

# Vliv velikosti mezivláčenných pórů na buněčnou proliferaci

Ivana Veverková<sup>1</sup>, Jiří Chvojka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, TUL

<sup>2</sup>Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, TUL

## Abstract

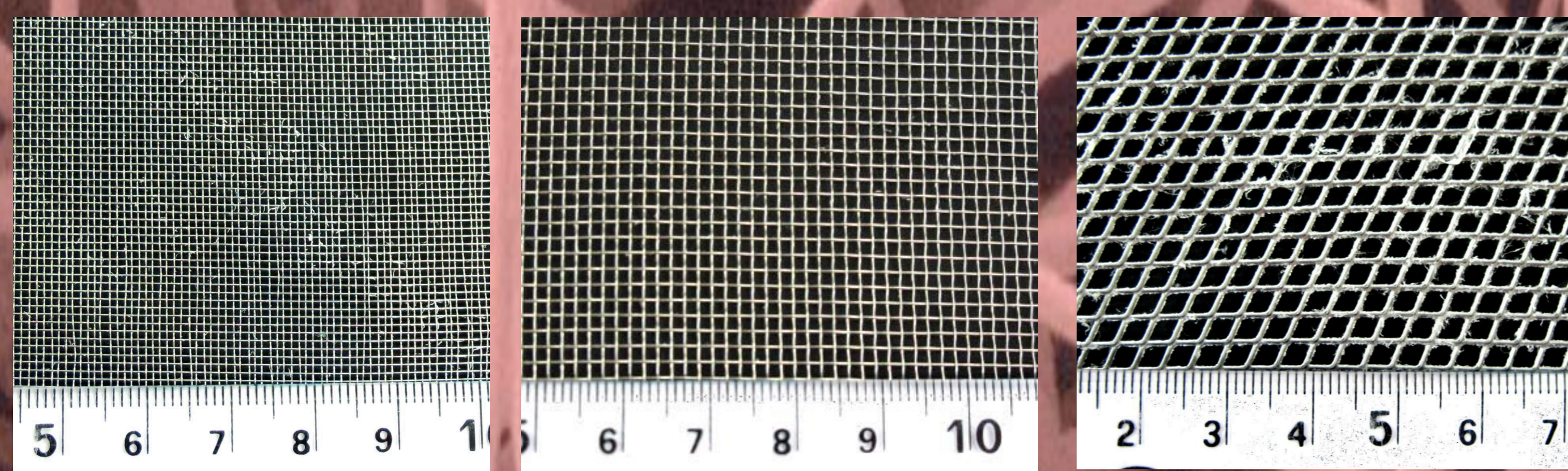
This study examines the impact of structured collectors on the profile and arrangement of electrospun polymer nanofiber layers. Experimental results showed that the structure of the collector significantly affects storage of the nanofibers. Generated inhomogeneous nanofiber layers reveal larger inter-fiber pores compared with conventional nanofiber layers. The larger pore size support better cell proliferation and penetration of cellular material into the volume of the structured nanofiber scaffolds.

## Úvod do problematiky

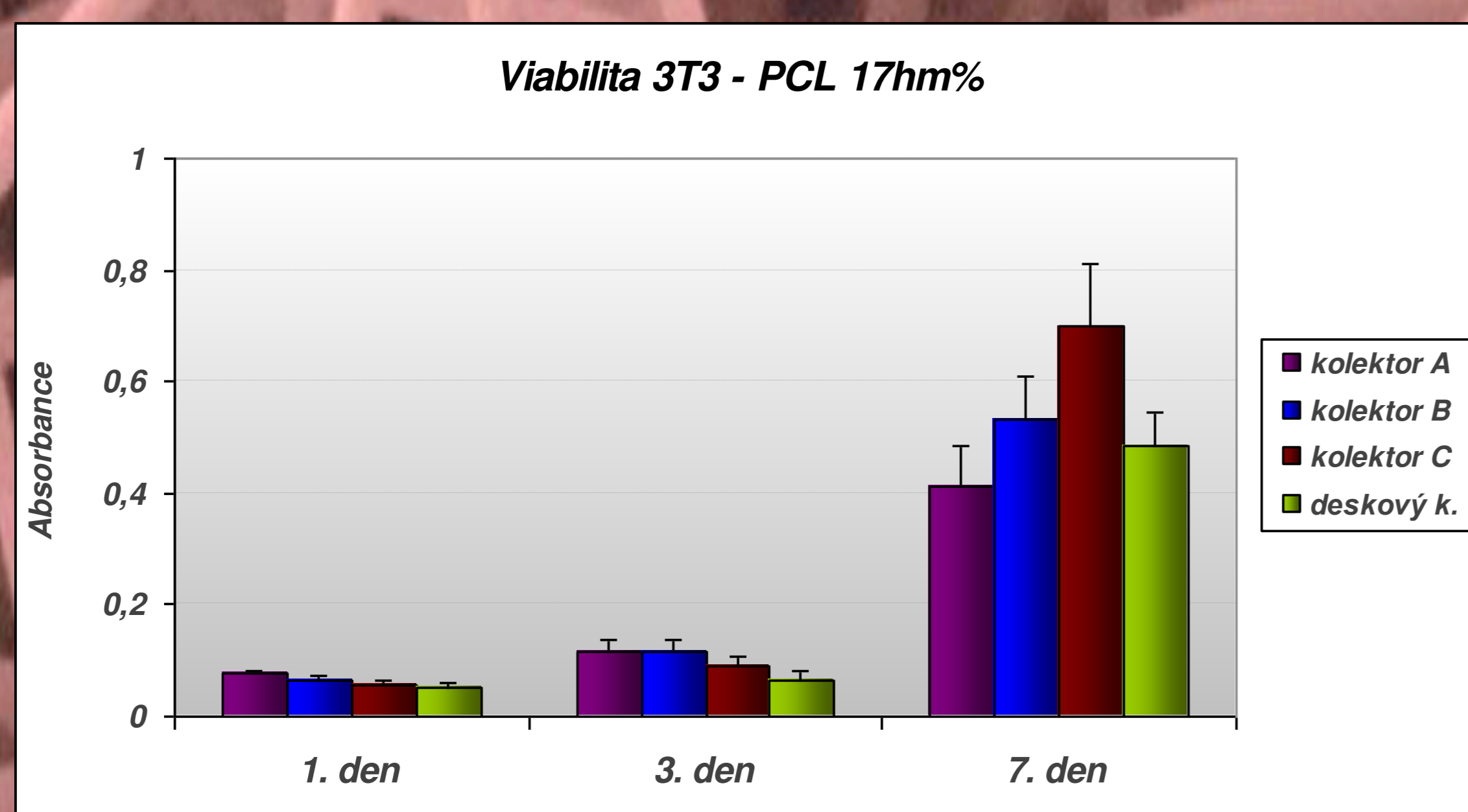
Tkáňové inženýrství se zabývá vývojem plně funkční náhrady lidské tkáně. Jako slibné biomimetické materiály se jeví elektrostatičticky zvlákněné nanovláčenné vrstvy, které významně imitují přirozené prostředí extracelulární matrix, jež má vláčenný charakter. Pro tkáňové inženýrství zásadním nedostatkem nanovláčenné vrstvy je velikost mezivláčenných pórů, jež odpovídá řádově průměrům vláken, což je pro buněčný materiál nedostatečné. Snahou je zvětšit póry v nanovláčenné vrstvě při zachování standardních průměrů vláken tak, aby byl scaffold výhodný pro proliferaci buněčného materiálu, přičemž velikost diferencovaných buněk lidského organismu je 7  $\mu\text{m}$  – 100  $\mu\text{m}$ .

## Metodika

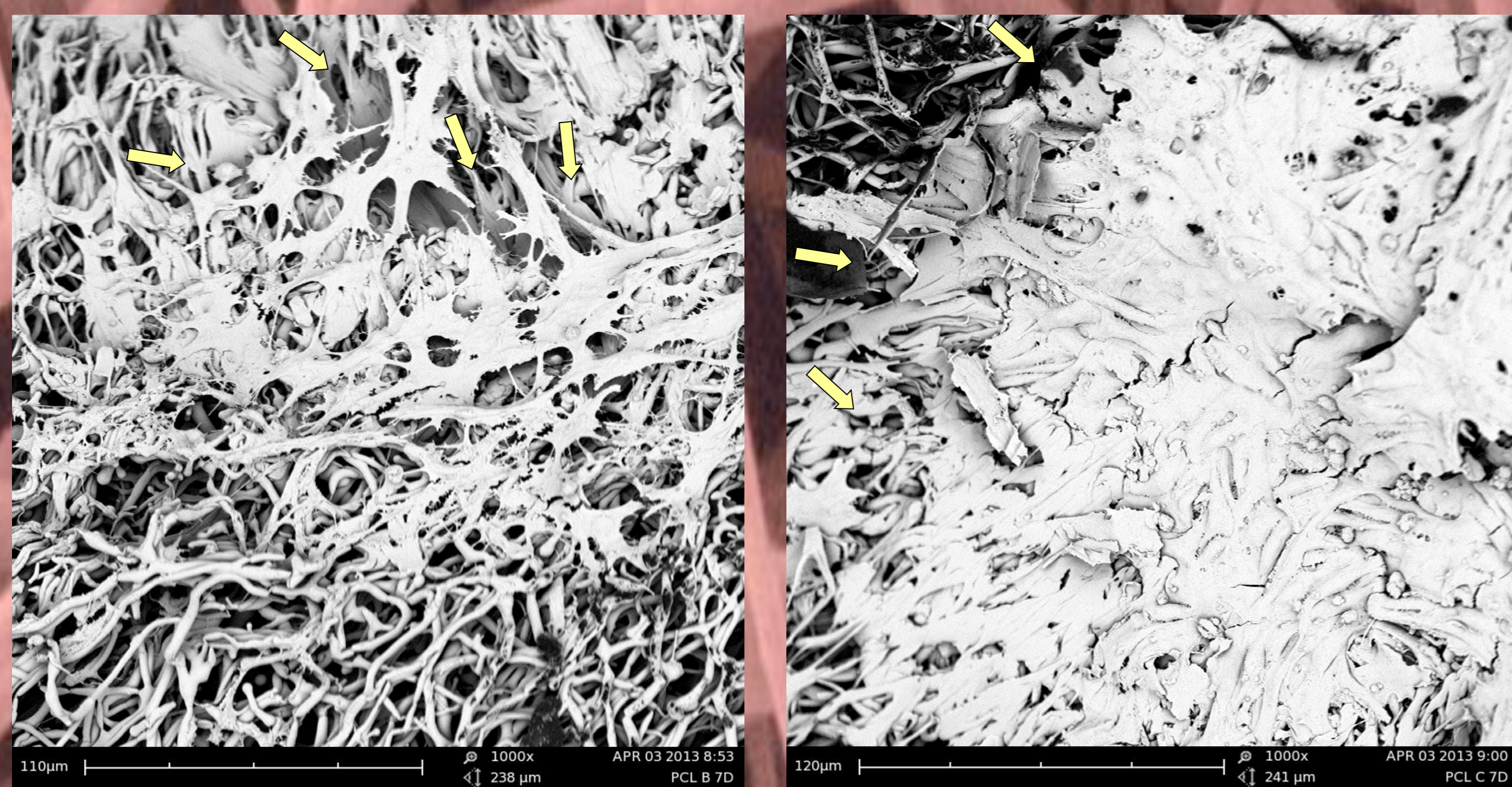
Byly navrženy 3 typy speciálních strukturovaných kolektorů charakteru mřížky s různými parametry. Na dané kolektory byly vytvořeny nanovláčenné vrstvy 12hm% PVA a 17hm% PCL. Velikosti mezivláčenných pórů a průměry vláken těchto vrstev byly porovnány s vrstvami nanovláken vytvořených konvenčně na deskové kolektory. Na scaffoldech byla testována cytotoxicita a míra proliferace buněčného materiálu. Scaffoldy o průměru 6 mm byly osazeny  $2 \cdot 10^4$  buňkami myšimi fibroblasty 3T3 a byla sledována buněčná proliferace v průběhu 7 dnů od nasazení. Proliferace a viabilita byla testována MTT testem, scaffoldy s buněčným materiálem byly vizualizovány SEM a fluorescenční mikroskopií.



**Obrázek 1** – Navržené strukturované kolektory: kolektor A – mříž 1 mm, kolektor B – mříž 2 mm, kolektor C – mříž 3 mm.



**Obrázek 2** – Viabilita 3T3 buněk scaffoldech na 17hm% PCL. 7. den kultivace buňky nejlépe proliferovaly na scaffoldu z kolektoru C.



**Obrázek 3** – SEM snímky proliferovaných buněk 3T3 na PCL scaffoldech z kolektorů B a C, 7. den kultivace. Šípkami označená penetrace buněk do objemu scaffoldu.

## Výsledky a diskuze

Scaffoldy zvlákněné na strukturované kolektory vykazují signifikantně větší póry v segmentech mezi vodivými segmenty kolektorů než scaffoldy z deskového kolektoru. Na vrstvách vznikaly segmenty s vyšší a nižší plošnou hmotností, jež se projevila rozdílnou hustotou vláken. Velikost pórů byla závislá na rozložení vodivých a nevodivých elementů kolektorové mřížky. V segmentech s nižší hustotou vláken velikost pórů vzrostla až 5x v porovnání s nanovláčennou vrstvou z vodivého deskového kolektoru.

MTT testem bylo prokázáno, že tyto scaffoldy zlepšují buněčnou proliferaci a penetraci buněk do objemu matrice. Nejlepší buněčná proliferace byla zaznamenána na PCL scaffoldu z kolektoru C, kde póry v nanovláčenné vrstvě dosahovaly plochy  $1,32 \mu\text{m}^2 \pm 42,37 \mu\text{m}^2$ . Nejméně proliferovaly buňky na PCL scaffoldu z deskového kolektoru a z kolektoru A. Právě scaffold z kolektoru A měl nejmenší póry z charakterizovaných scaffoldů, a to  $0,95 \mu\text{m}^2 \pm 1,57 \mu\text{m}^2$ .

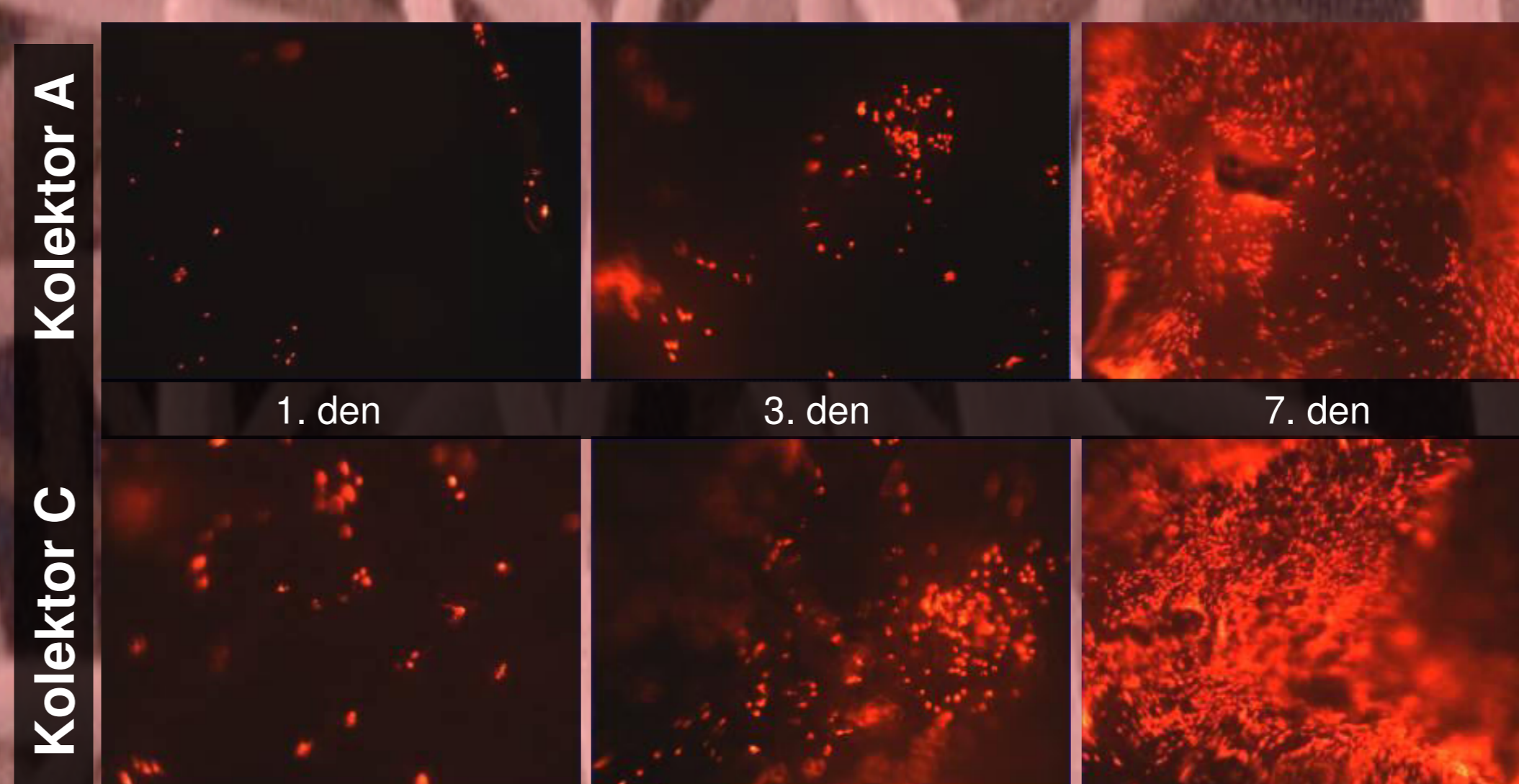
Přes úspěšné testování cytotoxicity PVA scaffoldů byly výsledky MTT testu PVA scaffoldů negativní. Buňky na scaffoldech z 12hm% PVA nebyly po 7 dnech kultivace viabilní.

**Tabulka 1** – Střední hodnoty průměrů vláken a velikosti mezivláčenných pórů 12hm% PVA. Největší póry byly dle střední hodnoty vyhodnoceny v meziprostoru kolektoru C.

PVA 12hm%		Průměr vláken [nm] - střední hodnota	Plocha pórů [ $\mu\text{m}^2$ ] - střední hodnota
Kolektor A	příčka	252,06 $\pm$ 37,30	0,19 $\pm$ 0,11
	meziprostor	249,16 $\pm$ 43,31	1,04 $\pm$ 0,81
Kolektor B	příčka	240,77 $\pm$ 39,86	0,32 $\pm$ 0,20
	meziprostor	224,63 $\pm$ 47,94	1,88 $\pm$ 1,64
Kolektor C	příčka	219,20 $\pm$ 37,93	0,27 $\pm$ 0,16
	meziprostor	237,61 $\pm$ 48,38	2,97 $\pm$ 2,81
Deskový kolektor		286,26 $\pm$ 43,42	0,58 $\pm$ 0,38

**Tabulka 2** – Střední hodnoty průměrů vláken a velikosti mezivláčenných pórů 17hm% PCL. Největší póry byly dle střední hodnoty vyhodnoceny v meziprostoru kolektoru B. Průměry PCL vláken se pohybovaly od stovek nanometrů až po jednotky mikrometrů, nebyl prokázán signifikantní vliv průměru vláken na buněčnou proliferaci.

PCL 17hm%		Průměr vláken [nm] - střední hodnota	Plocha pórů [ $\mu\text{m}^2$ ] - střední hodnota
Kolektor A	příčka	415,57 $\pm$ 151,77	0,54 $\pm$ 1,16
	meziprostor	415,71 $\pm$ 126,25	0,95 $\pm$ 1,57
Kolektor B	příčka	1281,00 $\pm$ 435,60	0,41 $\pm$ 0,74
	meziprostor	1029,45 $\pm$ 296,46	5,60 $\pm$ 8,30
Kolektor C	příčka	1539,92 $\pm$ 295,86	0,94 $\pm$ 5,49
	meziprostor	958,21 $\pm$ 355,02	1,32 $\pm$ 42,37
Deskový kolektor		2382,82 $\pm$ 665,93	2,93 $\pm$ 3,75



**Obrázek 4** – Fluorescenční mikroskopie 17hm% PCL scaffoldů s 3T3 buňkami z kolektorů A a C, zvětšení 10x. 1. a 3. den byl zřejmý rozdíl v počtu buněk na zorné poli mikroskopu. 7. den od nasazení buňky na obou scaffoldech výrazně proliferovaly, na scaffoldu z kolektoru C vidíme větší hustotu buněk v daném poli než na scaffoldu z kolektoru A.

## Závěr

Použitím strukturovaných kolektorů při elektrostatičtém zvláknění jsme schopni výrazně zvýšit velikost pórů při zachování konstantních nebo i menších průměrů vláken. Vznikne tak scaffold, jež je pro proliferaci buněčného materiálu a penetraci buněk do objemu výhodnější než scaffoldy elektrostatičticky zvlákněné na konvenčně používaný deskový kolektor.

## Reference

LOWERY, J. L., N. DATTA a G. C. RUTLEDGE. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials* [online]. 2010, roč. 31, č. 3, s. 491-504 [cit. 2013-03-04]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.072.  
VAQUETTE, C. a J. J. COOPER-WHITE. Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, roč. 7, č. 6, s. 2544-2557 [cit. 2013-03-12]. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.02.036.