledku byl pokus o výrobu totožné struktury zopakován za stejných podmínek. Jednou s přídavným kolektorem a jednou bez přídavného kolektoru pro srovnání. Jak je vidět na obrázcích 28A a 28B, vlákenná struktura vnitřní stěny vykazovala opět deformace. Tentokrát ale mnohem větší deformace vykazovala vlákenná vrstva, která byla zvlákněna za pomocí přídavného kolektoru. Tudíž se významný vliv přídavného plochého kolektoru při zvlákňování nepotvrdil. Ostatní snímky z elektronového mikroskopu jsou v příloze 3.



Obrázek 27. Zvlákněná struktura nosiče č. 4. A) Zvětšení 1000×; měřítko 110 μm. B) Zvětšení 5000×; měřítko 20 μm



Obrázek 28. Zvlákněná vlákenná struktura. A) Bez přídavného kolektoru. B) s přídavným kolektorem. Zvětšení 1000×; měřítko 120 μm

### 3.4.3 Nerezová a uhlíková rotující tyčka

Z důvodu obtížného sundávání vlákenného nosiče z nerezové tyčky byla pořízena kompozitní uhlíková tyčka se stejným průměrem s předpokladem menší adheze nanovlákenné vrstvy na uhlíkový kompozit. Tento předpoklad se však nepotvrdil, neboť se ukázalo, že adheze je pro oba materiály stejná. Zvlákňování probíhalo zvlášť na uhlíkovou a nerezovou tyčku za podmínek stejných jako v případě nosiče č. 4. Byl vynechán přídavný plochý kolektor z důvodu popsaného na konci kapitoly 3.4.2, dále byla řízena relativní vlhkost vzduchu mezi 25–30 % a zajištěna minimální obvodová rychlost rotace tyčky bez zařízení Dremel. Relativní vlhkost vzduchu a minimální obvodová rychlost byly záměrně sníženy z dalšího možného důvodu deformací vláken.



Obrázek 29. Vlákenná vrstva na uhlíkové tyčce

Po získání snímků z elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že na uhlíkové tyčce nedochází k deformaci "slinutí" vláken (obrázek 30A). Naopak v porovnání na nerezové tyčce opět dochází k deformaci vláken, jak je možné vidět na obrázku 30B. Pokus byl opakován a snímky z elektronového mikroskopu byly identické s předchozími výsledky. Další snímky zvlákněné vnitřní vlákenné vrstvy na uhlíkovou tyčku jsou v příloze 4.



Obrázek 30. Vlákenná vrstva A) z uhlíkové tyčky B) z nerezové tyčky. Zvětšení 1000×; měřítko 120 μm

Z dosavadních výsledků byl vliv snížení relativní vlhkosti vzduchu vyloučen a s ním i minimální rychlost otáčení kolektoru. Další z možného důvodu, proč je na uhlíkové tyčce lepší vlákenná vrstva, může být její velký měrný elektrický odpor oproti nerezové tyčce.

V případě uhlíkové kompozitní tyčky byl vypočítán měrný elektrický odpor 2,38  $\Omega$ .m. A u nerezové tyčky 6,616 × 10<sup>-5</sup>  $\Omega$ .m. Obě tyčky byly dlouhé 47 cm s průměrem 6 mm. Jelikož se ale jedná o uhlíkový kompozit, bude jeho vodivost pokaždé jiná, v závislosti na výrobě a výrobci.

Dále byl vizuálně porovnán na elektronovém mikroskopu (VEGA3 SB; TESCAN) vzorek povrchu nerezové a uhlíkové tyčky. Na obrázku 31 je vidět, že povrch nerezové tyčky není hladký. V případě povrchu uhlíkové kompozitní tyčky jsou vidět zalitá uspořádaná uhlíková vlákna, která díky své pravidelné orientaci mohou mít také určitý vliv na vznik defektů na vnitřní straně vlákenné vrstvy scaffoldu.



Obrázek 31. Povrch nerezové a uhlíkové tyčky. A) Nerezová tyčka. Zvětšení 40×, měřítko 2 mm. B) Nerezová tyčka. Zvětšení 200×, měřítko 500 μm. C) Uhlíková tyčka. Zvětšení 40×, měřítko 2 mm. D) Uhlíková tyčka. Zvětšení 200×, měřítko 500 μm.

Nevýhodou grafitové tyčky bylo její uchycení ve sklíčidle zvlákňovacího stroje. Po upnutí docházelo k poškození tyčky vůči sevření sklíčidla, jak je možné vidět na obrázku 32A a opakované použití tohoto kolektoru by nebylo možné. Proto bylo vyrobeno nerozebíratelné pouzdro s nerezovým nástavcem pro uchycení ve sklíčidle (obrázek 32B).



Obrázek 32. A) Poškozená úchytová část na uhlíkové tyčce. B) Pouzdro pro uchycení uhlíkové tyčky

## 3.4.4 Vybraný scaffold pro biologické testování

Pro biologické testování byl vybrán nosič s označením číslo 4. Jednalo se o scaffold s nejlepší zvlákněnou strukturou, jak je uvedeno v kapitole 2.4.2. Makroskopický snímek zvlákněného scaffoldu je na obrázku 33. Vnitřní strana vlákenné struktury byla podrobena měření průměru vláken a pórovitosti.



Obrázek 33. Vyrobený scaffold

#### Průměr vláken

Tloušťka byla měřena na 100 vláknech z několika detailních snímků vlákenné struktury pořízených z elektronového mikroskopu a vyhodnocených v programu *NIS Elements Ar*. Na obrázku 27 této vlákenné struktury jsou vidět i vlákna o větším průměru než 1  $\mu$ m. Z tohoto důvodu bylo zvlášť provedeno měření průměrné tloušťky vláken do 1  $\mu$ m a nad 1  $\mu$ m. Průměrná tloušťka vláken do 1  $\mu$ m činila 435,73 ± 215,64 nm. Dále průměrná tloušťka nad 1  $\mu$ m byla vyhodnocena na 2,4 ± 0,64  $\mu$ m. Z naměřených hodnot byly vytvořeny dva histogramy, které jsou v grafu 2. Záznam hodnot je v příloze 5.



Graf 2. Histogram naměřených průměrů vláken.

#### Velikost pórů

Průměrná velikost pórů byla odhadnuta na  $3,78 \pm 2,2 \ \mu m^2$  pomocí prahování v programu *Lucia 4.82* od firmy LIM, na stejných snímcích jako byla měřena průměrná tloušťka vláken. Jelikož průměrná velikost endotelových buněk je 10–20  $\mu m$  [33], endotelové buňky by se neměly dostat skrz vlákennou strukturu.

## 3.5 Biologické testování na vlákenné vrstvě scaffoldu

Jak již bylo popsáno v kapitole 3.4.4, pro biologické testování byl vybrán vlákenný nosič s označením číslo 4. Testování probíhalo v laboratořích tkáňového inženýrství Katedry netkaných textilií na Technické univerzitě v Liberci. Zejména bylo zjišťováno, zda je nosič vhodný pro buněčnou adhezi a proliferaci. Provedené laboratorní postupy jsou popsány v této kapitole. Jednotlivé kroky těchto postupů jsou uvedeny v příloze 6.

### 3.5.1 Příprava vzorků

Za účelem získání vzorků byl scaffold (obrázek 33) podélně rozstřižen a pomocí děrovačky z něj byly vystřiženy kruhové vzorky o průměru 5,5 mm. Velký ohled byl brán na to, aby se scaffold osadil buňkami na vzorky vlákenné vrstvy z vnitřní strany nosiče, představující náhradu bazální laminy. Takto připravené vzorky byly vloženy do 96 jamkových kultivačních destiček pro první, třetí, sedmý a čtrnáctý den testování. Do každé destičky bylo vloženo 7 vzorků vlákenného cévního nosiče pro testování: 4 MTT test, 1 fluorescenční a 2 elektronová mikroskopie. Jako kontrolní materiál bylo použito 7 vzorků ze zvlákněného 16% PCL (8-1-1) pro porovnání buněčné adheze a proliferace. Tento materiál, jehož průměr vláken byl vyhodnocen na 321 ± 146,67 nm, byl zvlákněn na přístroji Nanospider a použit z důvodu prokazatelné dobré buněčné proliferace na takto vyrobené vlákenné vrstvě.

## 3.5.2 Osazení scaffoldu buňkami

Scaffoldy byly osazeny lidskými endotelovými buňkami (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC) od firmy Lonza. Všechny vlákenné nosiče byly po dobu 30 min. sterilizovány 70% ethanolem a poté pětkrát promyty sterilním PBS (phosphate-buffered saline – fosfátový pufr, pH 7,4).

Z kultivační lahvičky s buňkami HUVEC bylo odsáto medium EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2, Lonza) a buňky byly opláchnuty sterilním PBS. Dále byly přidány 2 ml trypsinu (proteáza), díky němuž dojde k uvolnění buněk od dna kultivační lahvičky. Po uvolnění buněk bylo přidáno 6 ml media EBM-2. Buňky byly resuspendovány pomocí automatické počítačky buněk а (LUNA, Logos biosystems) byla zjištěna koncentrace buněk na 1 ml buněčné suspenze. Na každý nosič a do jamek pozitivní kontroly bylo naneseno 200 µl buněčné suspenze s finálním počtem buněk  $1 \times 10^4$ . Jako negativní kontrola byly použity stejné scaffoldy ovšem bez buněk, pouze s čistým médiem (EBM-2). Oproti tomu jako pozitivní kontrola byla použita jamka osazená pouze buňkami bez scaffoldu. Takto připravené destičky se scaffoldy (obrázek 34) byly po dobu testovacích dnů umístěny v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Kultivační médium EBM-2 bylo měněno každý druhý den.



Obrázek 34. Scaffoldy v kultivačních jamkách

### 3.5.3 Testování viability, adheze a proliferace buněk

Další krok po osazení nosičů buněk bylo jejich testování životaschopnosti, adheze a proliferace na tkáňovém nosiči. Testování probíhalo první, třetí, sedmý a čtrnáctý den od nasazení buněk na scaffold. V jednotlivých testovacích dnech byly scaffoldy testovány MTT testem (test buněčné viability; 3 vzorky, 1 negativní a 1 pozitivní kontrola) a byly vizuálně vyhodnoceny s využitím fluorescenční a elektronové mikroskopie. Principy vyhodnocování všech použitých metod jsou popsány v kapitole 2.6.

Pro MTT test byly vzorky nosičů přesunuty do sterilních jamek kultivační destičky. K nosičům bylo přidáno 50  $\mu$ l MTT a 150  $\mu$ l média EBM-2. Poté byly vzorky inkubovány 3 hodiny při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí této doby bylo médium s MTT odsáto a bylo přidáno 200  $\mu$ l kyselého isopropanolu (okyselené HCl). Po rozpuštění fialových krystalků formazanu (produkt štěpení MTT buňkami MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) byla spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 570 a 650 nm (ELx808 Absorbance Microplate Reader od firmy BioTek). Výsledné hodnoty absorbance zkušebních vzorků se od sebe odečetly a byl z nich spočítán průměr se směrodatnou odchylkou, jejichž hodnoty jsou v grafu 3. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.6.1, čím větší absorbance, tím větší množství živých buněk.

Vzorky pro fluorescenční mikroskopii (Nikon Eclipse Ti-E) byly fixovány vymraženým methanolem (-20 °C) a po promytí PBS byly obarveny proprium iodidem (Sigma – Aldrich). Obarvené vzorky byly opět promyty PBS.

Vzorky pro elektronovou mikroskopii (VEGA3 SB; TESCAN) byly fixovány 2,5% glutaralaldehydem v PBS a poté odvodněny vzrůstající ethanolovou řadou 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a 100 % ethanolu. Vysušené vzorky byly nalepeny na terčík a pozlaceny na zlatičce stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 3.3.

#### MTT test vyhodnocení

Výsledky MTT testu jsou zaznamenány v následujícím grafu 3. Z grafu je patrné, že absorbance na vzorku vlákenného nosiče (CEVA) byla v průběhu experimentu vyšší než na kontrolním vzorku vlákenného nosiče (PCL). Nicméně celkový trend absorbance u obou vzorků do 7. dne klesal. Poslední testovací den na cévním vlákenném nosiči absorbance stoupla. Dále v průběhu MTT testu se prokázalo, že pozitivní kontroly vykazovaly nárůst absorbance na rozdíl od buněk na scaffoldech, tudíž lze zavrhnout hypotézu, že by byl problém v testovaných buňkách. Nízká absorbance negativních kontrol se také potvrdila. Kompletní graf s pozitivními a negativními kontrolami je v příloze 7 této diplomové práce.



Graf 3. Vyhodnocení MTT testu ve 14 testovacích dnech

#### Fluorescenční a elektronová mikroskopie

Snímky z fluorescenční mikroskopie odpovídaly hodnotám z MTT testu. Na prvním snímku z prvního testovacího dne, který je na obrázku 35A je patrné, že buňky jsou téměř homogenně rozloženy a adherují na cévní nosič. Snímek ze 7. testovacího dne dokazuje, že postupem času buněk ubývá. Výjimkou je 14. den, kdy jak podle MTT testu, tak i dle snímku z fluorescenčního mikroskopu počet buněk roste. Tato skutečnost mohla nastat z důvodu pomalého růstu endotelových buněk oproti jiným buněčným typům. Nicméně se dá předpokládat, že se buňky více rozrůstají až kolem 14. dne. Na základě těchto skutečností by se v následujících experimentech mělo nasazovat větší množství buněk. Tím by se podpořil jejich růst – buňky produkují signální molekuly a růstové faktory do média. V případě, že je buněk málo, dostanou vzájemně méně signálů a to znamená pomalejší růst a naopak. To zároveň značí, že když je buněk málo, hrozí jim buněčná smrt (apoptóza). Zároveň však obrázek 35C ze 14. testovacího dne naznačuje, že byly buňky chybně resuspendované a nehomogenně nasazené na scaffold. Tím mohlo dojít ke zkreslení výsledků a k postupnému úmrtí buněk. Z těchto důvodů byl proveden další pokus, který je popsán níže. Další snímky z fluorescenčního mikroskopu jsou v příloze 8. Dále v příloze 9 jsou snímky kontrolního materiálu PCL, na kterých je vidět horši proliferace než na cévním nosiči.



Obrázek 35. Snímky cévního nosiče s HUVEC z fluorescenční mikroskopie. A) 1. testovací den B) 7. testovací den C) 14. testovací den. Zvětšení 100×, meřítko 100 μm.



Obrázek 36. Snímky cévního nosiče s HUVEC z elektronové mikroskopie. A) 1. testovací den B) 7. testovací den. Zvětšení 3000×, meřítko 20 μm. C) 14. testovací den. Zvětšení 1000×, meřítko 50 μm.

Snímky z elektronového mikroskopu, které jsou na obrázku 36, upozornily na stejné velké deformace na vlákenné vrstvě, jako nastávaly při zvlákňování ostatních scaffoldů na nerezovou tyčku. To značí nehomogenní rozložení velkých deformací na nosiči, které nebyly nalezeny při prvním zkoumání vzorku na elektronovém mikroskopu. Přesto je na snímku vidět, že buňky proliferovaly i na deformované vlákenné struktuře (obrázek 36C). Z 1. testovacího dne nebyl nalezen žádný pozůstatek buněk (obrázek 36A). Oproti tomu na obrázku 36B můžeme vidět porostlou vlákennou strukturu buňkami. To mohlo zapříčinit jejich již zmiňované špatné resuspendování. Můžeme ale říci, že snímky z elektronového mikroskopu odpovídají výsledkům z MTT testu a snímkům z fluorescenčního mikroskopu. Více snímků z elektronového mikroskopu je v příloze 10.

Na základě výsledků popsaných výše byl proveden další pokus. Při tomto pokusu byly tři scaffoldy osazeny koncentrací buněk (HUVEC)  $1 \times 10^4$  (stejná jako v předchozím experimentu), další tři koncentrace  $5 \times vyšši - 5 \times 10^4$  ve 200 µl suspenze. Pro porovnání proliferace byly na další tři nosiče naneseny myší fibroblasty (3T3 Swiss Albino) – 200 µl suspenze s koncentrací buněk  $1 \times 10^4$ . Tyto buňky byly vybrány pro jejich snadnou kultivaci na různých materiálech a především pak na PCL z Nanospideru, který byl použit jako kontrolní materiál. Z důvodu kritického nedostatku vzorků cévního vlákenného nosiče byly provedeny testy pouze za pomocí fluorescenčního a elektronového mikroskopu a pouze 3 testovací dny (první, třetí a sedmý den). Postup nasazení buněk na scaffold a příprava na fluorescenční mikroskopii byly stejné jako v předchozích kapitolách 3.5.2 a 3.5.3, jen pro myší fibroblasty bylo použito jiné kultivační médium a to DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Lonza). Média EBM-2 a DMEM byla měněna opět každý druhý den. Z důvodu uvedeného výše byly vzorky z fluorescenční mikroskopie dále použity pro elektronovou mikroskopii. Snímky druhého pokusu jsou v tabulce 3.

Testovací	Počáteční koncentrace buněk osazena na cévním nosiči ve 200 µl			
den	$\frac{\text{suspenze}}{1 \times 10^4 \text{ HUVEC}} = 5 \times 10^4 \text{ HUVEC}$		1×10 <sup>4</sup> 3T3	
1.				
3.				
7.				

Tabulka 3. Porovnání snímků cévního nosiče s HUVEC a 3T3 myšími fibroblasty z fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení 100×, meřítko 100 μm.

Na snímcích s endotelovými buňkami HUVEC je po prvním testovacím dni viditelný rozdíl v nanesených koncentracích buněk na cévním nosiči. Na nosiči s vyšší nasazenou koncentrací adoruje více buněk než na nosiči s nižší nasazovací koncentrací. 3T3 myší fibroblasty nasazené se stejnou koncentrací jako HUVEC

 $(1 \times 10^4)$  se v prvním dni množstvím vizuálně podobají, až na tvar buněk, které mají 3T3 odlišný.

Podle snímků z následujícího testovacího dne (3. den) je značný úbytek endotelových buněk, které byly nasazeny s nejnižší buněčnou koncentrací. Ze snímku s koncentrací endotelových buněk ( $5 \times 10^4$ ) si je možné povšimnout, že nedochází k buněčné apoptóze. Na vzorku s myšími fibroblasty je vidět, že dochází k proliferaci a je patrný vyšší počet buněk oproti prvnímu testovacímu dni.

U snímků z posledního testovacího dne (7. den) si je možné povšimnout, že endotelové buňky v obou koncentracích neproliferují na připravených cévních nosičích. Naopak 3T3 myší fibroblasty s počáteční koncentrací  $1 \times 10^4$  proliferují velice dobře. Tento výsledek vypovídá o vhodné vlákenné struktuře cévního nosiče pro proliferaci buněk. Ovšem v případě endotelových buněk se ukázalo, že 5× vyšší nasazovací koncentrace nestačí a v budoucnu by se mělo uvažovat o jejím zvýšení například až na  $1 \times 10^5$ . Dále byla zjištěná větší proliferace endotelových buněk i 3T3 myších fibroblastů na cévním nosiči než na kontrolním materiálu PCL, jehož snímky s buňkami jsou v příloze 11.

Výsledky z elektronové mikroskopie ukázaly obdobné deformace vláken a podobnou proliferaci buněk jako v předchozím experimentu, kdy byl scaffold osazen počáteční koncentrací  $1 \times 10^4$  buněk. Kvůli deformacím na scaffoldu je přesnější vyhodnocení proliferace buněk za pomocí fluorescenčního mikroskopu. Obrázky z této mikroskopie jsou v příloze 12.

# 4 Shrnutí

Cílem této diplomové práce bylo vyrobit metodou elektrostatického zvlákňování vhodný dvouvrstvý scaffold nanovlákenné cévní náhrady. Nejdůležitější bylo optimalizovat strukturu náhrady bazální laminy, která sloužila pro proliferaci endotelových buněk.

Výroba scaffoldu probíhala podobně jako v několika zde citovaných publikacích (Xu 2004, Edwards 2010, Hu 2012), které popisovaly výrobu cévního nosiče na rotující tyčku (kolektor). Ovšem nikde na snímcích v těchto publikacích se nenachází vyobrazení vnitřní vlákenné struktury nosiče, nýbrž jen vnější, která se ztotožňuje s naší vnější vlákennou strukturou. Při pokusu vyrobit ideální strukturu bazální laminy, docházelo k velkým deformacím v prvním styku vláken s kolektorem. Deformovaná vlákna by se dala označit jako "slinutá", což může výrazně ovlivnit proliferaci endotelových buněk. Z tohoto důvodu je tato práce zaměřená převážně na eliminaci těchto deformací.

První domněnka, proč dochází k deformacím, vedla k vysoké intenzitě elektrického pole okolo rotující tyčky. Pro rozbití této intenzity byl použit přídavný uzemněný plochý kolektor, umístěný nad rotující tyčku. Pomocí programu *COMSOL* Multiphysics bylo zjištěno, že snižováním vzdálenosti plochého kolektoru od rotující tyčky se intenzita elektrického pole rozloží rovnoměrně na plochý kolektor a nesoustředí se pouze v okolí rotující tyčky. Následující vyrobené vlákenné vrstvy ovšem nevykazovaly eliminaci těchto defektů. Pro eliminaci vlákenných deformací bylo dále odzkoušeno snížení relativní vlhkosti vzduchu a byly sníženy otáčky rotujícího kolektoru při zvlákňování. Žádný z těchto faktorů deformace neovlivnil.

V další části byl kolektor z nerezové oceli nahrazen uhlíkovým kompozitem. Bylo zjištěno, že vnitřní vlákenná struktura scaffoldu obsahuje vlákna o větším průměru, ale již bez větších deformací. Opakované zvlákňování potvrdilo stejné výsledky. Problém nastával při uchycení grafitové tyčky ve sklíčidle, kdy se při otáčení deformovala. To bylo vyřešeno speciálním nerozebíratelným pouzdrem s nerezovým nástavcem pro uchycení do sklíčidel. Dalším problémem by mohly být vysoké obvodové rychlosti tyčky, při kterých by mohlo docházet k jejímu ohybu mezi sklíčidlem a ložisky. Dále bylo zjištěno, že grafitová tyčka nesnižuje adhezi nanovlákenné vrstvy. Do budoucna bych doporučil vyzkoušet zvlákňování na teflonovou tyčku nebo tyčky z jiného materiálu.

Při laboratorním testování byly na vzorky scaffoldu nasazené lidské endotelové buňky (HUVEC). Byl proveden MTT test, fluorescenční a elektronová mikroskopie. Vzorky byly testovány první, třetí, sedmý a čtrnáctý den. První výsledky ukázaly, že buňky nedostatečně adorují na tkáňový nosič a díky tomu postupem času na scaffoldu špatně proliferují a dochází k buněčné apoptóze. To mohlo mít dle získaných snímků z fluorescenčního mikroskopu několik důvodů. Prvním důvodem mohlo být špatné resuspendování buněk, druhým důvodem jejich počáteční koncentrace. Tuto domněnku prokázal i snímek ze čtrnáctého dne, na kterém buňky proliferovaly ve vizuálně mnohem větším množství. V neposlední řadě mohou mít vliv na adhezi buněk vlastnosti materiálu. Jelikož je PCL hydrofobní polymer, nemusí být adheze bílkovin a následně i buněk ideální. Ovlivnění smáčivosti povrchu, například pouhým smáčením v PBS delší dobu, by mohlo přispět k lepší adhezi buněk. Dále snímky z elektronového mikroskopu ukázaly, že ačkoliv byl vybrán scaffold s nejvhodnější zvlákněnou strukturou, vykazoval na některých místech stejně velké deformace jako ostatní nosiče. Ovšem snímky ukázaly dobrou buněčnou proliferaci čtrnáctý den i na těchto deformacích.

Z důvodů špatné proliferace endotelových buněk bylo prováděno jejich porovnávání s 3T3 myšími fibroblasty. Endotelové buňky však již byly nasazeny v 5× větší koncentraci oproti původní. Z kritického nedostatku vzorku byly provedeny testy pouze první, třetí a sedmý den na fluorescenčním a elektronovém mikroskopu. Výsledné snímky ukázaly, že i když byla počáteční koncentrace nasazených buněk vyšší, docházelo na vzorcích k postupné buněčné apoptóze. Výjimka nastala u 3T3 myších fibroblastů, které velice dobře proliferovaly. Pro další práce bych doporučil postupně zvyšovat nasazovací koncentraci buněk pro lepší proliferaci endotelových buněk, změnu polymeru, nebo vhodnou modifikaci hydrofobního povrchu PCL. V současné době je na Technické univerzitě v Liberci testován kopolymer PURASORB PLC 7015 (kopolymer PLA/ PCL 70/30), který se jeví jako slibný materiál pro tvorbu budoucích nanovlákenných cév. Zejména vyniká díky svým mechanickým vlastnostem, jako je lepší adheze a proliferace endotelových buněk na prvních vyrobených scaffoldech.

# 5 Závěr

Výrobou vhodné náhrady maloprůměrových cév se kromě mnoha výzkumníků ve světě zabývala i tato diplomová práce. Cílem bylo vytvoření nanovlákenné cévní náhrady imitující vrstvy biologické cévy pomocí elektrostatického zvlákňování. Ukázalo se, že optimální vlákennou vrstvu pro endotelové buňky nelze snadno vytvořit, z důvodu převládajících vlákenných deformací na její vnitřní straně. Z tohoto důvodu se dál tato práce zabývala výrobou optimální vnitřní vrstvy nahrazující bazální laminu cévní náhrady. Pro eliminaci těchto deformací bylo jako jedna z variant navrženo zvlákňování na uhlíkovou nebo do budoucna teflonovou tyčku. Nejlepší vyrobená vlákenná vrstva byla osazena endotelovými buňkami a podrobena laboratornímu testování. Výsledky prokázaly nedostatečnou buněčnou adhezi a následnou proliferaci endotelových buněk na vlákenné vrstvě.

Pro vývoj první vrstvy nanovlákenné cévní náhrady je nejdůležitější optimalizovat vlákennou bazální laminu, na které endotelové buňky rostou. Proto bych doporučil pokračovat v pokusech o její vytvoření s pomocí již zmiňované teflonové tyčky či jiného materiálu, vykazující nižší adhezi vrstvy na kolektor. Dále bych doporučil modifikaci zvlákňovacích zařízení, ve smyslu rovnoměrného nastavování vzdálenosti tyčky od zvlákňovací jehly. Tím by se mohlo zamezit tvorbě vibrací tyčky při vyšších obvodových rychlostech. Z hlediska kultivace endotelových buněk by se mělo pokračovat v hledání a zvyšování správné nasazovací koncentrace buněk na připravený scaffold s optimální náhradou bazální laminy. V případě materiálu bych navrhoval zaměřit se na výběr vhodného polymeru, jehož vlastnosti jako například smáčivost ovlivňují adhezi endotelových buněk. V této práci byla optimalizována morfologie vnitřní vrstvy cévní náhrady tak aby zajišťovala optimální proliferaci endotelových buněk. Byla zkoumána řada parametrů mající vliv na tvorbu defektů a tyto parametry byly následně podrobně zkoumány. Problém tvorby defektů na vnitřní vrstvě cévní náhrady byl částečně vyřešen a byly navrženy budoucí experimenty řešící danou problematiku.

Při psaní této diplomové práce a pořízení posledních výsledků pokusů, jsem dospěl k názoru, že vyrobit dvouvrstvou nanovlákennou cévní náhradu s optimální vlákennou strukturou pro endotelové buňky, nebude velký problém. Jediné, co bude opravdu zapotřebí při její tvorbě, je dostatek času a velká trpělivost při jejím testování.

# Použitá literatura

- [1] "Gymnázium a Střední odborná škola pedagogická," [Online]. Available: http://ms.gsospg.cz:5050/bio/Sources/Textbook\_Textbook.php?intSectionId=31500.
   [Přístup získán 14 2 2014].
- [2] S. Čech, Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře, MU Brno, 2011.
- [3] R. Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, Sttutgart: Georg Thieme Verlag, 2009.
- [4] L. Junqueira, Základy histologie, Praha: H & H, 2002.
- [5] V. Konradová, Funkční histologie, Praha: H&H, 2000.
- [6] J. Eble a S. Niland, "The Extracellular Matrix of Blood Vessels," Current Pharmaceutical Design, sv. 15, č. 12, pp. 1385–1400, 2009.
- [7] B. Broke a S. Karnik, "Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal," *TRENDS in Cell Biology*, sv. 13, č. 1, pp. 51–56, 2003.
- [8] D. Lukáš, Lékařské textilie 2. díl, Praha 1, 2009.
- [9] "National Center for Biotechnology Information," 2002. [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116749/pdf/20020600s00018p150.pdf.
   [Přístup získán 28 2 2014].
- [10] M. Krajíček, Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění, Grada Publishing a.s, 2007.
- [11] D. Lukáš, A. Sarkar, L. Martinová a D. Vodseďálková, "Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)," *Textile Progres*, sv. 41, č. 2, pp. 59–140, 2009.
- [12] B. Nandana, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnology Advances*, sv. 28, pp. 325–347, 2009.

- [13] C. XU, R. Inai a S. Ramakrishna, "Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering," *Biomaterials*, sv. 25, č. 5, pp. 877– 886, 2004.
- [14] M. Edwards a G. Mitchell, "Development of orientation during electrospinning of fibres of poly(ε-caprolactone)," *European Polymer Journal*, sv. 46, č. 6, pp. 1175– 1183, 2010.
- [15] J. Hu, W. Chao a P. Lee, "Construction and characterization of an electrospun tubular scaffold for small-diameter tissue-engineered vascular grafts: A scaffold membrane approach," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, sv. 13, pp. 140–155, 2012.
- [16] R. Lanza a R. Langer, Principles of tissue engineering, San Diego: Academic Press, 2000.
- [17] H. Anwarul, M. Adnan a A. Nasim, "Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts," Acta Biomaterialia, sv. 1, č. 10, pp. 11–25, 2014.
- [18] A. Ratcliffe, "Tissue engineering of vascular grafts," *Matrix Biology*, č. 19, pp. 353– 357, 2000.
- [19] "Laboratoř experimentální medicíny," [Online]. Available: http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test. [Přístup získán 15 04 2014].
- [20] "Fyzikální ústav akademie věd," [Online]. Available: https://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialuaneb-jak-vypada-jejich-struktura. [Přístup získán 15 04 2014].
- [21] "Chempoint," [Online]. Available: http://www.chempoint.cz/fluorescencnimikroskopie. [Přístup získán 15 04 2014].
- [22] I. Armentano, M. Dottori a E. Fortunati, "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review," *Polymer Degradation and Stability*, sv. 95, č. 11, pp. 2126–2146, 2010.

- [23] H. Lodish a A. Berk, "National Center for Biotechnology Information," 2010.
  [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/. [Přístup získán 27 02 2014].
- [24] D. Petráš, D. Kimmer a K. Soukup, "Bezbečná nanovlákna," *Chemické listy*, sv. 103, pp. 1009–1016, 2009.
- [25] M. Li, M. Mondrinos a M. Gandhi, "Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering," *Biomaterials*, sv. 26, č. 30, p. 5999–6008, 2005.
- [26] V. Milleret, H. Thomas a H. Hall, "Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation," *Acta Biomaterialia*, sv. 8, č. 12, pp. 4349–4356, 2012.
- [27] Y. Dong a T. Yong, "Long-term viability of coronary artery smooth muscle cells on poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) nanofibrous scaffold indicates its potential for blood vessel tissue engineering," *Journal of the royal society*, sv. 5, pp. 1108–1118, 2008.
- [28] E. Cottam, D. Hukins a K. Lee, "Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material," *Medical Engineering* & *Physics*, sv. 31, č. 2, pp. 221–226, 2009.
- [29] B. Tillman a S. L. S. Yazdani, "The in vivo stability of electrospun polycaprolactonecollagen scaffolds in vascular reconstruction," *Biomaterials*, sv. 30, č. 4, pp. 583–588, 2009.
- [30] Y. Ju, J. Choi a A. Atala, "Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels," *Biomaterials*, sv. 31, č. 15, pp. 4313–4321, 2010.
- [31] P. Xiang, M. Li a C. Zhang, "Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels," *International Journal* of Biological Macromolecules, sv. 49, č. 3, pp. 281–288, 2011.
- [32] I. Yalcin, J. Horaková a P. Mikeš, "Design of Polycaprolactone Vascular Grafts," *Journal of Industrial Textiles*, sv. 4, 2014.

 [33] J. McGeachie, "School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia," [Online]. Available: http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/moreabout/endothel.htm. [Přístup získán 24 04 2014].



64







65













Označení nosiče	Napětí [kV]	Vzdálenost jehly od tyčky [cm]	Vzdálenost tyčky od plochého kolektoru [cm]	Dávkování [ml/h]	Průměr jehly [mm]
3	10	20	3	2 - 3	0,7
4	10	20	1	2 - 3	0,7
5	20	20	1	2 - 3	0,7
6	20	20	0,5	2 - 3	0,7
7	10	25	1	2 - 3	0,7
8	10	25	0,5	2 - 3	0,7











Uhlíková	Napětí [kV]	Vzdálenost jehly od	Dávkování	Průměr jehly
tyčka		tyčky [cm]	[ml/h]	[mm]
	10	20	2 - 3	0,7



Naměřené tloušťky vláken pod 1 µm ze scaffoldu č. 4				
126,24	298,67	383,16	486,85	
130,42	298,54	398,14	507,41	
149,34	298,76	398,3	510,73	
160,41	298,55	403,57	515,8	
183,87	302,64	406,31	521,41	
189,65	316,1	406,75	534,31	
191,21	316,3	409,88	549,76	
201,42	321,98	422,42	552,54	
201,33	330,44	423,67	570,67	
211,71	340,63	425,61	593,22	
222,46	340,38	427,11	604,46	
236,13	342,86	430,26	657,87	
236,99	343,08	435,64	695,19	
239,31	343,67	435,86	812,2	
252,67	350,05	437,42	840,21	
252,45	352,43	441,58	886,3	
254,43	361,76	445,08	903,56	
269,12	368,06	450,12	920,41	
271,07	377,77	450,65	923,45	
272,69	377,07	454,73	945,97	
281,37	377,39	467,34	965,54	
285,64	381,12	470,01	980,32	
287,23	381,41	470,2	983,01	
290,45	381,73	476,46	989,72	
297,13	382,41	479,67	993,14	
Průměr poc	1 1 μm [nm]	43	5,73	
Směrodatná odchylka pod 1 µm [nm]		± 21	15,64	
Naměřené tloušťky vláken nad 1 µm ze scaffoldu č. 4				
---	------	------	------	--
1085	1896	2390	2807	
1341	1915	2400	2825	
1350	1915	2436	2829	
1447	1915	2436	2885	
1480	1936	2451	2893	
1512	1941	2451	2998	
1519	1966	2451	2998	
1545	2010	2456	3047	
1545	2040	2500	3047	
1564	2040	2535	3095	
1569	2046	2554	3095	
1600	2046	2588	3095	
1616	2094	2597	3138	
1668	2111	2663	3158	
1668	2134	2668	3265	
1697	2134	2672	3310	
1702	2197	2672	3310	
1726	2219	2672	3336	
1754	2247	2700	3355	
1754	2263	2700	3456	
1754	2285	2740	3623	
1775	2313	2776	3703	
1789	2320	2776	3821	
1789	2333	2785	3876	
1842	2359	2807	3924	
Průměr nad 1 μm [nm]		238	5,31	
Směrodatná odchylka nad 1 µm [nm]		± 64	2,08	

#### MTT test

- 1) Do sterilní lahvičky připravit 150 µl média EBM-2 a doplněno o 50 µl MTT.
- 2) Testované scaffoldy přenést sterilní pinzetou do připravené sterilní destičky.
- Příprava pozitivní kontroly do jamky s narostlými buňkami po odsátí starého média přidat 150 µl media a 50 µl MTT.
- 4) Vložit do inkubátoru při 37 °C po dobu 3 hodin.
- 5) Odsát médium s MTT.
- 6) Přidat 200 µl kyseleného isopropanolu a změřit absorbanci.

#### Barvení buněk pro fluorescenční mikroskopii

- 1) Vyjmout roztok s buňkami z inkubátoru.
- 2) Přidat methanol o teplotě –20 °C a nechat působit 10 min za účelem fixace.
- 3) 4× opláchnout buňky nesterilním roztokem PBS.
- 4) Přidat barvicí roztok proprium iodid.
- 5) 4× opláchnout buňky nesterilním roztokem PBS.
- 6) Pozorovat buňky fluorescenčním mikroskopem.

#### Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

- 1) Fixace buněk na preparátu pomocí 2,5% glutaraldehydu.
- 2) Vysušení pomocí ethanolové řady (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %), v každé koncentraci ethanolu nechat vzorky 10 min.
- 3) Po dokončení ethanolové řady nechat vzorky vyschnout na parafilmu.
- 4) Vzorky se nalepí na připravený terčík.
- 5) Terčík se vzorky nazlatit a pozorovat v elektronovém mikroskopu.



Vyhodnocení MTT testu ve 14. testovacích dnech

PC - pozitivní kontrola, NC - negativní kontrola











Testovací	Počáteční koncentrace buněk osazena na kontrolním PCL nosiči ve 200 μl suspenze. Zvětšení 100x, měřítko 100 μm				
den	1×10 <sup>4</sup> HUVEC	$5 \times 10^4$ HUVEC	1×10 <sup>4</sup> 3T3		
1.					
3.					
7.					

Testovací	SEM snímky. Zvětšení 1000x, měřítko 50 µm				
den	$1 \times 10^4$ HUVEC	$5 \times 10^4$ HUVEC	$1 \times 10^4 3 \mathrm{T3}$		
1.		1100 MV 2004     1200 MV 2004     1200 MV 2004     1200 MV 2004       1000 MV 2004     1200 MV 2004     1200 MV 2004     1200 MV 2004       1000 MV 2004     1200 MV 2004     1200 MV 2004     1200 MV 2004			
3.	minipulation   minipulation				