

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Lékařská biofyzika



RNDr. Martin Kráľovič

Funkcionalizovaný nanovláknenný systém pro urychlení regenerace vnitřních tkání

Functionalized nanofiber system for accelerated regeneration of internal tissues

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně, a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27. 9. 2021

Martin Král'ovič

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi pomohli při studiu a vypracování této disertační práce.

Především děkuji panu prof. RNDr. Evženu Amlerovi, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, předávání poznatků, rad a cenných zkušeností. Také mu děkuji za možnost pracovat v nanotechnologické laboratoři na zajímavém tématu a možnost učit se nahlížet na fascinující nanosvět kolem nás.

Dále bych chtěl poděkovat panu Ing. Petru Novotnému za technickou pomoc v laboratoři.

Panu prof. MUDr. et Mgr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D. děkuji za excelentní histologickou analýzu a plodné diskuse nad získanými daty.

Velmi děkuji týmům chirurgů pana prof. MUDr. Jiřího Hocha, CSc., a to paní MUDr. Barboře East, Ph.D. a panu MUDr. Michalu Vjaclovskému. Bez jejich odborné způsobilosti a operátérské šikovnosti by nebylo možné provést *in vivo* experimenty. Panu profesorovi Hochovi děkuji za užitečné rady z chirurgické praxe při navrhování nanovláknenných materiálů a možnost shlédnout operaci kolorektální anastomózy.

Paní MVDr. Janě Lorenzové, Ph.D. a týmu veterinářů děkuji za organizaci *in vivo* experimentů a péči o experimentální zvířata.

Moc děkuji i nebohým prasátkům a králíkům, kteří pro pokrok ve vědě a poznání nedobrovolně odevzdali to nejcennější, co měly, své životy.

Panu Ing. Martinu Otáhalovi, Ph.D. za biomechanickou analýzu vzorků tkání.

Také děkuji paní Mgr. Evě Filové, Ph.D. a její kolegyním za pomoc při *in vitro* testování nanovláknenných nosičů.

V neposlední řadě moc děkuji za podporu mým drahým rodičům.

Abstrakt

Funkcionalizací lze upravit vlastnosti nanovláken, připravených elektrostatickým zvlákňováním, aby se svými vlastnostmi a funkcí co nejvíce podobala chybějící extracelulární matrix hojící se rány. U králičích střevních anastomóz se jako klíčová ukázala funkcionalizace nanovláken kryogenní frakcionalizací. Zatímco použití funkcionalizovaných PVA a chitosanových nanovlákených membrán vedlo k nežádoucím strikturám až obstrukcím střeva a silným zánětům, až další funkcionalizace PVA a chitosanových nanovláken kryogenní frakcionalizací umožnila snížení dávky polymeru, což významně zredukovalo zánětlivou odpověď a podstatně zvýšilo biokompatibilitu použitého materiálu. Aplikací kryogenně frakcionalizovaných nanovláken bylo dosaženo zvýšení podílu mikrocév, fibroblastů a kolagenu, což mělo za následek zvýšení biomechanické pevnosti zhojených anastomóz. Funkcionalizace polykaprolaktonových nanovláken speciálním přilepením k polypropylénové síťce umožnilo jejich použití pro podporu hojení fascií v břišní stěně prasat. Funkcionalizace PVA nanovláken glyoxalem vedla ke zvýšení jejich stability ve vodním prostředí. Aplikace membrány z PVA funkcionalizovaných nanovláken na hluboké kožní defekty králíků podporuje výměnu dýchacích plynů mezi ránou a okolím, což zvyšuje proliferaci buněk a produkci kolagenu. Nanovlákená membrána tak může snížit důležitost procesu rozvoje vaskularizace rány, který byl, v případě studovaných vnitřních ran, klíčovým faktorem pro jejich úspěšné zhojení.

Klíčová slova

extracelulární matrix, kryogenní frakcionalizace, střevní anastomózy, hluboké kožní rány, incizionální hernie

Abstract

Functionalization can adjust the properties of nanofibers prepared by electrospinning to best replace the missing extracellular matrix in a healing wound. In the rabbit intestinal anastomoses, the functionalization of nanofibers by cryogenic fractionalization has proven to be crucial. While the use of functionalized PVA and chitosan nanofiber membranes led to intestinal strictures and severe inflammation, further functionalization of PVA and chitosan nanofibers by their cryogenic fractionalization led to the possibility of reducing the polymer dose, which significantly reduced the inflammatory response and significantly increased the biocompatibility of the material used. The application of fractionalized nanofibers increased the fraction of microvessels, fibroblasts and collagen, which resulted in an increase in the biomechanical strength of healed anastomoses. The functionalization of the polycaprolactone nanofibers by special adhesion to the polypropylene hernia mesh made it possible to use them as a support for the healing of the fascia in the abdominal wall of pigs. Functionalization of PVA nanofibers with glyoxal led to their increased stability in the aqueous environment. By applying a membrane of PVA functionalized nanofibers to full-thickness wounds in rabbit skin, nanofibrous membranes allow the exchange of respiratory gases between the wound and establish a microenvironment, which promotes cell proliferation and collagen production. The nanofiber membrane on the skin wound can thus reduce the importance of the condition for neovascularization, which is crucial for successful healing in internal wounds as the incision in abdominal fascia or the intestinal anastomoses.

Keywords

extracellular matrix, cryogenic fractionalization, intestinal anastomosis, full-thickness skin wound, fascia, incisional hernia

Seznam použitých zkratek

A _A	plocha histologického jevu na plochu řezu
AC	střídavý elektrický proud
BCECF, AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester
BSA	hovězí sérový albumin
DC	stejnoseměrný elektrický proud
DCM	dichlormetan
DiOC6	3,3'-dietyloxakarbokyanin jodid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
E	Youngův modul pružnosti
ECM	extracelulární matrix, mimobuněčná hmota
EDTA	kyselina trypsin-ethylendiamintetraoctové
EGF	epidermal growth factor
$\epsilon_{\max}$	maximální specifické prodloužení
FAK	fokální adhezní kináza
FBS	fetální hovězí sérum
FTIR-ATR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací a se zeslabeným celkovým odrazem
GIT	gastrointestinální trakt
HaCaT	keratinocyty izolované z kůže dospělého člověka
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IFN-gama	interferon gama
IL-12	interleukin 12
i.m.	intramuskulárně
i.v.	intravenózně

L	nízkomolekulární PVA
MEM	minimální základní médium
MPP	matrix metaloproteinázy
MSC	mezenchymální kmenové buňky
M _w	molekulární váha
n.s.	statisticky nevýznamné
PBS	fosfátový pufr - phosphate buffered saline
PCL	polykaprolakton
PCL-strip dní	skupina s periodickou výměnou PCL nanovlákných membrán každých 7 dní
PDGF	platelet-derived growth factor
PDS	polydioxanon
PES	polyethersulfon
PLA	kyselina polymléčná
PGA	kyselina polyglykolová
PLGA	kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové
PP	polypropylénová kýlní síťka
PP/PCL	kompozitní materiál z PP kýlní síťky a PCL nanovláken
PTK2	protein tyrosinkináza 2
PVA	polyvinylalkohol
PVA-strip dní	skupina s periodickou výměnou PVA nanovlákných membrán každých 7 dní
Q _A	počet profilů histologického jevu na plochu řezu
RT	pokojová teplota
σ _k	mez kluzu
σ _{max}	maximální pevnost v tahu
	subkutánně

SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SMC	buňky hladkého svalstva
TBS	Tris-buffered saline
TFA	kyselina trifluoroctová
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF-alfa	tumor necrosis factor alfa
U	vysokomolekulární PVA
U:L	hmotnostní poměr vysokomolekulárního a nízkomolekulárního PVA
V _v	objemová frakce složek střevní stěny v místě anastomóz

Obsah

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
1.1. Nanovlákná v regenerativní medicíně.....	12
1.1.1. Nanovlákná připravená metodou elektrostatického zvlákňování	15
1.1.2. Polymery pro elektrostatické zvlákňování.....	17
1.1.3. Buňky a nanovlákná připravená metodou elektrostatického zvlákňování	19
1.1.4. Funkcionalizace nanovláken.....	23
1.2. Hojení ran	27
1.2.1. Hojení kožních ran.....	27
1.2.2. Hojení fascie a incizionální kýla	31
1.2.3. Hojení střevních anastomóz.....	32
2. CÍLE PRÁCE.....	36
3. METODIKA	37
3.1. Metodika přípravy a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení hlubokých kožních ran.....	37
3.1.1. Příprava a funkcionalizace nanovláknenných membrán.....	37
3.1.2. Charakterizace proteinové adsorpce	38
3.1.3. Nasazení a kultivace buněk	39
3.1.4. Stanovení metabolické aktivity buněk	40
3.1.5. Hodnocení buněčné adheze.....	40
3.1.6 Barvení Live/Dead	40
3.1.7. Testování <i>in vivo</i>	41
3.1.8. Histologická analýza	41
3.2. Metodika přípravy a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení fascie po reparaci kýl břišní stěny	44
3.2.1. Příprava a funkcionalizace nosiče	44
3.2.2. Nasazování a kultivace buněk	44
3.2.3. Stanovení buněčné metabolické aktivity	45
3.2.4. Stanovení buněčné proliferace	45
3.2.5. Vizualizace buněk pomocí skenovací elektronové mikroskopie	45
3.2.6. Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie	46
3.2.7. Statistická analýza dat <i>in vitro</i> testů.....	46
3.2.8. Testování <i>in vivo</i>	46
3.2.9. Histologická analýza	47
3.2.10. Biomechanické testování	49

3.3. Metodika k přípravě a testování funkcionalizovaného nanovláknenného systému pro podporu hojení střevních anastomóz.....	49
3.3.1. Příprava, a funkcionalizace nanovláken	49
3.3.2 Nasazování a kultivace buněk	51
3.3.3. Stanovení buněčné metabolické aktivity	51
3.3.4. Stanovení buněčné proliferace	52
3.3.5. Vizualizace pomocí konfokální mikroskopie	52
3.3.6. Imunohistochemické barvení talinu.....	52
3.3.7. Testování <i>in vivo</i>	53
3.3.8. Histologická analýza	54
3.3.9. Biomechanické testování	55
4. VÝSLEDKY.....	56
4. 1. Příprava a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení hlubokých kožních ran	56
4.1.1. Charakterizace funkcionalizovaných nanovláken	56
4.1.2. Interakce nanovláknenných membrán s proteiny	58
4.1.3 Testování funkcionalizovaných nanovláken <i>in vitro</i>	59
4.1.4. Testování funkcionalizovaných nanovláken <i>in vivo</i>	62
4.1.5. Diskuze	69
4.2. Příprava a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení fascie po reparaci abdominální kýl	72
4.2.1. Charakterizace funkcionalizovaných nanovláken	72
4.2.2. Testování funkcionalizovaných nanovláken <i>in vitro</i>	73
4.2.3. Testování funkcionalizovaných nanovláken <i>in vivo</i>	75
4.2.4. Histologická analýza	76
4.2.4. Biomechanická analýza	79
4.2.5. Diskuze	81
4. 3. Příprava a testování nanovláknenného systému pro podporu hojení střevních anastomóz. 84	
4.3.1. Charakterizace funkcionalizovaných nanovláken.....	84
4.3.3. Testování funkcionalizovaných nanovláken <i>in vivo</i>	89
4.3.4. Histologická analýza	90
4.3.5. Biomechanická analýza	94
4.3.6. Diskuze	95
5. ZÁVĚR	99
6. SOUHRN.....	103
7. SUMMARY	104
8. PUBLIKACE, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE	105

9. OSTATNÍ PUBLIKACE AUTORA	106
9.1. Publikace s IF	106
9.2. Publikace bez IF	107
9.3. Kapitoly v knihách	107
10. POUŽITÁ LITERATURA	108

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. Nanovlákná v regenerativní medicíně

Úkolem regenerativní medicíny je pomáhat obnovovat buňky, tkáň a orgány, poškozené zraněním, věkem či nemocí pacienta anebo je zcela nahrazovat za uměle vypěstované buňky, tkáň a orgány¹. Regenerativní medicína je úzce propojená s tkáňovým inženýrstvím, interdisciplinárním odvětvím biomedicíny, které se snaží hledat optimální postupy pro vytváření tkáňových a orgánových náhrad. Oba překrývající se obory využívají přirozenou regenerační schopnost tkání a orgánů. Schopnost regenerace závisí na druhu orgánu a na rozsahu a míře jeho poškození. Tělo člověka nedokáže zcela nahradit žádný ze svých orgánů *de novo*, nicméně u některých orgánů je možná částečná schopnost dorůstání, obnovy původní velikosti, tvaru a funkce. U dětí bylo pozorováno dorůstání amputovaných špiček prstů, a to včetně distální části kosti posledního třetího článku². V dospělosti jsou u člověka nejlépe regenerujícím orgánem játra, kterým trvá přibližně rok, aby zdvojnásobila svou velikost po resekci³.

Již od konce 19. století je obecně známým faktem to, že podstata regenerační schopnosti těla spočívá v regulovaném dělení buněk a jejich další diferenciaci do příslušných buněčných typů a tkání. Jednotlivé buněčné typy se mezi sebou liší svou schopností se dělit. Kmenové buňky si zachovávají schopnost dělení v průběhu celého lidského života, kdy pomocí svého asymetrického dělení doplňují svá množství a zároveň dávají vznik buněčné hmotě, která nahrazuje poškozené, odumřelé a chybějící buňky v různých typech tkání⁴. Dynamická rovnováha mezi odumíráním a množením kmenových buněk v průběhu života člověka a jejich diferenciací je klíčový mechanismus udržující lidské tělo v homeostáze⁵. Narušením proliferační schopnosti kmenových buněk, například nahromaděním poškození DNA⁶, vede k narušení této dynamické rovnováhy a omezení přirozené regenerační schopnosti, což má za následek degradaci struktury a funkce tkání.

V regenerativní medicína jsou používány tři hlavní přístupy⁷. Prvním z nich je buněčná terapie, kdy se do poškozené tkáně pacienta aplikují *in vitro* vlastní namnožené buňky pacienta, případně uměle vypěstované tkáň z těchto odebraných buněk. Druhým přístupem je použití speciálního materiálu, který se aplikuje do poškozené tkáně, kdy tento materiál dokáže vhodně stimulovat kmenové buňky k množení a k diferenciaci. Třetím přístupem je kombinace obou výše zmíněných přístupů a využívá se jak množení buněk pacienta *in vitro*, tak materiály navozující regenerativní procesy v postižené otkáni. Každý přístup má své výhody, ale i nedostatky. Buněčný přístup obsahuje velké množství kroků.

Buňky je potřeba izolovat z těla pacienta, následně kultivovat *in vitro* a po namnožení implantovat zpět do těla pacienta. Těchto mnoho kroků sebou nese rizika infekce, selhání a v neposlední řadě má vysoké nároky na materiálové a technické vybavení, což se promítá do vyšších finančních nákladů v porovnání s bezbuněčnou terapií. Bezbuněčná terapie (a částečně i kombinovaná terapie) se opírá o možnost stimulovat proliferaci a diferenciaci buněk vhodným materiálem. Tento materiál musí splňovat značné množství požadavků. Implantovaný materiál musí být pro pacienta především bezpečný, tedy nesmí zhoršit nebo ohrozit jeho zdraví, například podporovat vznik krevních sraženin nebo nádorů či vyvolávat akutní imunitní odpověď. Také chronické dráždění imunitního systému je častým nežádoucím efektem implantace materiálu a vzniká po delší přítomnosti implantovaného materiálu v organismu⁸. Implantovaný materiál by se měl v organismu rozkládat a mít schopnost úplné biologické degradace, přičemž produkty biodegradace musí splňovat totožná přísná kritéria jako sám implantovaný materiál. V ideálním případě by rychlost biodegradace implantovaného materiálu měla odpovídat rychlosti tvorby nové tkáně, která ho po určité době zcela nahradí. Vlastnosti implantovaného materiálu by tedy měly umožnit buňkám tkání osídlit tento materiál, což znamená možnost migrace buněk po povrchu materiálu nebo vstup do jeho nitra. Materiál určený pro kultivaci buněk *in vitro* nebo pro implantaci *in vivo* se označuje jako nosič (angl. “scaffold“). Vlastnosti nosiče by měly také podporovat fyziologické požadavky regenerující tkáně, tedy umožnit přísun živin a kyslíku do tkáně a odvod odpadních látek metabolismu a produktů biodegradace materiálu. Proto je pro nosič důležitou vlastností vhodná poréznost. Nosič by měl totiž zejména vhodným způsobem stimulovat buňky k migraci, proliferaci a diferenciaci do plnohodnotné tkáně.

Buňky potřebují pro svou existenci a diferenciaci spojení s materiálem, nejčastěji buněčnou adhezí. Experimentálně bylo zjištěno, že některé typy buněk dokonce podstupují buněčnou smrt v případě, že jim není buněčná adheze umožněna⁹. V přirozeném prostředí tkáně buňky žijí v extracelulární matrix (ECM). ECM je trojrozměrná síť houbovitého tvaru, která poskytuje buňkám mechanickou oporu. Hlavní složkou ECM je kolagen, jehož vlákna mají tloušťku řádově od několika desítek nanometrů po jednotky mikrometru⁴. Funkcí ECM není pouze mechanická opora a ochrana buňkám, ale podílí se také na tvorbě vhodného mikroprostředí pro život buněk. ECM kolem sebe váže vodu a další látky, potřebné pro život buněk, a zachytává různé typy signálních molekul, jako jsou hormony či růstové faktory, čímž se podílí na přenosu informací mezi buňkami a tkáněmi^{4,10}.

Bezbuněčný přístup je v porovnání s buněčným přístupem jednodušší, avšak představuje značnou technologickou výzvu, zejména v tom, jakým způsobem připravit

materiál, který dokáže svou funkcí a strukturou napodobit anebo se alespoň přiblížit přirozené ECM. Umělá ECM by měla být připravena z velmi jemných vláken, velikostí průměru odpovídajících přirozené ECM. Vzhledem k tomu, že se jedná o vlákna o průměru řádově několik desítek nanometrů až několik jednotek mikrometrů, je nutné použít technologické postupy, které dokáží manipulovat s hmotou této velikosti. Nanotechnologie pracuje s hmotou na úrovni nanometrů a lze pomocí ní připravit jemná vlákna takového průměru, z jakých je utkána tělu přirozená ECM. Tato jemná vlákna se nazývají nanovlákna. Nanovlákna jsou definována jako vlákna s průměrem menším než 1 mikrometr, tj. 1000 nanometrů¹¹ a tato definice nanovláken je použita i v této práci.

Do současnosti bylo vyvinuto několik nanotechnologických metod, schopných připravit nanovlákna, na kterých dokáží somatické buňky přežívat. Metoda samoskladby (angl. self-assembly) využívá stavební jednotky, jako například peptidy, které se, pomocí svých fyzikálně - chemických vlastností, dokáží poskládat do nanovláknenných struktur¹². Tato metoda je inspirovaná hierarchicky organizovanou strukturou kolagenu, jehož polypeptidické molekuly jsou splétané do trojitě šroubovice a tyto trojitě šroubovice do kolagenových fibril a kolagenové fibrily do kolagenových vláken^{4,12}. Omezenost použití této metody spočívá ve vlastnostech stavebních jednotek, specificky podmíněných pro samoskladbu nanovláken, které nemusí ve výsledné struktuře odpovídat specifickým požadavkům konkrétních typů buněk.

Další metodou přípravy nanovláken je separace fází (angl. phase separation). Tato metoda spočívá v rozpuštění polymeru a jeho následné separaci fází dvou kapalin za vytvoření gelu polymeru a jeho následné vysušení, tj. odstranění rozpouštědla, vypařováním nebo sušením mrazem (lyofilizací). Metodou separace fází je možné vytvořit trojrozměrnou houbovitou síť polymerních nanovláken¹³. Podobně, jako v případě metody samoskladby, je i v případě metody separace fází, limitujícím faktorem pro širší uplatnění mimo experimentální laboratoře výběr polymeru a nízká produkce nanovláken. Tyto limity překonává až další metoda přípravy nanovláken, odstředivé zvlákňování (angl. centrifugal spinning nebo také i forspinning). Pomocí této metody lze připravit nanovlákna z výrazně širšího spektra polymerů¹⁴. Principem metody je přeměna kapalně látky na vlákno. Kapka roztoku polymeru je pomocí odstředivé síly rychle rotujícího emitru (až 15 tisíc otáček za minutu) vytahována do tenkého vlákna¹⁵. Se snižujícím se průměrem vznikajícího vlákna se výrazně zvětšuje povrch vlákna a tím i vypařování rozpouštědla z vlákna. Suchá vlákna jsou zachytávána na kolektor. Při metodě odstředivého zvlákňování je možné použít místo roztoku polymeru i taveninu polymeru¹⁶. Materiály připravené pomocí odstředivého

zvlákňování obsahují zpravidla vlákna s průměrem menším než 1 mikrometr, ale je zde i relativně vysoké zastoupení mikrovláken o průměru mezi 1 až 10 mikrometry a obsahuje také kapičky polymeru. Materiál s obsahem polymerních mikrovláken je v tahu mechanicky pevnější než materiál složený čistě z nanovláken stejného polymeru, avšak tato nehomogenní mikrovlákná mají nižší rychlost biodegradace, což nemusí odpovídat rychlosti regenerace hojící se tkáně.

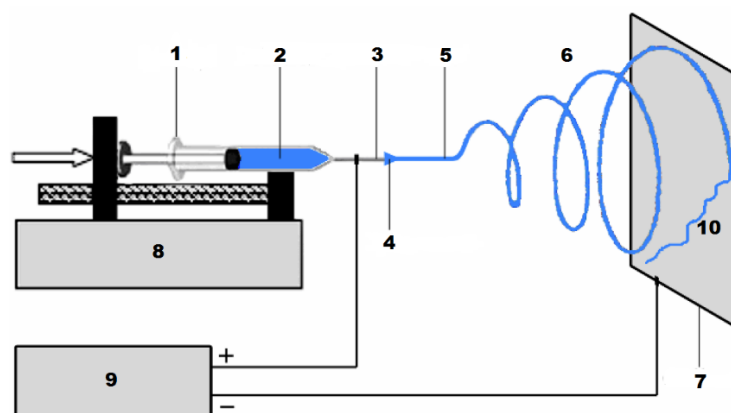
V současné době je nejrozšířenější metodou přípravy nanovláken elektrostatičké zvlákňování (angl. electrospinning). Tato metoda byla zdokonalována a rozšířena do průmyslové velkovýroby¹⁷. Původní metoda elektrostatičkého zvlákňování byla založena na stejnosměrném elektrickém proudu (angl. DC electrospinning) a modifikována na využití proudu střídavého (angl. AC electrospinning)¹⁸, což ještě markantněji zvýšilo efektivitu produkce nanovláken za časovou jednotku.

1.1.1. Nanovlákná připravená metodou elektrostatičkého zvlákňování

Elektrostatičkým zvlákňováním je možné připravit vlákna s průměrem od několika mikrometrů do 1,2 nanometru^{19,20}, přičemž tuto spodní hodnotu průměru nanovlákná lze chápat jako spodní limit existence hmoty ve formě polymerních nanovláken. Vzhledem k rozměru molekul polymerů nelze metodou připravit pikovlákná, tedy polymerní vlákna s průměrem menším než 1 nanometr.

Základním principem metody přípravy nanovláken metodou elektrostatičkého zvlákňování je vytahování nanovláken z kapičky rozpuštěného polymeru pomocí působení sil statického elektrického pole^{11,21}. Tyto síly nejprve překonají povrchové napětí kapičky roztoku polymeru a zdeformují její původní kulovitý tvar do struktury zvanou Taylorův kužel. Vrchol Taylorového kužele (angl. Taylor cone) je dál prodlužován (vytahován) silami statického elektrického pole do trysky (angl. jet), která se rychle prodlužuje. Prodlužování vede ke ztenčování vznikajícího vlákna, které se stává v elektrickém poli nestabilním a začne rotovat. Rychlé prodlužování a ztenčování vznikajícího vlákna má další důležitý aspekt. Rychle roste také celkový povrch vlákna, což má za následek rychlejší odpařování rozpouštědla. Vznikající vlákno začne schnout a tuhnout, až se, již téměř suché, polymerní vlákno odlomí na rozhraní fází pevná látka - kapalina. Tuhé navláknó je elektricky přitahováno ke sběrnému kolektoru, kterým může být v nejjednodušším případě i kovová deska. Obr. 1 ilustruje schéma výše popsaného elektrostatičkého zvlákňování. Postupné

hromadění nanovláken na kolektoru vytváří makroskopický objekt, nanovláknenný materiál, který je možno uchopit například pinzetou a dále s ním manipulovat.



Obr. 1. Schéma elektrostatického zvlákňování. Za pomoci pumpy (8) je roztok polymeru (2) dávkován ze stříkačky (1) do jehlového emitru (3). Kapka polymeru na konci jehly se vlivem elektrického napětí formuje v Taylorův kužel (4), který se dále prodlužuje do trysky (5) a ta dále rychlým prodlužováním přechází do bičující fáze (6). Vyparováním rozpouštědla vzniká tuhé polymerní nanovlákně (10), které je přitahováno na plochý kovový kolektor (7). Elektrické napětí je generováno ze zdroje vysokého elektrického napětí (9). Převzato a upraveno Ziabari et al. (2009)¹³⁷.

V současné době existuje mnoho technických variant výše popsaného základního postupu. Různé varianty elektrostatického zvlákňování mají za následek vysokou diverzitu vytvořených nanovláknenných materiálů. Základní jehlový emitor může být nahrazen vaničkou, drátem či rotujícím válcem^{11,17,22,23}. Emitor je také dávkovač kapiček polymerního roztoku. Vyšší počet kapiček polymerního roztoku na emitru má za následek vyšší produktivitu nanovláken za časovou jednotku.

Tvar kolektoru ovlivňuje tvar výsledného nanovláknenného materiálu a také prostorové uspořádání nanovláken. Přitahováním nanovláken na kolektor ve tvaru ploché kovové desky se vytvoří nanovláknenná membrána, útvar povrchně podobný listu papíru¹¹. Nanovláknenná membrána vzniklá na kolektoru ve tvaru ploché kovové desky má nanovlákně náhodně uspořádaná. Naproti tomu kolektor ve tvaru nízkého válce, který má ve svém středu vyvýšenou jehlu, orientuje vlákna mezi jehlou a hranou válce souměrně a vytváří tak nanovláknennou membránu s radiálně orientovanými nanovláknami²⁴. Velice specifickým kolektorem je rychle rotující válec (několik stovek až tisíců otáček za minutu)²⁵.

Nanovlákná se na povrch rotujícího válce ukládají ve směru paralelním ke směru otáčení válce. Takto lze připravit nanovláknenní membránu s výlučně paralelně uspořádanými nanovláknami. Nejpreciznějším provedením rotujícího kolektoru je rotující tenký kovový váleček (angl. mandrel), například kovový drát, který ukládá nanovlákná na svůj povrch²⁶. Nanovláknenný materiál vytvořený tímto způsobem si uchovává dutinku kolem rotujícího drátu a výsledná nanovláknenná hmota připomíná svým vzhledem tenkou hadičku. Tento typ nanovláknenného materiálu má potenciál stát se perspektivními cévními náhradami.

Výsledný tvar nanovláken ovlivňují i další parametry^{11,21,27}. Důležitá je viskozita zvlákňovacího roztoku. Viskozitu zvlákňovacího roztoku ovlivňuje při konstantní teplotě rozpouštědlo, koncentrace polymeru a délka polymerních řetězců. S rostoucí viskozitou roste i průměr vytvořených nanovláken^{27,28,29}. Zvýšení elektrické vodivosti zvlákňovacího roztoku, například rozpuštěním některé soli, vede ke snížení průměru nanovláken²⁹. Průměr nanovláken ovlivňuje také vzdálenost kolektoru od emitru. Větší vzdálenost a delší trajektorie poskytuje delší čas a větší prostor pro fázi "bičování", tedy fázi rychlého prodlužování nanovláken, což se projeví tenčím průměrem nanovláken^{27,30}. Teplota vzduchu ve zvlákňovacím zařízení ovlivňuje kromě viskozity i rychlost vypařování rozpouštědla ze vznikajícího nanovláken³¹. Také relativní vlhkost vzduchu ovlivňuje elektrickou vodivost a rychlost vypařování vodního zvlákňovacího roztoku.

Příprava nanovláken elektrostatickým zvlákňováním oproti dalším metodám přípravy nanovláken je vysoce verzatilní. Základní vybavení o jehlovém emitru, deskovém kolektoru a zdroji vysokého napětí lze modifikovat použitím různých typů emitrů, kolektorů a parametrů zvlákňování. Tato široká variabilita metody elektrostatického zvlákňování umožňuje připravit nanovláknenný materiál takzvaně "na míru" pro různé typy tkání a orgánů za použití stejného polymeru.

1.1.2. Polymery pro elektrostatické zvlákňování

V současnosti se podařilo elektrostaticky zvláknit více než 100 různých polymerů³². Pro úspěšné zvlákňování je potřeba najít takovou kombinaci polymeru a rozpouštědla, které má optimální elektrickou vodivost, viskozitu, povrchové napětí a optimální rychlost odpařování rozpouštědla^{11,21,32}. Splnění všech uvedených podmínek není jednoduchým úkolem, a proto je v některých případech nutné použít dvě nebo i více rozpouštědel³³.

Jenom pouhý zlomek ze stovky elektrostaticky zvláknitelných polymerů je možné použít v regenerativní medicíně³⁴. Mnohé polymery a z nich připravené nanovlákná

Podle svého původu se polymery pro elektrostatické zvlákňování dělí na přírodní a syntetické. Nejznámější a nejrozšířenější přírodní polymery, používané v regenerativní medicíně, jsou kolagen³⁵ a želatina³⁶, získávané z těl zvířat, chitosan, získávaný ze schránek mořských korýšů nebo z hub³⁷ (Obr. 2), fibroin z hedvábí zámotků motýlů bource morušového (*Bombyx mori*)³⁸ a alginát, získávaný z hnědých mořských řas³⁹. Výhodou přírodních polymerů je jejich výborná biokompatibilita, původ z obnovitelných přírodních zdrojů a jejich dostupnost (a s tím související nižší cena). Například chitosan (společně s jeho prekurzorem chitinem) je po celulóze druhým nejrozšířenějším polymerem na světě⁴⁰.

The image displays the chemical structures of three polymers: chitosan, PVA, and PCL. Chitosan is a polysaccharide composed of repeating units of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose, shown in its cyclic Haworth projection with an amino group at the C2 position. PVA (polyvinyl alcohol) is a linear polymer with a repeating unit consisting of a carbon-carbon backbone where one carbon has a hydroxyl group attached. PCL (polycaprolactone) is a linear polyester with a repeating unit consisting of a six-membered ring containing an ester group, with a terminal hydrogen atom on the oxygen.

chitosan

PVA

PCL

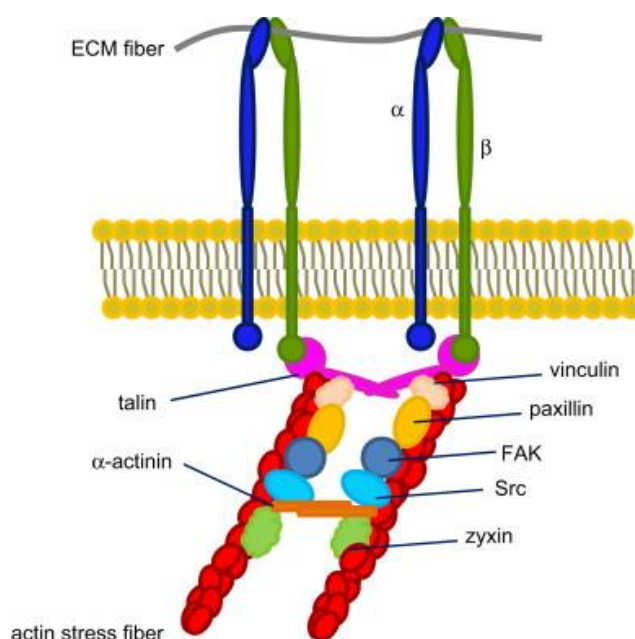
18

1.1.3. Buňky a nanovláknna připravená metodou elektrostatického zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování produkuje vlákna s průměrem několika desítek až stovek nanometrů. Materiál vytvořený z takto tenkých vláken má své specifické vlastnosti, mimo jiné vysoký poměr celkového povrchu nanovláken k jejich objemu či hmotnosti¹¹. Například jeden gram takového nanovláknenného materiálu by bylo možné rozložit na plochu několika desítek metrů čtverečných¹¹. Vysoká plocha povrchu nanovláknenného materiálu má za následek vysokou povrchovou energii. Buňky takové povrchy upřednostňují pro své přichycení⁴⁵.

V materiálu mohou být nanovláknna uspořádána volně, ale velmi často jsou vzájemně propletena. Nanoláknna jsou obklopena volným prostorem, což nanovláknenný materiál činí vysoce porézním⁴⁶. Takto uspořádaná struktura mikroprostředí je pro buňky klíčová. Póry materiálu umožňují přístup kyslíku a živin k buňkám a odvádění oxidu uhličitého a dalších toxických metabolitů.

Možnost ovlivňovat vlastnosti nanovláken výběrem polymerů, rozpouštědla, a nastavením vhodných vnějších a vnitřních parametrů elektrostatického zvlákňování pokládá otázku, jaké charakteristiky by měl mít ideální nanovláknenný nosič pro buňky. Ideální nanovláknenný nosič by měl primárně buňkám umožnit vysokou buněčnou adhezi ke svému povrchu. Buněčná adheze, tedy vazba buňky s ECM, je uskutečněna složitým přesným mechanickým mechanismem, na kterém se podílí mnoho různých molekul⁴ (Obr. 3).



Obr. 3. Zjednodušené schéma komplexu molekul, které se podílí na přenosu signálů z buněčné adheze do nitra buňky prostřednictvím integrinů (α , β podjednotky), aktinových vláken a signálních molekul. Převzato a upraveno Baker et Zaman (2010)¹³⁹.

Na molekuly ECM se vážou proteiny zprostředkující buněčnou adhezi jako např. fibronectin, vitronectin, osteopontin^{4,45,47}. Tyto proteiny zprostředkující buněčnou adhezi obsahují peptid RGD (Arg-Gly-Asp), který rozpoznávají transmembránové receptory buněk zvané integriny a váží se na ně svými extracelulárními doménami^{4,49}. Intracelulární domény integrinů se pak vážou na další komplexy molekul (vinkulin, talin, paxilin apod.) aktinových vláken^{4,49}. Aktin s myozinem vytvářejí uvnitř buňky kontrakce, nezbytnou součást buněčných dějů, umožňující pohyb buňky nebo její dělení⁴. Dalším typem molekuly, která se váže na intracelulární domény integrinů, je fokální adhezní kináza (FAK, syn. PTK2), která vytváří intracelulární signály pro změnu chování buněk⁵⁰. Způsob, jakým se buňka bude chovat, zda buňka začne migrovat nebo začne buněčné dělení, do jisté míry závisí na rozsahu a typu buněčné adheze k ECM nebo k jinému materiálu, což určují fyzikální a chemické vlastnosti jeho povrchu.

Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu materiálu závisí na jeho chemickém složení. Přítomnost konkrétních prvků v chemické vazbě definuje typ chemické vazby a určuje, zda je materiál hydrofilní nebo hydrofobní. Pokud je povrch materiálu složen z molekul s polárními vazbami, chová se jako hydrofilní a přitahuje molekuly vody. Naopak povrch materiálu složený převážně z molekul s nepolárními chemickými vazbami činí materiál hydrofobní a molekuly vody odpuzuje. Somatické buňky obecně upřednostňují hydrofilní povrchy. Nanomateriál s hydrofilním povrchem je díky své vysoké smáčivosti dobře hydratován a voda je jedním z klíčových faktorů pro udržení vhodné konformace molekul, které zprostředkovávají buněčnou adhezi (např. fibronectin, vitronectin nebo integrin)^{51,52}. Smáčivost materiálu však závisí také na struktuře povrchu. Membrána, vyrobená z nanovláknenného materiálu, vykazuje vyšší hydrofobii než film o stejné tloušťce, vyrobený z téhož polymeru. Se zmenšujícím se průměrem vlákna se zvyšuje hydrofobie nanovláknenného materiálu¹¹. Nanovláknenné materiály jsou proto jedny z nejvíce hydrofobních materiálů a označovány jako superhydrofobní⁵³. Je velmi pravděpodobné, že voda je odpuzována vzduchem, zachyceným v pórech nanovláknenného materiálu a čím menší je průměr nanovláken, tím větší množství vzduchu je v materiálu obsaženo⁵⁴. Navíc se zmenšujícím se průměrem nanovláken je voda odpuzována větším počtem polymerních řetězců, a to kvůli zvýšenému celkovému povrchu materiálu a tím i většímu kontaktu

polymerních řetězců s vodou⁵⁵. Polymery, které jsou pro buňky příliš hydrofilní ve formě filmů nebo hydrogelů, by mohly být mnohem přijatelnější ve formě nanovláken. Například keratinocyty a kožní fibroblasty byly dokonce schopny množit se a migrovat po vláknech vyrobených z 98% deacetylovaného polyvinylalkoholu⁵⁶.

Buňky reagují také na drsnost povrchu substrátu⁴⁵. Drsnost povrchu ve vláknitém materiálu je určena průměrem vláken^{11,57}. Obecně, jak bylo zjištěno studiemi *in vitro*, platí, že různým typům kultivovaných buněk se nejlépe daří na vláknech o průměru menším než 1 000 nanometrů, tedy na nanovláknenných strukturách. Například keratinocyty se nejlépe množily na PVA nanovlákněch o průměru 305 nm⁵⁶. Proliferace kožních fibroblastů na PVA vláknech o průměru 305, 667 a 1116 nm se významně nelišila a byla srovnatelná s jejich proliferací na skleněném krycím sklíčku⁵⁶. Avšak na nanovlákněch o průměru pouhých 69 a 161 nm byla proliferace kožních fibroblastů omezena a dosahovala nižších hodnot v porovnání se skleněným krycím sklíčkem⁵⁶. S rostoucím průměrem vláken se zvyšuje drsnost materiálu a snižuje mobilita buněk⁵⁶. Autoři této studie vyvodili, že kompromis mezi optimální mobilitou a proliferací kožních buněk by mohla představovat vlákna o průměru 300-700 nm⁵⁶. Podobně i 3T3 fibroblastům nejvíce vyhovovala PCL nanovláknena o průměrem menším než 1000 nm, kdy pro jejich proliferaci byla neoptimálnější nanovláknena o průměru okolo 500 nm⁵⁸.

Dalším faktorem, ovlivňujícím tvar a chování buněk je prostorové uspořádání nanovláken materiálu. Buňky, kultivované na náhodně orientovaných vláknech, jsou ploché, polygonálního tvaru a mají náhodně orientovaná α -aktinová vlákna síťovité struktury⁵⁹. Buňky, pěstované na uspořádaných vláknech mají vřetenovitý tvar a jsou prodlouženy ve směru vláken⁵⁹. Buněčná membrána těchto buněk obaluje vlákno a tvoří na těle buňky útvar podobný záhybu nebo drážky⁶⁰. Jejich α -aktinová vlákna se uspořádají rovnoběžně se směrem nanovláken⁵⁹. Prodloužení buněk bývá často provázáno prodloužením jader, které, v součinnosti s cytoskeletální reorganizací, může změnit expresi genů a chování buněk^{61,62}. Buňky na uspořádaných vláknech vykazovaly zvýšenou expresi integrinu $\alpha 1$, $\alpha 5$ a $\beta 1$ ⁶³. Integriny $\alpha 5$ a $\beta 1$ se účastní fibrilární adheze, která je typická pro buňky žijící v nativních podmínkách⁶⁴. Uspořádaná nanovláknena usnadňují buňkám migraci po povrchu materiálu. Na povrchu materiálu s náhodně uspořádanými nanovláknny má buňka plochý tvar se síťovitě uspořádanými α -aktinovými vlákny, která se na náběžné straně smršťují a vytvářejí četná rozšíření, tzv. lamelipodia, a táhnou dopředu tělo buňky s jádrem a její zadní část^{4,65}. Na nanovlákněch uspořádané struktury má buňka vřetenovitý tvar s prodlouženým jádrem a

paralelně uspořádanými α -aktinovými vlákny, která tělo buňky zužují a prodlužují podobným způsobem jako svalové buňky⁶⁵.

Migrující buňky jsou mimo jiné citlivé i na jakékoli narušení jejich dráhy⁶⁵. Proto materiál s paralelně uspořádanými vlákny je snadnější a rychlejší cestou pro migrující buňky než materiál s náhodně uspořádanými vlákny. Například u gliových buněk byla naměřena pětikrát větší rychlost migrace po paralelně uspořádaných vláknech než po náhodně orientovaných⁶⁵.

Výraznou nevýhodou materiálu připraveného elektrostatickým zvlákňováním je jeho plochý membránový tvar. Tento typ membrány vyhovuje spíše epiteliálním buňkám, jako například keratinocytům, které přirozeně žijí na ploché bazální lamě v kůži⁴. Mezenchymální buňky, například kožní fibroblasty, sice dokáží přežít, proliferovat a diferencovat na jeho povrchu, ale, kvůli velmi malým pórům mezi nanovláknami, nedokážou proniknout do nitra materiálu. Pro mesenchymální buňky je přirozené mikroprostředí tvořené prostorově orientovanými vlákny kolagenu a elastinu⁴. S klesající hodnotou průměru nanovláken klesá i průměr pórů v nanovlákněné membráně¹¹. Regenerovaná tkáň tedy představuje vlastně pouze jakousi tenkou živou slupku na povrchu nanovlákněné membrány. Do vnitřku této nanovlákněné membrány se buňky mohou dostat až po biodegradaci nanovláken, což je však nevyhnutně doprovázené ztrátou nanovlákněného materiálu, vhodného pro buněčnou adhezi.

S cílem odstranit tento nedostatek nanovlákněných membrán, bylo vyvinuto několik modifikací metody elektrostatického zvlákňování. Například pro zvýšení poréznosti nanovlákněného materiálu byla v průběhu elektrostatického zvlákňování na nanovlákna na kolektoru naprášena sůl⁶⁶. Nanovlákna sůl překryla a po ukončení zvlákňování byla tato sůl vymyta. Na místě krystalků zůstaly v materiálu póry o velikosti použitých krystalků soli⁶⁶. Podobně lze použít i namrzlý kolektor. Nanovlákna se postupně ukládají mezi rostoucí krystalky ledu, což výrazně zvyšuje poréznost vznikajícího nanovlákněného materiálu. Tato modifikovaná metoda elektrostatického zvlákňování se nazývá mrazové zvlákňování (angl. cryospinning) a její použití je omezeno pouze pro hydrofobní polymery⁶⁸. Ultrazvuk, použitý na již připravený nanovlákněný materiál ve vodném prostředí, vedl ke zvýšení poréznosti materiálu a tedy i prostupnosti tohoto materiálu buňkami (fibroblasty)⁶⁸.

1.1.4. Funkcionalizace nanovláken

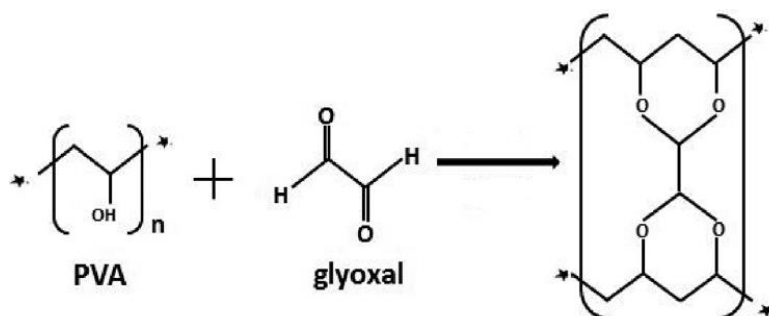
Procesem elektrostatického zvlákňování roztoku polymeru vzniká polymerní nanovláknenný materiál. Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu nanovláken odpovídají fyzikálním a chemickým vlastnostem polymeru, ze kterého jsou nanovláknna vytvořena. Tyto vlastnosti polymeru nemusí vždy odpovídat požadavkům výsledného nanomateriálu, například vhodnost pro vhodnou buněčnou adhezi a podobně. Povrch některých syntetických polymerů je příliš hydrofobní, a proto se hledají a vyvíjejí metody, jak tento hydrofobní povrch nanovláken modifikovat s cílem zvýšení jeho hydrofility. Obecně se procesy modifikace nanovláken s cílem vylepšovat jejich vlastnosti nazývají funkcionalizace nanovláken⁶⁹.

Funkcionalizace nanovláken je v současnosti zdaleka nejdůležitější a nejprogresivnější větví výzkumu nanovláken v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Dominance výzkumu funkcionalizace nanovláken je výsledkem postupné sukcese oboru. Po primární etapě výzkumu nanovláken, která řešila, jak neoptimálněji elektrostaticky zvláknit a připravit nanovláknna z polymerů, schválených pro použití ve veterinární a humánní medicíně, přišla následující etapa výzkumu, kladoucí si cíl najít metody, jak vylepšit biokompatibilitu nanovláken a připravit je takřikajíc "na míru" pro konkrétní tkáň. Vzhledem ke značné diverzitě metody elektrostatického zvlákňování a také množství různých typů buněk a tkání, které jsou v zájmu regenerativní medicíny, je vysoká také diverzita metod funkcionalizace nanovláken.

Nejjednodušší metodou funkcionalizace nanovláken je přimíchání chemické látky do zvlákňovacího roztoku polymeru, tedy tzv. metoda „zvlákňování z blendy“¹¹. Nanovláknna obsahující tuto chemickou látku mají odlišné vlastnosti oproti nanovláknům bez obsahu této látky. Za účelem zvýšení smáčivosti materiálu, lze do roztoku hydrofobního polymeru přimíchat hydrofilní polymer, například želatinu do PCL roztoku⁷⁰. Funkcionalizovaná nanovláknna budou více hydrofilní a mít vyšší biokompatibilitu než prostá PCL nanovláknna⁷⁰. Do zvlákňovacího roztoku tak lze přimíchat například růstové faktory⁷¹, hormony⁷², vitamíny⁷³ a další bioaktivní látky⁷⁴. Tyto látky se pak uvolňují do prostředí a ovlivňují chování buněk. Připravená nanovláknna tak napodobují další funkci ECM, která má přirozenou schopnost vázat a uvolňovat tyto informační molekuly¹⁰.

Přimíchání chemické látky do zvlákňovacího roztoku může také stabilizovat strukturu nanovláken. Jedná se o bifunkční až multifunkční činidlo, které chemicky propojuje jednotlivé polymerní řetězce ve struktuře nanovláknna, tedy zesiluje polymer (angl. crosslinking). Takto lze například síťovat PVA nanovláknna glyoxalem⁷⁵ (Obr. 5).

Nesíťovaná PVA nanovláknna se při ponoření do vody okamžitě rozpouštějí, síťovaná nanovláknna nikoliv^{44,75}. Doba, za kterou se síťovaná PVA nanovláknna ve vodním prostředí rozpadnou, závisí na intenzitě síťování PVA, tedy poměru PVA a glyoxalu⁷⁵. Nanovláknna mohou být síťována také fyzikálně, použitím tepla⁷⁶, UV záření⁷⁷ či rentgenového nebo gama záření⁷⁸.



Obr. 5. Schéma reakce PVA s glyoxalem je principem funkcionalizace PVA nanovláken pro zvýšení stability PVA nanovláken ve vodním prostředí. Převzato a upraveno podle Panigrahi et al. (2019)¹³⁸.

Chemickou látku je možné do vnitřku nanovláken uzavřít. Uzavřená látka může být pevná nebo také kapalná látka. Pro představu, systém nanovláknno s uzavřenou kapalinou připomíná svým vzhledem 10000 x zmenšené brčko s nápojem uvnitř. Látka uzavřená do nanovláken je chráněná před vnějšími vlivy, což může prodloužit její životnost a možnost zachovat si vysokou bioaktivitu. Uzavřená látka se z nanovláken uvolní až po rozpadu struktury nanovláknna. Rychlost rozpadu nanovláknna tedy určuje rychlost uvolňování uzavřené látky do prostředí nanovláknenného materiálu. Rozpad nanovláknna může probíhat buď rozpouštěním jeho polymeru anebo chemickým rozkladem polymeru. Rychlost obou procesů lze do značné míry ovlivnit a dle potřeby správně "načasovat" uvolňování obsažených látek do prostředí.

Rychlost rozpouštění polymeru lze ovlivnit funkcionalizací v podobě síťování polymeru, jako například u PVA^{44,75}. Chemický rozklad polymerního nanovláknna závisí na délce řetězců polymeru⁷⁹. Volbou polymeru s vhodnou délkou řetězců by bylo možné řídit rychlost rozpadu nanovláknenného materiálu a tím uvolňování jeho obsahu^{44,75}.

Změnou chemického složení povrchu nanovláken, která by bránila konkrétním enzymům v rozkládání povrchu nanovláken, by bylo možné zpomalit rychlost degradace polymeru a uvolnění obsažené látky.

Elektrostaticky lze zvláknovat nejen roztoky látek, ale také disperzní systémy, jako například emulze. Principem je rozpuštění polymeru v rozpouštědle, ve kterém je přítomná další nerozpustná zvláknovaná látka. Většinou se používá hydrofobní polymer v organickém rozpouštědle a jako zvláknovaná látka některá bioaktivní látka ve vodní fázi⁸⁰. Nejdůležitějším úkolem v emulzním zvláknování je příprava emulze s tak malými kapénkami, aby mohly být obsaženy ve struktuře nanovláknů. Jedná se tedy o přípravu nanoemulze s kapénkami o průměru několik desítek až stovek nanometrů, obvykle v rozmezí 20-200 nm. Nanoemulzi lze připravit například použitím ultrazvuku⁸¹, ale také mechanicky intenzivním mícháním⁸⁰. Nezbytnou součástí přípravy nanoemulze je přimíchání vhodného surfaktantu, který snižuje povrchové napětí mezi oběma fázemi a stabilizuje celý disperzní systém. Potřeba surfaktantu je nezbytná proto, že plocha, kterou jsou obě fáze disperzního systému ve vzájemném kontaktu, je relativně velká vzhledem k miniaturní velikosti kapének⁸². Surfaktant také snižuje povrchové napětí zvláknovací směsi při zvláknovacím procesu⁸².

Pokročilejším postupem je uzavření nanovláknů do jiného nanovláknů za vzniku koaxiálního nanovláknů. Vnější neboli plášťový polymer tak obaluje a chrání vnitřní nanovláknů nazývané jádro. Nemusí se přitom nutně jednat pouze o jedno uzavřené jádrové nanovláknů. Koaxiálním elektrostatickým zvláknováním se podařilo připravit koaxiální nanovláknů s více druhy jádra⁸³. Taková nanovláknů se označují jako multikoaxiální nanovláknů.

Vlastnosti povrchu nanovláknů určují schopnost buněčnou adhezi k nanovlákněnému materiálu. Míra buněčné adheze zase zpětně ovlivňuje chování buněk. Nejrozšířenější metodou funkcionalizace povrchu nanovláken je chemické navazování širokého spektra molekul (angl. grafting). Například navazováním kolagenu na povrch PES nanovláken došlo ke snížení jejich hydrofobie a zvýšení jejich biokompatibility⁸⁴. Nevýhodou metody chemického navazování molekul na povrch nanovláken je nutnost použití silných chemických činidel, která mají často silné cytotoxické či mutagenní účinky. I reziduální množství těchto chemikálií může být pro pacienta rizikem. Proto se od této metody čím dál více upouští a hledají se alternativy, jakým způsobem funkcionalizovat povrch nanovláken bezpečněji.

Funkcionalizace povrchu nanovláken adsorbí molekul by mohla být bezpečnější alternativou k chemickému navazování. Vláknů přirozené ECM mají schopnost adsorpce různých bioaktivních molekul, přítomných v organismu, jako jsou například růstové faktory, na svůj povrch¹⁰. Chybí zde však informace, jaká je vlastně dynamika adsorpce a desorpce

proteinu k povrchu nanovláken, jak dlouhá a jak pevná je adsorpce proteinů k povrchu nanovláken a jak velký vliv má na zvýšení biokompatibility nanovláken. I přes mnoho neznámých se zdá, že se jedná o jednoduchou a zároveň levnou metodu, kdy se nanovlákná funkcionalizují sama pasivně ponořením do roztoku proteinů nebo kultivačního média.

Další alternativní metodu k chemickému navazování molekul na povrch nanovláken je použití plazmatu. Na modifikaci nanovláken se používá studené plazma, připravené ionizací plynu. Studené plazma i přes svou nižší energii, nižší teplotu částic a nižší hustotu elektronů, v porovnání s horkým plazmatem, je pro úpravu povrchu nanovláken vhodnější, protože nezpůsobuje tepelnou destrukci nanovláken. Studené plazma má nižší hustotu elektronů při nízké nebo pokojové teplotě⁸⁶. Expozici studeným plazmatem dohází k chemickým reakcím mezi molekulami povrchu nanovláken a ionty plazmatu, čímž se mění chemické složení povrchu nanovláken. Nejčastěji používanými plyny k produkci studené plazmy jsou kyslík⁸⁷, vzduch⁸⁸, amoniak⁸⁹, dusík⁹⁰ a argon^{91,92}. Tyto plyny vedou ke vzniku nové polární chemické vazby, která snižuje hydrofobii povrchu a tím zlepšuje biokompatibilitu. Park et al. (2007) porovnávali biokompatibilitu PLGA nanovláken, modifikovaných plazmatem kyslíku a amoniaku⁸⁷. Nemodifikovaná PLGA nanovlákná jsou přirozeně hydrofobní s kontaktním úhlem smáčivosti 134°. Po modifikaci kyslíkovou plazmou se kontaktní úhel snížil na 115°, při použití amoniakové plazmy dokonce na 45° a dochází tedy k výraznému zvýšení hydrofilie. Rychlost růstu fibroblastů byla téměř čtyřikrát vyšší u nanovláken, modifikovaných kyslíkovou plazmou než u vláken nemodifikovaných. Buňky na nanovlákních modifikovaných čpavkovou plazmou rostly dokonce osmkrát rychleji než na vlákních bez modifikace. Toto zlepšení biokompatibility bylo pozorováno v případě PCL nanovláken⁹³. Modifikace kyslíkovou plazmou pomohlo dosáhnout lepší adheze osteoblastů, vyšší proliferace a osteogenní diferenciace. Yeong et al. (2009) použili směs metanové a kyslíkové plazmy k ošetření nanovláken z hedvábných fibroinů⁹⁴. Nanovlákná fibroinu hedvábí jsou přirozeně hydrofobní s kontaktním úhlem 115°. Modifikace metanovou plazmou měla za následek zvýšení kontaktního úhlu na 135°, tedy nežádoucí zvýšení hydrofobie⁹⁴. Zatímco kyslíkové plazma hydrofilii výrazně zvýšilo, kdy kontaktní úhel se snížil ze 115° na 39°, při stejné době expozice⁹⁴. Následné porovnání chování buněk prokázalo, že hydrofilní povrch zlepšil růst keratinocytů na rozdíl od hydrofobních⁹⁴.

Funkcionalizace nanovláken plazmou nezanechává v materiálu toxické zbytky⁹⁵. Plazma proniká dovnitř struktury materiálu pouze do hloubky nižší jednoho nanometru⁹⁶, a proto modifikuje pouze povrch nanovláken a nenarušuje ani nemění primární strukturu a tím

i cenné vlastnosti materiálu, jako je například elasticita PCL nanovláken. Studená plazma by mohla mít navíc i sterilizační účinky na nanovlákná, aniž by je poškozovala teplem nebo ionizujícím zářením.

Dalším způsobem funkcionalizace nanovláken je jejich spojení s jiným typem materiálu za vzniku tzv. kompozitu. Vzniklý kompozit má vlastnosti obou materiálů. Metoda slouží k modifikaci výhodných vlastností materiálu a eliminaci nevýhod původního materiálu. Pravděpodobně největší nevýhodou nanovláknenného materiálu je jeho nízká mechanická pevnost. Buňky využívají pouze povrch nanovláknenné membrány, pokud nemají možnost infiltrovat nanovláknenný materiál. Ani nanovláknenná membrána z mechanicky pevnějších polymerů, kterými jsou PCL nebo PVA, nedokáže udržet chirurgické stehy při mechanickém namáhání tkáně a je nutná příprava kompozitní struktury za účelem zvýšení pevnosti výsledného materiálu. Kompozit se připravuje nejčastěji elektrostatickým povlákáním povrchu materiálu. Nerovnosti povrchu povlákávaného materiálu přitahují nanovlákná a dochází k jejich vrstvení na povrchu původního materiálu⁹⁶. Kompozitní materiál s vrstvou nanovláken, která umožňuje vyšší adhezi buněk, má vyšší biokompatibilitu než původní materiál bez nanovláken⁹⁶.

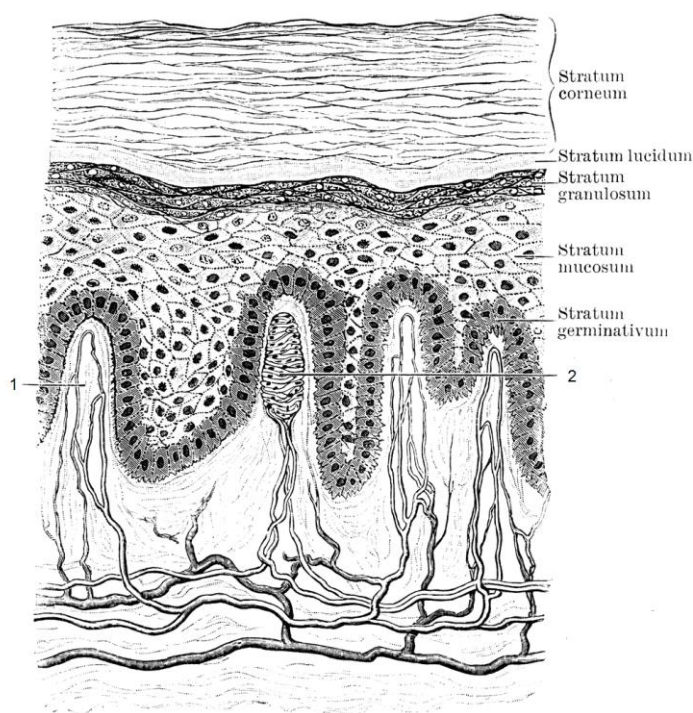
Pravděpodobně nejradiálnější metoda funkcionalizace nanovláken je jejich kryogenní mletí neboli také kryogenní frakcionalizace⁹⁷. Při této metodě dochází ke zmrazení nanovláknenných membrán kapalným dusíkem, čímž se stanou křehčími, a následně jsou vystavena mechanické frakcionalizaci použitím vibrujícího kovového kladívka. Výsledkem frakcionalizace nanovláknenných membrán je jemný prášek s částicemi o velikosti několik desítek nanometrů až několika mikrometrů⁹⁷. Frakcionalizované nanovlákná představují další typ materiálu, na kterém lze pěstovat buňky⁹⁷.

1.2. Hojení ran

1.2.1. Hojení kožních ran

Proces hojení tkání je nejlépe prostudovaný na kůži, zejména díky snadnému přístupu k tomuto orgánu i jeho velikosti, kdy povrch kůže u dospělého člověka dosahuje plochy až dva metry čtverečné⁹⁸. Na tomto orgánu dochází navíc ke kontaktu a k interakcím s okolním prostředím, jehož výsledkem bývají častá poranění různého rozsahu a závažnosti. Při poranění kůže jakéhokoli rozsahu je vždy porušena ochranná bariéra organismu a hojení rány probíhá, na rozdíl od vnitřních ran, v interakci s vnějším prostředím.

Kůže je plochý orgán vrstevnaté struktury (Obr. 6). Rozlišují se tři základní kožní vrstvy: epidermis, dermis a hypodermis. Epidermis, jako vnější vrstva, je v přímém kontaktu s okolním prostředím a na svém povrchu obsahuje tzv. stratum corneum, což je vrstva odumřelých keratinocytů s vysokým obsahem keratinu. Pod stratum corneum se nachází, u kůže tlustého typu, tenká vrstva odumřelých epitelových buněk zvaná stratum lucidum⁹⁹ a další vrstvou epidermis je tzv. stratum granulosum, obsahující epitelové buňky s granulemi, vyplněnými prekurzorem keratinu. Vrstva pod stratum granulosum, zvaná stratum spinosum, obsahuje epitelové buňky, spojené těsnými buněčnými spoji, tzv. desmozomy. Tento typ buněčného spoje představuje nejpevnější a nejodolnější spojení buněk cytoskeletu a zajišťuje mechanickou pevnost epidermis⁹⁹. Nejspodnější vrstva epidermis, stratum basale, je tvořena jedinou vrstvou buněk, které však mají pro regeneraci kůže nepostradatelný význam. Tyto buňky jsou mitoticky aktivní a doplňují buněčnou hmotu do ostatních vrstev kůže. Buňky stratum basale jsou ukotveny na bazální lamina, což je extracelulární matrix ve tvaru tenké membrány⁹⁹. Bazální lamina připojuje k epidermis vrstvu dermis⁹⁹.

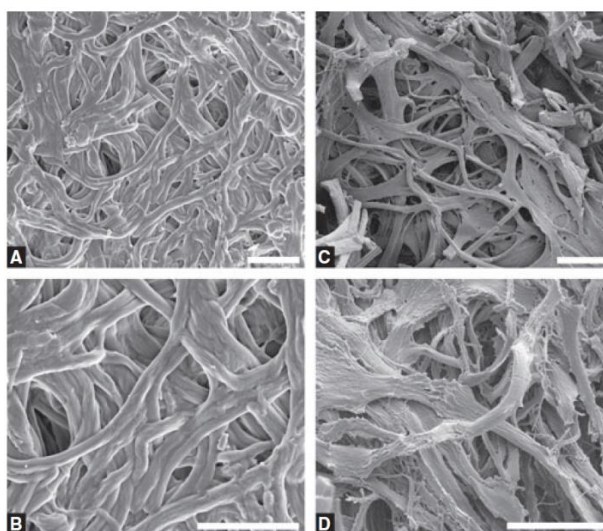


Obr. 6. Stavba kůže. (1) Cévní pleteň. (2) Vaterovo–Paciniho tělísko (mechanoreceptor doteku). Převzato a upraveno podle Cunningham (1903)¹⁴⁰.

Dermis, označovaná i jako škára, neobsahuje, na rozdíl od epidermis, epitelové buňky. Dermis je složená ze dvou vrstev - stratum papillare a stratum reticulare, prostorově

orientovaných kolagenových a elastických vláken, fibroblastů a sítí kapilár. Ve vrstvě stratum reticulare se nacházejí kožní receptory a jsou zde kořeny chlupů a kořenové folikuly.

Hypodermis neboli podkožní vrstva, je nejhlubší vrstva kůže, tvořena kolagenním vazivem a tukovou tkání. Hypodermis spojuje kůži s tkáněmi, ležícími pod kůží, jako jsou mimo jiné fascie svalů, okostice a perichondrium chrupavek⁹⁹



Obr. 7. SEM snímky ECM zbavené buněk z biopsií kůže od 35leté (A, B) a od 90leté (C, D) ženy. Měřítka je 10 μ m. Převzaté Schmelzer et al. (2012)¹⁴¹.

Způsobů a typů zranění kůže je značná diverzita. Lze ale obecně rozlišovat povrchová zranění, poškozující pouze epidermis, a hluboká zranění (angl. full-thickness wound), zasahující celý kožní profil¹⁰⁰.

Následující proces hojení bude popsán na příkladu hluboké rány, kdy složitý proces hojení kožní rány obsahuje čtyři, vzájemně se překrývající, stádia: stádium hemostázy, stádium zánětu, stádium proliferace a stádium remodelace¹⁰¹.

Okamžikem vzniku kožní rány začíná stádium hemostázy. Cílem stádia hemostázy je zastavit ztrátu krve a zabránit průniku patogenů dovnitř organismu¹⁰¹. Dochází k okamžité vazokonstrikci a omezení průtoku krve postiženým místem. Specifické mikroprostředí v ráně způsobuje změnu chování trombocytů. Krevní destičky agregují a uvolňují do prostředí rány fibrinogen. Rozpustného fibrinogenu se v ráně mění na vláknitý nerozpustný fibrin za vzniku krevní sraženiny, zátky, která ucpe cévy, přítomné v ráně¹⁰². Součástí krevní sraženiny jsou, kromě jemných fibrinových nanovláken o průměru přibližně 100 nm, také trombocyty¹⁰³. Trombocyty jsou zdrojem růstových faktorů (např. PDGF, EGF, TGF- β , IGF-1), potřebných pro zacelení rány^{104,105}.

Po zastavení krvácení cévy uvolní vazokonstrikci za vzniku vazodilatace¹⁰⁶. Vazodilatace napomáhá buňkám imunitního systému migrovat do rány. Buňky imunitního systému se aktivují specifickým mikroprostředím rány a uvolněnými růstovými faktory trombocytů¹⁰⁵. Neutrofilní granulocyty fagocytózou nejprve zlikvidují zbytky poškozené tkáně, jako jsou mrtvé buňky, částičky ECM a také přítomné patogeny¹⁰². Poté jsou neutrofilní granulocyty vystřídány monocyty, které se v mikroprostředí rány diferencují na makrofágy¹⁰¹. Makrofágy, kromě čištění rány fagocytózou a uvolňováním enzymů (MPPs, chitinázy)¹⁰⁷, také uvolňují signální molekuly, které v ráně stimulují další buňky - fibroblasty a endotelové buňky^{108,109}.

Přirozenou a nedílnou součástí procesu hojení tkáně je zánět, který má za cíl stimulovat buňky, přítomné v ráně, k proliferaci. Při některých specifických podmínkách, jako například onemocnění diabetes mellitus, masivní bakteriální infekce nebo pokročilý věk pacienta, může hojení rány zůstat ve stádiu zánětu delší dobu, řádově týdny až měsíce, za vzniku chronické rány¹⁰¹. Chronická rána není schopna přejít do dalších fází hojení a zcela se zahojit. Navíc dlouhodobá aktivita stimulovaných imunitních buněk v nehojící se ráně navíc poškozuje okolní tkáň a snižuje její schopnosti vlastní regenerace téměř na minimum¹⁰⁹.

Uvolnění signálních zahájí další stádium hojícího procesu, stádium proliferace¹⁰⁰. Výsledkem toho stádia je namnožení buněk v ráně. Množí se endotelové buňky vytvářejí nové cévy v dermis. Reagují tak na zvýšenou poptávku po kyslíku a živinách¹⁰², které intenzivně spotřebovávají značně namnožené fibroblasty pro produkci nové ECM, a to zejména elastických vláken a vláken kolagenu typu III¹¹⁰. Nově vytvořená ECM formuje granulační tkáň. Granulační tkáň je dočasná ECM v hojící se ráně. Slouží jako lešení pro migraci epiteliálních buněk z okrajů rány do jejího středu¹¹¹. Buňky epitelu změni v tomto místě rány svůj epiteliální fenotyp na mezenchymální a améboidním pohybem migrují do centra rány¹¹². Po dosažení cílového místa v ráně změni mezenchymální fenotyp zpět za epiteliální, vytvoří bazální laminu, namnoží se a obnovují epidermis v procesu tzv. reepitelizace¹⁰².

Mnohé fibroblasty se změni na kontraktilní myofibroblasty, které svou kontrakcí zmenšují plochu granulační tkáně. Kontrakce granulační tkáně vytváří mechanický tlak na fibroblasty a mikrocévy, které následkem toho apopticky odumírají, a zastaví tak bujnou buněčnou proliferaci a produkci nové ECM¹¹³.

Pokud je stimulace fibroblastů příliš intenzivní dochází k hyperplazii, masivnímu namnožení buněk a nadměrné produkci kolagenu, mající za následek vznik hypertrofické

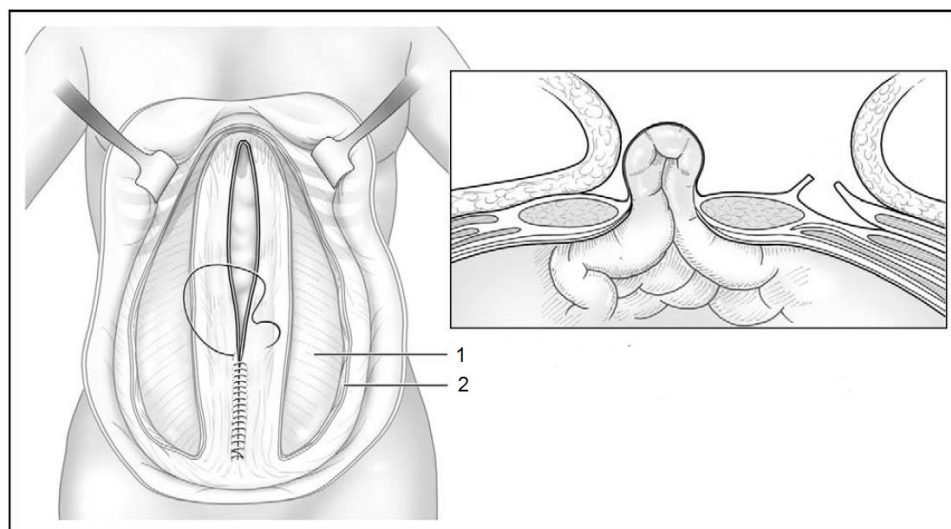
nebo keloidní jizvy, což lze chápat jako jistý protipól k chronické ráně. Keloidní jizva, na rozdíl od hypertrofické, přerůstá plochu původního zranění a prorůstá i do okolní zdravé tkáně.

V posledním stádiu hojení rány, stádiu remodelace, dochází k přestavbě granulační tkáně na zralou funkční tkáň, enzymatickému odbourávání granulační tkáně a syntéze nové ECM, ve které dominuje kolagen typu I¹¹⁰.

1.2.2. Hojení fascie a incizionální kýla

Incizionální kýlu lze definovat jako mezeru v břišní stěně v oblasti pooperační jizvy, která je citelná anebo zjištělná klinickým vyšetřením či zobrazovacími metodami¹¹⁴. Jedná se o přerušení kontinuity břišní stěny v místě jizvy např. po laparotomii, chirurgickém otevření břišní dutiny¹¹⁵ (Obr. 7).

Hojení incize fascií břišních svalů probíhá podobně jako u kůže se stádií hemostázy, proliferace a remodelace¹¹⁶. Na rozdíl od hojení kůže se však na procesu hojení incize fascie neúčastní epiteliální buňky. Analýza sér kultur buněk, izolovaných z incize krysí fascie, ukázala změny v relativním zastoupení makrofágu a fibroblastů¹¹⁷. První den po operaci bylo v incizi 84% makrofágů z veškerých přítomných buněk. 28. den po operaci byl zaznamenán jejich pokles na 15%. Naopak fibroblasty zvýšily své zastoupení z 2 % (první den po operaci) na 65% (den sedmý) a 80% 28. den. Maximální množství buněk v kultuře bylo ze vzorku, odebraného pátý den po operaci, což odpovídá stádiu proliferace¹¹⁷.



Obr. 7. Incizionální kýla. Detail zobrazuje příčný řez břišní stěnou v místě kýly. (1) vnitřní šikmý sval břišní, (2) zevní šikmý sval břišní. Převzato a upraveno podle Clarke (2010)¹⁴².

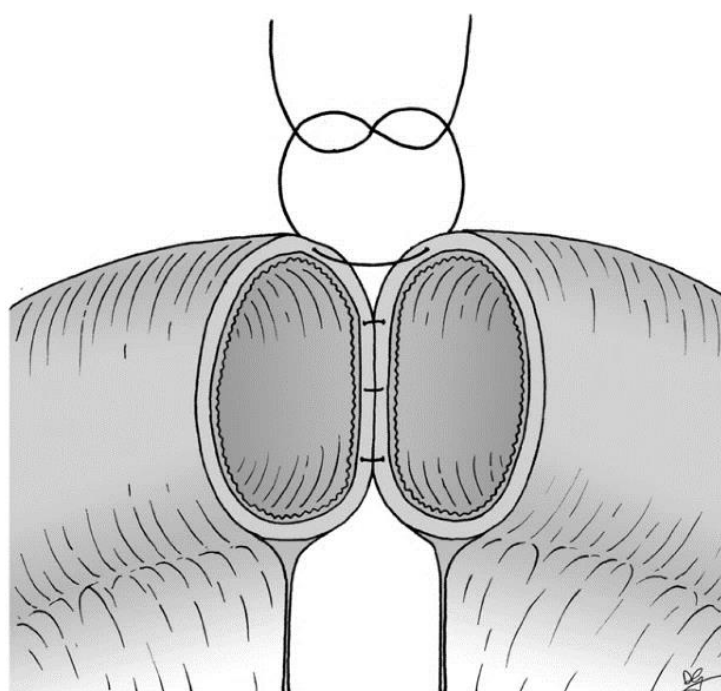
Nejčastější příčinou vzniku incizionální kýly je zřejmě nedostatečné zhojení incize ve fasciích břišních svalů. Nedostatečně zhojená jizva má sníženou biomechanickou pevnost a při fyzickém namáhání břišní stěny poté dochází k ruptuře jizvy. Na úrovni tkání a buněk se nedostatečné zhojení facie projevuje nepřírodným složením a uspořádáním vláken ECM, především vláken kolagenu. U pacientů s incizionální kýlou bylo pozorováno zvýšení obsahu kolagenu typu III a snížení celkového poměru kolagenu typu I vzhledem k množství kolagenu typu III¹¹⁸. Dokonce u recidivních kýl bylo zjištěno snížení poměrů kolagenu typu I až o 70%¹¹⁹. Je známo, že kolagen typu III vytváří tenčí vlákna než kolagen typu I. Tenčí vlákna kolagenu III jsou mechanicky méně odolná než vlákna kolagenu I. Zvýšení množství kolagenu typu III na úkor typu I má za následek mechanické oslabení místa zhojené incize břišní stěny. V hojící se incizi byla mimo jiné zjištěna tak zvýšená koncentrace metaloproteinázy (MPP), enzymu štěpící kolagen¹²⁰. Ve fyziologickém procesu hojení tkáně je hlavní složkou ECM granulační tkáň ve stádiu proliferace kolagen typu III, který je v následujícím stádiu remodelace postupně nahrazován pevnějším kolagenem typu I. Snížení poměru kolagenu typu I a navýšení kolagenu typu III nabádá k závěru, že tato nerovnováha je výsledkem nedostatečně prodělané fáze remodelace tkáně. Důležitou skutečností je však fakt, že u pacientu s incizionální kýlou byl nalezen snížený poměr kolagenu typu I ku kolagenu typu III nejen v místě zhojení incize, ale také v kůži¹²¹. Zdá se, že se velmi pravděpodobně jedná o genetickou poruchu, která způsobuje tento nefyziologický poměr kolagenu typu I a III v tkáních¹²¹.

1.2.3. Hojení střevních anastomóz

Termínem anastomóza se označuje chirurgické spojení mezi dvěma dutými tělesnými strukturami, které transportují tekutiny, jako jsou cévy nebo urogenitální a gastrointestinální trakt (GIT) (Obr. 8). V obecné chirurgii jsou anastomózy jedny z nejčastějších chirurgických zákroků.

Stěna GIT se skládá ze čtyř vrstev: sliznice, submukóza, svalová vrstva a seróza⁹⁹. Serózní vrstvu postrádá pouze jícen a spodní třetina konečníku⁹⁹. Ruční šití umožňuje různé techniky šití. Stehy mohou být vyrobeny z jednoho vlákna šicího materiálu, kontinuálního stehu nebo provedeny sérií jednotlivých stehů, které nejsou spojeny, tzv. přerušným stehem¹²². Anastomózu lze navíc šít jednovrstvou extramukozální nebo dvouvrstvou technikou. Obecně se předpokládalo, že dvojité šití je účinnější, tedy pevnější a tím i

bezpečnější než metoda jednovrstvá. Srovnávací studie však ukázala, že jednovrstvá extramukozální technika je stejně pevná jako dvouvrstvá¹²³. Stehy v jednovrstvé extramukozální anastomóze sešívají serózu a submukózu. Druhá vrstva obsahuje propletená vlákna kolagenu (typ I, III a V) a elastická vlákna; vrstva je zodpovědná za větší pevnosti v tahu. V důsledku toho je submukóza vhodná pro ukotvení stehu v jednovrstvé anastomóze. Dvouvrstvá anastomóza se skládá z vnitřního stehu, který prošívá všechny vrstvy a vnějšího stehu, který je proveden přes serózní a svalovou vrstvu. Nadbytečné stehy více poškozují submukózní nervový a vaskulární plexus, což může negativně ovlivnit zásobení tkáně živinami a kyslíkem, jež jsou klíčovými faktory pro buněčnou proliferaci a produkci kolagenu při hojení střevní rány.



Obr. 8. Schéma konstrukce střevní anastomózy technikou end-to-end. Převzato a upraveno podle Ross et al. (2016)¹⁴³.

Hojení střevní anastomózy je složitý proces, rozdělený do tří překrývajících se stádií (fází): stádium zánětu (fáze zpoždění, 0–4 dny po operaci), stádium proliferace (fáze fibroplazie, dny 3–14) a stádium reorganizace tkáně (fáze maturace cca po 10 dnech)^{124,125}. Bezprostředně po resekci střeva je zahájena hemostatická vazokonstrikce, následovaná sekundární vazodilatací¹²⁴. Rozšíření cév a zvýšení jejich propustnosti způsobuje otok na obou koncích přerušené tkáně. Vazodilatace také pomáhá leukocytům migrovat do místa rány. Leukocyty, granulocyty a makrofágy čistí ránu od nekrotické tkáně, poškozené ECM a patogenů. Leukocyty uvolňují signální molekuly, např. cytokiny, které spolu s hypoxií

stimulují tvorbu nových cév. Nové cévy v ráně přivádí krev s výživou a kyslíkem, základními faktory pro syntézu kolagenu a tvorbu granulační tkáně. Granulační tkáň slouží jako dočasné přemostění, umožňující migraci buněk epitelu ze sliznice do rány. Nově vytvořený slizniční kryt utěšňuje ránu z lumenální strany a zabraňuje pronikání střevního obsahu do rány a do tělní dutiny. Během následující fáze proliferace dochází k množení buněk a k masivní produkci kolagenu. Na rozdíl od kožní rány, při hojení střevní stěny je kolagen produkován fibroblasty a buňkami hladké svaloviny¹²⁴. V závěrečném stádiu hojení tkáně, stádiu reorganizace, dochází k maturaci buněk a prostorovému uspořádání kolagenových vláken.

Intenzita, načasování a trvání jednotlivých stádií hojení anastomózy se liší pro různé části GIT. Například u králíků byly pozorovány rozdíly mezi hojením anastomózy ilea, tedy (konečná část tenkého střeva) a tlustým střevem¹²⁶. Sedm dní po operaci byly granulocyty a nekrózy stále hojně přítomny v anastomózách tlustého střeva, v anastomóze ilea však chyběly. Navíc u anastomóz tlustého střeva byly sliznice tlustého střeva, ve většině zkoumaných případů, zhojeny nedostatečně, na rozdíl od zcela zhojených sliznic ilea. Celkově byla míra hojení anastomóz tlustého střeva výrazně nižší než u anastomóz ilea. Autoři vyloučili, jako možnou příčinu rozdílného hojení, rozdílný průtok krve v ileu a tlustém střevě. Jako pravděpodobnější důvod zmínili delší přítomnost granulocytů v anastomóze tlustého střeva. Granulocyty produkují kolagenázy, enzymy štěpící kolagen¹²⁷. Tato skupina enzymů hraje důležitou roli během čištění rány a během reorganizace kolagenových fibril v granulární tkáni rány. U anastomóz tlustého střeva, zejména v bezprostřední blízkosti stehu, byly histochemicky detekovány výrazné ztráty kolagenu (pokles o 29% ve srovnání se vzdálenějšími oblastmi) a vyšší koncentrace kolagenáz (MMP-8 a MMP-9)¹²⁸. Vysoká koncentrace kolagenáz může bránit tvorbě granulační tkáně, klíčového meziprojektu hojení střevních ran. Nižší množství kolagenu oslabuje pevnost anastomózy v tahu a může vést k vážným pooperačním komplikacím.

Nejproblematictějšími orgány pro tvorbu anastomóz jsou jícen, tlusté střevo a konečník. Kolorektální anastomózy (spojení mezi tlustým střevem a konečníkem) mají, ve srovnání s anastomózami tenkého střeva, relativně vysoký výskyt pooperačních komplikací a také mortality. Četné studie prokázaly sníženou schopnost hojení v této problematické části GIT^{130,131,132}. U kolorektálních anastomóz je vysoká četnost výskytu dehiscence anastomózy, mající za následek prosakováním střevního obsahu (anastomotic leak). Jedná se o jednu z nejzávažnějších a život ohrožujících pooperačních komplikací střevních anastomóz, vyskytující se u až 10% operovaných pacientů^{133,134}. V nejzávažnějších

případech může anastomotický leak vyvolat život ohrožující stav. Obsah střev kontaminuje peritoneální dutinu, což vede ke sterkorální peritonitidě, sepsi, následnému selhání orgánů a smrti. Pro záchranu života pacienta je nutný další operační zákrok, spočívající v odstranění předchozí anastomózy a vytvoření nové. Součástí opětovné operace je nutné provedení stomie, umělého vývodu střevního obsahu na povrch těla¹²⁹.

Jedním z přístupů, vedoucích ke snížení výskytu anastomotického leaku, je adekvátní perioperační péče - typ anestezie a analgezie, profylaxe antibiotiky, ochranná stomie a vhodné techniky anastomózy podporující hojení¹³⁵. Těsné spojení příslušných vrstev obou střevních segmentů po resekci je klíčovým faktorem pro zhojení anastomózy. Pokud jsou například přímo střevní vrstvy, sliznice může být zhojena již do tří dnů po operaci. V případě everze a inverze sliznice je však proces zhojení sliznice prodloužen, pravděpodobně z důvodu delší dráhy migrace buněk epiteliálních sliznic¹²⁴.

2. CÍLE PRÁCE

1. Příprava a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení hlubokých kožních ran.
2. Příprava a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení fascie po reparaci abdominální kýly.
3. Příprava a testování nanovláčenného systému pro podporu hojení střevních anastomóz.

3. METODIKA

3.1. Metodika přípravy a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení hlubokých kožních ran.

3.1.1. Příprava a funkcionalizace nanovláknenných membrán

Nanovláknenné membrány byly připraveny pomocí elektrostatického zvlákňování použitím drátového emitru a zachytávání na drátový kolektor s polypropylénovou netkanou textilií (plošná hmotnost 30 g/m², Pegas), pro lepší manipulaci s nanovláknem. PCL nanovláknenné membrány byly připraveny z 24% (w/v) roztoku PCL ($M_w=45\,000$, Sigma-Aldrich) ve směsi chloroformu (Sigma-Aldrich) a etanolu (Penta s.r.o.) v poměru 9:1. PVA nanovláknena byla elektrostaticky zvlákňována z vodného roztoku PVA o celkové koncentraci 12 % (hm.). Na přípravu 10 % roztoku PVA byl použit nízkomolekulární PVA (5-88, $M_w \sim 35\,kDa$, dále označovaný jako L, Merck) a vysokomolekulární PVA (40-88, $M_w \sim 205\,kDa$, dále označovaný jako U, Merck). Bylo připraveno pět různých vzorků PVA nanovláknenných membrán s různým poměrem hmotnosti polymerů PVA (3U : 1L, 2U : 1L, 1U : 1L, 1U : 2L a 1U : 3L).

PVA nanovláknena byla funkcionalizována glyoxalem (Sigma-Aldrich, koncentrace 40 000 ppm ve zvlákňovacím roztoku) při okyselení zvlákňovacího roztoku kyselinou fosforečnou (Sigma-Aldrich) (koncentrace 30 000 ppm ve zvlákňovacím roztoku). Po elektrostatickém zvlákňování byla vlákna PVA zahřívána na teplotu 60 °C po dobu 48 hodin.

Morfologie připravených nanovláken byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Vzorky PCL a PVA byly pokoveny zlatem (Tescan) pomocí pokovovacího zařízení Quorum Q150RS (QuorumTech). K analýze pokovených vzorků byl použit elektronový mikroskop Vega3 SBU (Tescan). Průměrný průměr vláken byl stanoven ze získaných snímků v softwaru ImageJ z alespoň 100 nezávislých měření.

Za účelem studia stability vzorků byla nanovláknena rozřezána na kousky o hmotnosti přibližně 10 mg. Deset vzorků z každého vzorku PVA s různým poměrem PVA 5-88 (L) a PVA 40-88 (H) bylo inkubováno v TBS (pH 7,0) až do úplné degradace. Degradace byla analyzována optickou a gravimetrickou analýzou vzorku PVA. Stav vláken byl monitorován každých 24 hodin a degradace bylo dosaženo rozpouštěním vzorků s následnou filtrací (0,22 µm filtr) a gravimetrickým stanovením výsledného vzorku.

Stanovení kontaktního úhlu bylo provedeno pomocí měřicího zařízení SeeSystem (Advex) a kapky destilované vody o objemu 10 µl při teplotě 22 °C. Z deseti opakování

měření pro oba typy nanovláknenných membrán byla vypočítána průměrná hodnota kontaktního úhlu.

Bobtnání nanovláknenných membrán bylo stanoveno změnou hmotnosti po inkubaci v destilované vodě. Deset vzorků o průměru 6 mm bylo zváženo v suchém stavu a inkubováno po dobu 30 minut ve 200 μ l vody. Každý vzorek byl po inkubaci zvážen a stupeň nabobtnání byl vypočten jako poměr vlhké a suché hmotnosti nanovláknenné membrány.

3.1.2. Charakterizace proteinové adsorpce

Adsorpce proteinu byla analyzována infračervenou spektroskopií, studiem povrchového zeta potenciálu a desorpční kinetiky. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací a zeslabeným celkovým odrazem (FTIR-ATR) byla provedena na měřicím zařízení IRaffinity 1 (Shimadzu). Měření bylo provedeno v rozsahu 500-4200 cm^{-1} s Happ-Gazelovou apodizací. Byla získána a analyzována spektra suchých PVA a PCL nanovláknenných membrán, inkubovaných s kolagenem typu I (1 mg/ml), transferinem (10 mg/ml) a hovězím sérovým albuminem (BSA, 10 mg/ml). Interakce povrchu nanovláknenné membrány s proteiny byla analyzována pomocí měření povrchového zeta potenciálu. Vzorky PVA a PCL byly inkubovány v roztoku kolagenu typu I (1 mg/ml), kyseliny hyaluronové (1 mg/ml) a hovězího sérového albuminu (BSA, 10 mg/ml) po dobu 30 minut. Vzorky byly poté měřeny pomocí Surface zeta-potential kit (Malvern). Měření bylo provedeno na Zetasizer ZS (Malvern). Každý cyklus byl založen na 3 měřeních a 4 pozicích od povrchu s krokem 250 μ m. Jako referenční materiál byly použity křemíkové částice s potenciálem -42,2 mV.

Byla měřena kinetika desorpce proteinů za účelem charakterizace vazebné kapacity nanovláknenných membrán. PCL a PVA nanovláknenné membrány byly nejprve navlhčeny ve 100 μ l destilované vody a následně bylo prováděno navázání BSA (10 mg/ml, 1 mg/ml a 0,1 mg/ml), kolagenu typu I (1 mg/ml), želatiny (10 mg/ml) a transferinu (10 mg/ml) po dobu 60 minut. Vzorky byly poté přeneseny do nových jamek mikrodestičky a desorpce byla prováděna v cyklech s intervalem 60 minut. V každém cyklu bylo k nanovláknům přidáno 200 μ l vody a po inkubaci byla uložena kvantifikace proteinu. Kvantifikace proteinu byla provedena pomocí testu Quanti-it Protein (Life Technologies) podle pokynů výrobce. 200 μ l fluorescenčního barviva bylo přidáno do vzorku proteinu a fluorescence byla

odečtena při $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$. Desorpční experiment byl proveden ze 4 replikátů pro každou skupinu.

3.1.3. Nasazení a kultivace buněk

Z PCL a PVA nanovláčkových membrán byly připraveny buněčné nosiče, které měly kruhový tvar o průměru 6 mm. Vzorky byly sterilizovány pomocí etylenoxidu při 37 °C. Buněčné nosiče byly použity na buněčné testy až jeden týden po sterilizaci, aby se odvětraly případné zbytky etylenoxidu.

Všechny tři typy buněk byly udržovány ve vlhkém inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou a teplotou 37 °C s výměnou média každý třetí den. Když buňky dosáhly přibližně 80% konfluence, byly suspendovány pomocí roztoku kyseliny trypsin-ethylendiamintetraoctové (EDTA, PAA Laboratories GmbH). Počet buněk byl stanoven pomocí světelné mikroskopie. Buňky ze třetí pasáže byly použity pro experimenty *in vitro*. Aby se eliminoval jakýkoli příspěvek buněk bez buněčné adheze k nosiči, každý buněčný nosič byl přenesen do nové jamky na destičce před jakýmkoli testy *in vitro*. Prasečí primární MSC byly kultivovány v minimálním základním médiu (MEM) (s L-glutaminem, PAA Laboratories GmbH) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (FBS; Mycoplex, PAA Laboratories GmbH) a roztok 100 IU/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (PAA Laboratories GmbH). Pro detekci metabolické aktivity, proliferace, životaschopnosti a buněčné adheze byly MSC nasazeny na buněčné nosiče v hustotě 75×10^3 buněk/cm². Keratinocyty z kůže dospělého člověka (HaCaT; ReproCELL Europe Ltd) byly kultivovány v médiu DMEM (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Německo) doplněném 10% FBS a roztokem 100 IU/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (PAA Laboratories GmbH). Pro detekci metabolické aktivity, proliferace, životaschopnosti a buněčné adheze byly HaCaT nasazeny na buněčný nosič v hustotě 30×10^3 buněk/cm². Myší 3T3 fibroblasty (linie 3T3-Swiss albino CCL-92™, ATCC®) byly kultivovány v DMEM (PAN-Biotech GmbH), doplněném 10% FBS a roztokem 100 IU/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (PAA Laboratories GmbH). Pro detekci metabolické aktivity, proliferace, životaschopnosti a buněčné adheze byly fibroblasty 3T3 nasazeny na buněčné nosiče v hustotě 3×10^3 buněk/cm².

3.1.4. Stanovení metabolické aktivity buněk

Metabolická aktivita buněk byla stanovena pomocí CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Po 1, 3, 7 a 10 dnech byly buněčné nosiče přeneseny na novou 96-jamkovou destičku obsahující 100 µl čerstvého média na jednu jamku a 20 µl CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent. Absorbance formazanu v 100 µl roztoku byla měřena ($A_{\text{vzorek}} = 490 \text{ nm}$, $A_{\text{reference}} = 690 \text{ nm}$) po 2-hodinové inkubaci při 37 °C a 5% CO₂ pomocí destičkového readru EL800 (BioTek). Absorbance vzorků bez buněk byla odečtena od absorbance vzorků s buňkami.

3.1.5. Hodnocení buněčné adheze

Buněčná adheze byla hodnocena pomocí specifického barvení jader a membrán, pozorovaných konfokální mikroskopií. Po jednom dni kultivace byly nosiče s buňkami fixovány metanolem (-20 °C), dvakrát promyty PBS, inkubovány v 10 µg/ml 3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodidu (DiOC6; Invitrogen) po dobu 45 minut při pokojové teplotě a poté inkubovány v 5 µg/ml propidium jodidu v PBS po dobu 10 minut. Nosič byl dvakrát opláchnut PBS a skenován tentýž den. Barvení DiOC6 bylo použito k vizualizaci mitochondrií a vnitřních membrán, zatímco barvení propidium jodidem bylo použito k vizualizaci buněčných jader. Pro detekci DiOC6 a propidium jodidu byl použit konfokální mikroskop Zeiss LSM 5 DUO při $\lambda_{\text{ex}} = 488$ a 560 nm a $\lambda_{\text{em}} = 505\text{--}550$ nm a 575–650 nm. Výsledky byly vyhodnoceny statisticky pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA) a Student-Newman-Keulsovy metody. Hladina významnosti p byla stanovena na 0,05. Data jsou uvedena jako průměr ± směrodatná odchylka.

3.1.6 Barvení Live/Dead

Pro detekci viability buněk bylo provedeno barvení Live/Dead buněk (BCECF, AM/propidium jodid) a vizualizace pomocí konfokální mikroskopie. Byl přidán BCECF, AM (Sigma-Aldrich) zředěný 1:100 v médiu a inkubován po dobu 45 minut při 37 °C a 5 % CO₂ pro detekce živých buněk. Poté byl promyt PBS (pH 7,4); propidium jodid (5 µg/ml v PBS pH 7,4) byl přidán na 10 minut, znovu promyt PBS (pH 7,4) a vizualizován pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. Pro každý nosič byl spočítán počet

živých/mrtvých buněk (software Ellipse) a zprůměrován. Výsledky byly vyhodnoceny statisticky pomocí jednocestné analýzy rozptylu (ANOVA) a Student-Newman-Keulsovy metody. Hladina významnosti p byla stanovena na 0,05. Data jsou uvedena jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka.

3.1.7. Testování *in vivo*

Pro testování *in vivo* bylo použito 50 králíků plemene činčila ve věku 3-4 měsíců ($4,1 \pm 0,6$ kg). Péče o zvířata byla v souladu se Zákonem České národní úmluvy o ochraně obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely, Sb. zákonů č. 246/1992, včetně změn na ochranu zvířat proti týrání, a Vyhláškou Ministerstva zemědělství ČR a Sbírkou zákonů č. 419/2012 Sb., o držení a využívání pokusných zvířat.

Zvířata byla rozdělena do 5 skupin, každá po 10 zvířatech: PCL, PCL-strip, PVA, PVA-strip a kontrolní skupina. Operace byly provedeny v celkové anestezii (Ketamin 50 mg/kg a Xylazin 5 mg/kg). Zvířata byla premedikována intramuskulární injekcí 15 mg apaurinu. Kůže na levé straně byla oholena a dezinfikována roztokem jodovaného povidonu (Braunol, B.Braun). Následně byl vyříznut jeden čtvercový defekt 35 mm $\times$ 35 mm v celé hloubce kůže. Defekty byly zakryty pomocí PCL nebo PVA nanovláknenných membrán s 10 mm přesahem nebo byly ponechány nezakryté v případě kontrolní skupiny. Okraje defektů byly fixovány stehem (Dafilon 4/0; B.Braun). Defekty byly překryty sterilním obvazem.

V 7., 14. a 21. den byly odebrány kožní biopsie z každého defektu. Biopsie (1 cm²) byly odebrány v celé hloubce kůže s přesahem do zdravé okolní tkáně. Vzorky byly fixovány pufrovaným formalínem pro histologickou analýzu. V případě skupiny PCL-strip a skupin PVA-strip byly nanovláknenné membrány nahrazeny novými sterilními. Defekty byly překryty sterilním obvazem.

Okamžitě po každém výkonu a po 24 a 48 hodinách bylo podáváno analgetikum (Meloxicam). Zdraví zvířat, jejich chování, příjem potravy a vody byl kontrolován denně v průběhu celého experimentu.

3.1.8. Histologická analýza

U každého zvířete byly analyzovány tři tkáňové bloky, představující biopsie rány a přilehlé zdravé kůže v 7., 14. a 21. den po operaci. Vzorky tkání byly fixovány pufrovaným

formalínem, dehydratovány v etanolových roztocích a uloženy do parafinových bloků pomocí tkáňového procesoru Leica TP1020 (Leica GmbH, Nussloch). Devět sériových 5 μm silných histologických řezů bylo zpracováno z každého tkáňového bloku, zalitého v parafínu, pomocí mikrotomu Leica RM2014. Rovina řezu byla orientována kolmo k povrchu kůže, aby poskytla část jak zdravého kožního okraje, tak přilehlé regenerující se kožní rány. Řezy byly zbaveny parafínu, rehydratovány a obarveny. Tři řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem. Další tři řezy byly obarveny pikrosiriovou červení (Direct Red 80, Sigma-Aldrich), ředěnou v nasyceném roztoku kyseliny pikrové po dobu jedné hodiny. Poslední tři řezy byly zpracovány imunohistochemicky za účelem detekce přítomnosti buněk hladkého svalstva (SMC) a myofibroblastů. Byl použitý α -aktin hladkého svalstva (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, DakoCytomation) jako marker kontraktálního fenotypu SMC a myofibroblastů. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována 3% H_2O_2 v PBS. Nespecifická vazebná aktivita byla blokována kozím nebo koňským sérem v PBS při teplotě místnosti. Řezy byly inkubovány přes noc s primární protilátkou při 4 °C a ředění 1:1000. Produkty imunoreakce byly detekovány pomocí imunoperoxidázové techniky (N-Histofine kit, Nichirei Biosciences) a výsledky reakce byly vizualizovány diaminobenzidinem (Fluka). Imunohistochemické řezy byly kontrastně obarveny Gillovým hematoxylinem.

Všechny kvantitativní odhady byly provedeny pomocí dobře zavedených stereologických metod¹⁴⁴, dostupných v softwaru Ellipse a uDis (ViDiTo). Byly použity tři spojitě parametry popisující tkáňovou reakci kůže (tabulka A).

Nejprve byl hodnocen kolagen typu I ve vzorcích obarvených pikrosiriovou červení pomocí kruhově polarizovaného světla¹⁴⁵. Kruhový polarizátor (Hama) byl zkřížený s analyzátozem, zkonstruovaným z kombinace čtvrtvlnné lambda desky umístěné pod lineární polarizátor (U-GAN, Olympus). Oba filtry byly vyrovnány do zkřížené polohy pomocí mikroskopu Olympus CX41. Podle tloušťky se kolagenová vlákna typu I objevují ve žluté (tenčí vlákna), oranžové a červené barvě (silné svazky vláken). Zelená barva a slabý dvojlom představuje kolagen typu III s volně uloženými fibrily nebo velmi tenkými úseky vláken typu I.

Druhým parametrem byla přítomnost arteriol, metarteriol, vén a dalších mikrocév, obsahujících alespoň jednu vrstvu buněk hladkého svalstva nebo α -aktin pozitivních pericytů hladkého svalstva v dermis. Tento parametr byl detekován pomocí imunohistochemického barvení (protilátka proti α -aktinu hladkého svalstva, klon 1A4, DakoCytomation) a vizualizován pomocí imunoperoxidázové reakce a diaminobenzidinu.

Třetí parametr byla tloušťka epitelu. Tloušťka epitelu byla měřena spojením bazální membrány s nejsvrchnější vrstvou keratinizované buněčné vrstvy pomocí lineárního kreslicího nástroje softwaru Ellipse. Když byla nalezena keratinizace, nespojitě vrstvy stratum corneum nebyly brány v úvahu. Pro každý vzorek byla provedena alespoň tři ekvidistanční měření a byla vypočtena střední hodnota. Hodnota nebyla měřena v případech, kdy epitel neměl buď zřetelnou bazální membránu anebo byl epitel neúplný či poškozený.

V každém vzorku byla obrazová pole zobrazena systematickým náhodným způsobem na obrazovce s rozlišením 1616×1912 pixelů (podrobnosti vzorkování a použité zvětšení viz. Tab. 1). Dále byla náhodně umístěna jednotná mřížka ekvidistančních bodů na mikroskopická obrazová pole v poloprůhledném překrytí, takže počet bodů zasahujících do zájmové struktury byl úměrný jejich ploše. Relativní množství kolagenu typu I bylo vypočteno vynásobením počtu spočítaných bodů plochou, odpovídající každému bodu¹⁴⁴, čímž se vypočítal podíl plochy. Oblast nezabraná pojivovou tkání (např. tkáňové mikrotrhliny) byla vyloučena z referenční oblasti.

Mikrocévy pozitivní na α -aktin hladkého svalstva byly hodnoceny jako počet profilů mikrocév na plochu řezu (Q_A) s použitím počítačového rámce¹⁴⁶. Při odhadu hustoty mikrocévních profilů bylo napočítáno v průměru 75 mikrocévních profilů na vzorek.

Kvantitativní parametr	Objektiv mikroskopu	Biologická interpretace
A_A (kolagen)	10×	Větší množství zralého kolagenu typu I je zodpovědné za mechanickou funkci tkáně ¹⁴⁷
Q_A (mikrocévy)	10×	Větší hustota mikrocév zajišťuje výživu mezenchymových a prozánětlivých buněk, ale je také důsledkem hypoxie rány ^{148, 149} .
Tloušťka epidermis	10×	Tloušťka vrstevnatého dlaždicového epitelu se zvyšuje s pokročilými stádii epitelizace rány, ale často se zvyšuje při hojení ran (skvamózní hyperplazie ¹⁵⁰).

Tab. 1. Kvantitativní parametry histologického hodnocení vzorků tkáně: A_A (kolagen), plošný podíl kolagenu v dermis hojící se rány. Q_A , počet profilů mikrocév pozitivních na α -aktin hladkého svalstva na plochu řezu. Objektiv mikroskopu a zvětšení, použité pro kvantitativní hodnocení každého z parametrů, byly nejmenší, což umožnilo přesnou a jednoznačnou identifikaci případů počítání s ohledem na metody histologického barvení.

3.2. Metodika přípravy a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení fascie po reparaci kýl břišní stěny

3.2.1. Příprava a funkcionalizace nosiče

PCL nanovlákná byla připravena metodou elektrostatického zvlákňování z PCL, připraveného podle správné výrobní praxe se středním bodem viskozity 1,2 dL/g (Purasorb® PC 12; Corbion Purac). 16% hm. roztok PCL rozpuštěného v chloroformu a etanolu v poměru 9: 1 byl elektrostaticky zvlákňován na zvlákňovacím zařízení s drátovým emitorem a kolektorem s netknou textilií (plošná hmotnost 30g/m², Pegas).

Připravená PCL nanovlákná měla plošná hmotnost 25,2 g/m². PCL nanovlákná byla dále funkcionalizována PP kýlní sítíkou (Prolene™, Ethicon Inc.). Na povrch kýlní sítěky byl pomocí teflonového válce nanesený 32% hm. roztok PCL rozpuštěného v chloroformu a na tento povrch byla přenesena PCL nanovlákná. PCL nanovlákná byla nalepena na obě strany kýlní sítěky. Plošná hmotnost lepidla na kýlní síťce byla po odpaření chloroformu 44 g/m².

Morfologie připravených PCL nanovláken byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Vzorky byly pokoveny zlatem pomocí pokovovacího zařízení Quorum Q150RS (QuorumTech). K analýze pokovených vzorků byl použit elektronový mikroskop Vega3 SBU (Tescan). Průměrný průměr vláken byl stanoven ze získaných snímků v softwaru ImageJ z alespoň 100 nezávislých měření.

Pro *in vivo* experiment byly funkcionalizované PCL nanovlákná rozřezány na obdélníkové tvary se stranami 4 a 7 cm a pro *in vitro* experiment na kruhové nosiče o průměru 6 mm. Tyto nosiče byly sterilizovány etylenoxidem při teplotě 37 ° C a použity 1 týden po sterilizaci, aby se vyvětraly případné zbytky etylenoxidu.

3.2.2. Nasazování a kultivace buněk

Sterilní kruhové nosiče o průměru 6 mm z PP sítěky, funkcionalizovaných PCL nanovláken (PP/PCL) a PCL nanovláken byly osazeny 3T3-A21 fibroblasty (Sigma-Aldrich) při buněčné hustotě 14 200 buněk/cm². Buňky byly kultivovány v DMEM (Sigma-Aldrich), doplněné 10% fetálním bovinním sérem (Thermo Fisher Scientific) a ošetřeny penicilinem/streptomycinem (100 IU/ml, respektive 100 µg/ml, Sigma-Aldrich). Médium bylo měněno každé 3-4 dny.

3.2.3. Stanovení buněčné metabolické aktivity

Ke stanovení metabolické aktivity byl použit MTS test (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega Corporation). V 1., 3., 7. a 14. den experimentu byl nosič sadherovanými buňkami přenesen do nových jamek. Ke každému nosiči bylo přidáno 20 µl roztoku MTS a 100 µl čerstvého média. Po inkubaci (37°C, 10% CO₂) byly výsledky měřeny spektrofotometricky na destičkovém readru ELx800 (BioTek) při 490 nm (referenční vlnová délka 690 nm). Absorbance média bez buněk byla od naměřených dat odečtena.

3.2.4. Stanovení buněčné proliferace

Ke stanovení proliferace buněk byla v 1., 3., 7. a 14. den experimentu použita fluorescenční souprava Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly přeneseny do zkumavek s obsahem 200 µl pufru pro lýzu buněk (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2% v/v Triton X-100) a prošly třemi cykly zmrazení/rozmrazení. Mezi cykly byly vzorky vortexovány. Ke stanovení obsahu DNA v buňkách kultivovaných na nosiči byla připravena standardní křivka se vzorky se známou koncentrací DNA. Obsah DNA byl stanoven smícháním 100 µL PicoGreen činidla a 100 µL vzorku DNA. Byly měřeny triplikáty. Intenzita fluorescence byla měřena na destičkovém readru Synergy HT (BioTek) $\lambda_{\text{ex}} = 480\text{--}500\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{--}540\text{ nm}$).

3.2.5. Vizualizace buněk pomocí skenovací elektronové mikroskopie

Pro vizualizaci buněk nanesených na nosiči byla 14. den použita rastrovací elektronová mikroskopie (SEM). Vzorky byly fixovány 2,5% glutaraldehydem (Sigma-Aldrich) při teplotě 4 °C. Po 2 hodinách byly vzorky vysušeny vzestupnými koncentracemi etanolu (35%, 48%, 70%, 96% a 100%). K odstranění zbytkové vlhkosti ze vzorků byl použit hexamethyldisilazan (Sigma-Aldrich). Vzorky byly pokovovány zlatem pomocí pokovovacího zařízení Quorum Q150RS (QuorumTech) a vizualizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Vega 3 SBU (Tescan).

3.2.6. Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie

V 1., 7. a 14. den byly buňky osazené na nosičích fixovány metanolem (-20 °C), promyty PBS a obarveny pomocí DiOC6 (1 µg/ml v PBS; 30 min při RT; zelená barva, vlnová délka maxima $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 501$ nm; Thermo Fisher Scientific) pro vizualizaci buněčných membrán; a propidium jodidem (5 µL/ml v PBS; 10 min při RT; červená barva, maxima vlnových délek $\lambda_{\text{ex}} = 536$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 617$ nm) pro vizualizaci buněčných jader. Vzorky byly vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu LSM 510 DUO (Zeiss).

3.2.7. Statistická analýza dat *in vitro* testů

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí softwaru SigmaStat 3.5. Statistická významnost mezi dvojicí skupin byla stanovena pomocí analýzy testování rozptylu. Pro post hoc analýzu byl použit Dunnův test a Bonferroniho korekce. Data jsou prezentována jako střední hodnoty $\pm$ SD. Hodnota $p = 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

3.2.8. Testování *in vivo*

Pro *in vivo* testování bylo získáno sedm miniprasat (samice, hmotnost 40–55 kg) z Ústavu fyziologie a genetiky zvířat AV ČR, vvi, (Libechov). Miniprasata byla chována v místnosti s certifikovaným stabilním prostředím (teplota a vlhkost vzduchu). Byla krmena *ad libitum* pomocí standardní stravy pro prasata a měla neomezený přístup k vodě.

Během studie byly respektovány Etické zásady a pokyny pro vědecké experimenty na zvířatech. Zacházení a péče o pokusná zvířata se řídily Směrnicí Rady EU 86/609 EHS a probíhaly v souladu s Vyhláškou o ochraně pokusných zvířat (Vyhláška č. 419/2012 Sb.). Výzkum byl schválen Odbornou komisí Fakulty veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Česká republika (protokol č. 34–2016) a byl v souladu se Zákonem č. 246/1992 Sb. (Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání).

Zvířata byla připravena k operaci po 10 dnech aklimatizace. Všechna zvířata byla premedikována kombinací tiletaminu, zolazepamu (2 mg/kg, LP Zoletil 100; Virbac Corporation), ketaminu (2 mg/kg, LP Narketan; Vetoquinol UK Limited) a xylazinu (2 mg/kg; LP Rometar – Bioveta Inc.) intramuskulárně (i.m.). Boční aurikulární žíla byla následně kanylována a celková anestezie byla navozena propofolem (1–2 mg/kg

intravenózně [i.v.]; LP Norofol, Norbrook) s následnou tracheální intubací. Celková intravenózní anestézie byla následně udržována propofolem (0,1–0,3 mg/kg/h i.v.; Fresenius).

Po dokončení všech předoperačních příprav byla zvířata umístěna do hřbetní polohy a ve střední linii břicha byl proveden řez o plné tloušťce kůže o délce 20 cm, počínaje 3 cm pod xiphoidem. V linea alba byly provedeny dva oddělené řezy o délce 5 cm, uzavřené pokračujícím stehem (PDS, 3,5 M, Ethicon Inc.). Oba defekty byly následně vyztuženy náhodně zvoleným implantátem - kýlní síťka Prolene (Ethicon Inc.) nebo funkcionalizované PCL nanovlákná a fixovány k fascii pokračujícím stehem 5 mm od okraje implantátu a ke stehové linii (PDS 3M). Podkožní tkáň a kůže byly uzavřeny také pomocí pokračujícího stehu (Ethilon 3M; Ethicon Inc.). Během operace byla zvířata umístěna na vyhřívací podložku a intravenózně hydratována.

30 minut před chirurgickým zákrokem byla každému zvířeti podána dávka antibiotika (20 mg/kg i.m., Amoxicillinum a Acidum clavulanicum pro veterinární použití, LP Synulox; Pfizer, Inc., New York, NY, USA), poté bylo antibiotikum podáváno dalších 7 dní v dávce 8,75 mg/kg. Všechna zvířata dostala první den po operaci jednu dávku analgetika meloxicam (0,4 mg/kg i.m., LP Metacam 20 mg/ml; Boehringer Ingelheim). Zvířata nebyla po operaci omezena v pohybu.

Za 6 týdnů po operaci byla všechna zvířata usmrcena předávkováním thiopentalem i.v. (Valeant Pharmaceuticals, LP Laval) a embutramid-mebezonium jodid-tetracain-hydrochlorid-dimethylformamidem i.v. (T-61; Merck & Co., Inc.). Vzorky odebrané pro histologické a imunohistochemické analýzy byly vyfotografovány, uspořádány a fixovány v 10% fosfátem pufovaném formalinu po dobu 48 hodin. Odebírány byly dva vzorky o velikosti 1 × 6 cm plné vrstvy břišní stěny se sítkou pro biomechanické testování.

3.2.9. Histologická analýza

Všech 14 vzorků bylo fixováno formaldehydem a vloženo do parafinových bloků. Vzorky zahrnovaly incizní čáru (označenou prošívacím materiálem) a 20 mm okolní tkáň břišní stěny. Parafinové bloky byly zpracovány standardní technikou a z každého bloku bylo získáno alespoň 10 histologických řezů o tloušťce 5 µm. Dva řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem (pro vizualizaci zánětlivého infiltrátu), dva Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (pro rozlišení kolagenu, tuku, svalové tkáně a

zánětlivého infiltrátu) a dva mikroskopickou červení (pro rozlišení vláken kolagenu typu I. v mikroskopii polarizovaným světlem)¹⁴⁵.

Další dva řezy byly použity k prokázání aktinu buněk hladké svaloviny větších mikrocév (nikoli kapilár) a kontraktilních myofibroblastů (protilátka 1A4; DakoCytomation) vizualizací pomocí reakce imunoperoxidázy za použití sady N-Histofine (Nichirei Biosciences) a diaminobenzidinu (Fluka). Pozadí bylo obarveno Gillovým hematoxylinem.

Poslední dva řezy byly obarveny (po 20 minutovém předběžném ošetření při 96 °C v Dako Target Retrieval Solution, pH 9) použitím protilátky CD31 (klon J70A, ředění 1:40; Dako Denmark A/S Cytomation) pro detekci vaskulárního endotelu.

Kvantitativní analýza histologických vzorků byla provedena pomocí stereologické bodové mřížky a sčítacího rámce implementovaného v programu newCAST[™] (Visiopharm). Pro kvantitativní popis vzorků bylo použito šest proměnných, a to jak na šicí linii, tak v sousední přilehlé tkáni (Tab. 2).

Kvantitativní parametr	Použitý objektiv	Obrázky	Biologický význam
$A_A(\text{kolagen I, incize})$ $A_A(\text{kolagen I, mimo incizi})$	10×	4	Vyšší obsah vyzrálých fibril kolagenu I přispívá k mechanické pevnosti jizvy.
$A_A(\text{aktin, incize})$ $A_A(\text{aktin, mimo incizi})$	10×	4	Vyšší množství kontraktilních myofibroblastů přispívá ke zúžení jizvy.
$Q_A(\text{mikrocévy, incize})$ $Q_A(\text{mikrocévy, mimo incizi})$	10×	4	Vyšší hustota krevních cév podporuje růst a trofický stav hojící se tkáně.

Tab. 2. Morfometické parametry použité pro kvantitativní histologii A_A (plocha na plochu) představuje zlomek plochy (plocha na plochu) složky (fibrily kolagenu typu I nebo aktin-pozitivní myofibroblasty) v referenční oblasti incize nebo sousední tkáně (mimo incizi; 20 mm laterálně od řezu). Plošné frakce byly hodnoceny pomocí stereologické bodové mřížky. Q_A (množství na plochu) je počet profilů pozitivních na aktin hladkého svalstva (SMA) nebo CD31 pozitivních profilů mikrocév na jednotku plochy odhadnutých pomocí počítacího rámce¹⁵¹. Referenční prostor byl zvolen jako pojivová tkáň pod dermis obklopující abdominální fascii.

Primární data byla zpracována za použití softwaru Statistica Base 10 (StatSoft, Inc.). Statistická korelace proměnných byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. K testování konzistence mediánu populace mezi skupinami byl použit Mann-

Whitneyův U-test. Dvojice vzorků odebraných ze stejného místa inceze a mimo incizi byla porovnávána Wilcoxonovým párovým testem.

3.2.10. Biomechanické testování

Na digitálním tenzometru MicroTester byla stanovena maximální pevnost v tahu, Youngův modul a mez kluzu. Silová odezva každého vzorku byla detekována na úchytech měřičů napětí během celého cyklu. U každého vzorku byly analyzovány mechanické vlastnosti. Měřeny byly následující veličiny: pružnost v tahu E (MPa), maximální pevnost v tahu $\sigma_{\max}$ (MPa) a odpovídající maximální specifické prodloužení $\varepsilon_{\max}$ (-), dále mez kluzu σ_k (MPa) a odpovídající prodloužení ε_k

Struktura každého vzorku a charakter roztržení byly během výzkumu skenovány mikroskopem Olympus SZX-12 vybaveným ultracitlivou videokamerou PCO Sensicam (Olympus Corporation).

Vzorky tkáně (proužky o průměrné velikosti $9,4 \times 25 \times 51,5$ mm zhojené břišní stěny) byly jednotlivě připevněny k úchytům tenzometru, a to tak, aby podélně přiléhaly k implantovaným materiálům. Každý vzorek byl natahován desetkrát o 5 mm rychlostí 10 mm/s a následně byl tažen rychlostí 0,5 mm/s až do jeho poškození.

3.3. Metodika k přípravě a testování funkcionalizovaného nanovlákného systému pro podporu hojení střevních anastomóz

3.3.1. Příprava, a funkcionalizace nanovláken

PCL nanovlákné membrány byly připraveny z 24% (w/v) roztoku PCL ($M_w=45\,000$, Sigma-Aldrich) ve směsi chloroformu (Sigma-Aldrich) a etanolu (Penta s.r.o.) v poměru 9:1. PCL nanovlákné membrány byly připraveny pomocí elektrostatického zvlákňování použitím drátového emitru a zachytávání na drátový kolektor s polypropylénovou netkanou textilií (plošná hmotnost 30 g/m^2 , Pegas), pro lepší manipulaci s nanovláknky.

Polyvinylalkoholy (PVA, 5-88 a 40 88% hydrolýza, Merck) byly rozpuštěny v destilované vodě při teplotě $80\text{ }^\circ\text{C}$. Pro elektrostatické zvlákňování byl použit vodný roztok PVA o koncentraci 12% (hm./hm.). Vzájemný hmotnostní poměr obou polymerů byl 1:1.

K elektrostatickému zvlákňování bylo použito zvlákňovací zařízení NanoSpider (Elmarco) s drátěnou elektrodou a s drátěným kolektorem pokrytým polypropylenovou netkanou textilií.

PVA nanovláknna byla funkcionalizována glyoxalem (koncentrace 40 000 ppm ve zvlákňovacím roztoku) při okyselení zvlákňovacího roztoku kyselinou fosforečnou (koncentrace 30 000 ppm ve zvlákňovacím roztoku). Po elektrostatickém zvlákňování byla vlákna PVA zahřívána na teplotu 60 °C po dobu 48 hodin.

Pro získání purifikovaného chitosanu byl chitosan, izolovaný z krunýřů krevet (Sigma-Aldrich), rozpuštěn v 10% vodném roztoku kyseliny octové (Sigma-Aldrich), a to 1% hm./obj. a zfiltrován. Filtrovaný roztok chitosanu byl vysrážen 1M NaOH (Sigma-Aldrich), promyt směsí destilovaná voda/acetón a vysušen při teplotě místnosti.

Vysušený purifikovaný chitosan byl rozpuštěn ve směsi kyseliny trifluoroctové (TFA, Sigma-Aldrich) a dichlormethanu (DCM, Sigma-Aldrich) (TFA : DCM = 7:3 obj./obj.) za získání 5% hm./obj. roztoku chitosanu³⁷ Chitosanová nanovláknna byla z roztoku chitosanu elektrostaticky zvlákňována pomocí zvlákňovacího zařízení se speciálně vyvinutou skleněnou jehlovou elektrodou (emitorem) a kovového plochého kolektoru, potaženého polypropylenovou netkanou textilií (plošná hmotnost 30 g/m², Pegas).

Aby se zabránilo rozpouštění chitosanových nanovláknenných membrán ve vlhkém prostředí, byla chitosanová nanovláknna funkcionalizována. hydroxidem sodným. Chitosanová nanovláknna byla namočena po dobu 10 minut v nasyceném roztoku NaOH (Sigma-Aldrich) v absolutním etanolu (Penta s.r.o.), následně promyta v destilované vodě do neutrálního pH a poté dehydratována ponořením do zvyšujících se koncentrací etanolu. Dehydratovaná chitosanová nanovláknna byla sušena při pokojové teplotě

Nanovláknna byla frakcionalizována v kapalném dusíku pomocí kryogenního mlýnku (Freezer/Mill 6870, SPEX SamplePrep) po dobu 2 pracovních cyklů. Každý pracovní cyklus zahrnoval 10 mletí (délka 1 min) a opětovné ochlazení (1 min). Použitá frekvence nárazu kladívka byla 12 Hz.

Morfologie nanovláknenných membrán a frakcionovaných nanovláken byla analyzována elektronovým mikroskopem VEGA 3 SBU (Tescan) za použití detektoru sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 10 kV. Před analýzou SEM byly všechny vzorky pokoveny tenkou vrstvou zlata pomocí rotačního pokovovacího zařízení (Q 150R S, Quorum). Průměrný průměr vlákna byl změřen pro 100 náhodně vybraných vláken pomocí softwaru Tescan.

Ke sterilizaci frakcionovaných chitosanových a PVA nanovláken pro *in vivo* testy byl použitý paprsek urychlených elektronů. Mikrozkušavky Eppendorf s frakcionovanými nanovláknami byly vystaveny elektronovému paprsku (elektronová energie 9,5 MeV, elektronový proud 8 μ A a absorbovaná dávková rychlost (dávkový příkon) 30 Gy/s) na urychlovači Microtron MT25 s vysokofrekvenčním zdrojem elektronů. Během 15 minutové expozice byla celková použitá dávka záření 27 kGy.

3.3.2 Nasazování a kultivace buněk

Pro *in vitro* experiment byly PCL, PVA a chitosanové nanovláknenné membrány rozřezané na kruhové nosiče o průměru 6 mm. Tyto nosiče byly sterilizovány etylenoxidem při teplotě 37 ° C a použity 1 týden po sterilizaci, aby se vyvětraly případné zbytky etylenoxidu.

Sterilní kruhové nosiče o průměru 6 mm byly osazeny 3T3-A21 fibroblasty (Sigma-Aldrich) při buněčné hustotě 14 200 buněk/cm². Buňky byly kultivovány v DMEM (Sigma-Aldrich), doplněné 10% fetálním bovinním sérem (Thermo Fisher Scientific) a ošetřeny penicilinem/streptomycinem (100 IU/ml, respektive 100 μ g/ml, Sigma-Aldrich). Médium bylo měněno každé 3-4 dny.

3.3.3. Stanovení buněčné metabolické aktivity

Ke stanovení metabolické aktivity byl použit MTS test (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega Corporation). V 1., 4., 7., 11. a 14. den experimentu byl nosič s adherovanými buňkami přenesen do nových jamek. Ke každému nosiči bylo přidáno 20 μ l roztoku MTS a 100 μ l čerstvého média. Po inkubaci (37°C, 10% CO₂) byly výsledky měřeny spektrofotometricky na destičkovém readru ELx800 (BioTek) při 490 nm (referenční vlnová délka 690 nm). Absorbance média bez buněk byla od naměřených dat odečtena.

3.3.4. Stanovení buněčné proliferace

Ke stanovení proliferace buněk byla v 1., 4., 7., 11. a 14. den experimentu použita fluorescenční souprava Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly přeneseny do zkumavek s obsahem 200 µl pufru pro lýzu buněk (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2% v/v Triton X-100) a prošly třemi cykly zmrazení/rozmrazení. Mezi cykly byly vzorky vortexovány. Ke stanovení obsahu DNA v buňkách kultivovaných na nosiči byla připravena standardní křivka se vzorky se známou koncentrací DNA. Obsah DNA byl stanoven smícháním 100 µL PicoGreen činidla a 100 µL vzorku DNA. Byly měřeny triplikáty. Intenzita fluorescence byla měřena na destičkovém readru Synergy HT (BioTek) $\lambda_{\text{ex}} = 480\text{--}500\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{--}540\text{ nm}$).

3.3.5. Vizualizace pomocí konfokální mikroskopie

V 1., 7. a 14. den byly buňky osazené na nosičích fixovány metanolem (-20 °C), promyty PBS a obarveny pomocí DiOC6 (1 µg/ml v PBS; 30 min při RT; zelená barva, vlnová délka maxima $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 501\text{ nm}$; Thermo Fisher Scientific) pro vizualizaci buněčných membrán; a propidium jodidem (5 µL/ml v PBS; 10 min při RT; červená barva, maxima vlnových délek $\lambda_{\text{ex}} = 536\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617\text{ nm}$) pro vizualizaci buněčných jader. Vzorky byly vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu LSM 510 DUO (Zeiss).

3.3.6. Imunohistochemické barvení talinu

3T3 fibroblasty byly fixovány 4% paraformaldehydem/PBS po dobu 5 minut, jednou promyty PBS a skladovány v PBS při 2–8 °C před barvením. Vzorky byly poté třikrát promyty PBS a inkubovány v 3% FBS/0,1% Triton X v PBS po dobu 30 minut při RT. Vzorky byly následně inkubovány s 1% Tween 20 v PBS po dobu 20 minut při teplotě místnosti. Monoklonální protilátka proti talinu (ředění 1:200, klon 8d4, T3287, Sigma-Aldrich) byla aplikována přes noc při 2–8 °C. Po 3x promytí PBS/0,05% Tween (3, 5, 10 min) a jednou v PBS, goat anti-mouse IgG/IgA/IgM (H + L) Alexa Fluor 488 (ředění 1:300, A10667, Invitrogen Life Technologies) byl přidán na 45 minut při teplotě místnosti. Následně, po stejném promývacím postupu, byly vzorky inkubovány s faloidinem konjugovaným s ATTO-633 (ředění 1:50 v 1 ml PBS, Sigma Aldrich) po dobu 1 hodiny při

teplotě místnosti. Buněčná jádra byla kontrastně barvena pomocí Hoechst 34580 (1:5000, H21486, Life Technologies) po dobu 30 minut při teplotě místnosti a dvakrát promyta v PBS. Vzorky byly skenovány pomocí konfokálního mikroskopu ZEISS LSM 5 DUO při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 650 \text{ nm}$ pro barvení ATTO-633.

3.3.7. Testování *in vivo*

Celkem 62 králíků plemene Hyplus (samice a samci, hmotnost 2,5 - 3 kg) bylo použito na *in vivo* testy. 10 dní před operací byli králíci aklimatizováni, drženi ve standardních klecích po jednom zvířeti v jedné kleci, krmeni standardními králíčími granulemi a s přísunem vody ad libitum. Během aklimatizace byl zvířatům podáván sulfadimidin.

Během celé studie byly dodržovány etické zásady a pokyny pro vědecké experimenty na zvířatech. Zacházení a péče o pokusná zvířata se řídily Směrnicí Rady EU 86/609 EHS a probíhaly v souladu s Vyhláškou o ochraně pokusných zvířat (Vyhláška č. 419/2012 Sb.).

Králíci byli anestetizováni intramuskulárně (i.m.) aplikovaným ketaminem (2 mg/kg, LP Narketan; Vetoquinol UK Limited) a xylazinem (2 mg/kg; LP Rometar – Bioveta Inc.) a inhalací kyslíku s obsahem 1,5 - 2% isofluranu. Po vyholení břišní oblasti a její desinfekci jodovaným povidonem (Braunol, B.Braun) a chlorhexidinem byl proveden 5-6 cm dlouhý středový řez pro otevření břišní dutiny.

Na tlustém střevě byla, ve vzdálenosti 15 cm od ileocekální chlopně, ručně vytvořena end-to-end anastomóza pomocí jednoduchého pokračujícího stehu PDS 4/0. Po sešití anastomózy byla na suturu aplikovaných 0,02 gramy mletých PVA anebo chitosanových nanovláken.

Fascie a kůže byly sešity odděleně pomocí pokračujících stehů. Po operaci bylo králíkům podáno: antiulcerózum ranitidin (i.m., 0,2 ml/kg tělesné hmotnosti, LP Ranital) a následující dva dny, antiemetikum metoklopramid (i.m., 0,1 ml/kg tělesné hmotnosti, Degan) a následující dva dny, antibiotikum marbofloxacin (i.m., 10 mg/kg tělesné hmotnosti, LP) a následujících 6 dnů po 24 hodinách a meloxicam (s.c., 1 mg/kg tělesné hmotnosti, Metacam) a následující 4 dny. Po 14 dnech byli králíci usmrceni i.v. předávkováním anestetikem thiopental.

3.3.8. Histologická analýza

Pro histologickou analýzu bylo použito celkem 30 králíků, z toho 17 vzorků bez materiálu a 13 vzorků s materiálem. Po eutanazii byly resekovány 5 cm dlouhé segmenty střeva s anastomózou ve středu segmentu (označeno šicím materiálem). Střevní segmenty byly podélně rozříznuty a po odstranění výkalů promyty fyziologickým roztokem. Čisté segmenty byly fixovány ve formalínu. Po fixaci formalínem byly vytvořeny 4 μ m silné histologické řezy s rovinou řezu rovnoběžnou s dlouhou osou střeva. Každý řez obsahoval střed anastomózy a minimálně 5 mm střeva na obou stranách.

Dva řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem pro celkovou morfologii vzorku, dva Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem k odlišení pojivové tkáně a hladkého svalstva¹⁵², dva pikrosiriovou červení (Sigma Aldrich) pro rozlišení kolagenu typu I a III pomocí mikroskopie s polarizovaným světlem¹⁴⁵ a dva řezy sadou BioGram (BioGnost) k identifikaci a rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií. Další dva řezy byly imunohistochemicky obarveny pro vizualizaci buněk hladké svaloviny a myofibroblastů (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, DakoCytomation; ředění 1: 100), další dva řezy pro vizualizaci endoteliálních buněk (Monoclonal Anti CD31 antibody Clone J70A, DakoCytomation; ředění 1:40) a poslední dva řezy pro detekci makrofágů (Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone KP1, DakoCytomation; ředění 1:100). Vizualizace imunohistochemické reakce byla založena na diaminobenzidinu (DAB+, Liquid; DakoCytomation). Imunohistochemické řezy byly kontrastně obarveny Gillovým hematoxylinem. Všechny řezy byly dehydratovány v postupně zvyšujících koncentracích ethanolového roztoku a upevněny v médiu rozpustném v xylenu.

Pro každý vzorek byly pořízeny čtyři mikrofotografie s použitím buď 10 $\times$ objektivu (α -aktin hladké svaloviny, CD31-pozitivní mikrocévy) nebo 20 $\times$ objektivu (kolagen typu I a kolagen typu III, CD68-pozitivní makrofágy) namontovaného na optický mikroskop Olympus BX41 (Olympus). Pro mikroskopii pikrosiriové červeně byl použit kruhový polarizační filtr (Hama) překrytý čtvrtvlnným $\lambda/4$ filtrem pod filtrem analyzátoru U-GAN (Olympus).

Kvantitativní histologie byla provedena pomocí stereologické bodové mřížky¹⁵³ a následujících parametrů: (ii) objemová frakce α -aktin-pozitivních myofibroblastů hladké svaloviny v celé střevní stěně (hladká svalovina pravidelných svalových vrstev, střevní stěna nebyla započítána); (i) objemová frakce kolagenu I a III v celé střevní stěně, (iii) objemová frakce CD68+ buněk morfologicky identifikovaných jako makrofágy v celé střevní stěně;

(iv) dvourozměrná hustota CD31-pozitivních profilů mikrocév, vyjádřená jako Q_A (počet na plochu) = Q/A , tj. počet CD31-pozitivních profilů mikrocév (Q) na jednotku plochy (A), stanovený pomocí stereologického bodového rastru (point-grid metoda)¹⁵¹.

Protože některé parametry neprošly Shapiro-Wilkovým W -testem normality, byly dále použity neparametrické statistiky. K porovnání rozdílů mezi chitosanovými skupinami, PVA skupinou a skupinou vzorků bez jakéhokoli biomateriálu byl použit Kruskal-Wallis ANOVA následovaný post-hoc Mann-Whitney U -testem. Korelace mezi parametry byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Tyto testy byly použity tak, jak jsou dostupné v balení Statistica Base 11 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Významné rozdíly jsou uvedeny jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) a *** ($p < 0,001$).

3.3.9. Biomechanické testování

Celkem bylo použito 32 králíků, z toho 14 králíků bez materiálu, 18 králíků s chitosanovými frakcionalizovanými nanovláknky. Po eutanazii králíků byl resekován 5 cm dlouhý střevní segment s anastomózou uprostřed. Výkaly byly odstraněny a vzorky promyty fyziologickým roztokem. Čisté střevní segmenty byly umístěny do fyziologického roztoku a okamžitě testovány.

Biomechanické zkoušky byly provedeny na digitálním tenzometru MicroTester. Po celý experiment byla struktura segmentu snímána mikroskopem Olympus SZX-12 (Olympus) vybaveným ultracitlivou videokamerou SensiCam (PCO). Střevní segmenty byly jednotlivě umístěny do čelistí zařízení podélným způsobem a dostatečně fixovány. U každého vzorku byla měřena jeho délka, šířka a tloušťka. Následně byl každý vzorek desetkrát natahován o 5 mm délky rychlostí 10 mm/s a následně byl tažen rychlostí 0,5 mm/s až do jeho poškození. V průběhu experimentu byla u každého vzorku zaznamenávána tažná síla a následně stanovena mez kluzu a maximální pevnost v tahu.

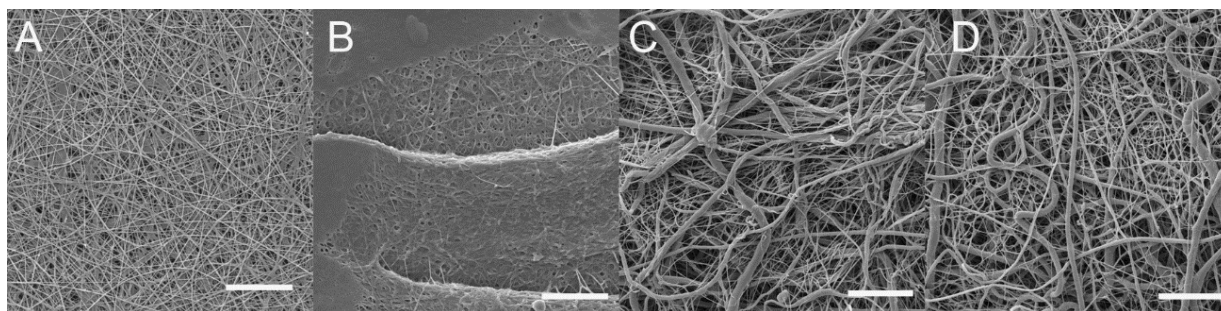
4. VÝSLEDKY

4. 1. Příprava a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení hlubokých kožních ran

4.1.1. Charakterizace funkcionalizovaných nanovláken

PCL nanovláknna byla připravena elektrostatickým zvlákňováním pomocí systému rozpouštědel chloroform a etanol. Elektrostatické zvlákňování ze dvou rozpouštědel mělo za následek vytvoření typické nano/mikrovláknenné morfologie (Obr. 9C). Mikrovláknna (průměr větší než 1000 nm) vykazovala průměrný průměr 4381 ± 1751 nm a nanovláknna (průměr menší než 1000 nm) měla průměrný průměr 375 ± 110 nm. PCL vlákna v připraveném PCL vykazovala náhodnou orientaci vláken a nízkou přítomnost defektů. PCL nanovláknna vykazují hydrofobní charakter s kontaktním úhlem $130 \pm 3^\circ$ (Obr. 11B).

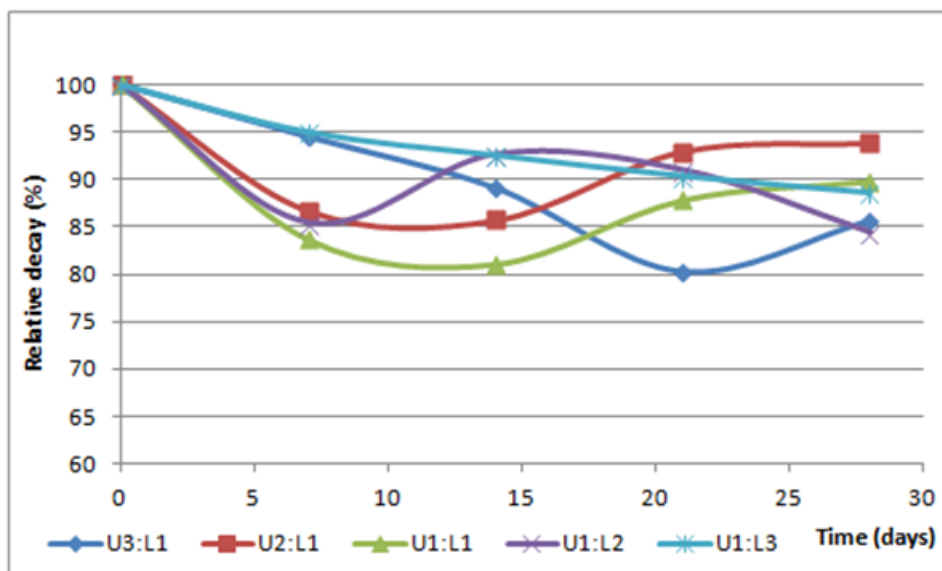
PVA nanovláknna byla připravena z nízkomolekulárního PVA (5-88, MW ~ 35 kDa, dále označovaný jako L) a vysokomolekulárního PVA (40-88, MW ~ 205 kDa, dále označovaný jako U). Bylo připravených pět různých vzorků PVA nanovláknenných membrán s různým poměrem hmotnosti polymerů PVA (3U : 1L, 2U : 1L, 1U : 1L, 1U : 2L a 1U : 3L). Elektrostatické zvlákňování polymerního roztoku vedlo k vytvoření nanovláknenné membrány s průměrným průměrem 427 ± 128 nm (Obr. 9A). PVA a vykazovalo hydrofilní charakter s kontaktním úhlem $45 \pm 8^\circ$ (Obr. 11B).



Obr. 9: SEM snímky připravených nanovláken, (A) PVA suchý vzorek, (B) PVA mokrý vzorek, (C) PCL suchý vzorek, (D) PCL mokrý vzorek. Měřítko 20 μ m.

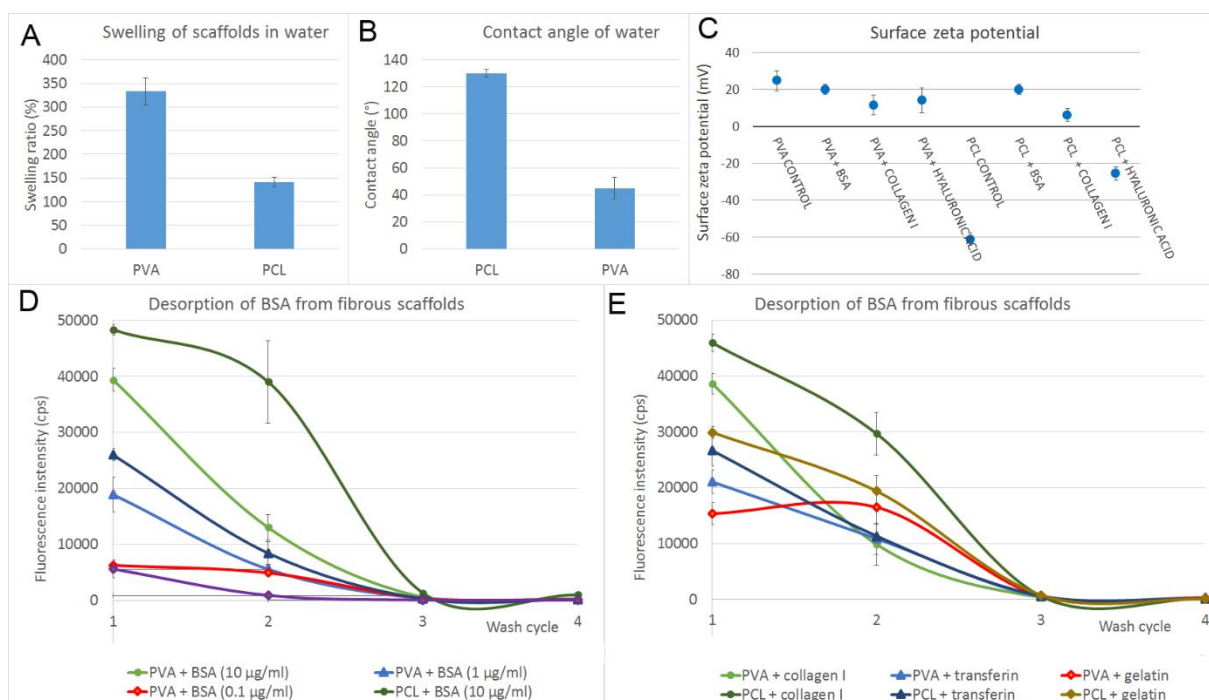
PVA nanovláknna byly funkcionalizována glyoxalem a kyselinou fosforečnou pro zvýšení stability struktury nanovláken ve vodním prostředí. Stabilita vzorků byla ve studii analyzována po dobu 28 dnů. Výsledky ukázaly vysokou stabilitu připravených nanovláknenných membrán bez výrazných změn v degradaci po dobu 28 dnů za podmínek

okolního prostředí (Obr. 10). V případě všech vzorků byla degradace během hodnotícího období pouze okolo 20%. Proto složení vysokomolekulárního a nízkomolekulárního PVA neovlivňuje stabilitu nanovlákněné membrány. Podobná kinetika degradace mezi vzorky může být spojena s interakcí mezi řetězci s nízkou a vysokou molekulovou hmotností.



Obr. 10. Relativní degradace PVA nanovlákněných membrán s různým poměrem PVA s vysokou (U, PVA 40-88) a nízkou (L, PVA 5-88) molekulovou hmotností v čase (dny).

Porovnání bobtnání (Obr. 11A) ukázalo, že PVA nanovlákněná membrána v kontaktu s vodou absorbovala velké množství vody (333 ± 28 %). Ale PCL nanovlákněná membrána neabsorbovala signifikantní množství vody a vykazovala nízké bobtnání (142 ± 10 %). Tyto výsledky ukazují hydrofilní povahu PVA nanovlákněné membrány a hydrofobní povahu PCL nanovlákněné membrány. Analýza morfologie nanovlákněných membrány po inkubaci ve vodním prostředí (Obr. 9B, 9D) ukázala, že v případě PVA bobtnání vedlo k tvorbě vláknitého gelu a ke zmenšení velikosti pórů. V případě PCL nebyly pozorovány žádné významné změny v morfologii vláken a distribuci pórů.



Obr. 11. Charakterizace povrchu nanovláknenných membrán a jejich adhezních vlastností. (A) Bobtnání ve vodě. (B) Kontaktní úhel. (C) Povrchový zeta potenciál. (D) Desorpční charakteristiky BSA. (E) Desorpční charakteristiky transferinu, kolagenu typu I a želatiny.

4.1.2. Interakce nanovláknenných membrán s proteiny

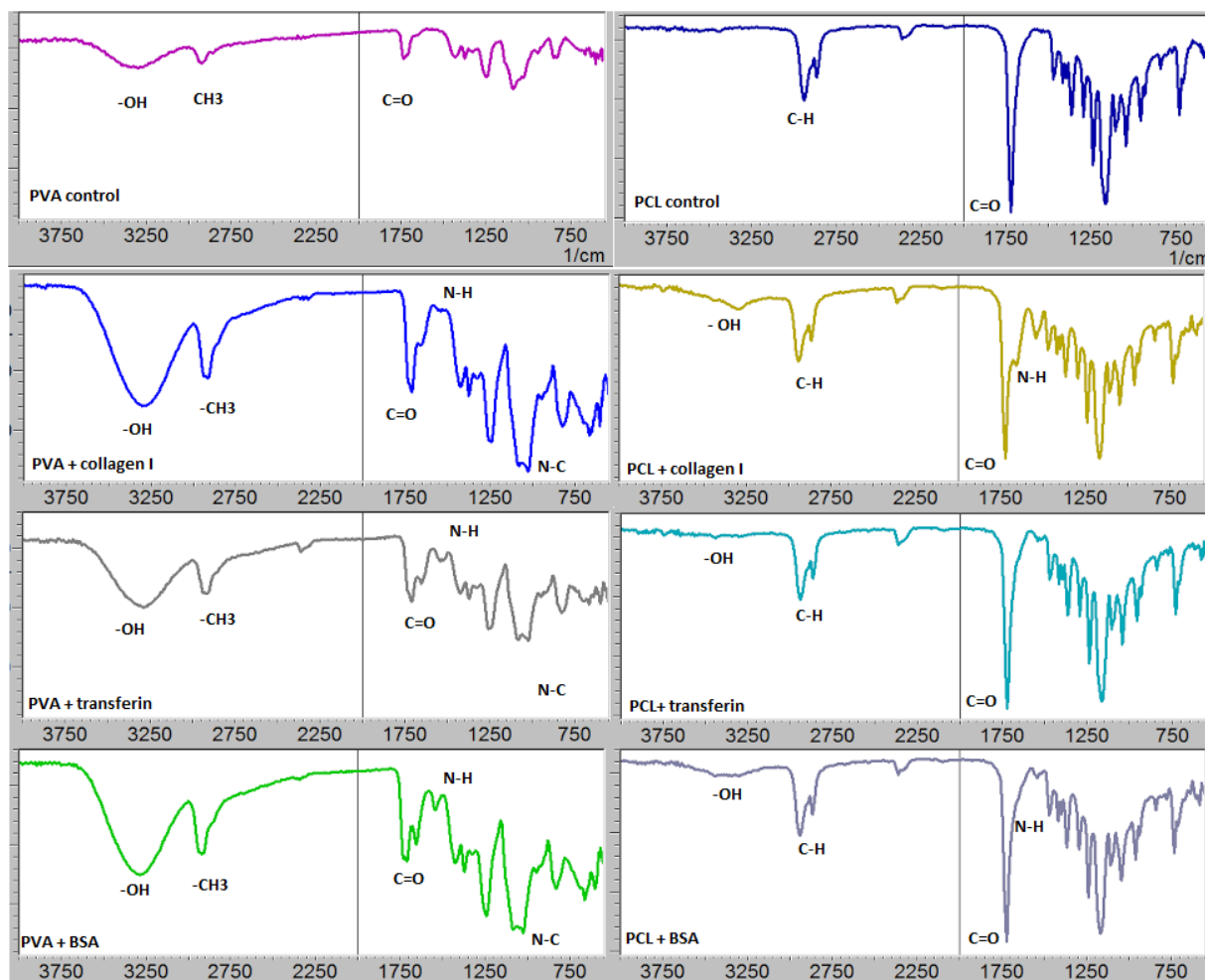
Rozdíl v morfologii a smáčivosti mezi PCL a PVA nanovláknennými membránami souvisí také s jejich odlišnou interakcí s proteiny. Interakce s proteiny byla hodnocena pomocí FTIR-ATR. Vzorky inkubované s BSA, transferinem a kolagenem typu I byly analyzovány na adsorpci proteinu na povrch nanovláknenných membrán. Získaná spektra ukazují adsorpci při frekvencích typických pro proteiny (Obr. 12). Kontrolní PVA obsahuje převážně rezonanci OH skupin ($3100\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$), vazby C-H a skupiny C=O (1750 cm^{-1}). Při adsorpci kolagenu typu I došlo ke zvýšení rezonance v oblastech typických pro N-H ($1650\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) a C-N ($1342\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$) vazbu. Podobný adsorpční vzorec byl pozorován u BSA. Vzorky, inkubované s transferinem, vykazovaly nižší rezonanci u těchto vlností. V případě PCL je FTIR spektrum čistých vláken charakterizováno přítomností signálu vazeb C-H (2800 cm^{-1}) a skupiny C=O (1750 cm^{-1}). Po inkubaci s proteiny (kolagen I, transferin a BSA) byl detekován další signál při vlnotech odpovídajících skupinám OH ($3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$), NH ($1650\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) a CN ($1342\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$). Tyto výsledky ukazují vazbu proteinů na PCL nanovláknena.

Podobně měření povrchového zeta potenciálu v přítomnosti BSA, kolagenu typu I a kyseliny hyaluronové ukázalo změny v povrchových charakteristikách (Obr. 11C). V případě čistých PVA nanovláken byl povrchový zeta potenciál -24 ± 5 mV. Po použití kolagenu typu I a BSA se povrchový zeta potenciál zvýšil (u kolagenu typu I byl 11 ± 5 mV, u BSA byl -20 ± 3 mV), což ukazuje na interakci se nanovláknem. Kyselina hyaluronová se také navázala na povrch PVA, což vedlo ke zvýšení povrchového zeta potenciálu na 14 ± 7 mV. V případě PCL měla čistá vlákna vysoce negativní povrchový zeta potenciál -61 ± 4 mV. Interakce s BSA a kolagenem I vedla ke zvýšení zeta potenciálu na hodnotu 20 ± 3 mV, resp. 6 ± 3 mV. Interakce s kyselinou hyaluronovou změnila zeta potenciál pouze na -5 ± 4 mV,

Interakce s proteiny je také charakterizována rychlostí proteinové desorpce. Vzorky PVA a PCL inkubované různou koncentrací BSA ukazují, že proteiny jsou vázány na oba typy vláken (Obr. 11D). V případě PCL i PVA je množství desorptovaného BSA spojeno s počáteční koncentrací proteinu. Při vyšších koncentracích však vlákna PCL uvolňovala vyšší množství BSA, což také naznačuje vyšší adsorpci. Při nízkých koncentracích (0,1 mg/ml BSA) byla rychlost desorpce podobná pro oba typy vláken. Chování bylo podobné také pro další proteiny, jako je kolagen typu I, želatina a transferin (Obr. 11E). Nižší desorptované množství z PVA nanovláken může být spojeno s omezeným interakčním povrchem po počátečním nabobtnání. Vysoce nabobtnalé vzorky PVA již vytvořily gel, omezující vstup proteinů do PVA, a vzniklý materiál tak poskytuje pouze omezený interakční povrch. PCL vykazuje zlepšenou stereologickou stabilitu a dobrou adsorpci proteinů, což má za následek více adhezivní prostředí.

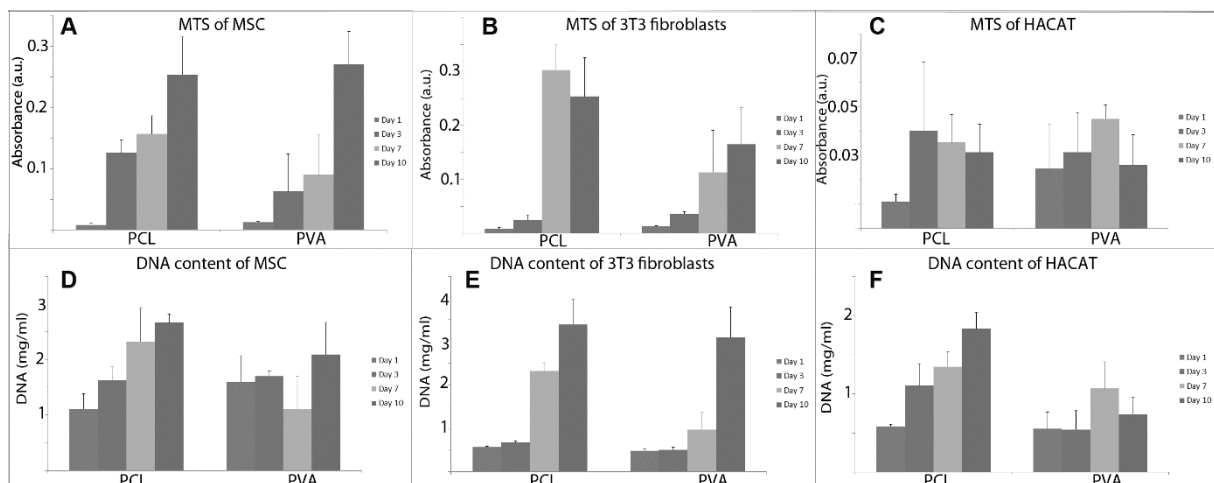
4.1.3 Testování funkcionalizovaných nanovláken *in vitro*

Metabolická aktivita a buněčná proliferace byly analyzovány pro srovnání buněčného růstu na nanovláknenných membránách. Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu, indikujícího aktivitu mitochondriálních dehydrogenázových enzymů. Buněčná proliferace byla měřena testem Picogreen, kvantifikujícím koncentraci DNA na nanovláknenných membránách. V případě MSC (obr. 4 A, D) se buněčná metabolická aktivita zvyšovala na nanovláknenných membránách, což ukazuje na kompatibilitu buněk s materiálem. Počet buněk se však zvyšoval

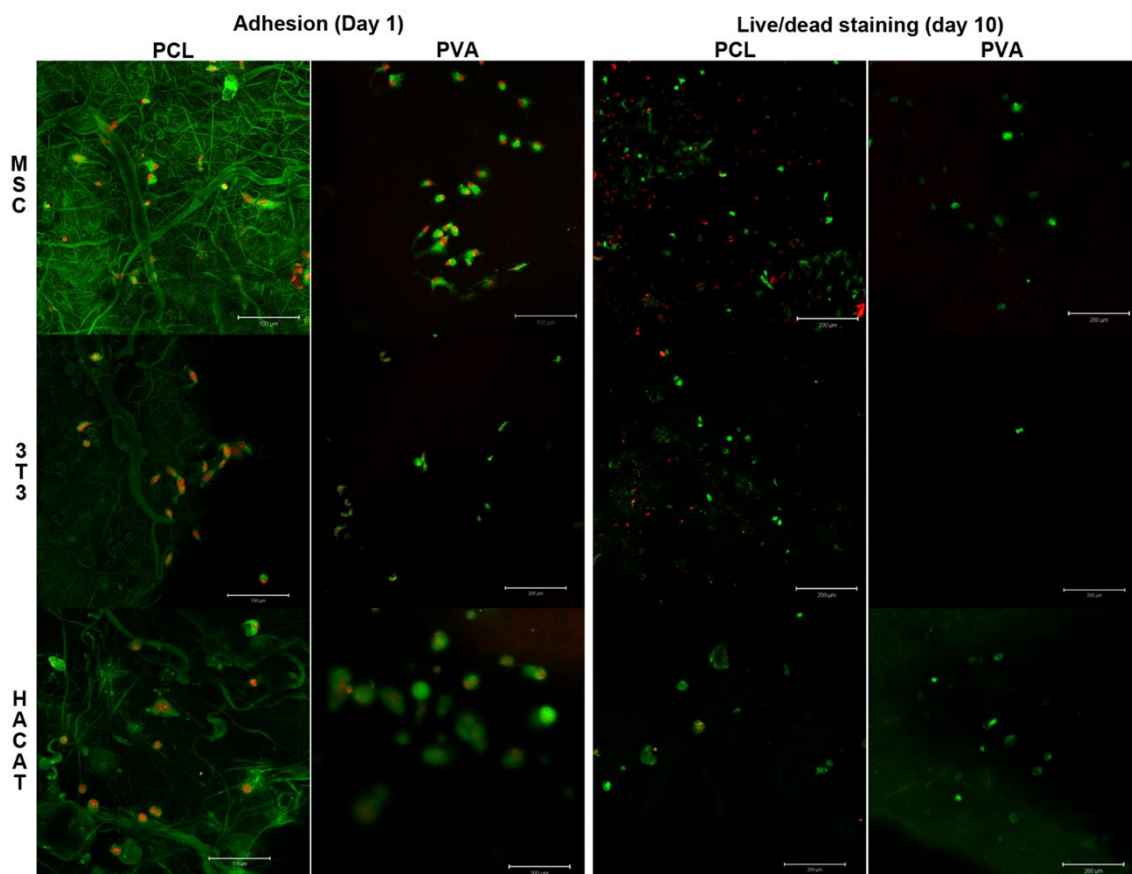


Obr. 12. FTIR ATR spektra vláken s adsorbovanými proteiny. Spektra ukazují přítomnost rezonančních skupin ve vzorcích PVA a PCL s BSA, transferinem a kolagenem I.

hlavně na PCL vláknech, jak dokazuje analýza proliferace. Koncentrace DNA v 7. den byla významně vyšší na PCL ($p < 0,001$). V případě 3T3 fibroblastů (Obr. 13B, 13E) vykazovaly buňky na PCL vláknech vyšší metabolickou aktivitu a proliferaci než na PVA, s výjimkou 10. dne. Výsledky ukázaly významně vyšší metabolickou aktivitu v 1., 3. a 7. den na PCL vláknech ($p < 0,001$). Podobně byla rychlost proliferace významně vyšší u PCL vláken v 1., 3. a 7. den ($p < 0,001$). V případě keratinocytů (Obr. 13C, 13F) vykazovaly oba typy vláken omezenou kompatibilitu. Důvodem může být nedostatečný počet buněk při počáteční kolonizaci. Avšak životaschopné buňky vykazovaly zlepšenou proliferaci v případě PCL v den 10, kdy byla koncentrace DNA významně vyšší. Celkový trend koncentrace DNA na PCL naznačuje zvýšení počtu buněk, zatímco na PVA byl počet buněk spíše statický.



Obr. 13. Buněčná proliferace a metabolická aktivita na PCL a PVA nanovlákněných membránách. (A) Metabolická aktivita MSC. (B) Metabolická aktivita 3T3 fibroblastů. (C) Metabolická aktivita keratinocytů. (D) Proliferace MSC. (E) Proliferace 3T3 fibroblastů. (F) Proliferace keratinocytů.



Obr. 14. Buněčná adheze a životaschopnost na nanovlákněných membránách. Adheze MSC, 3T3 fibroblastů a keratinocytů (HACAT) 1. den. Zelená označuje buněčné membrány obarvené DiOC6 a červená označuje buněčná jádra obarvená propidium jodidem. Barvení

Live/Dead MSC, 3T3 fibroblastů a keratinocytů v 10. den. Červená označuje PI signál mrtvých buněk. Zelená označuje vitální skvrnu BCECF-AM.

Analýza buněčné adheze pomocí konfokální mikroskopie ukázala buňky adherující odlišně na oba typy nanovlákných membrán (Obr. 14). Buňky na PCL membráně vykazovaly morfologicky roztažený tvar morfologii, zatímco buňky na PVA byly spíše globulární neadherované buňky. Barvení Live/Dead v 10. den ukazuje, že zatímco na PCL byl počet buněk zvýšený, počet buněk na PVA membráně byl podobný počáteční hustotě nasazování. Nicméně životaschopnost buněk na PVA byla vysoká a na nosiči byl nalezen nízký počet mrtvých buněk. To naznačuje, že vlákna PVA jsou biokompatibilní, i když materiál nepodporuje buněčnou proliferaci. Naopak PCL vlákna umožňují buněčný růst a dělení. Live/Dead barvení ukazuje zvýšený počet 3T3 fibroblastů, keratinocytů a mezenchymálních kmenových buněk. Avšak kromě živých buněk byly detekovány také mrtvé buňky, což ukazuje na neoptimální podmínky pro růst buněk, korelující s pomalejším nárůstem metabolické aktivity v případě MSC, a poklesem v případě fibroblastů 3T3 mezi dnem 7 a dnem 10 (Obr. 14).

Testy *in vitro* ukázaly, že PCL je vhodným materiálem pro růst fibroblastů, keratinocytů a MSC a je považován za adhezivní krytí ran. Na druhou stranu PVA nestimuluje buněčnou proliferaci na svém povrchu, je však také biokompatibilním materiálem bez cytotoxicity, ale s nižší kapacitou pro buněčnou adhezi.

4.1.4. Testování funkcionalizovaných nanovláken *in vivo*

PVA a PCL nanovlákné membrány byly testovány na hlubokých kožních ranách o kritické ploše (35 mm x 35 mm) (Obr. 15). Rány byly kryté trvale bez výměny (Skupina I - PCL, Skupina II - PVA) nebo s periodickou výměnou každých 7 dní (Skupina III - PCL-strip, Skupina IV – PVA-strip). Kontrolní skupina (skupina V) měla kritický defekt bez krytí rány nanovláknou membránou.

Ve skupině PVA bylo po 7 dnech viditelné koagulum a žádná sekundární infekce. Po 14 dnech byla rána ve fázi granulace a obvaz byl volně připevněn k povrchu rány. Po 21 dnech byla viditelná epitelizace rány a nová srst na okrajích rány. (Obr. 15)

Analýza skupiny PVA-strip ukázala suchou a čistou ránu bez infekce po 7, 14 a 21 dnech. Část vzorků vykazovala tvorbu koagula. Na vzorcích byla patrná granulace a tvorba

fibrinové vrstvy. Postup granulace byl patrný po 14 dnech a po 21 dnech byla pozorovatelná epitelizace rány. U některých vzorků byla viditelná tvorba nové srsti.

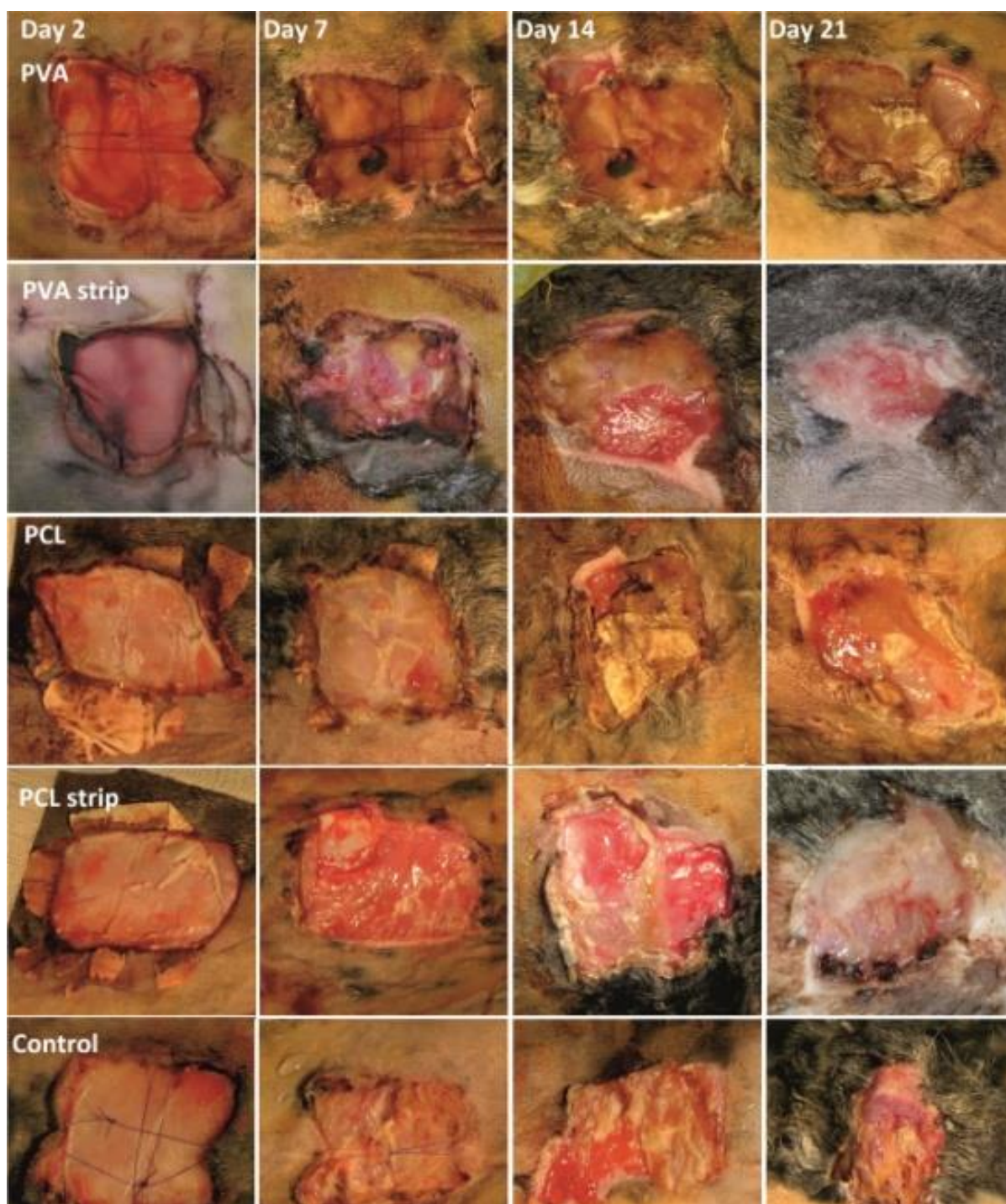
Skupina PCL vykazovala podobnou progresi hojení jako skupiny s PVA a PVA-strip po 7, 14 a 21 dnech. Obvaz však pokrýval celou ránu a interakce s povrchem rány byla silnější.

Ve skupině PCL-strip byla pozorovaná granulační tkáň po odstranění krytí rány 7. a 14. den. Po 21 dnech byla plocha rány zmenšena o 1/3 původní velikosti. Okraje rány vykazovaly epitelizaci a tvorbu nové srsti. Kontrolní skupina vykazovala hojení bez známek zánětu. Granulace byla pozorována 7. a 14. den. 21. den byla epitelizace viditelná na okrajích rány.

Progrese hojení byla podporována ve skupinách s použitím PVA a PCL membrány ve srovnání s kontrolní skupinou. Skupiny s periodickou výměnou navíc vykazovaly zrychlené hojení ve srovnání se skupinami s krytím jedním obvazem po dobu 21 dnů.

Histologická analýza byla provedena na biopsiích odebraných v 7., 14. a 21 den. Biopsie tkání obsahovaly jak tkáň hojící se rány, tak tkáň obklopující ránu. Průběh hojení ran koreluje s produkcí kolagenu typu I. Je známo, že zralý kolagen typu I, nalezený ve svazcích husté pojivové tkáně, je zodpovědný za pevnost v tahu měkkých lidských tkání¹⁴⁷. Kvantitativní analýza (Obr. 16 a Tab. 3) ukázala, že obsah kolagenu typu I v nativní kůži byl vyšší než ve všech vzorcích ran. Překrytí nanovláčennou membránou však vedlo ke zvýšení obsahu kolagenu ve srovnání s kontrolní skupinou. Obsah pro všechny skupiny byl podobný během celého testovaného období, kromě statisticky významného zvýšení ve skupině PCL oproti skupině PCL-strip 21. den ($p = 0,039$). Nejvyšší průměrné hodnoty byly pozorovány ve skupinách PCL a PVA. Odstranění a výměna nanovláčenného krytí z rány měla spíše inhibiční účinek na akumulaci a produkci kolagenu typu I. Kvalitativní zjištění jsou znázorněna na Obr. 17 (pravý sloupec).

Rozvoj mikrocév v hojící se ráně je klíčovým faktorem pro odstraňování odpadních látek, přivádění živin a kyslíku pro syntézu kolagenu^{148,149}. Zvýšená hustota mikrocév je také odpovědí na hypoxické podmínky v hojící se tkáni.



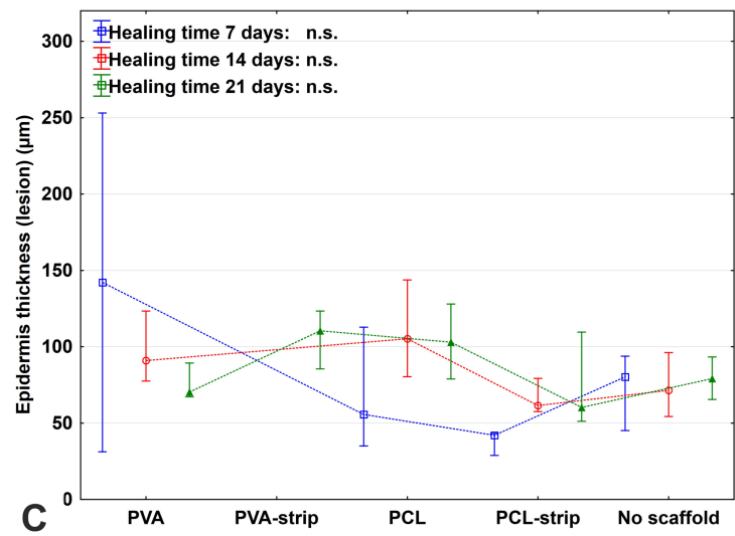
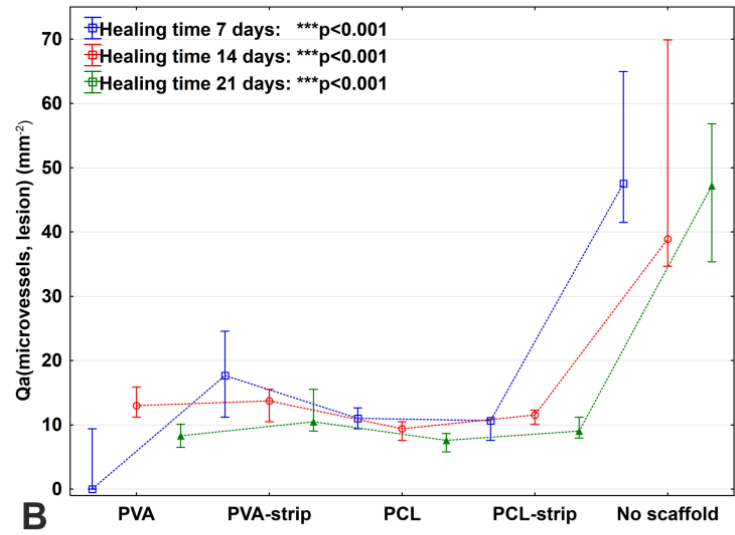
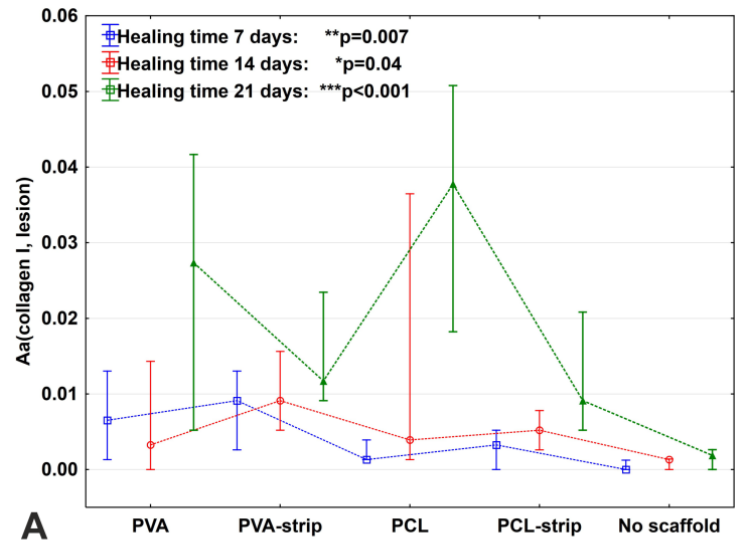
Obr. 15. Hojení kožních ran, překrytých PCL a PVA nanovláknými membránami 2., 7., 14. a 21. den. Nanovlákné membrány byly na ráně ponechány po celý experiment (PVA a PCL) nebo byly převazovány (PVA-strip, PCL-strip). Ke srovnání byl použit vzorek bez nanovlákných membrán (Control).

Aplikace PVA a PCL nanovlákných membrán na rány vedla k nižší hustotě mikrocév ve srovnání s hojením u kontrolní skupiny bez membrán (obrázek 7 a tabulka 2). Skupina PVA-strip vykazovala vyšší hustotu mikrocév ve srovnání s PVA-strip a PCL v 7.

den a ve srovnání s PCL-strip a PCL ve 21. den, respektive ve 14. a ve 21. den. Navíc skupina PCL-strip měla v 7. den vyšší hustotu mikrocév než skupina s PCL. Všechny vzorky vykazovaly velmi vzácný výskyt obřích buněk cizích těles a zánětlivých buněk, což dokumentovalo normální průběh regeneračních fází. Kvalitativní nálezy jsou znázorněny na obrázku 8 (střední sloupec).

U všech zkoumaných vzorků bylo hojení doprovázeno nadměrnou produkcí kožních epitelálních buněk¹⁵⁰. Skupiny s nanovláknými membránami vykazovaly podobnou tloušťku vytvořené epidermis jako kontrolní skupiny. Aplikace PVA a PCL membrán vedla k vytvoření epidermis s podobnou tloušťkou (přibližně 100 μm). Výměna PVA (PVA-strip) však nevedla ke snížení tvorby epidermis. V případě skupiny s PCL byla epidermis tenčí. Nález ukazuje i nižší obsah kolagenu typu I u PCL-strip ve srovnání s PCL. Kromě toho byla ve skupině PCL pozorovaná nejvyšší tvorba sekundárních kožních derivátů (bazální proliferace epidermis a formování dermálních papil). Kvalitativní nálezy jsou znázorněny na Obr. 17.

Obr. 16. Kvantitativní histologie kůže po 7, 14 a 21 dnech hojení u všech studovaných skupin. Data jsou prezentována jako mediány a mezikvartilové vzdálenosti. Jsou uvedeny p-hodnoty Kruskal-Wallis ANOVA testů. (A) Plošný podíl kolagenu v dermis na plošný úsek léze AA (kolagen typu I, léze). Ve většině období hojení bylo množství kolagenu typu I větší v jakémkoli typu nanovlákné membrány oproti vzorkům bez nanovláken. Vzorky s jednotlivými typy nanovlákných membrán měly srovnatelné množství kolagenu a jediným rozdílem bylo větší množství kolagenu v PCL než v PCL-strip po 21 dnech hojení. (B) Hustota větších (obsahujících buňky hladkého svalstva) mikrocév v dermis hojící se léze Q_A (mikrocévy, léze). Aplikace obou typu nanovlákných membrán vedla k nižší hustotě mikrocév ve srovnání s hojením rány bez membrán. Vzorky s PVA měly vyšší hustotu mikrocév než vzorky s PCL. (C) Tloušťka epidermis pokrývající hojící se lézi. Histologickým rozbořem byla zjištěna srovnatelná tloušťka téměř všech vzorků.



Porovnání plošných podílů kolagenu typu I v ráně s p-hodnotami za 7 dní/14 dní/21 dní:

	PVA-strip	PCL	PCL-strip	Kontrola
PVA	n.s./n.s./n.s.	n.s./n.s./n.s.	n.s./n.s./n.s.	0.006/n.s./0.001
PVA-strip	-	n.s./n.s./n.s.	n.s./n.s./n.s.	0.006/0.004/0.002
PCL	-	-	n.s./n.s./ 0.039	0.038/n.s./<0.001
PCL-strip	-	-	-	n.s./ 0.012/0.003

Porovnání hustoty mikrocév Q_A s p-hodnotami za 7 dní/14 dní/21 dní:

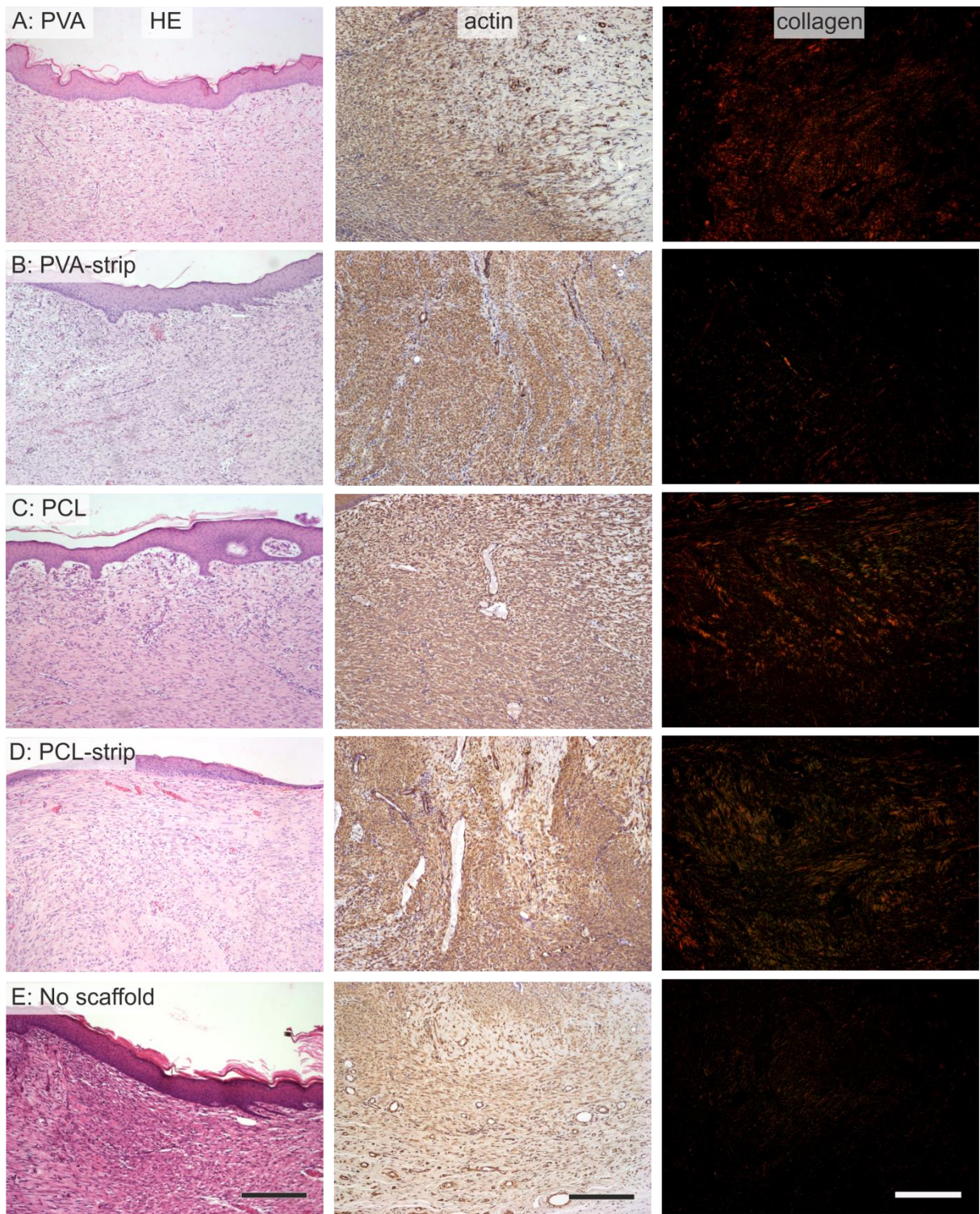
	PVA-strip	PCL	PCL-strip	Kontrola
PVA	0.003/n.s./n.s.	0.035/0.005/n.s.	n.s./n.s./n.s.	<0.001/<0.001/<0.001
PVA-strip	-	n.s./ 0.024/0.020	0.027/n.s./n.s.	<0.001/<0.001/<0.001
PCL	-	-	n.s./n.s./ 0.034	<0.001/n.s./<0.001
PCL-strip	-	-	-	<0.001/<0.001/<0.001

Porovnání tloušťky epidermis s p-hodnotami za 7dní/14 dní/21 dní:

	PVA-strip	PCL	PCL-strip	Kontrola
PVA	n.s./n.s./n.s.	n.s./n.s./ 0,045	n.s./ 0,030 /n.s.	n.s./n.s./n.s.
PVA-strip	-	n.s./n.s./n.s.	n.s./n.s./n.s.	n.s./n.s./n.s.
PCL	-	-	n.s./ 0,026 /n.s.	n.s./n.s./n.s.
PCL-strip	-	-	-	n.s./n.s./n.s.

Tab. 3. Porovnání statistických rozdílů histologických parametrů. P-hodnoty post-hoc Mann-Whitney testů, srovnávajících jednotlivé skupiny podle výsledků Kruskal-Wallis ANOVA u všech třech histologických kvantitativních parametrů a všech třech intervalech hojení (7dní/14 dní/21 dní). Opakující se hodnoty byly nahrazeny znakem (-). Pro nevýznamné hodnoty ($p > 0,05$) je použito označení n.s. (not significant).

Obr. 17. Kvalitativní histologická analýza v pěti experimentálních skupinách (A-E) po 21 dnech hojení. Barvení hematoxylin-eosinem (levý sloupec); imunohistochemická detekce α -aktinu hladkého svalstva (hnědá barva, střední sloupec); specifická vizualizace kolagenu typu I, obarveného červeně, a kolagenu typu III, obarveného zeleně s pikrosirovou červení, pozorovaná pod kruhově polarizovaným světlem (pravý sloupec). V levém sloupci celková histologie ukázala epitel pokrývající hojící se ránu. U vzorků překrytých nanovláčnými membránami (A-D) byla tloušťka epitelu srovnatelná s tloušťkou u vzorků bez membrán (E). Ve vzorcích PCL byla častěji než v jiných skupinách pozorována primordia regenerujících se chlupových folikulů. Ve středním sloupci barvení zvýrazňuje větší mikrocévy, které byly nejčastější u vzorků bez membrán (E). V dermis je také obarveno mnoho aktin pozitivních kontraktálních myofibroblastů. Pravý sloupec ukazuje, že kolagen typu I (červená až žlutá vlákna) byl hojnější ve skupinách PCL (C) a PVA (A) než v jiných skupinách. Kolagen typu III (jemná zelená vlákna) byl hojnější ve vzorcích strip PCL (D). Ve vzorcích bez nanovláčných membrán byl obsah kolagenu v dermis nejnižší (E). Měřítka = 200 μ m.



4.1.5. Diskuze

Tato část práce srovnávala a hodnotila PVA a PCL funkcionalizované nanovláknenné membrány, sloužící jako překrytí pro hluboké kožné rány. Oba polymery, PVA i PCL, jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Mají však odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, což má vliv na chování nanovláknenných membrán v ráně.

Hydrofilní PVA nanovláknenné membrány byly připravené z dvou PVA polymerů o vysoké a nízké molekulární hmotnosti a následně funkcionalizované bifunkčním činidlem glyoxalem a kyselinou fosforečnou. Cílem funkcionalizace mělo být zvýšení stability nanovláknenné struktury ve vodném prostředí. Glyoxal je bifunkční činidlo, které je schopné propojit jednotlivé molekulární řetězce PVA (Obr. 5). Také bylo testováno, jaký vliv má různé relativní zastoupení vysokých a nízkých molekulárních vah PVA na funkcionalizaci PVA nanovláken glyoxalem. Testy stability PVA nanovláken ve vodním prostředí ukázaly minimální vliv relativního zastoupení vysokých a nízkých molekulárních vah PVA v nanovlákněch na jejich funkcionalizaci glyoxalem a kyselinou fosforečnou. Lze to vysvětlit použitou koncentrací glyoxalu, při které je četnost propojení mezi jednotlivými polymerními řetězci tak vysoká, že se ztrácí vliv délky polymerních řetězců. Při snížení koncentrace glyoxalu by byla pravděpodobně snížena stabilita nanovláken s vyšším relativním zastoupením nízkých molekulárních vah PVA, tedy kratších řetězců.

Elektrostatické zvlákňování hydrofobního PCL ze směsi rozpouštědel chloroform/etanol vedlo ke vzniku vláknité membrány. SEM analýza ukázala na přítomnost mikrovláken (průměr větší než 1000 nm) vedle nanovláken (průměr menší než 1000 nm). Literatura uvádí, že přítomnost etanolu ve zvlákňovacím roztoku snižuje rychlost odpařování rozpouštědla a snižuje průměr vzniklých vláken¹⁵⁴. Elektrostatické zvlákňování PCL z čistého chloroformu vede ke vzniku mikrovláken¹⁵⁵. Průměr nanovláken v připravených PCL a PVA membránách vyhovuje nárokům keratinocytů a kožních fibroblastů⁵⁶.

Oba typy nanovláknenných membrán byly funkcionalizovány adsorpcí proteinů na povrch nanovláken. PVA nanovláknenná membrána vykazovala významné bobtnání a omezenou adsorpci BSA. Výsledky však ukazují, že PVA interaguje s proteiny. Interakce může být podpořena především vodíkovými vazbami. PVA obsahuje vysoké množství OH skupin, stimulujících interakci s kolagenem a dalšími hydrofilními proteiny. V případě PCL bude interakce prováděna spíše hydrofobními interakcemi. Výsledky povrchového zeta potenciálu naznačují silnou interakci s BSA s PCL i PVA. Na druhé straně, jak kolagen typu I, protein s četnými hydroxylovými skupinami a rigidní strukturou, tak kyselina

hyaluronová, vysoce hydrofilní proteoglykan, vykazovaly vyšší povrchové pokrytí PVA oproti PCL. Desorpční studie však ukázaly vyšší uvolňování kolagenu typu I z PCL vláken. Interpretace tohoto zjištění může souviset s kombinací povrchových vlastností a bobtnání. V případě PCL bude interakce modulována buď nábojovými interakcemi (PCL má vysoký negativní zeta potenciál) a hydrofobními interakcemi (hydrofobní povrch s kontaktním úhlem 130°). Protože PCL nebobtná a je stabilní, bude povrch pro adsorpci během implantace stejný. V případě PVA bude adsorpce založena na vodíkové vazbě. To podporuje adsorpci molekul obsahujících karboxylovou, karbonylovou, aminovou a hydroxylovou skupinu, jako je kolagen typu I a kyselina hyaluronová. Avšak v důsledku vysokého bobtnání (333 %) a gelování při kontaktu s vodou je poměr povrchu nanovláken k jejich objemu pro adsorpci snížen. Nicméně polymerní řetězce PVA, ponořené do vhodného rozpouštědla (např. vody) podléhají procesu gelování, souvisejícím se vstupem molekul rozpouštědla a stereologickými změnami polymerních řetězců. Polymerní matrice se pak skládá z několika zón¹⁵⁶ - povrchová zóna, která obsahuje vysoce nabobtnané a uvolněné polymerní řetězce, obklopené molekulami rozpouštědla; pryžová zóna, obsahující částečně nabobtnané polymerní řetězce, tvořící hranici mezi gelovou/krytalickou zónou; a krytalická zóna s nenabobtnaným polymerem v suchém stavu. Na povrchové zóně dochází k erozi polymerního materiálu z hydrofilní matrice. Molekuly rozpouštědla obklopují polymerní řetězec a překonávají přitažlivé síly (např. van der Waalsovy síly, hydrofobní síly, iontové síly) mezi polymerními řetězci. To má za následek vysoké změkčení polymerního gelu na jeho povrchu a rozpuštění polymerních řetězců. V případě PVA to může dále snížit adhezi mezi krytem na ráně a nově vytvořenou ECM.

Biokompatibilita PCL a PVA nanovláknenných membrán byla testována na mezenchymálních kmenových buňkách (MSC), fibroblastech a keratinocytech. PCL vlákna vykazovala na svém povrchu vyšší buněčnou proliferaci a vyšší metabolickou aktivitu. PVA je, díky svým hydrofilním povrchovým vlastnostem, vysokému bobtnání a nízké adhezi proteinů, méně vhodným substrátem pro adhezi buněk. Výsledky však naznačují, že PVA vytváří podmínky pro život a růst buněk (kromě 3T3 fibroblastů po 10 dnech kultivace). V případě MSC vykazovaly buňky proliferaci na PCL vláknech, projevenou zvýšením celkové metabolické aktivity i koncentrace DNA. Nárůst počtu buněk byl však doprovázen přítomností mrtvých buněk v 10. den. Toto pozorování může souviset s nedostatkem živin a akumulací inhibičních faktorů, což odpovídá výsledkům publikovaných^{157,158}. V případě PVA vykazovaly MSC velmi omezenou proliferaci, nicméně buněčná životaschopnost a metabolická aktivita byla zachována. PVA bývá

označován jako polymerní systém pro udržení buněk v klidové fázi buněčného cyklu (G_0), včetně MSC. V případě fibroblastů 3T3 došlo ke zvýšení počtu buněk na PCL vláknenné membráně. V případě PVA zůstal počet stabilní až do 10. dne, kdy byl pozorován prudký nárůst počtu buněk. Výsledek může souviset s akumulací extracelulární matrix produkované fibroblasty a tvorbou vhodného mikroprostředí pro proliferaci buněk na nanovláknenném povrchu. Aby se zabránilo tomuto jevu *in vivo*, byla doba výměny skeletu v další studii *in vivo* nastavena na 7 dnů. Keratinocyty na obou typech membrán zůstaly v klidovém stavu. Nižší rychlost proliferace však může souviset s nižší hustotou výsevu buněk. Obecně platí, že obě membrány vykazují biokompatibilitu a necytotoxické vlastnosti. Rozdíly ve vlastnostech materiálu mají důležité důsledky pro aplikaci při hojení ran. PCL vykazuje vlastnosti zlepšující buněčnou adhezi a regeneraci jako nosič buněk. PVA nanovláknenná membrána naopak vykazuje vysokou rychlost bobtnání a omezený buněčný růst.

Tyto vlastnosti vedou k různému optimálnímu léčebnému režimu. V *in vivo* experimentu byl porovnáván léčebný režim, kdy nanovláknenné membrány byly buď přítomny na ráně během celkové doby hojení (21 dní, skupiny PCL a PVA) anebo byly vyměňovány každých 7 dní (skupiny PCL-strip a PVA-strip). Proces hojení ran byl u ran krytých PCL a PVA nanovláknem podpořen. PCL membrána se pevně přilepila k povrchu rány. V případě PVA bylo připevnění nanovláknenné membrány k ráně volné od 14. dne kvůli suchému a granulujícímu prostředí. Podobné pozorování zaznamenali Liu et al. (2010)¹⁵⁹. Ve všech skupinách byla epitelizace pozorována po 21 dnech. Skupiny PCL-strip a PVA-strip vykazovaly rychlejší hojení než skupiny bez výměny nanovláknenných membrán. Histologická analýza ukázala podobný model hojení mezi PCL a PVA membránami. Ve skupinách PCL a PVA bylo podobné množství kolagenu typu I a tloušťka epidermis. Výsledky však ukázaly vyšší počet sekundárních kožních derivátů v ranách krytých PCL. Výsledek naznačuje, že jak adhezivní PCL, tak neadhezivní PVA jsou vhodné pro regeneraci kůže; PCL krytí však podporuje adhezi a migraci buněk a vede k rychlejšímu hojení se zvýšenou bazální proliferací keratinocytů.

Důvodem, proč je PCL vhodnějším materiálem, může být jeho lepší schopnost funkcionalizace adsorpcí proteinů, což může následně vést k lepší buněčné adhezi *in vivo*. Alternativním vysvětlením může být skutečnost, že PCL za fyziologických podmínek podléhá hydrolýze, která má za následek tvorbu volných karboxylových skupin na svém povrchu, což vede ke snížení hydrofobie PCL nanovláken¹⁶⁰.

Aplikace PCL a PVA nanovláknenných membrán vedla ke snížení tvorby mikrocvé ve srovnání s kontrolní skupinou. To ukazuje, že v hojící se ráně pod nanovláknem nebylo tak

hypoxické prostředí, jaké bylo v kontrolní skupině bez nanovláken. Faktory, jako absence nekrózy, nízký zánět a bezproblémový průběh hojení naznačují, že u ran krytých nanovláknými byla koncentrace kyslíku dostatečná a nevedla k indukci hypoxické odpovědi a angiogeneze. Hypoxické prostředí nevyvolala ani extenzivní syntéza kolagenu typu I, která spotřebovává kyslík^{148,149}. Frakce kolagenu typu I byla u skupiny PCL a PVA vyšší než u kontrolní skupiny. Studované kožní rány byly tedy zásobeny kyslíkem z prostředí. Struktura a vlastnosti nanovlákných membrán pravděpodobně vytvářely méně hypoxické prostředí vhodné pro syntézu kolagenu typu I. V porózních nanovlákných membránách se mohla zadržovat vlhkost, která bránila vysychání rány a vzniku tlustého strupu, což podporovalo dobrou výměnu plynů mezi ránou a vnějším prostředím.

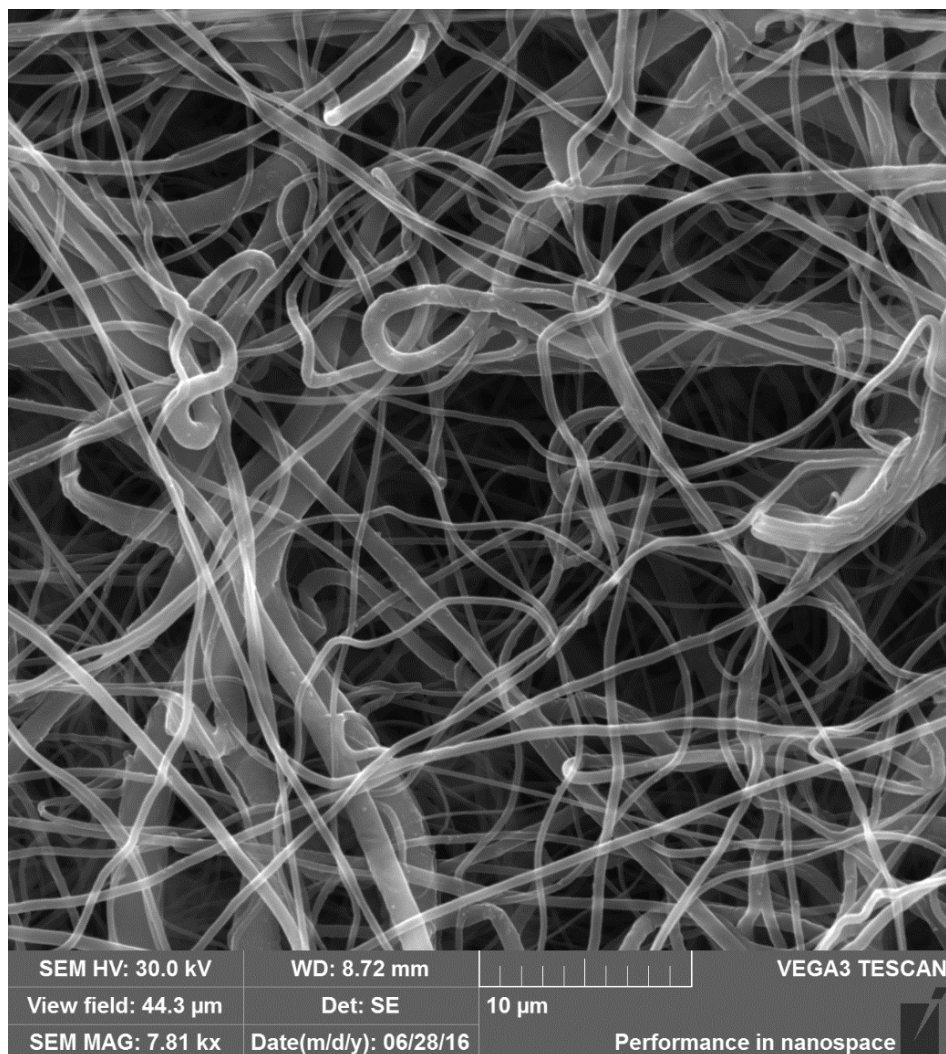
Klíčový rozdíl mezi reakcí rány na krytí PCL a PVA byl v postupu hojení po odstranění krytí z rány. Periodické odstraňování PCL krytí rány (skupina PCL-strip) vedlo ke statisticky významnému poklesu množství kolagenu typu I v den 21. Kromě toho se tloušťka epidermis snížila, což ukazuje, že buňky a extracelulární matrice, vytvořené v místě rány byly z rány odstraňovány během výměny obvazu. Na druhé straně ve skupině PVA-strip nebyl pozorován žádný významný pokles koncentrace kolagenu I nebo tloušťky epitelu po výměně obvazu. Režim hojení a převazování ran proto hraje důležitou roli ve výsledku procesu hojení a adhezivita obvazu na rány by měla být považována za klíčový faktor pro výběr režimu. V případě adherentních biodegradabilních obvazů, jako je PCL nano/mikrovlákněné krytí, by měla být výměnná lhůta krytí ran prodloužena, a to především v pozdní granulační a časně fázi epitelizace. Odstranění obvazu z rány může odlepit nově vytvořenou tkáň a prodloužit dobu hojení. Takové typy obvazů jsou optimální pro chirurgické a hluboké rány s nízkou exsudací a tvorbou nekrotické tkáně. Na druhé straně neadhezivní krytí, jako je PVA, umožňuje úspěšné hojení ran se srovnatelnými výsledky a vykazuje omezené poškození rány během výměny krytí. Takový obvaz je proto optimální pro ošetření ran s krátkými intervaly výměny obvazu, jako jsou popáleniny.

4.2. Příprava a testování funkcionalizovaných nanovláken pro podporu hojení fasc po reparaci abdominální kýl

4.2.1. Charakterizace funkcionalizovaných nanovláken

Materiál byl připravený elektrostatickým zvlákňováním PCL ze směsi chloroformu a etanolu. Analýza pomocí skenovací elektronové mikroskopie ukázala

nano/mikrovláknennou strukturu s průměrným průměrem nanovláken 445 ± 402 nm s přibližně 6 % zastoupením mikrovláken (vláken s průměrem větším než 1000 nm) (Obr. 18).

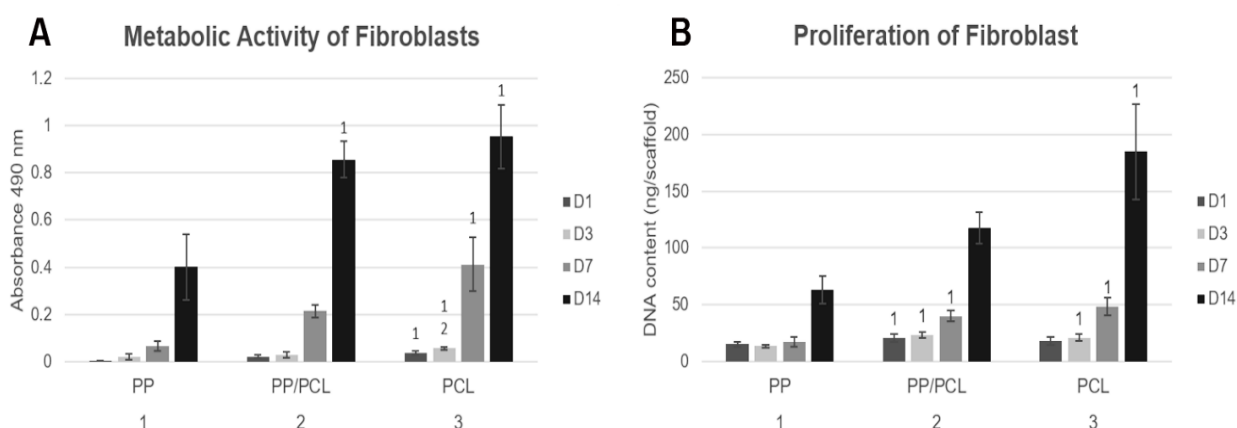


Obr. 18. SEM Snímek materiálu připraveného elektrostatickým zvlákňováním roztoku PCL ve směsi chloroformu a etanolu.

4.2.2. Testování funkcionalizovaných nanovláken *in vitro*

K testování biokompatibility připravených materiálů byl použit MTS test a test proliferace. Testovanými vzorky byly: polypropylenová (PP) síťka, polykaprolaktonová nanovláknna (PCL) a kompozitní nosič z polypropylenové síťky a polykaprolaktonových nanovláken (PP/PCL).

MTS test byl proveden v 1., 3., 7. a 14. den kultivace buněk, za účelem stanovení metabolické aktivity fibroblastů (obr. 19A). Data, získaná MTS testováním, ukazují, že všechny testované vzorky materiálů (PP, PP/PCL a PCL) jsou biokompatibilní, kdy průběhu experimentu byla pozorována rostoucí metabolická aktivita. Metabolická aktivita buněk, nasazených na PCL nanovlákněném nosiči, byla výrazně vyšší ve srovnání s metabolickou aktivitou buněk, nasazených na PP síťce, a to v průběhu celého experimentu. Bylo pozorováno i statisticky významné zvýšení metabolické aktivity buněk na kompozitním nosiči PP/PCL.

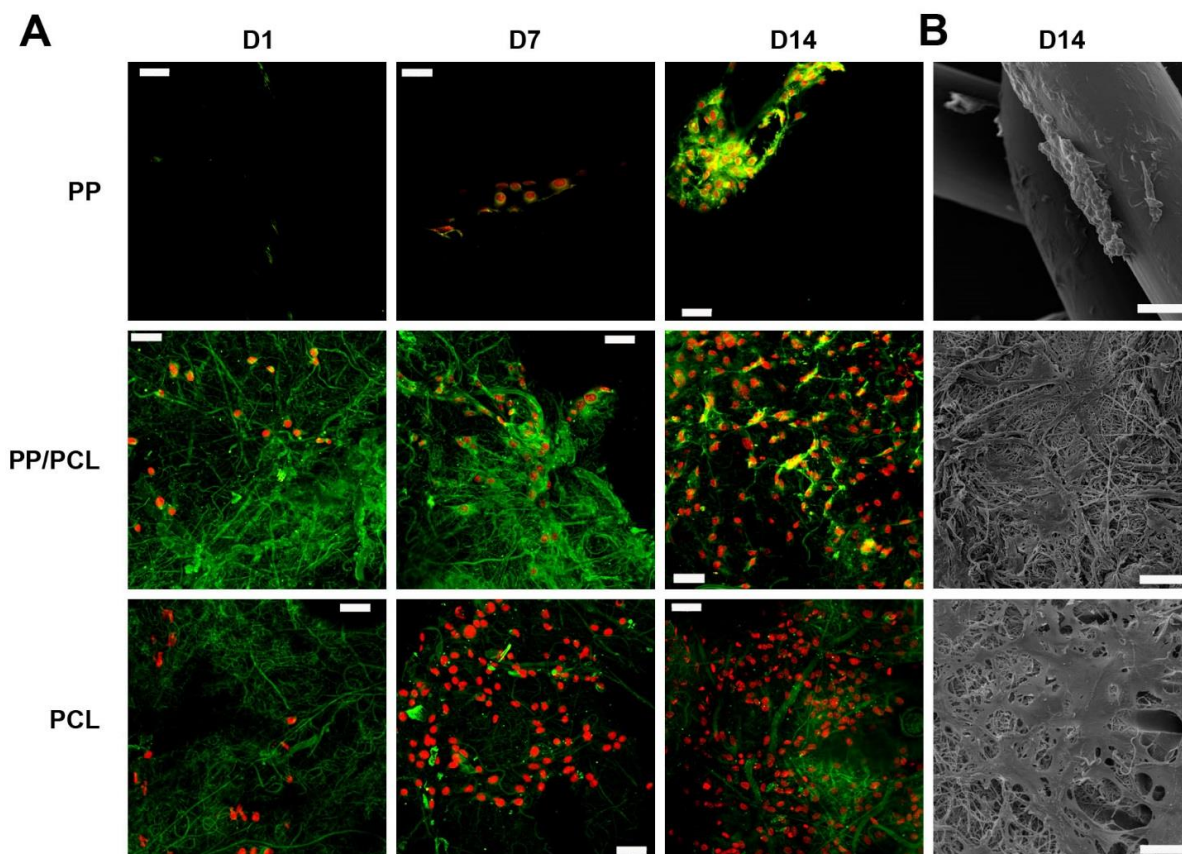


Obr. 19. Metabolická aktivita (A) a proliferace fibroblastů (B) v 1., 3., 7. a 14. den jejich nasazení na testované materiály: PP – polypropylenová kýlní síťka, PP/PCL - kompozitní nosič z polypropylenové kýlní síťky a polykaprolaktonových nanovláken, PCL - polykaprolaktonová nanovláknina. D1-D14 označují dny experimentu. Statistická významnost byla stanovena $p < 0,05$.

Podobně dopadly i výsledky testu proliferace metodou Picogreen (Obr. 19B), ukazující množství DNA, obsažené v nasazených buňkách v příslušných dnech. Významné rozdíly byly pozorovány od 7. dne experimentu na vzorku obsahujícím nanovláknina (PP/PCL, PCL) ve srovnání s kontrolní PP kýlní síťkou.

Morfologie nasazených buněk byla vizualizována pomocí skenovací elektronové mikroskopie a konfokální mikroskopie. Obrázky z konfokální mikroskopie (Obr. 20A) vzorků PP/PCL a PCL vykazovaly vyšší počáteční buněčnou adhezi a následně i zvýšenou rychlost proliferace fibroblastů. Fibroblasty nasazené na PP síťku nebyly na materiálu rovnoměrně rozloženy a vytvářely shluky. Analýza pomocí skenovací elektronové mikroskopie ukázaly téměř souvislé vrstvy buněk na materiálech obsahujících nanovláknina

(Obr. 20B). Na PP kýlní síťce byly buňky rozprostřeny nerovnoměrně a byly vzácné (Obr. 20B) kvůli relativně vysokému průměru PP vláken a tedy nízkému poměru povrchu k objemu materiálu a přítomnosti velkých ok, představujících prázdný prostor pro buněčnou adhezi.



Obr. 20. Vizualizace fibroblastů pomocí konfokální (A) a skenovací elektronové mikroskopie (B), kultivovaných na PP kýlní síťce, kompozitním PP/PCL nosiči a na PCL nanovlákněch. Zelená barva zobrazuje buněčné biomembrány, červená barva jádra buněk. D1, D7, D14 - dny od nasazení fibroblastů na testované materiály. Zvětšení 200x, měřítko 50 μm (A), 650x, měřítko 50 μm (B).

4.2.3. Testování funkcionalizovaných nanovláken *in vivo*

U žádného experimentálního zvířete nebyly pozorovány žádné patrné změny kondice nebo úbytek hmotnosti. Po explantaci břišní stěny bylo provedeno makroskopické hodnocení vzorků ze všech skupin. Povrch regenerované tkáně nevykazoval v žádné skupině známky zánětu nebo infekce. Makroskopická analýza však odhalila spíše neuspokojivé

výsledky. Standardní PP kýlní síťka byla do břišní stěny integrována, zatímco kompozitní PP/PCL nanovláknenný materiál vedl k vytvoření silné vazivové tkáně s bohatou fibroplazií.

4.2.4. Histologická analýza

Všechny vzorky obsahovaly vrstvu podkožního tuku, břišní svaly s fasciemi a aponeurózami, extraperitoneální tuk a vrstvu parietální pobřišnice. Hlubší vrstvy břišní fascie obsahovaly zbytky elastických vláken. Linie incize byly spojeny v jednu vrstvu zhojené tkáně, břišní svaly si však zachovaly vrstvenou organizaci. Typické histologické nálezy jsou uvedeny na Obr. 21.

Citlivost imunitní reakce CD31 na detekci vaskulárního endotelu byla velmi variabilní, proto byl pro statistickou analýzu použit spolehlivější výčet profilů mikrocév na jednotku plochy. Všechny vzorky byly porovnány odděleně v oblastech „incize“ a „mimo incizi“.

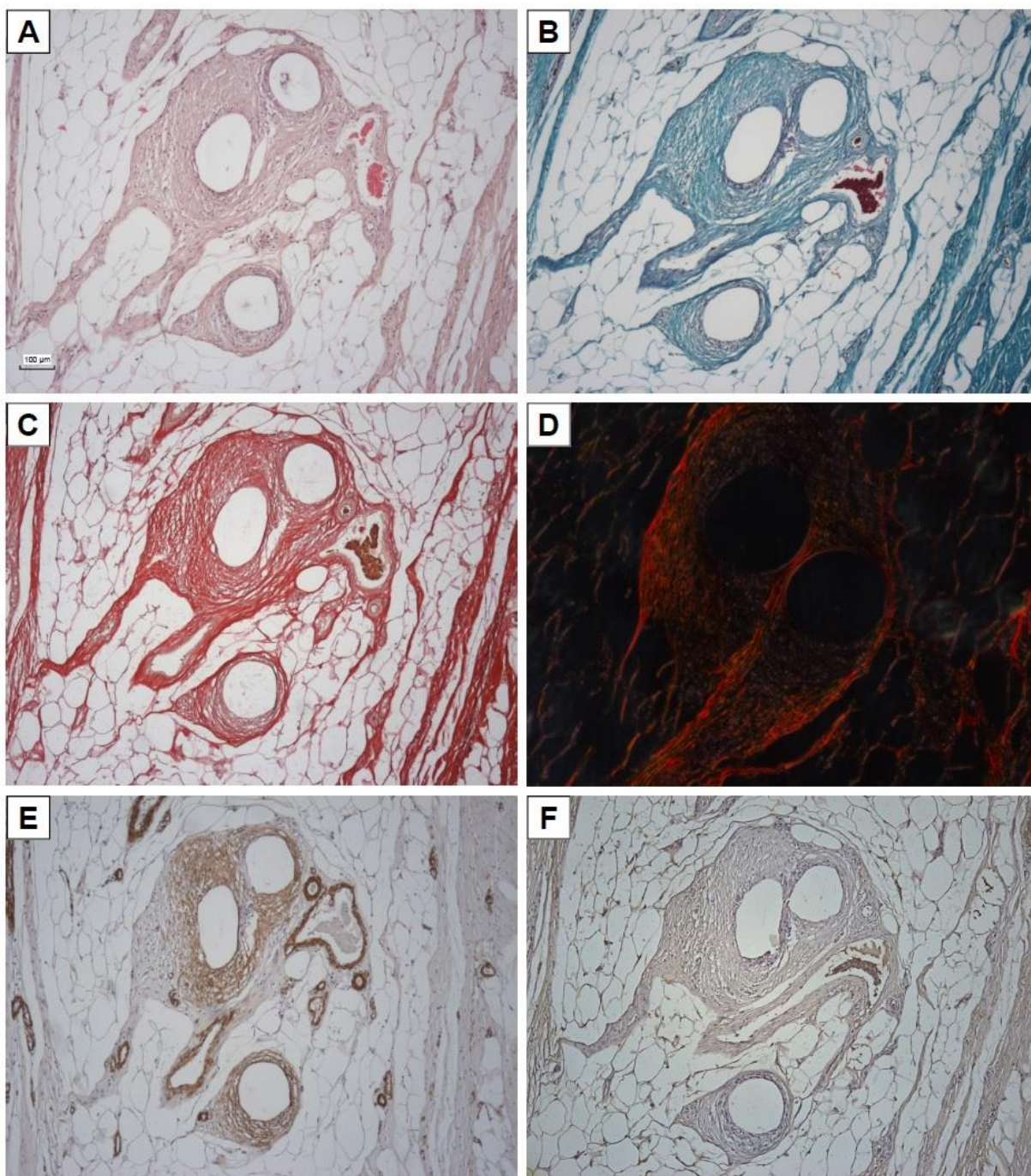
Oblast incize skupiny PP/PCL obsahovala větší podíl aktin pozitivních myofibroblastů než PP skupina (Mann-Whitney U test, $p = 0,002$). Hustota profilů mikrocév v rámci zhojené incize byla větší v PP skupině než ve skupině PP/PCL (Mann-Whitney U test: $p = 0,018$).

Rovněž implantát PP/PCL vedl k tvorbě jizev s vyšším obsahem aktin pozitivních myofibroblastů, ale s nižší hustotou aktin pozitivních mikrocév v oblasti „incize“ ve srovnání s oblastí „mimo incizi“ (Wilcoxonův párový test, $p = 0,017$). Ve tkáni jizvy pod implantátem PP sítěky nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi „incizí“ a přilehlou oblastí „mimo incizi“.

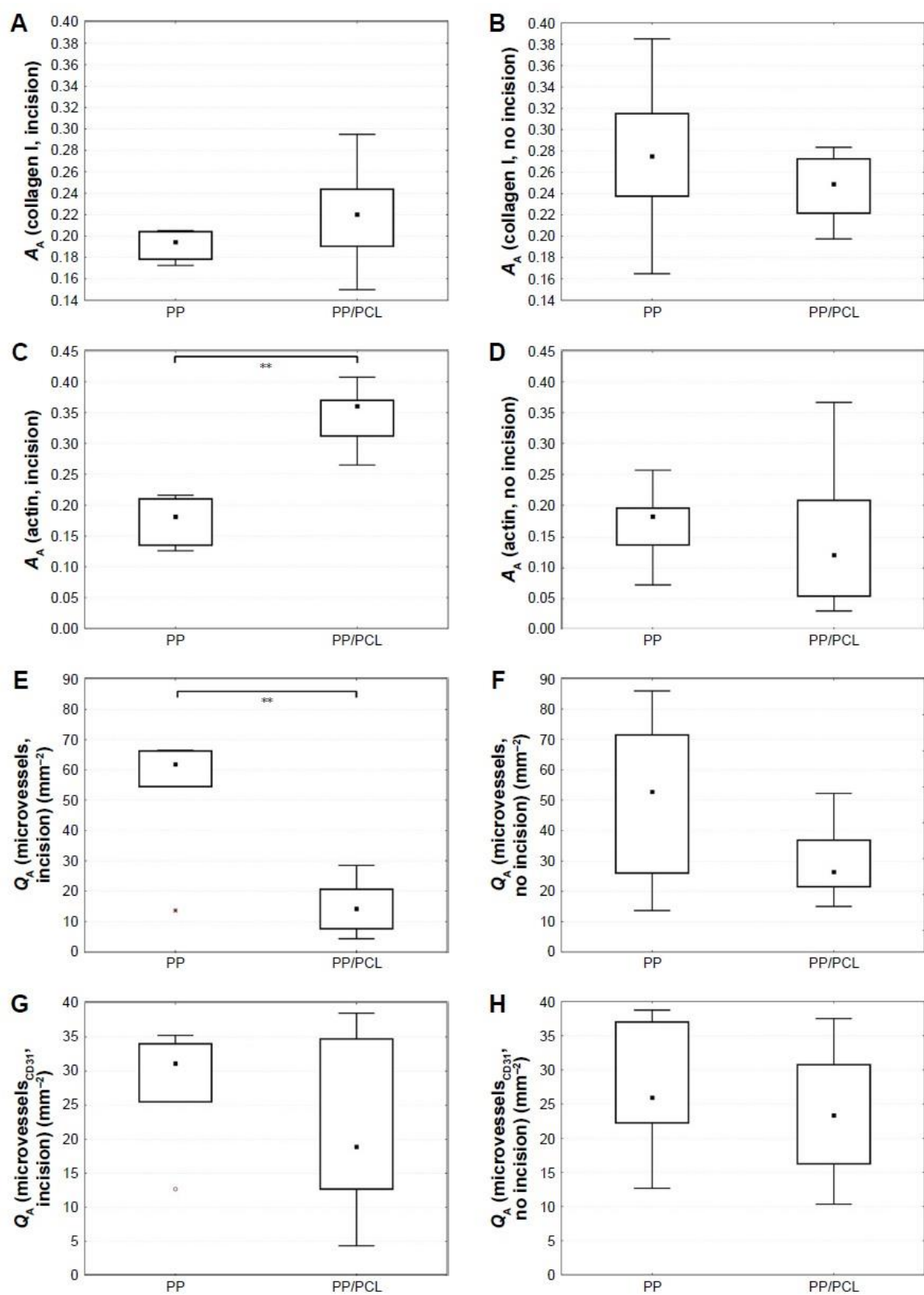
Oblast „incize“ pod PP/PCL implantátem obsahovala větší podíl myofibroblastů, ale méně mikrocév než vzorek pod PP sítíkou. Množství kolagenu typu I ve vzorcích záviselo na množství přítomných myofibroblastů.

Korelační analýza, kromě řady dalších korelací, ukázala, že pod PP sítíkou vykazoval obsah kolagenu typu I v řezu mírnou pozitivní korelaci s podílem aktin pozitivních myofibroblastů (Spearman $R = 0,54$; $p < 0,05$), a frakce aktin pozitivních myofibroblastů byla středně statisticky spojena s vyšší hustotou CD31 pozitivních mikrocév ($R = 0,60$; $p < 0,05$). U PP/PCL skupiny byla frakce kolagenu typu I pozitivně slabě korelována s hustotou aktin pozitivních mikrocév ($R = 0,40$; $p < 0,05$), ale středně s hustotou CD31 pozitivních mikrocév ($R = 0,57$; $p < 0,05$). PP/PCL kompozit byl méně infiltrován zánětlivými buňkami

než PP síťka, kolagenové fibrily byly více zarovnané a jizva obsahovala méně tukové tkáně (Obr. 21), avšak bez statistické významnosti.



Obr. 21. Přehled použitých barvení histologických řezů (A) Hematoxylin-eozin, (B) Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom, (C) Pikrosiriová červeň v nepolarizovaném světle a (D) v kruhově polarizovaném světle, (E) protilátka proti aktinu hladké svaloviny (myofibroblasty a buňky hladké svaloviny v cévní stěně), (F) protilátka CD31 (endotel mikrocév).



Obr. 22. Srovnání kvantitativních parametrů experimentálních skupin (PP vs. PP/PCL) v oblasti incize (A, C, E a G) a v oblasti mimo incizi (B, D, F a H). Odpovídající oddíly mezi

skupinami byly porovnány pomocí Mann-Whitneyova U-testu (významné výsledky jsou uvedeny v diagramech: ** p, 0,01).

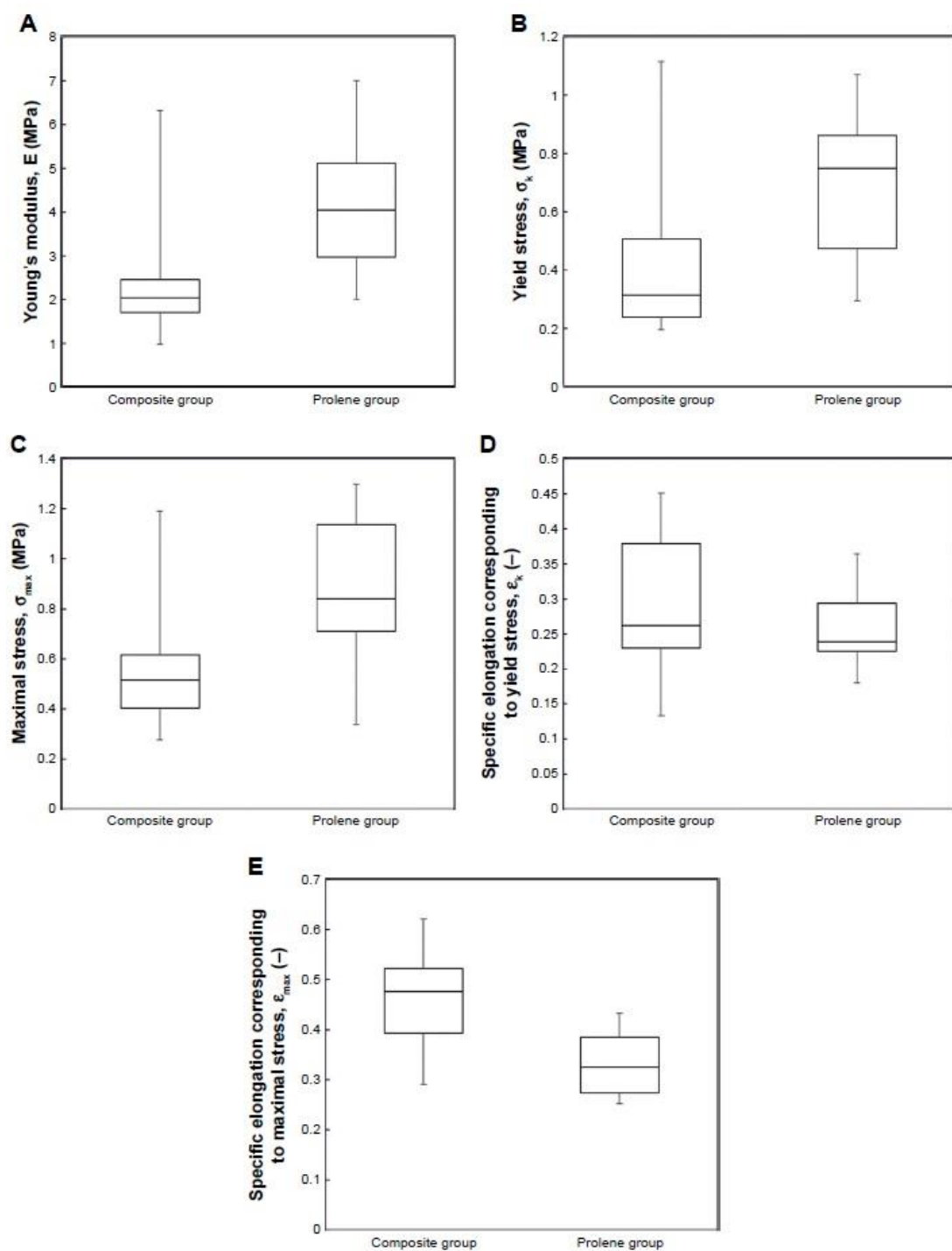
4.2.4. Biomechanická analýza

Naměřená data byla zpracována a byly vypočítány hodnoty σ_k , $\sigma_{\max}$, E. Jako další parametry byly stanoveny hodnoty relativního prodloužení, odpovídající monitorovanému tahu. Tab. 4 uvádí hodnoty mediánů sledovaných parametrů a směrodatné odchylky. Porovnání sledovaných parametrů obou skupin je znázorněno na Obr. 23.

	E [MPa]	σ_k [MPa]	$\sigma_{\max}$ [MPa]	ϵ_k [-]	$\epsilon_{\max}$ [-]
PP/PCL	2,041±1,041	0,314±0,213	0,517±0,202	0,262±0,091	0,476±0,088
PP	4,052±1,347	0,750±0,233	0,841±0,272	0,239±0,051	0,325±0,057

Tab. 4. Hodnoty sledovaných parametrů v biomechanické analýze.

Biomechanické testování ukázalo, že kompozitní materiál vede k tvorbě jizev s nižšími naměřenými hodnotami ve všech sledovaných parametrech, zejména v Youngově modulu pružnosti (E) a mezi kluzu (σ_k). Mez kluzu je hodnota určující napětí, při kterém je deformace stále vratná. Pod touto hodnotou neprobíhají ve tkáni nevratné strukturální změny. Youngův modul pružnosti vykazuje lineární korelaci mezi napětím a deformací. Jinými slovy, vyšší hodnota Youngova modulu znamená, že tkáň je tužší a méně pružná. Kompozitní PP/PCL skupina je tedy pružnější než skupina PP, avšak na úkor nižší pevnosti v tahu.



Obr. 23. Porovnání sledovaných parametrů (A) pružnost, (B) mez kluzu, (C) maximální napětí, (D) specifické prodloužení odpovídající mezi kluzu, (E) specifické prodloužení odpovídající maximálnímu napětí - pro zhojenou tkáň s PP kýlní sítkou (Prolene group) a kompozitním PP/PCL (Composite group). Graf ukazuje maximální a minimální naměřené hodnoty, první a třetí kvartil a medián.

4.2.5. Diskuze

Cílem této části práce bylo vhodně funkcionalizovat PCL nanovlákná a vytvořit tak nanovláknenný implantát, vhodný pro podporu hojení incizionální kýly a následně tento implantát otestovat *in vitro* a *in vivo*. PCL nanovlákná byla funkcionalizována PP kýlní sítkou, která se standardně implantuje při chirurgické operaci břišní kýly. Unikátnost nově připraveného kompozitu PCL nanovlákná/PP kýlní síťka spočívá ve způsobu přichycení nanovláken na povrch sítěky, kdy byla PCL nanovlákná na povrch sítěky nalepena biodegradabilním PCL lepidlem.

Výsledný kompozit je pevnější v porovnání s dříve vyvinutým kompozitem, u kterého byla PCL kýlní síťka elektrostaticky povlákněná PCL nanovlákn⁹⁶. Nový kompozitní implantát byl navržený a zkonstruovaný tak, aby řešil kritickou fázi implantace materiálu. Tou kritickou fází je probuzení pacienta z celkové anestézie, který bývá velmi často doprovázen kašláním, které vyvolává silné kontrakce operované břišní stěny a vytváří tak vysoké požadavky na pevnost implantátu. Samotná PCL nanovlákná nemají dostatečnou mechanickou pevnost⁹⁶. Funkcionalizace nanovláken kýlní sítkou tak zvýšilo pevnost nanovláknenného materiálu, kterou ještě umocnilo použití lepidla mezi oběma materiály.

Vytvořený kompozitní PP/PCL nanovláknenný implantát byl otestován *in vitro*. Kultivace 3T3-A21 fibroblastů ukázala výbornou biokompatibilitu kompozitního materiálu a ta byla srovnatelná s PCL nanovlákn⁹⁶. Testy metabolické aktivity (MTS test) a množství DNA (Picogreen) ukázaly významné rozdíly mezi použitím PP kýlní sítěky a oběma (PCL i PP/PCL) nanovláknennými materiály. Konstrukce propylenové kýlní sítěky obsahuje relativně velké prázdné mezery mezi vlákny, v porovnání s velikostí fibroblastů. Fibroblasty mohou žít pouze na povrchu polypropylénových vláken. Prázdný prostor PP kýlní sítěky byl v kultivační komůrce s fibroblasty vyplněn kultivačním roztokem, kdy v této podobě pro fibroblasty představuje "mrtvý prostor", ve kterém se buňky nemají možnost uchytit, vytvořit buněčnou adhezi a dělit se. V porovnání s kontinuální nanovláknennou membránou tak poskytuje prostá PP kýlní síťka výrazně menší povrch k adhezi buněk. Tyto závěry jsou ve shodě s daty, získanými konfokálním mikroskopem a SEM snímky, na kterých buňky pěstované na prosté kýlní síťce nevytvářejí kontinuální buněčnou vrstvu, jakou vytvářejí v případě PP sítěky s nanovlákn⁹⁶, ale pouze ostrůvky buněk. Toto zjištění má zásadní vliv na hojení incizionální kýly a její mechanickou pevnost. Méně buněk, přítomných v ráně, vytváří také méně kolagenu, což má za následek nejen pomalé hojení rány, ale i mechanicky méně odolnou jizvu, čímž vzniká vyšší riziko recidivy výskytu kýly.

Biokompatibilita PCL nanovláken, funkcionizovaných PCL lepidlem a PP kýlní sít'kou, ukázala i *in vitro* vysokou biokompatibilitu PCL lepidla. PCL lepidlo bylo připraveno rozpuštěním PCL v chloroformu. Případný reziduální obsah chloroformu, vzhledem k jeho vysoké cytotoxicitě¹⁶¹, by mohl negativně ovlivnit biokompatibilitu připraveného materiálu. Také případná schopnost lepidla akumulovat plyn etylénoxid, který byl použitý na sterilizaci materiálu, by mohla negativně ovlivnit biokompatibilitu připraveného materiálu. Na základě provedených buněčných testů a vzhledem k tomu, že mezi výsledky buněčného testování nanovláken a nanovláken s nalepenou PP sít'kou nebyl významný rozdíl, lze považovat výše zmíněné obavy za neopodstatněné.

Implantace připraveného kompozitního nanovláknenného materiálu do incizionální kýly prasete a následná makroskopická, histologická a biomechanická analýza zhojené tkáně ukázala spíše rozporuplné výsledky. Implantace kompozitního materiálu vedla k vytvoření silné vazivové tkáně s bohatou fibroplazií, zatímco u standardní kýlní sít'ky se stala součástí břišní stěny. Proč vlastně k danému jevu došlo u kompozitního materiálu? Odpovědí může být vlastní konstrukce kompozitu, a to přítomnost PCL nanovláken a PCL lepidla. Jak ukázaly buněčné testy, PCL nanovláknena představují výborný substrát pro kultivaci fibroblastů. Kultivace fibroblastů *in vitro* na PCL nanovláknenech vedla k jejich většímu množení. Histologická analýza skutečně ukázala vyšší obsah aktin pozitivních myofibroblastů v oblasti incize u vzorku tkáně s kompozitním implantátem. Vyšší počet myofibroblastů produkuje větší množství kolagenu, což rovněž histologická analýza u kompozitního implantátu potvrdila. Kolagenní vlákna byla více uspořádaná než u prosté PP kýlní sít'ky. To pravděpodobně souvisí s rovnoměrnou distribucí fibroblastů na povrchu nanovláken, která byla pozorována konfokální a skenovací elektronovou mikroskopií. Poskytnutí optimálních podmínek a mikroprostředí v podobě PCL nanovláken, vedlo k masivnímu namnožení fibroblastů a k příliš bohaté produkci kolagenu, což mělo za následek rozsáhlou fibroplazii.

Pro produkci kolagenu je také důležitý přísun živin, zejména kyslíku a tedy i optimální vaskularizace tkáně^{148,149}. V této studii nebyla testována schopnost PCL nanovláken podpořit množení endotelových buněk. Histologická analýza však potvrdila, že u nanovláknenného implantátu je v místech s vyšším obsahem myofibroblastů a kolagenu také hustější pletě aktin pozitivních zralých mikrocév. Neovaskularizaci a množení endotelových buněk stimulují také růstové faktory, uvolňující se z hypoxické tkáně. Hypoxie může být způsobena vyšším metabolismem buněk. Buněčné *in vitro* testy ukázali, že fibroblasty, kultivované na PCL nanovláknenech, vykazovali vyšší metabolickou aktivitu.

Lze se proto domnívat, že oba faktory jak vhodné prostředí na PCL nanovlákních pro množení endotelových buněk, tak vyšší metabolická aktivita fibroblastů na PCL nanovlákních vedoucí k hypoxii, mohly společně přispět k hustější vaskularizaci hojící se incize, a tak nepřímo i k vyššímu obsahu kolagenu.

Histologická analýza dále ukázala, že myofibroblasty, v případě přítomnosti nanovlákněného implantátu, měly menší tendenci vytvářet kontraktilní fenotyp buněk a menší smršťování zhojené tkáně, než bylo pozorováno u standardní polypropylénové kýlní sítě. S touto skutečností zřejmě souvisí rovnoměrné uspořádání kolagenových vláken, umožněné homogenním uspořádáním myofibroblastů na homogenním povrchu nanovlákněné vrstvy. Proč myofibroblasty vytvářejí spíše méně kontraktilní fenotyp na nanovlákních, není dosud zcela objasněno. Do budoucna, pro pochopení tohoto chování myofibroblastů, by bylo vhodné prozkoumat expresi genů myofibroblastů v průběhu hojení incize. V každém případě je menší kontraktilita jizvy při hojení incizionální kýly pozitivním efektem.

Biomechanická analýza ukázala, že kompozitní nanovlákněný implantát vedl ke vzniku jizvy méně tuhé, pružnější, ale zároveň méně odolné vůči rušivým silám oproti standardní kýlní síti. Za tento jev mohou pravděpodobně dva faktory. Prvním je specifické uspořádání kolagenových vláken a související nižší kontrakce rány. Při maturaci rány dochází fyziologicky k přeorganizování sítě kolagenových vláken a kontrakci rány. Menší kontrakce rány mohla vést k nižšímu přeorganizování kolagenu, čím se kolagenová síť stala volnější a pružnější. Druhým faktorem mohla být přítomnost lepidla v nanovlákněném implantátu. Rychlost biodegradace PCL lepidla byla, vzhledem k vzájemnému poměru celkového povrchu k objemu materiálu, mnohem nižší, než u PCL nanovláken. Proto lze předpokládat, že do oblasti lepidla fibroblasty pronikly později a vytvořily mnohem méně kolagenu a tato oblast zhojené kýly tak mohla být mechanicky nejslabším místem. Přítomnost téměř dvojnásobného množství PCL ve vrstvě lepidla, vzhledem k samotné nanovlákněné vrstvě, mohla být také důvodem, proč se kolem jizvy u nanovlákněného implantátu vytvořila vazivová vrstva. Jde o typickou reakci na přítomnost většího cizího tělesa v organismu⁸.

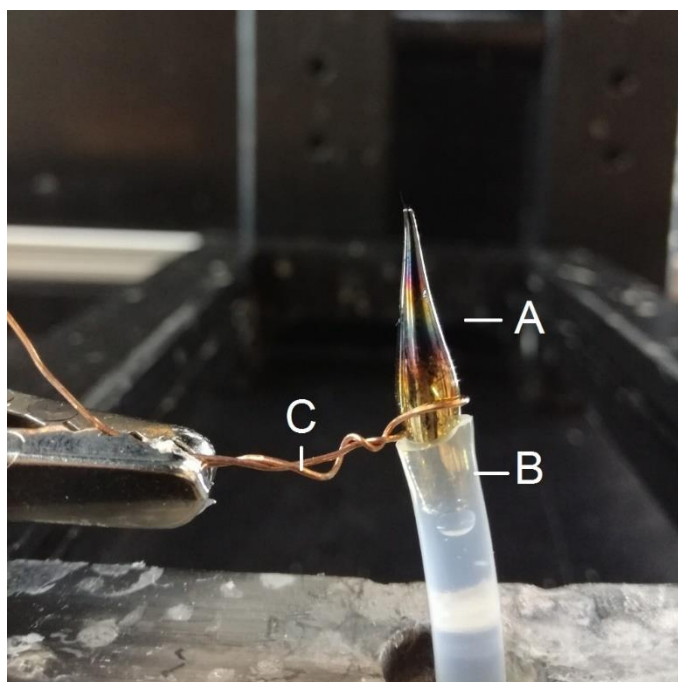
Na základě výsledků lze říci, že přítomnost tak silné vrstvy lepidla v kompozitním implantátu není optimální a je spíše nežádoucí. Pro zlepšení *in vivo* biokompatibility navrženého kompozitního nanovlákněného implantátu by bylo vhodné zredukovat množství lepidla i nanovláken. Redukce množství použitého lepidla by následně vedla také

k vytvoření tenčí nanovláknenné membrány. Méně lepidla znamená i méně chloroformu, který se z lepidla odpařuje a narušuje (rozleptává) strukturu PCL nanovláken.

4. 3. Příprava a testování nanovláknenného systému pro podporu hojenířstních anastomóz.

4.3.1. Charakterizace funkcionalizovaných nanovláken

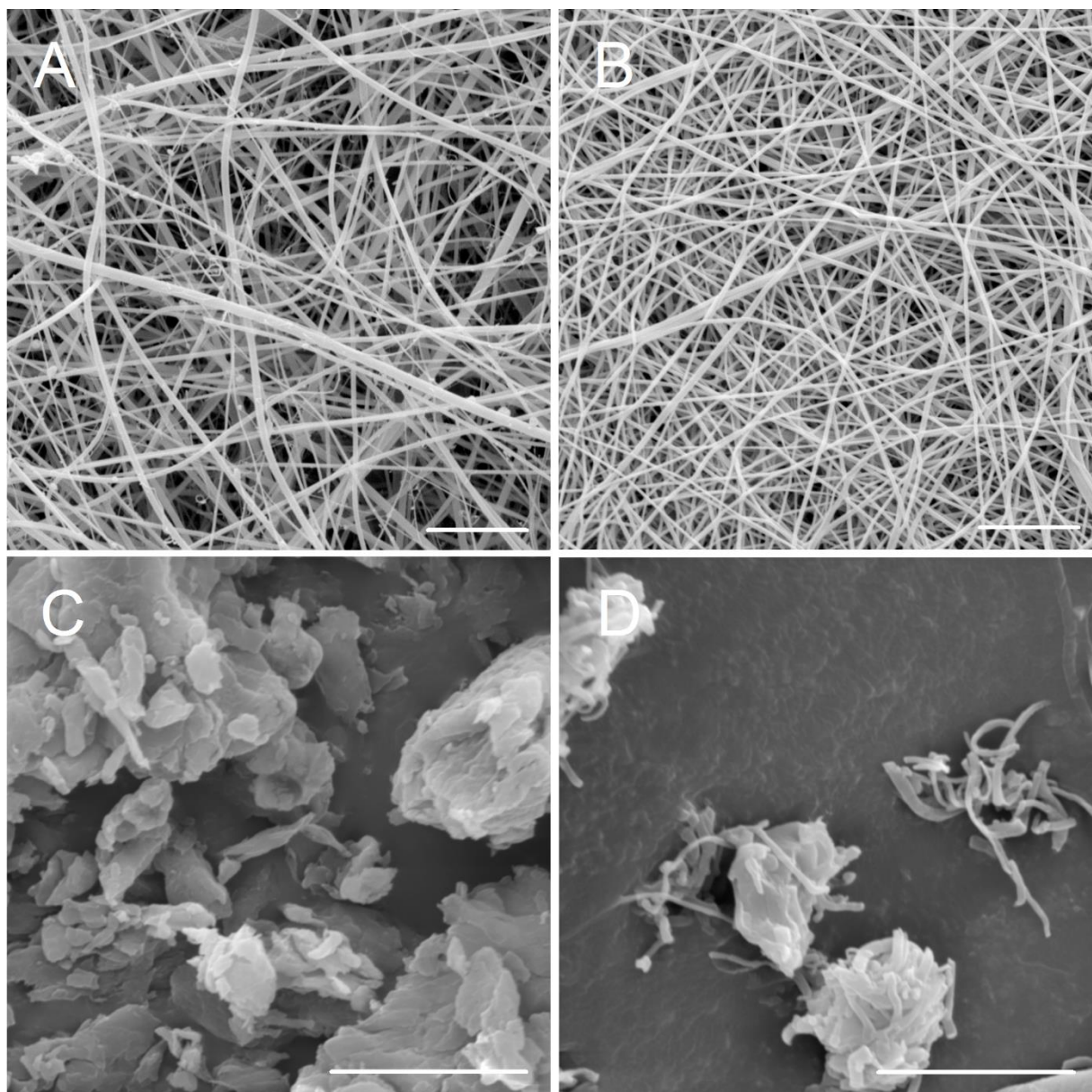
PVA a chitosanové nanovláknenné membrány byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním. Na přípravu chitosanových nanovláken byl vyvinutý speciální pokovený skleněný emitor (Obr. 4), aby se předešlo rozpouštění standardně používaného kovového emitoru kyselinou trifluoroctovou, nechtěnému obohacování chitosanové nanovláknena o ionty kovů a snižování biokompatibility chitosanových nanovláken. Zvlákňovací roztok chitosanu v roztoku TFA a DCM přicházel do styku jen s vnitřní skleněnou plochou emitoru.



Obr. 24. Pokovený skleněný emitor vyvinutý pro přípravu chitosanových nanovláken nanovláken z roztoku TFA/DCM. Emitter je zasazený do silikonové hadičky, která přivádí zvlákňovací roztok, a spojený měděný drátek s krokosvorkou se zdrojem vysokého elektrického napětí.

SEM analýza připravených membrán ukázala jejich vláknitou strukturu (obr. 25A, 25B). Průměrný průměr nanovláken, naměřený ihned po elektrostatickém zvlákňování, činil

324 ± 18 nm u PVA nanovláken a 295 ± 97 nm u chitosanových nanovláken. Chitosanová nanovláknina byla následně funkcionalizována v roztoku NaOH za účelem jejich stabilizace, což mělo za následek zvětšení jejich průměru, který byl naměřen 314 ± 147 nm.

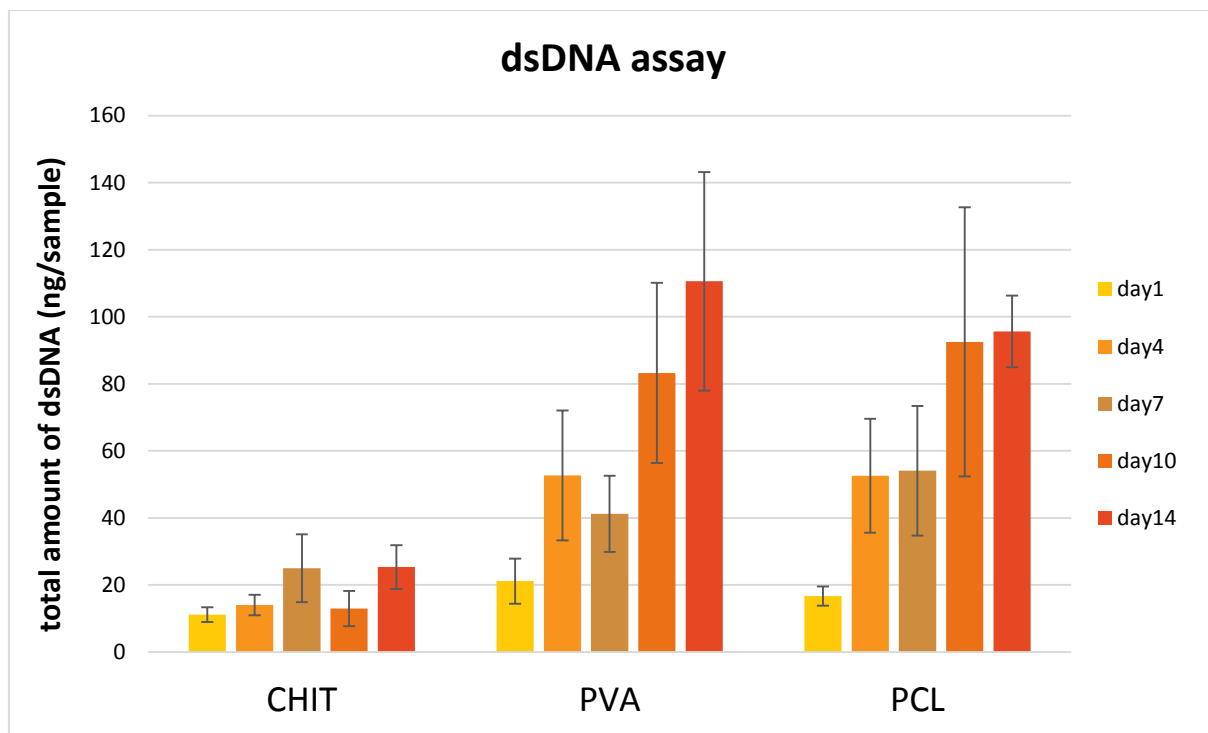


Obr. 25. SEM snímky nanovláken. (A) Chitosanové nanovláknina po zvláknění. (B) PVA funkcionalizované nanovláknina glyoxalem. (C) Frakcionalizované chitosanové vlákna funkcionalizované hydroxidem draselným. (D) Frakcionalizované PVA nanovláknina funkcionalizované glyoxalem. Měřítka 5 μ m.

Kryogenní frakcionalizací byl z PVA a chitosanových nanovláknenných membrán vytvořen jemný prášek. Morfologie částic frakcionalizovaných nanovláknenných membrán je zobrazena na obrázcích 24C a 24D, a to ve velikosti od submikronových fragmentů jednotlivých nanovláken až po jejich shluky velikosti několik mikronů.

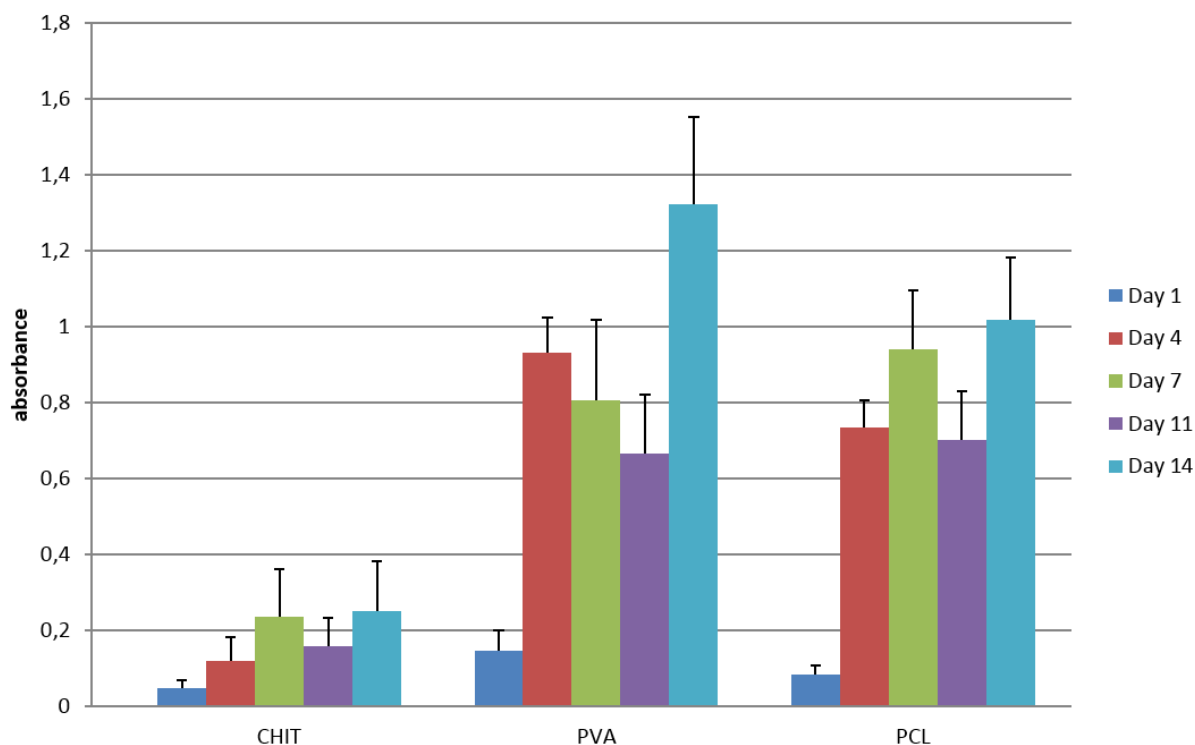
4.3.2. Testování funkcionalizovaných nanovláken *in vivo*

Proliferace a metabolická aktivita myších 3T3 fibroblastů byly analyzovány pro srovnání biokompatibility připravených nanovláčkových membrán. Proliferace byla stanovena měřením množství DNA. Kvantifikace obsahu DNA ukázala podobné množství DNA na nanovláčkách PVA a PCL a nejnižší na chitosanu. (Obr. 26). Podobně metabolická aktivita buněk měřená testem MTS vykazovala nejnižší hodnoty na chitosanových nanovláčkových membránách během celé kultivace fibroblastů (Obr. 27). Vzájemný poměr hodnot metabolické aktivity a množství DNA však ukázal srovnatelné hodnoty pro všechny tři testované nanovláčkové membrány (Obr. 28).

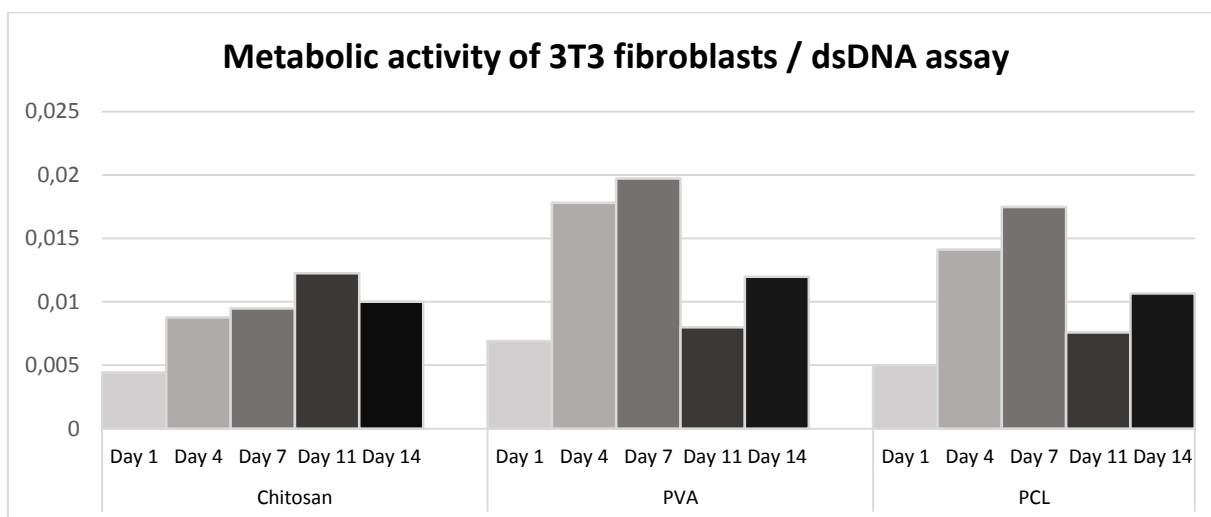


Obr. 26. Proliferace 3T3 fibroblastů na nanovláčkách z chitosanu (CHIT), polyvinylalkoholu (PVA) a polykaprolaktonu (PCL) měřená pomocí testu dsDNA.

Metabolic activity of 3T3 fibroblasts



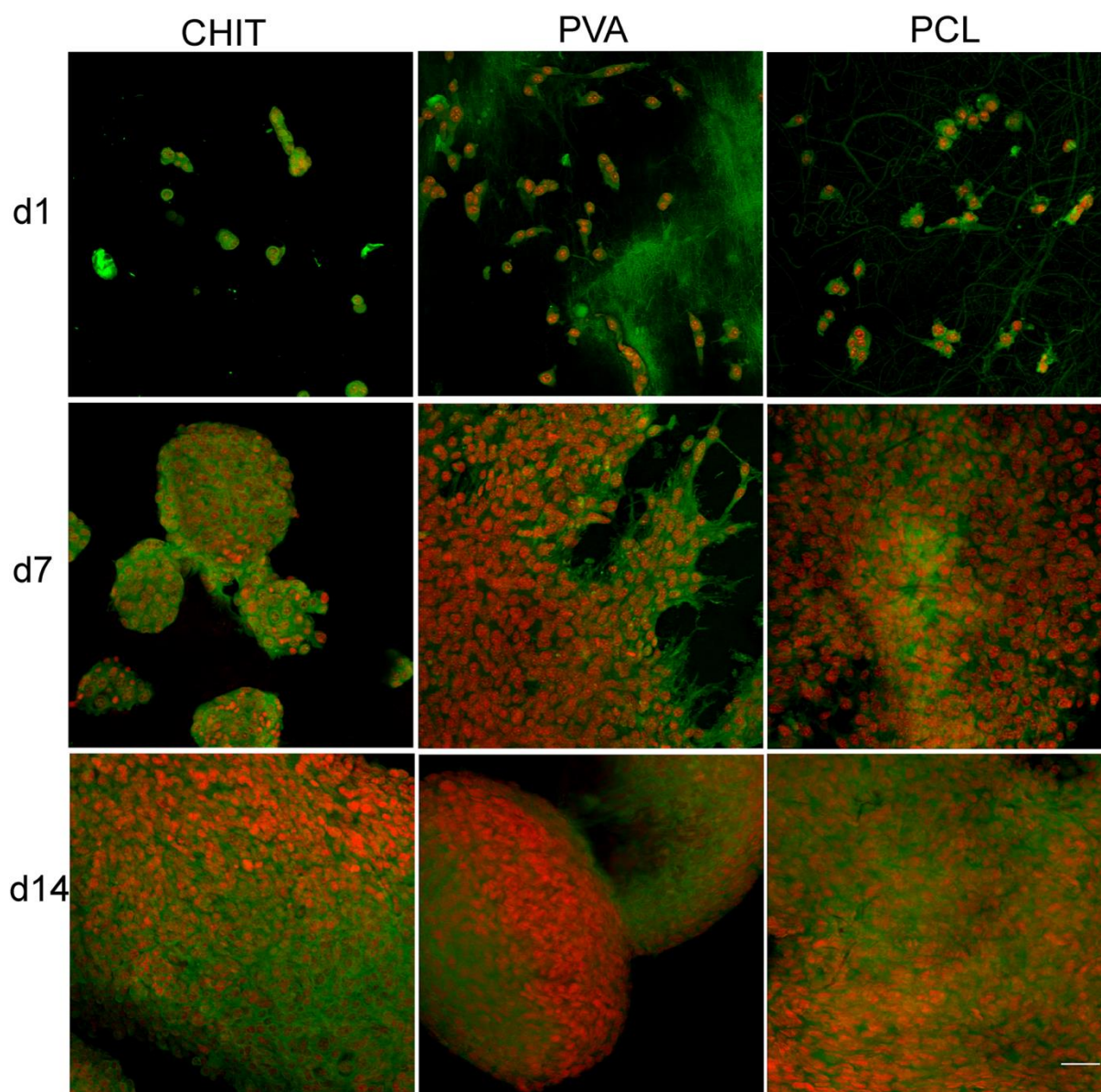
Obr. 27. Metabolická aktivita 3T3 fibroblastů na nanovlákních z chitosanu (CHIT), polyvinylalkoholu (PVA) a polykaprolaktonu (PCL) měřená pomocí testu MTS.



Obr. 28. Vzájemný poměr hodnot metabolické aktivity a množství DNA 3T3 fibroblastů kultivovaných na nanovlákněných membránách z chitosanu, PVA a PCL.

Morfologie a buněčná adheze 3T3 fibroblastů byla analyzována pomocí konfokální mikroskopie. První den kultivace byly 3T3 fibroblasty homogenně distribuovány na všech

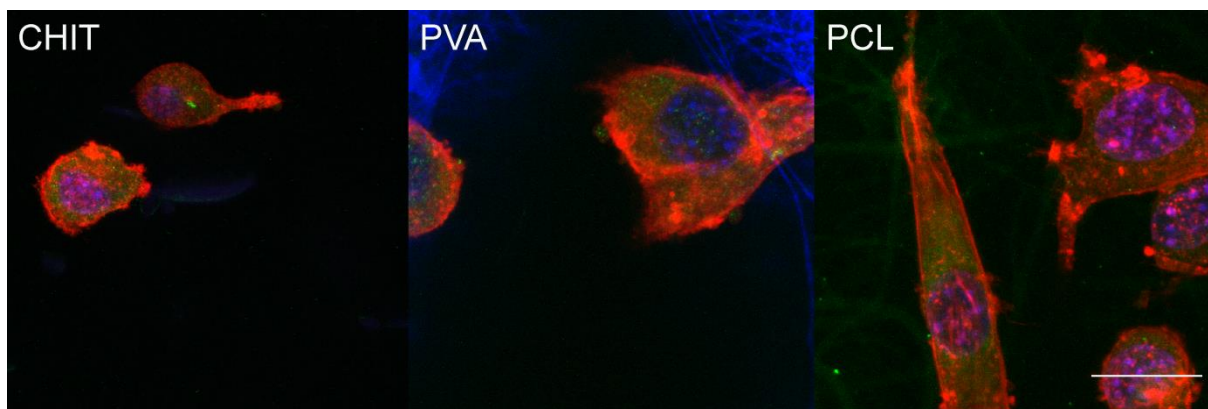
nanovlákněných membránách. Na PCL byly 3T3 fibroblasty více rozprostřeny s filopodií, na PVA a chitosanu měly tyto buňky kulovitý tvar (Obr. 29).



Obr. 29. Vizualizace kultur 3T3 fibroblastů na nanovlákněch z chitosanu (CHIT), polyvinylalkoholu (PVA) a polykaprolaktonu (PCL) v 1., 4. a 14. den kultivace. DiOC(6)3 (zelené fibroblasty)/propidium jodid (červená buněčná jádra) barvení pomocí konfokálního mikroskopu. Měřítka = 50 μm .

První den kultivace byl talin homogenně distribuován ve 3T3 fibroblastech na PCL nanovlákně, zatímco na PVA a chitosanových nanovlákněch měl talin bodovou distribuci. (Obr. 30). Sedmý den kultivace vytvořily 3T3 fibroblasty na chitosanu menší shluky, pouze některé buňky byly lokalizovány jednotlivě. Na chitosanových nanovlákněch rostly buňky

převážně ve skupinách, homogennější růst byl pozorován na nanovlákněch PVA a PCL, kde byla pozorována téměř konfluentní buněčná kultura (Obr. 29).



Obr. 30. Snímky z konfokální mikroskopie 3T3 fibroblastů s obarveným talínem (červená) a buněčnými jádry (modrá) na nanovlákněch chitosanu (CHIT), polyvinylalkoholu (PVA) a polykaprolaktonu (PCL) v den 1 nasazení. Měřítka 20 μm .

4.3.3. Testování funkcionalizovaných nanovláken *in vivo*

Aplikace PVA a chitosanových nanovláknenných membrán na anastomózy vedlo spíše k neuspokojivým výsledkům. Králíci trpěli průjmy, dehiscencí incizí, přítomností abscesů a záněty pobřišnice, přičemž docházelo k úmrtí zvířat. Navíc se nanovláknenné membrány smrskávaly, což vedlo ke strikturám střeva až k blokaci průchodnosti střeva (Obr. 31).

Aplikace frakcionalizovaných PVA a chitosanových nanovláken byla, v porovnání s aplikací membrán, úspěšnější. U anastomóz, kde byla použita frakcionalizovaná nanovláknna nebyla pozorována žádná střevní striktura ani obstrukce.



Obr. 31. Aplikace PVA a chitosanových nanovláknenných membrán na anastomózy způsobovala striktury až obstrukce tlustého střeva u králíků. Šipka označuje PVA implantovanou nanovláknennou membránou.

4.3.4. Histologická analýza

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům aplikace nanovláknenných membrán byly histologicky analyzovány pouze anastomózy ošetřené PVA (skupina PVA) a chitosanovými (skupina Chitosan) frakcionalizovanými nanovláknny a anastomózy bez aplikace materiálu (skupina No material).

Celkový histologický přehled a zkoumané parametry jsou uvedeny ve vzorcích, náhodně vybraných ze skupiny PVA, ze skupiny Chitosan a skupiny No materiál (Obr. 32). Gramovo barvení vykazovalo pouze výjimečně a individuálně se vyskytující bakterie nebo jejich fragmenty v některých anastomózách.

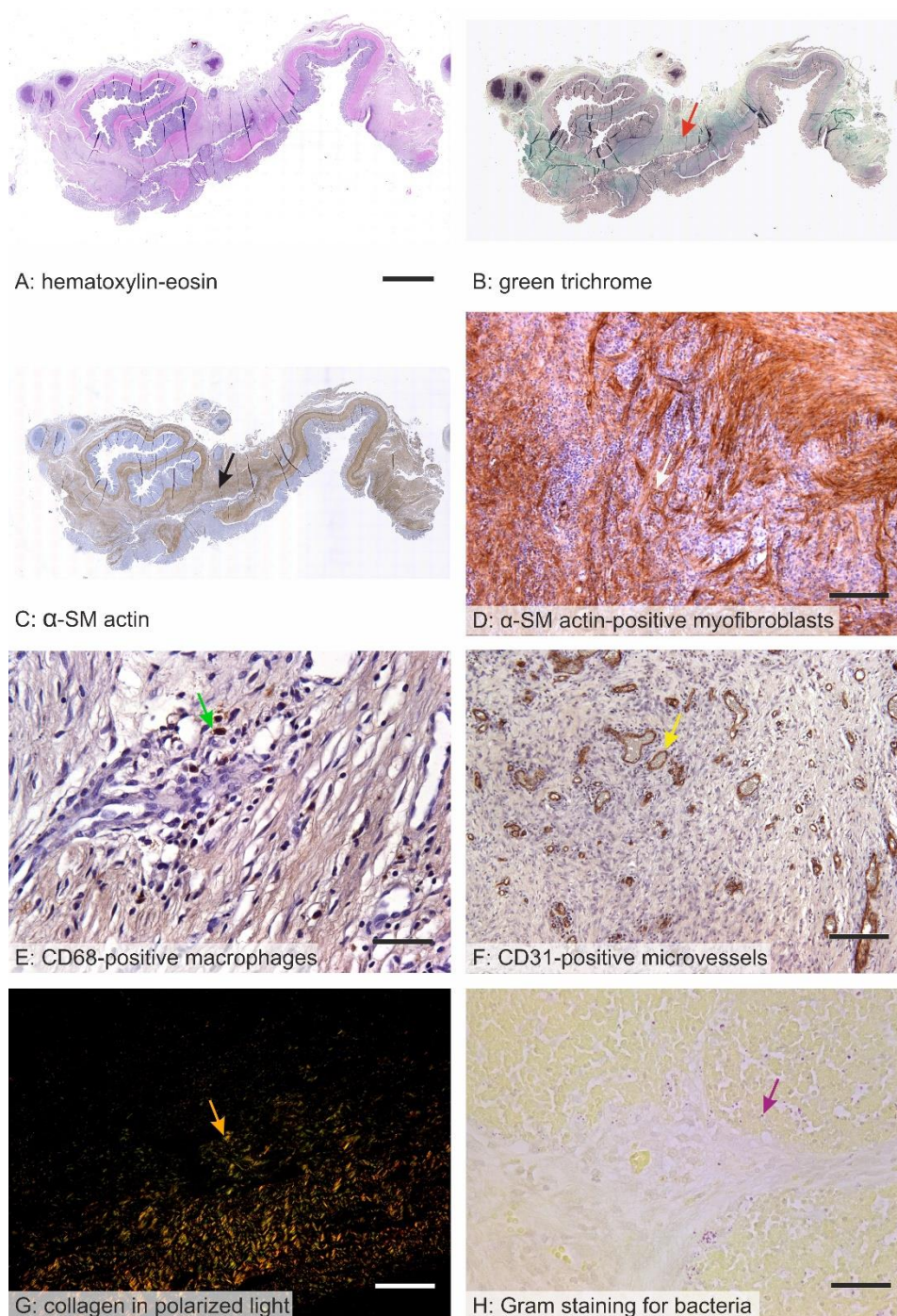
Kvantitativní histologická analýza ukázala významné rozdíly ve složení anastomóz mezi skupinami Chitosan, PVA a No materiál (Obr. 33). Objemová frakce kolagenu ve stěně anastomózy byla větší ve vzorcích ze skupiny Chitosan než ve vzorcích ze skupiny PVA (Mann-Whitney $p = 0,007$) a vzorcích ze skupiny No material (Mann-Whitney $p < 0,001$). Vzorky skupiny PVA a skupiny No material měly srovnatelnou objemovou frakci kolagenu v anastomóze (Mann-Whitney n.s., $p = 0,17$).

Podobně byla objemová frakce aktin pozitivních myofibroblastů ve stěně anastomózy ve vzorcích ze skupiny Chitosan větší než ve vzorcích ze skupiny No biomaterial (Mann-Whitney $p = 0,003$). Ve vzorcích skupiny Chitosan byla tendence k vyšším hodnotám, než ve vzorcích skupiny PVA, avšak bez statistické významnosti (Mann-

Whitney $p = 0,053$). Skupiny PVA a No material se významně nelišily v objemové frakci aktin pozitivních myofibroblastů ve stěně anastomózy (Mann-Whitney n.s., $p = 0,24$).

Hustota mikrocév, pozitivních na CD31, ve stěně anastomózy byla vyšší ve vzorcích skupiny Chitosan, než ve vzorcích skupiny PVA (Mann-Whitney $p = 0,003$) a skupiny No material (Mann-Whitney $p < 0,001$). Tento parametr byl rovněž větší u vzorků ze skupiny PVA v porovnání se vzorky skupiny No material (Mann-Whitney $p < 0,001$).

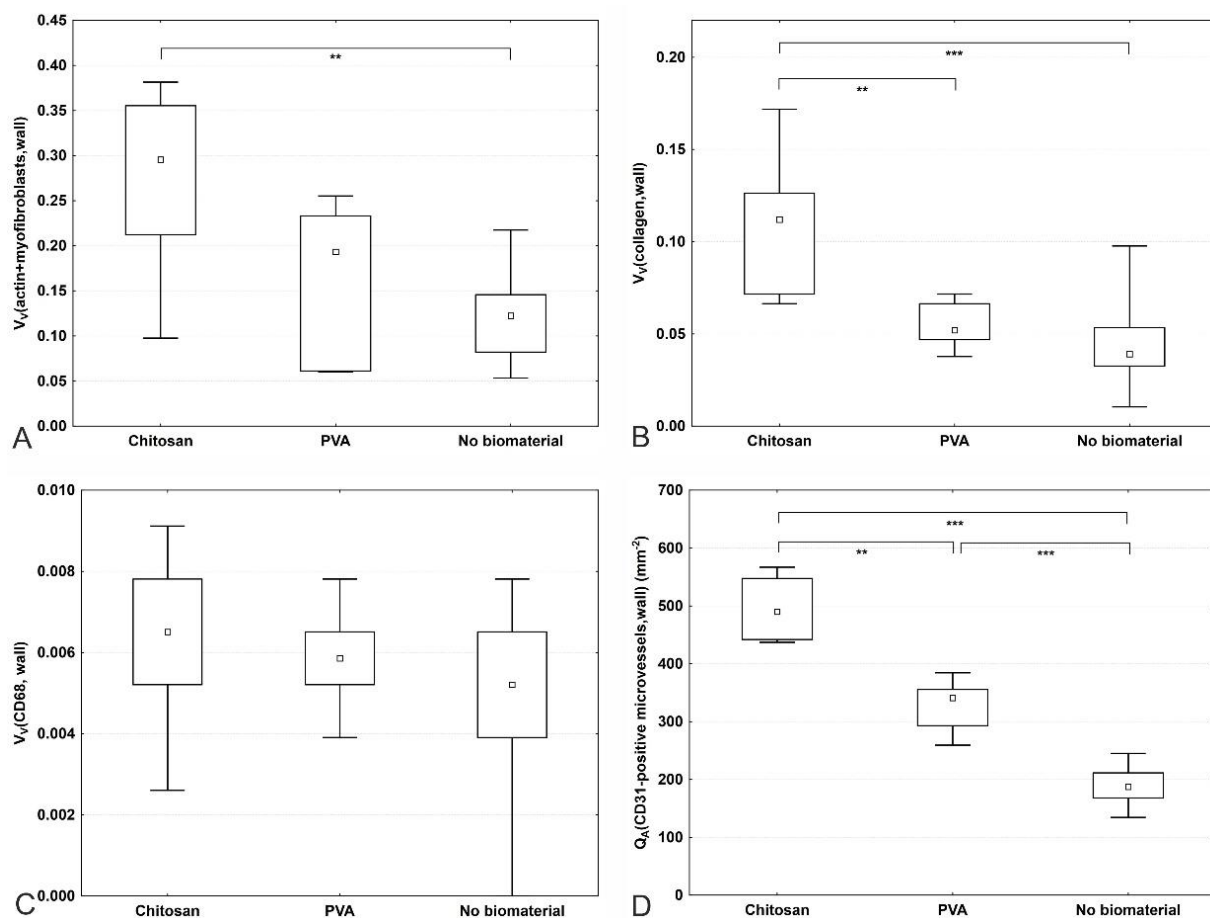
Objemová frakce CD68 pozitivních makrofágů ve stěně anastomózy byla srovnatelná ve všech studovaných skupinách (Kruskal-Wallis ANOVA n.s., $p = 0,16$; post hoc Mann-Whitney testy n.s.).



Obr. 32. Střevní anastomózy na podélných histologických řezech, obarvených různými metodami. Celková morfologie a lokalizace místa anastomózy byla hodnocena pomocí barvení hematoxylin-eosin (A). Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom (B) poskytly kontrastnější obraz anastomózy a odhalily mezeru ve vrstvě muscularis (červená šipka). To bylo potvrzeno pomocí imunohistochemické reakce proti α -aktinu hladké svaloviny (C, D). Mezera ve vrstvě muscularis (C, černá šipka) byla často částečně vyplněna myofibroblasty pozitivními na α -aktin hladkých svalů (D, bílá šipka) a tyto myofibroblasty prorůstaly do výplně granulační tkáně v hojícím se defektu. V hojících se defektech byly nalezeny pouze

vzácně makrofágy pozitivní na CD68 (E, zelená šipka). Imunohistochemie CD31 (F) byla použita k vizualizaci mikrocév (žlutá šipka) uvnitř defektu. Hodnocení kolagenu bylo provedeno v částech obarvených pikrosiriovou červení, pozorovaných pod kruhově polarizovaným světlem (G), kde kolagen typu I měl vzhled jako načervenalých a žlutých extracelulárních depozit (oranžová šipka) a kolagen typu III se jevil jako zelená depozita. Bakterie byly odhaleny pomocí Gramova barvení, modifikovaného pro použití na parařinových řezech (H). Nebyly nalezeny žádné velké akumulace bakterií; pozorovány byly pouze jednotlivé, převážně gramnegativní, bakterie (purpurová šipka). Měřítko: 1 mm (1-C), 200 μm (D, F), 50 μm (E, G, H).

Hustota mikrocév pozitivně korelovala s frakcí myofibroblastů (Spearman $R = 0,47$, $p < 0,05$), s frakcí kolagenu ($R = 0,60$, $p < 0,05$), stejně jako s frakcí makrofágů ($R = 0,40$, $p < 0,05$). Tyto korelace zmizely, jakmile byly testovány pro každou skupinu zvlášť.



Obr. 33. Kvantitativní histologické parametry, porovnávané mezi experimentálními skupinami (Chitosan, PVA a No material). Anastomózy ve skupině Chitosan obsahovaly větší frakci aktin-pozitivních myofibroblastů (A, Mann-Whitney $p = 0,003$), větší frakci

kolagenu (B, Mann-Whitney $p < 0,001$) a větší hustotu CD31-pozitivních mikrocév (D, Mann-Whitney $p < 0,001$) než skupina No material. Anastomózy ve skupině Chitosan obsahovaly větší podíl kolagenu (B, $p = 0,007$) a větší hustotu CD31-pozitivních mikrocév (D, $p = 0,003$) než skupina PVA. Skupina PVA se lišila od skupiny No material v tom, že obsahovala větší vyšší hustotu CD31 pozitivních mikrocév (D, $p < 0,001$). Data jsou zobrazena jako mediánové hodnoty s rámečky přesahujícími horní mez prvního a třetího kvartilu a úsečky označující minimální a maximální hodnoty. V_V představuje objemovou frakci složek střešní stěny v místě anastomóz; Q_A představuje množství profilů mikrocév na jednotku plochy.

4.3.5. Biomechanická analýza

Biomechanicky byly analyzovány a srovnávány kontrolní anastomózy (No material) s anastomózami ošetřenými chitosanovými frakcionalizovanými nanovláknami (skupina Chitosan), které byly vybrány jako slibnější metoda v porovnání se skupinou ošetřenou frakcionalizovanými PVA nanovláknami, jak ukázala histologická analýza.

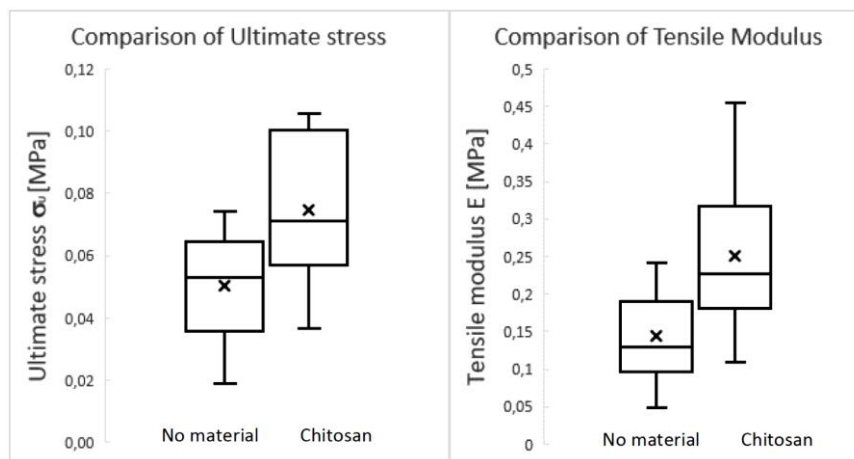
Části střev se zhojenou anastomózou vykazovaly významně vyšší hodnoty maximálního napětí ve skupině Chitosan než ve skupině No material. Skupiny Chitosan a No material se významně nelišily v hodnotě meze kluzu. Protože byly měřeny nativní biologické struktury, dosahuje odchylka vysokých hodnot pro obě skupiny i pro všechny hodnocené parametry.

Z naměřených dat byly vypočítány hodnoty σ_Y , σ_{max} a E (Tab. 5). Skupiny No material a Chitosan se v hodnotě meze kluzu (σ_Y) významně nelišily (U-test, Mann-Whitney, $p = 0,755$). Obě studované skupiny se významně lišily v maximální pevnosti v tahu (σ_{max}) s vysokou hodnotou p (Mann – Whitney U-test, $p = 0,009$). Youngův modul (E) byl ve skupině Chitosan větší než ve skupině No material ($p = 0,007$) (Obr. 34).

Na základě vyhodnocených údajů lze říci, že vzorky tkání skupiny Chitosan jsou výrazně tužší než skupiny No material, jak bylo očekáváno. Překvapením však byla skutečnost, že mez kluzu je u obou testovaných skupin podobná. Může to být způsobeno tím, že před dosažením konečného stresu byla tkáň střeva poškozena na mikroúrovni. Toto poškození mikroúrovně je u obou skupin stejné, protože závisí pouze na vlastnostech tkáně střeva, nikoli na použité hojivé proceduře.

Skupina	σ_Y [kPa]	σ_{max} [kPa]	E [kPa]
No material	41.251±15.750	50.150±16.849	143.484±55.761
Chitosan	44.319±27.597	74.615±22.126	249.020±98.429

Tab. 5. Hodnoty sledovaných biomechanických parametrů σ_Y , σ_{max} , a E.



Obr. 34. Porovnání sledovaných biomechanických parametrů.

4.3.6. Diskuze

Buněčné testy potvrdily, že myším 3T3 fibroblastům z testovaných nanovláknenných membrán nejvíce vyhovují PCL nanovlákná. Ukázaly to hodnoty množství DNA a metabolické aktivity buněk během kultivace. Také konfokální mikroskopie ukázala téměř konfluentní buněčnou kulturu na PCL nanovlákněch. 3T3 fibroblasty měly plochý tvar s filopodii, což vypovídá a dobré buněčné adhezi k PCL nanovláknům. Použití PVA s vyšším stupněm deacetylace pomohlo zlepšit biokompatibilitu PVA nanovláken. Chitosanová nanovlákná vykazovala ve srovnání s PCL a PVA nejnižší biokompatibilitu. I přes skutečnost, že PCL nanovláknenné membrány vyhovují 3T3 fibroblastům, byly do králíků implantovány PVA a chitosanové nanovláknenné membrány. PCL je totiž polymer s relativně pomalou biodegradací¹⁶², což by mohlo zpomalovat hojení anastomóz.

Příprava chitosanových nanovláken elektrostatickým zvlákněním byla uskutečněna pomocí speciálně vyvinutého skleněného emitru (elektrody)¹⁶³. Na rozpouštění chitosanu byla použita vysoce korozivní kyselina trifluoroctová, která také rozpouští běžně používané kovové emitory. Ionty kovů se tak z emitru dostávají do zvláknovacího roztoku a po zvláknění do nanovláken. Z kontaminovaných nanovláken se ionty mohou uvolňovat do kultivačního média a ovlivňovat *in vitro* testy nebo do těla

experimentálních zvířat. Tento problém vyřešil nově vyvinutý emitor, protože jeho vnitřní skleněný povrch odolává kyselině trifluoroctové. Povrch skleněné kapiláry je pokovený tenkou vrstvičkou zlata pro zajištění elektrické vodivosti. Vrstvička zlata končí těsně (přibližně 300 μm) před ústím skleněné kapiláry, aby nedocházelo ke kontaktu mezi kovem a roztokem chitosanu v kyselině trifluoroctové.

Toto technické řešení se liší od dříve publikovaného emitru, který představují dvě koaxiálně uspořádané kapiláry, vnitřní skleněnou a vnější kovovou, mezi kterými je tenká štěrbina¹⁶⁴. Při zvláknování koaxiálním kovovým a skleněným emitorem může docházet k zatékání roztoku do štěrby mezi kovovou a skleněnou kapilárou, kdy dochází ke kontaktu kyseliny trifluoroctové s kovem. Následně roztok v štěrbině zasychá, polymer se usazuje a je nutné emitor vyměnit za nový. Pokovení skleněné kapiláry vyřešilo tento technický problém. Na novém typu skleněné elektrody nedocházelo k výše popsaným jevům¹⁶³.

Na rozdíl od mnoha jiných studií s nanovláknými membránami, nanovlákně PVA ani chitosanové membrány nestimulovaly v tomto experimentu hojení anastomóz tlustého střeva. Naopak, nanovlákně membrány způsobovaly zhoršení hojení anastomóz, akutní záněty v místech anastomózy a dokonce i záněty pobřišnice. Navíc smršťování nanovlákných membrán, jako následek biodegradace materiálu, vedlo ke komplikacím, způsobeným zaškrcováním střeva, a ke strikturám tlustého střeva. V jiné studii nemělo použití polykaprolaktonových (PCL) nanovlákných membrán na anastomózy tenkého střeva prasátek žádný stimulační účinek na hojení a nanovlákně membrány mohly naopak toto hojení anastomóz zpomalit¹⁶⁵. Vzhledem k výsledkům, dosaženým při *in vivo* experimentu se zdá, že nanovlákně membrány nepředstavují optimální řešení toho, jak účinně podpořit, zlepšit a urychlit hojení střevních anastomóz.

Úspěšného hojení anastomóz tlustého střeva u králíků bylo dosaženo až aplikováním kryogenně frakcionalizovaných PVA a chitosanových nanovlákných membrán. Frakcionalizované nanovlákně membrány nezpůsobovaly striktury a blokování průchodnosti střev v místě anastomózy. Histologická analýza ukázala významné rozdíly mezi zhojenými anastomózami po ošetření PVA a chitosanovými frakcionalizovanými nanovláknými v porovnání s kontrolní skupinou. Anastomózy, ošetřené frakcionalizovanými PVA nanovláknými měly větší hustotu mikrocév než kontrolní skupina. Anastomózy, ošetřené chitosanovými frakcionalizovanými nanovláknými, měly navíc ještě hustší síť mikrocév, obsahovaly více myofibroblastů i více kolagenu v uzdravené tkáni v porovnání s kontrolní skupinou. Navíc, dle histologických dat, biomechanická analýza a především větší hodnota Youngova modulu ve skupině Chitosan než v skupině No material ($p = 0,007$) znamená větší

tuhost a menší flexibilitu, což odpovídá většímu obsahu kolagenu ve zhojené tkáni anastomózy.

Frakcionalizace prokazatelně zvýšila biokompatibilitu nanovláknenného materiálu. Zvětšená plocha povrchu a zmenšená velikost frakcionalizovaných nanovláken pravděpodobně vytvořila v hojící se ráně anastomózy lepší mikroprostředí pro buňky než plochá nanovláknenná membrána. Buňky, produkující kolagen, jako například myofibroblasty, upřednostňují prostředí nebo materiál, poskytující více fokálních adhezi^{166,167}. Frakcionalizace zvyšuje povrch nanovláken. Vhodná buněčná adheze je klíčovým faktorem pro proliferaci, diferenciaci a produkci kolagenu fibroblasty. Menší rozměr frakcionalizovaných nanovláken mohl představovat výhodu pro remodelaci kolagenu během fáze zrání hojící se tkáně anastomózy. Frakcionalizovaná nanovláknna tak, díky své menší velikosti, nezpomalovala hojení rány a dokonce, vytvořením vhodného mikroprostředí pro kolagen produkující buňky, mohla urychlit celý proces hojení anastomóz.

Frakcionalizovaná chitosanová nanovláknna mohou modifikovat zánětlivou fázi hojení střevních anastomóz tím, že podporují vznik tkáně bohatší na kolagen. Chitosan, přirozeně se vyskytující v buněčné stěně parazitických i jiných patogenních hub, proto při vniknutí do těla spouští chitosan imunitní odpověď. Přítomnost chitosanu v těle aktivuje buňky imunitního systému, jako například neutrofily¹⁶⁸, NK buňky a makrofágy¹⁶⁹, které začnou produkovat chitinázy, enzymy schopné degradovat chitosan a rozrušovat buněčnou stěnu hub. Pro aktivaci makrofágů *in vitro* musí být chitosan přítomen v rozpustné formě nebo jako částice, které jsou makrofágy schopné fagocytovat¹⁷⁰. Testy *in vitro* ukázaly, že nejúčinněji aktivovaly makrofágy polymerní částice o velikosti 800 nm¹⁷¹. Frakcionalizovaná chitosanová nanovláknna jsou svou velikostí vhodná k fagocytování a rychlé aktivaci makrofágů. V případě implantovaných nanovláknenných membrán je však nutné nejprve rozrušit pomocí chitináz strukturu nanovláken a až následně může proběhnout fagocytóza. Větší poměr povrchu frakcionalizovaných chitosanových nanovláken k jejich objemu může také urychlovat jejich biodegradaci v makrofágech. Aktivované makrofágy uvolňují signální molekuly, jako IL-12, IFN-gama a TNF-alfa¹⁷⁰. TNF-alfa, prozánětlivý cytokin, má proliferační účinky na kultivované lidské fibroblasty¹⁷² a na endotelové buňky *in vivo*¹⁷³. To souhlasí s výsledky histologické analýzy, která ukázala průkazně více myofibroblastů a kolagenu i hustší síť mikrocév u anastomóz s frakcionalizovanými chitosanovými nanovláknny oproti kontrolní skupině anastomóz bez materiálu.

Popsaná prozánětlivá stimulace frakcionalizovanými chitosanovými nanovlákný je v podstatě opačná strategie léčby podáváním protizánětlivých léčiv za použití mikročástic s cílem snížit imunitní odpověď organismu¹⁷⁴. Použití pro- nebo protizánětlivých částic závisí na účelu aplikace. Prozánětlivý přístup fungoval pro posílení pevnosti střevních anastomóz. Je však na místě domněnka, že by mohlo být silně kontraproduktivní použít frakcionalizovaná chitosanová nanovlákná na hojení hlubokých dermálních ran s cílem vyhnout se keloidům nebo hypertrofickým jizvám.

Tato popsaná metoda stimulace hojení by mohla najít uplatnění v obecné chirurgii, protože frakcionalizovaná nanovlákná zlepšují a urychlují hojení anastomóz v gastrointestinálním traktu a v břišní stěně po operacích kýly a podobně.

5. ZÁVĚR

Nanovlákná, připravená elektrostatickým zvlákňováním, jsou v současné době v popředí zájmů regenerativní medicíny, protože svou strukturou a funkcí připomínají ECM, přirozené prostředí buněk. Funkcionalizace nanovláken umožňuje dále optimalizovat jejich vlastnosti, aby co nejvíce imitovaly vlastnosti ECM. Takové vytvoření optimálního mikroprostředí pro buňky vede ke stimulaci jejich proliferace, diferenciaci, zvýšené syntéze nové ECM a tím ke zlepšení regenerace poškozené tkáně.

Cílem první části práce bylo funkcionalizovat elektrostaticky zvlákněná nanovlákná pro podporu hojení hlubokých kožních ran. Model hojení kůže, pro své umístění na povrchu těla, nabízí mnohem lepší přístup ke studiu hojení tkání než vnitřní orgány, uložené hluboko v těle experimentálního zvířete.

Struktuře kožní ECM se nejvíce podobají vláknité polymerní nanomembrány. Elektrostatickým zvlákňováním byly připraveny nanovláknenné membrány z hydrofobního PCL a hydrofilního PVA polymeru. Hydrofilní PVA nanovlákná byla funkcionalizována glyoxalem za účelem zvýšení stability jejich nanovláknenné struktury ve vlhkém prostředí tkáně, čímž bylo umožněno jejich použití v přirozeně vlhkém prostředí hojení rány. Byl zkoumán vliv délky PVA polymerních řetězců na účinnost funkcionalizace glyoxalem, tj. na zvýšení stability struktury vláken. Bylo zjištěno, že při dané koncentraci PVA a glyoxalu mají délky polymerních řetězců na stabilitu nanovláken zanedbatelný vliv. Dále bylo zjištěno, že glyoxalem funkcionalizované PVA nanovláknenné membrány, dokáží nabobtnat až na 330% své suché hmotnosti, na rozdíl od PCL nanovláken. Na obou typech připravených nanovláken - PCL nanovlákná a glyoxalem funkcionalizovaná PVA nanovlákná - byla dále testována možnost funkcionalizace těchto vláken adsorpcí proteinů. Po aplikaci nanovláknenných membrán na kožní ránu zřejmě dochází k adsorpci proteinů a dalších látek na jejich povrch podobným mechanismem. Při pokusech *in vitro* bylo zjištěno, že PCL nanovlákná lépe adsorbovala proteiny z roztoku než PVA. PCL nanovláknenné membrány také lépe stimulovaly proliferaci a metabolickou aktivitu kultivovaných kožních buněk (keratinocyty, fibroblasty a mesenchymální kmenové buňky) než membrány z PVA nanovláken. PCL nanovláknenné membrány tedy lépe podporovaly hojení hlubokých kožních defektů u králíků. Použití PVA nanovláknenných membrán se naopak osvědčilo při periodické výměně kožního krytí, neboť pouze minimálně poškozovalo hojící se ránu.

Ve vzorkách biopsií z ran bylo nalezeno více fibroblastů a kolagenu u obou skupin, ošetřených nanovláknenným krytím, v porovnání s kontrolní neošetřenou skupinou. Proto se lze domnívat, že připraveným PCL a PVA nanovláknenným membránám se alespoň do určité

míry podařilo nahradit přirozenou kožní ECM, což vedlo k namnožení kožních buněk a produkci nové ECM v podobě hojných kolagenových vláken. Vzhledem ke skutečnosti, že adekvátní přísun živin, především kyslíku, je klíčové pro syntézu a maturaci kolagenu, byla nižší hustota nových cév, zjištěná v ranách ošetřených nanovláčennými membránami, spíše překvapivým histologickým nálezem. Vysoká poréznost nanovláčenných membrán a jejich schopnost zadržovat vlhkost vytvářela v hojící se ráně pravděpodobně příznivé mikroprostředí, které umožňovalo zvýšenou výměnu dýchacích plynů tak, že vliv neovaskularizace rány na její hojení zůstal potlačen.

V druhé části práce byl vyvinut implantát pro podporu hojení fascie po operaci abdominální kýly u prasat. Připravený nanovláčenný materiál měl za úkol podpořit proliferaci fibroblastů, buněk produkujících kolagen. Na kvantitě a kvalitě kolagenových vláken totiž závisí pevnost zhojené jizvy. Buněčné testy v první části práce ukázaly PCL nanovláčna jako vhodný buněčný nosič pro myši 3T3 fibroblasty. Nedostatečná mechanická pevnost PCL nanovláčenné membrány a její neschopnost udržet sutury a odolat zátěži při kontrakci břišních svalů vedla k nutnosti PCL nanovláčna dále vhodně funkcionalizovat. To bylo realizováno přilepením standardně používané polypropylénové kýlní sítěky za vzniku kompozitního materiálu. Pomocí speciálního PCL lepidla byly PCL nanovláčenné membrány přilepeny na obě strany kýlní sítěky. Podle výsledků buněčných testů došlo obohacením kýlní sítěky o PCL nanovláčna ke zvýšení biokompatibility nanomateriálu. Myši 3T3 fibroblasty vykazovaly vyšší proliferaci a vyšší metabolickou aktivitu na kompozitním materiálu v porovnání s prostou kýlní sítěkou.

Výsledky implantace takto funkcionalizovaných PCL nanovláčenných membrán do prasátek přineslo spíše zklamání. Zatímco u prosté kýlní sítěky došlo k její integraci do břišní stěny, u nanovláčenného kompozitu došlo k nežádoucí hyperplazii a vzniku tlusté vazivové tkáně okolo implantátu. Histologická analýza ukázala, že u kompozitního implantátu byla neúměrně podpořena fáze proliferace na úkor fáze maturace rány. To souviselo i se sníženým obsahem fibril kolagenu typu I oproti kolagenu typu III a nižší biomechanické odolnosti zhojené jizvy ve srovnání se standardní kýlní sítěkou. Jizvy zhojené za použití kompozitního implantátu měly však vyšší pružnost než jizvy u skupiny s prostými kýlními sítěkami. Tato studie ukázala, že samotná PCL nanovláčna jsou schopna účinně stimulovat fázi proliferace v procesu hojení. Snížení tloušťky nanovláčenné membrány a množství lepidla by tak mohlo být slibnou cestou, jak účinně dosáhnout kvalitnějšího zhojení fascií břišních svalů.

Třetí část práce se věnovala podpoře hojení střevních anastomóz na králičím modelu. Nejprve byly použity funkcionalizované PVA nanomembrány, které byly připraveny stejným způsobem jako v první části práce. V této části práce bylo PCL kvůli své relativně pomalé biodegradabilitě nahrazeno chitosanem. Chitosanová nanovláknna byla funkcionalizována hydroxidem sodným pro zvýšení stability ve vlhkém prostředí. Oba druhy nanovláknenné membrány (PVA, chitosan) byly aplikovány na anastomózy tlustého střeva u králíků a zajištěny k seróze přišitím. Výsledky implantace nanovláknenných membrán byly zklamáním. Implantované nanovláknenné membrány se v břišní dutině smršťovaly, způsobovaly striktury až obstrukce střeva a vytvářely masivní záněty v místě implantace.

Proto byly PVA i chitosanové nanovláknenné membrány dále funkcionalizovány kryogenní frakcionalizací za vzniku jemného prášku, který byl aplikován na sešitou ránu anastomózy. Frakcionalizace umožnila snížit použité množství polymerního materiálu a podstatně redukovat intenzitu zánětu v hojící se ráně. Histologická analýza zhojených anastomóz ukázala větší množství mikrocév, fibroblastů a větší frakci kolagenu u anastomóz, ošetřených frakcionalizovanými nanovláknny než kontrolní skupina bez materiálu.

Frakcionalizovaná nanovláknna mohla, díky svému výrazně zvětšenému povrchu, v ráně sloužit jako buněčný nosič, podporující adhezi fibroblastů a buněk hladké svaloviny. Frakcionalizovaná nanovláknna, vzhledem ke své velikosti, mohla být lépe fagocytována imunitními buňkami, což mělo za následek lepší biodegradabilitu materiálu. Zlepšená biodegradabilita mohla také, kromě snížení intenzity, rovněž zkrátit délku zánětu a urychlit hojení anastomóz. Stimulace buněk imunitního systému fagocytózou mohla dále stimulovat proliferaci dalších buněk.

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly úspěšně splněny. Byly vyvinuty, připraveny, vhodně funkcionalizovány a *in vitro* a *in vivo* otestovány nanovláknenné materiály, schopné podpořit hojení jak vnitřních, tak i kožních ran. Na cestě za novými materiály byly i slepé odbočky s frustrujícími výsledky, které však nutily se hlouběji zamyslet a zcela změnit způsob uvažování při řešení problému. Jako například v případě střevních anastomóz, kdy bylo nutné zcela radikálně změnit charakter použitého nanovláknenného materiálu. Pevně věřím, že nové poznatky, získané v této práci, přispějí k rozšíření znalostí o nanovláknenných materiálech a hojení ran a také, že vyvinuté nanomateriály naleznou praktické uplatnění pro zlepšení hojení ran ve veterinární i humánní medicíně.

6. SOUHRN

Nanovlákná, připravená elektrostatickým zvlákňováním, připomínají svou strukturou a funkcí extracelulární matrix a nacházejí široké uplatnění v regenerativní medicíně. Funkcionalizací lze upravit vlastnosti nanovláken, aby lépe odpovídala specifikům hojení konkrétní tkáně.

Cílem této práce bylo vhodně funkcionalizovat nanovlákná pro zlepšení hojení hlubokých kožních defektů a vnitřních operačních ran, konkrétně střevních anastomóz a fascií v břišní stěně..

PVA nanovlákná byla funkcionalizovaná glyoxalem pro zvýšení jejich stability ve vlhkém prostředí. Zvýšená stabilita umožnila jejich další funkcionalizaci adsorpcí proteinů na svůj povrch. Takto funkcionalizovaná PVA nanovlákná (a pro srovnání PCL nanovlákná) byla dále testována *in vitro* a *in vivo*. Překrytí ran oběma typy nanovláken vedlo k podpoře hojení ran u králíků, ke zvýšené tvorbě fibroblastů a kolagenu, ale k menšímu počtu mikrocév, což vede k hypotéze vytvoření mikroprostředí, které zlepšuje výměnu dýchacích plynů mezi ránou a okolím, podporující proliferaci buněk a produkci kolagenu. Ačkoli PVA nanovláknenné krytí představuje výhodu v převazování bez negativního účinku na nově tvořenou tkáň, PCL nanovlákná se ukázala jako lepší buněčný nosič.

V případě fascií břišní stěny byla PCL nanovlákná funkcionalizována připevněním PP kýlní sítě pro zlepšení mechanické pevnosti. PCL nanovlákná, testovaná *in vitro*, zvýšila proliferaci a metabolickou aktivitu fibroblastů v porovnání s kýlní sítí. Implantace funkcionalizovaných nanovláken vedla k tvorbě pevné vazivové tkáně, která byla pružnější než zhojená fascie s implantovanou prostou kýlní sítí.

Pro podporu hojení střevních anastomóz byla PVA nanovlákná funkcionalizována glyoxalem a chitosanová nanovlákná hydroxidem sodným pro zvýšení stability struktury ve vodném prostředí. Aplikace nanovláknenných membrán na anastomózy vedla k nežádoucím strikturám střeva a k zánětům. Až další funkcionalizací nanovláken kryogenní frakcionalizací bylo dosaženo výrazného zlepšení procesu hojení. Zhojené anastomózy vykazovaly zvýšení podílu mikrocév, fibroblastů a kolagenu, což se projevilo i na zvýšení biomechanické pevnosti zhojených anastomóz.

7. SUMMARY

Electrospun nanofibers resemble the structure and functions of the extracellular matrix and are widely used in regenerative medicine. Functionalization can be used to adjust the properties of nanofibers to better match the specificities of the healing of a particular tissue.

The aim of this thesis was to functionalize nanofibers to improve the healing of intestinal anastomoses of rabbits and fascia in the abdominal wall of pigs. For comparison to these internal tissues, the nanofibers were functionalized for the healing of full-thickness skin wounds of rabbits.

PVA functionalized nanofibers using glyoxal to increase their stability in wet environments have been tested as wound dressings for full-thickness wounds. The increased stability of PVA nanofibers enabled further functionalization, namely the adsorption of proteins on their surface. Covering the skin wound with a PVA nanofiber membrane led to improved wound healing compared to the control group. The PVA nanofiber membrane creates a moist microenvironment that allows the exchange of respiratory gases between the wound and the environment, which promotes cell proliferation and collagen production. The advantage of using a PVA nanofiber membrane is the possibility of changing the dressing without a negative effect on the quality of the healed wound.

In the case of a fascia in the abdominal wall, PCL nanofibers were functionalized by the special gluing of a PP hernia mesh to improve the mechanical strength of the nanofibers. PCL nanofibers tested *in vitro* increased the proliferation and metabolic activity of fibroblasts compared to the hernia. Implantation of functionalized nanofibers resulted in the formation of tissue that was more flexible than a healed fascia with the implanted hernia mesh.

To promote the healing of intestinal anastomoses, PVA nanofibers were functionalized with glyoxal and chitosan nanofibers, and with sodium hydroxide to increase the stability of the nanofiber structure in a wet environment. The application of nanofiber membranes to anastomoses led to intestinal strictures and serious inflammation. Only by the further functionalization of nanofibers and cryogenic fractionation, was successful healing achieved. The healed anastomoses showed an increase in the fractions of microvessels, fibroblasts and collagen, which was reflected in an increase in the biomechanical strength of the healed anastomoses.

8. PUBLIKACE, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE

BUZGO, Matej, PLENCNER, Martin, RAMPICHOVA, Michala, LITVINEC, Andrej, PROSECKA, Eva, STAFFA, Andrea, **KRALOVIC Martin**, FILOVA, Eva, DOUPNIK, Miroslav, LUKASOVA, Vera, VOCETKOVA, Karolina, ANDEROVA, Jana, KUBIKOVA, Tereza, ZAJICEK, Robert, LOPOT, Frantisek, JELEN, Karel, TONAR, Zbynek, AMLER, Evzen, DIVIN, Radek, FIORI, Fabrizio. Poly-ε-caprolactone and polyvinyl alcohol electrospun wound dressings: adhesion properties and wound management of skin defects in rabbits. *Regenerative Medicine*, 2019, vol. 14, no. 5, p. 423-445.

IF=1,33.

EAST, Barbora, PLENCNER, Martin, **KRALOVIC Martin**, RAMPICHOVA, Michala, SOVKOVA, Vera, VOCETKOVA, Karolina, OTÁHAL, Martin, TONAR, Zbynek, KOLINKO, Yaroslav, AMLER, Evzen, HOCH, Jiri. A polypropylene mesh modified with poly-ε-caprolactone nanofibers in hernia repair: large animal experiment. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, vol. 13, p. 3129-3143.

IF=4,471

KRALOVIC Martin, VJACLOVSKY Michal, KESTLEROVA Andrea, RUSTICHELLI, Franco, HOCH, Jiri, AMLER, Evzen. Electrospun nanofibers as support for the healing of intestinal anastomoses. *Physiological Research*, 2019, vol. 68, p S517-S525.

IF=1,696.

KRALOVIC Martin, VJACLOVSKY, Michal, TONAR, Zbynek, LORENZOVA, Jana, OTÁHAL, Martin, HOCH, Jiri, AMLER, Evzen (in prep) Nanofiber fractionalization stimulates 3D healing in the large intestine anastomoses in rabbits.

9. OSTATNÍ PUBLIKACE AUTORA

9.1. Publikace s IF

KRALOVIC, Martin, HORÁČEK Ivan, CERNY, Robert. Mouth development in the Senegal bichir (*Polypterus senegalus*) does not involve the oropharyngeal membrane: possible implications for the ecto-endoderm boundary and tooth initiation. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, vol. 26, p. 179-182.

IF=1.045

BELLU, Emanuela, GARRONI, Giuseppe, BALZANO, Francesca, SATTA, Rosanna, MONTESU, Maria Antonia, **KRALOVIC, Martin**, FEDÁČKO, Jan, CRUCIANI, Sara, MAIOLI Maioli. Isolating stem cells from skin: Designing a novel highly efficient non-enzymatic approach, *Physiological Research*, 2019, vol. 68, p. S385-S388.

IF=1,696.

BEZNOSKA, Jiří, UHLÍK, Jiří, KESTLEROVÁ, Andrea, **KRÁLOVIČ, Martin**, DIVÍN, Radek, FEDÁČKO, Jan, BENEŠ, Jiří, BENEŠ, Michal, VOCETKOVÁ, Karolína, SOVKOVÁ, Věra, NEČAS, Alois, NEČASOVÁ, Andrea, HOLEŠOVSKÝ, Jakub, AMLER, Evžen. PVA and PCL nanofibers are suitable for tissue covering and regeneration. *Physiological Research*, 2019, vol. 68, p. S501-S508.

IF=1,696.

BELLU, Emanuela, CRUCIANI, Sara, GARRONI Giuseppe, BALZANO, Francesca, SATTA, Rosanna, MONTESU, Maria Antonia, FADDA, Angela, MULAS, Maurizio, SARAIS, Giorgia, BANDIERA, Pasquale, VENTURA, Carlo, **KRALOVIC, Martin**, SABO, Jan, AMLER, Evzen, MAIOLI Margherita. Natural Compounds and PCL Nanofibers: A Novel Tool to Counteract Stem Cell Senescence *Cells*, 2021, vol. 10, no. 6, p. 1-13.

IF= 4.829

9.2. Publikace bez IF

KRALOVIC, Martin, SOPKO Bruno, NOVOTNY Petr, AMLER Evzen. Nanofibers from polyvinyl alcohol and can enlarge the set of trapped odorological traces. *Lékař a technika - Clinician and Technology*, 2018, vol. 48, p. 131-135.

9.3. Kapitoly v knihách

KRALOVIC, Martin. The effect of surface properties on nanofiber-cell interactions. In: Nanostructures in biomedicine: their regenerative and toxic properties. Praha: Proxima Tisk, 2018, s. 110-113. ISBN 978-80-906655-7-6.

KRALOVIC, Martin. The surface treatment of nanofibers for biomedical applications. In: New Trends in Biomedical and Bio-Based Materials. Jindřichův Hradec: Epika, 2018, s. 41-46. ISBN 978-80-7608-017-1.

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. MASON, Chris; DUNNILL, Peter. A brief definition of regenerative medicine, 2008, *Future Medicine*, 3.1: 1-5.
2. CHEN, Miin-Fu; HWANG, Tsann-Long; HUNG, Chien-Fu. Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Annals of Surgery*, 1991, 213.3: 227-229.
3. DOUGLAS, B. S. Conservative management of guillotine amputation of the finger in children. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 1972, 8.2: 86-89.
4. ALBERTS, Bruce, et al. Essential cell biology. Garland Science, 2015.
5. WEISSMAN, Irving L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *cell*, 2000, 100.1: 157-168.
6. NIJNIK, Anastasia, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*, 2007, 447.7145: 686-690.
7. DVIR, Tal, et al. Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues. In: *Nano-Enabled Medical Applications*. Jenny Stanford Publishing, 2020, 351-382.
8. ANDERSON, James M.; JIANG, Sirui. Implications of the acute and chronic inflammatory response and the foreign body reaction to the immune response of implanted biomaterials. In: *The Immune Response to Implanted Materials and Devices*. Springer, Cham, 2017, 15-36.
9. STRAFACE, Elisabetta, et al. C3-fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability. *FEBS Letters*, 1999, 454.3: 335-340.
10. CLAUSE, Kelly C.; BARKER, Thomas H. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24.5: 830-833.
11. RAMAKRISHNA, Seeram. An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific, 2005.
12. LUO, Jingnan; TONG, Yen Wah. Self-assembly of collagen-mimetic peptide amphiphiles into biofunctional nanofiber. *Acs Nano*, 2011, 5.10: 7739-7747.
13. TU, Chifeng, et al. The fabrication and characterization of poly (lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation. *Polymers for Advanced Technologies*, 2003, 14.8: 565-573.
14. ZHANG, Zhi-Ming, et al. A review on nanofiber fabrication with the effect of high-speed centrifugal force field. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 2019, 14: 1-11.
15. ZHANG, Xiangwu; LU, Yao. Centrifugal spinning: an alternative approach to fabricate nanofibers at high speed and low cost. *Polymer Reviews*, 2014, 54.4: 677-701.
16. ZANDER, Nicole E. Formation of melt and solution spun polycaprolactone fibers by centrifugal spinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132.2: 1-9.
17. JIRSAK, Oldrich, et al., Patent, WO2005024101, 2003.
18. POKORNY, Pavel, et al. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16.48: 26816-26822.

19. HUANG, Zheng-Ming, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2003, 63.15: 2223-2253.
20. HUANG, Chaobo, et al. Electrospun polymer nanofibres with small diameters. *Nanotechnology*, 2006, 17.6: 1558-1563.
21. RENEKER, Darrell H.; YARIN, Alexander L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, 2008, 49.10: 2387-2425.
22. SAHAY, Rahul; THAVASI, Velmurugan; RAMAKRISHNA, Seeram. Design modifications in electrospinning setup for advanced applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 2011: 1-17.
23. PARK, Su, et al. Apparatus for preparing electrospun nanofibers: designing an electrospinning process for nanofiber fabrication. *Polymer International*, 2007, 56.11: 1361-1366.
24. XIE, Jingwei, et al. Radially aligned, electrospun nanofibers as dural substitutes for wound closure and tissue regeneration applications. *ACS nano*, 2010, 4.9: 5027-5036.
25. KATTA, P., et al. Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. *Nano Letters*, 2004, 4.11: 2215-2218.
26. MO, Xiumei; WEBER, Hans-Joachim. Electrospinning P (LLA-CL) nanofiber: A tubular scaffold fabrication with circumferential alignment. In: *Macromolecular Symposia. Weinheim: WILEY-VCH Verlag*, 2004, 413-416.
27. HAIDER, Adnan; HAIDER, Sajjad; KANG, Inn-Kyu. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 2018, 11.8: 1165-1188.
28. THOMPSON, C. J., et al. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*, 2007, 48.23: 6913-6922.
29. NAYAK, Rajkishore, et al. Effect of viscosity and electrical conductivity on the morphology and fiber diameter in melt electrospinning of polypropylene. *Textile Research Journal*, 2013, 83.6: 606-617.
30. WANG, Tong; KUMAR, Satish. Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 102.2: 1023-1029.
31. DE VRIEZE, Sander, et al. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science*, 2009, 44.5: 1357-1362.
32. ZAHMATKESHAN, M., et al. Polymer based nanofibers: preparation, fabrication, and applications. *Handbook of Nanofibers*, 2018, s. 1-47.
33. ENIS, Ipek Y.; VOJTECH, Jakub; SADIKOGLU, Telem G. Alternative solvent systems for polycaprolactone nanowebs via electrospinning. *Journal of Industrial Textiles*, 2017, 47.1: 57-70.
34. LIU, Ziqian; RAMAKRISHNA, Seeram; LIU, Xiaoling. Electrospinning and emerging healthcare and medicine possibilities. *APL bioengineering*, 2020, 4.3: 1-14.
35. MATTHEWS, Jamil A., et al. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 2002, 3.2: 232-238.
36. HUANG, Zheng-Ming, et al. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*, 2004, 45.15: 5361-5368.

37. OHKAWA, Kousaku, et al. Chitosan nanofiber. *Biomacromolecules*, 2006, 7.11: 3291-3294.
38. KIM, So Hyun, et al. Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure. *Polymer Journal*, 2003, 35.2: 185-190.
39. BONINO, Christopher A., et al. Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85.1: 111-119.
40. HONARKAR, Hengameh; BARIKANI, Mehdi. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 2009, 140.12: 1403-1420.
41. LUO, C. J.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules*, 2012, 45.11: 4669-4680.
42. KENAWY, El-Refaie, et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend. *Journal of controlled release*, 2002, 81.1-2: 57-64.
43. SHIN, Ho Joon, et al. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2006, 17.1-2: 103-119.
44. YANG, Enlong; QIN, Xiaohong; WANG, Shanyuan. Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane. *Materials Letters*, 2008, 62.20: 3555-3557.
45. BACAKOVA, Lucie, et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology advances*, 2011, 29.6: 739-767.
46. GIBSON, Phillip; SCHREUDER-GIBSON, Heidi; RIVIN, Donald. Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2001, 187: 469-481.
47. BARKER, Thomas H. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials*, 2011, 32.18: 4211-4214.
48. RUOSLAHTI, Erkki. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*, 1996, 12.1: 697-715.
49. TAKADA, Yoshikazu; YE, Xiaojing; SIMON, Scott. The integrins. *Genome biology*, 2007, 8.5: 1-9.
50. SCHLAEPFER, David D., et al. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 1994, 372.6508: 786-791.
51. KESELOWSKY, Benjamin G.; COLLARD, David M.; GARCÍA, Andrés J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2003, 66.2: 247-259.
52. KESELOWSKY, Benjamin G.; COLLARD, David M.; GARCÍA, Andrés J. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102.17: 5953-5957.

53. NURAJE, Nurxat, et al. Superhydrophobic electrospun nanofibers. *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, 1.6: 1929-1946.
54. MA, Zuwei, et al. Grafting of gelatin on electrospun poly (caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue engineering*, 2005, 11.7-8: 1149-1158.
55. HUANG, Zheng-Ming, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, 2003, 63.15: 2223-2253.
56. PELIPENKO, Jan; KOCBEK, Petra; KRISTL, Julijana. Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 66: 29-35.
57. BORHANI, Sedigheh, et al. Structural characteristics and selected properties of polyacrylonitrile nanofiber mats. *Journal of applied polymer science*, 2008, 108.5: 2994-3000.
58. LIU, Chen, et al. The effect of the fibre orientation of electrospun scaffolds on the matrix production of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells. *Bone research*, 2015, 3.1: 1-9.
59. FILOVA, E., et al. Growth of valve interstitial cells on aligned and randomly oriented electrospun nanofibres. In: *Joint meeting of the Society for Heart Valve Disease & Heart Valve Society of America*. 2009. p. 379.
60. TIAN, Furong, et al. Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro-and nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 84.2: 291-299.
61. THOMAS, Carson H., et al. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99.4: 1972-1977.
62. CHEW, Sing Yian, et al. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. *Biomaterials*, 2008, 29.6: 653-661.
63. YIN, Zi, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*, 2010, 31.8: 2163-2175.
64. KATZ, Ben-Zion, et al. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular biology of the cell*, 2000, 11.3: 1047-1060.
65. JOHNSON, Jed, et al. Quantitative analysis of complex glioma cell migration on electrospun polycaprolactone using time-lapse microscopy. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2009, 15.4: 531-540.
66. KIM, Taek Gyoung; CHUNG, Hyun Jung; PARK, Tae Gwan. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta biomaterialia*, 2008, 4.6: 1611-1619.
67. LI, Wenchao, et al. Facile fabrication of porous polymer fibers via cryogenic electrospinning system. *Journal of Materials Processing Technology*, 2019, 266: 551-557.
68. LEE, Jung Bok, et al. Highly porous electrospun nanofibers enhanced by ultrasonication for improved cellular infiltration. *Tissue Engineering Part A*, 2011, 17.21-22: 2695-2702.

69. KRIEGEL, Christina, et al. Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2008, 48.8: 775-797.
70. GAUTAM, Sneh; DINDA, Amit Kumar; MISHRA, Narayan Chandra. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33.3: 1228-1235.
71. SAHOO, Sambit, et al. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2010, 93.4: 1539-1550.
72. VLACHOU, Marilena, et al. Fabrication and characterization of electrospun nanofibers for the modified release of the chronobiotic hormone melatonin. *Current drug delivery*, 2019, 16.1: 79-85.
73. ZARANDI, Mohammad Amin, et al. Drug release, cell adhesion and wound healing evaluations of electrospun carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibres containing phenytoin sodium and vitamin C. *Iet Nanobiotechnology*, 2015, 9.4: 191-200.
74. TAEPAIBOON, Pattama; RUNGSARDTHONG, Uracha; SUPAPHOL, Pitt. Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 67.2: 387-397.
75. DING, Bin, et al. Preparation and characterization of nanoscaled poly (vinyl alcohol) fibers via electrospinning. *Fibers and Polymers*, 2002, 3.2: 73-79.
76. SULLIVAN, Stephanie T., et al. Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 2014, 35: 36-50.
77. GESTOS, Adrian, et al. Crosslinking neat ultrathin films and nanofibres of pH-responsive poly (acrylic acid) by UV radiation. *Soft Matter*, 2010, 6.5: 1045-1052.
78. HE, Chuanglong, et al. Crosslinking of poly (L-lactide) nanofibers with triallyl isocyanurate by gamma-irradiation for tissue engineering application. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, 99.4: 655-665.
79. BARTNIKOWSKI, Michal, et al. Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science*, 2019, 96: 1-20.
80. AGARWAL, Seema; GREINER, Andreas. On the way to clean and safe electrospinning—green electrospinning: emulsion and suspension electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies*, 2011, 22.3: 372-378.
81. LAMARRA, J., et al. Electrospun nanofibers of poly (vinyl alcohol) and chitosan-based emulsions functionalized with cabreuva essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 307-318.
82. HU, Jue, et al. Emulsion electrospinning of polycaprolactone: influence of surfactant type towards the scaffold properties. *Journal of Biomaterials Science, polymer edition*, 2015, 26.1: 57-75.

83. CHEN, Hongyan, et al. Nanowire-in-microtube structured core/shell fibers via multifluidic coaxial electrospinning. *Langmuir*, 2010, 26.13: 11291-11296.
84. SHABANI, Iman, et al. Improved infiltration of stem cells on electrospun nanofibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 382.1: 129-133.
85. WOO, Kyung Mi; CHEN, Victor J.; MA, Peter X. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2003, 67.2: 531-537.
86. DESMET, Tim, et al. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review. *Biomacromolecules*, 2009, 10.9: 2351-2378.
87. PARK, Kwideok, et al. Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2007, 18.4: 369-382.
88. RICCARDI, Claudia, et al. Surface modification of poly (ethylene terephthalate) fibers induced by radio frequency air plasma treatment. *Applied Surface Science*, 2003, 211.1-4: 386-397.
89. LEE, James CM; MA, Guiqiu; YU, Qingsong. Plasma treatment of random and aligned electrospun PCL nanofibers. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 2013, 33.3: 171-178.
90. ESPOSITO, Andrea Rodrigues, et al. Benefits of oxygen and nitrogen plasma treatment in Vero cell affinity to poly (lactide-co-glycolide acid). *Materials Research*, 2013, 16: 695-702.
91. SANTOS, Marina I., et al. Surface-modified 3D starch-based scaffold for improved endothelialization for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19.24: 4091-4101.
92. LUNA, Sandra M., et al. Cell adhesion and proliferation onto chitosan-based membranes treated by plasma surface modification. *Journal of Biomaterials Applications*, 2011, 26.1: 101-116.
93. YILDIRIM, Eda D., et al. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. *Biofabrication*, 2010, 2.1: 014109.
94. JEONG, Lim, et al. Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration. *International journal of biological macromolecules*, 2009, 44.3: 222-228.
95. CHERUTHAZHEKATT, Sadiqali, et al. Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 2010, 8.2: 55-66.
96. PLENCNER, Martin, et al. Abdominal closure reinforcement by using polypropylene mesh functionalized with poly-ε-caprolactone nanofibers and growth factors for prevention of incisional hernia formation. *International journal of nanomedicine*, 2014, 9: 3263.
97. KNOTEK, Petr, et al. Cryogenic grinding of electrospun poly-ε-caprolactone mesh submerged in liquid media. *Materials Science and Engineering: C*, 2012, 32.6: 1366-1374.

98. MCLAFFERTY, Ella; HENDRY, Charles; FARLEY, Alistair. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*, 2012, 27.3: 35.
99. BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk; VARGA, Ivan. *Memorix histologie*. Triton, 2017
100. SORG, Heiko, et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 2017, 58.1-2: 81-94.
101. VELNAR, Tomaz; BAILEY, Tracey; SMRKOLJ, Vladimir. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 2009, 37.5: 1528-1542.
102. CAÑEDO-DORANTES, Luis; CAÑEDO-AYALA, Mara. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, 2019, 1-15.
103. LI, Wei, et al. Fibrin fiber stiffness is strongly affected by fiber diameter, but not by fibrinogen glycation. *Biophysical journal*, 2016, 110.6: 1400-1410.
104. EPPLEY, Barry L.; WOODSELL, Jennifer E.; HIGGINS, Joel. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 2004, 114.6: 1502-1508.
105. NAMI, Niccolò, et al. Crosstalk between platelets and PBMC: new evidence in wound healing. *Platelets*, 2016, 27.2: 143-148.
106. KHALIL, Zeinab; MERHI, Merhi. Effects of aging on neurogenic vasodilator responses evoked by transcutaneous electrical nerve stimulation: relevance to wound healing. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2000, 55.6: B257-B263.
107. ELKINGTON, Paul T.; GREEN, Justin A.; FRIEDLAND, Jon S. Analysis of matrix metalloproteinase secretion by macrophages. In: *Macrophages and Dendritic Cells*. Humana Press, 2009. p. 253-265.
108. WYNN, Thomas A.; VANNELLA, Kevin M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 2016, 44.3: 450-462.
109. WILLENBORG, Sebastian; EMING, Sabine A. Macrophages—sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2014, 12.3: 214-221.
110. VOLK, Susan W., et al. Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs*, 2011, 194.1: 25-37.
111. HÄKKINEN, Lari; LARJAVA, Hannu; KOIVISTO, Leeni. Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontic Topics*, 2011, 24.1: 94-129.
112. YAN, Chunli, et al. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- α through bone morphogenic protein-2. *The American journal of pathology*, 2010, 176.5: 2247-2258.
113. DESMOULIÈRE, Alexis, et al. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1997, 29.1: 19-30.
114. KORENKOV, Michael, et al. Classification and surgical treatment of incisional hernia. *Langenbeck's archives of surgery*, 2001, 386.1: 65-73.
115. SANTORA, Thomas A.; ROSLYN, Joel J. Incisional hernia. *Surgical Clinics of North America*, 1993, 73.3: 557-570.

116. FRANZ, Michael G. The biology of hernias and the abdominal wall. *Hernia*, 2006, 10.6: 462-471.
117. STEWART, Richard J., et al. The wound fibroblast and macrophage. I: Wound cell population changes observed in tissue culture. *Journal of British Surgery*, 1981, 68.2: 125-128.
118. KLINGE, U., et al. Collagen I/III and matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 13 in the fascia of patients with incisional hernias. *Journal of Investigative Surgery*, 2001, 14.1: 47-54.
119. KLINGE, U., et al. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *European surgical research*, 2000, 32.1: 43-48.
120. KLOSTERHALFEN, B.; KLINGE, U. Retrieval study at 623 human mesh explants made of polypropylene—impact of mesh class and indication for mesh removal on tissue reaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2013, 101.8: 1393-1399.
121. ZHENG, Hong, et al. Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix?. *World journal of surgery*, 2002, 26.4: 401-408.
122. SLIEKER, Juliette C., et al. Systematic review of the technique of colorectal anastomosis. *JAMA surgery*, 2013, 148.2: 190-201.
123. KAR, Sibabrata, et al. Single layered versus double layered intestinal anastomosis: a randomized controlled trial. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 2017, 11.6: 1-4.
124. THORNTON, Frank J.; BARBUL, Adrian. Healing in the gastrointestinal tract. *Surgical Clinics of North America*, 1997, 77.3: 549-573.
125. ASHKANANI, F.; KRUKOWSKI, Z. H. Intestinal anastomosis. *Surgery (Oxford)*, 2002, 20.5: 104-107.
126. HESP, W. L., et al. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *British journal of experimental pathology*, 1985, 66.5: 511.
127. LAZARUS, Gerald S., et al. Human granulocyte collagenase. *Science*, 1968, 159.3822: 1483-1485.
128. ÅGREN, Magnus S., et al. Action of matrix metalloproteinases at restricted sites in colon anastomosis repair: an immunohistochemical and biochemical study. *Surgery*, 2006, 140.1: 72-82.
129. THORNTON, Michael, et al. Management and outcome of colorectal anastomotic leaks. *International journal of colorectal disease*, 2011, 26.3: 313-320.
130. BUCHS, Nicolas C., et al. Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *International journal of colorectal disease*, 2008, 23.3: 265-270.
131. BOCCOLA, Mark A., et al. Risk factors and outcomes for anastomotic leakage in colorectal surgery: a single-institution analysis of 1576 patients. *World journal of surgery*, 2011, 35.1: 186-195.
132. KRARUP, P.-M., et al. A nationwide study on anastomotic leakage after colonic cancer surgery. *Colorectal Disease*, 2012, 14.10: e661-e667.

133. CHAMBERS, W. M.; MORTENSEN, NJ McC. Postoperative leakage and abscess formation after colorectal surgery. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 2004, 18.5: 865-880.
134. OLSEN, B. C., et al. Rate of anastomotic leakage after rectal anastomosis depends on the definition: pelvic abscesses are significant. *Scandinavian Journal of Surgery*, 2019, 108.3: 241-249.
135. DAAMS, Freek; LUYER, Misha; LANGE, Johan F. Colorectal anastomotic leakage: aspects of prevention, detection and treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2013, 19.15: 2293.
136. ZIABARI, M.; MOTTAGHITALAB, V.; HAGHI, A. K. Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2009, 26: 53-62.
137. AOKI, Kaoru; SAITO, Naoto. Biodegradable polymers as drug delivery systems for bone regeneration. *Pharmaceutics*, 2020, 12.2: 95.
138. PANIGRAHI, D.; KUMAR, S.; DHAR, A. Modulating chain conformations of polyvinyl alcohol through low cost and nontoxic glyoxal crosslinker: Application in high performance organic transistors. *Organic Electronics*, 2019, 65: 193-200.
139. BAKER, Erin L.; ZAMAN, Muhammad H. The biomechanical integrin. *Journal of biomechanics*, 2010, 43.1: 38-44.
140. CUNNINGHAM, Daniel John (ed.). *Text-book of anatomy*. William Wood, 1903.
141. SCHMELZER, Christian EH, et al. Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin?. *The FEBS Journal*, 2012, 279.22: 4191-4200.
142. CLARKE, John M. Incisional hernia repair by fascial component separation: results in 128 cases and evolution of technique. *The American Journal of Surgery*, 2010, 200.1: 2-8.
143. ROSS, Andrew R., et al. The extramucosal interrupted end-to-end intestinal anastomosis in infants and children; a single surgeon 21 year experience. *Journal of Pediatric Surgery*, 2016, 51.7: 1131-1134.
144. MOUTON, P. R. Length and surface area. *Principles and Practices of Unbiased Stereology: An Introduction for Bioscientists*, 2002
145. RICH, Lillian; WHITTAKER, Peter. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 2005, 22.2: 97-104.
146. GUNDERSEN, Hans Jørgen G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of microscopy*, 1977, 111.2: 219-223.
147. JUNGE, Karsten, et al. Decreased collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prostheses. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 2004, 389.1: 17-22.
148. GROEBER, Florian, et al. Skin tissue engineering—in vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, 63.4-5: 352-366.
149. LI, Jie; ZHANG, Yan-Ping; KIRSNER, Robert S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique*, 2003, 60.1: 107-114.

150. TRUONG, Anh-Tuan N., et al. Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model. *Journal of Burns and Wounds*, 2005, 4.
151. TONAR, Zbyněk, et al. Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microscopy research and technique*, 2008, 71.10: 760-772.
152. KOCOVAR, J. Overall staining of connective tissue and the muscular layer of vessels. *Folia Morphologica*, 1970, 18.3: 293-295.
153. MOUTON, Peter R. *Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists*. JHU Press, 2002.
154. ENIS, Ipek Y.; VOJTECH, Jakub; SADIKOGLU, Telem G. Alternative solvent systems for polycaprolactone nanowebs via electrospinning. *Journal of industrial textiles*, 2017, 47.1: 57-70.
155. VAN DER SCHUEREN, Lien, et al. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European Polymer Journal*, 2011, 47.6: 1256-1263.
156. MADERUELO, Cristina; ZARZUELO, Aránzazu; LANAO, José M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of controlled release*, 2011, 154.1: 2-19.
157. CAETANO, Guilherme Ferreira, et al. Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. *Procedia Engineering*, 2015, 110: 59-66.
158. OSATHANON, Thanaphum, et al. The responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells on polycaprolactone-based scaffolds: an in vitro study. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, 11.3: 239-246.
159. LIU, Xin, et al. In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2010, 94.2: 499-508.
160. AUGUSTINE, Robin, et al. Electrospun poly (ϵ -caprolactone)-based skin substitutes: In vivo evaluation of wound healing and the mechanism of cell proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2015, 103.7: 1445-1454.
161. TEMPLIN, Michael V., et al. Chloroform-induced cytotoxicity and regenerative cell proliferation in the kidneys and liver of BDF1 mice. *Cancer letters*, 1996, 108.2: 225-231.
162. LAM, Christopher XF, et al. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2009, 90.3: 906-919.
163. KRÁLOVIČ, Martin, NOVOTNÝ, Petr, AMLER, Evžen. Elektroda zejména pro přípravu nanovláken a nanočástic. Česká republika. Užitečný vzor CZ 33180 U1. 3. 9. 2019.
164. AHMAD, Bilal, et al. Electrospinning of ethyl cellulose fibres with glass and steel needle configurations. *Food research international*, 2013, 54.2: 1761-1772.

165. ROSENDORF, Jachym, et al. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific reports*, 2020, 10.1: 1-12.
166. CUKIERMAN, Edna, et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001, 294.5547: 1708-1712.
167. BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science*, 2012, 125.13: 3015-3024.
168. MINAMI, S., et al. Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. *Carbohydrate polymers*, 1996, 29.3: 241-246.
169. NISHIMURA, K., et al. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 1984, 2.1: 93-99.
170. SHIBATA, Yoshimi; METZGER, W. James; MYRVIK, Quentin N. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *The Journal of Immunology*, 1997, 159.5: 2462-2467.
171. CHIKAURA, H., et al. Effect of particle size on biological response by human monocyte-derived macrophages. *Biosurface and Biotribology*, 2016, 2.1: 18-25.
172. BATTEGAY, Edouard J., et al. TNF-alpha stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *The Journal of Immunology*, 1995, 154.11: 6040-6047.
173. FRATER-SCHRÖDER, Marijke, et al. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84.15: 5277-5281.
174. WOFFORD, Kathryn L., et al. Biomaterial-mediated reprogramming of monocytes via microparticle phagocytosis for sustained modulation of macrophage phenotype. *Acta biomaterialia*, 2020, 101: 237-248.