



Studium adsorpce proteinů na polyesterové nanovláknenné materiály

Bakalářská práce

Studijní program:

B3942 Nanotechnologie

Studijní obor:

Nanomateriály

Autor práce:

Jan Kolátor

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra chemie





Zadání bakalářské práce

Studium adsorpce proteinů na polyesterové nanovláknenné materiály

Jméno a příjmení: Jan Kolátor
Osobní číslo: M18000130
Studijní program: B3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Zadávací katedra: Katedra chemie
Akademický rok: 2020/2021

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Charakteristika fyzikálně-chemických vlastností nanovláknenných materiálů (např. morfologie, smáčivost)
3. Adsorpce proteinů – optimalizace procesu adsorpce a desorpce, studium vlivu doby adsorpce
4. Analýza adsorbovaných proteinů
5. Porovnání a vyhodnocení výsledků

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
30 stran
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. Anand, G., Sharma, S., Dutta, A.K., Kumar, S.K., Belfort, G., 2010. Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity. *Langmuir* 26, 10803-10811. <https://doi.org/10.1021/la1006132>
2. Louie, S.M., Tilton, R.D., Lowry, G.V., 2016. Critical review: impacts of macromolecular coatings on critical physicochemical processes controlling environmental fate of nanomaterials. *Environ. Sci. Nano* 3, 283-310. <https://doi.org/10.1039/C5EN00104H>
3. Wei, Q., Becherer, T., Angioletti-Uberti, S., Dzubiella, J., Wischke, C., Neffe, A.T., Lendlein, A., Ballauff, M., Haag, R., 2014. Protein Interactions with Polymer Coatings and Biomaterials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 8004-8031. <https://doi.org/10.1002/anie.201400546>

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce:

9. října 2020

Předpokládaný termín odevzdání:

17. května 2021

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

8. května 2021

Jan Kolátor

Poděkování

Tato bakalářská práce by nemohla vzniknout bez odborných konzultací a pomoci při práci na experimentální části. Rád bych zde poděkoval všem, kteří se podíleli na vytvoření této bakalářské práce. Největší díky patří vedoucí mé bakalářské práce Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za odborné konzultace, nesčetné množství cenných rad, připomínek a nápadů, jak tuto práci vylepšit, a své konzultantce Ing. Šárce Hauzerové za odbornou pomoc při provádění experimentální části, vyhodnocování výsledků, a hlavně za trpělivost a všechny čas, který mi během celé práce věnovala. Dále bych rád poděkoval doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové, Ph.D. za cenné rady a konzultace při analýze smáčivosti, Ing. Kristýně Havlíčkové za přípravu testovaných materiálů, které byly použity v této bakalářské práci a Ing. Janě Müllerové, Ph.D. za provedení infračervené spektroskopie.



Abstrakt

Materiály s nanovláknennou strukturou jsou v oblasti medicíny považované za žhavé téma posledních let. Vývoj těchto materiálů ve tkáňovém inženýrství udělal ohromný pokrok. Nanovláknenné materiály se využívají v cílené dopravě léčiv nebo jako tkáňové nosiče. Pro vývoj těchto materiálů je důležité to, jak na ně organismus bude reagovat. Zásadní význam v odpovědi organismu na materiály má proteinová adsorpce, protože určuje tzv. biologickou identitu materiálů. V této bakalářské práci byla studována proteinová adsorpce na vybrané polyesterové biodegradabilní materiály s rozdílnou morfologií a chemickou strukturou. Byl analyzován vliv morfologie a chemické struktury materiálu na proteinovou adsorpci. U testovaných materiálů byla provedena morfologická analýza a analýza smáčivosti. Následně byla analyzována časová závislost proteinové adsorpce na testované materiály. Proteinová adsorpce byla testována pomocí modelového proteinu (hovězí sérový albumin, BSA). Bylo analyzováno množství slabě a silně vázaných proteinů na materiál ve vybraných časových intervalech pomocí spektrofotometrických, flourimetrických a elektroforetických metod. Z výsledků je patrné, že nejvíce proteinů, jak slabě, tak i silně vázaných, se adsorbovalo na materiál z kyseliny polymléčné. Celkově se navázalo 0,8 mg proteinů na 1 mg vzorku. Časová závislost adsorpce nám ukazuje určitý trend. U materiálů vyrobených pouze z čistého polymeru (polykaprolakton a kyselina polymléčná) je maximální adsorpce v intervalu 1 hodiny, za to pro kopolymery a blendy je maximální adsorpce při 24 hodinách. Ze získaných výsledků vidíme, že morfologie a chemická struktura materiálů ovlivňují množství adsorbovaných proteinů na materiál. Materiál z polykaprolaktonu s vyšší molekulovou hmotností měl vyšší průměry vláken a adsorboval více proteinů než materiál z polykaprolaktonu, který měl nižší molekulovou hmotnost.

Klíčová slova: Tkáňové inženýrství, proteinová adsorpce, nanovláknenné materiály, biodegradabilní polyestery



Abstract

The materials with the nanofiber structure are considered as a hot topic of the last years in the medical science. The development of these materials made a huge progress in the tissue engineering. Nanofiber materials are used as a drug delivery or as scaffolds. The important thing for development of these materials is how the organism will react to them. The protein adsorption is the main thing in the response of the organism to the materials because the protein adsorption determines the biological identity of the materials. In this bachelor thesis the protein adsorption was studied on the chosen biodegradable polyester materials with different morphology and chemical structure. The meaning of the morphology and the chemical structure was analysed upon to a protein adsorption. The morphological analysis and the analysis of the wettability was performed on the tested materials. Then the time dependency of the protein adsorption was analysed on the tested materials. The protein adsorption was tested via modelled protein (BSA). The analysis of weakly and strongly bound proteins on the materials was performed during the time periods via spectrophotometric, fluorimetric and electrophoretic methods. We can see from the results, that the most of the weakly and strongly bound proteins were adsorbed to polymer of the lactic acid. The total amount of adsorbed proteins is 0,8 mg of the protein per 1 mg of the polylactic acid. The time dependency of the adsorption shows some certain trend. The materials created only from pure polymer (polycaprolactone and polylactic acid) have maximal adsorption in 1 hour and on the other side, for the copolymers and blends is a maximal adsorption in 24 hours of adsorption. In the end we can see that the amount of the adsorbed proteins on materials are affected by morphology and chemical structure of the materials. Polycaprolactone with higher molecular weight has higher average of fibers and adsorbed more proteins than polycaprolactone with lower molecular weight.

Key words: Tissue engineering, protein adsorption, nanofiber materials, biodegradable polyester



Obsah

Úvod	12
Teoretická část	13
1 Tkáňové inženýrství	13
2 Tkáňové nosiče (scaffoldy)	16
2.1 Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství.....	17
2.1.1 Metody přípravy nanovláknenných materiálů.....	20
3 Adsorpce proteinů na nanomateriály	27
3.1 Testování adsorpce proteinů	29
Experimentální část	30
4 Materiály a metody.....	30
4.1 Použité chemikálie	30
4.2 Použité přístroje	31
4.3 Použité roztoky	32
4.4 Morfologie materiálů	34
4.5 Smáčivost materiálů.....	34
4.6 Metodika adsorpce a desorpce	35
4.7 Použité metody	37
5 Výsledky a diskuze.....	42
5.1 Morfologie materiálů	42
5.2 Smáčivost materiálů.....	46
5.3 Analýza proteinové adsorpce.....	49
5.3.1 Analýza slabě vázaných proteinů	49
5.3.2 Analýza silně vázaných proteinů.....	51
Závěr	57
Seznam použité literatury	59
Seznam příloh	64



Seznam obrázků

Obrázek 1 – Proces tkáňového inženýrství ; převzato z ((Asadian et al. 2020).....	14
Obrázek 2 – Podobnost scaffoldů s ECM a) SEM snímek decelularizované bazální laminy b) SEM snímek nanovlákných PET scaffoldů c) SEM snímek decelularizovaných průdušinek d) SEM snímek dvoufázových PET scaffoldů;převzato z (Bridge et al. 2015)	17
Obrázek 3 – Chemický vzorec PCL	18
Obrázek 4 – Chemický vzorec PLA	19
Obrázek 5 – Chemický vzorec PGA	20
Obrázek 6 – Chemický vzorec PLCL.....	20
Obrázek 7: Aparatura na jehlové elektrostatické zvlákňování; převzato z ((Ziabari et al. 2009).....	21
Obrázek 8: Aparatura na bez-jehlové elektrostatické zvlákňování; převzato z (M.Moghadam et al. 2016).....	22
Obrázek 9: Schématické znázornění technologie Nanospider™; převzato z (Havlíček et al. 2020).....	22
Obrázek 10: Ilustrace procesu metody melt-blown; převzato z (Zhang et al. 2020).....	23
Obrázek 11: Ilustrace procesu fázové separace; převzato z (Asadian et al. 2020).....	24
Obrázek 12 : Znázornění metody drawing za použití mikropipety; převzato z (Nain et al. 2006).....	26
Obrázek 13: Grafické znázornění tvrdé a měkké korony adsorbované na nanočástici, modré klubka znázorňují slabě vázané proteiny a červená klubka znázorňují silně vázané proteiny; převzato z (Rahman et al. 2013)	27
Obrázek 14: Schéma adsorpce proteinů na materiál , kde dochází ke změně konformace (denaturaci) proteinů; převzato z (Wei et al. 2014).....	28
Obrázek 15: Vpravo: Připravený vzorek na měření kontaktního úhlu; vlevo: přilehlá kapka na materiálu PCL 45, ze které byl následně měřen kontaktní úhel.....	35
Obrázek 16: Grafické schéma experimentu.....	36
Obrázek 17: Kalibrační křivka vytvořena při analýze koncentrace proteinu dle Bradfordovy metody.....	38
Obrázek 18: Reakce CBB s proteiny za změny barvy roztoků z hnědé na modrou.....	39
Obrázek 19: Reakce roztoku BCA s proteiny za vzniku fialového komplexu.....	40



Obrázek 20: SEM snímky a histogramy četností průměrů vláken testovaných materiálů (za sebou PCL 45, PCL 80, PLCL, BL 1:1 a PLA); snímky vlevo-zvětšení 1 000×, měřítko 50 μ, snímky vpravo- zvětšení 5 000×, měřítko 10 μm, dole grafy četností průměrů vláken materiálů.....	45
Obrázek 21 – Krabicový graf porovnávající průměry vláken testovaných materiálů, znaménko (X) znázorňuje průměr vláken materiálů, znaménko (–) znázorňuje medián a znaménko (°) znázorňuje odlehlé hodnoty	46
Obrázek 22: Grafy smáčivosti materiálů – Jednotlivé grafy smáčivosti testovaných materiálů. Testované materiály PCL45, PCL 80, PLCL a BL 1:1 mají časovou osu uvedenou v sekundách a PLA má časovou osu uvedenou v milisekundách; graf porovnání smáčivosti materiálů bez PLA, bez směrodatných odchylek	47
Obrázek 23: Interferogram z infračervené spektroskopie; Porovnání chemického složení BL 1:1	48
Obrázek 24: Graf množství slabě vázaných proteinů na 1mg materiálu (z roztoků po oplachu v PBS) horní graf – analýza pomocí Bradfordovy metody, spodní graf – analýza pomocí metody BCA.....	50
Obrázek 25: Snímky gelů z SDS-PAGE elektroforézy znázorňující vliv doby adsorpce na materiály. V rámečku jsou zvýrazněny doby s nejvyšší adsorpcí silně vázaných proteinů. (A-PCL45, B-PCL80, C-PLCL,D-BL1:1,E-PLA	53
Obrázek 26: Graf koncentrace silně vázaných proteinů na materiál na 1 mg vzorku, horní graf - analýza podle metody BCA, dolní graf- analýza podle metody Quant-iT	54
Obrázek 27: Grafy celkového množství adsorbovaných proteinů, 1. graf doba adsorpce 1 hodina a 2. graf doba adsorpce 24 hodin	55

Seznam Tabulek

Tabulka 1: Použité chemikálie na přípravu nanovlákných vrstev	30
Tabulka 2: Použité proteiny a chemikálie na stanovení jejich koncentrací.....	30
Tabulka 3: Použité chemikálie na přípravu roztoku PBS.....	30
Tabulka 4: Použité chemikálie pro SDS-PAGE elektroforézu.....	31
Tabulka 5: Použité přístroje a programy	31
Tabulka 6: Použité roztoky.....	32
Tabulka 7: Testované materiály	42
Tabulka 8: Průměry vláken, interval spolehlivosti 95 % a plošná hmotnost testovaných materiálů.....	43



Seznam použitých zkratek

AC	Alternating current
BCA	Kyselina bicinchoninová
BL 1:1	Blend 1:1 Poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) a polycaprolactone (80)
BSA	Hovězí sérový albumin
CBB	Comassie Brilliant Blue
DC	Direct current
ECM	Extracelulární matrix
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GPC	Gelová permeační chromatografie
M_w	Molekulová hmotnost
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Polykaprolakton
PET	Polyethylentereftalát
PGA	Kyselina polyglykolová
PLA	Kyselina polymléčná
PLCL	Kopolymer PLA a PCL
ROP	Ring-opening polymerization
RT	Pokožová teplota
SDS	Dodecylsírán sodný
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SPR	Metoda rezonance povrchových plazmonů
TI	Tkáňové inženýrství
WCA	Water contact angle



Úvod

Nanotechnologie a nanomateriály jsou trendem poslední doby. Získávají si své místo v mnoha oblastech průmyslu. Lékařské technologie a postupy nejsou výjimkou a také se jako ostatní průmyslová odvětví posouvají kupředu. Oblast tkáňového inženýrství, která se zabývá léčbou poškozených tkání či cílenou dopravou léčiv, je vhodným příkladem. V postupném vývoji tkáňového inženýrství začínají nanomateriály získávat na důležitosti. Nanovláknenné materiály, které svou strukturou připomínají přirozenou mezibuněčnou hmotu, vykazují potenciál pro využití v medicínské oblasti. Je zřejmé, že materiály nesmí být toxické a po implantaci do živého organismu nesmí docházet k zánětlivým reakcím. Aby se předešlo nežádoucím reakcím je potřeba testovat chování materiálů. Důležitou roli v odpovědi organismu na materiál hraje proteinová adsorpce. Materiál po implantaci neinteraguje přímo s buňkami organismu, ale je okamžitě obalen vrstvou proteinů. Vrstva proteinů na materiálu udává tzv. biologickou identitu a ta určuje, jak bude materiál interagovat s okolními buňkami. Vývoj a testování materiálů skrze proteinovou adsorpci je vhodné pro jejich následné využití v lékařské praxi. Proteinová adsorpce je ovlivněna mnohými faktory např. chemickou strukturou a morfologií materiálů. Teoretická část této bakalářské práce se zpočátku zabývá tkáňovým inženýrstvím, kde je popsán jeho historický vývoj a využití v praxi. Následuje kapitola o tkáňových nosičích, která je zaměřena na využívané materiály. Podrobně jsou zde popsány nanovláknenné polymerní materiály a jejich metody přípravy. Poslední kapitola teoretické části se zabývá proteinovou adsorpcí, kde se vysvětluje princip interakce materiálu s proteiny. Experimentální část této práce se zaměřuje na studium vlivu chemické struktury a morfologie vybraných nanovláknenných materiálů na proteinovou adsorpci a dále je studována časová závislost proteinové adsorpce na vybrané materiály.

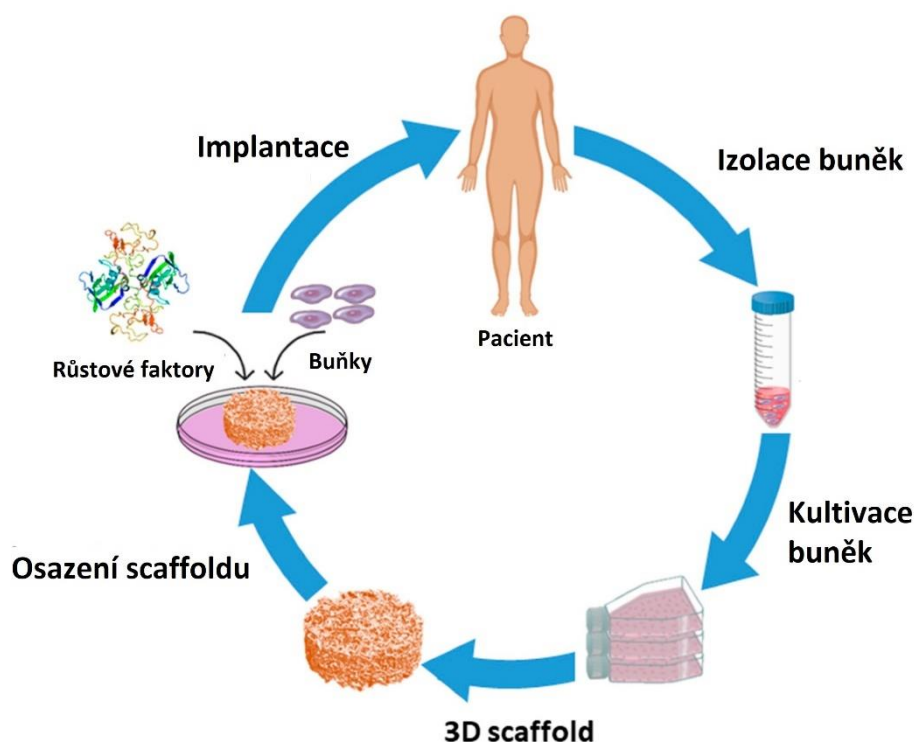


Teoretická část

1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární odvětví, které využívá znalosti z inženýrství, lékařství, biologie a materiálových studií k léčbě nebo k úplné náhradě poškozené tkáně. V praxi pokrývá široké spektrum aplikací, které se snaží zachránit nebo nahradit poškozenou tkáň (např. kosti, krevní cévy, chrupavky, svaly, kůže atd.) (S. Safinsha a Mubarak Ali 2020). Tkáňové inženýrství je považováno za vlastní vědní obor. (Asadian et al. 2020). Jelikož se v lékařství nenachází dostatek dárců tkání, je potřeba připravit náhradní tkáně, které pomohou tento problém vyřešit. K vytvoření náhradní tkáně mohou sloužit zdravé tkáně daného pacienta (autotransplantace), tkáně získané od dárce (allografty) (S. Safinsha a Mubarak Ali 2020), nebo také tkáně získané z jiného organismu (xenotransplantace) (Cascalho a Platt 2008). U takto vytvořených tkání může dojít po transplantaci do těla pacienta k nežádoucím reakcím imunitního systému. Spektrum využití tkáňového inženýrství je velmi široké. Spektrum využití tkáňového inženýrství je možné dělit podle různých přístupů. Jeden z nich je podle zvoleného způsobu léčby. K léčbě poškozených tkání se využijí pouze zdravé buňky, které se následně implantují na poškozenou tkáň a dojde k její regeneraci. Jako další je možné využití tkáňových nosičů (angl. scaffoldů) vyrobených z biomateriálů nebo následná kombinace buněk s tkáňovým nosičem (Ratner et al. 2004) viz obrázek 1, který popisuje tento přístup tkáňového inženýrství. Jako první se vyrobí tkáňový nosič, dále dochází k izolaci buněk z živého organismu, které se následně nasadí na tkáňový nosič a implantují se na poškozenou tkáň (Asadian et al. 2020). Jedna z dalších možností je také decelularizace extracelulární matrix (ECM) (buněčná složka ECM se odstraní, ale zachová se její morfologie) k vytvoření biomateriálu, který je možné osadit novými buňkami a využít následně jako implantát do organismu (Chan a Leong 2008).





Obrázek 1 – Proces tkáňového inženýrství; převzato z (Asadian et al. 2020)

Dále lze tkáňový nosič funkcionalizovat pro cílenou dopravu léčiv (angl. drug-delivery). Jedná se o navázání léčiva na materiál s vhodnými vlastnostmi, díky kterým se léčivo uvolní na předem dané poškozené místo, je možné ovlivnit množství a rychlost uvolnění léčiva (př. léčba rakoviny, při které se uvolní přesné množství léčivých látek, které zničí nádorové buňky, ale nezasáhne zdravé buňky v okolí) (Bansal et al. 2020). Odlišným přístupem využití tkáňového inženýrství je podle cílové tkáně. Vědci se pokusily vytvořit prakticky všechny savčí tkáně, mezi nejvýznamnější oblasti tkáňového inženýrství patří kostní a kloubní náhrady, regenerace pokožky při popáleninách či jiných poraněních, regenerace krevních cév nebo při léčbě poškozených orgánů (např. játra, slinivka břišní atd.) (Ratner et al. 2004). Výzkum v oblasti biomateriálů začal v 50. letech 20. století, avšak důkazy nezáměrných implantací cizího materiálu do lidského těla nacházíme již z doby pravěku. Archeologický nález lidské kostry se zabodnutým kopím v kyčli dokazuje, že lidské tělo je schopné se vypořádat a tolerovat cizí materiály (Ratner et al. 2004). První éru materiálů můžeme označit jako období před 2. světovou válkou, kdy implantáty neměly vysokou úspěšnost kvůli nízké biokompatibilitě (např. hliníkové a zinkové náhrady). Mezi 50. a 60. lety minulého století začal vývoj druhé generace materiálů, jejímž hlavním cílem bylo zkoumaní toxicity a biokompatibility materiálů, které byly běžně dostupné z poválečného období (např.

titan, nerezová ocel, teflon, nylon). Z této doby je známo mnoho nových léčebných přístrojů, mezi nejdůležitější patří např. kardiostimulátor. Na rozdíl od druhé éry se ve třetí éře začaly vyvíjet materiály přímo pro lékařské účely tak, aby nedocházelo k nežádoucím interakcím mezi materiálem a organismem jako např. bioskla, polyethylenglykol atd. Jako poslední éra ve vývoji biomateriálů se označuje období od nového tisíciletí. V moderní éře se využívá poznatků z moderní biologie, díky kterým se mohou vyvíjet biomateriály pro konkrétní biologické aplikace (Ratner et al. 2004).



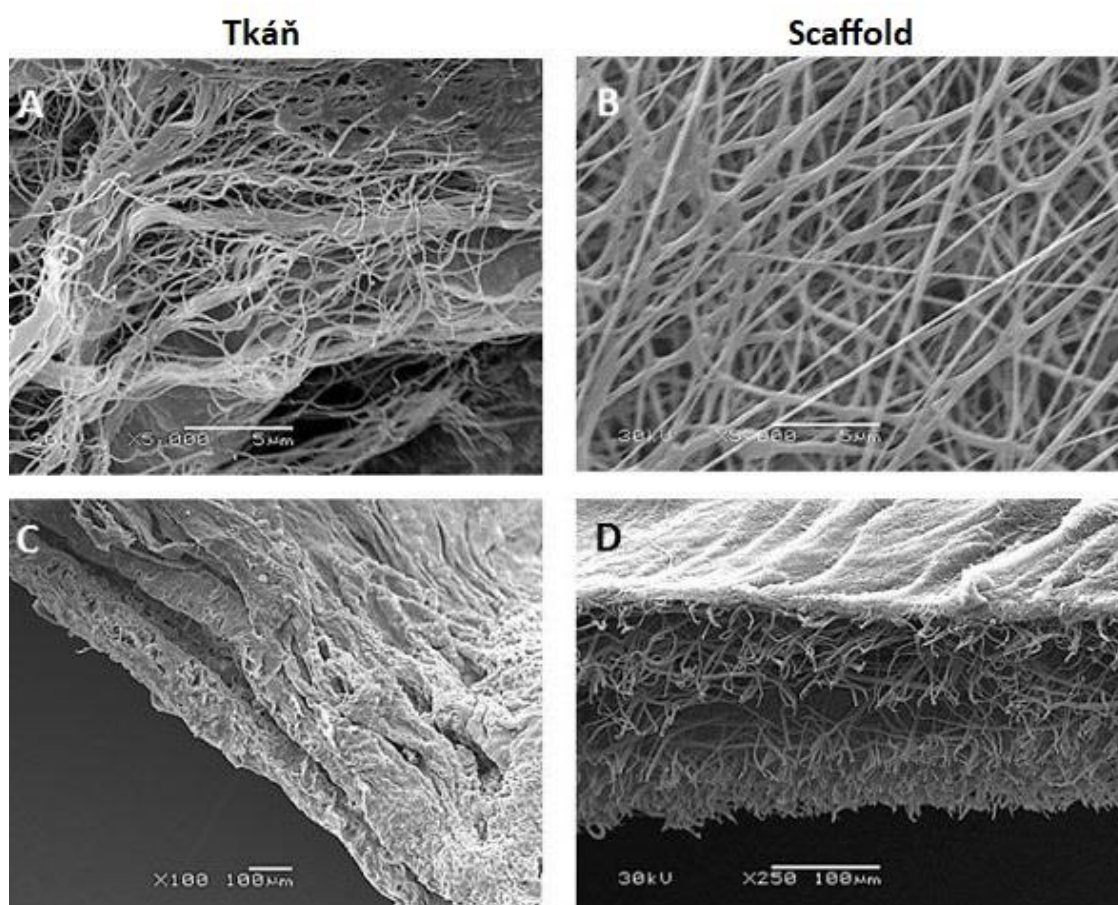
2 Tkáňové nosiče (scaffolds)

Jedná se o podpůrné struktury při regeneraci buněk. Scaffolds nesmí vyvolávat zánětlivé a toxické reakce v lidském organismu, které by mohly zamezit regeneraci poškozené tkáně (Tian et al. 2012). Chemicko-fyzikální a povrchové vlastnosti použitých materiálů mají vliv na interakce mezi tkání a implantovaným materiálem. Požadované vlastnosti scaffoldu souvisí s danou cílovou tkání tzn. pro každou tkáň jsou vhodné jiné vlastnosti. Mezi základní vlastnosti patří biokompatibilita, biodegradabilita, stavba scaffoldu a mechanické vlastnosti. Materiály nesmí být toxické. Biodegradabilita je vlastnost, u které je zkoumaná rychlost degradace materiálu a následné degradační produkty. Stavba scaffoldu je specifická vlastnost a určuje, zda se jedná o 2D či 3D strukturu, dále se zkoumá porozita struktury a drsnost povrchu. Tkáňové nosiče musí mít vhodné mechanické vlastnosti (např. pevnost, pružnost atd.) (S. Safinsha a Mubarak Ali 2020). Před jakoukoliv lékařskou aplikací materiálu je důležité znát jeho vlastnosti. Po implantaci do organismu může dojít ke změně vlastností daného materiálu (např. změna mechanických vlastností vlivem degradace) (Ratner et al. 2004). Nejčastěji se materiály vhodné pro výrobu scaffoldů dělí na tři skupiny, kterými jsou kovy, keramika a polymery (Ratner et al. 2004). Kovy jsou často používané, díky jejich dobrým mechanickým vlastnostem především vynikají svou pevností, proto se využívají jako kostní či kloubní náhrady. Po implantaci kovových materiálů do těla může docházet vlivem prostředí ke korozím, to může mít za následek změnu jejich funkce, a proto je jejich využití omezenější. Nejčastěji se na výrobu scaffoldů používá nerezová ocel, kobalt nebo titan (Dolcimascolo et al. 2019). Keramické materiály jsou pevné anorganické sloučeniny (Ratner et al. 2004), které jsou vysoce biokompatibilní, proto se běžně používají pro léčbu poškozených kostí, ale jejich využití je značně omezeno kvůli jejich křehkosti (Dolcimascolo et al. 2019). Polymerní scaffolds jsou obvykle dlouhé organické řetězce složené z menších opakujících se jednotek (monomerů), ale existují i výjimky, které jsou anorganického charakteru např. silikony (Bauer et al. 2013). Polymerní materiály budou více popsány v kapitole 2.1.



2.1 Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství vytváří biologické náhrady sloužící k regeneraci poškozených tkání pomocí zdravých buněk a tkáňových nosičů (Asadi et al. 2020). Vývoj ve tkáňovém inženýrství se vydal směrem, ve kterém se scaffoldy snaží podobat přirozené mezibuněčné hmotě (extracelulární matrix, ECM). ECM nemá pouze mechanickou funkci, ale také podporuje buněčnou adhezi a proliferaci. Předpokládalo se, že scaffoldy, které by se podobaly ECM nejen svými chemickými vlastnostmi, ale i svou strukturou, by mohly mít podobnou funkci v organismu. Jelikož je mezibuněčná hmota tvořena mikrovláknny a nanovláknny, začaly se ve tkáňovém inženýrství využívat mikro/nanovláknenné materiály. Podobnost mezi ECM a nanovláknennými materiály je možné vidět na obrázku 2, kde jsou porovnávány nanovláknenné PET scaffoldy s decelularizovanými ECM) (Ma et al. 2005).



Obrázek 2 – Podobnost scaffoldů s ECM a) SEM snímek decelularizované bazální laminy b) SEM snímek nanovláknenných PET scaffoldů c) SEM snímek decelularizovaných průdušinek d) SEM snímek dvoufázových PET scaffoldů; převzato z (Bridge et al. 2015)

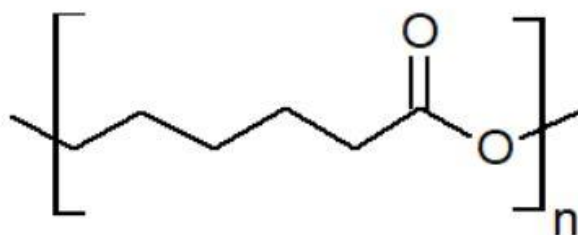
Pro výrobu nanovláknenných scaffoldů se používají polymerní materiály. Polymery se nejčastěji dělí na přírodní a syntetické, dále je můžeme dělit na biodegradabilní a nebiodegradabilní (Dhandayuthapani et al. 2011). Přírodní polymery jsou nejčastěji získávány z živých organismů. Do přírodních polymerů využívaných v TI řadíme proteiny (např. kolagen, fibrin, elastin) a polysacharidy (např. celulóza chitin, chitosan). Tyto polymery se mohou využívat k širokému spektru aplikací v tkáňovém inženýrství (např. tkáňové nosiče, cílená doprava léčiv) (Asadi et al. 2020). Syntetické polymery jsou vyráběny průmyslovou syntézou a nejsou získávány z přírodních zdrojů. Syntetické polymery dělíme do různých skupin podle jejich chemické struktury. Mezi využívané polymery patří polyvinylalkohol, který je často využívaný v tkáňovém inženýrství (např. při regeneraci pokožky) (Teixeira et al. 2019). Dalším využívaným polymerem je polyethylenglykol, který se využívá k cílené dopravě léčiv (Ratner et al. 2004). Mezi využívané polymery patří polyuretany, které se využívají při léčbě kardiovaskulárních onemocněních (např. regenerace cév, srdeční chlopně atd.) (He a Benson 2013). Další často zkoumanou skupinou jsou polyestery (Asadi et al. 2020).

Polyestery

Často používanou skupinou polymerů jsou polyestery. Jedná se o biokompatibilní a degradabilní polymery, které ve své chemické struktuře obsahují esterovou vazbu (Asadi et al. 2020). V oblasti medicíny se mohou využít např. jako stenty v kardiologii, nosiče léčiv, při regeneraci krevních cév atd. (Fernández et al. 2012).

Polykaprolakton (PCL)

Jedná se o semikrystalický alifatický polyester (viz obrázek 3), který se vyrábí polymerizací monomeru kaprolaktonu, dochází zde k otevření kruhu cyklického monomeru (ring-opening polymerisation, ROP). PCL je hydrofobní materiál.

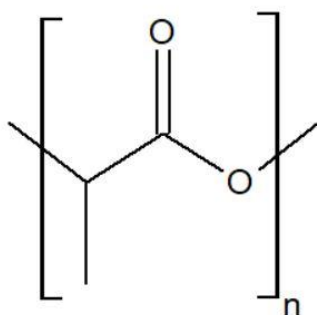


Obrázek 3 – Chemický vzorec PCL

Vlastnosti polymerů závisí na molekulové hmotnosti (M_w). Pokud je molekulová hmotnost PCL vysoká ($M_w > 20\,000$), vyskytuje se PCL jako pevný polymer, ale jestliže je jeho molekulová hmotnost nižší ($M_w < 20\,000$), je voskovité charakteru. Pevnost materiálu se pohybuje v rozmezí 12–30 MPa a jelikož disponuje vysokou elasticitou, tak ho můžeme prodloužit o 400–900 %. Polykaprolakton má nízkou teplotu skelného přechodu ($\sim -60\text{ }^\circ\text{C}$) a jeho teplota tání se pohybuje okolo $60\text{ }^\circ\text{C}$ (Jiang a Zhang 2013). PCL podléhá enzymatické degradaci. Degradace PCL je pomalejší (může trvat déle než 1 rok) než u kyseliny polymléčné a kyseliny polyglykolové, a proto se využívá pro cílenou dopravu léčiv a dlouhodobé aplikace tkáňového inženýrství (Sinha et al. 2004).

Kyselina polymléčná (PLA)

Dalším polymerem, který se řadí mezi alifatické polyestery (viz obrázek 4), je kyselina polymléčná. Jedná se o hydrofobní materiál, ale v porovnání s PCL je PLA více hydrofilní, monomerem je kyselina mléčná, která vzniká kvašením uhlovodíků (sacharidů). Kyselina polymléčná se vyskytuje ve dvou enantiomerech, jedním z nich je L-kyselina polymléčná (PLLA) a druhým je D-kyselina polymléčná (PDLA) (Mu et al. 2019). Výroba PLA probíhá polymerizací otevřením kruhu (ROP) dimeru kyseliny mléčné (Jiang a Zhang 2013). Přírodně se vyskytující monomer je kyselina L-mléčná, tvořící kyselinu poly-L-mléčnou, která je krystalickým polymerem.

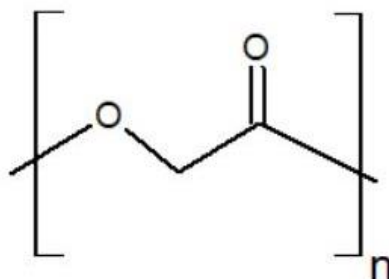


Obrázek 4 – Chemický vzorec PLA

Teplota skelného přechodu se nachází mezi $60\text{--}65\text{ }^\circ\text{C}$ a teplota tání odpovídá cca $175\text{ }^\circ\text{C}$. Pevnost je okolo 4,8 GPa. Degradace je sice rychlejší než u PCL, ale stále je označována za pomalou, jelikož může trvat měsíce (Ghanbarzadeh a Almasi 2013). PLA je biokompatibilní a degradabilní polymer, který se často využívá v tkáňovém inženýrství. (Calori et al. 2020).

Kyselina polyglykolová (PGA)

Mezi využívané alifatické polyestery dále patří kyselina polyglykolová (viz obrázek 5). Syntéza probíhá otevřením cyklického kruhu (Jiang a Zhang 2013).

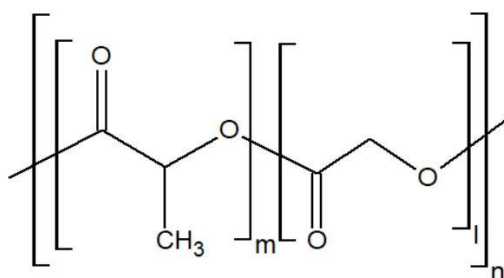


Obrázek 5 – Chemický vzorec PGA

Teplota skelného přechodu je 35–40 °C a teplota tání se pohybuje mezi 225–230 °C. V porovnání s PCL a PLA se jedná o nejpevnější polymer (pevnost 7 GPa) a také podléhá nejrychlejší degradaci. (Ghanbarzadeh a Almasi 2013).

Kopolymer kaprolaktonu a kyseliny mléčné (PLCL)

Kopolymery jsou vyráběny s cílem upravit vlastnosti původních homopolymerů (např. rychlost degradace, mechanické vlastnosti atd.) (Mikeš et al. 2019).



Obrázek 6 – Chemický vzorec PLCL

Kopolymery mohou být náhodné (statistické) a blokové. Struktura náhodných kopolymerů je tvořena z nahodile uspořádaných monomerů. Vlastnosti PLCL se mění v závislosti na poměru zastoupení LA:CL. Statistický PLCL se často tvoří v poměrech 90:10, 80:20, 70:30 (Fernández et al. 2012).

2.1.1 Metody přípravy nanovláknenných materiálů

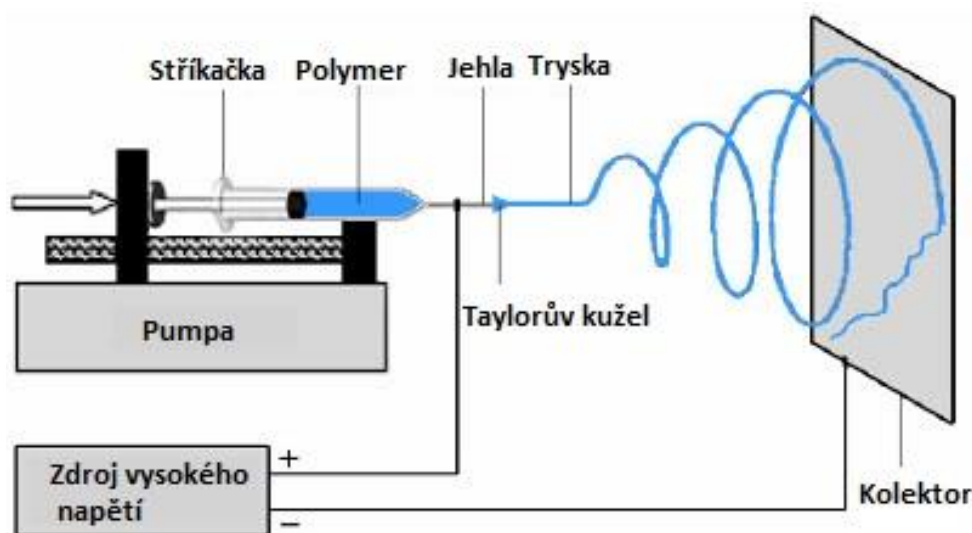
Materiály pro tkáňové inženýrství jsou vyráběny různými metodami. Jednotlivé metody přípravy se liší svou náročností a produktivitou. Vytvořené vláknenné materiály



z odlišných metod mají jiné vlastnosti jako např. orientace vláken, průměr vláken, rovnoměrnost atd. (Jirsák et al. 2003).

Elektrostatické zvlákňování (Electrospinning)

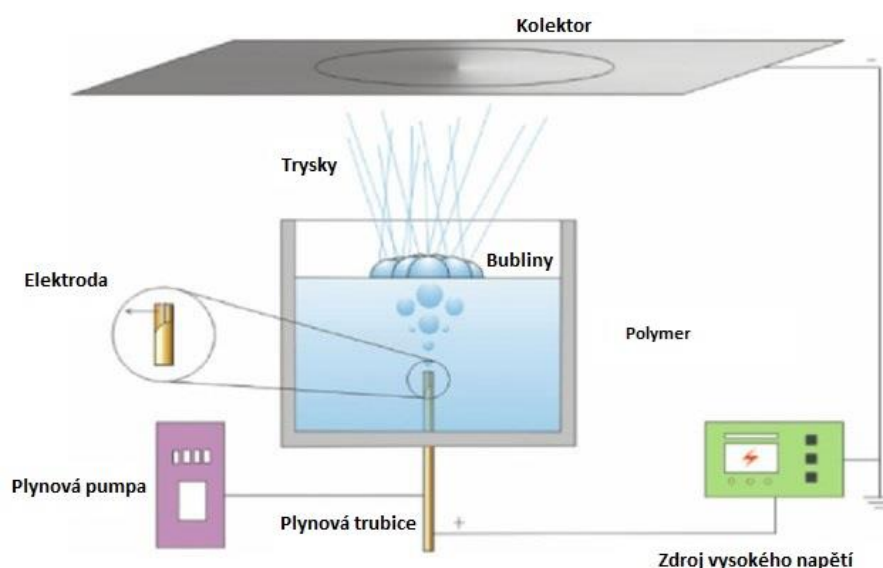
Při elektrostatickém zvlákňování se využívá elektrického pole k tvorbě nanovláken (s průměry menšími než 1 μm) z polymerního roztoku nebo taveniny (Frenot a Chronakis 2003). Vzhled a vlastnosti výsledných vláken závisí na více proměnných, kterými jsou např. velikost intenzity elektrického pole, druh rozpouštědla, koncentrace polymerního roztoku, typ zvlákňovacího systému atd. (Ratner et al. 2004). Elektrostatické zvlákňování může být jehlové (viz obrázek 7) nebo bez-jehlové (viz obrázek 8). Jehlové elektrostatické zvlákňování využívá kapilární jehly. Konec kapilární jehly, kde se díky svému povrchovému napětí udržuje kapka polymerního roztoku, vystavíme vysokému elektrickému napětí, tím se vyvolá náboj na povrchu kapaliny. Zvyšováním intenzity elektrického pole se tekutina na špičce prodlužuje a vytváří tzv. Taylorův kužel. Při překročení kritického bodu (tzn. že elektrostatická síla je větší než povrchové napětí polymeru), se nabitý paprsek uvolní z hrotu kužele a dochází k jeho zvlákňování a odpaření rozpouštědla. Vytvořená vlákna se následně přichytávají na opačně nabitý kolektor, který bývá vyrobený z kovu (Frenot a Chronakis 2003).



Obrázek 7: Aparatura na jehlové elektrostatické zvlákňování; převzato z (Ziabari et al. 2009)

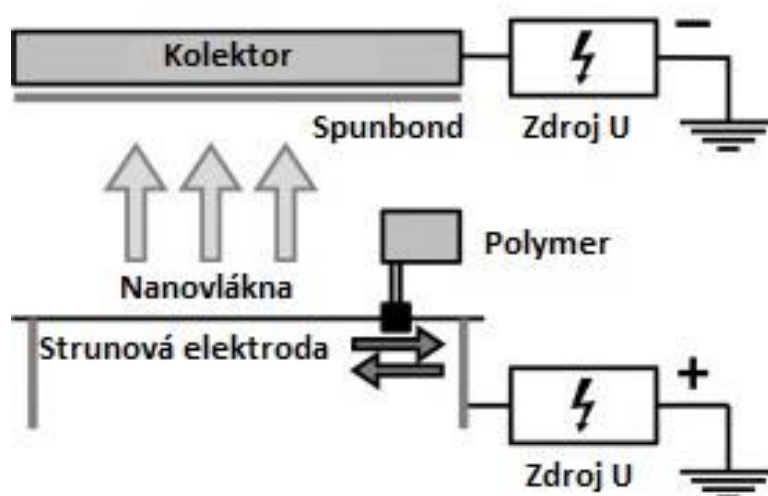
Bez-jehlové elektrostatické zvlákňování využívá zvlákňování z volného povrchu polymerního roztoku či taveniny. Působením elektrostatického pole se na povrchu

roztoku vytváří mnoho polymerních trysek, ze kterých jsou tvořena nanovlákná, které jsou přichyceny na opačně nabitý kolektor. Při porovnání obou metod elektrostatického zvlákňování je bez-jehlová metoda produktivnější (M.Moghadam et al. 2016).



Obrázek 8: Aparatura na bez-jehlové elektrostatické zvlákňování; převzato z (M.Moghadam et al. 2016)

Speciálním typem bez-jehlové metody je technologie Nanospider™ (viz obrázek 9), která byla vyvinuta společností Elmarco v České republice (M.Moghadam et al. 2016). Strunová a kolektorová elektroda je připojena ke zdroji vysokého napětí. Následně jsou z volného povrchu polymerního roztoku, který se nachází na strunové elektrodě, vytvořena nanovlákná, které se přichytí na kolektor (Havlíček et al. 2020).



Obrázek 9: Schématické znázornění technologie Nanospider™; převzato z (Havlíček et al. 2020)

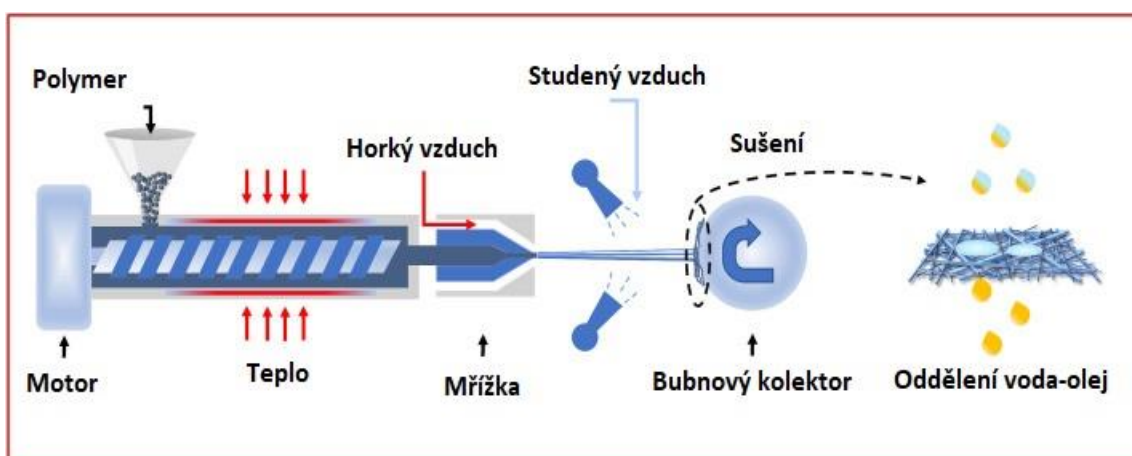
Pomocí technologie Nanospider™ byly vyrobeny materiály (PCL, PLA, PLCL a BL 1:1) pro experimentální část této práce. U elektrostatického zvlákňování můžeme využívat stejnosměrný proud (DC electrospinning) nebo střídavý proud (AC electrospinning). Aparatura pro AC electrospinning se skládá z vysokonapěťového transformátoru, dávkovací pumpy a zvlákňovací elektrody (Havlíček et al. 2020), není zde potřebný uzemněný kolektor. Produktivita je u AC electrospinningu vyšší (Balogh et al. 2016).

Odstředivé zvlákňování (Forcespinning)

Metoda forcespinning využívá odstředivých sil na rozdíl od electrospinningu, kde se využívají síly elektrostatické. Ve středu bubnu se otáčí kolem své osy zvlákňovací tryska s polymerním roztokem a působením odstředivých sil se tvoří na kolektoru souměrná vlákna (Nahida Sultana et al. 2017). Specifickou metodu elektrostatického zvlákňování je centrifugal electrospinning. Dochází zde ke kombinaci odstředivého zvlákňování a elektrostatického zvlákňování. Na polymerní roztok působí síly elektrostatické i síly odstředivé. Mezi vlastnosti, které mají vliv na výsledná vlákna patří rychlost otáčení zvlákňovací trysky, vzdálenost trysky od kolektoru, velikost elektrického napětí atd. (Havlíček et al. 2020).

Melt-Blown

U metody melt-blown se nepoužívá rozpouštědlo, využívá se zde čisté taveniny polymeru, k vytvoření taveniny je potřeba polymer dostatečně zahřát (překročit jeho teplotu tání) (Zhang et al. 2020).



Obrázek 10: Ilustrace procesu metody melt-blown; převzato z (Zhang et al. 2020)

Tavenina polymeru je za pomoci horkého vzduchu prohnána přes pórovitou zvlákňovací mřížku, která určuje velikost vytvořených vláken. Vytvořená vlákna se navíjí na rotující buben (kolektor), kde se vytvoří vrstva polymeru, která se na vzduchu nechá vysušit (Zhang et al. 2020).

Solvent casting

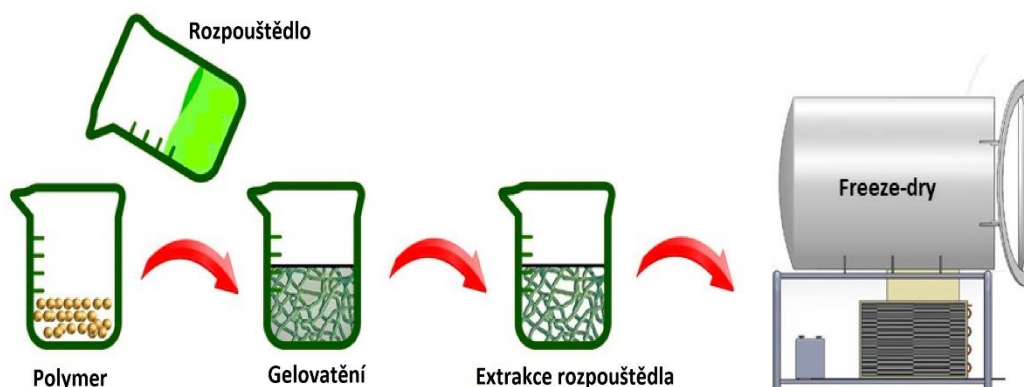
Metoda využívající porogen, který se přidá do polymerního roztoku. Jako porogen se používají soli např. NaCl. Velikost póru závisí na velikosti molekul zvoleného porogenu. Po vytvoření směsi z polymerního roztoku a porogenu, se odpařuje rozpouštědlo a následně se pomocí vody rozpustí a vymyje porogen od vzniklé pórovité struktury (S. Safinsha a Mubarak Ali 2020). Metoda vytváří 3D pórovité scaffoldy pro tkáňové inženýrství, pórovitost může dosahovat až 90 % (Ong et al. 2019).

Self-Assembly

Většina ostatních výrobních metod funguje na principu top-down (tzn. z velkého objemu tvoříme nanovlákná), metoda self-assembly využívá princip bottom-up. Využívá se samovolného sestavení jednotlivých molekul do větší struktury. Jednou z možných vytvořených struktur jsou nanotrubičky, sloužící jako nosiče léčiv (Asadian et al. 2020; Li et al. 2021).

Fázová separace

Hlavní princip této metody je izolace dvou látek v odlišném skupenství (viz obrázek 11).



Obrázek 11: Ilustrace procesu fázové separace; převzato z (Asadian et al. 2020)

Teplota polymerního roztoku se sníží, aby z roztoku vznikl gel. Původní rozpouštědlo se nahradí odlišným rozpouštědlem. Odstraněním původního rozpouštědla se z gelu vytvoří 3D pórovitá struktura. (Asadian et al. 2020; Petráš et al. 2009).

Freeze drying

Principiálně jednoduchá metoda, ve které dojde ke zmrazení polymerního roztoku, ve kterém se vytvoří ledové krystaly rozpouštědla. Rozpouštědlo se sublimací odpaří z polymeru a vytvoří se čistá polymerní pórovitá struktura (S. Safinsha a Mubarak Ali 2020).

3D tisk

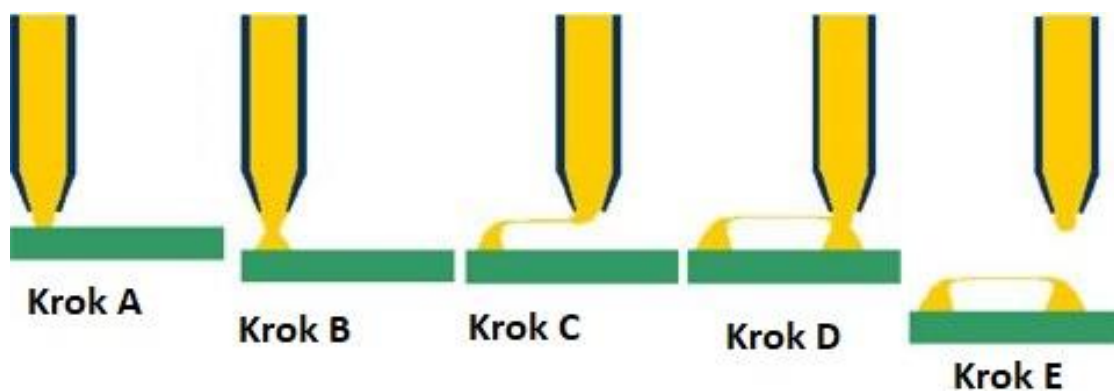
Jedna z nejnovějších používaných metod. Jak bylo zmíněno dříve, některé metody přípravy nanovlákných scaffoldů jsou schopné vytvořit 3D scaffoldy pro tkáňové inženýrství, ale jejich struktura je tvořena nahodile, tzn. nelze regulovat velikosti pórů, průměry vláken a každý stejně vyrobený materiál se nepatrně liší. Struktura u vytisknutých scaffoldů je řízená počítačem a je tvořena metodou bottom-up tak, aby na sebe všechny vrstvy dokonale pasovaly (S. Safinsha a Mubarak Ali 2020). Biodegradabilní a biokompatibilní materiály (popsané dříve jako polykaprolakton, kyselina polymlečná a jejich kopolymery) se jeví jako vhodní kandidáti pro experimentální výrobu pomocí 3D tiskáren (Zhou et al. 2021). PCL a PLA nacházejí využití díky svým mechanickým vlastnostem převážně ve výrobě kostních nebo kloubních náhrad. Výroba scaffoldů pomocí 3D tisku vykazuje obrovský potenciál i v dalších oblastech tkáňového inženýrství (např. regenerace cév, kůže atd.) (Vyas et al. 2021; Zhou et al. 2021).

Drawing

Na rozdíl od ostatních metod drawing nevyniká vysokou produktivitou, ale oproti ostatním dokáže vytvořit vlákna orientovaná do daných struktur, u ostatních metod se vlákna tvoří nahodile. Vlákna je možné vytvářet z tavenin nebo z polymerních roztoků (Strnadová et al. 2020).



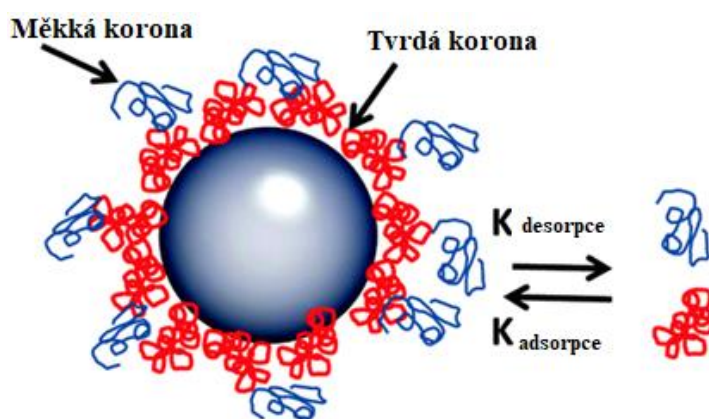
S použitím skleněné mikropipety vytvoříme na podložce kapku z polymerního roztoku. Vlákno vytvoříme tažením do určitého místa, kde na konci vytvoříme druhou kapku pro upevnění. Během tažení se odpařuje rozpouštědlo a vzniká samostatné vlákno (viz obrázek 12) (Nain et al. 2006).



Obrázek 12: Znárodnění metody *drawing* za použití mikropipety; převzato z (Nain et al. 2006)

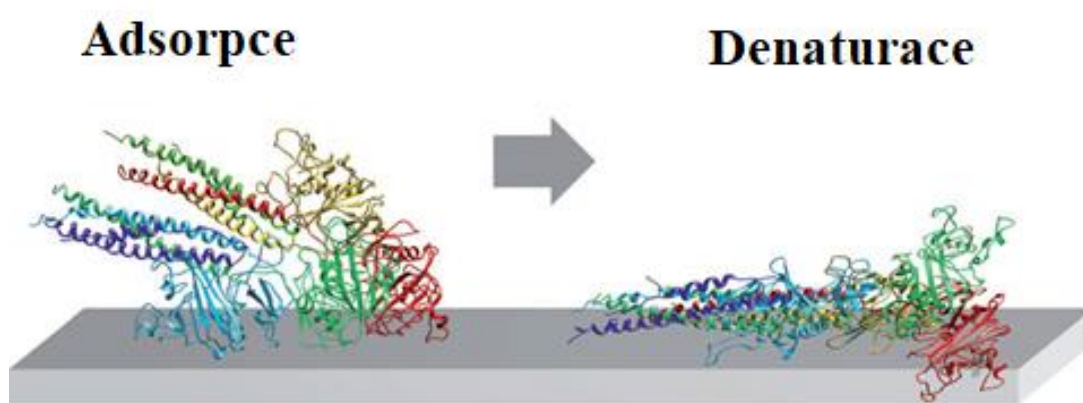
3 Adsorpce proteinů na nanomateriály

Materiál ihned po implantaci do organismu reaguje s proteiny, vytváří na povrchu tzv. koronu (vrstva proteinů na povrchu materiálu). Jelikož je materiál okamžitě obalen proteiny nedochází k přímému kontaktu materiálu s okolními buňkami (Wilson et al. 2005). Proteinová korona ovlivňuje vlastnosti materiálu (např. povrchová struktura, náboj), udává jeho „biologickou identitu“, a právě biologická identita je tím faktorem, který určuje fyziologickou odpověď při reakci materiálu s okolními buňkami. Vlastnosti materiálu, mezi které patří struktura materiálu (2D nebo 3D struktura), porozita materiálu, struktura povrchu, ovlivňují množství a typ navázaných proteinů na materiál. Nejčastější biologické prostředí, se kterými materiál interaguje jako první, je krev. V krevní plazmě se nacházejí stovky různých proteinů a teoreticky řečeno materiál může reagovat s každým z nich. (Walkey a Chan 2012). Proteiny s vyšší afinitou k materiálu tvoří tzv. tvrdou koronu (hard corona), zatímco proteiny, které mají nižší afinitu tvoří tzv. měkkou koronu (soft corona). V rámci proteinové korony zjistíme, že zde dochází k interakci protein-materiál nebo k interakci mezi dvěma proteiny. Na to, jak interagují proteiny tvrdé a měkké korony, existuje více teorií. První teorie vysvětluje tvrdou koronu, jako proteiny, které interagují přímo s materiálem. Měkká korona je složená pouze slabě vázanými proteiny pomocí interakce protein-protein. Jinak řečeno, měkká korona je navázána na tvrdou koronu (viz obrázek 13) (Walkey a Chan 2012).



Obrázek 13: Grafické znázornění tvrdé a měkké korony adsorbované na nanočástici, modrá klubka znázorňují slabě vázané proteiny a červená klubka znázorňují silně vázané proteiny; převzato z (Rahman et al. 2013)

Další teorie říká, že jak tvrdá korona, tak i měkká korona, může interagovat přímo s materiálem, ale liší se zde jejich vazebná energie, která je u silně vázaných proteinů vyšší než u slabě vázaných. Rozdíl mezi těmito hypotézami je teoretický, ale experimentální výsledky, které porovnávají množství adsorbovaných proteinů, se výrazně neliší (Walkey a Chan 2012). Jelikož se jedná o dynamický proces, struktura proteinové korony není stálá a pořád se mění. Není tedy možné představit obecný vzorový model proteinové korony pro všechny materiály. U adsorbovaných proteinů může docházet k jejich denaturaci (změna jejich konformace) (viz obrázek 14) a následně k jejich desorpci z materiálu.



Obrázek 14: Schéma adsorpce proteinů na materiál, kde dochází ke změně konformace (denaturaci) proteinů; převzato z (Wei et al. 2014)

Na začátku se adsorbují proteiny s nejvyšší koncentrací, postupem času jsou vystřídány proteiny s vyšší afinitou k materiálu, dochází zde k tzv. Vromanovu efektu (Rahman et al. 2013). Proteiny tvrdé korony jsou adsorbovány během několika vteřin, na rozdíl od proteinů měkké korony, kterým adsorpce může trvat několik minut až hodin. Následná desorpce probíhá naopak, rychleji se zde desorbují proteiny měkké korony, jelikož se jedná o slabě vázané proteiny, stačí k jejich uvolnění nižší energie. Tvrdá korona zůstává adsorbovaná na materiál déle než měkká, proto je její význam při určování fyziologické odpovědi považován za důležitější (Walkey a Chan 2012). Hydrofilicita a hydrofobicita materiálů patří mezi základní parametry proteinové adsorpce. Hydrofobní materiály adsorbují jiné typy proteinů než materiály hydrofilní kvůli své afinitě k molekulám vody, kterými jsou proteiny v organismu obaleny. Globulární proteiny se snáze adsorbují na hydrofobní materiály. Hydrofobní materiály více ovlivňují denaturaci adsorbovaných proteinů.

3.1 Testování adsorpce proteinů

Proteiny v roztoku můžeme identifikovat pomocí běžných biochemických metod (např. spektrofotometrie). Analýza adsorbovaných proteinů je obtížnější, jelikož je musíme analyzovat přímo z povrchu materiálu nebo z roztoku po desorpci adsorbovaných proteinů z materiálu. U proteinové adsorpce dochází k ovlivnění druhem materiálu, koncentrací proteinu, typem roztoku, dále závisí, zda se jedná o roztok samostatného proteinu či o komplexní biologický roztok (např. krevní plazma), následně je náročné při testování adsorpce proteinů od sebe odlišit silně vázané proteiny od slabě vázaných proteinů. Při výběru správné analýzy pro testování adsorbovaných proteinů je pro nás důležitý typ požadované informace (kvantifikace adsorbovaného proteinu, kinetika adsorpce, konformace a orientace adsorbovaného proteinu). Dosud není známá žádná metoda, která by zajistila komplexní analýzu proteinové adsorpce, a proto je nutné pro komplexní analýzu využít více metod (Martins et al. 2012). Ke kvantifikaci proteinů z roztoku lze využívat spektrofotometrické a fluorescenční metody, které využívají interakce s vybraným činidlem (záleží dle metody) s adsorbovanými proteiny (Hlady et al. 1999) na základě kolorimetrického určení jejich koncentrace. Jako příklad si můžeme uvést metodu podle Bradforda, která využívá barvivo Comassie Brilliant Blue (CBB) (detailnější popis viz kapitola 4.7) a metodu s kyselinou bicinchoninovou (BCA) (viz kapitola 4.7). Jako kvalitativní analýzy k identifikaci proteinů z roztoku mohou být využívány separační metody. Jedná se o analýzu na základě rozdělení molekul podle jejich velikosti (molekulové hmotnosti), příkladem separační metody je např. SDS-PAGE elektroforéza (viz kapitola 4.7). Mezi separační metody patří také kapalinová chromatografie. Příkladem kapalinové chromatografie je gelová permeační chromatografie (GPC), která slouží k oddělení molekul podle jejich velikosti. Roztok se zkoumanou látkou prochází přes gelové částice s póry. Menší molekuly si cestu „prodlouží“ skrze póry a větší částice jsou rychleji unášeny mobilní fází (roztokem) (Martins et al. 2012). K analýzám proteinů přímo z materiálu slouží optické metody. Mezi využívané patří elipsometrie, kde se využívá změny stavu polarizace světla po odrazu na reflektivním povrchu. Pomocí indexu lomu proteinu je možné zjistit koncentraci adsorbovaného proteinu (Martins et al. 2012). Další metodou analyzující proteiny přímo z povrchu materiálu je rezonance povrchových plazmonů (SPR), kde vlivem rezonance elektromagnetického záření s povrchovými elektrony kovů (zlato, stříbro atd.) dochází ke změně úhlu odrazu záření. (Durech et al. 2014).



Experimentální část

Cílem této bakalářské práce je studium časové závislosti adsorpce proteinů na testované materiály a pozorovat vliv chemické struktury a morfologie testovaných materiálů na adsorpci proteinů.

4 Materiály a metody

4.1 Použité chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie na přípravu nanovlákněných vrstev

Etanol absolutní	Penta
Chloroform	Penta
PCL (M_w 45 000)	Sigma-Aldrich
PCL (M_w 80 000)	Sigma-Aldrich
PLCL	Corbion
PLA	PolySciTech

Tabulka 2: Použité proteiny a chemikálie na stanovení jejich koncentrací

BCA	Termo Fisher Scientific
Bradfordovo činidlo	Sigma-Aldrich
BSA-hovězí sérový albumin	Sigma-Aldrich
Destilovaná voda	(laboratorní zařízení Aqual)
Quant-it Kit	Termo Fisher Scientific

Tabulka 3: Použité chemikálie na přípravu roztoku PBS

KCl	Penta
KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnan draselný	Penta
NaCl – chlorid sodný	Sigma-Aldrich
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	(laboratorní zařízení Aqual)



Tabulka 4: Použité chemikálie pro SDS-PAGE elektroforézu

30% akryl-bisakrylamid mix	Amresco
APS-amonium persulfát	LachNer
Bromfenolová modř	Amresco
β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Glycerol	Penta
Glycin	VWR International
Kyselina octová	Penta
Methanol	Penta
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad
SDS-sodium dodecyl sulfát	Sigma-Aldrich
Tris	Amresco
TEMED	Sigma-Aldrich

4.2 Použité přístroje

Tabulka 5: Použité přístroje a programy

Nanospider™ NS 1WS500U	Elmarco
Rastrovací elektronový mikroskop Vega 3 SB	Tescan
Spektrofotometr Synergy HXT	
pH metr	
SDS-PAGE elektroforéza - miniprotean	BioRad
Quorum	Quorum technologies
Inkubátor Q-cell	
ImageJ	
Microsoft office	

4.3 Použité roztoky

Tabulka 6: Použité roztoky

Roztok	Složení	Poznámka
PBS	800 ml dH ₂ O 8 g NaCl 0,2 g KCL 3,63 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 0,24 g KH ₂ PO ₄	
Roztok modelového proteinu	50 mg BSA 1 ml PBS	
1 % SDS pro desorpci silně vázaných proteinů	1 g SDS 100 ml PBS	
10 % SDS -100ml	10 g SDS 90 ml dH ₂ O Doplněno dH ₂ O do 100 ml	-Při přípravě roztoku zahřát na 50 °C -Skladováno při RT
1,5M Tris-HCL pH 6,8 -50ml	9,09 g Tris 40 ml dH ₂ O pH upraveno HCl Doplněno dH ₂ O do 50 ml	-Skladováno při RT
1,5M Tris-HCL pH 8,8 -100 ml	18,7 g Tris 80 ml dH ₂ O pH upraveno HCl Doplněno dH ₂ O do 100 ml	-Skladováno při RT
10 % APS -100 ml	1 g APS 8 ml dH ₂ O Doplněno dH ₂ O do 10 ml	-Skladováno při -20 °C
2× SDS-PAGE vzorkovací pufr	10 ml Tris-HCl pH 6,8 6 ml 20 % SDS 30 ml glycerol 15 ml β-merkapt ethanol 1,8 mg bromfenolová modř Doplněno dH ₂ O do 100ml	-Skladováno při -20 °C

10 % polyakralamidový separační gel -20 ml/4 gely	7,9 ml dH ₂ O 6,7 ml 30% akryl- bisakrylamid mix 5,0 ml 1,5M Tris (pH 8,8) 0,2 ml 10 % SDS 0,2 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED	
5 % polyakralamidový zaostřovací gel -8 ml/4 gel	5,5 ml dH ₂ O 1,3 ml 30 % akryl- bisakrylamid mix 1,0 ml 1,5M Tris (pH 6,8) 0,08 ml 10 % SDS 0,08 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED	
10× SDS-PAGE pufr -1 l	10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g glycin 800 ml dH ₂ O Doplněno dH ₂ O do 1 l	-Před použitím 10× zředěno do roztoku PBS -Skladováno při RT
10× PBS - 1 l	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ 800 ml dH ₂ O Doplněno dH ₂ O do 1 l	-Před použitím 10× zředěno dH ₂ O -Skladováno při RT
CBB barvicí roztok -1 l	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 450 ml methanol 100 ml kyselina octová Doplněno dH ₂ O do 1 l	-Skladováno při RT



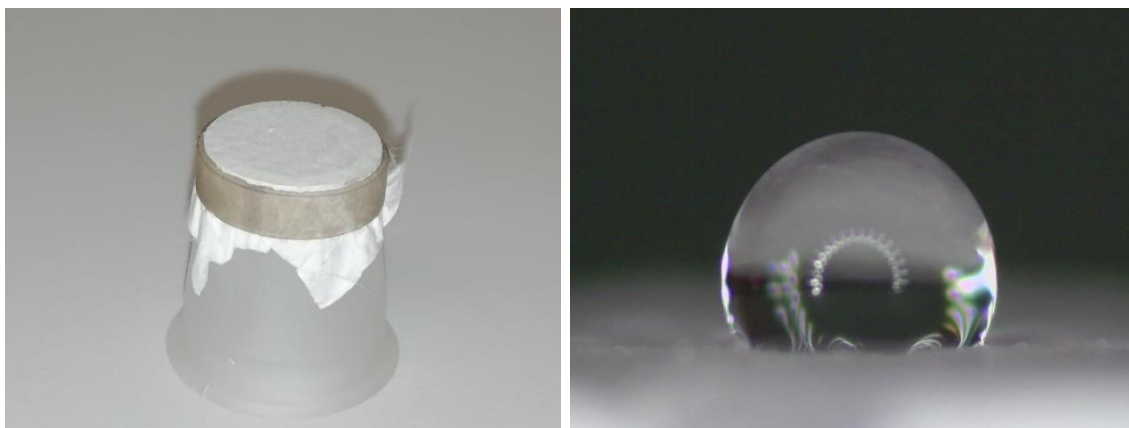
CBB odbarvovací roztok – 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 450 ml destilovaná voda	- Skladováno při RT
Sušící roztok – 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 30 ml glycerol 420 ml destilovaná voda	- Skladováno při RT

4.4 Morfologie materiálů

Morfologie materiálů byla analyzována pomocí snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Aby bylo možné vytvořit snímky materiálů pomocí SEM, musí být vzorky mikro/nano vlákných materiálů pokoveny. Zde byly vzorky pokoveny 10 nm vrstvou zlata. Poté byly pořízeny snímky (použité napětí 10-20 kV) o zvětšení vzorků 1000×, 2500×, 5000× a 10 000×. K vyhodnocení byly využity snímky, na kterých byly materiály zvětšeny 5000×. Průměry vláken byly měřeny pomocí programu ImageJ. Náhodně bylo vybráno 125 vláken od každého materiálu, u kterých byl změřen jejich průměr. V programu Microsoft Excel byly vypočítány průměrné hodnoty průměrů vláken, četnost vláken o určitých průměrech a byla provedena statistická analýza.

4.5 Smáčivost materiálů

Smáčivost materiálu byla analyzována pomocí metody WCA (měření kontaktního úhlu přisedlé kapky, angl. water contact angle). Bylo připraveno 10 vzorků od každého materiálu o velikosti 2×2 cm. Vzorky byly připevněny a vypnuty na plastové těleso (ve tvaru komolého kužele) pomocí plastového kolečka (viz obrázek 15).



Obrázek 15: Vlevo: Připravený vzorek na měření kontaktního úhlu; vpravo: přilehlá kapka na materiálu PCL 45, ze které byl následně měřen kontaktní úhel

Na každý takto připravený vzorek byla pomocí pipety nanесena 1 kapka destilované vody o objemu 5 μl . Po nanесení kapky na vrstvu materiálu bylo sledováno její chování pomocí aparatury vytvořené z mikroskopu a připevněné kamery. Chování kapky bylo zaznamenáno na video, ze kterých se následně vyhodnotila smáčivost materiálů. Byly měřeny kontaktní úhly s vývojem v čase v programu ImageJ a poté byla provedena statistická analýza v programu Microsoft Excel.

4.6 Metodika adsorpce a desorpce

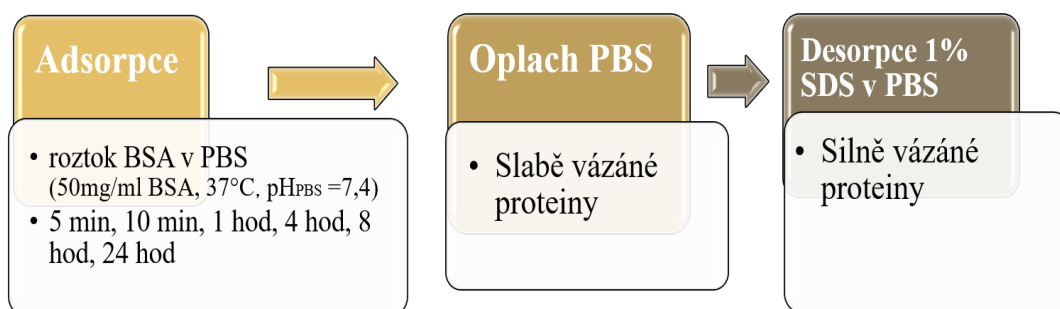
Pro testování adsorpce proteinů na testované materiály byl jako modelový protein použit hovězí sérový albumin (BSA). Aby bylo možné analyzovat časovou závislost proteinové adsorpce, bylo provedeno 6 experimentů adsorpce BSA o různých intervalech inkubace (5 minut, 10 minut, 1 hodina, 4 hodiny, 8 hodin a 24 hodin). Po uplynutí časových intervalů došlo k oplachu slabě vázaných proteinů (pomocí oplachu v PBS) a k desorpci silně vázaných proteinů (pomocí detergentu SDS) z materiálu. Slabě vázané proteiny byly analyzovány spektrofotometricky pomocí Bradfordovy metody a metody BCA. Jedná se o kvantitativní analýzy, které nám určují koncentraci slabě vázaných proteinů v roztoku. Spektrofotometricky byly analyzovány i silně vázané proteiny, u kterých byla použita metoda BCA, nemohla zde být použita Bradfordova metoda, jelikož činidlo CBB reaguje s detergentem SDS, který byl využit k desorpci silně vázaných proteinů, a výsledky by nebyly přesné. Bradfordova metoda byla nahrazena citlivější fluorimetrickou metodou Quant-iT protein assay kit a dále byly silně vázané proteiny testovány pomocí separační metody SDS-PAGE elektroforézy.

Příprava vzorků

Bylo připraveno 6 triplikátů (trojice vzorků) a 1 kontrolní vzorek pro všechny testované materiály. Každý vzorek byl vyříznut o velikosti 2×2 cm a byl samostatně zvážen (viz příloha A).

Metodika adsorpce a desorpce

Každý z triplikátů slouží k analýze adsorpce proteinů v daném časovém intervalu, při kterém jsou materiály inkubovány s roztokem proteinu. Byly zvoleny časové intervaly 5 minut, 10 minut, 1 hodina, 4 hodiny, 8 hodin a 24 hodin. Po zvážení byly všechny vzorky opatrně vloženy do 1,5 ml mikrozkušavek, tak aby nedošlo k jejich poškození.



Obrázek 16: Grafické schéma experimentu

Ke všem vzorkům byl přidán 1 ml roztoku BSA (50 mg/ml) ve fosfátovém pufru (PBS, pH= 7,4). Ke kontrolním vzorkům od každého materiálu byl přidán 1 ml čistého PBS. Tyto vzorky slouží jako negativní kontrola. Takto připravené vzorky v roztoku BSA v PBS byly vloženy do inkubátoru při teplotě 37 °C (včetně negativní kontroly). V inkubátoru byly ponechány po dobu určených časových intervalů. Po uplynutí nastavených intervalů byly vzorky opláchnuty v 1 ml čistého PBS, čímž byly vytvořeny roztoky se slabě vázanými proteiny. Následně byly vzorky ponořeny do 1 % roztoku SDS v PBS. Vzorky byly ponechány v desorpčním roztoku 1 hodinu při pokojové teplotě, aby došlo k desorpci silně vázaných proteinů ze vzorků. Takto připravené roztoky slabě a silně vázaných proteinů byly použity k analýze proteinové adsorpce.

4.7 Použité metody

V této kapitole budou popsány metody, které sloužily k analýze proteinové adsorpce.

10 % SDS-PAGE elektroforéza

Jedná se o separační metodu, která rozděluje proteiny podle jejich velikosti (molekulové hmotnosti). K separaci molekul dochází díky rozdílné rychlosti nabitých částic v elektrickém poli. Využívaný dodecylsírán sodný (SDS) dodává proteinům záporný náboj. Kvůli zápornému náboji se molekuly pohybují přes polyakrylamidový gel k elektrodě s kladným elektrickým nábojem. Větší molekuly se pohybují pomaleji než menší molekuly, jelikož je pro ně obtížnější pohyb skrze síťovaný gel. K vyhodnocení výsledků slouží srovnávání s markerem, u kterého jsou známé velikosti molekul.

V kádince byl připraven 10 % separační (dolní) gel (viz tabulka 6), pomocí pipety byl nanesen do aparatury (dvojice skel), která se tímto gelem zaplnila do cca 75 %, zbytek aparatury byl dolit destilovanou vodou. Během síťování separačního gelu byl v kádince připraven gel zaostřovací (horní) (viz tabulka 6). Když byl dolní gel dostatečně zesítěný (ztuhlý) byla destilovaná voda nahrazena zaostřovacím gelem. Do zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek, který v gelu vytvoří jamky, do kterých se budou nanášet vzorky. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl hřebínek opatrně odebrán. Takto připravené gely byly vloženy do elektroforetické vaničky a byly zality elektroforetickým pufrem (angl. running buffer). Do vytvořených jamek pomocí hřebínku byly pomocí pipety nanесeny vzorky, které byly předtím smíchány 1:1 se vzorkovým pufrem a povařeny ve vodní lázni při 95 °C po dobu 10 minut. Do první jamky bylo vždy nanесeno 5 µl markeru (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards). Do ostatních jamek bylo přidáno 15 µl každého vzorku. Celková aparatura SDS-PAGE elektroforézy byla uzavřena a přivedena ke zdroji. Z počátku bylo vstupní napětí nastaveno na 80 V, po uplynutí cca 20 minut, kdy molekuly vzorků prošly skrze zaostřovací gel, bylo napětí zvyšováno až na 120 V. Při zvýšeném napětí probíhala elektroforéza 1 hodinu. Po ukončení samotné elektroforézy byly z aparatury vyjmuty gely. Z celého gelu byl odříznut zaostřovací gel, který se už dále nebude využívat. Rozdělovací gel byl vložen do misky s barvicím roztokem CBB a za stálého míchání byl ponechán 24 hodin k barvení.

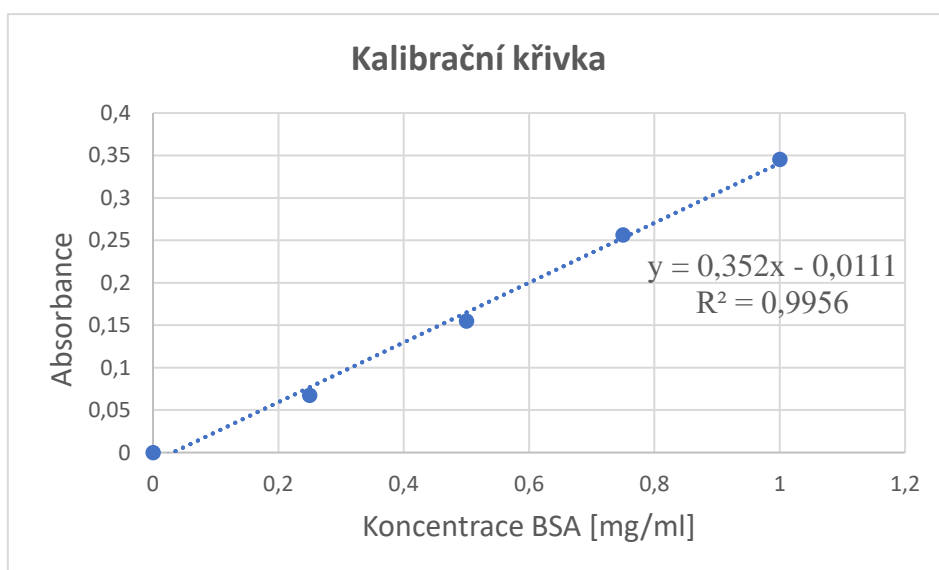


Poté byl gel vložen do misky s odbarvovacím roztokem, který byl podle potřeby měněn do úplného odbarvení přebytečného barviva z gelu. Gel můžeme uchovat mezi vrstvou celofánu (na bázi celulózy) pomocí sušícího roztoku. Takto vytvořené gely byly dále analyzovány.

Analýza koncentrace proteinu dle Bradfordovy metody

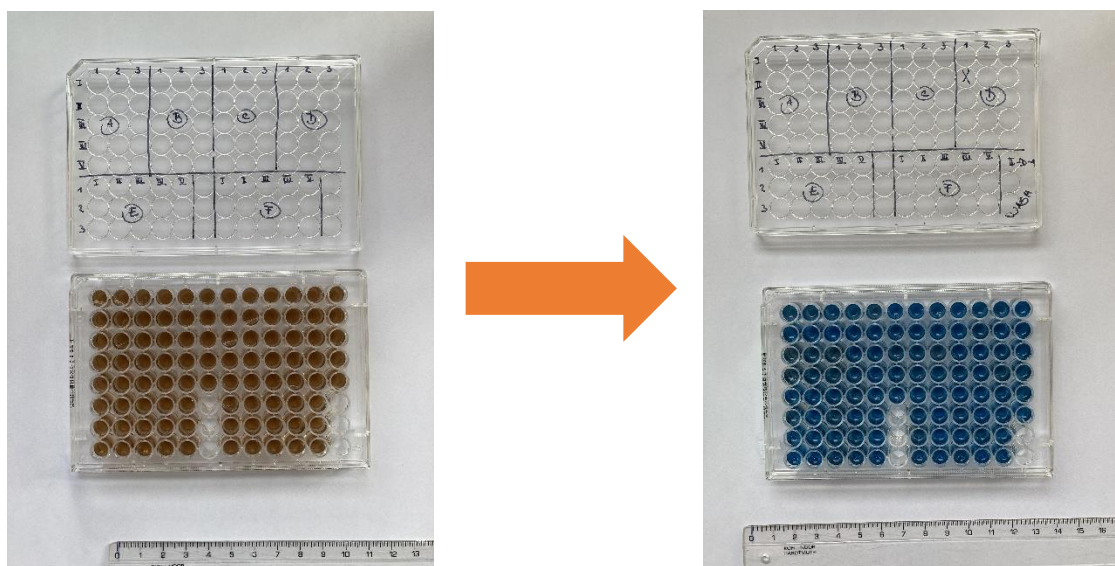
Metoda sloužící k určení koncentrace adsorbovaných proteinů. Je zde využíváno interakce proteinů s barvivem CBB v kyselém prostředí. Po navázání barviva na molekuly proteinu dochází ke změně absorpčního maxima na 595 nm z původních 465 nm. Barva roztoku se změní z hnědé na modrou (viz obrázek 18). Nevýhodou této metody je, že dochází k reakci s detergenty (např. SDS) a tím se snižuje spolehlivost výsledků, a proto nemůže být Bradfordova metoda využita v analýze silně vázaných proteinů.

Z roztoku BSA (50 mg/ml) byly připraveny roztoky o snižující se koncentraci (1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0 mg/ml), z takto připravených roztoků byla sestrojena kalibrační křivka a její rovnice (viz obrázek 17).



Obrázek 17: Kalibrační křivka vytvořena při analýze koncentrace proteinu dle Bradfordovy metody

Bradfordův roztok byl vytemperován na pokojovou teplotu a poté bylo do každé předem popsané jamky z 96-ti jamkové destičky přidáno 250 μ l Bradfordova roztoku. K Bradfordově roztoku bylo přidáno 5 μ l testovaných vzorků, takto vzniklé roztoky byly řádně promíchány (pipetou), aby došlo k reakci barviva s proteiny (viz obrázek 18) a následně byly inkubovány 10 minut při pokojové teplotě.



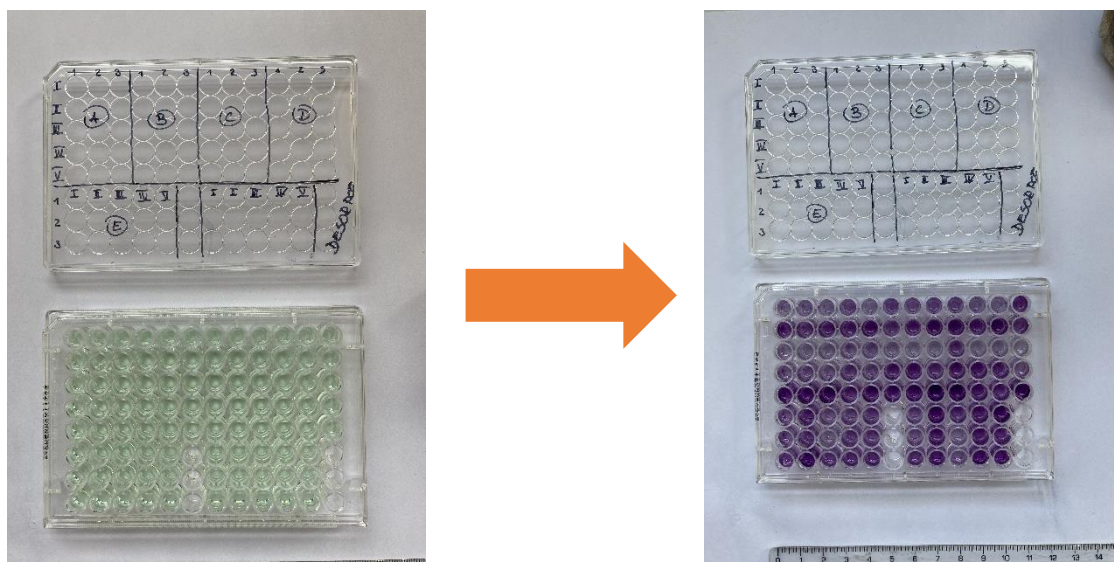
Obrázek 18: Reakce CBB s proteiny za změny barvy roztoků z hnědé na modrou

Pomocí spektrofotometru byla měřena absorbance všech testovaných vzorků při vlnové délce 595 nm. Z rovnice kalibrační křivky a hodnot absorbance změřené pomocí spektrofotometru byly vypočítány koncentrace proteinů ve všech testovaných vzorcích a následně byla provedena statistická analýza.

Analýza koncentrace proteinu dle metody BCA

Metoda BCA je další z řady kvantitativních analýz sloužící k určení koncentrace adsorbovaného proteinu. V této metodě se využívá reakce proteinů s Cu^{2+} ionty, přičemž dochází k redukci na ionty Cu^+ . Jednomocné ionty mědi reagují s kyselinou bicinchoninovou (nebo s jejími sodnými solemi) v alkalickém prostředí za tvorby fialového komplexu. V porovnání s Bradfordovou metodou nedochází k interferenci s detergenty, a proto touto metodou můžeme analyzovat slabě i silně vázané proteiny.

Z roztoku BSA (50 mg/ml) byly stejně jako u Bradfordovy metody vytvořeny roztoky se sestupnou koncentrací na sestavení kalibrační křivky. Roztok BCA byl pomocí pipety nanesen do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Do každé jamky bylo přidáno 200 μl roztoku BCA a poté bylo přidáno 25 μl testovaného vzorku. Testovaný vzorek byl důkladně promíchán s roztokem BCA a po dobu 30 minut byl inkubován při teplotě 37 °C, aby došlo k reakci proteinů s činidly za vzniku fialového komplexu (viz obrázek 19).



Obrázek 19: Reakce roztoku BCA s proteiny za vzniku fialového komplexu

Po inkubaci vzorků byla pomocí spektrofotometru měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Z rovnice kalibrační křivky a změřené absorbance byla opět spočítána koncentrace adsorbovaných proteinů a provedena statistická analýza naměřených hodnot.

Analýza koncentrace proteinu dle metody Quant-iT

Jedná se o fluorimetrickou metodu, která slouží k určení koncentrace adsorbovaného proteinu na materiál. Fluorimetrické metody využívají přechodu elektronu ze základního stavu do stavu excitovaného. Při návratu zpět do základního stavu vyzáří elektron energii ve formě fotonu. Při měření dopadá na vzorek záření o vlnové délce, které excituje atom do vyššího energetického stavu. Při návratu do základního stavu vyzáří testovaný vzorek záření o vlnové délce, která je vyšší než excitační záření, protože emitované záření má vždy nižší energii (část energie se přemění např. na teplo).

Z připravených roztoků o sestupné koncentraci BSA (500 ng/μl, 400 ng/μl, 300 ng/μl, 200 ng/μl, 100 ng/μl, 50 ng/μl, 25 ng/μl a 0 ng/μl) byla sestrojena kalibrační křivka. Fluorimetrické metody jsou citlivější než metody spektrofotometrické, a proto musely být testované vzorky 10 × zředěny v PBS. Do černé 96-ti jamkové mikrotitrační destičky bylo nanášeno 200 μl roztoku připraveného pro metodu Quant-iT a 10 μl zředěných vzorků. Poté proběhlo měření pomocí spektrofotometru při excitační vlnové délce 470 nm a při vlnové délce emitovaného záření 570 nm. Z rovnice kalibrační křivky (kubická rovnice) a změřených hodnot pomocí spektrofotometru byly získány koncentrace modelového proteinu (koncentrace byly zpětně vynásobeny 10× kvůli zředění vzorků) a následně byla provedena statistická analýza.

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Infračervená spektroskopie je analýza chemického složení zkoumané látky. Infračervené záření (vlnová délka $\lambda =$ cca 1-1000 μm), nemá dostatečnou energii k excitaci atomu do vyšší atomové vrstvy (orbitalu). Vlivem energie infračerveného záření dojde ke změně vibračního stavu molekuly, nebo ke změně rotačního stavu molekuly.

Pro analýzu chemického složení pomocí FTIR byly použity materiály PCL 80, PLCL, BL 1:1 a PLA. Připravené vzorky testovaných materiálů byly uchyceny do spektrometru. Pomocí infračerveného záření, které prošlo vzorkem, byl vytvořen interferogram. Z výsledného interferogramu bylo zkoumáno chemické složení testovaných materiálů. U BL 1:1 bylo provedeno 7 měření na náhodně vybraných místech. Analýza testovaných materiálů infračervenou spektroskopií byla provedena Ing. Janou Müllerovou, Ph.D.



5 Výsledky a diskuze

V této bakalářské práci byly testovány polymerní mikro/nanovláknenné materiály a jejich interakce s hovězím sérovým albuminem. Polymery, ze kterých byly materiály vyrobeny, patří do skupiny alifatických polyesterů. Byly použity čisté polymery nebo jejich blendy či kopolymery (viz tabulka 7). Materiály byly připravené elektrostatickým zvlákňováním pomocí technologie Nanospider™ Ing. Kristýnou Havlíčkovou (viz příloha B).

Tabulka 7: Testované materiály

Značení	Polymer	Molekulová hmotnost (M _w)
PCL 45	Polycaprolactone	45 000 g/mol
PCL 80	Polycaprolactone	80 000 g/mol
PLCL	Poly(lactide-co-ε-caprolactone)	80 000 g/mol
BL 1:1	Blend 1:1 Poly(lactide-co-ε-caprolactone) a polycaprolactone(80)	PLCL= 80 000 g/mol PCL 80 = 80 000 g/mol
PLA	Polylactic acid	45 000 - 55 000 g/mol

Ze snímků ze SEM byla provedena morfologická analýza vyrobených vláknenných vrstev měřením průměrů vláken. Dále byl v této práci sledován vliv délky proteinové adsorpce modelového proteinu na vybrané materiály. Bylo analyzováno množství slabě vázaných proteinů a silně vázaných proteinů. Slabě i silně vázané proteiny byly analyzovány spektrofotometricky. Silně vázané proteiny byly dále analyzovány fluorimetricky a elektroforeticky.

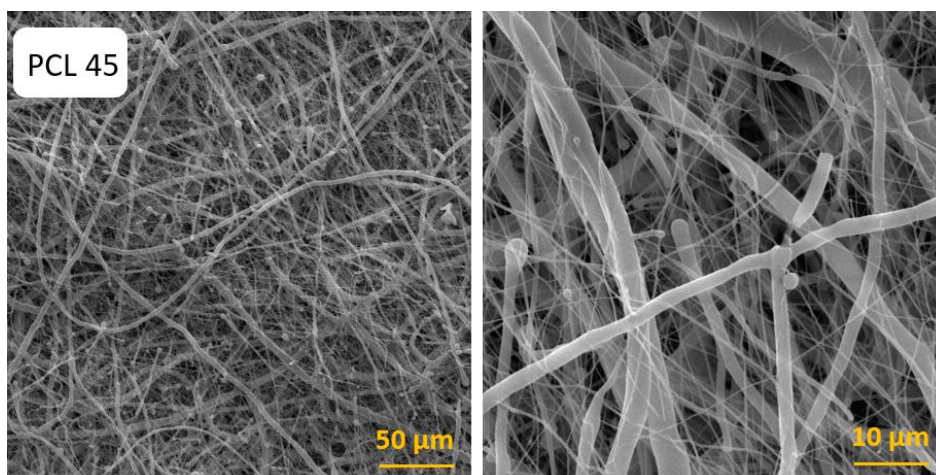
5.1 Morfologie materiálů

Morfologie materiálů byla analyzována ze snímků pořízených skenovacím elektronovým mikroskopem pomocí měření průměrů vláken v programu ImageJ (viz kapitola 4.4). Následně byla provedena statistická analýza. Byly vypočítány průměry vláken testovaných materiálů (viz tabulka 8), četnost průměrů vláken (viz obrázek 20), plošná hmotnost a následně byla provedena statistická analýza v programu Microsoft Excel.

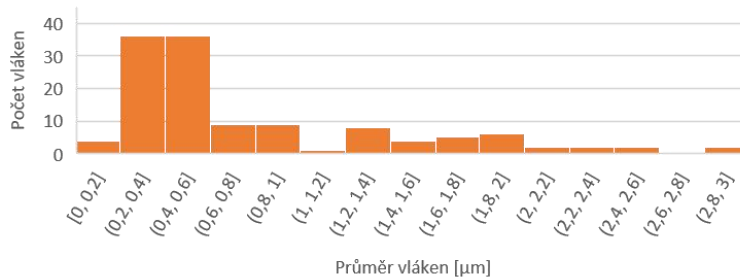


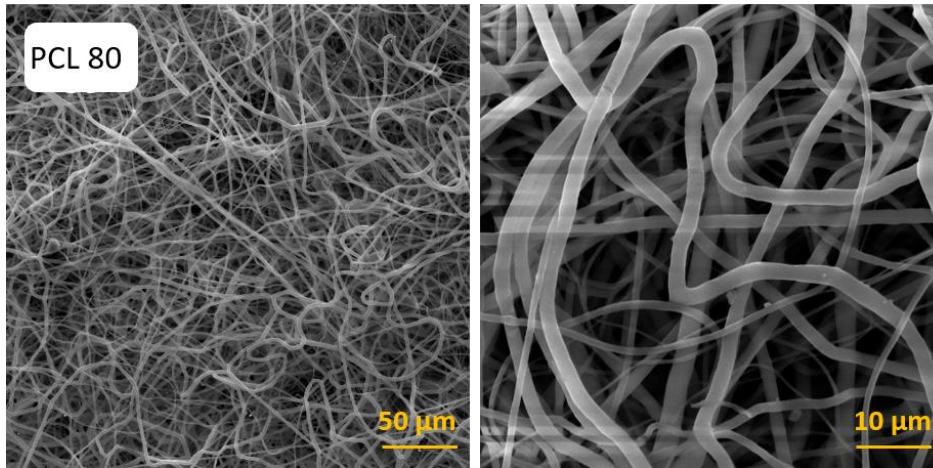
Tabulka 8: Průměry vláken, interval spolehlivosti 95 % a plošná hmotnost testovaných materiálů

Materiál	Průměr vláken	Interval spolehlivosti 95 %	Plošná hmotnost
PCL 45	0,80±0,64 μm	(0,688;0,912) μm	20,1±2,1 g/m ²
PCL 80	1,05±0,47 μm	(0,968;1,132) μm	17,5±1,7 g/m ²
PLCL	1,12±0,65 μm	(1,006;1,234) μm	19,8±1,1 g/m ²
BL 1:1	0,91±0,49 μm	(0,824;0,996) μm	17,8±0,4 g/m ²
PLA	1,02±0,49 μm	(0,935;1,105) μm	15,4±4,3 g/m ²

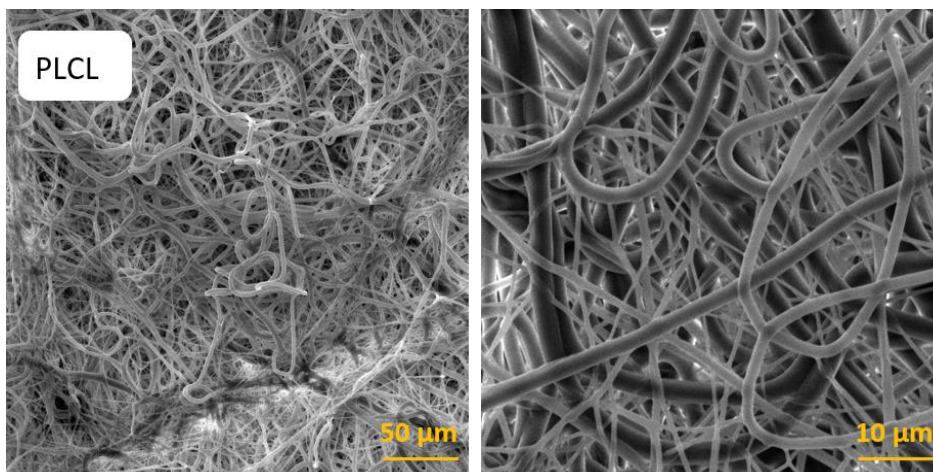
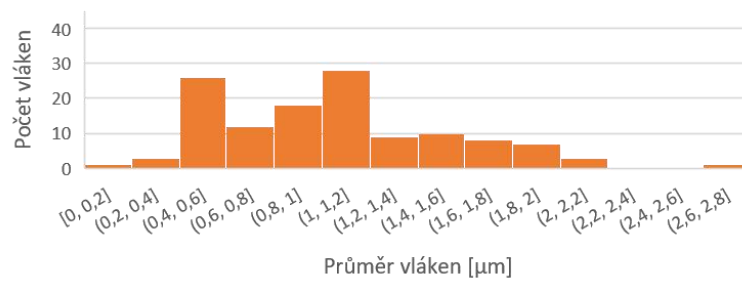


Četnost průměrů vláken PCL 45

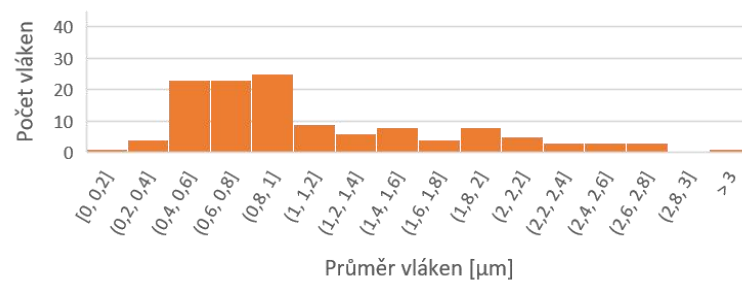


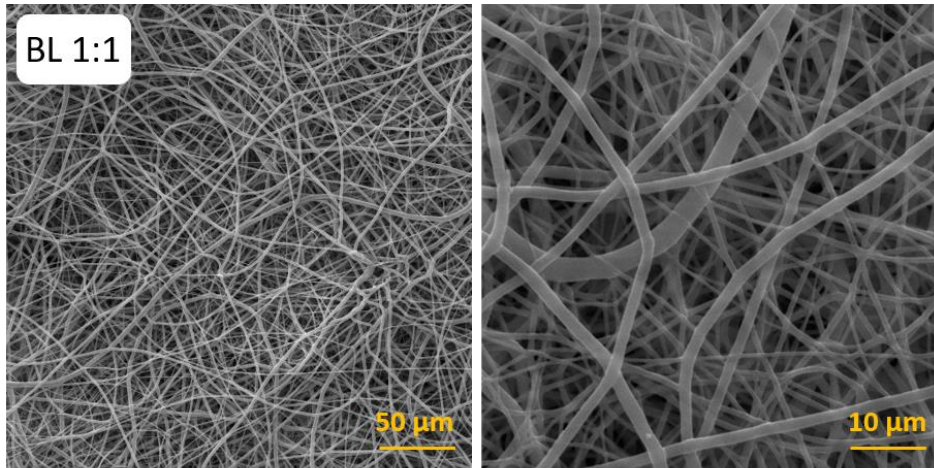


Četnost průměrů vláken PCL 80

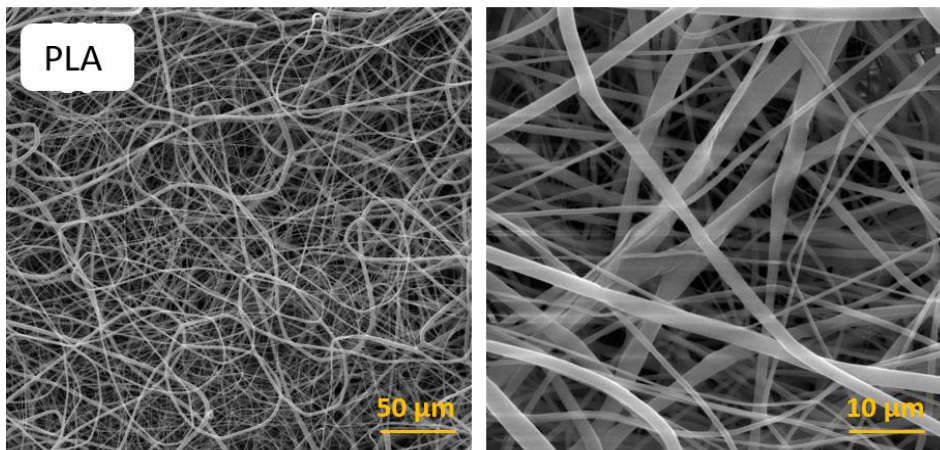
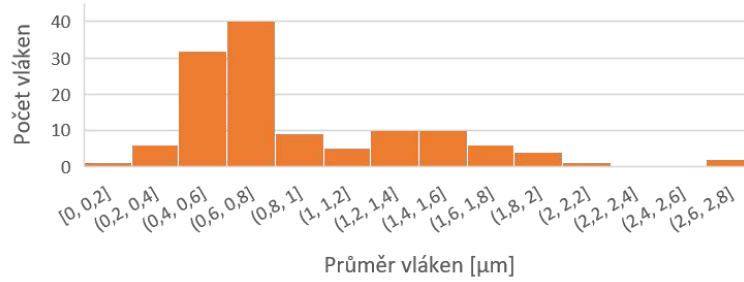


Četnost průměrů vláken PLCL

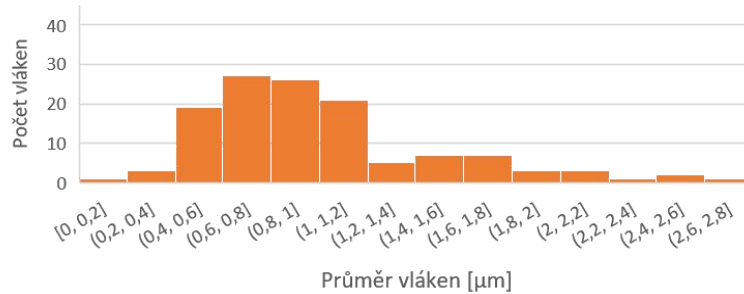




Četnost průměrů vláken BL 1:1

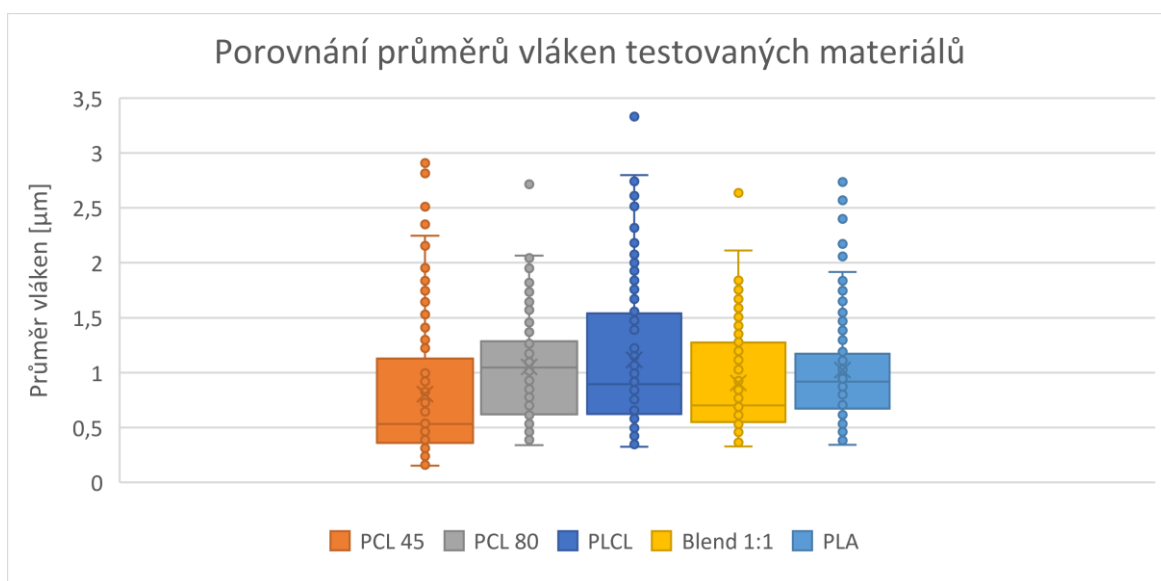


Četnost průměrů vláken PLA



Obrázek 20: SEM snímky a histogramy četností průměrů vláken testovaných materiálů (za sebou PCL 45, PCL 80, PLCL, BL 1:1 a PLA); snímky vlevo-zvětšení 1 000×, měřítko 50 μm, snímky vpravo- zvětšení 5 000×, měřítko 10 μm, dole grafy četností průměrů vláken materiálů.

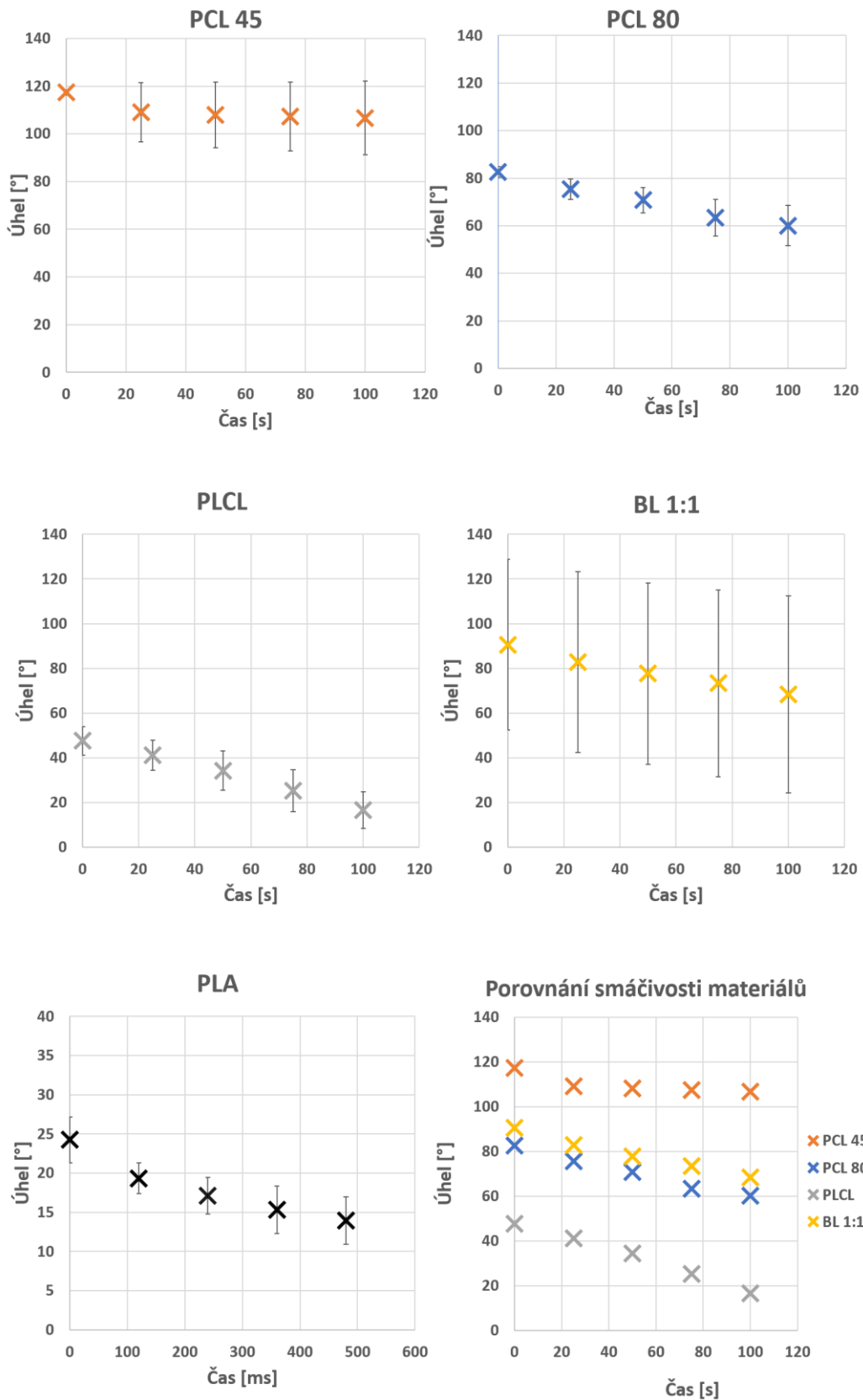
Nejmenší průměr vláken nalezneme u PCL 45, který je 0,8 μm (viz tabulka 8). Při porovnání morfologie materiálů PCL 45 a PCL 80, vidíme, že materiál s vyšší molekulovou hmotností má také vyšší průměry vláken. Průměr vláken PCL 80 se pohybuje okolo 1 μm . Polymer kyseliny mléčné má nejužší distribuci průměrů vláken (viz obrázek 21), což je také patrné při pohledu na snímek ze SEM (viz obrázek 20), kde se průměry vláken podobají svými velikostmi. Nejširší distribuci vláken vykazuje PLCL, kde se průměry vláken pohybují od 0,7 do 1,5 μm , ale nachází se zde i nejvíce odlehlých hodnot. Ve struktuře PLCL se nacházejí i vlákna přesahující průměr 3 μm (viz obrázek 21). Materiály si jsou až na PCL 45 statisticky podobné (viz tabulka 8), kdy se jejich průměry vláken pohybují od 0,91 μm do 1,12 μm . Podle intervalu spolehlivosti 95 % se PCL 45 statisticky přibližuje pouze k materiálu BL 1:1. Defekty u připravených materiálů můžeme najít u PCL 45. U ostatních materiálů defekty nebyly pozorovány.



Obrázek 21 – Krabicový graf porovnávající průměry vláken testovaných materiálů, znaménko (X) znázorňuje průměr vláken materiálů, znaménko (-) znázorňuje medián a znaménko (°) znázorňuje odlehlé hodnoty

5.2 Smáčivost materiálů

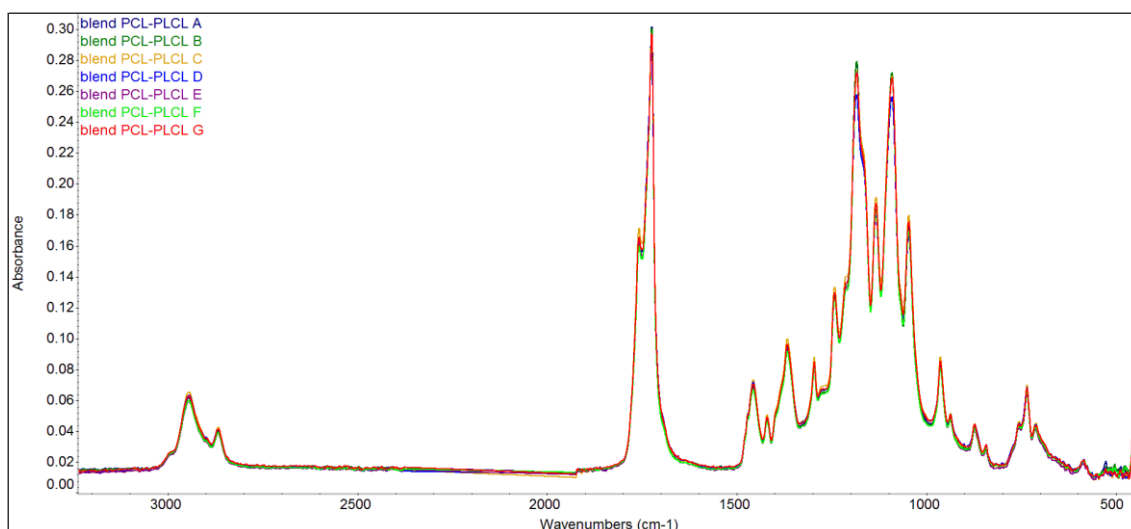
Smáčivost materiálů byla analyzována metodou měření kontaktního úhlu (metoda WCA). Na připravené vzorky byla pipetou nanesena kapka destilované vody o objemu 5 μl a následně bylo její chování zaznamenáno na video (viz kapitola 4.5). Pomocí programu ImageJ byly měřeny kontaktní úhly s vývojem v čase. V programu Microsoft Excel byla provedena statistická analýza a vytvořeny grafy (viz obrázek 22).



Obrázek 22: Grafy smáčivosti materiálů – Jednotlivé grafy smáčivosti testovaných materiálů. Testované materiály PCL 45, PCL 80, PLCL a BL 1:1 mají časovou osu uvedenou v sekundách a PLA má časovou osu uvedenou v milisekundách; graf porovnání smáčivosti materiálů bez PLA, bez směrodatných odchylek



Při porovnání všech materiálů je nejméně smáčivý materiál PCL 45. Na grafu můžeme vidět, že se zastavilo klesání kontaktního úhlu kapky na 105° a kapka od 45 vteřiny zůstává v podstatě neměnná. Toto chování PCL 45 bychom mohli vysvětlit jeho strukturou, ve které se nachází nejtenčí vlákna ze všech testovaných materiálů, a proto se kapka nemusí do materiálu ochotně vstřebávat. U materiálu PCL 80, který má průměry vláken vyšší, vidíme stálý klesající trend kontaktního úhlu. V konečném čase měření (100 s) byl kontaktní úhel 60° . Polykaprolakton s vyšší molekulovou hmotností a vyššími průměry vláken je tedy více smáčivý než PCL 45. Nejvíce smáčivý materiál byl polymer kyseliny mléčné, kde se oproti ostatním materiálům kapka vody vstřebala i v časech kratší než 1 vteřina. V samostatném grafu smáčivosti pro PLA vidíme, že kontaktní úhel z původních 25° klesá v řádu milisekund. Pokud porovnáme morfologii PLA s ostatními vzorky, vidíme, že je podobná jako u ostatních materiálů. Je jisté, že na smáčivost PLA má vliv její chemická struktura, kde se nejhojněji vyskytuje esterová vazba. U grafu smáčivosti materiálu BL 1:1 si můžeme všimnout enormních směrodatných odchylek. Odchyly jsou dány rozdělením naměřených hodnot na dvě skupiny. U ostatních materiálů se vyskytovala většinou 1 vybočující hodnota, která byla z měření vyloučena. Je možné, že toto chování BL 1:1 je dáno nehomogeností chemického složení materiálu. Chemické složení materiálu BL 1:1, bylo analyzováno infračervenou spektroskopií (FTIR) (viz příloha C) a ta ukázala, že chemické složení materiálu BL 1:1 je všude stejné a homogenní (viz obrázek 23).



Obrázek 23: Interferogram z infračervené spektroskopie; Porovnání chemického složení BL 1:1

Nevýhodou metody FTIR pro analýzu nanovlákných vrstev je, že infračervené záření projde skrz celou vrstvou materiálu. I když je chemické složení celé vrstvy podle metody

FTIR homogenní, je možné, že se liší chemické složení (např. orientací funkčních skupin) jednotlivých vláken, které podle morfologie nemůžeme rozeznat, jelikož PLCL a PCL 80 mají podobnou morfologii. Měření, ve kterém se hodnoty kontaktního úhlu dostaly až přes 100 °, byly pravděpodobně provedeny v oblasti výskytu vlákna vytvořeného z PCL 80. Měření, kde naopak kontaktní úhel nabýval hodnot pouze okolo 50 °, mohlo být provedeno na oblasti z PLCL. Měření kontaktního úhlu není úplně vhodná metoda pro měření smáčivosti vlákenných materiálů. Testované vlákenné vrstvy jsou morfologicky nehomogenní a závisí do kterého místa je kapka vložena, a proto je možné mít velmi rozdílné výsledky. Pro metodu WCA je velmi důležitá geometrie struktury materiálů a drsnost povrchu, jak ve svých studiích zmiňuje Szewczyk (Szewczyk et al. 2018). Ve struktuře materiálů se mohou nacházet oblasti s tenčími nebo širšími vlákny, póry, defekty atd. (viz obrázek 20), proto můžeme v grafech najít velké odchylky. Bylo by vhodné dále testovat smáčivost materiálu např. přístrojem Krüss, kde je studován hmotnostní přírůstek materiálu vzlínáním vody. Analýza pomocí přístroje Krüss byla v původním plánu této práce, jenže protiepidemická opatření znepřístupnila studentům vstup do budov univerzity, a proto nebyla analýza provedena.

5.3 Analýza proteinové adsorpce

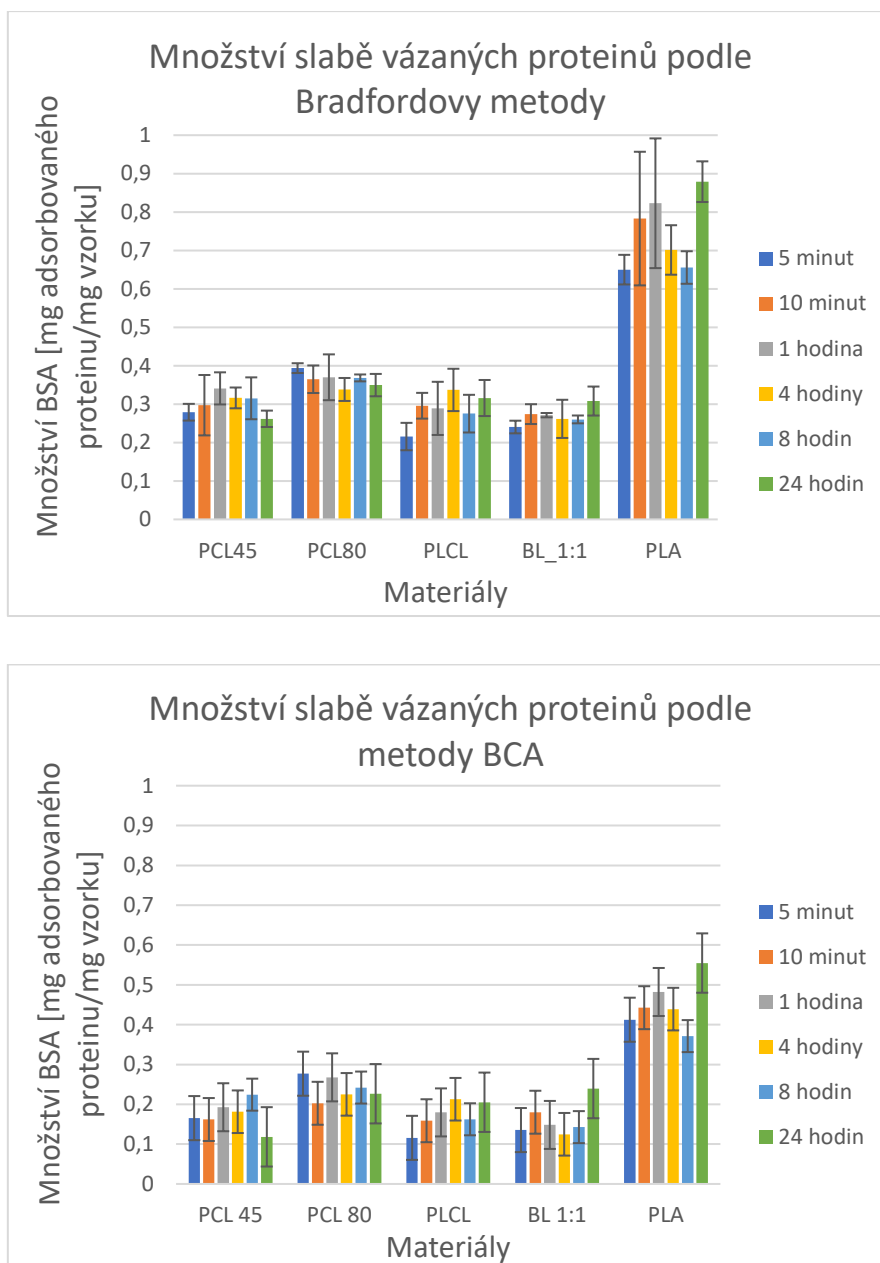
Adsorpce proteinů byla testována pomocí modelového proteinu BSA. Z každého materiálu bylo připraveno 6 triplikátů vzorků 2×2 cm a všechny vzorky byly jednotlivě zváženy. Každá sada triplikátů sloužila k testování adsorpce proteinů na materiál, kdy byl pro každou sadu zvolen jiný čas adsorpce proteinů (5 minut, 10 minut, 1 hodina, 4 hodiny, 8 hodin a 24 hodin). K testovaným materiálům byl přidán 1 ml roztoku BSA v PBS (50 mg/ml), takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu vybraného časového intervalu. Poté byly vzorky vloženy do roztoku čistého PBS, kde došlo k uvolnění slabě vázaných proteinů. Takto vzniklý roztok se slabě vázanými proteiny byl dále analyzován. Po oplachu v PBS byly materiály vloženy do roztoku desorpčního činidla 1 % SDS v PBS na 1 hodinu při pokojové teplotě, kdy došlo k desorpci silně vázaných proteinů, které byly následně analyzovány.

5.3.1 Analýza slabě vázaných proteinů

Slabě vázané proteiny (tzv. „soft corona“) byly analyzovány z roztoků, které byly získány z oplachů testovaných vzorků v čistém PBS po adsorpci. Množství slabě vázaných



proteinů bylo analyzováno spektrofotometricky pomocí Bradfordovy metody a metody BCA (viz kapitola 4.7). Pomocí kalibrační křivky byly dopočítány hodnoty koncentrací BSA, které byly následně přepočítány na množství adsorbovaného proteinu na 1 mg vzorku, aby bylo možné porovnávání výsledků (viz obrázek 24), jelikož všechny vzorky neměly stejnou hmotnost (viz příloha A). Následně byly z takto vypočítaných hodnot množství slabě vázaných proteinů vytvořeny grafy.



Obrázek 24: Graf množství slabě vázaných proteinů na 1mg materiálu (z roztoků po oplachu v PBS) horní graf – analýza pomocí Bradfordovy metody, spodní graf – analýza pomocí metody BCA

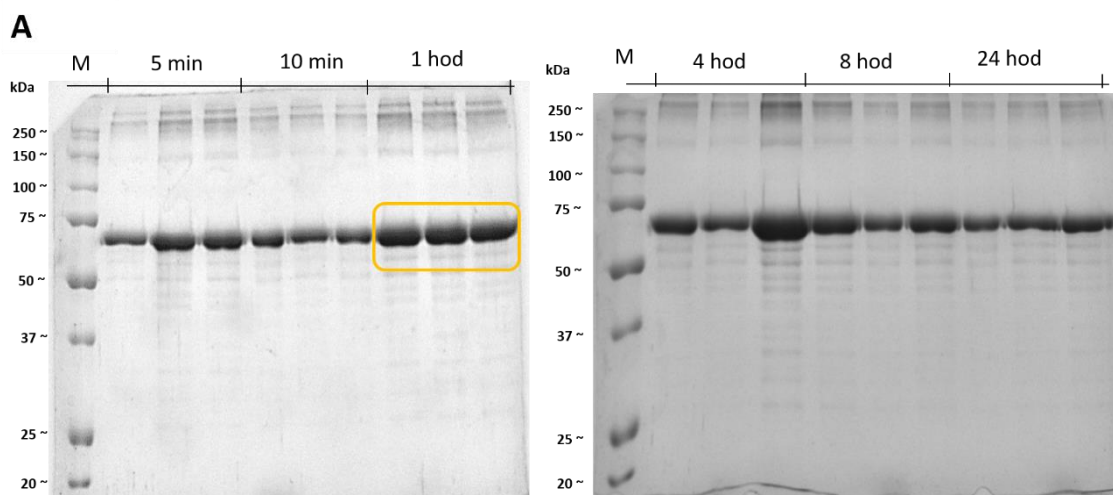
Z obou grafů je zřejmé, že nejvíce slabě vázaných proteinů na 1 mg vzorku na sebe váže PLA. Hodnoty slabě vázaných proteinů na materiál PLA jsou až 3× vyšší než hodnoty

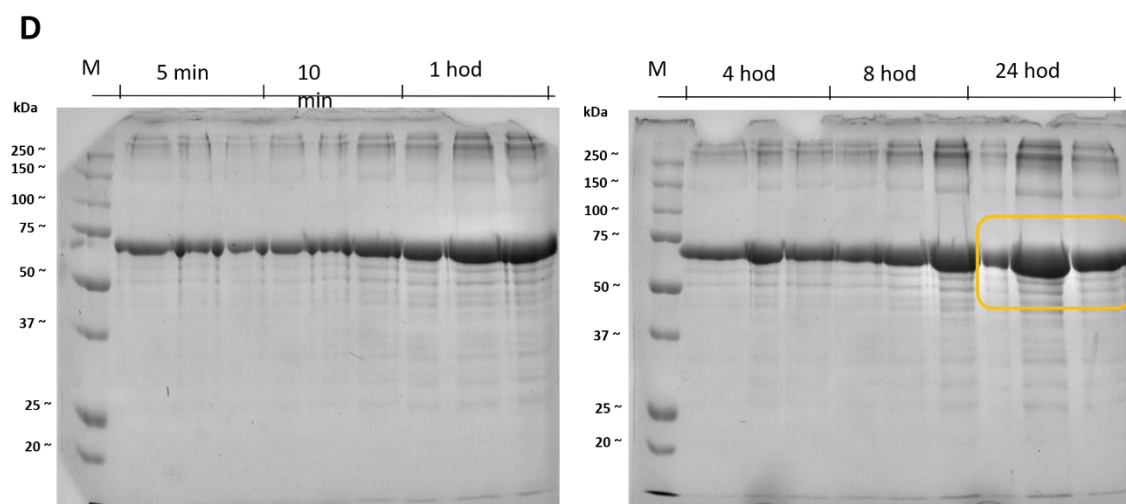
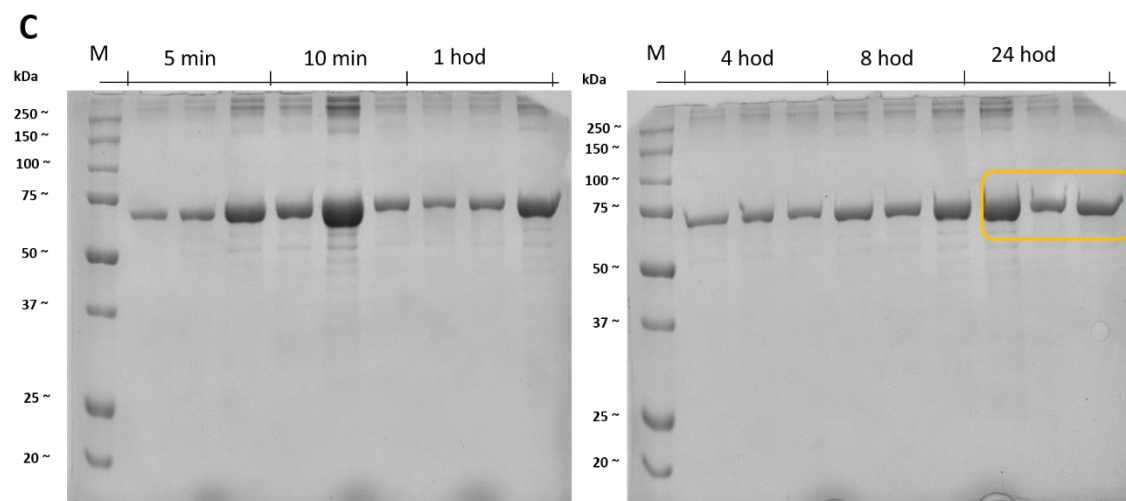
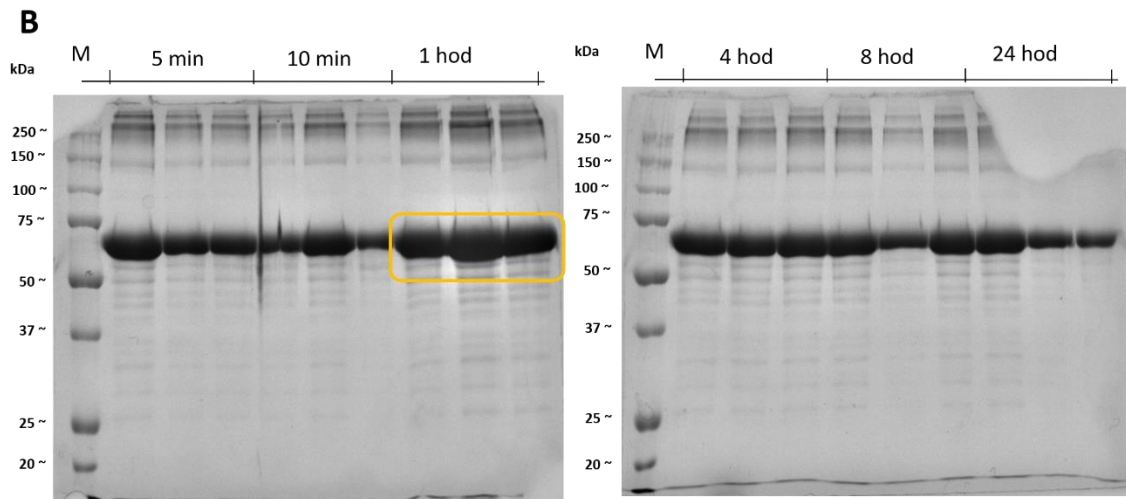


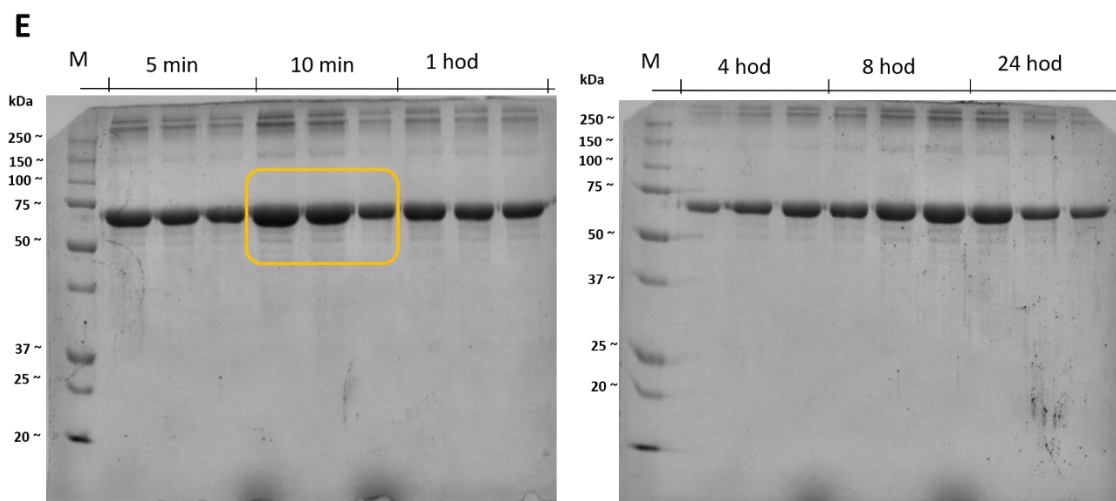
u zbylých testovaných materiálů a dostávají se až k hodnotám 0,9 mg adsorbovaného proteinu na 1 mg vzorku (podle Bradfordovy metody) (viz obrázek 24). Je možné, že se na PLA adsorbuje nejvíce proteinů kvůli více hydrofilnímu chování oproti ostatním materiálům. Pokud porovnáme PCL 45 a PCL 80, kdy se jedná o stejný polymer lišící se svou molekulovou hmotností. Lze vidět, že PCL 80, který má spíše mikrovláknennou strukturu, je schopný adsorbovat více slabě vázaných proteinů než PCL 45, který má vlákna se signifikantně nižším průměrem.

5.3.2 Analýza silně vázaných proteinů

Silně vázané proteiny (tzv. „hard corona“) byly analyzovány z roztoků po desorpci v 1 % SDS v PBS. Množství silně vázaných proteinů bylo zkoumáno elektroforeticky, spektrofotometricky a fluorimetricky (viz kapitola 4.7). Ze spektrofotometrických metod byla zvolena pouze metoda BCA, která nereaguje s desorpčním činidlem SDS. Z tohoto důvodu nemohla být provedena analýza pomocí Bradfordovy metody, jelikož dochází k interakci s desorpčním činidlem a došlo by ke zkreslení výsledků. Fluorimetrická metoda Quant-iT je také citlivá na SDS, a proto musely být vzorky 10x zředěny. SDS- PAGE elektroforéza slouží k identifikaci proteinů, kde se porovnávají pásy známého markeru a testovaného vzorku (viz kapitola 4.7).

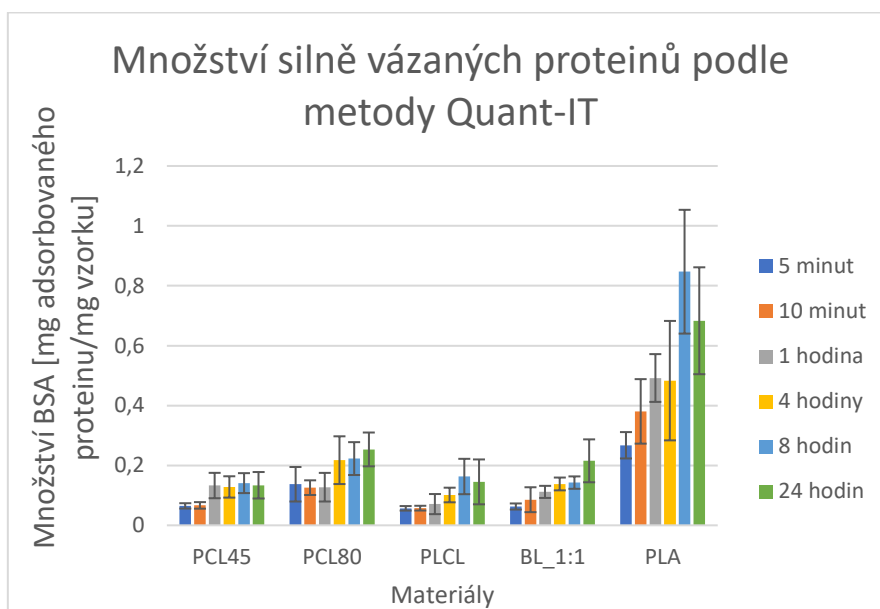
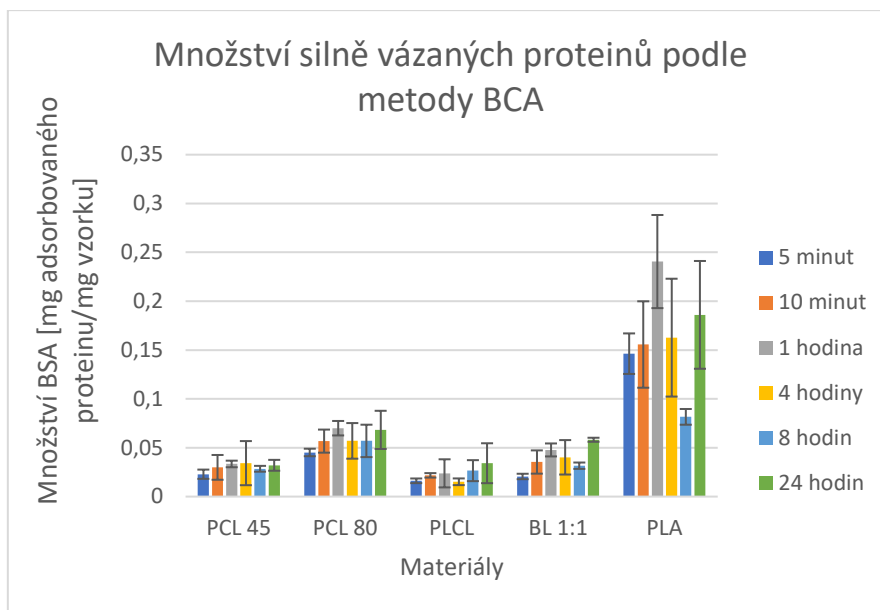






Obrázek 25: Snímky gelů z SDS-PAGE elektroforézy znázorňující vliv doby adsorpce na materiály. V rámečku jsou zvýrazněny doby s nejvyšší adsorpcí silně vázaných proteinů. (A-PCL45, B-PCL80, C-PLCL, D-BL1:1, E-PLA)

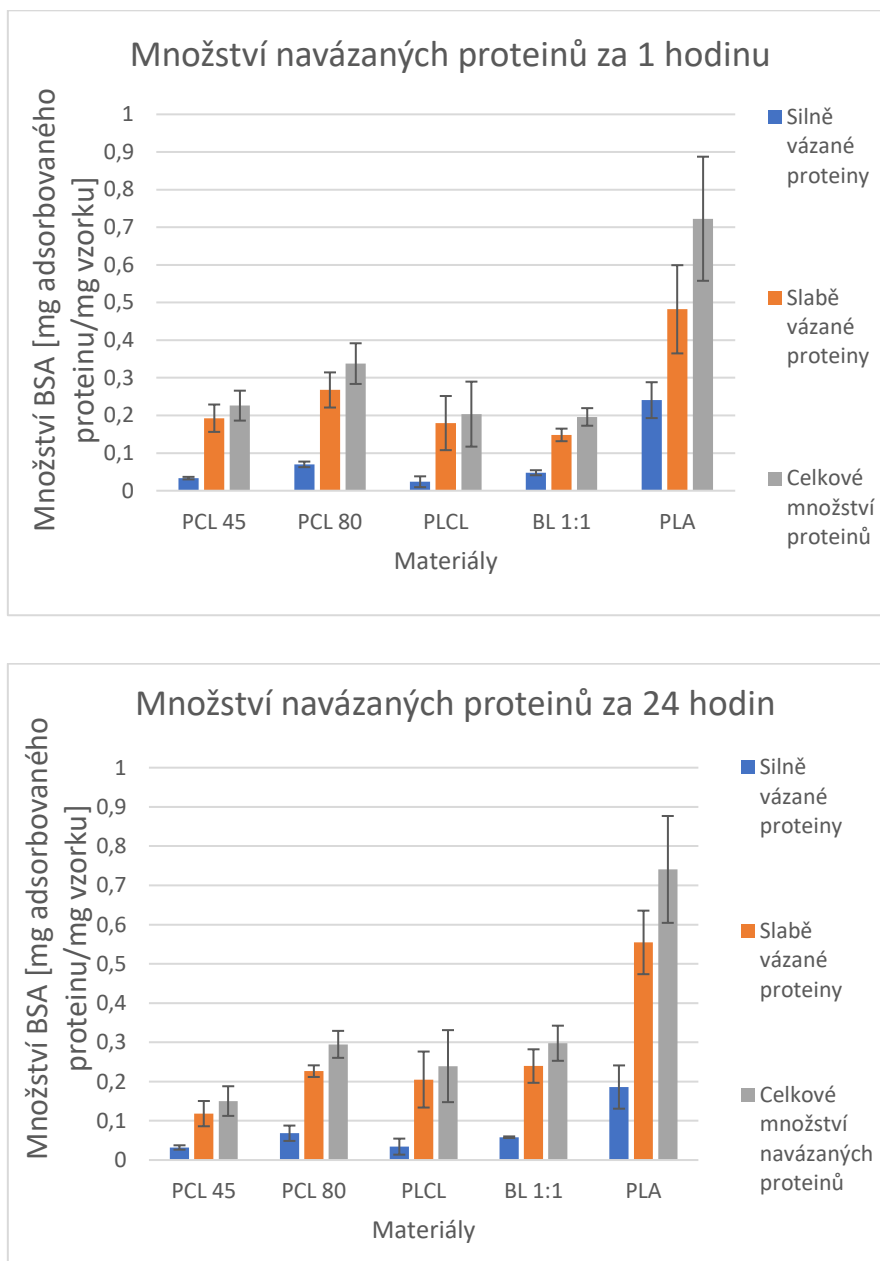
Při zkoumání časové závislosti proteinové adsorpce na materiál je ze snímků gelů z elektroforézy vidět, že na materiály, připravené ze samostatných polymerů, (PCL 45, PCL 80 a PLA) se adsorbuje nejvíce silně vázaných proteinů v kratších dobách adsorpce (viz obrázek 25 A, B, E). U kopolymeru PLCL a blendu BL 1:1 se adsorbuje nejvíce silně vázaných proteinů až po 24 hodinách inkubace materiálu s roztokem proteinů (viz obrázek 25 C, D). Toto bychom mohli vysvětlit tzv. Vromanovým efektem (viz kapitola 3) (Rahman et al. 2013), kdy může docházet k ovlivnění afinity proteinu nehomogenní chemickou strukturou vláken vytvořeného kopolymeru a blendu. Silně vázané proteiny byly následně analyzovány spektrofotometricky a fluorimetricky. Pomocí kalibrační křivky byly dopočítány hodnoty koncentrace BSA v 1 ml roztoku. Následně byly hodnoty koncentrace přepočítány na množství adsorbovaného proteinu na 1 mg testovaného vzorku stejně jako tomu bylo u analýzy slabě vázaných proteinů (viz obrázek 26). Kvůli výskytu desorpčního činidla SDS, nemohla být provedena analýza podle Bradfordovy metody a byla zde využita pouze metoda BCA a fluorimetrická metoda Quant-iT. Výsledky obou metod vychází výrazně odlišně. Hodnoty z metody Quant-iT jsou výrazně vyšší a ukazují i odlišný trend. Je možné, že u metody Quant-iT dochází i po 10 ti-násobném zředění vzorků k interakci s desorpčním činidlem SDS, jako tomu je u Bradfordovy metody. Z tohoto důvodu je pro analýzu silně vázaných proteinů vhodnější metoda BCA.



Obrázek 26: Graf koncentrace silně vázaných proteinů na materiál na 1 mg vzorku, horní graf - analýza podle metody BCA, dolní graf - analýza podle metody Quant-iT

Silně vázané proteiny na sebe nejvíce váže materiál PLA (viz obrázek 26), který je schopný adsorbovat až 0,25 mg silně vázaných proteinů na 1 mg vzorku. Na ostatní materiály se adsorbují proteiny do 0,1 mg na 1 mg vzorku. Metoda BCA potvrzuje i výsledky z elektroforézy (viz obrázek 25), kdy se na materiály z čistých polymerů adsorbují nejvíce proteiny při kratších dobách adsorpce. Na kopolymer PLCL a blend BL 1:1 se proteiny nejvíce váží při době adsorpce 24 hodin. PCL 80, který má ve své struktuře vlákna s vyššími průměry než PCL 45, váže více silně vázaných proteinů. Z toho je zřejmé, že morfologie materiálů ovlivňuje proteinovou adsorpci, jak u slabě

vázaných proteinů, tak u silně vázaných proteinů. Byly vybrány časové intervaly 1 hodina a 24 hodin. V době adsorpce 1 hodiny se adsorbovalo nejvíce proteinů na materiály ze samostatných polymerů a v době adsorpce 24 hodin adsorbovaly nejvíce proteinů PLCL a BL 1:1, proto byly vybrány tyto doby adsorpce pro vytvoření grafu celkového množství adsorbovaných proteinů. Na vytvoření grafů byly použity hodnoty z metody BCA, jelikož touto metodou bylo analyzováno množství slabě i silně vázaných proteinů. Díky tomu můžeme porovnávat výsledky mezi sebou (viz obrázek 27).



Obrázek 27: Grafy celkového množství adsorbovaných proteinů metoda BCA, 1. graf doba adsorpce 1 hodina a 2. graf doba adsorpce 24 hodin

Celkově se nejvíce proteinů (slabě i silně vázaných) adsorbovalo na materiál PLA (viz obrázek 27), který se také jevil jako nejvíce hydrofilní. Morfologie PLA je podobná s ostatními materiály, na smáčivost i na adsorpci proteinů má značný vliv chemická struktura PLA, kde se nejhojněji vyskytuje esterová vazba. Hodnoty navázaných proteinů na polymer kyseliny mléčné jsou až 3x vyšší než na ostatní materiály a dostávají se až k hodnotám 0,8 mg proteinu na 1 mg vzorku. Z ostatních materiálů se nejvíce proteinů adsorbovalo na materiál PCL 80. Jedná se o stejný polymer jako PCL 45 lišící se molekulovou hmotností a morfologií. Můžeme vidět, že na materiál PCL 80, který má spíše mikrovláknou strukturu, se adsorbuje více proteinů a je také více smáčivý. Z dosažených výsledků vyplývá, že morfologie materiálů přímo ovlivňuje proteinovou adsorpci. Zajímavá je skutečnost, že kopolymer PLCL, který je složený z PLA a PCL 80 a také blend BL 1:1 složený z PCL 80 a PLCL, adsorbují výrazně méně slabě i silně vázaných proteinů. To by mohlo být dáno specifickým povrchem testovaných materiálů, který v této práci nebyl studován. Studium časové závislosti proteinové adsorpce ukazuje, že materiály vytvořené pouze z polykaprolaktonu adsorbují nejvíce proteinů (slabě i silně vázaných) při kratších dobách adsorpce. Na materiál PLA se adsorbuje nejvíce silně vázaných proteinů při době adsorpce 1 hodina, ale nejvíce slabě vázaných proteinů se adsorbuje až při 24 hodinách. U kopolymeru a blendu je maximální adsorpce slabě i silně vázaných proteinů při 24 hodinách. Toto může být zapříčiněno tím, že tvorba proteinové korony je dynamický proces tzn. že se neustále mění. Závisí na afinitě proteinu k materiálu tzv. Vromanův efekt. Nejdříve se adsorbují nejvíce koncentrované proteiny, ale poté jsou nahrazeny proteiny s vyšší afinitou (Rahman et al. 2013). U adsorbovaných proteinů může dojít i k jejich denaturaci. Pro další testování vybraných materiálů by mohlo dojít k nahrazení hovězího sérového albuminu krevní plazmou. Jelikož krevní plazma obsahuje kombinaci proteinů mohla by být studovaná stavba proteinové korony více do hloubky. Kvůli náročnosti experimentu by nemusely být testovány všechny časové intervaly, jako tomu bylo v této práci, ale stačilo by testovat proteinovou adsorpci po 1 hodině a po 24 hodinách. Dále by bylo dobré detailněji zkoumat to, jak chemická struktura ovlivňuje proteinovou adsorpci.

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo studium časové závislosti adsorpce proteinů a studium vlivu morfologie a chemické struktury testovaných materiálů na adsorpci proteinů. Jako testované materiály pro tuto práci byly zvoleny elektrostaticky zvlákněné nano/mikro vláknenné degradabilní polyestery. Konkrétně byly použity PCL 45, PCL 80, PLCL, BL 1:1 a PLA. Morfologie materiálů byla analyzována měřením průměrů vláken ze snímků z elektronové mikroskopie. Materiály mají podobnou morfologii a jejich průměry vláken se pohybují okolo 1 μm , jediný materiál, který se od ostatních liší je PCL 45, u kterého jsou průměry vláken nejnižší. Jejich hodnota byla okolo 0,8 μm . Pro testování smáčivosti byla využita metoda WCA. Nejvíce smáčivý byl materiál PLA, který absorboval kapku destilované vody v časech pod 1 vteřinu, u ostatních materiálu se absorpce kapky pohybovala v řádu minut. Nejvíce hydrofobní byl materiál PCL 45, do kterého se kapka po době měření vůbec neabsorbovala. To můžeme vysvětlit jeho nanovláknennou strukturou, která má nejmenší průměry vláken. Testování samotné adsorpce proteinů probíhalo pomocí modelového proteinu BSA. Bylo analyzováno množství slabě vázaných proteinů z roztoků po oplachu v PBS a silně vázaných proteinů z roztoků po desorpci v 1 % SDS v PBS. Podle všech vybraných metod se nejvíce proteinů (slabě i silně vázaných) vázalo na materiál PLA. Hodnoty navázaných proteinů jsou až 3x vyšší než u ostatních materiálů. Nejméně slabě vázaných proteinů se vázalo na materiály PCL 45 a BL 1:1 a nejméně silně vázaných proteinů se navázalo na materiál PLCL. V porovnání množství navázaných proteinů na materiály ze stejného polymeru PCL 45 a PCL 80. Vidíme, že PCL 80, který má vyšší průměr vláken, adsorbuje celkově více proteinů než PCL 45, zde dochází k ovlivnění proteinové adsorpce vlivem morfologie materiálů. Morfologie PLA je srovnatelná s ostatními materiály, přesto se jevila jako nejvíce smáčivá a adsorbovala mnohem více proteinů než ostatní materiály. Zde je jasné, že smáčivost i proteinovou adsorpci ovlivňuje chemická struktura PLA, kde najdeme nejvyšší zastoupení esterových vazeb. Testování proteinové adsorpce v různých časových intervalech ukázalo, že materiály, které jsou vyrobeny pouze z čistého polymeru (PCL 45, PCL 80 a PLA) adsorbují nejvíce silně vázaných proteinů v kratších intervalech (ideálně 1 hodina). Naopak u kopolymeru PLCL a blendu BL 1:1 se nejvíce proteinů adsorbuje při delší době adsorpce (24 hodin).



Experimentální část této práce byla v praxi náročná. Byla potřeba dbát na přesnost a na správné manipulování s pipetou, které bylo pro tuto práci stěžejní. Jak si můžeme všimnout ve výsledcích z elektroforézy (viz obrázek 25), kdy můžeme najít jeden pás z testovaného triplikátu výrazně širší či užší. Dále v grafech množství slabě i silně vázaných proteinů můžeme najít velké směrodatné odchylky, je možné, že tyto odchylky jsou dány nezkušeností při práci s pipetou během celého experimentu. Pro vyšší relevantnost výsledků dosažených v této práci by bylo vhodné celý experiment zopakovat. Následně by bylo vhodné provést analýzu smáčivosti přístrojem Krüss. Pokračování této práce by mohlo být zaměřeno na testování proteinové adsorpce za použití krevní plazmy místo modelového proteinu BSA. Je možné, že zde použité metody, které se zdály být vhodné pro BSA by nemusely být vhodné pro krevní plazmu, která je složena z kombinace proteinů. Experiment by se mohl zkrátit o některé časové intervaly, kdy se jako nejdůležitější ukázaly 1 hodina a 24 hodin, na druhou stranu by se mohl experiment rozšířit na detailnější studium chemické struktury materiálů (např. krystalinita), která ovlivňuje, jak smáčivost, tak i samotnou proteinovou adsorpci.



Seznam použité literatury

ASADI, Nahideh, Azizeh Rahmani DEL BAKHSHAYESH, Soodabeh DAVARAN a Abolfazl AKBARZADEH, 2020. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Materials Chemistry and Physics*. **242**, 122528. ISSN 0254-0584. Dostupné z: doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122528

ASADIAN, Mahtab, CHAN, NOROUZI, Silvia GRANDE, Pieter COOLS, MORENT a De GEYTER, 2020. Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds. *Nanomaterials*.**10**, 119. Dostupné z: doi:10.3390/nano10010119

BALOGH, Attila, Balázs FARKAS, Geert VERRECK, Jürgen MENSCH, Enikő BORBÁS, Brigitta NAGY, György MAROSI a Zsombor Kristóf NAGY, 2016. AC and DC electrospinning of hydroxypropylmethylcellulose with polyethylene oxides as secondary polymer for improved drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics*. **505**(1), 159166. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.024

BANSAL, Mahima, Anusha DRAVID, Zaid AQRAWA, Johanna MONTGOMERY, Zimei WU a Darren SVIRSKIS, 2020. Conducting polymer hydrogels for electrically responsive drug delivery. *Journal of Controlled Release*. **328**, 192–209. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jconrel.2020.08.051

BAUER, Sebastian, Patrik SCHMUKI, Klaus VON DER MARK a Jung PARK, 2013. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*. **58** (3), 261– 326. ISSN 0079- 6425. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.001

BRIDGE, Jack, Jonathan AYLOTT, Christopher BRIGHTLING, Amir GHAEMMAGHAMI, Alan KNOX, Mark LEWIS, Felicity ROSE a Gavin MORRIS, 2015. Adapting the Electrospinning Process to Provide Three Unique Environments for a Tri-layered In Vitro Model of the Airway Wall. *Journal of visualized experiments : JoVE*. **2015**. Dostupné z: doi:10.3791/52986

CALORI, Italo Rodrigo, Gustavo BRAGA, Priscila da Costa Carvalho DE JESUS, Hong BI a Antonio Claudio TEDESCO, 2020. Polymer scaffolds as drug delivery systems. *European Polymer Journal*. **129**, 109621. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109621

CASCALHO, Marilia a Jeffrey L. PLATT, 2008. 81 - Challenges and potentials of xenotransplantation. In: Robert R. RICH, Thomas A. FLEISHER, William T. SHEARER, Harry W. SCHROEDER, Anthony J. FREW a Cornelia M. WEYAND, ed. *Clinical Immunology (Third Edition)*. Edinburgh: Mosby, s. 1215–1222. ISBN 978-0-323-04404-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-04404-2.10081-8



DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA a Sakthi KUMAR, 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. **2011**. Dostupné z: doi:10.1155/2011/290602

DOLCIMASCOLO, Anna, Giovanna CALABRESE, Sabrina CONOCI a Rosalba PARENTI, 2019. Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration* Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.83839

DURECH, Michal, F TRČKA, B VOJTĚŠEK a Petr MULLER, 2014. [Methods for Analysis of Proteinprotein and Proteinligand Interactions.]. *Klinická onkologie: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*. **27**, 75–81.

FERNÁNDEZ, Jorge, Agustin ETXEBERRIA a Jose-Ramon SARASUA, 2012. Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) statistical copolymers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **9**, 100–112. ISSN 1751-6161. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.01.003

FRENOT, Audrey a Ioannis S. CHRONAKIS, 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. **8**(1), 64–75. ISSN 1359-0294. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0294(03)00004-9

GHANBARZADEH, Babak a Hadi ALMASI, 2013. Biodegradable Polymers. *Biodegradation - Life of Science*. Dostupné z: doi:10.5772/56230

HAVLÍČEK, Karel, Lucie SVOBODOVÁ, Totka BAKALOVA a Tomáš LEDERER, 2020. Influence of electrospinning methods on characteristics of polyvinyl butyral and polyurethane nanofibres essential for biological applications. *Materials & Design*. **194**, 108898. ISSN 0264-1275. Dostupné z: doi: 10.1016/j.matdes.2020.108898

HE, Wei a Roberto BENSON, 2013. 5 - Polymeric Biomaterials. In: Sina EBNESAJJAD, ed. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Boston: William Andrew Publishing, Plastics Design Library, s. 87–107. ISBN 978-1-4557-2834-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-2834-3.00005-7

HLADY, Vladimir, Jos BUIJS a Herbert P. JENNISSEN, 1999. Methods for Studying Protein Adsorption. *Methods in enzymology*. **309**, 402–429. ISSN 0076-6879.

CHAN, B. P. a K. W. LEONG, 2008. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. **17**(Suppl 4), 467–479. ISSN 0940-6719. Dostupné z: doi:10.1007/s00586-008-0745-3

JIANG, Long a Jinwen ZHANG, 2013. 6 - Biodegradable Polymers and Polymer Blends. In: Sina EBNESAJJAD, ed. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Boston: William Andrew Publishing, Plastics Design Library, s. 109–128. ISBN 978-1-4557-2834-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-2834-3.00006-9



JIRSÁK, Oldřich, Klára KALINOVÁ a univerzita v Liberci TECHNICKÁ, 2003. *Netkané textilie*. Vyd. 1. Liberec: Technická univerzita. ISBN 978-80-7083-746-7.

LI, Liangchun, Rongqin SUN a Renlin ZHENG, 2021. Tunable morphology and functionality of multicomponent self-assembly: A review. *Materials & Design*. **197**, 109209. ISSN 0264-1275. Dostupné z: doi: 10.1016/j.matdes.2020.109209

MA, Zuwei, Masaya KOTAKI, Ryuji INAI a Seeram RAMAKRISHNA, 2005. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue engineering*. **11**, 101–9. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2005.11.101

MARTINS, M. Cristina L., Susana R. SOUSA, Joana C. ANTUNES a Mário A. BARBOSA, 2012. Protein Adsorption Characterization. In: Melba NAVARRO a Josep A. PLANELL, ed. *Nanotechnology in Regenerative Medicine: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 141–161. ISBN 978-1-61779-388-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-388-2_10

MIKEŠ, Petr, Horáková JANA, Šaman ALEŠ, Vejsadová LUCIE, Topham PAUL a Jenčová VĚRA, 2019. Comparison and characterization of different polyester nano/micro fibres for use in tissue engineering applications. ISSN 1528-0837. Dostupné z: doi:10.1177/1528083719848155

M.MOGHADAM, Soheila, Yu DONG, Salim BARBHUIYA, Linjun GUO, Dongyan LIU, Rehan UMER, Xiaowen QI a Youhong TANG, 2016. Electrospinning: Current Status and Future Trends. s. 89–154. ISBN 978-3-319-39713-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-39715-3_4

MU, Hongtao, Shaohuan CHEN, Fengyin LIU, Jianbo XIAO, Hui HUANG, Yuhua ZHANG, Yuanming SUN, Xiangyang GAO, Hongtao LEI a Xuwen YUAN, 2019. Stereoselective interactions of lactic acid enantiomers with HSA: Spectroscopy and docking application. *Food Chemistry*. **270**, 429–435. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.135

NAHIDA SULTANA, Quazi, Mujibur KHAN, Saheem ABSAR, Mahfuz HASAN a Stephanie HULSEY, 2017. Nanoscale Reinforcement of Polymer Textile Fibers.

NAIN, Amrinder, Joanna WONG, Cristina AMON a Metin SITTI, 2006. Drawing suspended polymer micro-/nanofibers using glass micropipettes. *Applied Physics Letters* **89**, 183105–183105. Dostupné z: doi:10.1063/1.2372694

ONG, Chia, Intan SUHAIMIN, Syamimi KASSIM, Syazana ZUBIR a Tuti ABDULLAH, 2019. Effect of Modified Solvent Casting/Particulate Leaching (SCPL) Technique on the Properties of Bioactive Glass Reinforced Polyurethane Scaffold for Biomedical Applications. *Journal of Physical Science*. **30**, 115–126. Dostupné z: doi:10.21315/jps2019.30.s2.10



PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ, 2009. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. **103**(12), 1009–1016. ISSN ISSN: 0009-2770.

RAHMAN, Masoud, Sophie LAURENT, Nancy TAWIL, L'Hocine YAHIA a Morteza MAHMOUDI, 2013. Nanoparticle and Protein Corona. In: Masoud RAHMAN, Sophie LAURENT, Nancy TAWIL, L'Hocine YAHIA a Morteza MAHMOUDI, ed. *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*. Berlin, Heidelberg: Springer, Springer Series in Biophysics, s. 21–44. ISBN 978-3-642-37555-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-37555-2_2

RATNER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS, 2004. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-08-047036-8.

S. SAFINSHA a M. MUBARAK ALI, 2020. Composite scaffolds in tissue engineering. *Materials Today: Proceedings*. **24**, International Conference on Advances in Material Science & Nanotechnology, 2318–2329. ISSN 2214-7853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.03.761

SINHA, V. R., K. BANSAL, R. KAUSHIK, R. KUMRIA a A. TREHAN, 2004. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*. **278**(1), 1–23. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.044

STRNADOVÁ, Kateřina, Lukáš STANISLAV, Ilona KRABICOVÁ, Filip SABOL, Jan LUKÁŠEK, Michal ŘEZANKA, David LUKÁŠ a Věra JENČOVÁ, 2020. Drawn aligned polymer microfibres for tissue engineering. *Journal of Industrial Textiles*. **50**(3), 263–277. ISSN 1528-0837. Dostupné z: doi:10.1177/1528083718825318

SZEWCZYK, Piotr K., Daniel P. URA, Sara METWALLY, Joanna KNAPCZYK-KORCZAK, Marcin GAJEK, Mateusz M. MARZEC, Andrzej BERNASIK a Urszula STACHEWICZ, 2018. Roughness and Fiber Fraction Dominated Wetting of Electrospun Fiber-Based Porous Meshes. *Polymers*. **11**(1). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11010034

TEIXEIRA, Marta A., M. Teresa P. AMORIM a Helena P. FELGUEIRAS, 2019. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers*. **12**(1). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12010007

TIAN, Huayu, Zhaohui TANG, Xiuli ZHUANG, Xuesi CHEN a Xiabin JING, 2012. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*. **37**(2), 37/2 Topical Issue on Biomaterials, 237–280. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004



VYAS, Cian, Jun ZHANG, Øystein ØVREBØ, Boyang HUANG, Iwan ROBERTS, Mohan SETTY, Benjamin ALLARDYCE, Håvard HAUGEN, Rangam RAJKHOWA a Paulo BARTOLO, 2021. 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. **118**, 111433. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111433

WALKEY, Carl D. a Warren C. W. CHAN, 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews*. **41**(7), 2780–2799. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/c1cs15233e

WEI, Qiang, Tobias BECHERER, Stefano ANGIOLETTI-UBERTI, Joachim DZUBIELLA, Christian WISCHKE, Axel T. NEFFE, Andreas LENDLEIN, Matthias BALLAUFF a Rainer HAAG, 2014. Protein Interactions with Polymer Coatings and Biomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*. **53**(31), 8004–8031. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201400546

WILSON, Cameron, Richard CLEGG, David LEAVESLEY a Mark PEARCY, 2005. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue engineering*. **11**, 1–18. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2005.11.1

ZHANG, Zhenqiang, Danfeng YU, Xiubin XU, Huayi LI, Taoyan MAO, Cheng ZHENG, Jianjia HUANG, Hui YANG, Zihan NIU a Xu WU, 2020. A polypropylene melt-blown strategy for the facile and efficient membrane separation of oil–water mixtures. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. ISSN 1004-9541. Dostupné z: doi:10.1016/j.cjche.2020.03.033

ZHOU, Xiaqing, Gan ZHOU, Radoslaw JUNKKA, Ningxiao CHANG, Aneela ANWAR, Haoyu WANG a Xiaojun YU, 2021. Fabrication of polylactic acid (PLA)-based porous scaffold through the combination of traditional bio-fabrication and 3D printing technology for bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **197**, 111420. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111420

ZIABARI, M., V. MOTTAGHITALAB a A. K. HAGHI, 2009. Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **26**(1), 53–62. ISSN 0104-6632. Dostupné z: doi:10.1590/S0104-66322009000100006



Seznam příloh

Příloha A: Hmotnosti testovaných vzorků při proteinové adsorpci	64
Příloha B: Informace o polymerních roztocích při elektrostatickém zvláknování	65
Příloha C: Chemické složení testovaných materiálů (metoda FTIR)	65

Příloha A: Hmotnosti testovaných vzorků při proteinové adsorpci

Tabulka A-1: Hmotnosti testovaných vzorků pro dobu adsorpce 5 minut a 10 minut

A - 5 minut				B - 10 minut			
[mg]	1	2	3	[mg]	1	2	3
PCL 45	7,8	7,7	7,8	PCL 45	8	8,1	7,6
PCL 80	7,4	6,9	7,7	PCL 80	6,4	7,7	7,3
PLCL	8	7,7	8,2	PLCL	7,4	8,6	7,9
BL 1:1	8	8,2	9	BL 1:1	9,1	8,5	9,1
PLA	3,8	4,1	4,1	PLA	3	2,8	4

Tabulka A-2: Hmotnosti testovaných vzorků pro dobu adsorpce 1 hodina a 4 hodiny

C - 1 hodina				D - 4 hodiny			
[mg]	1	2	3	[mg]	1	2	3
PCL 45	7,5	7,7	7,7	PCL 45	7,7	7,8	8,1
PCL 80	6,4	7,9	7,9	PCL 80	7,4	8,4	7,7
PLCL	7,6	7,6	7,5	PLCL	8,6	7,2	7,1
BL 1:1	8,3	8,3	8,7	BL 1:1	8	9,5	8,9
PLA	2,7	3,3	4,1	PLA	3,4	3,5	3,9

Tabulka A-3: Hmotnosti testovaných vzorků pro dobu adsorpce 8 hodin a 24 hodin

E - 8 hodin				F - 24 hodin			
[mg]	1	2	3	[mg]	1	2	3
PCL 45	7,7	8,5	7,8	PCL 45	7,8	7,5	8,7
PCL 80	7,7	6,7	7,4	PCL 80	7,4	8,3	7,3
PLCL	8,2	7,2	7,5	PLCL	7,2	7,2	7,7
BL 1:1	9,4	8,9	9,6	BL 1:1	8,4	8,2	8,7
PLA	4,2	4,1	3,8	PLA	3,2	2,9	2,9

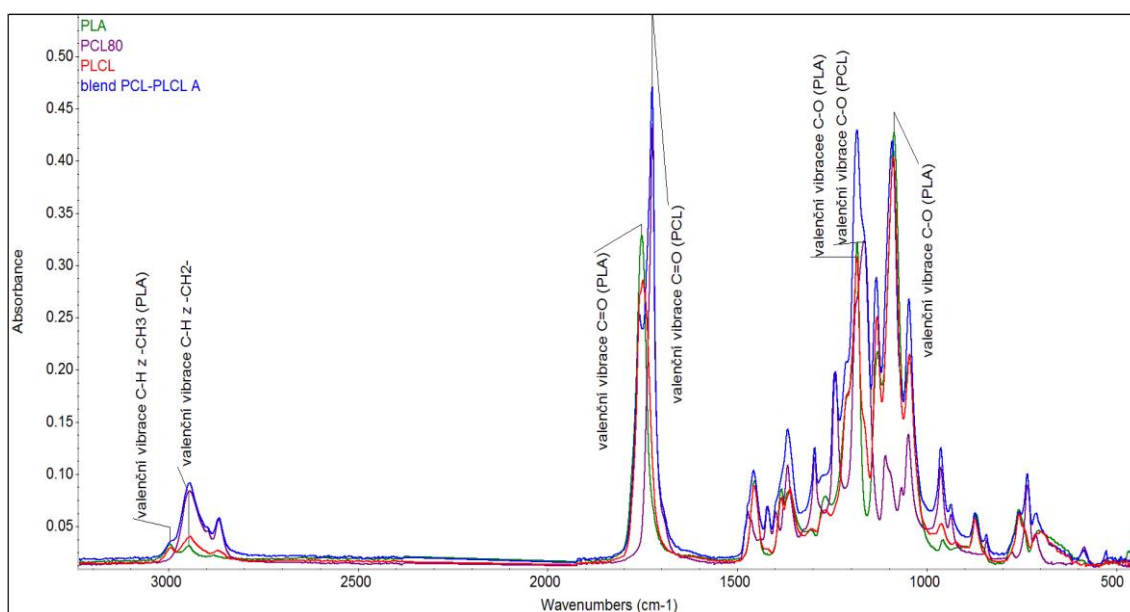


Příloha B: Informace o polymerních roztocích při elektrostatickém zvlákňování

Tabulka B-1: Informace o polymerních roztocích při přípravě elektrostatickým zvlákňováním

Typ polymeru	Rozpouštědlový systém
16 hm. % PCL45	Chloroform/Ethanol (8:2)
10 hm. % PCL80	Chloroform/Ethanol (8:2)
10 hm. % PLCL	Chloroform/Ethanol (8:2)
PCL80/PLCL (1:1)	Chloroform/Ethanol (8:2)
10 hm. % PLA	Chloroform/Ethanol (8:2)

Příloha C: Chemické složení testovaných materiálů (metoda FTIR)



Obrázek C-1: Interferogram z FTIR porovnávající chemické složení testovaných materiálů