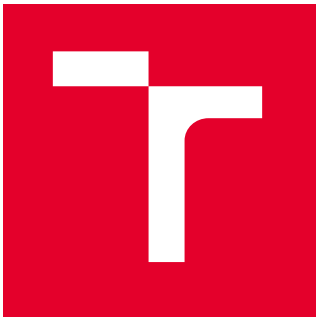


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ADAPTABILITA ELEKTROSPŘÁDANÝCH NANOVLÁKEN PRO KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

ADAPTABILITY OF ELECTROSPUN NANOFIBERS FOR BONE-TISSUE ENGINEERING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Tereza Havlíková

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. Nikola Papež, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2024

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Tereza Havlíková ***ID:*** 240504

Ročník: 3 ***Akademický rok:*** 2023/24

NÁZEV TÉMATU:

Adaptabilita elektrospřádaných nanovláken pro kostní tkáňové inženýrství

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Prozkoumejte aktuální stav ve vědě v oblasti kostního tkáňového inženýrství. Uveďte přehled o nedávném pokroku a možných budoucích perspektivách elektrospřádaných nanovláken jako nosiče pro kostní buňky. Zvolte si specifický typ kostní buňky a vhodný tkáňový nosič ve formě nanovláken, který by dle vaší předchozí rešerše mohl být s buňkami kompatibilní a blíže je specifikujte a popište. Na základě vašeho návrhu a teoretických poznatků vytvořte nanovlákennou strukturu. Na tuto vzniklou strukturu naneste kostní buňky, které jste si zvolila. Proveďte základní výzkumnou analýzu vámi vytvořených vzorků a vyvoďte závěry plynoucí z adaptibility použitých kostních buněk a nanovláken.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] SAMADI, Ali, Mohammad Amin SALATI, Amin SAFARI, Maryam JOUYANDEH, Mahmood BARANI, Narendra Pal SINGH CHAUHAN, Elias Ghaleh GOLAB, Payam ZARRINTAJ, Saptarshi KAR, Farzad SEIDI, Aleksander HEJNA a Mohammad Reza SAEB. Comparative review of piezoelectric biomaterials approach for bone tissue engineering. [online]. 2022, 33(12), 1555–1594. ISSN 15685624. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2022.2065409

[2] KITSARA, Maria, Andreu BLANQUER, Gonzalo MURILLO, Vincent HUMBLOT, Sara DE BRAGANÇA VIEIRA, Carme NOGUÉS, Elena IBÁÑEZ, Jaume ESTEVE a Leonardo BARRIOS. Permanently hydrophilic, piezoelectric PVDF nanofibrous scaffolds promoting unaided electromechanical stimulation on osteoblasts. Nanoscale [online]. 2019, 11(18), 8906–8917. ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C8NR10384D

Termín zadání: 5.2.2024 ***Termín odevzdání:*** 29.5.2024

Vedoucí práce: Ing. Nikola Papež, Ph.D.

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Oblast inženýrství kostní tkáně se zaměřuje na vývoj biokompatibilních tkáňových nosičů, které mohou úspěšně napodobit mezibuněčnou hmotu lidské tkáně a poskytovat rostoucím kostním buňkám nezbytnou mechanickou podporu a vhodnou stimulaci pro správný růst a proliferaci. Tato bakalářská práce popisuje základní principy tkáňového inženýrství s důrazem na oblast regenerace kostní tkáně, zkoumá aktuální technologické výzvy a diskutuje perspektivní materiály a technologie pro návrh kompatibilního tkáňového nosiče. Podrobněji jsou diskutována elektrospřádaná nanovlákna, jejich charakteristické vlastnosti a adaptabilita. Na základě teoretických poznatků z rešerše je vytvořen návrh vhodného tkáňového nosiče ze zvoleného materiálu pro následné osazení kostními buňkami a jsou představeny plánované postupy výroby. Dle návrhu je tkáňový nosič vytvořen a provedena je na něm základní výzkumná analýza z hlediska struktury, chemického složení, smáčivosti, obsahu krystalických fází a buněčné adheze, z čehož jsou vyvozeny závěry ohledně adaptability pro kostní tkáňové inženýrství.

KLÍČOVÁ SLOVA

inženýrství kostní tkáně, polyvinylidenfluorid, tkáňový nosič, osteoblasty, buněčná adheze, elektrostatické zvlákňování, nanovlákna, biokompatibilita, piezoelektrický jev

ABSTRACT

The field of bone tissue engineering focuses on developing biocompatible scaffolds, which can successfully mimic the extracellular matrix of human tissue and provide the growing bone cells with the necessary mechanical support and adequate stimulation for proper growth and proliferation. This bachelor thesis describes the basic principles of tissue engineering with an emphasis on the area of bone tissue regeneration, examines current technological challenges and discusses prospective materials and technologies for the design of a compatible tissue scaffold. Electrospun nanofibers, their characteristic properties and adaptability are discussed in more detail. Based on the theoretical findings from the research, a design of a suitable scaffold created from the selected material for following seeding of bone cells, and the planned production procedures are presented. According to the design, the tissue scaffold is manufactured and a series of fundamental research analyses are conducted on it in terms of its structural integrity, chemical composition, wettability, crystalline phase content and cell adhesion. The results of these analyses inform the conclusion regarding the tissue scaffold's adaptability for bone tissue engineering.

KEYWORDS

bone tissue engineering, polyvinylidenfluorid, scaffold, osteoblasts, cell adhesion, electrospinning, nanofibers, biocompatibility, piezoelectric effect

Vysázeno pomocí balíčku `thesis` verze 4.07; `http://latex.feec.vutbr.cz`

HAVLÍKOVÁ, Tereza. *Adaptabilita elektrospřádaných nanovláken pro kostní tkáňové inženýrství*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2024, 70 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Ing. Nikola Papež, PhD.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení autora:	Tereza Havlíková
VUT ID autora:	240504
Typ práce:	Bakalářská práce
Akademický rok:	2023/24
Téma závěrečné práce:	Adaptabilita elektrospřádaných nanovláken pro kostní tkáňové inženýrství

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno ....

podpis autorky*

*Autor podepisuje pouze v tištěné verzi.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Nikola Papežovi, Ph.D. a konzultantce paní doc. Mgr. Zdence Fohlerové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Obsah

Úvod **11**

1 Tkáňové inženýrství **12**
1.1 Výzkumný záměr tkáňového inženýrství 12
1.2 Odvětví kostního tkáňového inženýrství 13
1.2.1 Stavba kosti a její buněčná struktura 14
1.2.2 Vývoj a regenerace kostní tkáně 15

2 Tkáňové nosiče **17**
2.1 Základní parametry pro návrh tkáňového nosiče 17
2.2 Typy používaných materiálů 18
2.2.1 Rozdělení dle vývoje 18
2.2.2 Rozdělení dle charakteru materiálu 19
2.3 Metody výroby 21
2.3.1 Decelularizace 21
2.3.2 Fázová separace 22
2.3.3 Odlévání rozpouštědlem a louhování částic 22
2.3.4 Zpěňování 23
2.3.5 Sušení mrazem 23
2.3.6 Elektrostatické zvlákňování 23
2.3.7 3D biotisk 24

3 Aktuální stav ve vědě v oblasti KTI **25**
3.1 Problematika přesunu do lékařské praxe 25
3.1.1 Technologické výzvy 25
3.1.2 Etické výzvy 27
3.2 Perspektivní materiály a technologie 27
3.2.1 Nanostruktury 27
3.2.2 Polyvinylidenfluorid 28

4 Elektrospřádání nanovláken **30**
4.1 Princip elektrospřádání 30
4.1.1 Zvlákňování z jehly 31
4.1.2 Zvlákňování z povrchu 32
4.2 Typy nanovlákenných struktur pro TI 32
4.3 Parametry výrobního procesu 33
4.3.1 Vlastnosti roztoku 33
4.3.2 Zvlákňovací napětí 34

4.3.3 Provoz kolektoru . . . 34
4.3.4 Průtok emitorem . . . 35
4.3.5 Teplota pracovního prostředí . . . 35

5 Návrh a výroba tkáňového nosiče 36
5.1 Volba nosného materiálu . . . 36
5.2 Volba kostních buněk . . . 37
5.3 Výroba nanovláken . . . 37
5.4 Povrchová modifikace plazmou . . . 38
5.5 Osídlení nosiče buňkami . . . 39

6 Metody pro základní výzkumnou analýzu 41
6.1 Skenovací elektronová mikroskopie . . . 41
6.1.1 Potažení vodivým filmem . . . 41
6.2 Ramanova spektroskopie . . . 42
6.3 Infračervená spektroskopie . . . 42
6.4 Měření kontaktního úhlu kapaliny . . . 43
6.5 Konfokální mikroskopie . . . 44

7 Analýza a diskuze 45
7.1 Hodnocení kvality nanovláken . . . 45
7.2 Morfologie nanovláken po ošetření plazmou . . . 46
7.3 Povrchová smáčivost nanovláken . . . 48
7.4 Chemická charakterizace tkáňového nosiče . . . 49
7.5 Obsah krystalických fází . . . 51
7.6 Pozorování buněčné adheze . . . 56
7.7 Diskuze výsledků . . . 59

Závěr 62

Literatura 64

Seznam symbolů a zkratek 70

Seznam obrázků

1.1 Tkáňové terapie 13
1.2 Kostní buňky 15
1.3 Hojení kosti 16
3.1 Polyvinylidenfluorid 29
4.1 Elektrospřádání 31
7.1 Nanovlákna 45
7.2 Morfologie nanovláken po ošetření plazmou 47
7.3 Měření kontaktního úhlu kapaliny 48
7.4 Energetické spektrum 50
7.5 Absorpční spektrum 53
7.6 Ramanovo spektrum 55
7.7 Buněčná adheze a osídlení nosiče 57
7.8 Imunofluorescenční barvení jader a cytoplazmy buněk 58

Seznam tabulek

5.1 Parametry výroby vzorků. 38
5.2 Leptání plazmou 39
7.1 Souhrn povrchové smáčivosti vzorků 49
7.2 Chemická charakterizace 51
7.3 Kvantifikace krystalických fází 54

Úvod

V době stále se zvyšujícího výskytu onemocnění pohybového aparátu v důsledku zvyšujícího se průměrného věku populace, obezity a absence zdravé fyzické aktivity hledáme nejvhodnější terapie, které by byly schopné nahradit poškozenou kostní tkáň a podpořit její regeneraci. Vhodnou alternativu ke stávajícím postupům léčby by mohl představovat obor tkáňového inženýrství.

Tato bakalářská práce se zabývá literární rešerší v oblasti tkáňového inženýrství se zaměřením na opravu a náhradu kostní tkáně. Je definováno, co je to tkáňový nosič a jaké parametry musí obecně splňovat pro správnou funkci. Prozkoumán je vývoj materiálů a metod pro návrh a konstrukci kompatibilních tkáňových nosičů a jsou porovnány jejich výhody a nevýhody. Vzhledem k nedávného pokroku ve vědě v oblasti kostního tkáňového inženýrství jsou posouzeny technologické a etické výzvy, které brání přesunu do lékařské praxe a v souladu s tím jsou prozkoumány perspektivní materiály a technologie jako jsou nanovlákna z polyvinylidenfluoridu s piezoelektrickými vlastnostmi. Vzhledem k velkému funkčnímu potenciálu jsou důkladněji diskutována elektrospřádaná nanovlákna, typy struktur, které mohou tvořit a parametry jejich výrobního procesu.

Je vytvořen návrh struktury tkáňový nosič-buňky a jsou představeny zvolené postupy výroby. Tkáňový nosič je následně dle návrhu zkonstruován a je provedena základní výzkumná analýza jeho struktury, chemického složení, smáčivosti, charakteru krystalických fází a buněčné adheze vzhledem k posouzení adaptability pro kostní tkáňové inženýrství.

1 Tkáňové inženýrství

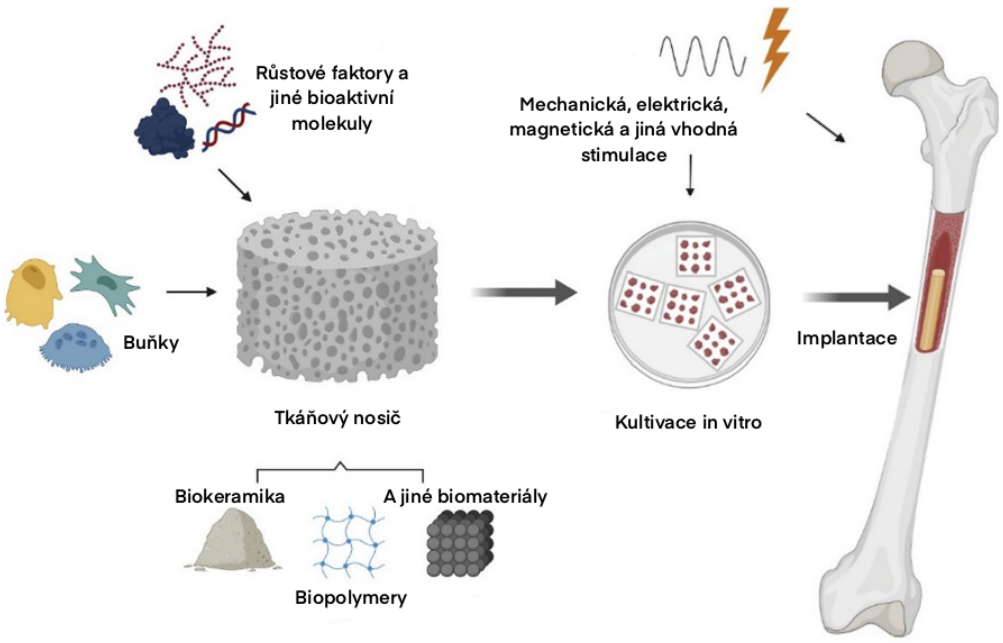
1.1 Výzkumný záměr tkáňového inženýrství

Využití umělých tkání v regenerativní medicíně se dostává do centra pozornosti v důsledku hledání alternativních terapií, které by nahradily transplantaci od dárců. Díky neustálým pokrokům v moderní medicíně roste věk, kterého se lidská populace průměrně dožívá a tím narůstá i poptávka po transplantaci selhávajících orgánů. Mimo věk, jsou faktory nárůstu poptávky po tkáňových náhradách i špatný životní styl, sedavé zaměstnání a úrazy spojené s náhlou a neúměrnou fyzickou aktivitou. I když se eventuálně pacient dočká vhodného dárce, tak je stále velkým problémem možnost odmítnutí štěpu a následné komplikace, i přes dlouhodobou imunosupresivní terapii. S cílem nalézt řešení těchto problémů začali v 60. letech 20. století výzkumníci v oblasti zdravotnictví mísit nové technologie a materiálové vědy s buněčnou a molekulární biologií, což postupně vedlo v 80. až 90. letech 20. století ke vzniku nového samostatného oboru. Tkáňové inženýrství (zkr. TI) je nyní definováno jako interdisciplinární obor, který aplikuje principy inženýrství a biologických věd směrem k vývoji biokompatibilních náhražek, díky kterým bude možné zachovat, obnovit nebo zlepšit funkci poškozených tkání [1, 2].

Průzkum tohoto relativně nového biomedicínského oboru ukazuje na to, že umělé biomimetické tkáňové náhrady mají potenciální kapacitu řešit přetrvávající krizi nedostatku kompatibilních tkání a orgánů. Využití v běžné péči o pacienty je však v současnosti stále omezené. Pacientům jsou již implantovány např. tepny, kožní štěpy či chrupavka, ale léčba je stále ve stádiu experimentů a primárně je mimořádně nákladná, kvůli neoptimalizovaných procesům výroby, nákladným materiálům a buněčným liniím. Mnohem složitější orgánové tkáně se zachovanou biologickou funkcí jako je srdce a plíce již byly úspěšně rekonstruovány v laboratorních podmínkách, avšak stále ještě zdaleka nejsou připravené k implantaci lidskému pacientovi [2].

Obecná strategie terapeutického odvětví tkáňového inženýrství se rozděluje podle toho, zda je cílem tkáň nahradit, dodat ji oporu, nebo stimulovat k vlastní regeneraci. Dle toho zavádíme:

- **Buněčné terapie** – strategie spoléhající na vlastní aktivitu buněk, které mohou být implantovány injekčně buď samostatně nebo např. spolu s hydrogelem. Jejich účelem je nahrazení populace buněk, které přestaly správně fungovat.
- **Tkáňové terapie** – strategie využívající buněk usazených na 3D tkáňový nosič viz obr. 1.1, na kterém se buňky *in vitro* množí a rostou v tkáň před implantací spolu s nosným materiálem. Tyto konstrukty mají za cíl nahradit chybějící část tkáně a dodat ji oporu při regeneraci, nebo nahradit celý orgán [1].



Obr. 1.1: Princip tkáňové terapie založený na výrobě tkáňového nosiče z vhodného materiálu a jeho funkční modifikaci pro dosažení optimálních vlastností pro následné osídlení buňkami a kultivaci tkáně před implantací. Převzato a upraveno z [3].

1.2 Odvětví kostního tkáňového inženýrství

Cílem kostního tkáňového inženýrství (zkr. KTI) je vývoj úspěšné alternativní terapie pro regeneraci a náhradu poškozené kostní tkáně. Základem tohoto snažení musí být porozumění struktuře kosti, buněčné skladbě jednotlivých částí, mechanice základních funkcí a převážně procesu tvorby a remodelace. Více než 200 kostí v lidském těle tvoří pevnou kostru pro podporu a ochranu měkkých orgánů před zraněním. Ve spolupráci se svaly, které se na kosti upínají, udržují žádoucí polohu těla a umožňují pohyb. Kost v sobě uchovává růstové faktory a pro tělo důležité minerály jako je vápník a fosfor. V neposlední řadě zde sídlí žlutá kostní dřeň uchovávající tuk a červená zajišťující vznik, dozrávání a zánik části krevních elementů [4].

Jak dospělí jedinci dále stárnou a dostávají určité nemoci, kostní remodelace, která v různé míře probíhá celý život, se může stát nevyváženou. Jako důsledek poruchy či nedostatku určitých minerálů může být odstraňováno více kostní tkáně, než kolik přibývá. V důsledku toho mohou kosti řídnout a slábnout, což může vést k bolesti, omezení v pohyblivosti a zranění, které se v pokročilém věku již obtížněji hojí. Osteoporóza, tedy řídnutí kostí, je v dnešní době nejčastější příčinou fraktury kostí, která může mít pro starší pacienta i fatální následky. Kromě získaných patologií

můžou ke kostním defektům vést také neléčené vrozené poruchy, rozsáhlé infekce či novotvary. Pokud se tělo pacienta již s těmito obtížemi není schopno samo vypořádat, tak se ošetřující lékař musí uchýlit k invazivnímu chirurgickému zákroku. To může zahrnovat použití kostních štěpů, biomateriálů pro náhradu kostí a vkládání kovových dílů pro podporu stability, funkce a regenerace kosti [4, 5].

Přestože je kost nyní celosvětově druhou nejčastěji transplantovanou tkání, stále jsou zde výrazné omezení a dosud nevyřešené problémy v procesu léčby. Autoštěpy, tedy kostní štěpy odebrané přímo z těla léčeného pacienta, jsou aktuálně nejideálnější formou léčby. Tato metoda je však limitována množstvím tkáně, kterou lze pacientovi odebrat, aby nedošlo k výraznému poškození, a také bolestmi, či možnou infekcí, které mohou být komplikacemi provedené operace. Aloštěpy pocházejí z neidentického lidského jedince, kterému jsou odebrány např. z hlavice femuru při náhradě kyčelního kloubu a xenoštěpy z jiného živočišného druhu představují riziko přenosu onemocnění, či nepříznivé imunitní reakce pacienta na štěp. Hlavní nevýhodou implantace kovových dílů je postupná degradace v čase a opotřebení přilehlých kostí [5].

Slibnou alternativou k tradičním metodám léčby onemocnění kostí je vývoj v odvětví kostního tkáňového inženýrství představující široké spektrum biomateriálů pro výrobu 3D tkáňových nosičů, které by ve spojení s vhodnými buňkami potenciálně mohly nahradit auto-, alo- a xeno- štěpy. Hlavním výzkumným záměrem je proto nalezení optimální kombinace biomateriálu, metody výroby tkáňového nosiče a výběr buněčné linie pro osazení.

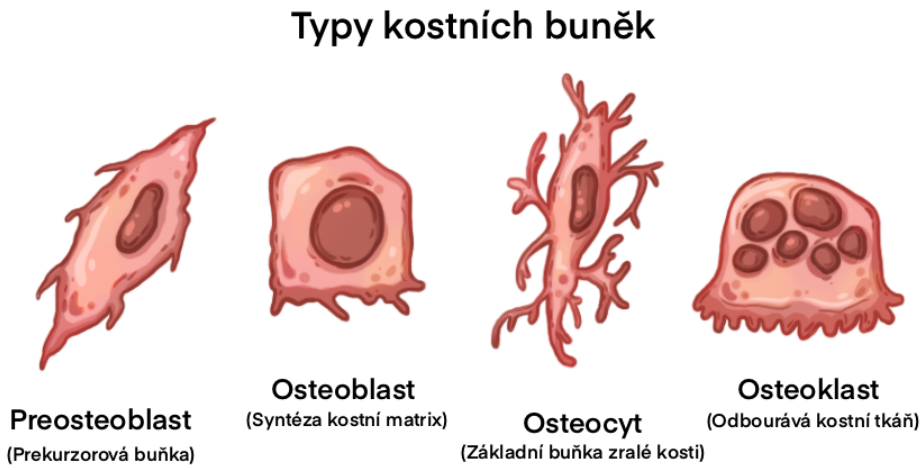
1.2.1 Stavba kosti a její buněčná struktura

Tkáň kostní, chrupavčitá a vazivo patří do kategorie pojiva, což jsou tkáně, které se kromě buněk skládají i z mezibuněčné hmoty, kterou pojivové buňky produkují pro svou oporu. Mezibuněčná hmota výrazně ovlivňuje vlastnosti a chování celé tkáně. Kost je pojivo skládající se z bílkovin, kolagenu a minerálů. Nejdůležitějšími minerály jsou zde uhličitan a fosforečnan vápenatý, které činí kost tvrdou a pevnou, zatímco kolagen poskytuje pružnost a odolnost proti zlomení. Kost je prostoupena krevními cévami, a proto je na rozdíl od chrupavky schopná do určité míry regenerace a srůstu.

Povrch kosti pokrývá vazivová blána zvaná periosteum, která je hustě protkána Haversovými kanálky zajišťující výživu tkáně. Popisujeme kost fibrilární a lamelární, v rámci jejíž vnitřní stavby rozlišujeme kost kompaktní, která tvoří převážně střední část kosti a kost spongiosní, která odstupuje ke koncům. Základní hmota se organizuje do lamel, trámčin a tvoří dutiny, které jsou vyplněny kostní dření a ohraničeny vrstvou endostea.

Kostní tkáň je složena viz obr. 1.2 z:

- **Preosteoblasty** – osteoprogenitorové kmenové buňky na počátku procesu diferenciace, které jsou přímým prekurzorem osteoblastů. Svou funkcí ovlivňují proces formování kosti.
- **Osteoblasty** – nezralé kostní buňky nacházející se na vnějším i vnitřním povrchu kosti, v místech regenerace či růstu a produkují kolem sebe látky, ze kterých vzniká mezibuněčná hmota. Ve chvíli, kdy se jí obklopí, tak se mění v osteocyty.
- **Osteoklasty** – buňky jejichž úkolem je rozpouštět a odbourávat kostní tkáň.
- **Osteocyty** – zralé kostní buňky plně obklopené mezibuněčnou hmotou tvořící strukturu uvnitř vyvinuté kosti a podílející se na metabolismu minerálů.
- **Mezibuněčná hmota** – podpůrná nebuněčná struktura tvořena svazky kolagenních vláken, které jsou tmeleny základní amorfní mezibuněčnou hmotou z převážně osseinu [6].



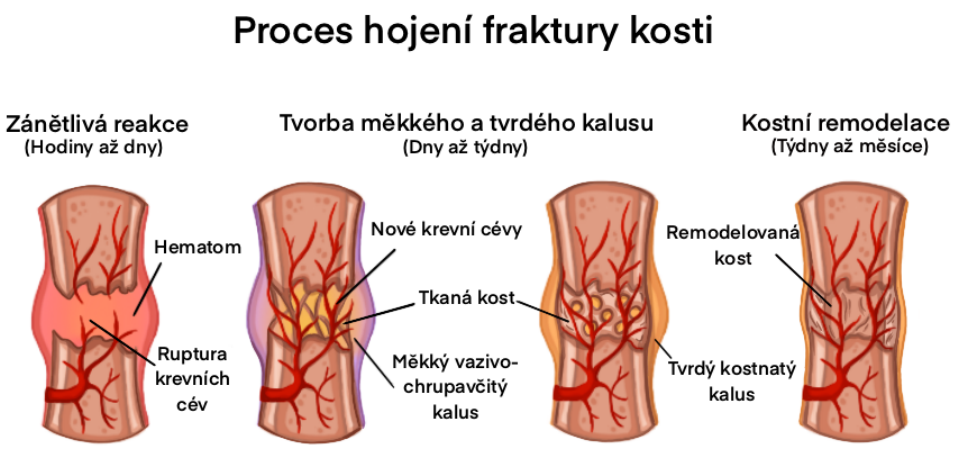
Obr. 1.2: Vizualizace mikroskopické anatomie jednotlivých typů buněk tvořících kostní tkáň a jejich primární funkční význam.

1.2.2 Vývoj a regenerace kostní tkáně

K tvorbě kosti dochází buď intramembránovou nebo endochondrální cestou. Intramembránová tvorba kosti zahrnuje mezenchymální osteoprogenitorové buňky diferencující se přímo na osteoblasty a vyskytuje se převážně u kostí lebky. Většina kostí v těle je však tvořena endochondrálně, kdy se mezenchymální osteoprogenitorové buňky nejprve diferencují na chondrocyty tvořící chrupavčitý základ, který je později mineralizován a nahrazen kostí v procesu osifikace. Pro udržení normální funkce

vyspělých zdravých kostí a minerální homeostázy je zapotřebí procesu kostní remodelace, v rámci kterého je důležité zachování rovnováhy mezi osteoklastickou kostní resorpcí a osteoblastickou tvorbou kosti [4].

Schopnost rychlé a účinné kostní regenerace je klíčovou pro zajištění obnovy původní morfologie a funkčnosti tkáně před zraněním. Mezi primární odpovědi organismu na frakturu kosti viz. obr. 1.3 patří formace stabilizujícího hematomu a vyvolání zánětlivá reakce, která přivolá buňky imunitního systému a uvolní látky zahajujících proces hojení. Dochází k neovaskularizaci a k tvorbě měkkého vazivo-chrupavčitého kalusu poskytujícího oporu a prostředí pro osteogenezi a tvorbu nevyspělé primitivní kosti, tzv. tkané kosti. Kalus postupně tvrdne procesem mineralizace a po dokončení formace kosti je resorbován. V rámci měsíců je tkaná kost remodelována v kost lamelární pro obnovení původních vlastností tkáně [7].



Obr. 1.3: Orientační popis hlavních fází hojení fraktury kosti představující vnitřní procesy probíhající v místě defektu v průběhu hodin až měsíců.

2 Tkáňové nosiče

Význam mezibuněčné hmoty neboli extracelulární matrix (zkr. ECM) pro formování a regeneraci tkáně byl již mnoha studiemi nezpochybnitelně zdokumentován. ECM poskytuje buňkám 3D podpůrnou strukturu, která zprostředkovává komunikaci mezi buňkami a ovlivňuje buněčnou adhezi, migraci, proliferaci, diferenciaci a samotnou tvorbu další ECM.

Podstatný rozdíl byl zaznamenán v chování a růstu buněk kultivovaných ve 2D prostředích. Tento postup je využíván převážně buněčnými biology při studiu jednotlivých procesů v buňkách, avšak chování celé tkáně *in vivo* lze dle aktuálních studií kvůli provázanosti ECM a buněk simulovat pouze ve 3D kultivačních prostředích.

Strategie využívající porézního odbouratelného syntetického materiálu jako prostředku pro tvorbu tkáňového nosiče a simulaci ECM byla poprvé představena ve vědecké práci publikované Langerem a Vacantim již v roce 1988 [8], teprve rok po zakotvení pojmu tkáňové inženýrství. Následné studie však ukázaly, že univerzální materiál bude těžké, ne-li téměř nemožné najít vzhledem k tomu, že každá tkáň vykazuje různé vlastnosti a dynamiku chování [9].

2.1 Základní parametry pro návrh tkáňového nosiče

Za předpokladu, že je zvolena strategie ve formě tkáňové terapie, musí být navržen a vyroben tkáňový nosič, který bude dostatečně dobře napodobovat strukturu a funkci ECM ve vybraném typu tkáně. Díky tomu bude nosič poskytovat potřebnou oporu v růstu a na něm usazené buňky budou prosperovat. Design tkáňového nosiče se správnými vlastnosti závisí převážně na zvoleném materiálu a metodě výroby, které musí splňovat specifické kritéria:

- **Biokompatibilita** – zvolený materiál nesmí být toxický a také nesmí vyvolávat imunitní reakci organismu.
- **Kontrolovaná biodegrabilita** – stádium degradace musí odpovídat rychlosti nárůstu nové mezibuněčné hmoty, přičemž musí stále nosič udržovat potřebnou oporu a produkty degradace materiálu nesmí být toxické.
- **Bioaktivita** – materiál musí být schopen se spojit s hostitelskou tkání, komunikovat, přenášet biologické podněty a látky jako jsou růstové faktory.
- **Mikroarchitektura** – porézní a dostatečně stabilní struktura materiálu napomáhá ke správné buněčné infiltraci, adhezi jednotlivých buněk, umožňuje difúzi látek a buněčnou migraci.

- **Mechanické vlastnosti** – výsledný tkáňový nosič musí být pevný a přitom dostatečně elastický a poddajný pro vhodné přizpůsobení se tkáni, do které je implantován. Upřednostňovány jsou materiály s hydrofilním povrchem, který usnadňuje buňkám přichycení.

Dle uvedených kritérií musí být tkáňový nosič biokompatibilní a biologicky odbouratelný porézní materiál s vlastnostmi podobnými tkáni, do které má být implantován. Tyto nosiče povětšinou nejsou navrženy jako dlouhodobé implantáty, měly by pouze zajistit přežití buněk, dodat počáteční oporu transplantované tkáni a usnadnit hostitelským buňkám vytváření mezibuněčné hmoty, která eventuálně převezme místo a funkci nosiče [5, 9].

2.2 Typy používaných materiálů

2.2.1 Rozdělení dle vývoje

Pokrok z jedné generace materiálů pro TI na druhou odráží rostoucí porozumění oboru biologie člověka, materiálové vědě a regenerativní medicíně. Biomateriál je látka, materiál nebo prostředek, který má schopnost kladně interagovat s biologickým systémem. Výzkumníci v oboru pokračují ve vývoji a zdokonalování biomateriálů a technologií za cílem vytvořit struktury, které budou moci bez problému integrovat do tkáně pacienta, a nakonec plně obnovit nebo nahradit poškozené tkáně a orgány.

První generace

První generaci tvoří bioinertní netoxické látky, které se obvykle používají v případech, kdy dlouhodobá degradace a kompletní integrace do tkáně není žádoucí a primárním cílem je mechanická podpora. Mezi běžné příklady patří nerezová ocel a titan pro ortopedické implantáty a polyethylen pro kloubní náhrady [10, 11].

Druhá generace

Materiály druhé generace se vyznačují svou biologickou aktivitou, rozložitelností a vstřebatelností. Tyto materiály časem degradují, takže jsou vhodné pro dočasnou strukturální podporu, než dojde k nahrazení novou tkání, a nebo např. jako nosiče léků. Jsou schopny interakce s prostředím, do kterého jsou implantovány a podporují tvorbu chemických vazeb na rozhraní tkáň/nosič. Mezi příklady patří bioaktivní sklo-keramika či polymery jako např. polyglykolid [11, 12].

Třetí generace

Třetí generace představuje 3D porézní bioaktivní rozložitelné materiály, které svou aktivitou podporují tkáň k regeneraci a hojení. Cílem je vytvořit dynamický a bioresponsivní tkáňový nosič, který dokáže napodobit přirozenou ECM a plně se zaintegruje po morfologické i funkční stránce do tkáně. Zkoumána je také forma zpracování materiálu, kdy do popředí kromě syntetických či přírodních hydrogelů přichází např. nanovlákna a nanočástice [11, 12].

2.2.2 Rozdělení dle charakteru materiálu

Materiály, které se v současnosti používají pro výrobu tkáňových nosičů pro inženýrství kostní tkáně, jsou anorganické materiály jako jsou kovy a biokeramika a přírodní nebo syntetické polymery. Pro zlepšení mechanických vlastností materiálů a zvýšení interakce mezi tkání a nosičem byly vyvinuty kompozity [12].

Kovy

Kovy lze považovat za nejstarší materiál používaný pro implantáty, jelikož jejich první zaznamenané použití bylo již v dobách starověkého Egypta, dávno před vznikem tkáňového inženýrství a první generací biomateriálů. První použité kovy byly hliník, zlato a stříbro [13].

V současné době jsou nerezová ocel, titan a jeho slitiny nejčastěji používanými kovovými biomateriály pro dentální a ortopedické implantáty a kloubní náhrady, a to díky jejich mimořádné pevnosti, biokompatibilitě, netoxicitě a odolnosti proti korozi. Kovy však nejsou biologicky odbouratelné, a proto pokud neslouží jako trvalá náhrada, tak je obvykle nutné kovové implantáty odstranit, zejména u dětí, které jsou stále v procesu růstu a vývinu. Pokud dojde k opotřebení materiálu, reoperace je opět žádoucí [12, 14].

Při zavedení kovového implantátu také může nastat tzv. „stress-shielding“, kdy dochází k redistribuci mechanického napětí v kosti. Kostní tkáň a její struktura jsou dynamické a reagují na mechanické namáhání. V oblastech, kde je vlivem implantátu snížen mechanický stres, může kostní tkáň podléhat procesu kostní resorpce, jelikož není vystavena obvyklé námaze. To může vést ke ztrátě hmoty a oslabení kosti v blízkosti implantátu [5].

Biokeramika

Biokeramika je využívána na základě její příznivé biokompatibility, biologické rozložitelnosti a osteokonduktivity. Mimo to, kostními buňkami zprostředkovaná degradace této keramiky *in vivo* produkuje vápenaté a fosfátové ionty, které podporují tvorbu

nové kosti prostřednictvím osteoindukce. Pro KTI nejpoužívanější biokeramika zahrnuje hydroxyapatit, β-trikalciumfosfát, bioaktivní sklo atd. Díky chemické podobnosti s nativní kostí vykazuje významné vlastnosti usnadňující diferenciaci a proliferaci usazených buněk [11, 12, 14].

Mezi nevýhody některých z těchto tvrdých materiálů patří křehkost, která může způsobit problémy s mechanickým namáháním a řízením rychlosti degradace. K překonání těchto mechanických omezení je biokeramika kombinována s jinými biomateriály za účelem vytvoření kompozitních tkáňových nosičů s žádoucími vlastnostmi, jak bude diskutováno později [5].

Přírodní polymery

Přírodní polymery jako jsou polysacharidy (alginát sodný, chitin/chitosan, deriváty kyseliny hyaluronové) a proteiny (kolagen, fibrinové gely, hedvábný fibroin) jsou využívány v KTI pro tvorbu tkáňových nosičů na základě jejich dobré plasticity, biokompatibility a biologické rozložitelnosti na oxid uhličitý a vodu *in vivo*. Významnou výhodou přírodních polymerů je, že často obsahují na svém povrchu funkční molekuly, které v dobrých podmínkách napomáhají adhezi a integraci buněk. Velká pozornost je obracena např. na kolagen, který je nejhojnější bílkovinou v lidském těle nacházející se především v chrupavce, vazech, kůži, šlachách a je hlavní složkou organické části kosti [5, 11, 12].

Na druhou stranu u těchto biomateriálů také pozorujeme mnoho nevýhod, jako jsou problémy s imunitní reakcí organismu, nedostatečně ovladatelná rychlost degradace a spolu se syntetickými polymery i suboptimální mechanické vlastnosti nosičů, kvůli kterým se opět ve vývoji obrací na využití přírodních polymerů v kompozitních nosičích, pro dosažení žádoucí pevnosti materiálu [5, 14].

Syntetické polymery

Syntetické polymery v KTI zahrnují kyseliny polymléčné, kyseliny polyglykolové a kopolymery kyseliny polymléčné a glykolové. Vzhledem k tomu, že syntetické polymery jsou námi zvolenými metodami vyráběny ze zcela neorganických sloučenin, tak je možno si jejich strukturu a vlastnosti velice snadno přizpůsobit našim požadavkům oproti extrahovaným a omezeně upravovaným přírodním polymerům. Skrze parametry výroby je mimo jiné možné přizpůsobení velikosti a množství pórů, rychlosti degradace a omezeně i mechanické pevnosti [5].

Syntetické polymery jsou však obecně hydrofobní a mnohdy také postrádají osteoinduktivní vlastnosti, kvůli čemuž bývá nutná sekundární modifikace pro zlepšení povrchové mikrostruktury a bioaktivity. Jelikož nejsou tělu vlastní, zůstává nutnost

pečlivé volby takového polymeru, který během své existence i rozkladu nevykazuje toxické účinky a při degradaci příliš nesnižuje pH svého okolí [5, 12].

Kompozity

Jak již bylo zmíněno, tkáňové nosiče vyrobeny pouze z jednoho materiálu mají řadu nevýhod, které mohou být kompenzovány kombinací s dalším materiálem za vzniku kompozitu. Aktuálně nejlepší vlastnosti vykazují kompozity z biokeramiky a polymeru (např. hydroxyapatit/kolagen), nebo z kombinace syntetických polymerů s přírodními polymery (např. polykaprolakton/alginát). Jedna z populárních metod představuje přidání biokeramiky nebo bioskla jako povlak nebo plnivo do polymerní matrice pro zlepšení bioaktivity a mechanických vlastností nosiče jako je např. pevnost a pružnost. Vhodná pórovitost materiálu může být docílena v kompozitním polymer-keramickém nosiči s různou úspěšností pomocí určitých metod výroby jako je 3D tisk a elektrostatického zvlákňování. Tyto kompozity se pak svými vlastnostmi mnohem více blíží skutečné kostní tkáni [5, 11, 12].

2.3 Metody výroby

Pro výrobu tkáňových nosičů pro využití v KTI bylo vyvinuto několik již osvědčených technologií. Požadované vlastnosti nosiče určují způsob výroby, který bude pro daný případ zvolen [11]. Pro specifické a často velice komplikované klinické potřeby jsou vyžadovány pokročilé technologie, které umožní výrobu tkáňového nosiče, který bude tzv. šitý na míru pacientovi [15].

2.3.1 Decelularizace

Proces decelularizace zahrnuje různé metody odstranění buněk z biologické tkáně při zachování přirozeného chemického složení ECM, jeho mikroarchitektury a schopnosti podporovat buněčný růst a diferenciaci pro následné využití ECM jako nosiče pro novou tkáň. Metody decelularizace zahrnují využití povrchově aktivních látek, enzymatických metod (např. kyselina ethylendiamintetraoctová v kombinaci s trypsinem), tepelného šoku nebo aplikace ultrazvuku. Poslední kroky procesu zahrnují aplikaci nukleáz a dehydratovaného alkoholu pro úplné odstranění buněčných zbytků, které by mohly znečistit novou tkáň a vyvolat imunitní reakci po transplantaci do pacienta. Správné provedení decelularizace je potvrzeno následným měřením obsahu DNA a barvením buněčných jader v očištěné ECM [15].

2.3.2 Fázová separace

Výroba tkáňového nosiče metodou fázové separace využívá jevu, kdy dodaná tepelná energie indukuje separaci fází v polymerním roztoku. Proces začíná rozpuštěním polymeru v rozpouštědle s vysokou teplotou a s nízkou molekulární hmotností kolem bodu tání polymeru, což umožňuje vytvoření homogenní taveniny. Roztok je odlit do požadovaného tvaru a kontrolovaně ochlazen, kdy dochází k separaci fází a srážení roztoku do fáze bohaté na polymer a fáze bohaté na rozpouštědlo. Odstranění rozpouštědla zanechává v polymerní matrici žádoucí póry. Kvůli relativně nízké velikosti pórů (10–100 µm) a variabilní poréznosti (60–98 %) tato metoda není bez modifikace příliš vhodná pro výsev osteoblastů a růst kostní tkáně. Vlastnosti výsledného materiálu výrazně závisí na koncentraci použitého polymeru, typu rozpouštědla a teplotním gradientu [5, 12, 15].

Již kolem roku 2011 byla metoda použita k výrobě polymerních nanovlákenných konstruktů z alifatických polyesterů díky správné regulaci teploty gelování. Ukázalo se, že vytvořené struktury dosahují až 98,5% poréznosti a průměr jednotlivých nanovláken se nachází v rozmezí od 50 do 500 nm. Správně modifikované varianty této metody lze použít k vytvoření funkčních nanovlákenných tkáňových nosičů z různých materiálů s řízenou a pečlivě navrženou porézní mikroarchitekturou [16].

2.3.3 Odlévání rozpouštědlem a louhování částic

Tato technika (angl. solvent casting/particle leaching) je nejběžnější a nejjednodušší metodou výroby tkáňového nosiče, nevyžaduje speciální vybavení, a lze skrze ní do jisté míry kontrolovat velikost pórů a celkovou poréznost nosiče. Tato metoda spočívá v rozpuštění polymeru v organickém rozpouštědle a jeho smíchání s částicemi ve vodě rozpustného porogenu jako je např. chlorid sodný. Následuje odlití výsledné směsi do formy. Rozpouštědlo se odpaří a kompozit polymer/porogen je vyluhován ve vodě, což vede k vymytí porogenu z nosiče. Celková poréznost nosiče závisí na množství použitého porogenu (<85 %) a velikost jednotlivých pórů odpovídá velikosti z porogenu vytvořených krystalů (30–300 µm). Problémem zůstává nehomogenní rozložení pórů a nedostatek jejich vnitřní konektivity. Zbývající toxické rozpouštědlo může způsobit denaturaci inkorporovaných molekul, což vede ke snížení bioaktivity a nemožnost přidání farmakologických látek do nosiče [12, 15]. Touto metodou je možno dosáhnout pouze určité tloušťky struktur (tenké porézní membrány) a omezených mechanických vlastností [11].

2.3.4 Zpěňování

Proces zpěňování (angl. gas-foaming) je metoda výroby tkáňového nosiče, díky které je možné se zcela vyhnout použití organických rozpouštědel, které do výroby přinášejí určité komplikace. Inertní nízko-toxický porogenní plyn, jako je CO_2 nebo N_2, je využit k natlakování modelovaného polymeru, kdy se jako odpověď na expanzi plynu v polymeru tvoří bubliny formující póry. Tato metoda poskytuje vysoce porézní struktury (velikost pórů >100 µm) s porézností až 93 %. Problémem však zůstává vzájemné propojení pórů zejména na povrchu, kde konektivita dosazuje pouze 10–30 %. Celkově je konektivita a velikost pórů touto metodou obtížně modifikována, což vede k vytváření struktury s četnými, velkými, ale v podstatě nespojenými póry s nedostatečnou mechanickou integritou jako celek. Tato metoda nemůže být bez modifikace použita pro hydrofilní materiály a sklovité polymery kvůli nízké rozpustnosti v CO_2, kdy však použití pomocného rozpouštědla, jako je ethanol nebo zředěná kyselina, by mohlo problém vyřešit [5, 11, 12].

2.3.5 Sušení mrazem

Metoda sušení mrazem (angl. freeze-drying) je také známá pod názvem lyofilizace. Proces začíná zmrazením celého roztoku, což vede k tvorbě ledových krystalů rozpouštědla mezi polymerními agregáty. Okolní tlak je následně vakuem snížen pod rovnovážný tlak par zmrzlého rozpouštědla. Rozpouštědlo je tak sublimováno z pevné fáze přímo do fáze plynné do té doby, než zůstane pouze suchý polymerní nosič s propojenou porézní strukturou [5]. Procesem lyofilizace je možné vytvořit tkáňový nosič s přibližně 90% porozitou a velikostí pórů v rozmezí 20–200 µm. Velikost a konektivita pórů je řízena rychlostí tuhnutí rozpouštědla, koncentrací polymeru v roztoku, zvolenou teplotou a okolním tlakem [15]. Jednou z výhod této metody je možnost použití vody místo organického rozpouštědla, což vede ke snížení šance na kontaminaci nosiče látkami, které by mohly způsobit buněčnou smrt [11].

2.3.6 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování neboli elektrospřádání (angl. electrospinning) je populární, jednoduchou a relativně nenákladnou metodou výroby tkáňového nosiče o velké ploše vhodné pro usazení buněk. Metoda produkuje poměrně jednoduše modifikovatelný nanovlákenný porézní nosič o vysoké konektivitě jednotlivých pórů. Využíváno je externě aplikované elektrické pole, které umožňuje zvláknění nabitých polymerních roztoků nebo tavenin. Vlákna v rozsahu mikro- a nano- metrů lze na sebe postupně ukládat za účelem vytvoření 3D tkáňového nosiče s možností zakomponování přídatných materiálů a aktivních biomolekul. Tato metoda, parametry její aplikace

a možné povrchové úpravy vytvořeného materiálu ovlivňující vlastnosti výsledného nosiče budou dále podrobněji diskutovány v samostatné kapitole [5, 12].

2.3.7 3D biotisk

Tradiční metody výroby tkáňového nosiče, které byly doposud stručně představeny, obecně nabízejí omezenou kontrolu nad velikostí pórů, jejich geometrií a vzájemnou konektivitou. 3D tisk umožňuje komplexní návrh a přesnou interpretaci mikroarchitektury modelované struktury skrze počítačem podporované navrhování (angl. computer-aided design) (zkr. CAD). Aplikace CAD modelované 3D objekty popisují jako řadu průřezových vrstev, což umožňuje 3D tiskárnám fyzicky reprodukovat modely prostřednictvím vrstvení. Platí tedy, že 3D tisk vyrábí objekty vrstvu po vrstvě zpracováním práškových, kapalných nebo pevných substrátů, které tiskárna na sebe postupně nanáší a spojuje v celek.

3D biotisk je revoluční technologie, která zahrnuje zpracování a ukládání živých buněk, mezibuněčné hmoty a přídavných biomateriálů vrstvu po vrstvě za účelem vytvoření trojrozměrných struktur napodobujících tkáň jako celek. Součástí předzpracování je často skenování anatomické struktury cílové tkáně pomocí počítačové tomografie či magnetické rezonance a následné převedení těchto snímků do 3D modelů rozdělených do vrstev. Proces biotisku umožňuje přesné umístění vysokého počtu buněk a dalších pomocných složek k vybudování komplexních biologických tkání. Naproti tomu konvenční metody tkáňového inženýrství usazují buňky na předem vyrobený holý tkáňový nosič, což ve výsledku omezuje schopnost vytvářet složitější hierarchické tkáňové struktury. Biotisk je velice slibnou technologií také z hlediska vaskularizace výsledné tkáně, avšak stále se jedná o velice nákladnou a ne pro všechny materiály optimalizovanou metodu [5, 15].

3 Aktuální stav ve vědě v oblasti KTI

I přes rozsáhlý výzkum v odvětví KTI je stále nejpoužívanější metodou léčby kostních defektů transplantace autoštěpů. Tkáňové inženýrství obecně stojí na správné funkci a spolupráci jednotlivých kultivovaných buněk, tkáňového nosiče a proudění signálů a látek mezi nimi. V současné době se vědečtí pracovnicí zaměřují na zdokonalení součinnosti těchto základních pilířů v naději, že tkáňové inženýrství nahradí zavedenou léčbu a její úskalí.

3.1 Problematika přesunu do lékařské praxe

3.1.1 Technologické výzvy

Kromě splnění základních parametrů pro návrh a konstrukci tkáňového nosiče je zapotřebí vyřešit mnoho dalších problémů, které vyplývají na povrch, kdy vyřešení jednoho problému mnohdy vede ke vzniku jiného. Mezi nejvýznamnější technologické výzvy patří:

Volba buněk pro osazení

Mnoho typů buněk a jejich jednotlivých linií je testováno pro využití v daných odvětvích tkáňového inženýrství, a přesto nejúčinnější volba pro osazení nosiče zůstává nejasnou. Mezi nejpoužívanější buňky dosud patří mezenchymální kmenové buňky, které jsou používány experimentálně i klinicky s různým stupněm úspěchu v závislosti na způsobu dodání. Existuje však potenciální riziko spojené s jejich odběrem z kostní dřeně, jejich regenerační schopnost je omezená a klesá s věkem pacienta.

Alternativou k mezenchymálním kmenovým buňkám jsou např. embryonální kmenové buňky, které vykazují dvě pozoruhodné vlastnosti: schopnost proliferovat v nediferencovaném, ale pluripotentním stavu a schopnost diferencovat se do mnoha specializovaných typů buněk. K vytvoření geneticky identických embryí s jejich zdrojem lze za účelem produkce embryonálních kmenových buněk využít terapeutického klonování. V posledních letech je také zkoumána metoda transformace dospělých somatických buněk na pluripotentní kmenové buňky prostřednictvím tzv. genetického přeprogramování bez využití embryí. Tyto buňky se však běžně nepodílejí na remodelaci dospělé zralé tkáně a mohou vyžadovat významnou laboratorní manipulaci a přípravu [5].

Neovaskularizace ve tkáňovém nosiči

Integrita kosti jako vysoce prokrvené tkáně závisí kromě těsného spojení sousedících buněk také na angiogenezi (proces novotvorby krevních kapilár), která hraje klíčovou roli ve vývoji a opravě kosti při narušení její struktury. Při absenci vaskulární sítě jsou kostní buňky zcela závislé na difúzi látek z mezibuněčného prostoru, a pokud není dostačující, tak buňky neprosperují a postupně umírají. Lokální vaskularizace obzvláště v časných stadiích po transplantaci dodává transplantované tkáni základní živiny nutné pro zakomponování do přilehlé zdravé tkáně a umožňuje její komunikace se zbytkem těla.

V současnosti je pro umělé tkáňové nosiče neovaskularizace a výměna látek s okolím stále problém. Oproti již delší dobu vyráběným velkým cévám není stále nalezena optimální metoda pro konstrukci drobných kapilár nutných pro lokální prokrvení tkáně nosiče. Dle průzkumů se nové cévy tvoří převážně v povrchových vrstvách, což vede k nízkému přenosu životně důležitých látek do vnitřní oblasti, kde může mít takový jev za následek brzdění prorůstání nosiče hostitelskou tkání nebo dokonce nezvratnou nekrózu [14, 5].

Osteoindukční materiály

Osteoindukce je biologický proces, který stimuluje tvorbu a růst kostní tkáně v těle. Jedná se o stimulaci diferenciace kmenových buněk na osteoblastické buněčné linie převážně skrze signální molekuly produkované mikroprostředím. Ačkoli biologické mechanismy tohoto jevu nebyly plně objasněny, je dobře známo, že osteoinduktivní materiály výrazně zvedají životaschopnost a rozsah integrace tkáňového nosiče.

Bylo zjištěno, že s osteoindukcí souvisí také např. piezoelektrické vlastnosti některých materiálů, jelikož takové materiály při mechanickém namáhání generují elektrické impulzy, což může vést k žádoucí stimulaci buněk v růstu a regeneraci. Cílem je tedy nalézt takový materiál, který kromě splnění základních parametrů kompatibility bude disponovat schopností tkáň stimulovat k růstu bez externího napájení či injekce stimulačních medikamentů [14, 17].

Povrchová hydrofilita

Dalším důležitým faktorem při výběru vhodného materiálu je jeho hydrofobita, resp. hydrofilita. Jedná se o vlastnost povrchů a jejich molekul, která se projevuje ochotou či neochotou interagovat s vodou. Vysoce hydrofobní materiály brání adekvátní adhezi buněk a tím tvorbě funkční tkáně. Z toho vyplývá, že je žádoucí při nedostatečně hydrofilním charakteru materiálu pozměnit po chemické stránce jeho povrch metodami, jako je ošetření kyslíkovou plazmou [18].

3.1.2 Etické výzvy

Přesun tkáňového inženýrství z laboratoří do běžné praxe spolu nese i mnoho etických, společenských a náboženských výzev, které je zapotřebí včas zmapovat a vyhodnotit. I když toto téma sahá do jiné kategorie výzkumné práce, je třeba jej zmínit pro celistvější uchopení problematiky. Mezi mnohé etické problémy patří:

Náklady na léčbu

Navzdory velkým nadějím, které jsou spojené s biotiskem orgánů na počkání pro jednotlivé pacienty s konkrétními požadavky, tato léčba nyní připadá v úvahu pouze pro pacienty, kteří by si tuto nákladnou alternativní léčbu zvládli na vlastní náklady uhradit. Navýšení a optimalizace produkce jsou tedy nutné pro léčbu rozsáhlých kostních defektů a většího počtu i ne příliš zámožných pacientů [5, 19].

Problematika lidského faktoru

Z předběžných výzkumů a praxe vyplývá, že ne všichni pacienti by byli ochotni podstoupit léčbu, která by zahrnovala implantaci cizích lidských či zvířecích buněk a syntetických materiálů. Etické a náboženské otázky se mimo jiné objevují např. kolem využívání buněk z embryí, které jsou v procesu zničeny, nebo kolem vlastnictví tkáně, ze které jsou buňky derivovány [5, 1].

Rizika terapie

V důsledku nedostatku dlouhodobých *in vivo* studií je obtížné kvantifikovat riziko spojené s negativní reakcí těla na tkáňovou terapii např. Ve formě vzniku zánětu vyvolaného nerozloženým tkáňovým nosičem či vzniku teratomu (nádor složený z různých tkání, které v daném místě normálně nebývají) [5, 19].

3.2 Perspektivní materiály a technologie

3.2.1 Nanostruktury

Kombinace pokroku v oblasti nanotechnologií a tkáňového inženýrství vyústila ve vývoj nanostrukturních biomateriálů, které představují velice slibnou cestu pro efektivnější a méně invazivní opravu a regeneraci poškozených tvrdých tkání [20].

Nanomateriály jsou běžně definovány jako struktury s rozsahem vnitřních či vnějších rozměrů v rozmezí 1–100 nm. Mohou mít různé tvary a zaujímat relativně rozsáhlé struktury o složité morfologii, přičemž jsou na základě rozměrů klasifikovány do čtyř skupin: 0D, což jsou bezrozměrné struktury soustředěné v jednom bodě

(např. nanočástice); 1D, struktury kde existuje pouze jeden definující parametr v nano-měřítku (např. nanovlákenné nitě); 2D, kde existují dva definující parametry v nano-měřítku, zatímco třetí je mimo jejich rozsah (např. tenké grafenové filmy); a 3D, kde existuje délka, výška a šířka v nano-měřítku (např. nanogely či nanovlákenné sítě) [21, 22].

Nanostrukturní materiály mohou být různého původu a chemického složení – organické, anorganické i kompozitní. Všechny dohromady představují základní stavební kameny v dynamicky se rozvíjející oblasti bioinženýrství tkání. Nanomateriály obecně vykazují mnoho zajímavých a jednoduše modifikovatelných parametrů, jako jsou významné mechanické vlastnosti, možnost funkcionalizace povrchu pro dosažení bioaktivity, velký povrch vzhledem k malému objemu a vysoká poréznost. Začleněním syntetickým nanostruktur do organických tkáňových nosičů lze dosáhnout kompozitů s jedinečnými vlastnostmi požadovanými pro inženýrství tvrdých a měkkých tkání. K napodobování struktury kostí jsou nejčastěji používanými entitami anorganický nanohydroxyapatit, nanostruktury křemičitanu vápenatého či uhlíkové nanotrubice, které lze snadno zformovat do potřebné struktury [21].

V tkáňovém inženýrství často používané nanomateriály zahrnují jak organické, tak syntetické polymerní nanovlákna, která mohou sloužit jako opěrné struktury pro buněčnou kultivaci, nebo jako finální tkáňové nosiče simulující přirozenou ECM [21]. Průměr nanovláken se těsně shoduje s průměrem vláken v ECM a jejich relativně velký povrch napomáhá správné adhezi buněk. Polymerní nanovlákna lze vyrábět pomocí metod jako je elektrostatické zvlákňování či fázová separace a jejich složení, průměr, uspořádání, míru degradace a mechanické vlastnosti lze přizpůsobit zamýšlené aplikaci [16]. Pro velký potenciál jejich využití v KTI budou konkrétní vlastnosti a typy nanovlákenných struktur dále diskutovány.

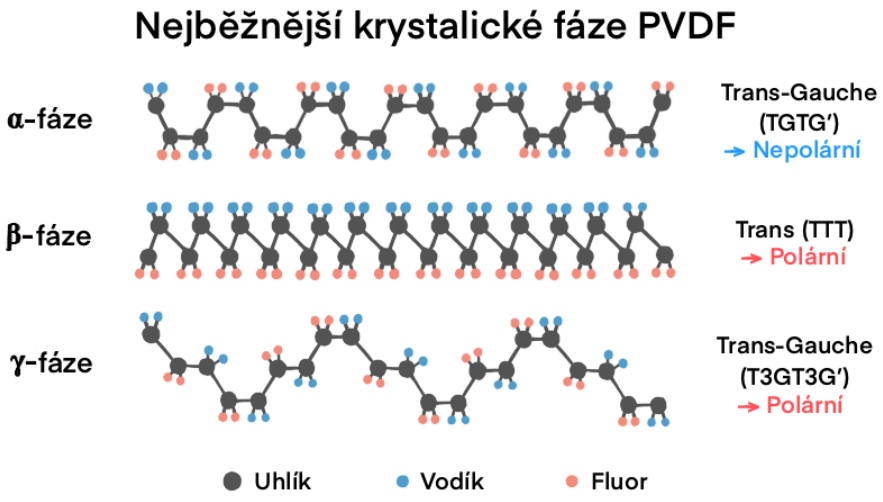
3.2.2 Polyvinylidenfluorid

Díky přítomnosti a různé koncentraci iontů a jiných nabitých komponent v ECM a na obou stranách buněčných membrán lze takovou biologickou strukturu považovat za elektricky aktivní. Skrze zapojení určitých signálních drah, výměně iontů, živin a růstových faktorů může být tkáň stimulována k hojení a regeneraci, v případě kosti konkrétně k osteindukci a osteogenezi. Kromě toho je povrch kostní tkáně ze své podstaty považován za nabitý, z čehož lze usoudit, že indukce a vedení elektrických signálů v navrhovaném tkáňovém nosiči bude hrát významnou roli při simulaci přirozeného prostředí v kostní tkáni [17].

Polyvinylidenfluorid (PVDF) (-CH_2-CF_2-) je termoplastický syntetický polymer, který je široce používán v mnoha různých biomedicínských aplikacích. PVDF disponuje vysokou biokompatibilitou, dobrými mechanickými parametry a skrze

určité metody výroby z něj lze vytvořit vysoce porézní a flexibilní tkáňový nosič. Tento polymerní materiál k sobě přitáhl pozornost zejména díky svým významným piezoelektrickým vlastnostem, které z něj činí ideálního kandidáta pro řešení dosavadní nosiči nedostatečně zprostředkované osteoindukce. Jak fyzikálně-chemické, tak biologické vlastnosti a chování PVDF konstruktů silně závisí na jejich mikroarchitektuře a na samotných parametrech jednotlivých metod výroby [23]. Mnoho studií se omezuje na použití 2D nanovlákenných tkáňových nosičů na bázi PVDF pouze pro kultivaci buněk *in vitro*, a tudíž systematické zkoumání buněčné odezvy na elektrospřádané PVDF *in vivo* ve větší míře stále chybí [16].

Piezoelektrický jev může být v polymerních materiálech indukován mechanickým namáháním, kdy se mění elektrická těžiště záporných a kladných nábojů a vznikne napětí, a je klíčový pro určité aplikace, jako je právě tvorba funkčních tkáňových nosičů, jelikož může vést k žádoucí osteoindukci. PDVF má celkem pět krystalických fází se třemi hlavními viz obr. 3.1 – α, β a γ, s různými konformacemi chemického řetězce a výslednou polaritou v důsledku nerovnoměrného rozložení náboje v molekule (vysoký rozdíl elektronegativity atomů H a F). Fáze, která se tvoří ve většině polymerů nejjednodušeji, je α-fáze, která je vzhledem k antisymetrickému uspořádání dipólů nepolární, tedy elektricky neaktivní (náboje se vyruší). β-fáze je však díky symetrickému uspořádání dipólů polární a pro celkovou piezoelektricitu nejdůležitější. γ-fáze také vykazuje určité piezoelektrické vlastnosti, avšak značně menší než β-fáze. Kromě toho je nutno zmínit, že piezoelektrická odezva PVDF je jedna z nejvyšších mezi netoxickými organickými i syntetickými polymery [24, 25, 26].



Obr. 3.1: Chemické konformace nejběžnějších krystalických fází vyskytujících se v PVDF a jejich charakter v rámci piezoelektrická polarizace.

4 Elektrospřádání nanovláken

Za zakladatele metody elektrostatického zvlákňování je považován A. Formhals, který mezi lety 1930–1944 vydal několik patentů zabývajících se procesem výroby a potřebnou aparaturou pro syntézu umělých vláken z polymerních roztoků [27]. K jeho dílu přispěl G. I. Taylor v roce 1964 svou prací [28], kteráf se zabývala matematickým modelováním tvaru, jaký zaujme tekutina v elektrickém poli, čímž byl popsán i jev vyskytující se v procesu elektrospřádání, který si podle něj nese jméno Taylorův kužel. Zájem o elektrospřádání byl znovu obnoven kolem roku 1995, kdy byly publikovány významné články na téma výroby polymerních vláken v mikro- a nanoměřítku [29]. Nové nápady a inovativní řešení do této problematiky přináší také čeští vědečtí pracovníci jako je např. O. Jirsák, který v roce 2003 vynalezl technologii Nanospider™ pro bezjehlové elektrospřádání [30], nebo D. Lukáš, který ve svém výzkumu [31] podrobně zkoumá potenciál různých modifikací procesu výroby a vlastnosti široké škály nanovlákenných struktur pro aplikaci i mimo biomedicínu.

Díky svým jedinečným vlastnostem mohou být polymerní elektrospřádaná nanovlákna významným kandidátem pro navržení ideální struktury, která v kombinaci s vhodným biokompatibilním materiálem, bude moci sloužit jako funkční tkáňový nosič pro usazení buněk. Elektrospřádání jako metoda pro výrobu nanovláken pro KTI k sobě přitahuje velkou pozornost díky své schopnosti vytvářet struktury podobné přirozeně vláknité ECM. Umožňuje zpracovávat širokou škálu materiálů a je to jednoduchá, relativně nenákladná a časově nenáročná metoda výroby nanovláken kulatých, plochých, dutých i vícevrstvých. Vlastnosti vzniklé nanovlákenné struktury jako je např. plošná hustota, průměr či orientace vláken mohou být jednoduše ovlivněny skrze vhodně zvolené parametry výroby. Mimo jiné je elektrospřádání také jednou z nejúčinnějších metod výroby piezoelektrických nanomateriálů.

Velký povrch nanovláken a celková porézní struktura nanovlákenné sítě zajišťuje propustnost pro kyslík a podporuje adhezi buněk, jejich proliferaci, migraci a diferenciaci. V případě potřeby může být povrch nanovláken dodatečně upravován pro dosažení žádoucích vlastností jako je např. povrchová hydrofilita či bioaktivita. Pro funcionalizaci tkáňového nosiče může být zváženo začlenění přídatných bioaktivních prvků jako jsou např. enzymy či růstovými faktory [24, 32].

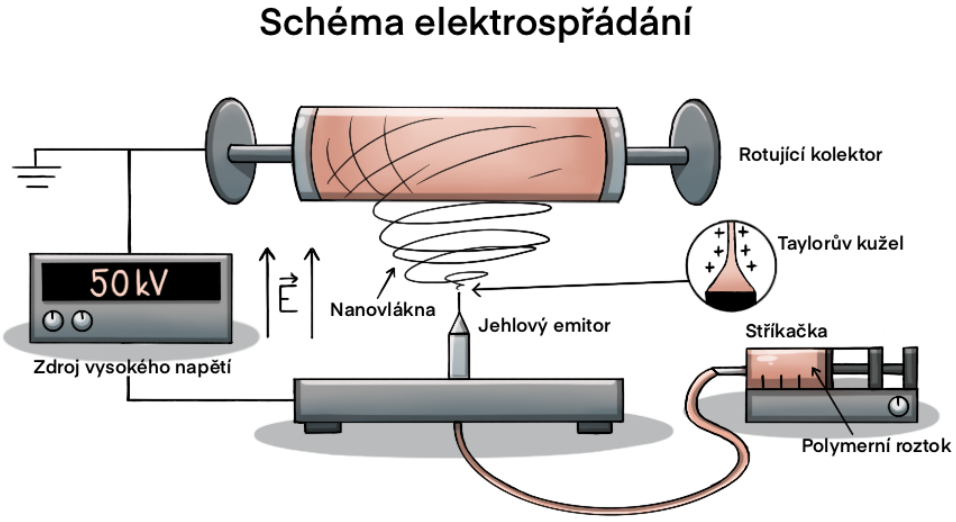
4.1 Princip elektrospřádání

Výrobní proces zahrnuje aplikaci elektrického pole o vysokém napětí na taveninu nebo roztok polymeru v rozpouštědle. Podle tvaru zvlákňovací elektrody rozlišujeme zvlákňování z jehly nebo z povrchu. V případě obou metod se vytlačená kapka polymerního roztoku nebo taveniny pod vlivem elektrostatického pole deformuje do tvaru

Taylorova kužele. Po překonání kritické hodnoty intenzity pole dochází k vytrysknutí, kdy je utvořen proud nabitého polymeru putující z emitoru směrem k uzemněnému kolektoru, což vede k tvorbě vláken. Elektricky nabitý proud polymeru je urychlován a díky odpařování rozpouštědla napínán a ztenčován [24, 33]. Takto formovaná vlákna jsou nejčastěji chaoticky přitahována buď na deskový kolektor nebo navíjena na válec, kde se neorganizovaně zachytí již v suchém stavu.

4.1.1 Zvlákňování z jehly

Elektrostatické zvlákňování na bázi emitoru ve formě jehly tvoří základní uspořádání, kdy vybraným emitorem připojeným k držáku protéká roztok stanovenou průtokovou rychlostí a v ideálním případě díky působení elektrostatického pole tvoří Taylorův kužel viz obr. 4.1. Pro tato uspořádání je používaný roztok uchováván v uzavřeném zásobníku a pomocí stříkačky je čerstvé množství roztoku vháněno do jehly. Tyto systémy na bázi jediného jehlového emitoru nabízejí jednoduchou kontrolu nad rychlostí zvlákňování roztoku a při dostatečné rychlosti poskytují nanovlákna o nízké variabilitě v jejich průměru. Pro svou nízkou výtěžnost se hodí převážně pro výzkumné účely, avšak nabízí také různé modifikace vedoucí k uplatnění v široké škále aplikací. Za účelem zvýšení produkce nanovláken se využívají metody s větším počtem jehlových emitorů. Mezi významné modifikace s větším počtem jehel patří např. koaxiální elektrospřádání využívající jehlu v jehle pro tvorbu dutých vláken, které dále mohou být vnitřně funkcionalizovány.



Obr. 4.1: Schéma výroby nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování za použití jediné jehly jako emitoru a rotujícího válce jako kolektoru s ukázkovým napětím.

4.1.2 Zvlákňování z povrchu

Uspořádání pro bezjehlové elektrospřádání standardně představuje otevřenou nádobu naplněnou polymerním roztokem, ve kterém se otáčí částečně ponořený válec, a na němž se tvoří tenký film daného roztoku. Na povrchu válce v místě největší intenzity elektrostatického pole se spontánně tvoří mnohočetná ohniska Taylorových kuželů dávající vznik separátním proudům polymeru. Mezi největší výhody bezjehlové metody patří nemožnost ucpání přítokových systémů a produkce velkého množství nanovláken za krátký čas, což umožňuje nepřetržitý provoz o vysokém výkonu. Na druhou stranu však také neumožňuje jemné řízení parametrů výroby, které nabízí metody na bázi jehly a výroba také silně závisí na intenzitě elektrostatického pole táhnoucího roztok, což se promítá do nutnosti použití výrazně vyšších napětí. Konstantní odpařování z povrchu roztoku ovlivňuje reprodukovatelnost morfologie vláken vzorku a může vést k celkové nehomogenitě tloušťky materiálu. Zvlákňování z povrchu nemusí být nejúčinnější metodou pro generování složitých struktur jako jsou koaxiální, víceosově uspořádaná nebo vícevrstvá nanovlákna.

4.2 Typy nanovlákenných struktur pro TI

Jak již bylo zmíněno, nanovlákenné nitě se typicky v procesu elektrospřádání shromažďují do netkané neuspořádané membrány. Přirozená kost má však výrazně anizotropní vlastnosti projevující se vysoce orientovanými vlákny ECM a uspořádanými kostními buňkami. Prostřednictvím určitého zarovnání nanovláken může být modulována buněčná morfologie usazených buněk, která dále ovlivňuje mezibuněčnou komunikaci a celkovou funkci tkáně. Tato modulace se na vyrovnaných vláknech při kultivaci buněk projevuje extenzí cytoskeletu a jádra buněk, které se při růstu vyrovnají a prodlouží ve směru vláken. Proto se má za to, že uspořádaná a usměrněná mikroarchitektura tkáňového nosiče je nezbytná pro co nejpřesnější napodobení nativní struktury ECM kostní tkáně [32].

Kromě 2D nanovlákenných membrán zarovnaných v jedné ose jsou pro potřeby KTI zkoumány také radiálně či spirálovitě zarovnaná nanovlákna vhodná např. pro napodobení tvrdé pleny mozkové. Výrazně složitější organizované vláknité struktury mohou představovat elektrospřádané 3D nanovlákenné sítě (matrice) s vysoce četnými a vzájemně propojenými póry a řízeným zarovnáním, které jsou potenciálně schopny ve větším měřítku vyplnit objem kostního defektu [32]. Inspirováni hierarchickými strukturami kostní tkáně M. Deng a jeho spolupracovníci navrhli a úspěšně zkonstruovali 3D biomimetický tkáňový nosič pomocí soustředného smotávání elektrospřádaných nanovlákenných listů s otevřenou centrální dutinou pro napodobení jednotlivých vrstev kosti [34].

Obecně je to právě typ kolektoru, který má rozhodující vliv na tvar tkáňového nosiče. Kolektory ve formě určitých vzorovaných ploch či šablon (např. zvlněná destička) determinují uspořádání, které budou nanášená vlákna zaujímat a výsledný tvar připravené struktury. Tyto kolektory jsou obvykle navrženy pomocí programu CAD. Pro specifické aplikace bylo navrženo mnoho různých tvarů šablon jako jsou např. mřížky, struktury napodobující včelí plástev či trubice. V důsledku rychlého tuhnutí proudu polymeru po opuštění emitoru a elektrostatické přitažlivosti mezi vlákny na uzemněném kolektoru a nabitými tryskami emitoru může elektropřádaná struktura z určitých materiálů růst směrem k nabitým tryskám a tvořit 3D struktury s tloušťkou dosahující i více než 10 cm. Dalším typem kolektoru může být kolektorová koagulační lázeň, kde dochází ke sběru vláken za pomoci kapaliny. Důležitým aspektem, který je třeba u tohoto kolektoru zvážit, je povrchové napětí daného roztoku, jelikož lázně s nízkým povrchovým napětím vytvářejí z vláken neuspořádané rozvolněné struktury. Naopak roztoky s vysokým povrchovým napětím se svým chováním víceméně podobají tradiční kolektorové sběrné desce. Vlákna jsou tedy shromažďována na povrchu roztoku a tvoří hustou pevnou strukturu. Mezi nová vylepšení tradičních postupů elektrospřádání patří využití pohyblivého x-y translačního kolektoru podobného tomu, který je využíván při standardním 3D biotisku [35].

4.3 Parametry výrobního procesu

V oblasti volby parametrů v procesu elektrospřádání se literatura zabývá především vlivem na morfologii vláken, jejich průměr a míru tvorby β-fáze. Mezi tyto hlavní parametry patří koncentrace polymeru v roztoku, jeho vodivost, typ a vlastnosti rozpouštědla, použité napětí, průtok roztoku, typ kolektoru atd.

4.3.1 Vlastnosti roztoku

Průměr nanovláken se zvyšuje s rostoucí koncentrací (užitečné rozpětí 10–25 %) a molekulární hmotností (běžně 275,000 nebo 534,000 $g \cdot mol^{-1}$) polymeru v roztoku s rozpouštědlem v důsledku vyšší viskozity a silnějších intermolekulárních interakcí. Při nízkých koncentracích se místo souvislých vláken tvoří pouze struktury připomínající korálky na provázku. Optimální vodivost roztoku zajišťuje samotné natahování vláken v elektrostatickém poli, kdy nevodivé ani příliš vodivé roztoky nemohou být zvlákňovány. Výběr vhodného rozpouštědla je rozhodující také pro výsledný tvar vláken, tedy pro vytvoření hladkých souvislých vláken bez defektů. Těkavá rozpouštědla s nízkým bodem varu a rychlou rychlostí odpařování jsou obecně preferována, protože usnadňují dehydrataci a tuhnutí proudu polymeru. Příliš vysoce těkavá rozpouštědla s velmi nízkými body varu mohou však vést k ucpávání trysky či ke tvorbě pórů

ve struktuře samotných vláken. Na rozdíl od toho málo těkavá rozpouštědla vedou k tomu, že vlákna dopadají na kolektor mokrá a splývají v homogenní strukturu. V potaz je třeba vzít také to, že rychlost odpařování rozpouštědla ovlivňuje i transformaci α-fáze na β-fázi, takže volba kombinace rozpouštědel výrazně závisí na konkrétní aplikaci [24, 36]. K rozpuštění např. PVDF se používají hlavně jednoduchá polární rozpouštědla, jako je dimethylacetamid, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a N-methyl-2-pyrrolidon, nebo binární směs těchto rozpouštědel s acetonem. Přidání malého množství acetonu vede k adekvátnímu zvýšení těkavosti rozpouštědla pro optimální tvorbu β-fáze [37].

4.3.2 Zvlákňovací napětí

Morfologii nanovláken je možné ovlivnit pracovními parametry zvoleného přístroje. Zvýšení použitého zvlákňovacího napětí (běžně užívané jednotky až desítky kV) vede ke zvětšení elektrostatických sil, které jsou zdrojem napínání proudu polymeru. Střední hodnota průměru vláken se zmenšuje se zvyšujícím se napětím až po jeho kritickou hodnotu, kdy proud začne být nestabilní a na kolektoru se tvoří neuniformní vlákna opět většího průměru. Elektrospřádání za vyšších hodnot napětí také orientuje dipóly chemických řetězců piezoelektrických polymerů, což umožňuje změnu α-fáze na β-fázi, ale při překročení kritické hodnoty opět dochází k převaze tvorby α-fáze. V závislosti na daných experimentálních podmínkách, existují různé optimalizované hodnoty zvlákňovacího napětí, což ukazuje na absenci jednoduché úměrnosti. Stanovení optimálních hodnot pro generování Taylorova kužele a řízení tvorby vláken s žádoucím obsahem β-fáze je proto výzvou [37].

4.3.3 Provoz kolektoru

Jak typ kolektoru ovlivňuje strukturu tkáňového nosiče bylo již zmíněno v předchozí sekci, avšak stojí za zmínění i parametry jeho provozu pro dosažení usměrněné struktury. Uspořádání a orientace výsledných nanovláken může být nejjednodušeji modulována při využití rotujícího válcového kolektoru změnou rychlosti jeho rotace. Usměrnění nanovláken při elektrospřádání se zvětšuje s rostoucí rychlostí rotace. Z existujících studií je zřejmé, že rychlost rotace pod 1000 ot./min je relativně nízká pro dosažení žádoucího zarovnání, a proto se pro vysoce usměrněná nanovlákna standardně využívá rychlostí 2000–2500 ot./min. Zvýšení rychlosti otáčení také zvyšuje tvorbu β-fáze, snižuje průměr vláken, avšak i celkovou poréznost nosiče. Za běžně užívanou vzdálenost kolektoru od emitoru se považují jednotky až desítky cm [24].

4.3.4 Průtok emitorem

Pro získání a udržení stabilního Taylorova kužele při jakémkoli použitém napětí je vyžadována optimální a hlavně stabilní hodnota průtoku emitorem. Stabilní průtok do jisté míry zabraňuje nadměrné tvorbě defektů, zejména zhuštěných kuliček, a s nárůstem jeho hodnoty se zvyšuje i střední hodnota průměru nanovláken. Užívaný rozsah běžně v desetinách až desítkách ml/h, kdy konkrétní hodnoty závisí na celkové konfiguraci (viskozita roztoku apod.) a jejich vliv na tvorbu β-fáze je stále předmětem výzkumu a diskuze [37].

4.3.5 Teplota pracovního prostředí

Ve výzkumné práci Lanceros-Mendéze a jeho spolupracovníků [38] byl prokázán také vliv teploty pracovního prostředí a roztoku na obsah krystalických fází v nanostrukturách. Z jeho práce vyplývá, že k vysokému obsahu β-fáze značně přispívá samotné makromolekulární natahování chemického řetězce při tvorbě vláken v procesu elektrospřádání a tohoto efektu lze optimálně docílit při odpařování rozpouštědla za pokojové teploty. Jak se teplota zvedá, obsah β-fáze se zvyšuje, avšak pouze do pokojové teploty 25 °C, kde dosahuje optima. Při metodách jako je tavení a rekrystalizace materiálu za teplot pracovního prostředí nastavených na 210 °C, nebo při elektrospřádání nad 45 °C byl pozorován velmi nízký obsah β-fáze [24, 38].

5 Návrh a výroba tkáňového nosiče

Cílem dosavadního snažení bylo poskytnout hlubší pochopení metod tkáňového inženýrství a úskalí, kterým tento interdisciplinární obor čelí. Pro splnění základních kritérií konstrukce tkáňových nosičů pro použití v KTI byly prozkoumány různé typy materiálů a technologií výroby, které poskytují uspokojivé výsledky, avšak pro dosažení pokročilých funkčních a stimulačních vlastností jako je např. schopnost osteoindukce, je potřeba stále vyvíjet nové inovativní postupy. Porovnání všech možných kombinací materiálů, metod výroby a povrchových úprav tkáňového nosiče je však nad rámec možností jediné výzkumné práce.

Navazující práce je založena na posouzení adaptability série vzorků elektrospřádaných nanovláken ze zvoleného materiálu pro konstrukci tkáňového nosiče kompatibilního s kostními buňkami, a proto se bude experimentální část zabývat pouze konstrukcí a zkoumáním těchto nanostruktur. Hlavním cílem je zkonstruovat netoxickou opěrnou strukturu, na které buňky přežijí, vhodně se začlení do nosiče a budou prosperovat. Materiál je volen dle mnoha dalších parametrů mimo biokompatibilitu, např. dle schopnosti osteoindukce skrze piezoelektrický jev, kdy však pro posouzení základní adaptability budou zkoumány především morfologické, strukturní a interakční vlastnosti vzorků tkáňových nosičů.

5.1 Volba nosného materiálu

Dle předešlé literární rešerše má pro konstrukci nanovlákenného tkáňového nosiče metodou elektrospřádání velký potenciál právě piezoelektrický PVDF. Jak již bylo řečeno, jedná se o biokompatibilní syntetický polymer, který vykazuje významné mechanické i osteoindukční vlastnosti a jeho roztok je vhodný pro elektrospřádání. Elektrostatické zvlákňování je účinnou a lehce nastavitelnou metodou, pomocí které lze vytvořit porézní a flexibilní PVDF nanovlákenný materiál s vysokým obsahem β-fáze a se zarovnáním molekulárních dipólů podél směru aplikovaného napětí.

Pro výrobu tkáňového nosiče je roztok zvlákňován při pokojové teplotě pomocí zařízení 4SPIN (Contipro, Dolní Dobrouč, CZE) za využití jediné jehlové trysky jako emitoru a rotujícího válce jako kolektoru pokrytého hliníkovou folií, díky čemuž se vytvořená tenká vrstva nanovlákenného materiálu jednodušeji sejme. Parametry výrobního procesu jsou pro jednotlivé vzorky zvoleny dle stávajících poznatků a jsou primárně odvozeny z vědeckých prací autorů Li Yuchao [24], Černohorský Petr [39], He Zhongchen [37] a jejich spolupracovníků.

Na základě těchto vědeckých prací je použit 20% roztok PVDF (Sigma-Aldrich, St. Loius, USA) s molekulární hmotností 275 000 $g \cdot mol^{-1}$. PVDF je rozpuštěn v dimethylsulfoxid-acetonu připraveném v poměru 7:3. Výsledná směs je před použitím zahřívána po dobu 24 hodin na míchadle při teplotě 80 °C a rychlosti 200 ot./min.

5.2 Volba kostních buněk

Existuje řada buněčných linií, které lze použít pro účely inženýrství funkční tkáně. Volba vhodných buněk záleží primárně na typu tkáně, do které tkáňový nosič má být integrován, tedy v případě stimulování regenerace kostní tkáně je první volbou linie lidských osteoblastů derivovaných z kmenových buněk.

Biokompatibilita testovaných materiálů a míra buněčná adheze je však nejčastěji v raných stádiích výzkumu zkoumána pomocí buněčných linií osteosarkomu namísto zmíněných osteoblastů. Hlavními důvody je nižší pořizovací cena, snadnější kultivace a údržba buněk z důvodu toho, že díky mutacím z nich lze jednodušeji vytěžit větší množství buněk. Osteosarkomatické buňky jsou dostupné v řadě buněčných linií s vzájemně se lišícími mutageny, které ovlivňují jejich morfologii, mitotickou rychlost, profil exprese či mineralizační aktivitu a mnohé jiné. Mimo do jisté míry odlišené chování je jejich dalším problémem patologický fenotyp. Při studiu buněčných a materiálových interakcí však stále není zcela jasné, do jaké míry významnosti se maligní buňky liší svým chováním od nemutovaných osteoblastů [40].

Buněčná linie lidského osteosarkomu Saos-2 (ATCC® HTB-85™) (Manassas, Virginie, USA) byla v roce 1975 izolována z národové kostní tkáně 11leté bělošské dívky. Činnost buněk Saos-2, tedy exprese cytokinů, růstových faktorů či struktura syntetizovaného kolagenu, je vysoce podobná činnosti osteoblastů. Díky tomu je linie Saos-2 považována za nejreprezentativnější buněčný model používaný ke studiu interakcí v tkáňových nosičích, který poskytuje výhody rychlé a jednoduché kultivace [40]. Pro tuto práci jsou proto dle výše uvedených poznatků použity právě buňky Saos-2.

5.3 Výroba nanovláken

Z předchozího výzkumu [41] jsou odvozeny optimální parametry procesu elektrospřádání na zařízení 4SPIN pro zvolenou aplikaci v KTI viz tab. 5.1, které se pro dané sady vzorků liší pouze v rychlosti otáčení válcového kolektoru. Jak již bylo zmíněno, rychlost otáček ovlivňuje celkové uspořádání a usměrnění nanovláken v materiálu, a přispívá i k míře výsledné poréznosti tkáňového nosiče, která představuje jeden z nejdůležitějších faktorů udávajících adaptabilitu tkáňového nosiče pro buněčné osídlení. Očekává se, že materiálem s moc velkými póry buňky propadnou na podsadu

a neuchytí se, a na materiálu s moc malými póry může být omezený prostor pro růst buněk, infiltraci do hlubších vrstev či difúzi plynů a živin. Výroba takto odlišných sad poslouží k posouzení vhodného nastavení a významnosti zkoumaného parametru.

Konfigurace	**Sada 1**	**Sada 2**
Roztok	20 % PVDF 275 DMSO/AC	20 % PVDF 275 DMSO/AC
Typ kolektoru	rotující válec s Al folií	rotující válec s Al folií
Typ emitoru	1 jehla	1 jehla
Průtok emitorem	35 µL/min	35 µL/min
Vysoké napětí	50 kV	50 kV
Vzdálenost elektrod	20 cm	20 cm
Otáčky kolektoru	300 ot./min	2000 ot./min
Objem stříkačky	10 mL	10 mL
Teplota prostředí	24 °C	24 °C
Vlhkost prostředí	30 %	30 %

Tab. 5.1: Parametry výroby 2 nanovlákenných materiálů metodou elektrospřádání lišící se nastavením rychlosti otáčení válcového kolektoru. Oba materiály jsou rozstříhány na jednotlivé vzorky a tvoří sadu 1 a 2.

5.4 Povrchová modifikace plazmou

Ošetření plazmou je jednou z nejrozšířenějších metod modifikace povrchových vlastností polymerů, jelikož plazma představuje vysoce reaktivní chemické prostředí schopné funkcionalizace širokého spektra materiálů. Modifikace plazmou je vhodná pro zvýšení povrchové energie, smáčivosti, adhezní pevnosti a také čištění či leptání prostřednictvím nevratných reakcí v povrchových vazbách vystavených plazmatu. Adekvátní volbou zdroje ionizace, použitého plynu a času působení lze získat povrchy se specifickými vlastnostmi šitými na míru konkrétním aplikacím.

Dle použitého zařízení může ošetření plazmou probíhat buď při atmosférickém tlaku nebo v případě zvoleného přístroje NANO Plasma Cleaner (Diener electronic, Ebhausen, DEU) v uzavřené komoře, ze které je vyventilován vzduch. Komora je naplněna přivedeným plynem, který je zdrojem elektrické energie ionizován, čímž vzniká reaktivní plazma. V biomedicínských aplikacích se obvykle využívá Ar a O_2, jejichž hlavní rozdíl představuje mechanismus povrchové aktivace, kdy použití Ar plazmy vede převážně k fyzickému leptání, avšak O_2 plazma zvyšuje povrchové napětí materiálu skrze odstranění kontaminantů a zavedení polárních molekul.

Z rešerše [42, 43] vyplývá, že je povrchová modifikace PVDF nanovláken plazmou žádoucí vzhledem ke zlepšení adhezních vlastností, což se také projevuje větší mírou smáčivosti materiálu v důsledku např. zavedení kyslíku do vazeb a uvolnění fluoru (defluorace pro snížení hydrofobicity). Aplikace O_2 a Ar plazmy na různé polymerní substráty přinesla slibné výsledky při podpoře buněčného růstu. Ošetření plazmou obvykle vede vzhledem k jejímu druhu, době působení a výkonu do jisté míry k degradaci povrchu polymeru. Degradační proces je doprovázen štěpením molekulárních řetězců, zavedením funkčních skupin a tvorbou volných radikálů, které aktivují povrch polymeru (reakce s funkčními skupinami, radikálová polymerace, změna povrchové energie aj.), což je v rámci funkcionalizace povrchu žádoucí.

Vzhledem k nabytým poznatkům je provedena úprava části vzorků dle prací M. Kitsara [43] a D. M. Correia [42] a jejich spolupracovníků pomocí O_2 plazmy, Ar plazmy nebo O_2 + Ar plazmy po dobu 2 min s výkonem 200 W nebo po dobu 10 min s výkonem 300 W. Výsledné vzorky připravené pro analýzu a osídlení buňkami jsou seřazené v tab. 5.2.

Číslo vzorku	**Modifikace**	**Druh plynu**	**Čas [min]**	**Výkon [W]**
1.1	Ne	–	–	–
2.1	Ne	–	–	–
2.2	Ano	O_2	2	200
2.3	Ano	Ar	2	200
2.4	Ano	O_2 + Ar	2	200
2.5	Ano	O_2	10	300
2.6	Ano	Ar	10	300
2.7	Ano	O_2 + Ar	10	300

Tab. 5.2: Řazení připravených vzorků nanovláken pojmenovaných dle formátu "sada.vzorek". Posouzen bude vliv rychlosti otáčení kolektoru při výrobě sady 1 a 2, a dále bude prozkoumán vliv procesu povrchové úpravy vzorků ze sady 2 plazmou. Tyto vzorky se liší druhem použitého plynu, výkonem a dobou ošetření.

5.5 Osídlení nosiče buňkami

Procesy buněčné kultivace a samotné manipulace s buňkami jsou provedeny na základě předchozího výzkumu, obecných kultivačních protokolů [44] a odborných konzultací, primárně dle práce Z. Fohlerové a jejích spolupracovníků [45].

Růst buněk je pravidelně kontrolován pod mikroskopem a při dostatečném namnožení a vyčerpání živného média a je část buněk odebrána a přenesena do nové

kultivační nádobky s čerstvým živným roztokem. Tento proces se nazývá pasážování a ve zkratce zahrnuje odstranění starého média, proplach pomocí PBS, přidání rozředěného trypsinu pro uvolnění buněk od povrchu nádobky, inhibici enzymu opětovným přídavkem média a centrifugaci pro vytvoření peletu buněk na dně zkumavky. Následně lze aplikovat metody pro počítání buněk, oddělit určité množství pro experimenty, či rozdělit buňky do nových živných médií.

Kultivační médium DMEM (Corning, New York, USA) doplněné 10% fetálním bovinním sérem (Corning, New York, USA) a kombinací antibiotik ve formě 5% roztoku penicilinu a streptomycinu (50 UI $\cdot$ ml^{-1} a 50 g $\cdot$ ml^{-1}) je použito k údržbě získaných buněk Saos-2. Buňky jsou skladovány v kultivační lahvičce pro adherující buňky s filtračním víčkem při teplotě 37 °C v inkubátoru se zvlhčeným vzduchem a 5% CO_2. K extrakci buněk slouží proces trypsinizace pomocí 0,25% roztoku trypsin-EDTA. Buňky jsou na vytvořené sterilní vzorky (UV sterilizační boxy) elektrospřádaných PVDF nanovláken předem hydratovaných živným médiem nasazeny v hustotě 1×10^3 buněk/ml a jsou uloženy do inkubátoru na 24 hodin. Paraformaldehydem fixované buňky jsou permeabilizovány roztokem 0,5% Triton–X 100 a 2% hovězího sérového albuminu, což umožňuje průnik barviv do buněk. Následně jsou buňky důkladně promyty v deionizované vodě a obarveny pomocí DAPI pro vizualizaci jader a FITC pro zobrazení buněčné membrány. Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich.

6 Metody pro základní výzkumnou analýzu

Vlastnosti připravených vzorků nanovláken je nutno popsat vhodnými zobrazovacími metodami a fyzikálními měřeními, aby bylo možné posoudit, zda jsou elektrospřádaná nanovlákna z PVDF schopna podporovat usazené buňky a jaký mají jejich konkrétní parametry na ně vliv. V této kapitole budou shrnuty metody pro základní výzkumnou analýzu a nastavění konkrétních měření.

6.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Prostředkem pro základní topografickou, morfologickou a kompoziční analýzu tkáňového nosiče je zvolena skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Jedná se o metodu mikroskopie, která využívá úzkého svazku elektronů pohybujícího se postupně po vzorku. Díky velmi krátkým vlnovým délkám elektronů je možné získat obraz o mnohem vyšším rozlišení než při optické mikroskopii.

Svazek elektronů vycházející z děla aktivuje emisi primárních rozptýlených elektronů na vysokých energetických hladinách, které pochází z hloubky materiálu a umožňují získat data vypovídající o jeho kompozici. Z prostředí těsně pod povrchem pochází sekundární emitované elektrony o nižší energii poskytující informace o povrchové struktuře. Když elektrony interagují s povrchem, jsou také vzhledem k vyražení elektronů z orbitalu a zaplnění děr po nich emitovány paprsky X nesoucí informaci o prvkovém složení. Když emitované elektrony vstoupí do detektoru, narazí na scintilátor, který vyzařuje světelné záblesky po dopadu nabité částice. Tyto záblesky se ve fotonásobiči přemění na elektrický proud a vyšlou signál do katodové trubice, kde následně vzniká obraz, který je možné si prohlížet a zaznamenávat.

Pozorování jsou prováděna na mikroskopu LYRA3 (Tescan, Brno, CZE) pomocí SE detektoru pro povrchovou analýzu, s urychlovacím napětím elektronů 2 kV, s pracovní vzdáleností 9 mm a daným zvětšením a zorným polem, nebo pomocí připojeného EDS detektoru X-Max 50 (Oxford Instruments, Oxford, GBR) sloužícího k chemické analýze s urychlovacím napětím elektronů 5 kV.

6.1.1 Potažení vodivým filmem

Pro bezproblémové zobrazení pomocí SEM je nutné potažení povrchu nevodivých vzorků citlivých na elektronový svazek tenkou vrstvou vodivého materiálu. Povlak zabraňuje hromadění elektrického náboje na povrchu a fixuje nanovlákna během pozorování. Bez povlaku by bylo zaměření a skenování při velkém zvětšení obtížné. Pro potažení vzorků tenkou vrstvou zlata nebo uhlíku byl použit přístroj Coater EM ACE600 (Leica Microsystems, Wetzlar, DEU).

6.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie představuje efektivní a nedestruktivní metodu analytické chemie, která poskytuje informace o vibračních přechodech v molekulách, což vypovídá o chemickém složení, molekulárních interakcích či krystalických fázích v analyzované látce. Vibrační režimy molekul jsou funkcí orientace jejich atomů a vazeb, jednotlivé atomové hmotnosti a pořadí vazeb. Nejlépe je lze modelovat za předpokladu, že pozorovaná sloučenina je složena z kuliček představujících atomy, spojených chemickými vazbami z pružin, přičemž je zřejmé, že vstup energie do sloučeniny způsobí, že jednotlivé molekuly budou vibrovat, dle jejich charakteristických vlastností.

Molekula analyzované látky po ozáření laserem absorbuje budící foton, čímž je excitována z počátečního stavu do virtuálního vyššího energetického stavu. Při relaxaci molekula emituje foton a dostane se do koncového klidového vibračního stavu, který není totožný s počátečním stavem molekuly (Stokesůs rozptyl). Určitá menší část molekul se už před interakcí s budícím fotonem může nacházet na excitované vibrační hladině, kdy se takové molekuly po absorpci fotonu vrací na jejich základní vibrační hladinu (anti-Stokesůs rozptyl). Tyto dva druhy rozptylu nesoucí analytickou informaci pod sebou sdružuje termín Ramanův rozptyl.

Rozdíl mezi počátečním a koncovým energetickým stavem molekul vede k posunu frekvence emitovaných fotonů od excitační frekvence budících fotonů (Ramanův posun). Rozptýlené fotony jsou detekovány a na základě měřitelné změny jejich frekvence je prováděna kvalitativní analýza vzorku. Ramanovo spektrum popisuje intenzitu Ramanova rozptylu v závislosti na Ramanově posunu, kdy jednotlivé píky ve spektru odpovídají určité vibraci molekul ve vzorku, jelikož každá molekula či funkční skupina má své charakteristické hodnoty energií vibračních hladin.

Tři hlavní krystalické fáze studovaných PVDF nanovláken jsou identifikovány z Ramanova spektra pomocí přístroje WITec Alpha 300R (WITec, Ulm, DEU). Při spektroskopii je použit zelený laser o vlnové délce 532 nm a výkonu 6 mW. Počet akumulací byl 10 při integrační době 10 s za použití objektivu se zvětšením 50×.

6.3 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (zkr. FTIR) je vysoce přesná spektroskopická metoda pro analýzu absorpčních vlastností materiálů při různých vlnových délkách, resp. frekvencích, infračerveného světla. Atomy v chemických sloučeninách se neustále pohybují a různě vibrují. Každá z pro látku charakteristických vibrací probíhá s jinou frekvencí, která je pro dané chemické vazby, sloučeniny či krystalické fáze zkoumané látky jedinečná. Díky tomu, že tyto vibrační frekvence

odpovídají frekvencím infračerveného světla, mohou chemické sloučeniny příslušné frekvence při ozáření absorbovat.

Paprsek infračerveného světla je generován širokopásmovým zdrojem světla, tudíž obsahuje celé spektrum vlnových délek. Paprsek vstupuje do specifické konfigurace zrcadel, Michelsonova interferometru, z nichž jedno se pohybuje pomocí motoru. Jak se toto zrcadlo pohybuje, každá vlnová délka světla ve svazku vstupujícím do vzorku je interferometrem periodicky blokována a propouštěna v důsledku interference paprsků odražených od zrcadel. Nejprve je pro jednotlivé vlnové délky změřeno emisní spektrum širokopásmového zdroje infračerveného světla (spektrum pozadí), a poté je zaznamenáno emisní spektrum daného zdroje světla svítícího přes vzorek (spektrum vzorku). Rozdíl těchto odlišných spekter udává kolik světla bylo absorbováno vzorkem.

Pro analýzu je nutné počítačové zpracování, aby se surová data, tedy interferogram představující absorpci světla pro každou polohu zrcadla, změnila na absorpci světla pro každou vlnovou délku vyjádřenou ve spektru pomocí její převrácené hodnoty v reciprokých cm. Klíčovým nástrojem je proto algoritmus využívající Fourierovy transformace sloužící k dekompozici funkce do jejích frekvenčních komponentů. Často je v kontextu FTIR reciproční délka 1 cm^{-1}, resp. vlnové číslo, chápáno jako energetická jednotka rovnající se energii absorbovaného fotonu o vlnové délce 1 cm.

K měření je použit přístroj FTIR Vertex 70s (Bruker, Billerica, USA) se 4 mm štěrbinou. Výsledné spektrum představuje rozdíl spektra vzorku, průměru z 16 skenování vzorku, a spektra pozadí, dle standardů průměru z 32 skenování bez vzorku. Po ukončení měření je provedena softwarová korekce izolinie spektra a převrácení pro zisk absorbance místo transmitance. Rozsah původního spektra 8000–300 cm^{-1} je zkrácen na užitečné spektrum 1700–300 cm^{-1}.

6.4 Měření kontaktního úhlu kapaliny

Kontaktní úhel θ je popsán mírou smáčení pevné látky kapalinou a je geometricky definován jako úhel, který svírá kapalina na třífázové hranici kapaliny, plynu a pevné látky. Měření kontaktního úhlu je založeno na Youngově rovnici, která předpokládá, že mezifázové síly jsou termodynamicky stabilní a představuje vztah mezi úhlem smáčení a jednotlivými mezifázovými energiemi.

Statické kontaktní úhly se měří, když je kapka usazena na povrchu vzorku a třífázová hranice se nepohybuje, a představují zdaleka nejčastější měřené formy smáčivosti. Tato měření nabízí rychlé, snadné a kvantitativní měření smáčivosti, které může sloužit k určení povrchového napětí pevného podkladu a jeho interakce s prostředím, jako je adheze. Pokud je materiál dobře smáčivý (hydrofilní), kapalina se rozprostře na povrchu a úhel bude malý, nebo se kapka zcela vsákne. Pokud je však materiál nesmáčivý (hydrofobní), kapalina zůstane ve formě kuličky a kontaktní úhel

bude velký. Pozorován může být i vliv drsnosti materiálu, kdy však míra smáčení závisí také na tom, zda kapka smáčí povrchové drážky, nebo zda mezi kapkou a povrchem zůstávají vzduchové kapsy.

K provedení měření je použito zařízení See System E (Advex Instruments, Brno, CZE) a k vyhodnocení kontaktního úhlu z fotografií slouží software See 7.0. Pomocí dávkovací mikropipety je na povrch nanovláken postupně usazeno deset kapek destilované vody o velikosti 3 µm. V $t = 4$ s je z fotografie změřen kontaktní úhel pomocí tří vybraných bodů, které spojením vytváří kružnici kopírující tvar kapky. Pro každý vzorek je výsledná hodnota kontaktního úhlu průměrem z 10 měření.

6.5 Konfokální mikroskopie

Laserový skenovací konfokální mikroskop (zkr. CLSM) je využíván k zobrazení a detailnímu rozlišení mnohobuněčných struktur i jednotlivých objektů v buňce. Za využití imunofluorescence lze specificky označit složky fixovaných i živých buněk nebo tkáňových řezů jako jsou aktinová vlákna, celá jádra či navázané biomolekuly, a poté je vizualizovat ve vysokém rozlišení, aniž by je rušila fluorescence z pozadí nebo jiných oblastí vzorku.

Namísto osvětlení celého vzorku najednou je laserové světlo skrze excitační optickou dráhu zaměřeno na definované místo v určité hloubce uvnitř vzorku skrze sérii clon, zrcadel a objektivů, kde excituje úzce osvětlené molekuly vzorku. Emitované světlo putuje zpět emisní optickou drahou do detektoru skrze další dírkovou clonu, která odřízne signály pozadí, které jsou mimo ohnisko.

Rastrovým snímáním vzorku se postupně vytvářejí obrazy jedné optické roviny. Složitější 3D objekty lze zobrazit skenováním několika rovin a jejich skládáním pomocí vhodného dekonvolučního softwaru. Je také možné analyzovat vícebarevná imunofluorescenční barvení pomocí nejmodernějších CLSM, které obsahují řadu laserů a emisních, resp. excitačních filtrů.

Interakce buněk s PVDF nanovlákny je vizualizována pomocí imunofluorescence. Obarvené buňky jsou zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss AG, Jena, DEU) s objektivy C-Apochromat 40x a Plan-Apochromat 20x, a s lasery o vlnové délce 488 nm (pro excitaci FITC [46]) a 405 nm (pro excitaci DAPI [47]). Pro softwarové zpracování a analýzu naskenovaných snímků je použit program Zeiss ZEN 3.10 LITE.

7 Analýza a diskuze

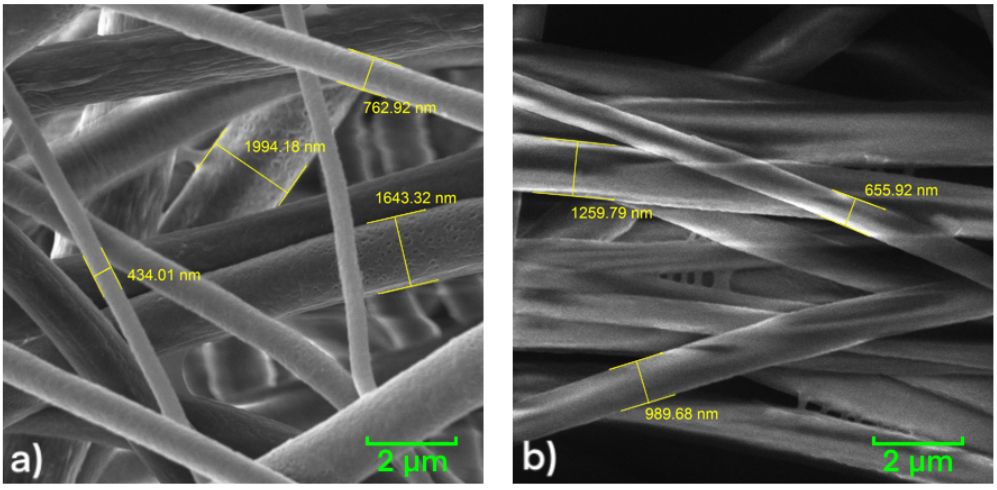
Mezi důležité faktory, které ovlivňují to, jak budou buňky na tkáňovém nosiči prosperovat, patří mimo netoxicitu materiálu také průměrná velikost pórů v nosiči, jejich distribuce a propojenost, které dohromady zajišťují infiltraci celého objemu nosiče buňkami. Pro správnou adhezi buněk je důležitá architektura nosiče, tedy průměr nanovláken a zarovnání, a také povrchová smáčivost materiálu [32, 43]. Pro využití potenciálu PVDF je také důležité posouzení obsahu piezoelektrické β-fáze [43].

Metody stručně popsány v minulé kapitole jsou použity k analýze výše zmíněných vlastností vyrobených nanomateriálů, výsledky jsou diskutovány a jsou vyvozovány závěry z hlediska adaptability nanovláken pro KTI.

7.1 Hodnocení kvality nanovláken

Proces elektrospřádání proběhl na základě dříve ověřených experimentů. Díky optimálně zvoleným parametrům výroby a vlastnostem roztoku nedošlo k ucpání trysky ani k jinému narušení zvlákňování, které by mohlo mít vliv na kvalitu výsledného materiálu. Po spotřebování objemu stříkačky byla výroba ukončena, a díky Al fólii byl materiál úspěšně sejmut z kolektoru a nastříhán na čtverce velikosti 1 × 1 cm.

Pozorování vzorků vyrobených nanovláken pro hodnocení jejich kvality je po potažení vodivou vrstvou zlata provedeno při nastavení SEM: urychlovací napětí 2 kV, pracovní vzdálenost 9 mm, zorné pole 11 µm a zvětšení 50kx.



Obr. 7.1: Snímky vzorků 1.1 a 2.1 získané SEM. Na snímku a) lze pozorovat neusměrněná nanovlákna zvlákňovaná s otáčením kolektoru 300 ot./min a na snímku b) jsou zachycena usměrněná nanovlákna zvlákňovaná s otáčením 2000 ot./min.

Při prozkoumání vzorků viz obr. 7.1 se potvrdilo, že nanovlákna byla úspěšně vyrobena bez větších tvarových nedokonalostí a působí jako hladká. Výskyt korálkových defektů se díky správnému poměru DMSO/AC ukázal být zanedbatelný.

Největším rozdílem mezi nanomateriály je dle očekávání uspořádání jednotlivých vláken, které je u vzorku 1.1 viz obr. 7.1 snímek a) velmi chaotické a vlákna jsou zkroucená a neusměrněná. Naopak na vzorku 2.1 na snímku b) lze vidět vlákna zarovnaná a natažená v relativně stejném směru. Dalším důležitým rozdílem je tloušťka vláken, která se na snímku a) výrazně mění, kdy rozdíl mezi nejširšími a nejtenčími vlákny je až 1873 nm. Na snímku b) je tloušťka jednotlivých vláken menší a konzistentnější, kdy největší rozdíl v šířce je pouze 604 nm. Vyšší rychlost otáčení vede k rovnoměrnějšímu rozložení nanovláken na povrchu kolektoru. Nižší rychlost způsobuje shlukování vláken a nerovnoměrnou distribuci s větší porézností.

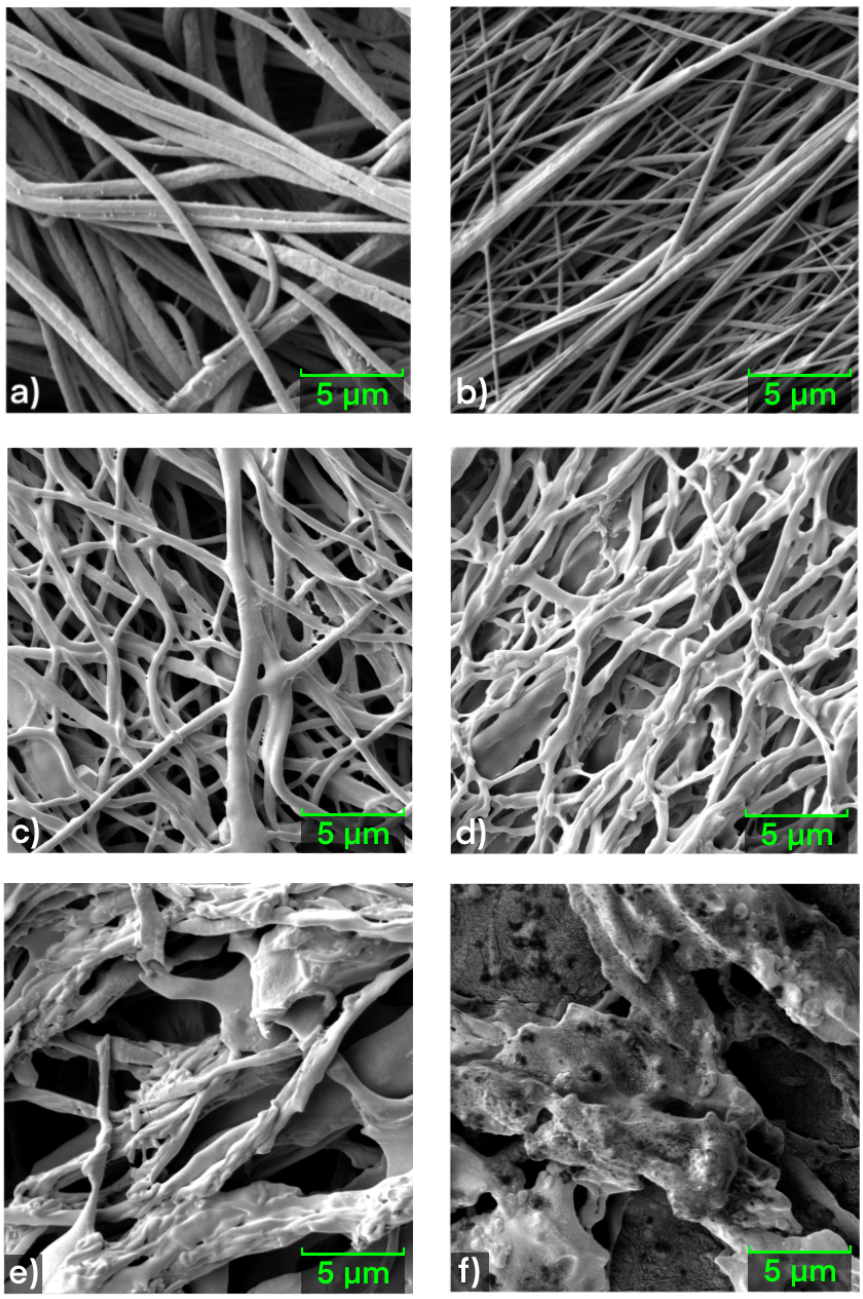
7.2 Morfologie nanovláken po ošetření plazmou

Po ošetření vybraných vzorků O_2, Ar nebo O_2 + Ar plazmou za účelem analýzy jejího vlivu na morfologii, smáčivost a poréznost nanovláken, je opět na vzorky nanesena vrstva zlata a jsou vizualizovány pomocí SEM při nastavení: urychlovací napětí 2 kV, pracovní vzdálenost 9 mm, zorné pole 19 µm a zvětšení 29kx.

Na obr. 7.2 lze na snímku a) pozorovat referenční vzorek nanovláken 2.1, který nebyl vystaven žádnému druhu plazmy, vlákna jsou tenká, hladká, oddělená a relativně usměrněná. Na snímku b) lze vidět vzorek 2.3 ošetřený Ar plazmou po dobu 2 min s výkonem 200 W, kde nedošlo k výrazné změně jak povrchu, tak usměrnění nanovláken. Nicméně, na snímku c) jsou zobrazeny nanovlákna ze vzorku 2.4, které byly vystaveny O_2 + Ar plazmě po dobu 2 min s výkonem 200 W, a u kterých došlo k pokroucení a narušení jejich povrchové struktury, což vedlo k jejich vzájemnému spojování a snižování průměrné velikosti pórů celé struktury. Podobný výsledek lze pozorovat na snímku d) s nanovlákny ze vzorku 2.2, které byly ošetřeny čistě O_2 plazmou se stejnými pracovními parametry a došlo u nich nejvýraznějším změnám v podobě kroucení, tvarové deformace a spojování, což ve výsledku ještě více snižuje poréznost a prostupnost výsledného tkáňového nosiče.

Při hodnocení nanovláken, které byly vystaveny plazmě po dobu 10 min o výkonu 300 W lze pozorovat významné degenerativní změny viz obr. 7.2 snímky e) zobrazující vzorek 2.7 a f) se vzorkem 2.5. Vzorek 2.7 byl vystaven dlouhému působení O_2 + Ar plazmy, která zcela změnila jeho morfologii z nanovláken na nízko-porézní síť deformovaných tlustších struktur vzdáleně připomínajících vlákna. U vzorku 2.5, na který takto významně působila čistě O_2 plazma, již nelze vůbec pozorovat jakákoli vlákna ani póry, ale struktura připomíná soudržnou směs různě velkých hrudek. Tyto destruktivní účinky však nelze pozorovat u vzorku 2.6 vystavenému dlouhému

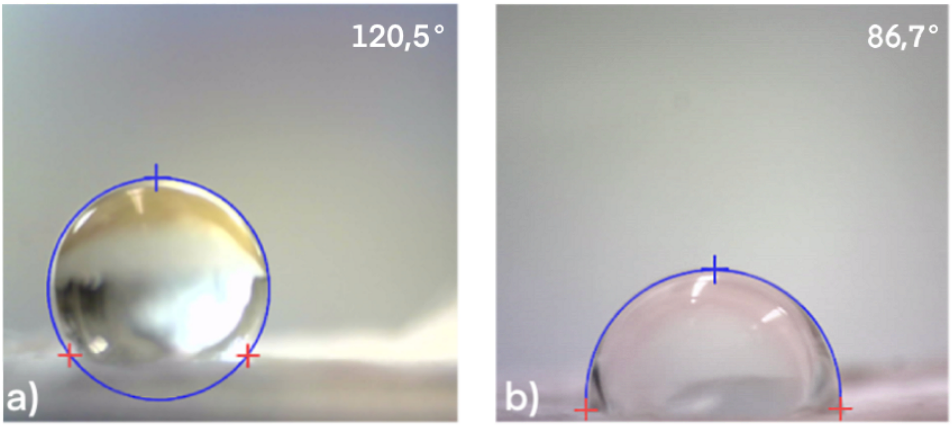
působení Ar plazmy, který se morfologicky téměř nezměnil od vzorku 2.3, resp. 2.1. Po prozkoumání vzorků 2.5 a 2.7 lze usoudit, že vlivem intenzivního ošetření O_2 plazmou již nesplňují požadavky pro porézní nanovlákenný nosič, tudíž nebudou předmětem další analýzy. Dále se nabízí otázka, jak moc ošetření plazmou ovlivnilo nejen strukturu materiálu, ale kompletně i jeho chemické a funkční vlastnosti.



Obr. 7.2: Morfologie nanovláken po ošetření plazmou při různém pracovním nastavení vizualizovaná pomocí SEM. Snímek a) je referenční, přičemž snímky b), c) a d) byly ošetřeny plazmou při nižším výkonu a době leptání, a snímky e) a f) při vyšším.

7.3 Povrchová smáčivost nanovláken

Před osazením buňkami jsou vzorky PVDF nanovláken povrchově nemodifikované i modifikované plazmou ze sady 2 vystaveny měření povrchového kontaktního úhlu kapaliny. Interval hydrofobie pro kontaktní úhel vody na povrchu pevné látky je stanoven od 90° do 150° (nad 150° superhydrofobní) a hodnoty v intervalu hydrofilie se pohybují od 0° do 90° [48]. Ukázkové snímky z provedeného měření viz obr. 7.3.



Obr. 7.3: Snímky ze zařízení See System E s využitím softwaru See 7.0 pro vyhodnocení kontaktního úhlu vody na povrchu materiálu. Ukázkové snímky zobrazují tříbodové měření, kdy na snímku a) lze pozorovat hydrofobní a na snímku b) hydrofilní chování PVDF nanovláken ve vztahu k ošetření plazmou.

Povrchový kontaktní úhel vody pro plazmou neošetřená nanovlákna ze vzorku 2.1 má průměrnou hodnotu 124,6° získanou z 10 měření v $t = 4$ s. Do uplynutí $t = 600$ s materiál neabsorboval větší množství kapaliny. Na základě těchto údajů lze plazmou nemodifikované PVDF nanovlákna klasifikovat jako hydrofobní.

Při dalších měřeních šlo pozorovat, že se u nanovláken ošetřených plazmou kontaktní úhel postupně snižuje. Pro vzorek 2.3, který byl vystavené Ar plazmě po dobu 2 min o výkonu 200 W se kontaktní úhel mírně snížil na hodnotu 122,2°, stále však v rámci hydrofobního intervalu. Vzorek 2.2 ošetřený O_2 plazmou se stejnými časovými a výkonnostními parametry nicméně vykazuje výrazné zvýšení povrchové energie, jelikož došlo ke snížení kontaktního úhlu až na průměrnou hodnotu 22,8° spadající již do hydrofilního intervalu. Usazené kapky byly pro vzorky 2.2 i 2.3 stabilní a nebyly do $t = 600$ s více absorbovány. Tento rozdíl je pravděpodobně obecně důsledkem toho, že při použití inertního Ar dochází především k fyzikálnímu leptání a čistění (větší a těžší atomy) a není výrazně pozměněna povrchová chemická struktura např. zavedením O_2 do vazeb namísto F jako u O_2 plazmy (menší a lehčí atomy). Vzorek 2.4 lze také označit za hydrofilní, jelikož u něj po vystavení O_2 + Ar plazmě

po dobu 2 min o výkonu 200 W dochází ke snížení kontaktního úhlu na průměrnou hodnotu 32,5°. Usazené kapky byly také stabilní. U vzorku 2.6 ošetřeném Ar plazmou po dobu 10 min o výkonu 300 W dochází k okamžité absorpci usazených kapek vody, lze tedy tomuto vzorku přiřadit nulovou hodnotu kontaktního úhlu a označit jej jako hydrofilní. Závěry z měření jsou shrnuty v tab. 7.1.

Číslo vzorku	**Kontaktní úhel [°]**	**Charakter smáčení**
2.1	124,6	hydrofobní
2.2	22,8	hydrofilní
2.3	122,2	hydrofobní
2.4	32,5	hydrofilní
2.6	0	hydrofilní

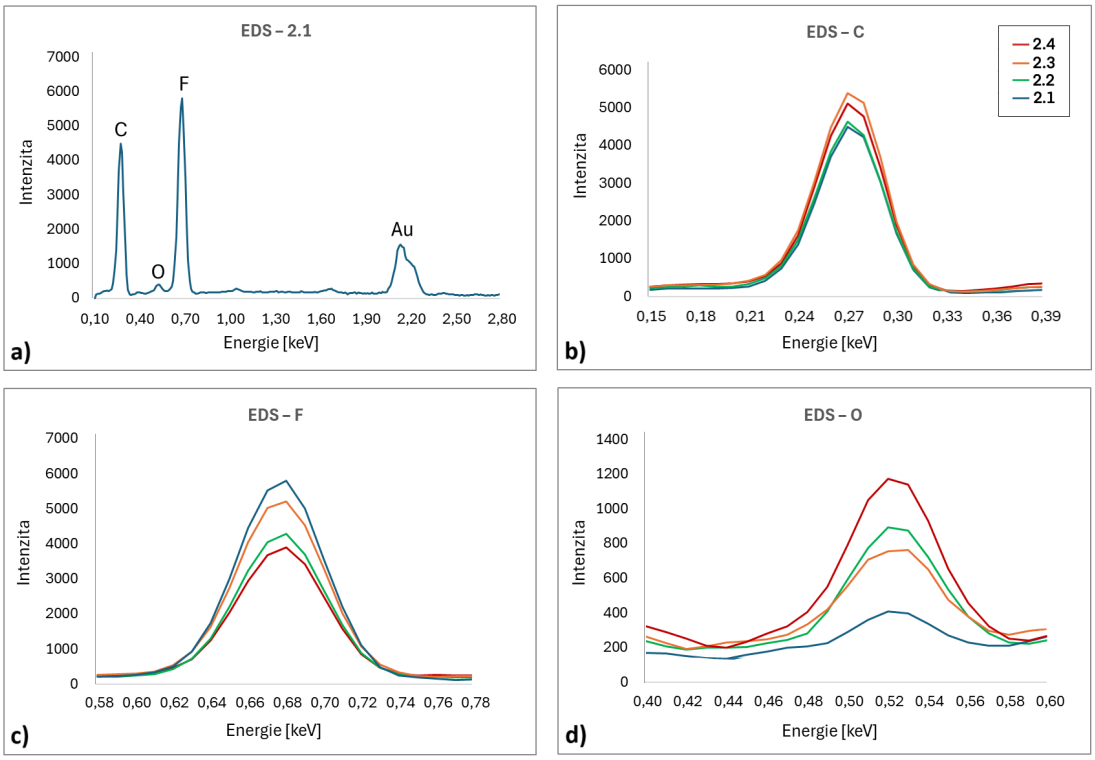
Tab. 7.1: Shrnutí průměrných hodnot povrchového kontaktního úhlu vody pro jednotlivé vzorky ze sady 2 se závěrem o charakteru smáčení daných nanovláken, tedy o jejich hydrofilních, resp. hydrofobních vlastnostech.

7.4 Chemická charakterizace tkáňového nosiče

Metoda EDS je provedena pro kvalitativní (zastoupení prvků) a kvantitativní analýzu (množství jednotlivých prvků a jejich poměr) vzorků nanovláken 2.1–2.4 a 2.6 pro potvrzení chemického složení nemodifikovaného referenčního vzorku a porovnání vlivu ošetření plazmou na množství zastoupených prvků vyjádřené v hmotnostních procentech, resp. v poměrech. Přepočet na atomová procenta není v tomto případě nutný vzhledem k tomu, že rozdíl v relativní atomové hmotnosti vyskytujících se prvků je zanedbatelný. EDS spektrometr je součástí sestavy pro SEM a jsou pro něj využity snímky při urychlovacím napětí 5 kV.

Vizualizovaná spektra jsou vhodná spíše pro identifikaci prvků a přibližný odhad jejich množství prvků v měřených vzorcích, ale nelze z vykreslené intenzity naměřeného signálu přímo odečítat hodnoty a dle nich vyhodnocovat koncentraci prvků. Prvky přítomné ve velkých množstvích (>10 %) budou tvořit dominantní vysoké píky ve spektru, zatímco prvky přítomné v minoritních (1–10 %) nebo stopových množstvích (<1 %) budou mít malé nebo nedetekovatelné píky, avšak nejsou zcela proporční ke koncentraci. Kvantitativní analýza tedy probíhá softwarově, kdy dochází k porovnání naměřeného signálu s nasbíranými daty a standardy, a výsledek představuje tabulka hmotnostních procent.

Z energetického spektra referenčního vzorku 2.1 získaného metodou EDS viz obr. 7.4 lze vyčíst, že se PVDF nanovlákna získaná metodou elektrospřádání skládají z primárně C (0,277 keV) a F (0,677 keV). PVDF obsahuje také H, který je však spektroskopicky velmi špatně detekovatelný, jelikož má pouze jeden elektron. Přítomnost poměrně malého množství O (0,523 keV) může být způsobena vystavením PVDF nanovláken působení vzduchu zejména při výrobě. V malém množství byl na některých dalších vzorcích nanomateriálu detekován výskyt také Na (1,040 keV) a Cl (2,622 keV), které lze považovat pravděpodobně za kontaminanty rozpouštědla. Ve spektru lze pozorovat také pík pro Au (2,120 keV), který je důsledkem potažení vzorků tenkým zlatým filmem, bez kterého by SEM a EDS analýza byla velmi nepřesná. Malý pík lze pozorovat také na energii 1,66 keV, ten se však nepodařilo přisoudit žádnému prvku.



Obr. 7.4: Spektra zobrazující energie, na kterých byly detekovány paprsky X vyzářené vzorkem dle jeho prvkového složení. Rozpoznané píky jsou popsány příslušnými prvky a spektra pro jednotlivé vzorky 2.1–2.4 jsou rozlišené barvou viz legenda.

Při pohledu na chemické složení nanovláken před a po ošetření plazmou lze pozorovat viz tab. 7.2, že hmotnostní procento uhlíku vypovídající o zastoupení ve vzorku je relativně stabilní napříč měřeními kolem hodnoty 56 %, zatímco kyslíku přibývá z 2,1 % v referenčním vzorku 2.1 na 8,4 % ve vzorku 2.4 leptaném O_2 + Ar plazmou a zastoupení fluoru v téže vzorcích klesá ze 45,1 % až na 27,6 %. Tento jev

je také doprovázen poklesem poměru F/C z 0,856 na 0,599, což umožňuje odhadnout míru defluorace na zhruba 30 % skeletu PVDF. Vzhledem k nárůstu poměru O/C z 0,040 na až 0,146 lze míru oxygenace odhadnout na zhruba 70 % skeletu.

U vzorků 2.3 a 2.6 ošetřených Ar plazmou při rozdílné době působení a výkonu nelze pozorovat významnější rozdíl v procentuálním zastoupení prvků, i když došlo ke změně smáčivosti materiálu. Tento jev lze vysvětlit tím, že působení Ar plazmy vede převážně k fyzikálnímu leptání a pouze mírným chemickým změnám.

Změny lze pozorovat také ve vykreslených spektrech viz obr. 7.4, kde je směr defluorace a oxygenace ve vztahu k ošetření plazmou taktéž znatelný. Změny obou F/C a O/C poměrů u vzorků 2.2. a 2.4 poukazují na úspěšnou povrchovou aktivaci nanovláken O_2 plazmou v podobě pravděpodobného odštěpení části hydrofobních skupin C−F a C−H a následnou tvorbou C=O, OH a COOH hydrofilních funkčních skupin na povrchu PVDF nanovláken během interakce mezi plazmou a vzorky [42].

	Kompozice [%]			**Poměr**	
Číslo vzorku	**C**	**F**	**O**	**F/C**	**O/C**
2.1	52,7	45,1	2,1	0,856	0,040
2.2	56,1	34,6	6,8	0,617	0,121
2.3	56,7	37,6	4,7	0,663	0,083
2.4	57,7	27,6	8,4	0,478	0,146
2.6	57,6	34,5	4,7	0,599	0,082

Tab. 7.2: Shrnutí prvkové kompozice připravených vzorků nanovláken vyjádřené v hmotnostních procentech a poměrech pro chemickou charakterizaci vzhledem k povrchové úpravě plazmou. Hodnoty jsou vyvozeny z energie a intenzity signálu.

7.5 Obsah krystalických fází

Jak již bylo zmíněno, PVDF má strukturu, ve které jsou 2 atomy H nebo F navázány na atom C a uspořádány v opakujících se řetězcích. Pokud tato struktura vykazuje asymetrii náboje v důsledku protilehlého prostorového uspořádání atomů H a F s vysoce rozdílnou elektronegativitou, tak jí připisujeme nenulový vnitřní dipólový moment a označujeme ji za polární. Toto uspořádání pozorujeme v PVDF u β-fáze. Fázové přeměny nepolární α na polární β se dosáhne působením mechanického stresu na vzorky PVDF, aby se polymerní řetězce vyrovnaly a vyvolala se paralelní konformace řetězce (TTT). Při umístění do elektrického pole vysokého napětí se náhodně orientované molekuly PVDF polarizují, což znamená, že jejich vnitřní dipólové momenty se uspořádají v určitém směru. Právě materiály s vysokým

obsahem β-fáze po vyjmutí z elektrického pole vykazuje nejsilnější zbytkovou polarizaci. Elektrospřádání v procesu výroby materiálu současně vyvolává mechanické protahování i elektrické pólování v jediném kroku zpracování [49].

Ačkoli FTIR je široce využívaná spektroskopická metoda pro charakterizaci struktury materiálu, v případě PVDF především krystalických fází, mnoho textů v odborné literatuře využívajících absorpčních spekter (někdy dokonce od stejných autorů) spěje často k protichůdným závěrům, zejména co se týče rozlišení frakcí β a γ celkové elektroaktivní fáze kolem pásů 840 cm^{-1} a 510 cm^{-1}. To je zpravidla způsobeno tím, že jednotlivé vzorky PVDF pro dané vědecké práce byly získány z roztoků o různých vlastnostech nebo rozličnými výrobními metodami a experimentálními podmínkami. Na druhé straně bylo zjištěno, že pásy kolem 763 cm^{-1} a/nebo 614 cm^{-1}, 1275 cm^{-1} a 1234 cm^{-1} lze spolehlivě použít k rozlišení a identifikaci všech tří hlavních krystalických fází α, β a γ [50, 51, 52].

Výsledky FTIR se již běžně používají mimo kvalitativní posouzení přítomnosti krystalických fází také ke kvantifikaci obsahu jednotlivých fází v PVDF pro odhad jeho piezoelektrických vlastností. Jak je uvedeno a vysvětleno v práci X. Cia a jeho spolupracovníků [52], tak jedinečné pásy kolem 1275 cm^{-1} a 1234 cm^{-1} pro fázi β a γ by mohly být v rámci univerzálního postupu použity ke kvantifikace složek elektroaktivní fáze. Prvním krokem je kvantifikace α a celkové elektroaktivní fáze skrze pásy kolem 763 cm^{-1} a 840 cm^{-1} viz rovnice 7.1:

$$F_{EA} = \left(\frac{A_{EA}}{\frac{K_{840}}{K_{763}} \times A_{\alpha} + A_{EA}} \right) \times 100\ \%, \tag{7.1}$$

kde F_{EA} představuje relativní obsah elektroaktivní fáze (β a γ), K_{763} a K_{840} absorpční koeficienty a A_{α} a A_{EA} hodnoty absorbance pro odpovídající fáze na 763 a 840 cm^{-1}. Hodnoty absorpčních koeficientů jsou $6,1 \times 10^4$ cm^2 mol^{-1} pro K_{763} a $7,7 \times 10^4$ cm^2 mol^{-1} pro K_{840}.

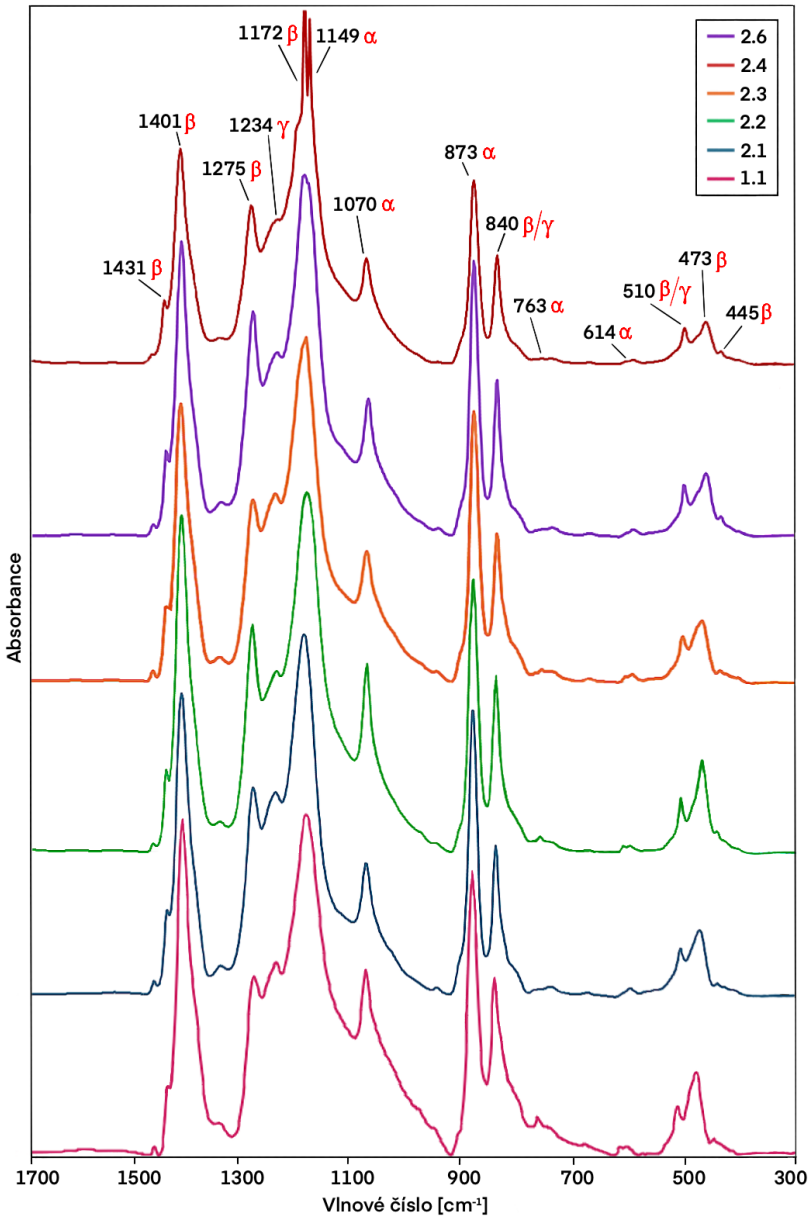
Následně lze k vyjádření zastoupení jednotlivých složek elektroaktivní fáze použít poměr výšky charakteristických píků kolem hodnot 1275 cm^{-1} a 1234 cm^{-1} k jejich nejbližšímu údolí (angl. peak-to-valley height ratio, P2VHR) viz rovnice 7.2 a 7.3:

$$F(\beta) = F_{EA} \times \left(\frac{\Delta H_{\beta}}{\Delta H_{\beta} + \Delta H_{\gamma}} \right) \times 100\ \%, \tag{7.2}$$

$$F(\gamma) = F_{EA} \times \left(\frac{\Delta H_{\gamma}}{\Delta H_{\beta} + \Delta H_{\gamma}} \right) \times 100\ \%, \tag{7.3}$$

kde $F(\beta)$ a $F(\gamma)$ představují procentuální zastoupení frakcí β a γ celkové elektroaktivní fáze F_{EA}, ΔH_{β} a ΔH_{γ} jsou rozdíly výšky (rozdíly absorbance) mezi příslušnými vrcholy kolem 1275 cm^{-1} a 1234 cm^{-1} a jejich nejbližšími údolími.

Charakteristické píky základních krystalických fází v rozmezí 1700–300 cm^{-1} jsou pro vzorky 2.1–2.6 určeny srovnávacím studiem a shrnutím FTIR vibračních pásů pro PVDF ze zpráv publikovaných v aktuální odborné literatuře a jsou vyznačeny v získaných absorpčních spektrech viz obr. 7.5. Přítomnost jedinečných pásů kolem 840, 763, 1275 a 1234 cm^{-1} dokazuje existenci všech tří základních krystalických fází α, β a γ, klasifikace dalších píků je pouze doplňková.



Obr. 7.5: Absorpční spektrum získané pomocí FTIR, oříznuté na užitečné spektrum 1700–300 cm^{-1}. Třem základním krystalickým fázím PVDF (α, β a γ) jsou přiřazeny charakteristické a doplňkové píky pro vzorky 2.1–2.6. Studován je výskyt píků a jejich poměr vzhledem k ošetření plazmou.

Je známo, že v typických vzorcích semi-krystalického PVDF není obsah krystalických struktur vyšší než 50–60 %. Dosud však neexistují konkrétní informace o tom, jak amorfní část PVDF ovlivňuje EDS a FTIR spektra. Proto se diskuse v této práci soustředí na krystalické fáze, které jsou významné z hlediska možné elektroaktivity skrze piezoelektrický jev [52]. Za využití výše uvedených vztahů (rovnice 7.1, 7.2 a 7.3) je vypočítáno % zastoupení jednotlivých krystalických fází a je uvedeno v tab. 7.3.

Ve všech vzorcích ze sady 2 podíl elektroaktivní fáze dosahuje nejméně 90 % z celkového obsahu krystalických fází oproti vzorku ze sady 1, u kterého hodnota F_{EA} dosahuje pouze 79 %, tudíž lze prohlásit, že se elektrospřádání s vyšší rychlostí otáčení kolektoru potvrdilo jako vhodná metoda pro rychlou a jednoduchou výrobu PVDF nanovláken s vysokým obsahem elektroaktivní fáze. Současně bylo dokázáno, že ošetření vzorků jak O_2, tak Ar plazmou o uvedeném nastavení neponižuje významně její obsah, byť by se dal očekávat destruktivní charakter. Lze však do jisté míry pozorovat změnu poměru jejích frakcí, kdy dochází k mírnému poklesu β-fáze na hodnotu 70 % (z původních 77,6 % pro vzorek 2.1) na úkor nárůstu α i γ fáze pro vzorek 2.3 ošetřený Ar plazmou o nižším výkonu, třebaže ke stejnému jevu nedochází u vzorku 2.6 ošetřeném Ar o vyšším výkonu, kde naopak dochází k nárůstu β-fáze na 88,8 %. K největšímu nárůstu β-fáze dochází u vzorku 2.4 ošetřeném O_2 + Ar plazmou až na 94,3 % na úkor převážně γ-fáze, jejíž podíl klesá na 0,5 %.

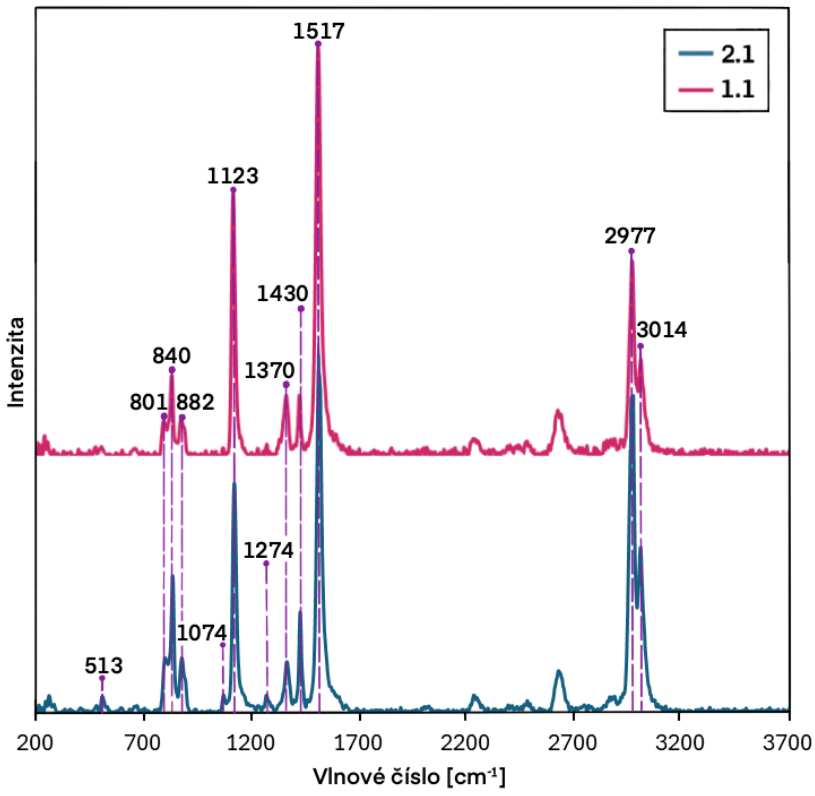
Zastoupení [%]	**1.1**	**2.1**	**2.2**	**2.3**	**2.4**	**2.6**
$F(\alpha)$	21,1	4,1	10	9,3	5,2	5,1
$F(\beta)$	52,1	77,6	84,3	70	94,3	88,8
$F(\gamma)$	26,8	18,3	5,7	20,7	0,5	6,1

Tab. 7.3: Kvantifikace krystalických fází PVDF pomocí FTIR absorpčních spekter a výpočetní metody P2VHR. Výsledek představuje % zastoupení jednotlivých fází ($F(\alpha)$, $F(\beta)$ a $F(\gamma)$) v příslušných vzorcích 2.1–2.6.

Oba nemodifikované vzorky 1.1 a 2.1 lišící se v rychlosti otáčení kolektoru při elektrospřádání jsou podrobeny Ramanově spektroskopii, která nese informaci o chemických vazbách v PVDF, a zobrazuje rozdíl ve výskytu krystalických fází mezi vzorky v podobě charakteristických vibračních přechodů. Tyto vibrace odrážejí uspořádání vazeb atomů v materiálu, které ovlivňuje jeho fyzikální a chemické vlastnosti, jako je právě piezoelektricita. Pro lepší pochopení vibračních přechodů si lze molekulu představit jako pružnou strukturu, kde jsou atomy spojeny pružinami, které umožňují atomům kmitat, různě se natáčet či mávat. V důsledku toho, že ne všechny symetrické a asymetrické úseky jsou spolehlivě zobrazeny jak pomocí FTIR, tak Ramanovy spektroskopie, považují se dané metody za komplementární pro co nejbližší popis krystalických fází sloučeniny (odhalení dalších píků). Ramanova spektroskopie

není použita pro vzorky ošetřené plazmou, jelikož skenování heterogenních vzorků je obtížné a citlivost přístroje při použitém výkonu není dostačující.

Největší intenzita Ramanova signálu viz obr. 7.6 se vyskytuje v regionu 1517 cm^{-1} pro vibrační mód vazby CC a v oblasti protahování CH (2800–3050 cm^{-1}), kterému dominuje silný pík na 2977 cm^{-1} patřící symetrickému módu skupiny CH_2, všechny typické pro α-fázi. Sousední pík na 3014 cm^{-1} je spojován s asymetrickým protažením CH_2 s β-fázi. Další významné píky jsou v oblasti kolem 811 cm^{-1} (γ, CH_2 kolébavý mód), 840 cm^{-1} ($\gamma + \beta$, CH_2 kolébavý mód a CF_2 asymetrické protahování), 882 cm^{-1} ($\alpha + \beta + \gamma$, CC symetrické a asymetrické protahování a CH_2 kroucení) a 1430 cm^{-1} ($\gamma + \beta$, CH_2 kroucení + kývání). Vzorek 2.1 s usměrněnými nanovlákny (2000 ot./min) vykazuje stejné píky jako vzorek 1.1, ale ve větším poměru elektroaktivních ku ne-elektroaktivním, a navíc vykazuje další 3 píky s prvním na 513 cm^{-1}, přiřazeným β-fázi, druhým na 1074 cm^{-1}, charakteristickým pro β/α-fázi, a třetím na 1274 cm^{-1}, jedinečným pro β-fázi [41, 50, 53]. Výsledky měření tedy naznačují, že materiál s usměrněnými nanovlákny vykazuje vyšší podíl β-fáze než materiál s nanovlákny neusměrněnými.



Obr. 7.6: Ramanovo spektrum, oříznuté na užitečné spektrum v rozsahu 200–3700 cm^{-1}, poskytuje informace o vibračních přechodech v analyzovaných vzorcích 1.1 (otáčení kolektoru 300 ot./min) a 2.1 (2000 ot./min).

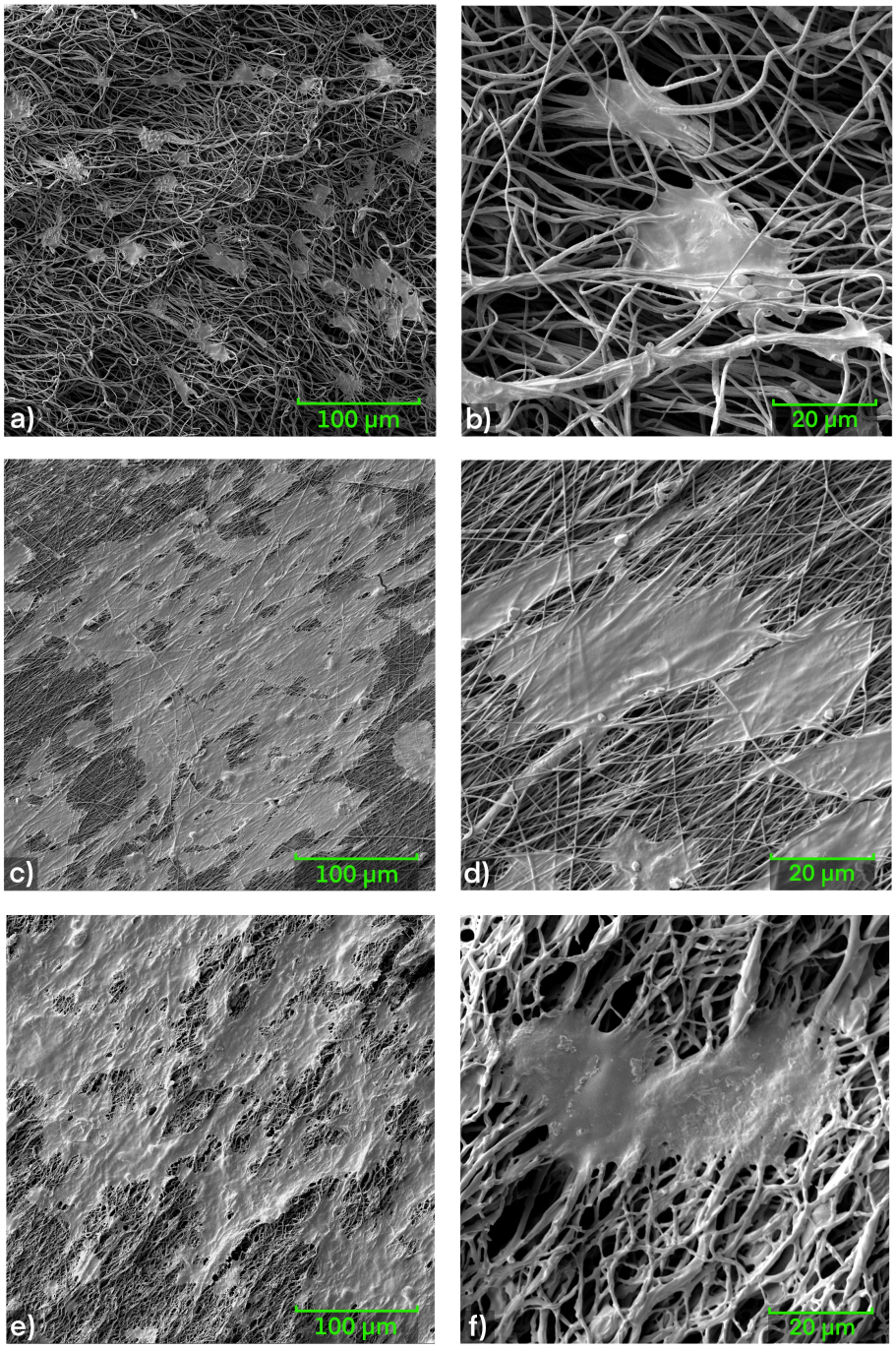
7.6 Pozorování buněčné adheze

Pro prozkoumání tkáňových nosičů po nasazení, kultivaci a fixaci kostních buněk Saos-2 byla nejprve zvolena SEM. Pozorování bylo provedeno se stejným pracovním nastavení jako v předchozích sekcích, avšak se zorným polem 350 µm a zvětšením 1,6kx pro zhodnocení míry osídlení nosiče buňkami a se zorným polem 80 µm a zvětšením 7kx pro posouzení tvaru jednotlivých buněk a charakteru adheze.

Buňky Saos-2 kultivované na nanovláknech s živným médiem po dobu 24 hodin se do určitý míry uchytily na všech vzorcích 1.1, 2.1–2.4 a 2.6 viz vybrané na obr. 7.7, tudíž lze usoudit, že elektrospřádaná PVDF nanovlákna neošetřená i ošetřená O_2 či Ar plazmou jsou pro použité buňky v daném čase biokompatibilní a netoxická. Vzhledem k vysoké chemické stálosti PVDF se neočekává, že by ani při delší kultivaci uvolňoval toxické látky do prostředí a zhoršoval životaschopnost buněk.

Faktorem významně přispívajícím k úspěšnosti uchycení buněk na nanovlákenném materiálu se potvrdila býti vyšší rychlost otáčení sběrného válce v procesu elektrospřádání, která s dalšími optimálně zvolenými parametry poskytuje tenká usměrněná nanovlákna o relativně homogenním rozložení. Takto zkonstruovaný tkáňový nosič viz obr. 7.7 snímky c) a d) díky své adekvátní poréznosti poskytuje buňkám dostatečnou oporu a zároveň prostor pro souvislý růst a vzájemnou komunikaci. Buňky se také na usměrněných vláknech více protahují, orientují se stejným směrem a tvoří spojité shluky, což je pro ně výhodnější z hlediska větší vzájemné komunikace a celkové životaschopnosti. Výsledná struktura významně napodobuje přirozenou tkáň. Na rozdíl od toho, na snímcích a) a b) lze pozorovat neusměrněná nanovlákna, na kterých roste pouze zlomek buněk oproti vláknům usměrněným. Vzhledem k chaotickému uspořádání nanovláken a velkým pórům se mnoho buněk pravděpodobně v důsledku nedostatečné opory neuchytilo, či úplně propadlo, a bylo odstraněno při promytí vzorků před fixací. Buňky jsou kulatější a netvoří tolik shluky.

Při posuzování vlivu plazmy na nanovlákna se ukázalo, že vzorky 2.3 a 2.6 ošetřené Ar plazmou o nižším i vyšším pracovním nastavení nevykazují vyšší kompatibilitu s buňkami Saos-2 oproti referenčnímu vzorku 2.1. Vzorky 2.2 a 2.4 ošetřené O_2 plazmou viz obr. 7.7 snímky e) a f), resp. O_2 + Ar plazmou, vykazují slibnější výsledky vzhledem k jejich prokázané hydrofilizaci a funkcionalizaci povrchu kyslíkem. Hydrofilní funkční skupiny na povrchu nanovláken přispívají k lepší adhezi buněk stejně tak, jak s tím spojené vyšší zastoupení elektroaktivní β-fáze napomáhá skrze elektromechanickou autostimulaci buněk jejich růstu a vzájemné komunikaci (viz práce M. Kitsara a spol. [43]).

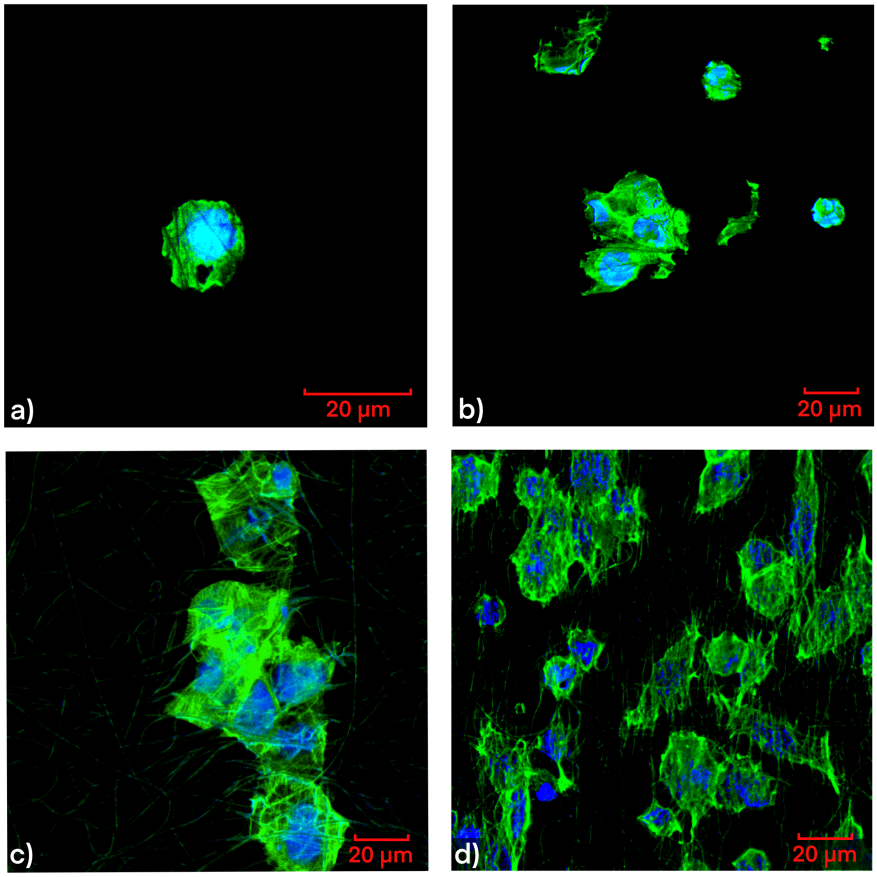


Obr. 7.7: Buněčná adheze vizualizovaná pomocí SEM. Na snímcích a) a b) neusměrněná nanovlákna, na snímcích c) a d) usměrněná nanovlákna a na snímcích e) a f) usměrněná nanovlákna ošetřená O_2 plazmou při nižším pracovním nastavení.

Pro další analýzu byla zvolena CLSM s využitím 2 fluorescenčních barviv DAPI a FITC. Modře fluorescenční DAPI specificky interaguje s A-T bohatými oblastmi DNA a je často používáno k zobrazení jader živočišných buněk v kombinaci s dalšími fluorescenčními barvivy, jako je zde použité zeleně fluorescenční FITC, které prochází

skrze permeabilizovanou membránu buňky a váže se v cytoplazmě. Díky tomu, že jejich emisní spektrum je dobře oddělené, lze zřetelně skrze CLSM vizualizovat odlišné struktury, na které se barviva vážou [46, 47].

Na snímcích získaných pomocí CLSM a zpracovaných kompatibilním softwarem ZEN 3.10 LITE se lépe ukazuje, jak buňky usazené na hydrofilní vzorky ošetřené O_2 plazmou pronikají i do hlubších vrstev tkáňového nosiče a tvoří nejen povrchově ale také prostorově orientované shluky, přičemž u hydrofobních vzorků zůstávají buňky převážně jen na povrchu. Na vybraných snímcích viz obr. 7.8 lze pozorovat oddělené modře zabarvené regiony jaderné DNA, které obklopuje zeleně zabarvená cytoplazma buněk. Barvivo DAPI by teoreticky mělo obarvit také A-T úseky DNA v buněčných mitochondriích, avšak velikost samotné organely a úseků DNA v ní jsou tak malé ve srovnání s jádrem, že často nejsou vůbec zaznamenány.



Obr. 7.8: Buňky vizualizované pomocí imunofluorescence a CLSM za využití fluorescenčních barviv FITC (vazba na povrchu buněk a v cytoplazmě, emituje zelené světlo) a DAPI (A-T regiony převážně v jaderné DNA, emituje modré světlo). Na snímcích a) vzorek 2.1, na b) 2.3, na c) 2.4 a na d) 2.2.

7.7 Diskuze výsledků

Během studia literatury byly identifikovány klíčové trendy v podobě různých forem využití elektrospřádaných nanovláken a byly posouzeny příspěvky existujících studií zahrnující volbu silně piezoelektrického PVDF jako biokompatibilního materiálu a diskuzi vhodných parametrů pro jeho výrobu.

V oblasti biomedicíny je stále zkoumáno a i již v praxi používáno množství netoxických polymerů pro výrobu vstřebatelných stehů či řízenou dopravu léčiv. Výhodou syntetický materiálů je možnost v procesu výroby kontrolovat jejich chemické a fyzikální vlastnosti, konkrétně a reprodukovatelně vyrobit vhodnou strukturu a případně ji funkčně modifikovat. Mezi významné biokompatibilní ne-biodegradabilní syntetické polymery patří např. nylon-6, který kromě chemické odolnosti vyniká svou pružností a pevností v tahu, avšak nemá piezoelektrické vlastnosti. Nylon může být funkcionalizován a hybridizován s jinými materiály k výrobě např. kožních obvazů či stentů, nevyniká však svou bioaktivitou, která je z hlediska designu chytrých materiálů žádoucí. V odvětví KTI tudíž do popředí vstupují piezoelektrické materiály, schopné na svém povrchu vlivem i malého mechanického namáhání generovat elektrický náboj, který může napomoci k aktivaci buněk. U biodegradabilních polymerů vyrobených z přírodních zdrojů, jako je např. slabě piezoelektrický PLA, můžou však kromě ztrácení na pevnosti v čase problém představovat také kyselé produkty, na které se PLA postupně rozkládá, a které můžou způsobit zánět při implantaci *in vivo* [54].

Vzhledem k tomu má význam studium materiálů na bázi právě PVDF, který poskytuje mimo základní biokompatibilitu, odolnost a pevnost také možnost elektromechanické stimulace buněk skrze své silné piezoelektrické vlastnosti. Ve vědeckých pracích M. Kitsara a spol. [43] jsou osteoblasty kultivované na PVDF nanovláknech analyzovány skrze hodnocení změn intracelulární koncentrace vápníku v čase. Vápník je zapojen do intracelulárních signálních a metabolických drah, a účastní se při přenosu signálu mezi buňkami v rámci aktivace odpovídajících iontových kanálů. Bylo zjištěno, že piezoelektrická stimulace je schopna vyvolat měřitelný influx vápníku, který následně aktivuje buňky, což vede ke zvýšení jejich růstu a diferenciace. Z výsledků uvedené studie vyplývá, že buňky pěstované na elektrospřádaných PVDF tkáňových nosičích k nanovláknům přilnou, přičemž generují adhezní síly, jejichž důsledkem je mechanické namáhání nanovláken, které je skrze piezoelektrický jev zodpovědné za zpětnou elektromechanickou stimulaci samotných buněk (autostimulace). V uvedeném článku je tedy prokázáno, že osteoblasty jsou při interakci s elektrospřádanými PVDF nanovlákny aktivovány bez nutnosti vnějších podnětů k vyvolání piezoelektrické odezvy, a právě proto je kombinace tohoto materiálu a výrobní metody v rámci aplikace v KTI tak perspektivní.

Parametry elektrospřádání bylo nutné experimenty optimalizovat. Pokud je zvlákňovací napětí příliš vysoké, mohou vznikat nehomogenní nebo trhaná vlákna. Vyšší průtok a viskozita roztoku můžou vést k tvorbě hrubších vláken nebo tzv. korálkových defektů, zatímco příliš nízký průtok a viskozita můžou způsobit tenká a křehká vlákna. Rychlost otáčení kolektoru ovlivňuje orientaci a uspořádání nanovláken, kdy vyšší rychlost otáčení může vést k vytvoření vláken s větší stejnosměrnou orientací a lepší mechanickou pevností. Teplota a vlhkost mohou ovlivnit odpařování rozpouštědla, sušení vláken a tvorbu defektů. Po dosažení vhodné konfigurace pro danou aplikaci byly úspěšně vyrobeny dvě sady vzorků lišící se rychlostí otáčení sběrného kolektoru, pro posouzení vlivu usměrnění nanovláken na růst buněk v tkáňovém nosiči, a které byly následně prozkoumány pomocí SEM. Kromě optimálnosti zvolené konfigurace elektrospřádání se také potvrdilo, že zvýšení otáček kolektoru z 300 na 2000 ot./min snižuje a homogenizuje průměr nanovláken, snižuje poréznost a orientuje nanovlákna v daném směru, díky čemuž buňkám struktura poskytuje lepší oporu.

Vybrané vzorky byly modifikovány O_2 a Ar plazmou o různé délce a výkonu ošetření pro posouzení jejího vlivu na strukturu a smáčivost nosiče. Povrchy s vysokou povrchovou energií ve srovnání s povrchovým napětím kapaliny mají silné přitažlivé síly mezi jejich molekulami, což usnadňuje kapalině smáčet povrch. Ošetření plazmou by mělo v teorii zvyšovat povrchovou energii materiálu, což by mělo v praxi vést k lepším adhezním vlastnostem. Měřením kontaktního úhlu kapaliny na povrchu materiálu se potvrdilo, že nemodifikovaná PVDF nanovlákna jsou hydrofobní a ošetření plazmou vede ke snížení kontaktního úhlu až do hydrofilního rozpětí s výraznějšími účinky pro O_2 plazmu. Vzorky ošetřené plazmou o vyšším pracovním nastavení se ukázaly být nevhodné pro aplikaci v KTI, jelikož ztrácejí svou vláknitou strukturu a infiltrace nosiče buňkami by nebyla možná.

EDS analýza potvrdila chemické složení PVDF a změny obou F/C a O/C poměrů vzhledem k ošetření plazmou poukazující na defluoraci a oxygenaci, tedy úspěšnou povrchovou aktivaci nanovláken ošetřených právě O_2 plazmou. Ve všech vzorcích ze sady 2 neošetřených i ošetřených plazmou je dle FTIR podíl elektroaktivní fáze nejméně 90 % z celkového obsahu krystalických fází s největším zastoupením silně piezoelektrické β-fáze pro vzorky 2.2 a 2.4. Výsledky FTIR a Ramana pro vzorky 1.1 a 2.1 potvrzují, že elektrospřádání s vysokými otáčkami kolektoru v procesu výroby materiálu skrze současné mechanické protahování a elektrické pólování zvlákňovaného materiálu indukuje antisymetrickou paralelní konformaci řetězce charakteristickou pro vysokou piezoelektrickou β-fázi. Také z FTIR vyplývá, že ošetření plazmou nemá destruktivní účinky vzhledem k obsahu elektroaktivní krystalické fáze, nýbrž naopak, ošetření O_2 plazmou dodává energii nutnou k indukci fázového přechodu z α-fáze na β-fázi, zavádí polarizované funkční skupiny, a díky zvýšení povrchové energie přeměnu stabilizuje.

Adheze buněk, neboli schopnost buněk přilnout k povrchům, je proces zahrnující interakce mezi buněčnými membránami a povrchy materiálů. Pro aplikace v tkáňovém inženýrství a biomedicíně je zásadní posouzení řady faktorů, které tento proces ovlivňují. Adheze buněk je zprostředkovávána transmebránovými receptory, proteiny v ECM a dalšími adhezními molekulami, a závisí na biokompatibilitě, povrchové energii, chemickém složení, topografii a povrchové modifikaci použitých syntetických nanovláken tvořících tkáňový nosič. Studiem zkonstruovaných tkáňových nosičů pomocí SEM a CLSM se ukázalo, že buňkám vyhovuje prostředí nanovláken, které napodobuje přirozené vláknité mikro- a nano-rozměrné prostředí ECM. Chemické složení PVDF se ukázalo být pro buňky po jednodenní kultivaci netoxické a biokompatibilní. Ošetřené povrchy nanovláken s vysokou povrchovou energií a polarizovanými funkčními skupinami zlepšují smáčivost a interakci s buněčnými membránami, čímž vedou k většímu rozšíření buněk po povrchu tkáňového nosiče a do jeho hlubších vrstev. Vhledem k tomu se ukázaly být nejkompatibilnějšími tkáňovými nosiči vzorky s tenkými, usměrněnými, hydrofilními a s vysoce piezoelektrickými nanovlákny.

Závěr

V rámci této bakalářské práce byla úspěšně provedena literární rešerše v oblasti KTI a návrhu funkčního nanovlákenného tkáňového nosiče pro osazení kostními buňkami. Tato práce obsahuje širší pohled na danou problematiku a poskytuje základy nutné pro volbu vhodného materiálu, technologických postupů a buněk, které při vzájemné kombinaci budou kompatibilní a vyprodukují funkční strukturu o žádoucích vlastnostech. Cílem práce bylo vyrobit a prozkoumat biokompatibilní nanovlákennou strukturu, kterou je možné použít pro aplikace v KTI. Zvolená kombinace PVDF materiálu a metody elektrospřádání nanovláken byla v teoretické části důkladně popsána a zhodnocena vzhledem k osazení buňkami Saos-2.

Parametry výrobního procesu byly experimenty optimalizovány a následně byly vyrobeny 2 sady vzorků, jejichž základní strukturní a funkční analýzou se pracovní nastavení s vyššími otáčkami kolektoru potvrdilo jako vhodné pro konstrukci biokompatibilního tkáňového nosiče s vysokým obsahem elektroaktivní krystalické fáze. Vzhledem k přirozené hydrofobicitě PVDF byly pro dosažení co nejoptimálnějšího hydrofilního prostředí pro adhezi buněk nanovlákna ošetřeny O_2, Ar a O_2 + Ar plazmou o různé době působení a výkonu plazmy. Jako buněčný materiál pro osídlení nosiče byly zvoleny osteosarkomatické buňky Saos-2, které jsou považovány za nejreprezentativnější buněčný model pro studium interakcí buněk osteoblastického typu v tkáňových nosičích.

V rámci základní výzkumné analýzy tkáňového nosiče byla použita pro posouzení kvality nanovláken, povrchové struktury a buněčné adheze metoda SEM. EDS analýza v kombinaci s FTIR a Ramanovou spektroskopií poukazuje na souvislost povrchových strukturních a funkčních změn indukovaných ošetřením O_2 plazmou, které společně vedou ke stabilnímu fázového přechodu z α-fáze na piezoelektrickou β-fázi a aktivaci povrchu. Skrze výsledky z měření kontaktního úhlu vody na povrchu nanovláken se modifikace vzorků O_2 plazmou prokázala být také účinnou z hlediska zvýšení povrchové energie a tím hydrofilizace nosiče. CLSM využívající fluorescenční kontrastní barvení jader a cytoplazmy ukazuje, že významný počet buněk Saos–2 se uchytil k jednotlivým nanovláknům, osídlil povrch nosiče a v případě hydrofilních elektroaktivních nanovláken také ve shlucích infiltroval hlubší vrstvy nosiče.

Na základě získaných dat se ukázaly být nejkompatibilnějšími tkáňovými nosiči vzorky s tenkými, usměrněnými, hydrofilními a s vysoce piezoelektrickými nanovlákny vyrobené s rychlostí otáčení kolektoru 2000 ot./min a ošetřené O_2 plazmou po dobu 2 min s výkonem 200 W. Elektrospřádáná PVDF nanovlákna se ukázala být obecně velice dobře modifikovatelnou, kompatibilní a adaptabilní strukturou vhodnou pro aplikaci v KTI, která díky piezoelektrickým vlastnostem umožňuje elektromechanickou autostimulaci buněk.

Hlavní omezení práce představovala krátkodobá 24 hodinová kultivace buněk na tkáňovém nosiči před fixací. V navazujícím studiu by bylo vhodné provést analýzu stability tkáňového nosiče při delší kultivaci (např. po 14 a 30 dnech) a stanovení dlouhodobých testů životaschopnosti buněk. V budoucím výzkumu by bylo užitečné dále detailněji studovat a měřit piezoelektrickou odpověď materiálu v závislosti na stimulaci vnějším zdrojem deformace či adhezními silami usazených buněk, včetně hlubšího posouzení účinků elektromechanické stimulace na růst, komunikaci a proliferaci usazených osteoblastických buněk.

Literatura

1. OLSON, Jennifer L.; ATALA, Anthony; YOO, James J. *Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions*. Sv. 47. 2011. Č. 1. ISSN 2233-7393. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.1.1.
2. SHARMA, Preeti; KUMAR, Pradeep; SHARMA, Rachna; BHAT, Vijaya Dhar. *Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope*. Sv. 12. 2019. Č. 3. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.25122/jml-2019-0032.
3. JODATI, Hossein; YILMAZ, Bengi; EVIS, Zafer. *A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features*. Sv. 46. 2020. Č. 1. ISSN 0272-8842. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.192.
4. AMINI, Ami R.; LAURENCIN, Cato T.; NUKAVARAPU, Syam P. *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*. Sv. 40. 2012. Č. 5. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10.
5. TURNBULL, Gareth; CLARKE, Jon; PICARD, Frederic; RICHES, Philip; JIA, Luanluan; HAN, Fengxuan; LI, Bin; SHU, Wenmiao. *3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering*. Sv. 3. 2018. Č. 3. ISSN 2452-199X. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
6. CLARKE, Bart. *Normal Bone Anatomy and Physiology*. Sv. 3. 2008. Č. 3. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.2215/CJN.04151206.
7. AHMAD, Oryan; ALI, Moshiri; SOODEH, Alidadi. *Current concerns regarding healing of bone defects*. Sv. 2. 2013. ISSN 2050-2303. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.13172/2050-2303-2-2-374.
8. VACANTI, Joseph P.; MORSE, Martin A.; SALTZMAN, W. Mark; DOMB, Abraham J.; PEREZ-ATAYDE, Antonio; LANGER, Robert. *Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices*. Sv. 23. 1988. Č. 1. ISSN 0022-3468. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/S0022-3468(88)80529-3.
9. KUMAR, Challa S. S. R. *Tissue, cell, and organ engineering*. Sv. 9, Tissue, cell, and organ engineering. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. Nanotechnologies for the life sciences. ISBN 3527313893.
10. HENCH, Larry L.; POLAK, Julia M. *Third-Generation Biomedical Materials*. Sv. 295. 2002. Č. 5557. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1126/science.1067404.

11. FARAG, Mohammad. *Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review*. Sv. 58. 2023. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1007/s10853-022-08102-x.

12. CHOCHOLATA, Petra; KULDA, Vlastimil; BABUSKA, Vaclav. *Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration*. Sv. 12. 2019. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/ma12040568.

13. GOBBI, Silvio; REINKE, Gustavo; GOBBI, Vagner; ROCHA, Ynglid; SOUSA, Thiago; COUTINHO, Maycol. *Biomaterial: Concepts and Basics Properties*. Sv. 9. 2020-02.

14. XUE, N.; DING, X.; HUANG, R.; JIANG, R.; HUANG, H.; PAN, X.; MIN, W.; CHEN, J.; DUAN, J.A.; LIU, P.; WANG, Y. *Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects*. Sv. 15. 2022. Č. 7. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/ph15070879.

15. COLLINS, Maurice N.; REN, Guang; YOUNG, Kieran; PINA, S.; REIS, Rui L.; OLIVEIRA, J. Miguel. *Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering*. Sv. 31. 2021. Č. 21. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1002/adfm.202010609.

16. DAHLIN, Rebecca L.; KASPER, F. Kurtis; MIKOS, Antonios G. *Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering*. Sv. 17. 2011. Č. 5. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0238.

17. YANG, Chunyu; JI, Jianying; LV, Yujia; LI, Zhou; LUO, Dan. *Application of Piezoelectric Material and Devices in Bone Regeneration*. Sv. 12. 2022. Č. 24. ISSN 2079-4991. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/nano12244386.

18. DUMITRESCU, Luminita Nicoleta; NEACSU, Patricia; NECULA, Madalina G.; BONCIU, Anca; MARASCU, Valentina; CIMPEAN, Anisoara; MOLDOVAN, Antoniu; ROTARU, Andrei; DINCA, Valentina; DINESCU, Maria. *Induced Hydrophilicity and In Vitro Preliminary Osteoblast Response of Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Coatings Obtained via MAPLE Deposition and Subsequent Thermal Treatment*. Sv. 25. 2020. Č. 3. ISSN 1420-3049. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/molecules25030582.

19. KANTER, A. J. de; JONGSMA, K. R.; VERHAAR, M. C.; BREDENOORD, A. L. *The Ethical Implications of Tissue Engineering for Regenerative Purposes: A Systematic Review*. Sv. 29. 2023. Č. 2. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2022.0033.

20. DU TOIT, L.C.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y.E.; PILLAY, V. 10 - Use of nanostructured materials in hard tissue engineering. In: NARAYAN, Roger (ed.). *Nanobiomaterials*. Woodhead Publishing, 2018, s. 257–295. ISBN 978-0-08-100716-7. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00010-6.

21. HARISH, Vancha; TEWARI, Devesh; GAUR, Manish; YADAV, Awadh Bihari; SWAROOP, Shiv; BECHELANY, Mikhael; BARHOUM, Ahmed. *Review on Nanoponlines and Nanostructured Materials: Bioimaging, Biosensing, Drug Delivery, Tissue Engineering, Antimicrobial, and Agro-Food Applications*. Sv. 12. 2022. Č. 3. ISSN 2079-4991. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/nano12030457.

22. PRYJMAKOVA, Jana; KAIMLOVA, Marketa; HUBACEK, Tomas; SVORCIK, Vaclav; SIEGEL, Jakub. *Nanostructured Materials for Artificial Tissue Replacements*. Sv. 21. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Č. 7. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/ijms21072521. PMID: 32260457; PMCID: PMC7177933.

23. DURANN-REY, David; BRITO-PEREIRA, Ricardo; RIBEIRO, Clarisse; RIBEIRO, Sylvie; SANCHEZ-MARGALLO et al. *Development and evaluation of different electroactive PVDF architectures for endothelial cell culture*. Sv. 10. 2022. ISSN 2296-4185. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1044667.

24. LI, Yuchao; LIAO, Chensheng; TJONG, Sie Chin. *Electrospun Polyvinylidene Fluoride-Based Fibrous Scaffolds with Piezoelectric Characteristics for Bone and Neural Tissue Engineering*. Sv. 9. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Č. 7. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/nano9070952.

25. RUAN, Liuxia; YAO, Xiannian; CHANG, Yufang; ZHOU, Lianqun; QIN, Gaowu; ZHANG, Xianmin. *Properties and Applications of the β Phase PVDF*. Sv. 10. 2018. Č. 3. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/polym10030228.

26. SAMADI, Ali et al. *Comparative review of piezoelectric biomaterials approach for bone tissue engineering*. Sv. 33. Taylor & Francis, 2022. Č. 12. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2065409. PMID: 35604896.

27. FORMHALS, Anton. *Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads*. 1934. Č. 1975504.

28. TAYLOR, Geoffrey Ingram. *Disintegration of water drops in an electric field*. Sv. 280. Royal Society, 1964. Č. 1382. ISSN 0080-4630. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151.

29. DOSHI, Jayesh; RENEKER, Darrell H. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. Sv. 35. 1995. Č. 2. ISSN 0304-3886. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/0304-3886(95)00041-8. Selected papers from the special technical session "Electrostatics in Polymer Processing and Charge Monitoring", 1993 IEEE Industry Applications Society Meeting.

30. JIRSAK, Oldrich; SANETRNIK, Filip; LUKAS, David; KOTEK, Vaclav; MARTINOVA, Lenka; CHALOUPEK, Jiri. *Method of Nanofibres Production from a Polymer Solution Using Electrostatic Spinning and a Device for Carrying Out the Method*. 2003. Č. PV2003-2421.

31. RAMPICHOVA, M. et al. *Composite 3D Printed Scaffold with Structured Electrospun Nanofibers Promotes Chondrocyte Adhesion and Infiltration*. Sv. 12. Taylor & Francis, 2018. Č. 3. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1385713. PMID: 29130836.

32. WANG, Xianfeng; DING, Bin; LI, Bingyun. *Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering*. Sv. 16. 2013. Č. 6. ISSN 1369-7021. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.005.

33. 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*. Sv. 11. 2018. Č. 8. ISSN 1878-5352. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015.

34. DENG, Meng et al. *Biomimetic Structures: Biological Implications of Dipeptide-Substituted Polyphosphazene–Polyester Blend Nanofiber Matrices for Load-Bearing Bone Regeneration*. Sv. 21. 2011. Č. 14. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1002/adfm.201100275.

35. SU, Yingchun; TOFTDAL, Mette Steen; LE FRIEC, Alice; DONG, Mingdong; HAN, Xiaojun; CHEN, Menglin. *3D Electrospun Synthetic Extracellular Matrix for Tissue Regeneration*. Sv. 1. 2021. Č. 7. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1002/smsc.202100003.

36. MOUTHUY, PA; YE, H. *5.04-Biomaterials: Electrospinning*. Sv. 2. Academic Press: Burlington, 2011. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/281041498_504_-_Biomaterials_Electrospinning.

37. HE, Zhongchen; RAULT, François; LEWANDOWSKI, Maryline; MOHSENZADEH, Elham; SALAUN, Fabien. *Electrospun PVDF Nanofibers for Piezoelectric Applications: A Review of the Influence of Electrospinning Parameters on the β Phase and Crystallinity Enhancement*. Sv. 13. 2021. Č. 2. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/polym13020174.

38. RIBEIRO, S.; RIBEIRO, T.; RIBEIRO, C.; CORREIA, D. M.; FARINHA, J. P.; GOMES, A. C.; BALEIZAO, C.; LANCEROS-MENDEZ, S. *Multifunctional platform based on electroactive polymers and silica nanoponlines for tissue engineering applications*. Sv. 8. 2018. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/nano8110933.

39. CERNOHORSKY, Petr et al. *Structure Tuning and Electrical Properties of Mixed PVDF and Nylon Nanofibers*. Sv. 14. 2021. Č. 20. ISSN 1996-1944. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/ma14206096.

40. DVORAKOVA, J.; WIESNEROVA, L.; CHOCHOLATA, P.; KULDA, V.; LANDSMANN, L.; CEDIKOVA, M.; KRIPNEROVA, M.; EBERLOVA, L.; BABUSKA, V. *Human cells with osteogenic potential in bone tissue research*. Sv. 22. 2023. Č. 1. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1186/s12938-023-01096-w.

41. HAVLIKOVA, Tereza. *Compatibility of piezoelectric semicrystalline polymer and osteoblastic cells*. Brno University of Technology, 2023. ISBN 978-80-214-6154-3. ISSN 2788-1334. Dostupné také z: https://doi.org/10.13164/eeict.2023.21.

42. CORREIA, D.M.; RIBEIRO, C.; SENCADAS, V.; BOTELHO, G.; CARABINEIRO, S.A.C.; RIBELLES, J.L. Gomes; LANCEROS-MENDEZ, Senentxu. *Influence of oxygen plasma treatment parameters on poly(vinylidene fluoride) electrospun fiber mats wettability*. Sv. 85. 2015. ISSN 0300-9440. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.03.019.

43. KITSARA, Maria; BLANQUER, Andreu; MURILLO, Gonzalo; HUMBLOT, Vincent; DE BRAGANCA VIEIRA, Sara; NOGUES, Carme; IBANEZ, Elena; ESTEVE, Jaume; BARRIOS, Leonardo. *Permanently hydrophilic, piezoelectric PVDF nanofibrous scaffolds promoting unaided electromechanical stimulation on osteoblasts*. Sv. 11. The Royal Society of Chemistry, 2019. Dostupné z DOI: http://dx.doi.org/10.1039/C8NR10384D.

44. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. *HTB-85 (CRL-4000™)* [online]. [cit. 2024-05-07]. Dostupné z: https://www.atcc.org/products/htb-85.

45. HERNANDEZ-TAPIA, Laura G.; FOHLEROVA, Zdenka; ZIDEK, Jan; ALVAREZ–PEREZ, Marco A.; CELKO, Ladislav et al. *Effects of Cryopreservation on Cell Metabolic Activity and Function of Biofabricated Structures Laden with Osteoblasts*. Sv. 13. 2020. Č. 8. ISSN 1996-1944. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/ma13081966.

46. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Fluorescein (FITC)* [online]. [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html.

47. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)* [online]. [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html.

48. LAW, Kock-Yee. *Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right*. Sv. 5. American Chemical Society, 2014. Č. 4. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1021/jz402762h.

49. LEE, Ji Eun; GUO, Yanting; LEE, Richard Eungkee; LEUNG, Siu Ning. *Fabrication of electroactive poly(vinylidene fluoride) through non-isothermal crystallization and supercritical CO2 processing*. Sv. 7. The Royal Society of Chemistry, 2017. Dostupné z DOI: http://dx.doi.org/10.1039/C7RA09162A.

50. SEDLAK, Petr; SOBOLA, Dinara; GAJDOS, Adam; DALLAEV, Rashid; NEBOJSA, Alois; KUBERSKY, Petr. *Surface Analyses of PVDF/NMP/[EMIM][TFSI] Solid Polymer Electrolyte*. Sv. 13. 2021. Č. 16. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/polym13162678.

51. MEDEIROS, Khrissy; RANGEL, Eduardo; SANT'ANNA, Alex; LOUZADA, Daniel; BARBOSA, C.; D'ALMEIDA, José Roberto. *Evaluation of the electromechanical behavior of polyvinylidene fluoride used as a component of risers in the offshore oil industry*. Sv. 73. 2018-01. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.2516/ogst/2018058.

52. CAI, Xiaomei; LEI, Tingping; SUN, Daoheng; LIN, Liwei. *A critical analysis of the α, β a γ phases in poly(vinylidene fluoride) using FTIR*. Sv. 7. The Royal Society of Chemistry, 2017. Dostupné z DOI: http://dx.doi.org/10.1039/C7RA01267E.

53. KASPAR, Pavel; SOBOLA, Dinara; CASTKOVA, Klara; KNAPEK, Alexandr; BURDA, Daniel; ORUDZHEV, Farid; DALLAEV, Rashid; TOFEL, Pavel; TRCKA, Tomas; GRMELA, Lubomir; HADAS, Zdenek. *Characterization of Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Electrospun Fibers Doped by Carbon Flakes*. Sv. 12. 2020. Č. 12. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.3390/polym12122766.

54. SHIVA, S. et al. *A review on the recent applications of synthetic biopolymers in 3D printing for biomedical applications*. Sv. 34. 2023. Č. 12. Dostupné z DOI: https://doi.org/10.1007/s10856-023-06765-9.

Seznam symbolů a zkratek

AC	aceton
CAD	angl. Computer-Aided Design
CLSM	angl. Confocal Laser Scanning Microscopy
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DMEM	angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
ECM	extracelulární matrix
EDS	energeticky disperzní rentgenová spektroskopie
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FTIR	angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy
KTI	kostní tkáňové inženýrství
P2VHR	angl. Peak-to-Valley Height Ratio
PBS	angl. Phosphate Buffered Saline
PLA	polylaktid
PVDF	polyvinylidenfluorid
SE	sekundární elektrony
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TI	tkáňové inženýrství