



## Diplomová práce

# Vývoj nových biodegradabilních polymerních fólií pro tkáňové inženýrství

*Studijní program:*

N0719A270001 Nanotechnologie

*Autor práce:*

**Bc. Michal Puchrík**

*Vedoucí práce:*

Ing. Markéta Klíčová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných  
materiálů

Liberec 2023



## Zadání diplomové práce

# Vývoj nových biodegradabilních polymerních fólií pro tkáňové inženýrství

*Jméno a příjmení:*

**Bc. Michal Puchrík**

*Osobní číslo:*

M20000159

*Studijní program:*

N0719A270001 Nanotechnologie

*Zadávající katedra:*

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

*Akademický rok:*

2021/2022

## Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše současného stavu poznání na poli přípravy a charakterizace polymerních fólií, které jsou vhodné pro aplikaci v biomedicíně inženýrství.
2. Vývoj biodegradabilních fólií na bázi polyesterových materiálů.
3. Kompletní charakterizace připravených vzorků (morfologické vlastnosti, porozita, mechanické vlastnosti, degradační profil, in vitro cytokompatibilita).
4. Diskuse výsledků, porovnání s aktuální literaturou.



*Rozsah grafických prací:* dle potřeby dokumentace  
*Rozsah pracovní zprávy:* 40-60 dle potřeby  
*Forma zpracování práce:* tištěná/elektronická  
*Jazyk práce:* Čeština

### **Seznam odborné literatury:**

1. HUH, Dongeun, Geraldine A. HAMILTON a Donald E. INGBER, 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends in Cell Biology [online]. 21(12), 745–754. ISSN 0962-8924, 1879-3088. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005
2. JANG, Kyung-Jin, Ali Poyan MEHR, Geraldine A. HAMILTON, Lori A. MCPARTLIN, Seyoon CHUNG, Kahp-Yang SUH a Donald E. INGBER, 2013. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro [online]. 5(9), 1119–1129. ISSN 1757-9708. Dostupné z: doi:10.1039/c3ib40049b
3. NOVAK, Richard, Meredyth DIDIER, Elizabeth CALAMARI, Carlos F. NG, Youngjae CHOE, Susan L. CLAUSON, Bret A. NESTOR, Jefferson PUERTA, Rachel FLEMING, Sasan J. FIROOZINEZHAD a Donald E. INGBER, 2018. Scalable Fabrication of Stretchable, Dual Channel, Microfluidic Organ Chips. Journal of Visualized Experiments: JoVE [online]. (140). ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/58151
4. WU, Qirui, Jinfeng LIU, Xiaohong WANG, Lingyan FENG, Jinbo WU, Xiaoli ZHU, Weijia WEN a Xiuqing GONG, 2020. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. BioMedical Engineering OnLine [online]. 19(1), 9. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/s12938-020-0752-0

*Vedoucí práce:* Ing. Markéta Klíčová  
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

*Datum zadání práce:* 1. listopadu 2021  
*Předpokládaný termín odevzdání:* 16. května 2022

L.S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.  
děkan

doc. Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 1. listopadu 2021

## Prohlášení

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

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

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

Užiji-li diplomovou 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 diplomová 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.

## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval lidem, kteří mi významně pomohli ke zdárnému dokončení této práce. Především děkuji mé vedoucí, inženýrce (již brzy doktorce) Markétě Klíčové, za skvělé vedení práce, jejíž obsahem bylo zajímavé téma navazující na předešlý výzkum Katedry netkaných textilií. Oceňuji přívětivou atmosféru, zaučení v mnoha nových metodách vědecké práce a zpracování výsledků, pomoc s *in vitro* testováním a také ochotu nalézt ve svém nabitém programu čas na četné konzultace, které mi při vypracovávání velmi pomohly.

Poděkování patří také Ing. Petře Honzíkové a Ing. Zdeňce Hodkové za zaučení a asistenci při několika metodách charakterizace materiálů a za pomoc při práci v mikrobiologické laboratoři. Ing. Ondřeji Novákovi, Ph. D., děkuji za zaučení do metody měření tloušťky materiálu.

Na místě je také poděkovat Katedře oděvnictví, jmenovitě Ing. Michalu Chotěborovi a Ing. Michalu Martinkovi, za poskytnutí možnosti práce s klimatizovanou komorou a asistenci při její obsluze.

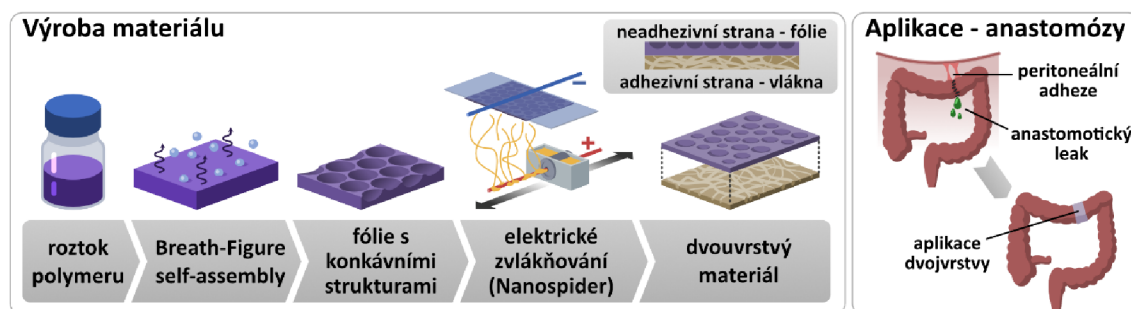
Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Martinu Slavíkovi, Ph. D., za zapůjčení dataloggeru s čidly a zaučení do jeho používání. Bc. Janu Kocmanovi děkuji za kvalitně zpracovanou analýzu materiálů na optickém profilometru.

V neposlední řadě bych rád poděkoval dalším členům Katedry netkaných textilií a nanovlákných materiálů (jmenovitě bych rád zmínil doc. Ing. Pavla Pokorného, Ph. D. a Ing. Jakuba Erbena) a jiným lidem působícím na Technické univerzitě v Liberci (zejména Ing. Petru Mikešovi, Ph. D.) za cenné rady a připomínky, které mi v určitých chvílích pomohly udělat ve své práci krok správným směrem.

## ABSTRAKT

Tkáňové inženýrství je perspektivní biomedicínský obor, který se zabývá obnovou poškozených nebo ztracených tkání. Jedním z klíčových pilířů tkáňového inženýrství jsou materiály z biodegradabilních polymerů, které tvoří fyzickou oporu buněk a svými vlastnostmi podporují jejich růst a diferenciaci. Velmi důležitým aspektem těchto materiálů je jejich struktura na mikroskopické úrovni, která může ovlivnit charakter interakce s buňkami a tkání více než její chemické složení. Toho využívá tato diplomová práce, která se zabývá návrhem, výrobou a testováním dvouvrstvého materiálu z polydioxanonu, který z každé strany vykazuje rozdílnou buněčnou aktivitu. Jednu vrstvu tvoří tenká fólie, jejíž povrch je pokryt systémem konkávních struktur, vytvořených pomocí self-assembly metody známé jako Breath Figures. Druhou vrstvu tvoří vlákna připravená stejnosměrným elektrickým zvlákněním s využitím poloprůmyslového zařízení Nanospider. Po důkladné charakterizaci základních vlastností následovaly *in vitro* testy s myšími fibroblasty 3T3. CCK-8 test metabolické aktivity a snímky z elektronové a fluorescenční mikroskopie prokázaly velmi odlišnou míru buněčné proliferace na obou stranách materiálu. Produkt má tedy potenciál fungovat jako rozhraní, které z jedné strany podporuje růst tkáně, ale z druhé strany brání nežádoucímu přirůstání tkáně jiné. Takový materiál má perspektivní využití v operativní medicíně, která již dlouhodobě hledá odpověď na otázku, jak předejít pooperačním komplikacím v dutině břišní, jmenovitě anastomotickým leakům a interperitoneální adhezi. Aplikace vyvinutého materiálu na operované místo může těmto problémům zabránit a během hojení se v těle neškodně rozložit.

### Grafický abstrakt

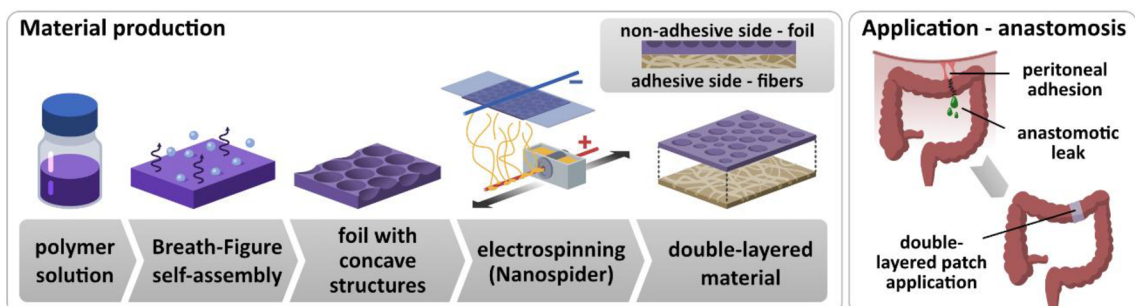


**Klíčová slova:** polydioxanon, Breath Figures, fólie, nanovlákna, tkáňové inženýrství

## ABSTRACT

Tissue engineering is a perspective field of biomedicine, which studies the possibilities of replacement of damaged or lost tissue. A key aspect of tissue engineering are biodegradable polymeric materials, which act as a scaffold that physically supports cells and promotes their growth and differentiation. An important property of such materials is their structure on the microscopic level, which influences the interaction with tissues even more than their chemical composition. The presented diploma thesis takes advantage of this reality and aims at developing a double-layered material made of polydioxanone, which exhibits a different level of cell activity on each of its two surfaces. One layer consists of a thin foil with an array of cavities on its surface, created using the Breath Figures self-assembly method. The other layer is made of fibres produced by utilizing Nanospider, a DC electrospinning machine for nanofiber production on a semi-industrial scale. After a thorough characterization of the material's properties, *in vitro* tests with 3T3 mouse fibroblasts were conducted. CCK-8 metabolic activity test, as well as electron and fluorescent microscopy proved that the degree of cell proliferation is significantly different on each side of the product. Therefore, the material has a potential to act as a physical interface, which promotes tissue regrowth on one side, but prevents unwanted tissue adhesion on the other side. Such material has a perspective to be used during surgical procedures in the abdominal cavity, which carry unresolved risks of complications, including anastomotic leaks and intraperitoneal adhesions. A patch of the material described in this work can be applied to the surgery site to reduce risk of the aforementioned complications, while degrading harmlessly in the body during the healing process.

### Graphical abstract



**Keywords:** polydioxanone, Breath Figures, foils, nanofibers, tissue engineering

# OBSAH

## I Teoretická část

1	Úvod .....	13
2	Tkáňové inženýrství .....	15
2.1	Definice a význam tkáňového inženýrství a úskalí jeho alternativ .....	15
2.2	Historie tkáňového inženýrství.....	17
2.3	Základní principy tkáňového inženýrství .....	19
2.3.1	Buňky .....	19
2.3.2	Scaffoldy.....	21
2.3.3	Signály .....	23
3	Biopolymery a specializované metody jejich zpracování.....	25
3.1	Polydioxanon.....	25
3.2	Polykaprolakton .....	26
3.3	Breath-figure self-assembly .....	29
4.2	Elektrické zvlákňování.....	31
4	Polymerní fólie ve tkáňovém inženýrství .....	34

## II Praktická část

5	Vývoj a výroba materiálu .....	42
5.1	Metoda přípravy PDX fólií.....	42
5.2	Určení optimální koncentrace roztoků pro přípravu fólií.....	42
5.3	Pozorování vlivu podmínek prostředí na proces Breath-figure self-assembly ..	46
5.4	Příprava fólií za kontrolovaných podmínek v klimatizované komoře.....	52
5.5	Vliv stáří roztoku na morfologii povrchu .....	61
5.6	Povlákňování fólií PDX a PCL nanovláknů .....	62
6	Charakterizace a <i>in vitro</i> testy .....	67
6.1	Charakterizace morfologie fólií optickým profilometrem .....	67
6.2	Měření tloušťky fólií .....	69
6.3	Měření charakteristických rozměrů konkávních struktur a vláken .....	70
6.4	Určení smáčivosti měřením kontaktního úhlu .....	73
6.5	Testy toxicity povlákňovaných fólií.....	74
6.6	<i>In vitro</i> testy buněčné proliferace .....	77
6.7	Zhodnocení degradability materiálu.....	90

7	Diskuse.....	92
7.1	Návrh materiálu .....	92
7.2	Příprava materiálu .....	94
7.3	Vyhodnocení <i>in vitro</i> testů .....	96
7.4	Potenciální úskalí a směry dalšího výzkumu.....	97
8	Závěr.....	99
	Seznam použitých zdrojů.....	101
	Seznam tabulek.....	112
	Seznam grafů.....	112

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFM	mikroskopie atomárních sil
BFSA	Breath-figure Self-assembly (metoda samouspořádávání pro vytváření periodických konkávních struktur)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (typ syntetického média pro kultivaci buněk)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	mezibuněčná hmota
FITC	phalloidin-fluorescein izokyanát
FM	fluorescenční mikroskopie
KNT	Katedra netkaných textilií TUL
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NPs	nanočástice
PANI	polyanilin
PBS	fosfátový pufr
PCL	poly- $\epsilon$ -kaprolakton
PDMS	polydimethylsiloxan
PDX	polydioxanon
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)
PPY	polypyrrol
PS	polystyren
RH	relativní vlhkost
RNA	ribonukleová kyselina
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TE	tkáňové inženýrství
TFE	2,2,2-trifluorethanol
UV/Vis	ultrafialové/viditelné spektrum



# I. TEORETICKÁ ČÁST

# 1 ÚVOD

Nezanedbatelnou část lidské populace denně trápí nemoci a postižení spojená s poškozením, ztrátou či narušením funkce některé z tkání nebo orgánů, ať už se jedná o úrazy, popáleniny, geneticky podmíněné abnormality nebo celou řadu civilizačních onemocnění, včetně kardiovaskulárních chorob či rakoviny. Medicína pracuje s různými metodami, jak tyto stavy léčit a kompenzovat. Tradiční postupy, jako jsou transplantace, či protetické náhrady, jsou však spojené s nezanedbatelnými úskalími, která se dosud nepodařilo uspokojivě vyřešit a nabízí se tak otázka, zda není žádoucí zvolit zcela jiný přístup.

Tkáňové inženýrství je poměrně mladý obor, který by mohl být odpovědí na tuto otázku. Za použití vlastních buněk pacienta a v ideálním případě levných a dostupných materiálů se tento biomedicínský směr pokouší o produkci biologických náhrad, co možná nejuvěrněji kopírujících funkci původní části lidského těla a bez rizika odmítnutí organismem. Jedním ze tří klíčových pilířů tohoto oboru (vedle buněk a různých typů biochemických signálů) jsou právě vhodné materiály, tzv. *scaffolds*, které tvoří základní „lešení“ pro nově vytvořenou tkáň, případně mohou plnit i další funkce, například usměrňovat regeneraci tkáně určitým způsobem a bránit tak např. nežádoucímu srůstání v pooperační ráně.

Tato diplomová práce se zabývá návrhem, výrobou a testováním jednoho takového materiálu. Po prozkoumání požadavků kladených na biologické scaffolds a různých možnostech jejich přípravy a modifikace byl připraven dvouvrstvý materiál, jehož základem je fólie z biodegradabilního polymeru polydioxanonu. Jedna strana fólie nese specifickou strukturu vytvořenou self-assembly metodou známou jako *Breath Figures*, zatímco druhá strana je pokrytá nanovláknem. Po analýze různých vlastností tohoto materiálu bylo usouzeno, že má potenciál podporovat buněčnou proliferaci na jedné straně, ale bránit přirůstání ke tkáni ze strany druhé. Tato hypotéza byla následně ověřena *in vitro* testy s myšími fibroblasty.

K přípravě strukturované fólie byl využit jednoduchý postup zahrnující nanesení tenké vrstvy roztoku polydioxanonu na hladké skleněné destičky a jejich umístění do klimatizované komory, kde byly vystaveny toku vzduchu o definované vlhkosti a teplotě. Za těchto podmínek došlo k odpaření rozpouštědla z roztoku a zároveň ke kondenzaci vodních kapek na hladině tuhajícího polymeru. Otisky těchto kapek poté zůstaly zachovány na vzniklé polymerní fólii v podobě systému konkávních struktur. K elektrickému

zvlákňování bylo použito zařízení Nanospider 1WS500U umožňující produkci nanovlákných vrstev v poloprůmyslovém měřítku. Morfologie fólie i vlákně vrstvy byla charakterizována skenovací elektronovou mikroskopií a optickou profilometrií. Před *in vitro* testováním byl proveden test cytotoxicity dle normy ISO 10993:5. *In vitro* test buněčné proliferace byl vyhodnocen určením metabolické aktivity buněk pomocí CCK-8, kromě toho byla buněčná populace pozorována prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie a fluorescenční mikroskopie.

Celý materiál je připraven pouze z jednoho, příp. kombinace dvou typů polymerů, bez jakékoliv modifikace jejich chemické struktury či navázání dalších látek. Produkt tak představuje zajímavou ukázkou, jak lze pouze morfologií materiálu ovlivňovat interakci scaffoldu s tkání a mohl by být například základem scaffoldů, které budou podporovat hojení pooperačních ran v dutině břišní a zároveň bránit intraperitoneální adhezi.

## 2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Náplní této diplomové práce je vývoj materiálu pro tkáňové inženýrství. Takové materiály jsou aplikovány v živých organismech, kde podporují regeneraci tkání. Díky tomu jsou na ně kladeny mnohočetné a velmi specifické požadavky. Pro jejich pochopení byla provedena literární rešerše, jejíž náplní jsou základní principy tkáňového inženýrství, zejména vzájemná interakce buněk, materiálů a dalších faktorů.

### 2.1 Definice a význam tkáňového inženýrství a úskalí jeho alternativ

Tkáňové inženýrství (*tissue engineering*, TE) je obvykle definováno jako multidisciplinární obor, který využívá poznatků inženýrství a přírodních věd k vývoji a výrobě biologických náhrad, které mohou nahradit či obnovit poškozenou tkáň či orgán, nebo mohou vylepšit jeho funkci [1]. Proces tkáňového inženýrství lze stručně shrnout následovně: Základem je vhodný *scaffold* neboli „lešení“ umožňující růst a diferenciaci buněk, kterým obvykle bývá buď decelularizovaná buněčná hmota, nebo syntetický polymerní materiál, který svou strukturou a vlastnostmi mezibuněčnou hmotu napodobuje. Na tento scaffold jsou zavedeny odpovídající typy buněk a vhodnou stimulací (pomocí parametrů prostředí, k jejichž regulaci slouží bioreaktory, dále prostřednictvím signálů a také pomocí dodávání vhodných živin, hormonů, stimulantů a dalších účinných látek) dochází k jejich proliferaci, postupnému osídlení celého scaffoldu a vhodné diferenciaci tak, že výsledným produktem je funkční uměle vytvořená biologická tkáň. Tato tkáň může poté sloužit k již zmíněným účelům, tedy k náhradě poškozené či chybějící tkáně/orgánu pacienta.

Tradičnějšími metodami zabývajících se stejným problémem jsou transplantace tkání a orgánů a syntetické (mechanické) náhrady a protézy. O prvních pokusech s transplantacemi existují záznamy již z doby starověku, např. v Eberském papyru datovaného do doby okolo 1550 př. n. l. se lze dočíst o proceduře léčení popálenin pomocí transplantace kožních štěpů [2]. Transplantace větších kusů tkání či celých interních orgánů nicméně byla dlouho spíše předmětem legend (příběhy o těchto zákrocích vykonaných bohy či léčiteli s nadpřirozenými schopnostmi lze dohledat v řeckém, římském, egyptském či indickém folklóru, spolehlivé záznamy o úspěšných skutečně vykonaných transplantacích tohoto typu však neexistují) a realitou se stala až v 50. letech 20. století, kdy byla provedena první úspěšná transplantace ledviny [3].

Ačkoliv se dnes již poměrně úspěšně daří transplantovat jak kusy tkání (např. kůže), tak celé orgány, transplantace jsou stále spojeny s významnými úskalími a omezeními. Při transplantaci z těla jiného člověka – dárce (tzv. allograft) nezřídka dochází k nežádoucí reakci imunitního systému, který transplantovanou tkáň rozeznává jako cizí objekt. Tento problém bývá kompenzován tlumením imunitního systému pomocí imunosupresiv, které však vede ke snížení obranyschopnosti organismu, či má jiné nepříznivé účinky [4]. Další komplikací při transplantaci allograftu může být nedostatek vhodných dárců – čekací lhůty na transplantace bývají dlouhé řádově i roky, což v případě akutních stavů vyžadujících co nejrychlejší řešení představuje nesmírný problém. V některých případech lze využít transplantaci vlastní tkáně z těla pacienta (autograft), která s výše zmíněným rizikem imunitní reakce není spojena, možnosti využití této metody jsou však omezené (z pochopitelných důvodů takto nelze nahrazovat např. celé vnitřní orgány), jsou spojeny s dalším chirurgickým zásahem do těla pacienta, a tedy případnými komplikacemi a také se zvýšenou pravděpodobností infekce [5].

Stejně tak protézy, tedy nebiologické (mechanické) náhrady zdaleka nejsou ideálním řešením. V současné době je již možné sestrojít bionické protézy končetin, které jsou propojené s nervovým systémem pacienta a umožňují určitou míru pohybu. Ve vývoji jsou rovněž technologie umožňující vytvářet smyslové vjemy (hmat, pocit tepla či chladu a podobně). V současnosti však neexistují komerčně dostupné syntetické náhrady schopné nahradit všechny funkce původní biologické části těla dokonale [6]. Užívání protéz je spojené i s psychickými těžkostmi (pacienti mívají obtíže ztotožnit se s mechanickou náhradou a vnímat ji jako součást vlastního těla, což mimo jiné souvisí právě i s absencí smyslových vjemů a všech funkcí původní končetiny), rehabilitace po amputaci a obdržení protetické náhrady je také velmi náročná z časového, psychického i finančního hlediska [7].

Situace je ještě méně příznivá v případě interních orgánů. Například implantovatelná umělá srdce jsou používána a neustále zdokonalována již přes 60 let, a ačkoliv nějakou formu takového zařízení již obdrželo okolo 1700 pacientů po celém světě, existující umělá srdce slouží spíše jako dočasné řešení k překlenutí doby před nalezením vhodného dárce pro transplantaci. Byly a jsou také spojeny s mnoha omezeními, např. starší pneumatically poháněné modely vyžadovaly pro svou činnost rozměrné pohonné zařízení, které znamenalo permanentní upoutání pacienta na lůžko. Do dnešní doby se nikomu nepodařilo

sestrojit takové umělé srdce, které by umožnilo skutečně trvalou náhradu tohoto orgánu a zajistilo pacientovi dlouhý a kvalitní život [8]. Nic nenasvědčuje tomu, že by v této oblasti mělo brzy dojít k zásadnímu průlomů, a tak se zdá, že biologické náhrady tkání a orgánů vytvořené pomocí tkáňového inženýrství by mohly představovat lepší řešení.

Tkáňové inženýrství má potenciál eliminovat a obejít většinu problémů zmíněných u jiných metod náhrady tkání a orgánů. Tkáňové inženýrství umožňuje použít k „vypěstování“ náhrady vlastní buňky pacienta a tím zamezit odmítavé reakci imunitního systému na novou tkáň. V případě, že je jako základ náhrady použita decelularizovaná mezibuněčná hmota, je spektrum možných dárců mnohem širší než v případě transplantace celého orgánu, neboť není nutné řešit kompatibilitu dárce a příjemce (ta je zajištěna osazením decelularizované hmoty vlastními buňkami příjemce), pokud je použitý scaffold synteticky připravený, není nutné dárcovství řešit vůbec. Tkáňové inženýrství cílí na přípravu biologických náhrad tvořených buňkami a mezibuněčnou hmotou, a tedy věrně kopírujících původní orgán/tkáň a všechny jejich funkce, což je v kontrastu s již zmíněnými nedokonalostmi syntetických náhrad a protéz.

## 2.2 Historie tkáňového inženýrství

Počátky tkáňového inženýrství tak, jak ho chápeme dnes, lze vysledovat na počátek 70. let 20. století do Spojených států Amerických, konkrétně do města Boston, které bylo po více než deset let jediným centrem výzkumu tohoto nového vědního oboru. Tehdy doktor W. T. Green, místní dětský chirurg, provedl první pokusy s regenerací tkáně (konkrétně chrupavky) pomocí chondrocytů (buněk chrupavčité tkáně) implantovaných na kostní štěpiny. Experiment sice nedopadl úspěšně, základní myšlenka (zavedení vhodného typu buněk na odpovídající scaffold) však byla správná. Během několika následných let bylo provedeno vícero experimentů s cílem vytvořit novou kožní tkáň pro implantaci pacientům s popáleninami. Tyto pokusy využívaly různé typy kožních buněk (kožní fibroblasty, keratinocyty, ...) a jako scaffold byla většinou použita nějaká forma kolagenu.

Zásadní milník ve vývoji tkáňového inženýrství přišel uprostřed 80. let, kdy vědci Joseph Vacanti a Robert Langer přišli s myšlenkou kontrolovaného designu vlastních scaffoldů z polymerních materiálů. Do té doby se na všechny experimenty používaly pouze přírodní materiály, u kterých nebylo možné ovlivňovat všechny klíčové vlastnosti a jejichž použití v roli scaffoldů přinášelo nepředvídatelné výsledky.

Patrně první použití termínu „tkáňové inženýrství“ je datováno do roku 1991, kdy v periodiku *Surgical Engineering International* vyšel článek s názvem „Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering“. Během 90. let se také výzkum tkáňového inženýrství rozšířil z oblasti Massachusetts i do jiných oblastí Spojených států a také do Evropy a Japonska. Většina výzkumníků přitom udržovala spolupráci s původními bostonskými průkopníky tohoto oboru [9].

Tkáňové inženýrství se dostalo do veřejného povědomí (nutno podotknout že poměrně rozporuplným způsobem) v polovině 90. let, kdy byly ve článku od BBC o potenciálu tohoto oboru použity fotografie tzv. Vacantiho myši, která měla na zádech strukturu připomínající lidské ucho. Jednalo se o součást experimentu, kdy byla chrupavčitá struktura tvořená buňkami skotu implantována do myši, aby následně prorostla myšími buňkami [10]. Fotografie vzbudily velké kontroverze, které byly ale zčásti způsobené nepochopením podstaty experimentu laickou veřejností.

První pacient léčený za použití metod tkáňového inženýrství byl mladý člověk s vrozenou vadou hrudního koše, díky které mu mimo jiné chyběla hrudní kost (sternum). U tohoto pacienta byla chybějící kost nahrazena chrupavčitou tkání, vytvořenou pomocí implantace vlastních (autologních) chondrocytů postiženého na syntetický polymerní scaffold. Podobnou metodou byl v roce 1998 u jiného člověka substituován chybějící článek prstu, zde je zajímavostí, že jako scaffold posloužil porózní kus hydroxyapatitu získaný z mořského korálu [11]. Lze dohledat ještě několik dalších případů experimentální léčby s využitím tkáňového inženýrství, zatím však nedošlo k masovému nasazení těchto postupů do klinické praxe. Stále zbývá totiž vyřešit několik zásadních problémů, jednak jak efektivně postupy tkáňového inženýrství převést do masového měřítká (tzv. *scaling up*), ale také jak omezit podíl buněk, které nepřežijí proces implantace nově vytvořené tkáně. Existují i etická úskalí – aby bylo možné efektivně vytvořit velké množství tkáně z několika málo buněk, je výhodné použít tzv. kmenové buňky (viz Kapitola 2.3.1). Vhodné typy kmenových buněk se však někdy získávají kontroverzními způsoby, například z potracených lidských embryí. Existuje několik hledisek, ze kterých lze na tento problém pohlížet, skutečnost, že zde toto etické dilema existuje však nelze zcela opomíjet.



## 2.3 Základní principy tkáňového inženýrství

Jak již bylo zmíněno v Kapitole 2.1, obvyklý postup tkáňového inženýrství je následující: Je vytvořen vhodný scaffold (buď vyroben synteticky, nebo odebrán z organické hmoty), na který je nasazen odpovídající typ buněk, jež jsou předem kultivovány *in vitro* za pro ně příznivých podmínek. Buňky uchycené na scaffoldu jsou následně stimulovány vhodnou kombinací biologických, chemických a fyzikálních faktorů a signálů, aby došlo k jejich růstu a diferenciaci k vytvoření požadovaného typu tkáně. V souladu s tímto postupem se někdy hovoří o třech základních pilířích tkáňového inženýrství, nebo o „triádě tkáňového inženýrství“ [12], kde všechny tři komponenty musejí fungovat v souladu, aby bylo možné dospět k požadovanému výsledku. Tyto komponenty jsou **buňky**, **scaffolds** a **signály**.

### 2.3.1 Buňky

Buňky využívané v tkáňovém inženýrství mohou pocházet z různých zdrojů a jsou různých typů. Preferované je použití autogenních buněk (vlastních buněk z těla pacienta), použití allogenních buněk (buněk od jiného lidského dárce) a xenogenních buněk (buněk z jiného živočišného druhu) je vždy spjaté s rizikem nežádoucích imunitních reakcí. Pro jejich schopnost nekonečného dělení a diferenciaci je také výhodnější využití kmenových buněk oproti buňkám somatickým.

Mezi typy buněk atraktivní pro použití v tkáňovém inženýrství patří:

- **Embryonální kmenové buňky (ESCs):** Výhodou těchto buněk je schopnost množení bez diferenciaci (*self-renewal*) a pluripotence, tedy schopnost diferenciovat se téměř v jakýkoliv typ buněk, a to jak entodermních (např. buňky vnitřního povrchu plic či trávicího traktu), mezodermních (svalové, kostní aj. buňky), i ektodermních (nervové a epidermální buňky) [13]. Problémem jsou již zmíněná etická dilemata související se získáváním těchto buněk, proto se jako vhodná alternativa rozvíjí využití indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) – viz později.
- **Somatické kmenové buňky (SCSs):** Jedná se o typ kmenových buněk nacházející se v malém množství v dospívajících a dospělých organismech. Existuje několik typů SCS, z nichž každý je multipotentní, tedy schopný diferenciaci pouze do určitého spektra buněčných typů (např. hematopoetické kmenové buňky jsou schopné



diferenciace ve všechny hlavní typy krevních buněk, jako jsou erytrocyty, monocyty a neutrofilie). Etika využití těchto buněk je mnohem méně rozporuplná, jejich izolace a množení je však obtížná a oproti embryonálním kmenovým buňkám mají pouze omezené možnosti diferenciace.

- **Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs):** Způsob produkce tohoto typu kmenových buněk byl objeven v prvním desetiletí 21. století a spočívá v „přeprogramování“ somatických buněk pomocí transkripčních faktorů (speciální typ proteinu který řídí transkripci genetické informace) a kultivace za podmínek imitujících podmínky za kterých vznikají embryonální kmenové buňky [14]. Výsledkem jsou buňky, které mají podobné použití jako ESCs, ale mohou být vytvořeny ze somatických buněk pacienta, bez nutnosti sklizení buněk z lidských embryí. Výzkum iPSCs stále probíhá a objevují se tak nové a nové zdroje vhodných somatických buněk pro pře-programování (lze již využít např. kožní fibroblasty, keratinocyty odebrané z vlasů a ochlupení, krevní buňky či dokonce epiteliální buňky izolované z moči [15], proces odběru buněk pro pře-programování je tak čím dál méně traumatizující) a také se daří stále lépe řídit jejich diferenciaci. Problémem zůstává získávání a udržování dostatečné populace buněk (viabilita buněk často rychle klesá již po několika málo pasážích), kontrola nad procesem diferenciace a zamezení mutacím a celková technologická náročnost metod využívajících iPSCs.
- **Reprogramované buňky (DRCs):** Alternativou k vytvoření indukovaných kmenových buněk a jejich následné diferenciaci je přímé pře-programování jednoho typu somatických buněk, aby z nich vznikl typ jiný, tzv. transdiferenciace. Tento proces je přímočařejší než využití kmenových buněk a teoreticky je tak lépe kontrolovatelný. Již se v praxi podařilo např. pře-programovat lidské fibroblasty v neuronové buňky, multipotentní srdeční buňky či v hepatocyty [16]. Tento přístup je poměrně nový a vyžaduje proto mnoho dalšího výzkumu, ale zdá se být velmi slibnou alternativou k jiným typům buněk.
- **Somatické buňky:** Somatické neboli tělní buňky jsou plně diferenciované buňky odebrané z určité tkáně, např. fibroblasty, hepatocyty nebo osteoklasty. Přestože práce s nimi je snazší než s některými z jiných zmíněných typů buněk, využití nacházejí spíše ve výzkumu než pro praktické aplikace v tkáňovém inženýrství. To je případ i této diplomové práce, kde jsou pro *in vitro* testy vyrobeného dvouvrstvého materiálu

využívány myší fibroblasty 3T3, jakožto jeden z často využívaných modelových typů buněk.

### 2.3.2 Scaffoldy

Scaffold („lešení“) je materiál, na který jsou nasazovány buňky a poskytuje jim mechanickou oporu a vhodné podmínky ke správnému růstu a diferenciaci. Svými vlastnostmi by scaffold měl připomínat mezibuněčnou hmotu (ECM).

- **Obecné požadavky na scaffoldy:** Konkrétní podoba a vlastnosti scaffoldů se může lišit v závislosti na jeho aplikaci, obecně je však od scaffoldů vyžadováno, aby byly biokompatibilní, to znamená, že v prostředí lidského těla musí příznivým způsobem interagovat s organismem [17]. Konkrétně je žádoucí, aby scaffold nebyl pro organismus toxický, nevyvolával zánětlivé imunitní reakce a aby nedošlo k jeho obalení vazivovou tkání (reakce organismu na cizorodé předměty, které není schopný rozložit nebo vyloučit z těla). Naopak by měl podporovat adhezi a správný růst a diferenciaci buněk na svém povrchu a ve svém objemu [18, 19]. K tomu je důležitá porozita materiálu – ECM nejlépe napodobují vysoce porézní materiály s podobnými rozměry pórů, jako je velikost buněk, kterými bude materiál osídlen (obvykle jednotky až desítky mikrometrů) [20–23]. To je také důvod, proč jsou pro výrobu scaffoldů vhodná submikronová vlákna a nanovlákna. Obvykle je také nutné, aby byl scaffold biodegradabilní, to znamená, aby se po určitém čase v lidském těle rozložil na netoxické metabolity. Doba degradace opět záleží na konkrétní aplikaci, materiál by měl plně zdegradovat až ve chvíli, kdy je již dostatečně prorostlý novou tkání (scaffold je postupně nahrazen mezibuněčnou hmotou [24]. S toxicitou materiálu významně souvisí přítomnost reziduálních rozpouštědel, obzvláště pokud je scaffold připraven elektrickým zvlákněním z polymerního roztoku [25]. Některé polymery používané v biomedicíně lze dobře rozpustit pouze v toxických rozpouštědlech (např. polykaprolakton v chloroformu nebo polydioxanon v 2,2,2-trifluoethanolu) a po výrobě scaffoldu by mělo v materiálu těchto rozpouštědel zbývat co nejméně, ideálně žádné. Velmi důležitým parametrem vyžadovaným pro zavedení jakéhokoliv biomedicínského výrobku do praxe (scaffoldu nevyjímaje) je také opakovatelnost výroby – je nutné vytvořit postup, kterým bude možné scaffold opakovaně připravovat, aniž by docházelo k výrazným rozdílům ve vlastnostech mezi jednotlivými šaržemi. To

bývá problém u scaffoldů založených na přírodních materiálech, např. kolagenu. Jednotlivé šarže kolagenu se totiž mohou mezi sebou lišit (délkou řetězců apod. [26]).

- **Materiály používané k výrobě scaffoldů:** Lze je rozdělit do dvou základních skupin – přírodní a syntetické. Mezi přírodní materiály, které mohou sloužit jako základ scaffoldů patří peptidy a proteiny (kolagen, želatina, fibrinogen, elastin, přírodní hedvábí, keratin a další), polysacharidy (celulóza, chitin, glykosaminoglykany), nebo polynukleotidy – polymery složené ze stejných stavebních bloků, které tvoří DNA a RNA [27]. V některých případech bývá využívána také decelularizovaná mezibuněčná hmota. Výhodou přírodních materiálů je jejich vysoká biokompatibilita a biodegradabilita – organismus se s těmito látkami běžně setkává, interaguje s nimi a k jejich degradaci má obvykle k dispozici enzymy. Nevýhodou jsou obecně horší mechanické vlastnosti a příliš rychlá degradace oproti syntetickým polymerům [28], větší náchylnost na přenos infekce a problémy s opakovatelností přípravy. Mezi syntetické materiály používané k přípravě scaffoldů patří především následující polymery: Kyselina L-polymlečná (PLA, přesněji PLLA), kyselina polyglykolová (PGA), kopolymery kyseliny polymlečné a polyglykolové (PLGA), polykaprolakton (PCL), polyethylenglykol (PEG), případně kopolymery výše zmíněných (PCL-PEG, PCL-PLA) [29]. Výhodou těchto polymerů je, že je lze snadno a ve velkém měřítku opakovatelně připravovat. Mají také větší rozpětí mechanických vlastností a degradability než přírodní látky, tyto vlastnosti mohou být dále přizpůsobovány konkrétní aplikaci prostřednictvím tvorby kopolymerů. Protože se však jedná o tělu nepřírodní látky, může u nich docházet k imunitní reakci organismu, případně k degradaci na metabolity s nepříznivými lokálními účinky (např. vyvolávající změnu pH). O polymerech použitých v praktické části této práce pojednává Kapitola 3.
- **Tkáňové inženýrství bez použití scaffoldů:** Použití scaffoldu zůstává integrální součástí většiny experimentů v oblasti tkáňového inženýrství, existují však i postupy, které od použití scaffoldu upouštějí a místo toho spoléhají čistě na mezibuněčnou adhezi a schopnost buněk vytvářet vlastní mezibuněčnou hmota. Zvládnutí těchto metod je lákavé, neboť eliminuje celou řadu potenciálních rizik spojených s použitím scaffoldu. Problémové je zvládnutí těchto postupů v dostatečně velkém měřítku, aby byly prakticky použitelné [30].

### 2.3.3 Signály

Pojem „signály“ v tkáňovém inženýrství zahrnuje několik různých faktorů a mechanismů, jejichž společným znakem je, že působí na buňky usazené na scaffoldu a ovlivňují jejich růst a diferenciaci.

- **Biologické faktory:** Do této kategorie patří různé typy biomolekul podporujících regeneraci tkáně. Malé molekuly, kam se řadí kortikosteroidy a hormony, zprostředkovávají signalizaci intercelulární (komunikaci uvnitř buňky) i intracelulární (komunikaci mezi buňkami) prostřednictvím navazování se na specifické typy buněčných receptorů. Peptidy a bílkoviny (proteiny), mohou plnit funkci mitogenů (látek spouštějících mitózu – buněčné dělení), morfofenů (látek řídících buněčnou diferenciaci) nebo cytokinů (látek spouštějících imunitní reakci). Specifickou skupinou biomolekul jsou růstové faktory, jedná se opět o molekuly bílkovinné povahy, které se vážou na buněčné receptory a podporují růst tkáně, která poté přibývá rychleji než bez jejich použití [28]. Příklady růstových faktorů, jejichž užití v tkáňovém inženýrství bylo popsáno a publikováno, jsou bFGF/FGF-2 (faktory podporující růst fibroblastů) nebo VEGF, který podporuje růst cévního epitelu [31]. Existuje několik mechanismů navázání a dopravy biologických faktorů k buňkám. První možností je navázání faktoru na nějaký nosič (kovalentně, nebo častěji nekovalentně), např. do lipozomu, polymerních mikrosfér nebo do hydrogelu [32]. Některé biologické faktory zůstávají aktivní i při kovalentním navázání na nosič nebo povrch. Faktory lze někdy přímo vmíchat do média při *in vitro* buněčné kultivaci, zde však může být problém s řízením rychlosti, jakou je mají buňky spotřebovávat. Jednou z možností, jak toho docílit, je řízení autokrinní-parakrinní signalizace mezi buňkami [33], což je však složitý proces. Další možností je zakomponování biologických faktorů přímo do scaffoldu, rychlost uvolňování je poté řízena rychlostí degradace scaffoldu.
- **Fyzikálně-chemické faktory:** Míra buněčné adheze (zprostředkována speciálními proteiny – integriny), stejně jako schopnost a rychlost proliferace a diferenciaci do velké míry závisí na morfologii a fyzikálně-chemických vlastnostech povrchu scaffoldů. Při výrobě scaffoldu je tak nutné docílit vhodné topografie a geometrie (velikost pórů, tloušťku a orientaci vláken a podobně), případně lze použít různé metody povrchových úprav ke zlepšení vlastností materiálu. Dalšími faktory, na

kterých záleží, je elasticita materiálu a vnější síly, které na něj působí, např. tlak či periodické namáhání v určitém směru – některé typy tkání (např. kostní tkáň nebo vnitřní povrch plic) jsou totiž přirozeně vystaveny podobným podmínkám a jejich simulace tak vede k lepší regulaci buněčné diferenciaci [34].

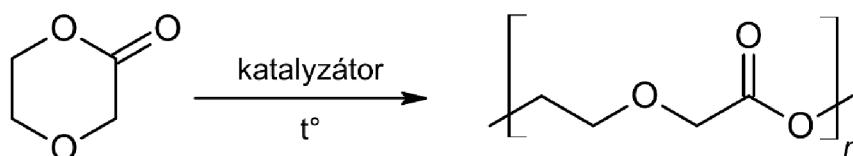
- **Bioreaktory:** Bioreaktor je zařízení, které dokáže vytvářet dynamické prostředí vhodné k buněčné kultivaci. Kultivace ve statickém prostředí (bez promíchávání) umožňuje vypěstovat pouze určitou maximální tloušťku tkáně, než se vyskytnou problémy se zajištěním kyslíku, živin a odvodu metabolitů všech buněk [35]. Použití bioreaktoru tento problém eliminuje, a navíc umožňuje působení dalších fyzikálně-chemických faktorů, které byly zmíněny v předchozím bodě. Existuje několik typů bioreaktorů s různou mírou složitosti, nejjednodušší bioreaktor je v podstatě kontinuálně promíchávaná průhledná nádoba (tzv. *spinner flask reactor*), složitějším typem je např. kompresní bioreaktor, který umožňuje dynamické namáhání scaffoldu a je tak vhodný např. ke stimulaci růstu chrupavčité tkáně.

## 3 BIOPOLYMERY A SPECIALIZOVANÉ METODY JEJICH ZPRACOVÁNÍ

První část této kapitoly představuje vhléd do vlastností a využití dvou biopolymerních materiálů, které jsou využívány v praktické části – polydioxanonu a polykaprolaktonu. Druhá polovina se pak zabývá metodami elektrického zvlákňování a Breath-figure self-assembly. Tyto specializované metody jsou využity v praktické části práce k přípravě materiálů se specifickou strukturou, která zásadně ovlivňuje, jakým způsobem interagují s buňkami a tkání.

### 3.1 Polydioxanon

Polydioxanon, přesněji poly-*p*-dioxanon (PDX) je syntetický semikrystalický polyester, v jehož struktuře se opakují etherové a esterové jednotky. Teplota tání polydioxanonu je okolo 110 °C a teplota skelného přechodu leží v rozmezí -10 až 0 °C [36]. K výrobě PDX slouží *p*-dioxanon, PDX se z něj vyrábí pomocí polymerizace s otevíráním kruhu (*ring opening polymerization*) za přítomnosti organokovového katalyzátoru, např. acetylacetonu zirkonu nebo laktátu zinku, a za dodání tepla. Tento proces je schematicky znázorněn na Obrázku 1.



Obrázek 1: Reakční schéma výroby polydioxanonu.

Nejstarší a nejrozšířenější aplikací polydioxanonu v medicíně je výroba chirurgických šitých nití. Za tímto účelem byl také tento polymer původně vyráběn americkou společností Ethicon Inc. Polydioxanon bývá zpracováván extruzí za nejnižší možné teploty, aby se předešlo jeho depolymerizaci [36]. Chirurgické nitě z PDX se vyznačují vysokou ohebností a v porovnání s jinými často využívanými vlákny, jako je Dexon (PGA) a Vicryl (kopolymer PGA a PLA) u nich dochází k pomalejší degradaci, při které nit ztrácí méně ze své pevnosti. K úplnému vstřebání v těle dochází přibližně po šesti měsících. Rovněž zánětlivost PDX nití bývá v porovnání s jinými materiály nižší.

Dalším použitím PDX je výroba biliárních stentů, které se používají pro léčbu benigní biliární stenózy (nenádorové onemocnění při kterém dochází ke zúžení žlučových cest).



Touto aplikací se zabývá společnost ELLA-CS, od které pocházejí vzorky polydioxanonových nití používané v praktické části k přípravě polymerních fólií [37].

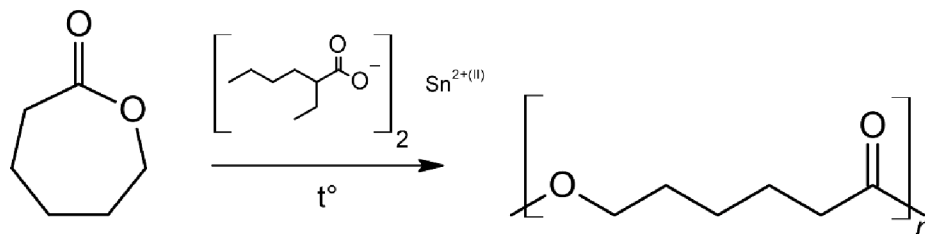
Pro snadnou viditelnost při použití jako šicí materiál nebo stent bývají PDX nitě obarveny, nejčastěji barvivem Solvent Violet 13 (jedná se o antrachinonové barvivo se systematickým názvem 1-hydroxy-4-(4-methylanilino)anthracen-9,10-dion), které jim propůjčuje tmavě modrofialovou barvu [38]. Takto byl obarven i materiál používaný jako surovina v praktické části, což je příčinou fialového zabarvení připravených polymerních fólií (patrné na Obrázku 7 na straně 43).

V poslední době jsou zkoumány možné nové biomedicínské aplikace PDX. Ukázalo se, že metodou elektrostatického zvlákňování lze připravit PDX nanovláknový materiál s takovými rozměry vláken a pórů, že napodobuje strukturu mezibuněčné hmoty [36]. Mechanické vlastnosti PDX nanovláken jsou navíc podobné mezibuněčné hmotě pojivové tkáně, jejíž hlavní struktura je tvořena kolagenem a elastinem. PDX také vykazuje určitou tvarovou paměť, což je při aplikaci v roli šicího materiálu spíše nevýhoda, neboť je komplikovanější na niti vázat a pevně utahovat uzly, tuto vlastnost lze však výhodně využít při přípravě cévních náhrad, nebo scaffoldů sloužících pro regeneraci cév. Kopolymerizací PDX s monomery derivátů (např. s benzyloxymethyldioxanonem, jehož následnou modifikací lze na řetězci polymeru vytvořit hydroxymethylové funkční skupiny [39], nebo s jinými látkami (např. s krátkými úseky polysacharidů nebo fosfátů [40]) lze řídit rychlost degradace, a tak se otevírají i nové možnosti využití PDX jako nosiče pro řízené uvolňování a dopravu léčiv (*drug delivery systems*). Výhodou oproti jiným biopolymerům (jako je PLGA), je také skutečnost, že degradační produkty polydioxanonu nesnižují lokální pH, tyto změny prostředí totiž mohou negativně ovlivňovat buněčnou viabilitu a proliferaci.

## 3.2 Polykaprolakton

Poly- $\epsilon$ -kaprolakton, někdy nazývaný jednoduše polykaprolakton či PCL, je zástupcem hydrofobních biodegradabilních polyesterů. Jedná se o semikrystalický polymer, jehož teplota tání je okolo 60 °C a teplota skelného přechodu -60 °C. PCL se vyrábí polymerizací s otevíráním kruhu, kde jako prekurzor slouží  $\epsilon$ -kaprolakton, cyklický polyester se sedmičlenným kruhem vyráběný oxidací cyklohexanonu kyselinou peroxooctovou.

Polymerizační reakce probíhá za zvýšené teploty a obvykle za přítomnosti katalyzátoru, např. 2-ethylhexanoátu cínatého. Reakční schéma výroby PCL znázorňuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Schéma polymerizační reakce používané k výrobě PCL.

Polymerizace PCL může probíhat za různých podmínek (teplota, doba polymerizace, typ a přítomnost katalyzátorů, poměr monomerů a rozpouštědla), tím lze určovat molekulovou hmotnost a polydisperzitu výsledného polymeru, a tedy dobu jeho degradace a mechanické vlastnosti [41].

PCL je dobře rozpustný v chloroformu, dichlormethanu, benzenu, cyklohexanonu nebo toluenu. Hůře rozpustný je v acetonu, ethylacetátu nebo dichlormethanu. Ve vodě a ethanolu je PCL nerozpustný [42]. Při produkci výrobků z PCL pro biomedicínu se tak často nelze vyhnout použití zdraví škodlivých rozpouštědel a je proto nutné věnovat pozornost možné přítomnosti rozpouštědlových reziduí ve výsledném materiálu.

Ve fyziologickém prostředí dochází k neenzymatické hydrolýze esterových vazeb a tím k degradaci polymerního řetězce [43]. Krátké oligomerní fragmenty (relativní molekulová hmotnost nižší než 3000) jsou poté dále degradovány uvnitř buněk. Celková doba degradace závisí na objemu materiálu, u čistého homopolymerního PCL se však pohybuje v řádu měsíců až let. K ovlivnění doby degradace se využívá kopolymerizace či mísení s jinými druhy polymerů [44].

Polykaprolakton je polymer, který je v současnosti hojně zkoumán a využíván v biomedicíně. Ačkoliv jeho biokompatibilita není v základní formě příliš vysoká, PCL nabízí široké možnosti modifikace, které umožňují upravovat řadu vlastností výsledného materiálu, jako je doba degradace, smáčivost, nebo morfologie povrchu. Lze také snadno vytvářet blendy (směsi) a kopolymery s jinými látkami. Doba degradace je obvykle delší než u jiných biopolymerů (PLA, PGA, PLGA). PCL je navíc dnes již relativně levný a dostupný materiál.



Některé výrobky z PCL jsou schváleny pro medicínské využití americkou Food and Drug Administration (FDA). Mezi nejstarší z nich patří Capronor, vstřebatelný antikoncepční implantát uvolňující z PCL tyčinek syntetickou obdobu progesteronu [45]. Jiným příkladem je Monocryl, biodegradabilní chirurgická vlákna, která jsou vyrobena z kopolymeru kaprolaktonu a glykolidu [46]. Dostupné jsou i *drug delivery* systémy na bázi PCL, konkrétně výrobky spadající pod značku SynBiosys, které mají formu mikrosfér, mikrotyčinek a jiných útvarů složených z kopolymeru laktidu kaprolaktonu a ethylenglykolu. Výrobce uvádí, že tyto produkty mohou sloužit k řízené dopravě široké škály léčiv a jiných látek a využívají se např. při léčbě cukrovky, kardiovaskulárních onemocnění, v onkologii nebo v oční medicíně [47]. Kromě toho lze stejným kopolymerem pokrývat implantáty pro zvýšení jejich biokompatibility.

Za zmínku stojí výzkum, kterého se dlouhodobě účastní Technická univerzita v Liberci ve spolupráci s Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Plzni a vědci z dalších výzkumných institucí, včetně zahraničních. Ústředním tématem této výzkumné činnosti je vývoj biodegradabilních, pro buňky antiadhezivních materiálů, které by mohly sloužit k zabránění nežádoucímu srůstání tkání při pooperační léčbě (k podobnému účelu by mohl sloužit i materiál připravený v praktické části této práce). Řada materiálů vyvinutých a testovaných v rámci tohoto výzkumu byla na bázi PCL. Nanovlákněné PCL vrstvy připravené bezjehlovým elektrickým zvlákněním na zařízení Nanospider byly otestovány *in vivo* jako krycí materiál na střevní anastomózy, který by měl podporovat hojení tkáně a omezit riziko anastomotického leaku (komplikace při které dochází k prosakování obsahu střeva skrz anastomózu, významně zvyšující mortalitu a riziko dalších komplikací). Materiál se ukázal být dobře biokompatibilní a cytokompatibilní, nebyl pozorován žádný negativní efekt na organismus zvířat, nanovlákněnou záplatu bylo možné snadno umístit na postižené místo, které zakrývala po celou dobu experimentu (i když v některých případech došlo k jejímu drobnému posunu). V ošetřených místech bylo zjištěno výrazně vyšší množství kolagenu než u zvířat, kde nebyla nanovlákněná aplikována, což lze považovat za důkaz stimulace hojení. K anastomotickému leaku nedošlo u žádného z testovaných zvířat z obou skupin (kontrolní a testovací), vliv nanovlákněné záplaty na snížení rizika leaku tedy nebylo možné posoudit [48].

V jiném experimentu byla jedna strana nanovlákněné PCL vrstvy upravena nejprve nanesením mikrokapiček pomocí electro sprayingu a následně chemickou depozicí

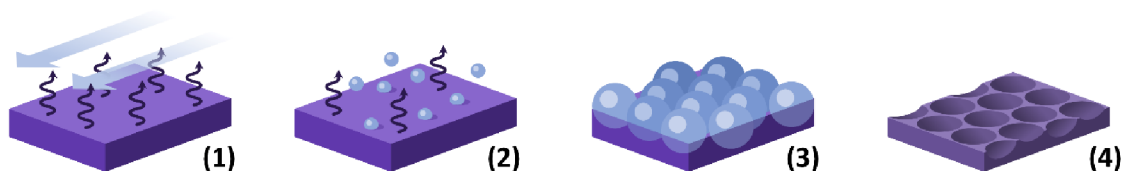
hexamethyldisiloxanu. Výsledkem byl velice hydrofobní povrch, inspirovaný morfologií lotosového listu. Následné testy probíhající po dobu šesti měsíců sledovaly možné změny morfologie a složení povrchu a prokázaly, že hydrofobní vlastnosti upraveného povrchu zůstávají zachovány. Testy s buněčnými kulturami vedly k potvrzení biokompatibility materiálu a při *ex vivo* testech bylo pozorováno, že upravená strana je méně adhezivní pro buňky a materiál tak má potenciál bránit nežádoucímu přirůstání tkáně při hojení např. střevní anastomózy [49].

Uvedené příklady probíhajícího výzkumu ukazují výhodné vlastnosti PCL (zejména PCL nanovláken), kterých je využito v praktické části při přípravě jedné z variant dvouvrstvého materiálu, který má za cíl, podobně jako zmíněný výzkum, podporovat adhezi buněk pouze z jedné strany.

### 3.3 Breath-figure self-assembly

*Breath-figure self-assembly* (BFSA) je metoda, kterou je možné připravovat polymerní materiály, jejichž povrch je pokryt uspořádanou sítí pórů či prohlubní (propojených nebo nepropojených), připomínajících strukturu včelí plástve. Jak již název napovídá, jedná se o tzv. self-assembly (lze přeložit jako „samouspořádání“) metodu, při které dochází k samovolné organizaci původně neuspořádaných komponent nějakého systému do určité uspořádané konfigurace, přičemž tento proces nevyžaduje vnější zásahy a je řízen pouze termodynamickými zákony (snaha systému existovat ve stavu energetické rovnováhy [50]).

*Breath-figures* je jev známý již poměrně dlouhou dobu. Doslovný překlad tohoto pojmu (který se však v českých publikacích nepoužívá) by byl „dechové obrazce“. Název má původ v jedné z nejtriviálnějších situací, kde se s tímto fenoménem lze setkat, což je kondenzace vodních kapek na studeném povrchu při vysoké vlhkosti, např. pokud v zimě člověk dýchne na okno [51]. Jev byl nejprve zkoumán v souvislosti s meteorologií, mimo jiné ve snaze objasnit proces, jakým vzniká rosa [52]. Na konci 20. století však začal být využíván k přípravě polymerních filmů s hierarchicky strukturovaným povrchem [53].



Obrázek 3: Princip Breath-figure self-assembly metody.

Princip metody, pomocí které lze tento jev aplikovat k přípravě strukturovaných polymerních materiálů, je znázorněn na Obrázku 3 a lze ho popsat následovně: Vrstva polymerního roztoku, ideálně připraveného s využitím vysoce těkavého rozpouštědla, je umístěna do prostředí, ve kterém proudí vlhký vzduch (1). Vypařování rozpouštědla spotřebovává energii (skupenské teplo vypařování), a pokud je dostatečně rychlé, dochází k ochlazení povrchu kapaliny na teplotu, při které začne docházet ke kondenzaci vzdušné vlhkosti (2). Na ochlazené hladině se díky kondenzaci začínají formovat vodní kapky, které jsou nejprve malé a neuspořádané, postupně se pak zvětšují a samouspořádávají do mřížky pokrývající celou hladinu (3). Za ideálních podmínek takto vzniká pravidelná hexagonální struktura těsně uspořádaných kapek. Eventuálně dojde k odpaření všeho rozpouštědla a poté i vlhkosti (po odpaření rozpouštědla již žádné jevy rapidně nespotebovávají teplo, proto dále nedochází ke kondenzaci). Výsledkem je polymerní film s uspořádanou strukturou pórů/prohlubní (4).

Velikost takto připravených pórů/prohlubní se obvykle pohybuje v řádu mikrometrů. Výslednou podobu struktury, či to, zda k celému procesu vůbec úspěšně dojde, však závisí na celé řadě parametrů [54]. Za zmínku stojí především následující:

- **Vlhkost:** Zvýšení relativní vlhkosti obvykle vede k větší velikosti pórů. Aby jev mohl vůbec probíhat, je obvykle zapotřebí relativní vlhkost alespoň 50 %.
- **Teplota:** čím vyšší je teplota, tím rychleji se odpařuje rozpouštědlo. Protože při nižší teplotě trvá úplné odpaření rozpouštědla déle, mají kondenzující vodní kapky delší dobu na růst, než dojde ke změně hladiny na pevnou látku. Zvýšení teploty tedy obvykle vede ke zmenšení pórů.
- **Použitý polymer:** Polymery s delším řetězcem (vyšší relativní molekulovou hmotností) produkují větší póry. Vliv na morfologii pórů má také tvar polymerního řetězce – rozvětvené řetězce mohou produkovat menší póry, polymery s kulovitým řetězcem vedou k uspořádané struktuře.

- **Koncentrace polymeru:** Nižší koncentrace polymeru v roztoku obvykle vede k tvorbě větších pórů. U některých polymerních roztoků však závislost na koncentraci nebyla pozorována.
- **Tlak:** Snížení tlaku vede ke zrychlení vypařování rozpouštědla. Stejný efekt má zrychlení toku proudícího vzduchu.

Chování systému závisí také na konkrétním použitém polymeru a rozpouštědle. V této diplomové práci je k přípravě fólie strukturované metodou breath-figure self-assembly využit PDX rozpuštěný v trifluorethanolu (TFE), protože tento roztok byl na Katedře netkaných textilií již dříve používán k přípravě materiálů pro tkáňové inženýrství a během některých experimentů byl pozorován na fóliích připravených z tohoto roztoku vznik struktur pórů právě díky BFSA. Cílem je připravit fólii, která na jedné straně inhibuje buněčnou adhezi. V literatuře existují záznamy o využití struktur připravených metodou BFSA k ovlivnění buněčné adheze, proliferace a diferenciace. Struktury se často využívají ke zvýšení adheze oproti hladkému polymernímu povrchu, při vhodné morfologii však mohou buněčnou proliferaci naopak inhibovat. Např. Fukuhira *et al.* připravili pomocí breath-figure self-assembly strukturovaný polymerní film z PLA, u kterého bylo *in vivo* testy na krysách prokázáno, že do určité míry snižoval riziko intraperitoneální adheze – nežádoucího přirůstání tkáně k vnitřnímu povrchu břišní dutiny po chirurgickém zákroku v tomto prostoru [55]. Tanaka *et al.* pozorovali v první fázi svého experimentu restrikcí laterální migrace hepatocytů pomocí filmu s póry o průměru 5 mikrometrů – buňky měly zakulacený tvar a zůstávaly v menších shlucích, zatímco buňky na hladkém povrchu tvořily monovrstvu [56]. Pomocí fólií strukturovaných metodou BFSA lze také inhibovat rakovinné buňky [57] a bakterie [58].

## 4.2 Elektrické zvlákňování

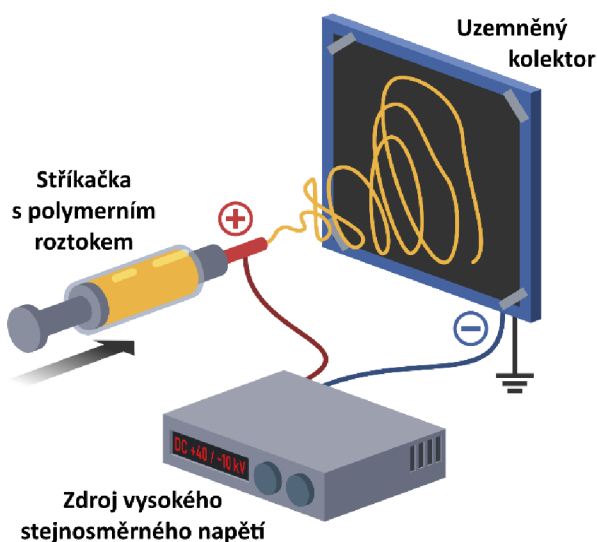
Elektrické zvlákňování je pravděpodobně nejčastěji využívaný způsob produkce nanovláken. To je dáno jeho jednoduchostí, možností rozšíření do průmyslového měřítko a širokou škálou parametrů, které je možné řídit, aby bylo dosaženo optimální podoby výsledných vláken. Aparatura pro stejnosměrné elektrické zvlákňování se skládá především z následujících komponentů [59]:

- **Zvlákňovací elektroda:** Může mít různou podobu. Nejstarší a v laboratorních podmínkách dosud využívaný typ je dutá jehla, skrze kterou je dávkován roztok

zvlákňovaného polymeru. V zařízeních pro průmyslovou výrobu bývá místo toho použito např. kovový válec nebo struna, které jsou roztokem natírány. Zvlákňovací elektroda bývá obvykle kladně nabitá.

- **Kolektor:** Plocha, na kterou jsou zachytávána vyrobená nanovlákná. Může sám o sobě plnit funkci druhé elektrody (je nabíjen opačným nábojem než zvlákňovací elektroda), nebo je kolektor umístěn mezi zvlákňovací elektrodou a druhou elektrodou. V laboratorních podmínkách může být kolektor např. kus tvrdého papíru, v zařízeních pro velkoobjemovou výrobu se obvykle používá spunbondová textilie, igelit nebo jiný podkladový materiál, který je postupně převíjen, a tak vzniká kontinuální pás povlákňovaného materiálu.
- **Zdroj vysokého napětí:** Napětí používané při elektrickém zvlákňování obvykle dosahuje hodnot v řádu desítek kV.

Sofistikovanější zvlákňovací zařízení bývají umístěna v izolované komoře, která kromě ochrany před úrazem elektrickým proudem umožňuje také určitou regulaci podmínek zvlákňování (teplota, vlhkost). Tyto podmínky mohou mít velký vliv na podobu nanovláken a je nutné je přizpůsobovat podle použitého polymeru a rozpouštědlového systému. Schéma nejjednodušší aparatury pro elektrické zvlákňování znázorňuje Obrázek 4.

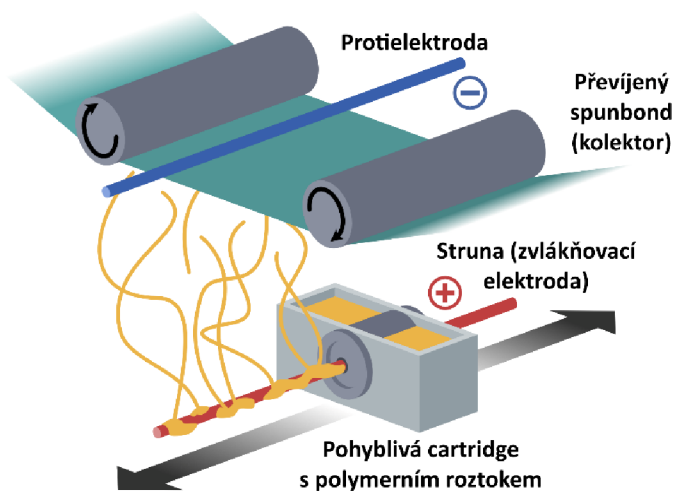


Obrázek 4: Schéma aparatury pro elektrické zvlákňování z jehly.

Během procesu zvlákňování vytváří zdroj napětí elektrostatické pole mezi zvlákňovací elektrodou a kolektorem. Na zvlákňovací elektrodu je vytlačen nebo natřen vodivý polymerní roztok, který se vlivem elektrického pole nabije stejným nábojem, jaký má zvlákňovací elektroda. V důsledku toho je polymerní roztok přitahován k opačně nabitému

kolektoru a částice v něm mají tendenci se odpuzovat (mají všechny stejný náboj), proti tomu však působí kohezní síly částic kapaliny, projevující se jako povrchové napětí. Obě síly jsou po určitou dobu v rovnováze a jejich působením dojde k prodloužení kapky polymerního roztoku na elektrodě do kónického tvaru, tzv. Taylorova kužele. V momentě, kdy je rovnováha porušena a elektrická síla převládne, vytryskne z kužele proud polymeru (polymerní tryska), který směřuje ke kolektoru. Během letu dochází k odpařování a odpařování rozpouštědla a drobné nestability letící trysky jsou příčinou tzv. bičování (*whipping*), při kterém se vznikající vlákno prodlužuje a ztenčuje [60]. Na kolektor již obvykle vlákna dopadají suchá, bez rozpouštědla (pokud jsou parametry zvlákňování správně nastaveny).

Finálním produktem praktické části této práce je dvouvrstvý materiál, jehož jedna vrstva je tvořena PCL nebo PDX nanovláknem. K výrobě nanovláken bylo použito zařízení Nanospider™ 1WS500U, vyráběné společností Elmarco na základě technologie vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci prof. O. Jirsákem a jeho týmem. Jako zvlákňovací elektroda zde slouží přibližně půl metru dlouhá struna, která je natírána polymerním roztokem pomocí hydraulicky poháněného jezdece nesoucího cartridge se zásobníkem na polymerní roztok a průvlakem, který strunu obepíná. Na struně po zapnutí elektrického pole vzniká velké množství Taylorových kuželů a produktivita je tak výrazně vyšší než u zvlákňování z jehly [61]. Vyrobená vlákna jsou zachytávána na průběžně převíjený spunbond, procházející mezi zvlákňovací elektrodou a protielektrodou. Schéma zvlákňování v zařízení Nanospider je uvedeno níže (Obrázek 5).



Obrázek 5: Schéma zařízení Nanospider.



## 4 POLYMERNÍ FÓLIE VE TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Následující kapitola představuje přehled vybraných polymerních fólií (membrán, filmů), kterými se zabýval výzkum v oblasti tkáňového inženýrství, nebo které jsou již komerčně dostupné. Protože scaffold pro tkáňové inženýrství musí být porézní a většinou je vhodné, aby byl trojrozměrný, jsou fólie (v klasické podobě dvourozměrný, málo prodyšný materiál) obvykle využívány v modifikované formě (povrchové úpravy, vytvoření pórů), jako jedna ze součástí vícevrstvého systému, který navíc nese i více porézní komponenty (např. nanovlákná), nebo v raném experimentálním stadiu, kdy je obvykle záměrem později upustit od použití fólie a připravit trojrozměrný scaffold. S fóliemi/membránami se můžeme také setkat u orgánů na čipu, což je odvětví biomedicíny, které nespadá přímo pod tkáňové inženýrství, využívá ale některé podobné koncepty.

Tkáňové inženýrství pracuje s teorií, že vodivé prostředí může být vhodné pro stimulaci růstu některých typů buněk, protože usnadňuje předávání signálů mezi nimi a umožňuje elektrickou stimulaci [62]. Existuje několik vodivých polymerů, konkrétně polyanilin (PANI), polypyrol (PPY) a polythiofen, které vykazují cytokompatibilitu a možnost využití v tkáňovém inženýrství. Vrstvy připravené z těchto polymerů podporují adhezi, proliferaci a diferenciaci různých typů buněk a *in vivo* testy neprokázaly žádné negativní účinky implantace těchto materiálů do organismu [63, 64]. Syntéza filmů těchto polymerů je obvykle chemická nebo elektrochemická. Liu *et al.* v roce 2013 připravili polypyrrolové membrány metodou elektropolymerizace pyrrolu na sklíčko pokryté indium-cín oxidem. Výsledný materiál byla jednolitá vrstva tvořená rovnoměrně rozmístěnými pospojovanými kulovými částicemi o průměrné velikosti 62 nanometrů. Na této membráně byly následně kultivovány myší pre-osteoblasty MC3T3-E1. Testy ukázaly, že vrstva je pro tyto buňky cytokompatibilní. Membrána s buňkami byla následně vystavena třem typům stimulace: mechanickému namáhání pomocí orbitální třepačky s frekvencí 150 otáček za minutu, elektrické stimulaci konstantním napětím 200 mV a kombinaci obou typů stimulace. Použitá stimulace neměla významný vliv na morfologii buněk, došlo však ke zrychlení buněčné proliferace a diferenciaci. Nejvíce patrný byl tento efekt u vzorků vystavených obou typům stimulace zároveň. Experiment tedy prokázal, že použití PPY

membrány umožňuje aplikovat stimulační efekty které urychlují růst a diferenciaci osteoblastů, což by mohlo mít význam pro kostní tkáňové inženýrství [65].

Min *et al.* během výzkumu publikovaného v roce 2014 připravili membránu z polyethylen tereftalátu (PET), která nesla sulfonovaný polyanilin. Na materiálu byly kultivovány pre-osteoblasty MC3T3-E1 a stromální buňky kostní dřevě (BMSCs). Bylo zjištěno, že míra buněčné adheze a proliferace je přímo úměrná míře sulfonace polyanilinu. Přítomnost PANI umožnila stimulaci elektrickým proudem, která vedla k vyšší míře buněčné mineralizace, tedy produkci fosfátu vápenatého a jeho zabudování do mezibuněčné hmoty, což je zásadní součást přirozeného procesu růstu a obnovy kostní tkáně [66].

Hydrofobní polymery, kam patří i PCL, jsou často využívány jako materiál pro scaffoldy a bioimplantáty díky jejich výhodným mechanickým vlastnostem a obvykle nízké imunitní odezvě organismu. Hydrofobicita však zároveň brání rychlé integraci s tkání. Sengupta *et al.* se pokusili vylepšit biokompatibilitu hydrofobní polyetherimidové (PEI) fólie sérií povrchových úprav, které vedly k výraznému zvýšení hydrofility. Prvním krokem byla plazmová úprava povrchu fólie za použití směsi dusíku a vodíku (2:3), která zavedla na povrch fólie aminové (-NH<sub>2</sub>) funkční skupiny. Na aminové skupiny byly nekovalentně navázány zlaté nanočástice stabilizované citrátem. Výsledná fólie byla máčena v roztoku argininu (biogenní aminokyselina), tím došlo k nekovalentnímu zachycení argininu na povrch zlatých nanočástic. Pro porovnání byly vytvořeny i vzorky, které stejným způsobem přes zlaté částice imobilizovaly fibronectin (glykoprotein nacházející se v ECM). Smáčivost a morfologie byly charakterizovány pomocí měření kontaktního úhlu a AFM. Kultivace v buněčné suspenzi (myší fibroblasty) a vyhodnocení buněčné adheze a viability ukázaly, že k upraveným povrchům po 4 hodinách adheruje okolo 90 % buněk v suspenzi a viabilita buněk je vyšší než na neupraveném polymeru, nebo na běžném povrchu kultivačních destiček. Vzorky s argininem navíc dosahovaly podobných výsledků jako vzorky s fibronectinem, zdá se tedy, že pokud je tato jednoduchá aminokyselina vhodně imobilizována, reagují na ní buňky podobně příznivě, jako na proteiny přirozeně se vyskytující v mezibuněčné hmotě. Výzkum nastínil jednu z možností úpravy hydrofobních polymerů pro zlepšení cytocompatibility a vytvořil materiál, který by mohl být vhodnějším podkladem pro kultivaci adherentních buněk, než povrch běžně používaných kultivačních láhví/destiček [67].



Bassi *et al.* publikovali v roce 2021 studii, která se zabývala testováním PCL membrány obohacené 5 % hydroxyapatitu (důležitým stavebním kamenem kostní tkáně) jako scaffoldu pro řízenou regeneraci kostí. Testy probíhaly *in vivo* na testovací populaci krys s 8mm defektem lebeční kosti. Jako negativní kontrola sloužila populace, jejíž hojení nebylo asistované žádnou membránou, léčba pozitivní kontroly byla podpořena kolagenovou membránou z prasečí kůže (u kolagenových membrán je již delší dobu známo, že jsou biokompatibilní, hemostatické (zastavují krvácení), permeabilní pro živiny a podporující migraci osteoblastů a fibroblastů [68]). K vyhodnocení procesu hojení po 7, 15, 30 a 60 dnech byly použity histologické a histometrické testy. Ukázalo se, že PCL membrána podporuje hojení kosti podobně, jako kolagenová membrána, po 30 i 60 dnech byla u obou vzorků pozorována velká oblast nově se formující kostní tkáně, po 60 dnech došlo u některých subjektů k téměř úplnému zacelení defektu novou kostní tkání. Oproti tomu u negativní kontroly probíhalo hojení podstatně hůře a střed defektu byl zacelen pouze pojivovou tkání. Test ukázal, že PCL membrány mohou být účinným prostředkem pro řízenou obnovu kostí a umožňují léčbu defektů, které organismus neumí bez asistence zregenerovat [69].

Stejný tým o rok dříve (2020) provedl obdobný experiment také s membránou z bakteriální celulózy Nanoskin<sup>®</sup> (celulóza vytvořená metabolickou aktivitou mikroorganismů, obvykle bakterií). *In vivo* experimenty a jejich vyhodnocení probíhalo obdobným způsobem, jako u výše zmíněného experimentu. Nicméně se ukázalo, že celulózová membrána není pro regeneraci kostních defektů vhodná, defekt byl po 60 dnech zacelený pouze pojivovou tkání (nedošlo k regeneraci kosti) a rovněž imunitní odezva byla vyšší než u kolagenové membrány. Membrána Nanoskin<sup>®</sup> je určena pro regeneraci měkkých tkání, zejména kůže, a tento experiment ukázal, že při aplikaci pro regeneraci jiného typu tkáně není její účinek uspokojivý [70].

Komerčně dostupným výrobkem, který lze klasifikovat jako fólii pro tkáňové inženýrství, je Cuticell<sup>®</sup> Epigraft [71]. Podobně jako v případě výše zmíněné membrány Nanoskin<sup>®</sup> se jedná o průhlednou vrstvu z bakteriální celulózy vytvářenou bakterií *Gluconacedobacter xylinus*. Přípravek neobsahuje žádná adheziva a je určen k aplikaci na rány, popáleniny či místa odběru kožních štěpů, kde může setrvat po dobu několika dnů. Výrobek stimuluje růst nových kožních buněk, a tak napomáhá k urychlení epitelizace. Klinická studie z let 2011-2012 sledovala účinky tohoto přípravku na několika pacientech, kteří

prodělali autotransplantaci kožního štěpu pro léčbu různých typů kožních karcinomů. Místo odběru kožního štěpu bylo překryto vrstvou fólie Epigraft s přesahem 1 cm na každé straně rány a převázáno gázou. Přípravek setrval na místě aplikace po dobu dvou týdnů, během nichž došlo k téměř kompletní reepitelizaci pokožky a postižené místo bylo u všech pacientů téměř bezbolestné. Nedošlo také k žádnému rozvoji infekce ani k jiným komplikacím. Studie ukázala, že celulóзовé fólie, jako je přípravek Epigraft, mohou být vhodným nástrojem k ošetření různých typů povrchových ran a podpoření jejich reepitelizace a alternativou k jiným prostředkům používaným k těmto účelům, jako jsou přípravky z alginátů, silikonové vrstvy nebo různé pěny [72].

Polymerní membrány tvoří jednu z nejdůležitějších komponent tzv. orgánů na čipu. Jedná se o mikrofluidní systémy osazené buňkami, které jsou schopny napodobit strukturu různých typů tkání a orgánů a simulovat jejich odezvu na biochemické podněty (léčiva, toxické látky apod.), a to mnohem přesněji než běžné metody *in vitro* testování. Polymerní membrány v orgánech na čipu tvoří rozhraní, které slouží jako mechanická opora buněk, probíhá skrz něj transport chemických látek a umožňuje mechanickou stimulaci buněk prostřednictvím jeho smršťování a natahování [73, 74]. Častými polymery pro výrobu membrán využívaných v orgánech na čipu jsou PDMS (polydimethylsiloxan), jehož výhodou je elasticita, umožňující periodickou deformaci ke stimulaci buněk, [75–77] a PET [78, 79]. Využit lze také polyimid, polykarbonát a další materiály. K zajištění prodyšnosti musejí být tyto membrány porézní, k tvorbě pórů lze využít např. *track etching*, jehož principem je ozařování fotosenzitivního prekurzoru finálního materiálu těžkými ionty, které po sobě zanechávají kanálky prostupující membránou. Různými modifikacemi této metody lze precizně řídit velikost pórů, která může dosahovat submikronového až mikronového měřítko [80, 81]. Jinou možností je využití fotolitografie [82]. V neposlední řadě může být membrána zhotovena z nanovláken připravených elektrickým zvlákňováním, v tu chvíli se však již nedá mluvit o fólii v pravém slova smyslu. Tabulka 1 na následující stránce shrnuje základní informace o polymerních fóliích, membránách a filmech popsanych v této kapitole a v Kapitole 3.

Tabulka 1: Přehled vybraných polymerních fólií a jejich aplikací v biomedicíně.

Materiál vrstvy	Modifikace/Přidané látky	Status	Aplikace	Zdroj
PPY	žádné	testováno <i>in vitro</i>	regenerace kostní tkáně	[65]
PET	sulfonovaný polyanilin	testováno <i>in vitro</i>	regenerace kostní tkáně	[66]
PEI	1. plazmatická úprava k zavedení -NH <sub>2</sub> skupin 2. nekovalentní navázání stabilizovaných AuNPs 3. nekov. zavázání Argininu/fibronektinu na AuNPs	testováno <i>in vitro</i>	hydrofilní podklad pro <i>in vitro</i> buněčnou kultivaci	[67]
PCL	5% hydroxapatit	testováno <i>in vivo</i>	regenerace kostní tkáně	[69]
bakteriální celulóza	závisí na konkrétním výrobku, obvykle žádné	komerčně dostupné (Nanoskin <sup>®</sup> , Cuticell <sup>®</sup> Epi-graft aj.)	kožní kryty stimulující regeneraci měkkých tkání – léčba popálenin apod.	[70–72]
kolagen	cross-linking	komerčně dostupné	regenerace kostní a pojivové tkáně, podpora hojení ran	[68, 83]
PDMS	submikronové až mikronové póry, obvykle vytvořené litograficky	experimentální aplikace	Membrány pro orgány na čipu	[75–77, 80–82]
kopolymer dodecylakrylamidu a ω-karboxyhexylakrylamidu	strukturované jamky (průměr cca 5 μm) vytvořené breath-figure self-assembly metodou	testováno <i>in vitro</i>	řízená kultivace hepatocytů, potenciálně regenerace jaterní tkáně	[56]
PS	porézní struktura (průměr pórů cca 10 μm) vytvořená breath-figure self-assembly metodou	testováno <i>in vitro</i>	zamezení vzniku bakteriálního biofilmu	[58]
polymer na bázi tetrafenyetheru připomínající strukturu glykogenu	porézní struktura (průměr pórů v řádu jednotek μm) vytvořená breath-figure self-assembly metodou	testováno <i>in vitro</i>	inhibice růstu rakovinných buněk	[57]

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

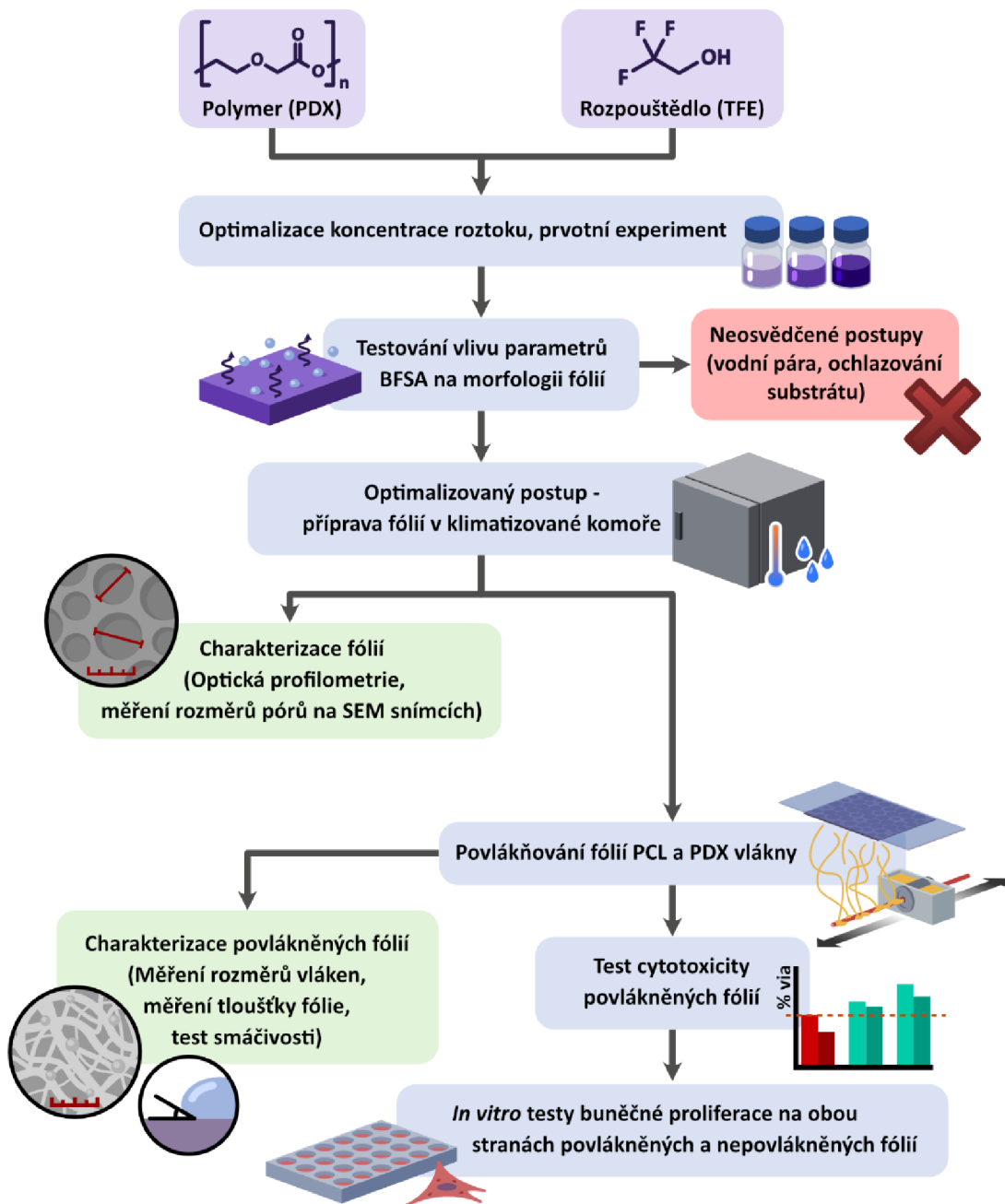
V rámci první poloviny praktické části byla prozkoumána Breath-figure self-assembly metoda a možnosti její aplikace pro přípravu PDX fólií s povrchem strukturovaným systémem konkávních struktur. Podnět pro tento výzkum vzešel z poznatků dříve zjištěných na KNT v rámci jiného experimentu, kdy během přípravy PDX fólie došlo k neřízenému Breath-figure jevu a byla vznesena hypotéza, že tato metoda strukturace povrchu by mohla nalézt uplatnění pro hybridní materiály pro tkáňové inženýrství. Cílem první části práce je tento jev důkladněji prozkoumat a nalézt vhodný postup a kombinaci podmínek (koncentrace roztoku pro přípravu fólií, teplota, vlhkost, ...) k umožnění řízené a opakovatelné přípravy fólií strukturovaných BFSA metodou.

V rámci druhé části práce byly prozkoumány možnosti konkrétního využití takto strukturovaných fólií. Dle publikované literatury [55–58] lze struktury připravené BFSA metodou při vhodné morfologii použít k omezení buněčné adheze a inhibici proliferace. Naopak určité typy nanovláken buněčnou proliferaci podporují [48, 49, 84]. Proto byl připraven dvouvrstvý kompozitní materiál, skládající se z fólie a nanovláknenné vrstvy (z PCL nebo z PDX nanovláken), který by mohl posloužit jako krycí materiál pro vnitřní pooperační rány zabraňující nežádoucímu srůstání tkání. Materiál byl charakterizován několika různými metodami (morfologie pomocí SEM a optické profilometrie, testy smáčivosti, měření průměrů vláken a rozměrů prohlubní na SEM snímcích pomocí softwaru ImageJ, měření tloušťky vrstvy, testy toxicity pro vyloučení přítomnosti reziduálních rozpouštědel) a následně byly provedeny *in vitro* testy buněčné proliferace na obou stranách dvojvrstvého materiálu.

Fólie zde vyvinutá a otestovaná může představovat alternativu k jiným hybridním materiálům, které jsou vyvíjeny v rámci dlouholetého trvajících výzkumu, kterého se účastní TUL ve spolupráci s Lékařskou fakultou UK v Plzni a dalšími odborníky z ČR i zahraničí. Cílem výzkumu je nalézt materiál, který by mohl být využitý pro vyztužení střevní anastomózy a podpoření jejího hojení, ale zároveň k zabránění intraperitoneální adheze, tedy nežádoucího přirůstání operované tkáně k vnitřní stěně břišní dutiny, příp. k okolním střevním záhybům. Materiály dosud testované v rámci toho výzkumu byly vyrobeny převážně z polykaprolaktonu a polyvinylalkoholu a aspekt bránění buněčné adhezi z vnější strany zatím nebyl doveden k dokonalosti [48, 84]. V jednom případě byla pro tento účel testována PCL vlákna upravená electrospayingem kapiček stejného polymeru a následnou plazmovou depozicí tenkých vrstev, tento proces vytvořil povrch podobný

superhydrofobnímu povrchu lotosového listu [49]. Tento materiál má skutečně omezenou buněčnou adhezi, má však význam zabývat se prozkoumáním dalších možností, jak docílit stejného efektu, které by mohly např. být jednodušší na výrobu, nebo vyprodukovat materiál s jinými mechanickými vlastnostmi. Materiál navržený a vyrobený v praktické části této práce by mohl být jednou takovou alternativou.

Proces, kterým se v rámci praktické části dospělo od prvotních experimentů až po přípravu a testování znázorňuje diagram níže (Obrázek 6).



Obrázek 6: Diagram experimentálního výzkumu provedeného v praktické části.

## 5 VÝVOJ A VÝROBA MATERIÁLU

### 5.1 Metoda přípravy PDX fólií

Po celou dobu experimentů byla používána metoda přípravy polydioxanonových fólií popsaná v této kapitole, případné drobné modifikace postupu budou vždy uvedeny u příslušného experimentu.

Polydioxanon ve formě filamentu pro výrobu stentů (výrobce ELLA-CS s. r. o., šarže M20000153 nebo S21002279-01) byl nastříhán na kusy o délce okolo 0,5-1 cm. Požadované množství (záviselo na množství roztoku potřebném na experiment) ústřížků bylo naváženo do skleněné lahvičky se šroubovacím uzávěrem. K ústřížkům filamentu byl následně napipetován 2,2,2-trifluorethanol (TFE, výrobce TCI), aby vznikl roztok o požadované hmotnostní koncentraci (na základě experimentu popsaného v Kapitole 5.2 byl pro většinu experimentů používán roztok s hmotnostní koncentrací 3 %). Roztok byl pomocí magnetického míchadla 24 hodin promícháván za laboratorní teploty při 300 otáčkách za minutu, aby došlo k rozpuštění PDX v TFE.

Sklička o rozměru 4,5 × 7 cm byly omyty vodou a očištěny ethanolem. Na každé omyté skličko byly nadávkovány 2 ml roztoku PDX v TFE (nejprve pomocí stříkačky, při pozdějších experimentech byla pro zvýšení přesnosti použita pipeta s nastavitelným objemem) tak, aby roztok pokrýval celou plochu sklička. Skličko bylo umístěno ve vodorovné poloze do požadovaného prostředí (první experimenty probíhaly v neklimatizovaném prostředí laboratoře a v komoře zvláknovacího zařízení Nanospider, později byla použita klimatizovaná komora s možností přesného řízení teploty a vlhkosti). V tomto prostředí bylo skličko ponecháno po dobu 24 hodin, kdy probíhalo odpařování rozpouštědla z roztoku a zformování tenké polymerní fólie. Fólie byla oddělena ze sklička pomocí pinzety.

### 5.2 Určení optimální koncentrace roztoků pro přípravu fólií

Experiment popsaný v této kapitole měl za cíl určit nejvhodnější koncentraci roztoku PDX, která bude používána pro všechny další experimenty zahrnující přípravu fólií.

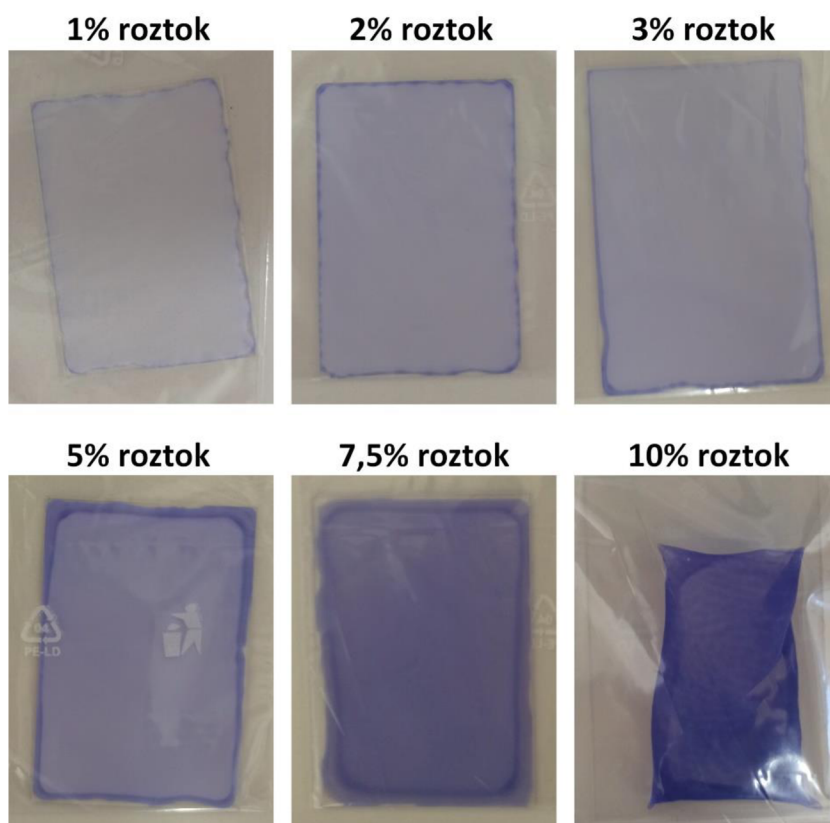
**Metodika:** Postupem popsaným v Kapitole 5.1 byly připraveny roztoky PDX v TFE o přibližných hmotnostních koncentracích 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 7,5 % a 10 %. Použit byl PDX šarže M20000153. Na sklička bylo nanášeno konstantní množství roztoku (pro



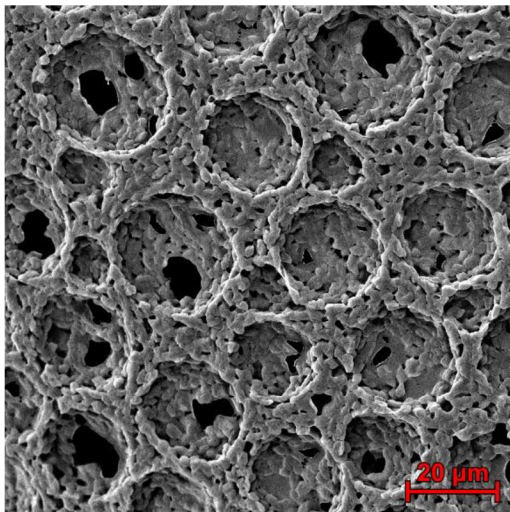
každou koncentrací byl vytvořen jeden vzorek, vždy na samostatném sklíčku). Po nanesení byla sklíčka s roztoky ponechána na vzduchu po dobu 24 hodin, během kterých došlo k odpaření TFE a zformování tenké folie z PDX na každém ze sklíček. Po nanesení byla sklíčka s roztoky ponechána po dobu 24 hodin v prostředí s počáteční teplotou 22,8 °C a relativní vlhkostí 50,2 %.

Po uplynutí 24 hodin byly fólie odděleny od sklíček. Podoba připravených fólií je zachycena na Obrázku 7 (fialové zbarvení je způsobeno přítomností barviva Solvent Violet 13 v PDX vláknech, které byly použity jako vstupní surovina – viz Kapitola 3.1).

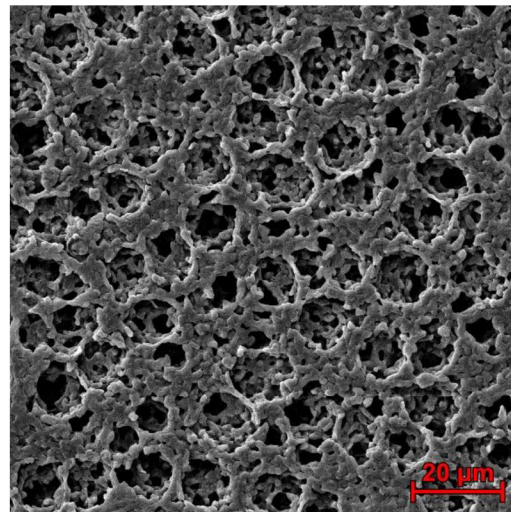
Ze všech fólií byly odstriženy malé vzorky pro pozorování morfologie na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Snímky jednotlivých fólií, pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem Tescan VEGA 3 (tento mikroskop byl používán na všechny SEM snímky použité v této práci), jsou zachyceny na Obrázcích 8 a 9. Před pozorováním pod SEM byly vzorky pro zvýšení vodivosti pozlaceny 7nm vrstvou zlata pomocí zařízení Q150ES (výrobce: Quorum Technologies).



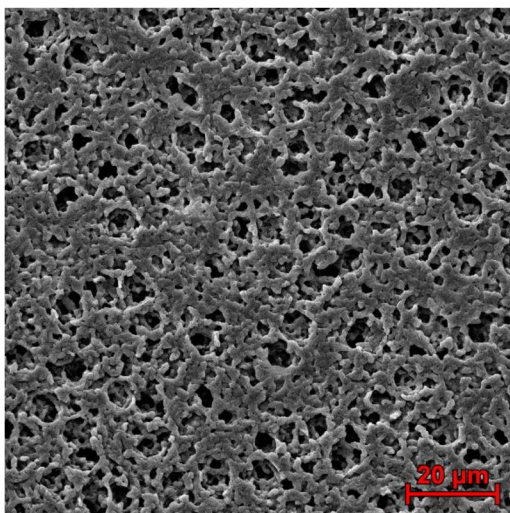
Obrázek 7: Fólie připravené z roztoků PDX různých koncentrací.



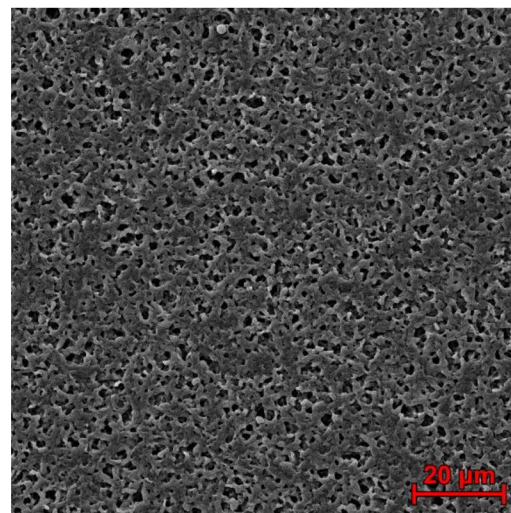
1% roztok



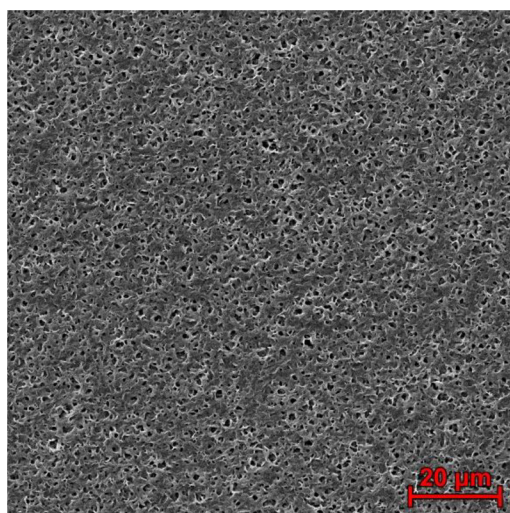
2% roztok



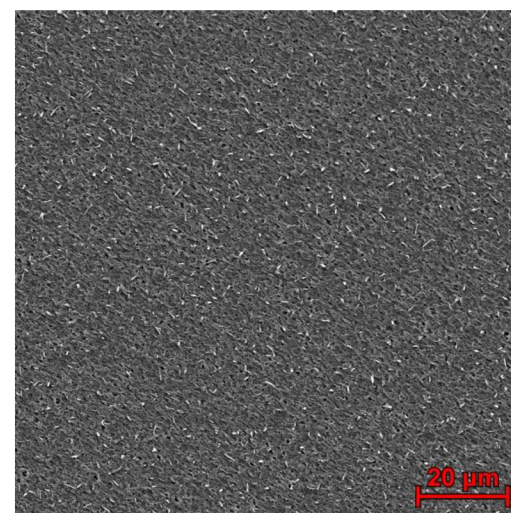
3% roztok



5% roztok



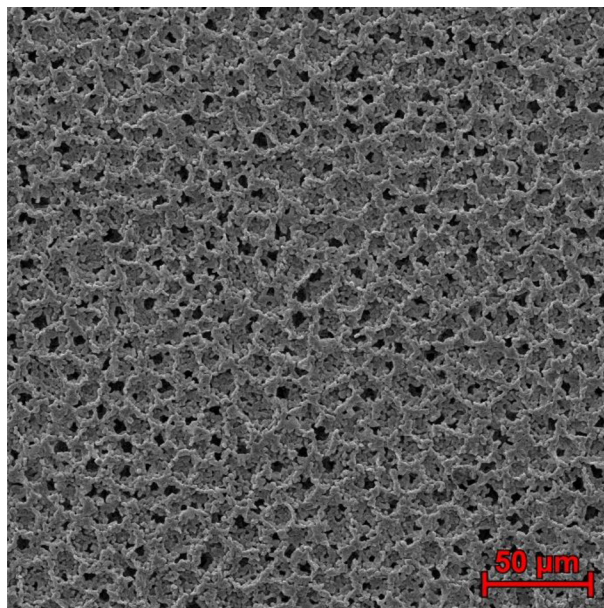
7,5% roztok



10% roztok

Obrázek 8: SEM snímky předních stran fólií připravených z různých koncentrací roztoku PDX. Zvětšení 2500×.





Obrázek 9: Podoba zadní strany fólie (shodná pro všechny připravené vzorky).

**Vyhodnocení:** Ke zformování fólie došlo z roztoků všech koncentrací. Výsledné fólie byly neprůhledné, fólie připravená z 1% roztoku byla křehká a obtížně se s ní manipulovalo, aniž by došlo k jejímu roztržení. Fólie ze 7,5 a 10% roztoku byly poměrně tuhé a během schnutí se oddělily od sklíček a zatumly v nerovném, pomačkaném tvaru. Fólie z 2 až 5% roztoků zůstaly po zaschnutí na sklíčku, ze kterých je bylo možné oddělit vcelku.

Pozorování pod SEM ukázalo, že obě strany fólie mají rozdílnou morfologii. Na straně, která byla při odpařování vystavena okolnímu prostředí (dále bude označována jako „přední“ nebo „vnější“) došlo při použitých podmínkách k tvorbě systému nepropojených konkávních struktur prostřednictvím Breath-figure self-assembly, nejlépe patrná a nejpravidelnější byla struktura u fólie z 1% roztoku, do určité míry ji bylo možné pozorovat i u fólie z 2% a 3% roztoku. U fólie s 5% a vyšší koncentrací již struktura prohlubně nevznikala. Pozorované prohlubně měly rozměry v řádu desítek mikrometrů (u 1% fólie měly průměr přibližně 20  $\mu\text{m}$ , u 2% a 3% fólie byly menší a méně pravidelné).

Strana, která byla při odpařování rozpouštědla přilehlá ke sklíčku (bude označována jako „zadní“ nebo „vnitřní“) měla u většiny fólií nepravidelnou strukturu a její podoba byla konzistentnější než u přední strany. Podoba zadní strany fólie je zachycena na Obrázku 9 a odpovídá většině fólií, které byly v průběhu celé diplomové práce připraveny. Rozdílnou podobu měla zadní strana fólií připravených z 1% a 2% roztoků, nerovnosti

na nich byly větší a jsou patrné otvory procházejících celou tloušťkou fólie, které jsou na fóliích připravených z roztoků vyšších koncentrací ojedinělé.

**Diskuse:** Jelikož všechny roztoky a fólie byly připraveny za stejných podmínek, lze říct, že morfologie povrchu fólie je výrazně ovlivněna koncentrací roztoku, ze kterého vzniká. Vznik pravidelných prohlubní související s Breath-figure self-assembly lze pozorovat u fólií vzniklých z nižších koncentrací roztoků (1 až 3 %), fólie připravené z vyšších koncentrací mají hladší morfologii. Použité podmínky (zejména vlhkost okolo 50 %) jsou na spodní hranici podmínek, za kterých běžně k BFSA dochází [54]. Jeví se proto jako vhodné při další přípravě fólií vlhkost zvýšit (jak je popsáno v Kapitolách 5.3 a 5.4, následná příprava fólií při 55% a 65% vlhkosti skutečně vedla k uspokojivějším výsledkům). Je potřeba zvážit také materiálové vlastnosti – u fólií z roztoků o malé koncentraci (1 a 2 %) dochází k BFSA jevu snáze (to je v souladu s literaturou [54]), tyto fólie však mají špatné mechanické vlastnosti (jsou křehké a při manipulaci se velmi snadno trhají a praskají). Optimální koncentrace roztoku proto leží okolo 3 % - fólie připravené z tohoto roztoku mají uspokojivou odolnost a zároveň na nich již při spodní hranici příznivé vlhkosti (okolo 50 %) dochází k BFSA.

**Závěr:** Po vyhodnocení materiálových vlastností a průběhu BFSA jevu byla jako nejvhodnější pro přípravu fólií vybrána 3% (hm.) koncentrace roztoku. Pro všechny následující experimenty byl používán tento roztok a morfologie fólie byla ovlivňována regulací jiných parametrů.

### **5.3 Pozorování vlivu podmínek prostředí na proces Breath-figure self-assembly**

Po určení vhodné koncentrace roztoku PDX experimentem popsaném v Kapitole 5.2. bylo nutné zjistit, jaký vliv mají na Breath-figure self-assembly podmínky prostředí, a také bylo vyzkoušeno několik dalších mechanismů, které by mohly proces ovlivnit (ošetření vznikající fólie vodní párou a vliv teploty sklíčka). Protože v první fázi praktické části nebylo k dispozici vhodnější zařízení umožňující nastavení určité teploty a vlhkosti, byl experiment proveden v komoře zařízení pro elektrické zvlákňování Nanospider, která je propojena s klimatizační jednotkou NS AC150 a umožňuje tak na omezenou dobu vytvářet prostředí s určitou teplotou a vlhkostí.

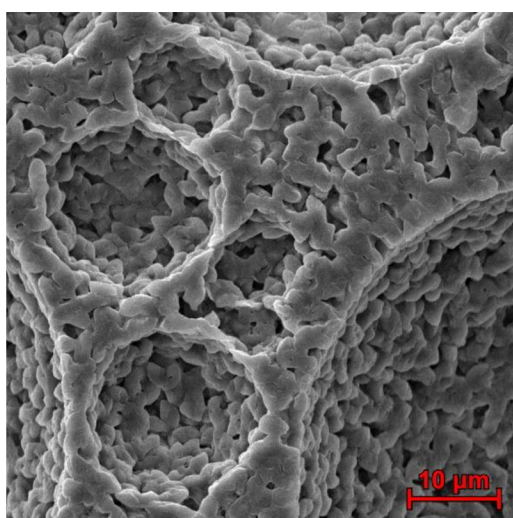
**Metodika:** Pro první sadu vzorků (dále označených jako 1,2,3 a M) byl připraven 3% roztok PDX v TFE (šarže M20000153). V komoře zařízení Nanospider s připojenou klimatizační jednotkou byly nastaveny následující podmínky: teplota 30 °C, relativní vlhkost 52 %. Skutečné podmínky v komoře byly měřeny laboratorním vlhkoměrem. V okolním prostředí panovaly tyto podmínky: teplota 23,2 °C, relativní vlhkost 48 %. Čtyři sklíčka o rozměru 4,5 × 7 cm byly ochlazeny v mrazáku přibližně na teplotu 0 °C, následně na ně byla pomocí injekční stříkačky nanесena rovnoměrná vrstva roztoku PDX (spotřeba cca 2 ml roztoku na každé sklíčko). Jedno ze sklíček bylo ponecháno v prostředí laboratoře (vzorek M), zbylá tři sklíčka (vzorky 1, 2 a 3) byla po dobu několik vteřin vystavena proudu teplé vodní páry, vytvořenému improvizovaným zařízením sestaveným z foggeru (mlhovače) pro teraristiku, a následně byla umístěna do klimatizované komory Nanospideru, ve které byly naměřeny skutečné podmínky  $t = 25 \text{ °C}$ ,  $RH = 85 \text{ %}$  (liší se od těch nastavených). Všechny čtyři vzorky byly ponechány v příslušném prostředí po dobu přibližně 24 hodin.

V jiný den byla připravena druhá skupina vzorků z nově namíchaného roztoku (stejná koncentrace a šarže jako u 1. sady). V komoře Nanospideru byly opět nastaveny podmínky  $t = 30 \text{ °C}$ ,  $RH = 52 \text{ %}$ . Okolní podmínky v laboratoři byly vlhkoměrem určeny jako  $t = 22 \text{ °C}$ ,  $RH = 51 \text{ %}$ . Nanesením vrstvy PDX na sklíčka (stejná metoda jako u 1. skupiny vzorků) bylo připraveno celkem pět vzorků, které byly označeny písmeny A-D:

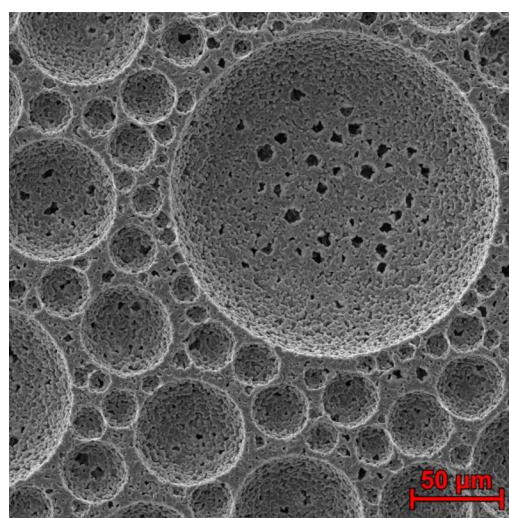
- Vzorek A1 byl připraven nanesením roztoku na sklíčko předem ochlazené na cca 0 °C, k odpařování rozpouštědla docházelo v podmínkách laboratoře.
- Vzorek A2 byl připraven nanesením roztoku na sklíčko o pokojové teplotě, k odpařování rozpouštědla docházelo v podmínkách laboratoře.
- Vzorek B byl připraven nanesením roztoku na sklíčko o pokojové teplotě, k odpařování rozpouštědla docházelo v klimatizované komoře Nanospideru.
- Vzorek C byl připraven nanesením roztoku na sklíčko předem ochlazené na cca 0 °C, k odpařování rozpouštědla docházelo v klimatizované komoře Nanospideru.
- Vzorek D byl připraven nanesením roztoku na sklíčko předem ochlazené na cca 0 °C a následným vystavením vrstvy teplé páře po dobu přibližně 5 sekund. K odpařování rozpouštědla docházelo v klimatizované komoře Nanospideru.

Všechny vzorky byly ponechány v příslušném prostředí po dobu cca 24 hodin, aby došlo k úplnému odpaření rozpouštědla. Po umístění vzorků do komory Nanospideru v něm byla vlhkoměrem naměřena teplota 27 °C a relativní vlhkost 72 %. Po úplném odpaření rozpouštědla byl přibližně ze středu všech fólií vystřižen malý vzorek k pozorování na SEM.

**Vyhodnocení:** Systémy konkávních struktur vznikly na všech vzorcích s výjimkou vzorku A2. Morfologie povrchu fólií je zachycena na SEM snímcích (Obrázky 10–16):

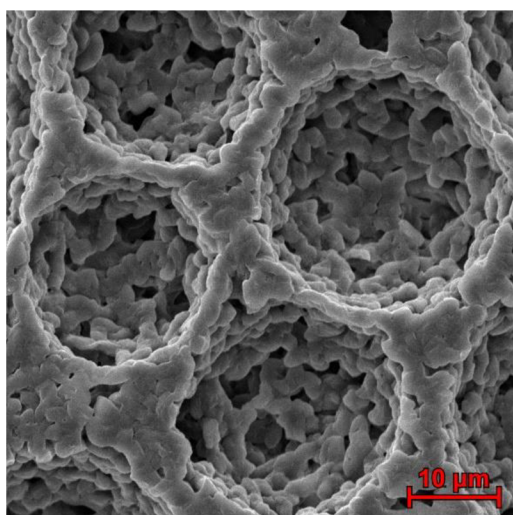


Přední strana, zvětšení 5000×

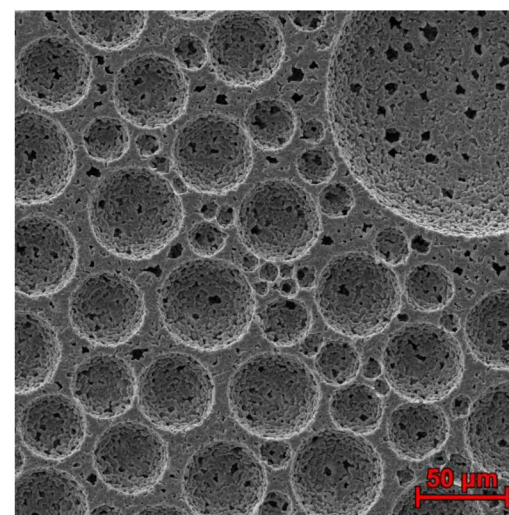


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 10: SEM snímky vzorku 1 (sklíčko ochlazené na 0 °C, ošetřeno proudem páry, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca  $t = 25$  °C,  $RH = 85$  %).



Přední strana, zvětšení 5000×

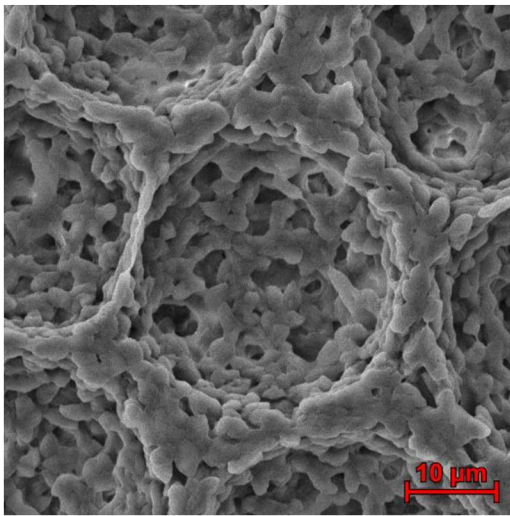


Přední strana, zvětšení 1000×

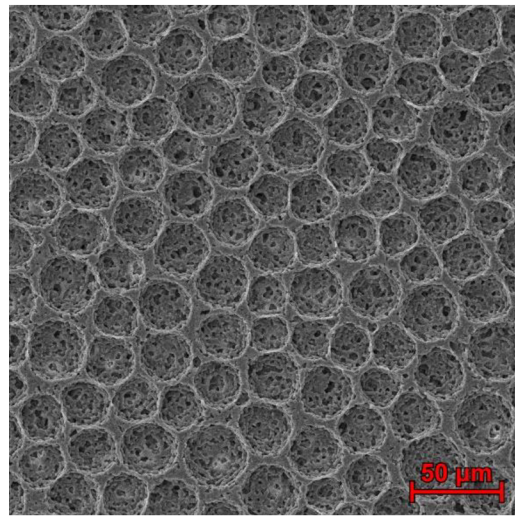
Obrázek 11: SEM snímky vzorku 2 (sklíčko ochlazené na 0 °C, ošetřeno proudem páry, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca  $t = 25$  °C,  $RH = 85$  %).

Téměř identicky vypadá i vzorek 3, proto zde jeho snímky nejsou zvlášť uvedeny.



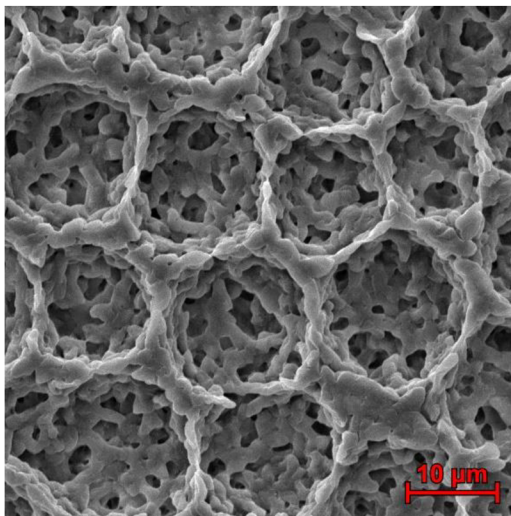


Přední strana, zvětšení 5000×

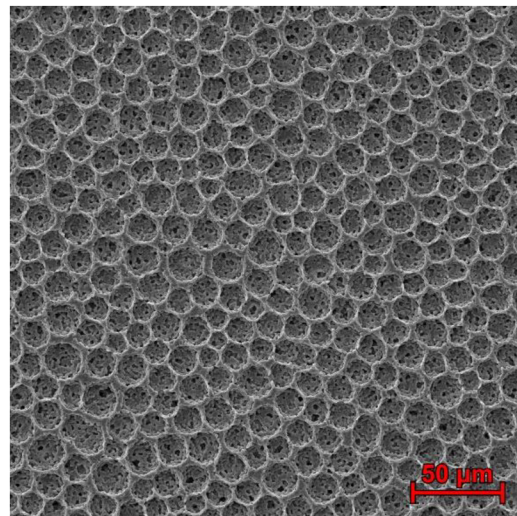


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 12: SEM snímky vzorku M (sklíčko ochlazené na 0 °C, odpar rozpouštědla v prostředí laboratoře za podmínek cca  $t = 23,2$  °C,  $RH = 48$  %).



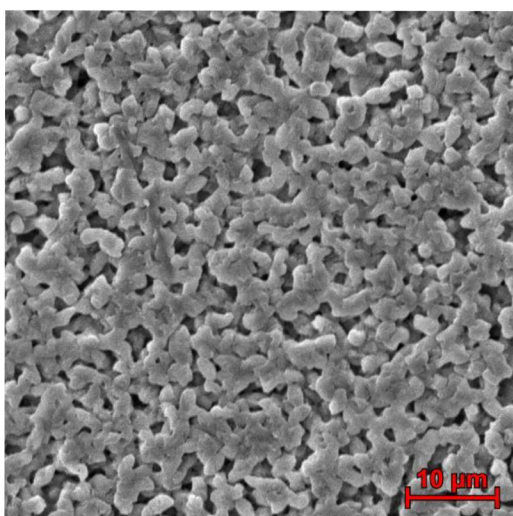
Přední strana, zvětšení 5000×



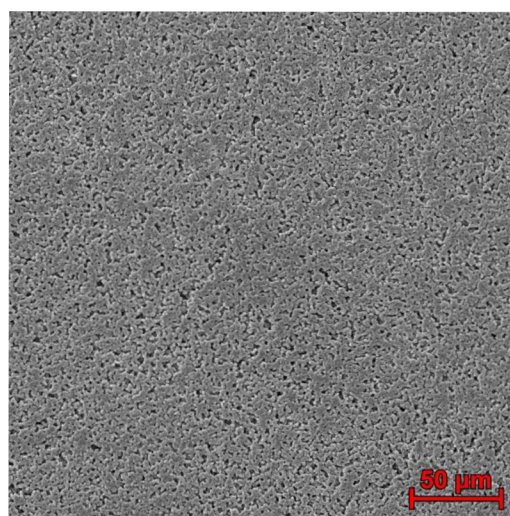
Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 13: SEM snímky vzorku A1 (sklíčko ochlazené na 0 °C, odpar rozpouštědla v prostředí laboratoře za podmínek cca  $t = 22$  °C,  $RH = 51$  %).



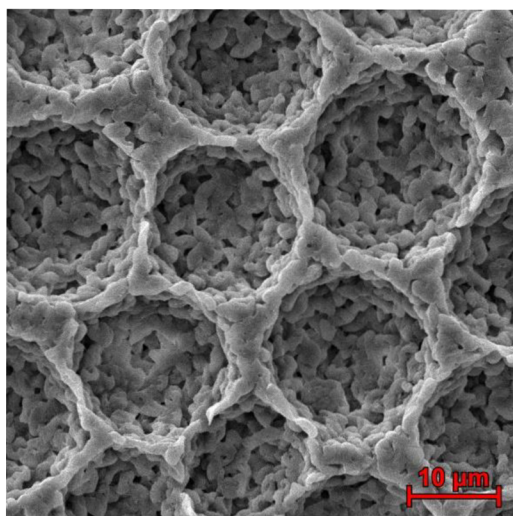


Přední strana, zvětšení 5000×

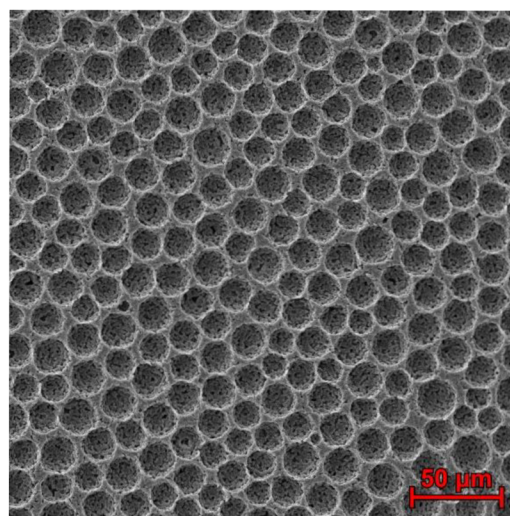


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 14: SEM snímky vzorku A2 (sklíčko o pokojové teplotě, odpar rozpouštědla v prostředí laboratoře za podmínek cca  $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 51\%$ ).

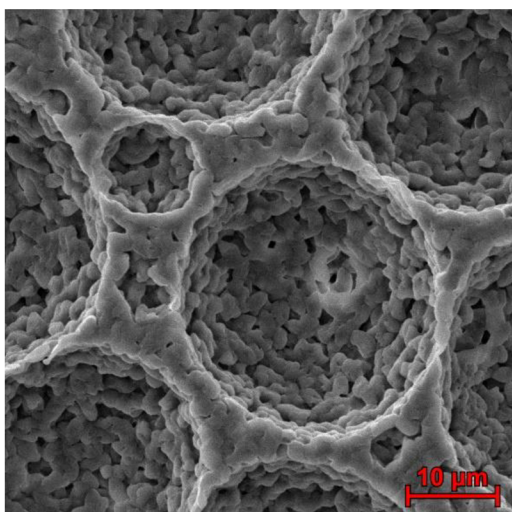


Přední strana, zvětšení 5000×

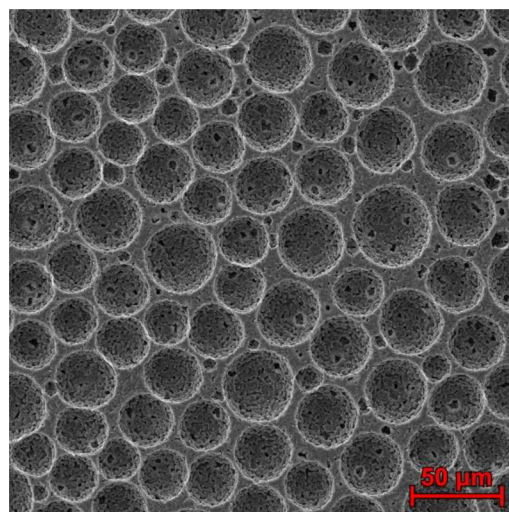


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 15: SEM snímky vzorku B (Sklíčko o pokojové teplotě, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca  $t = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 72\%$ ).



Přední strana, zvětšení 5000×



Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 16: SEM snímky vzorku C (sklíčko ochlazené na 0 °C, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca  $t = 27$  °C,  $RH = 72$  %). Identicky vypadá i vzorek D.

**Diskuse:** Ačkoliv počet připravených vzorků není příliš velký a nelze v nich vysledovat příliš konzistentní trendy, zdá se, že platí následující:

- Pokud je vlhkost, při které se TFE vypařuje velmi vysoká (nad 85 %), kondenzující kapičky vody na povrchu fólie se slévají/spojují do větších celků, což vede ke vzniku rozsáhlých prohlubní nepravidelných tvarů, které mohou mít rozměry až v řádu stovek mikrometrů nebo milimetrů (vzorky 1,2 a 3). Je však také možné, že tyto vzorky byly až příliš intenzivně ošetřeny vodní párou - do té míry, že ke zkondenzování velkých kapek na povrchu schnoucí fólie došlo již během vystavení proudu páry a nikoliv až postupně během vypařování rozpouštědla. Jiný vzorek ošetřený podobným způsobem (vzorek D) totiž tyto rozsáhlé prohlubně nevykazuje.
- Vzorky vystavené proudu páry obecně tvoří větší prohlubně, než vzorky takto neošetřené. To koresponduje s poznatkem z literatury, že vyšší vlhkost obecně vede k tvorbě větších prohlubní (vyšší relativní vlhkost vede k větší míře kondenzace kapiček vody na povrchu schnoucí fólie a kapky vody tak nabydou větších rozměrů a zanechají větší prohlubně [54]).

- Na vzorcích, které schnuly na ochlazených sklíčkách, vznikají nepatrně větší prohlubně, než na vzorcích připravených na sklíčkách o pokojové teplotě. Studené sklíčko pravděpodobně vedlo k ochlazení roztoku na něm odlitém, což umožnilo větší nárůst kondenzovaných kapek před jejich odpařením a vznik větších prohlubní [54]. Regulace teploty roztoku ochlazováním podkladu je někdy využívána k řízení průběhu BFSA, je k tomu však potřeba sofistikovanější aparatura schopná ochlazovat roztok po celou dobu odpařování rozpouštědla [85]. Kontinuální ochlazování substrátu může způsobit zvýšení viskozity roztoku a zpomalení odpařování, což vede k vyšší organizovanosti výsledné struktury [86].

**Závěr:** V klimatizované komoře Nanospideru bylo připraveno několik vzorků PDX fólií, které byly různými způsoby ošetřeny, a pro porovnání bylo připraveno i několik vzorků za laboratorních podmínek, aby bylo možné posoudit, jaký vliv mají podmínky při vypařování rozpouštědla a různé způsoby ošetření vliv na morfologii jejich povrchu, konkrétně na vznik a velikost pravidelných prohlubní díky Breath-figure self-assembly. Z mikroskopických snímků výsledných fólií se zdá, že platí určité trendy (např. že vyšší vlhkost, ošetření proudem páry či příprava vzorků na ochlazeném sklíčku vede ke zvětšení velikosti pórů), protože se však během experimentu nepodařilo udržet v komoře dlouhodobě neměnné podmínky, ani nebylo možné podmínky zaznamenávat v reálném čase, nelze z experimentu vyvodit přesnější závěry. Pro následující experimenty se podařilo opatřit klimatizovanou komoru se spolehlivější regulací podmínek a možností jejich kontinuálního měření, která bude využívána místo komory zařízení Nanospider. Vliv ochlazení sklíčka či ošetření vodní párou také nebývá konzistentní a tyto zásahy je obtížné pokaždé opakovat stejně, z tohoto důvodu je od nich při dalších experimentech upuštěno a morfologie konkávních struktur je řízena výhradně regulací vlhkosti a teploty.

#### **5.4 Příprava fólií za kontrolovaných podmínek v klimatizované komoře**

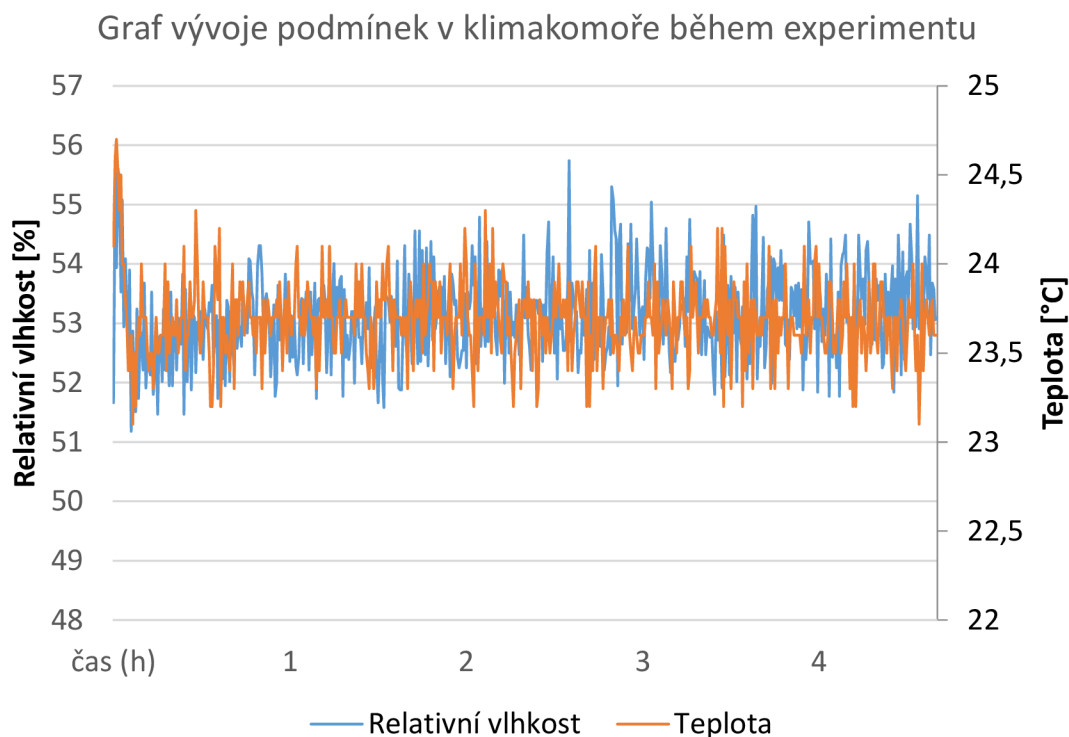
Na tyto a všechny následující experimenty zahrnující přípravu fólií byla používána klimatizovaná komora série Binder (výrobce VERKON) poskytnutá Katedrou oděvnictví (Fakulta textilní, TUL). V této komoře bylo provedeno několik experimentů s cílem připravit sadu fólií s co nejkonzistentnější podobou systému konkávních struktur na všech vzorcích.

**Metodika:** Pro první sadu vzorků byl namíchán 3% roztok PDX v TFE ze šarže M20000153. Byly připraveny tři vzorky fólií, každý ze 2 ml roztoku. Formování fólie probíhalo v klimatizované komoře za podmínek  $t = 23\text{ °C}$ ,  $RH = 55\%$ . Sklíčka byla umístěna vedle sebe na velké Petriho misce, která spočívala na roštu uprostřed klimatizační komory. Odpařování rozpouštědla probíhalo po dobu 24 hodin, poté byly fólie vyjmuty z komory a pozorovány pomocí SEM.

Druhá sada vzorků byla připravena z 3% roztoku, na který byla použita šarže PDX S21002279-01 (první používaná šarže byla v tento moment zcela spotřebovaná). Opět byly připraveny tři fólie, každá ze 2 ml roztoku. Každé ze sklíček bylo tentokrát umístěno zvlášť na malou Petriho misku, misky byly rovnoměrně rozmístěny po klimatizační komoře s rozestupy cca 15 cm mezi nimi. Nastavené podmínky byly  $t = 23\text{ °C}$ ,  $RH = 55\%$ . Po dobu 5 hodin, během kterých probíhalo odpařování rozpouštědla, byly podmínky v komoře kontinuálně měřeny (interval odečtu hodnot 30 sekund) pomocí čidel teploty a relativní vlhkosti připojených na datalogger Vernier LabQuest 1, aby bylo ověřeno, že klimatizační komora udržuje nastavené podmínky stabilní. Z výsledných dat byl vytvořen graf (Graf 1 níže). Po uplynutí této doby došlo k odpaření veškerého rozpouštědla a ke zformování fólií, ty byly vyjmuty z komory a opět pozorovány na SEM.

Z grafu je patrné, že podmínky v klimatizované komoře se lehce liší oproti nastaveným a kolísají okolo určité střední hodnoty. Vlhkost byla nastavena na 55 %, ve skutečnosti kolísala v rozmezí 51,5 až 55,5 %. Teplota byla nastavena na 23 °C, během experimentu se pohybovala zhruba v rozmezí 23 až 24 °C. Výkyvy hodnot nejsou příliš vysoké a od nastavených hodnot se příliš neliší (vliv na rozdíly mezi skutečnou a nastavenou hodnotou mohou mít i podmínky okolního prostředí), lze tedy předpokládat, že nastavené hodnoty poměrně dobře odpovídají skutečným podmínkám během experimentu.

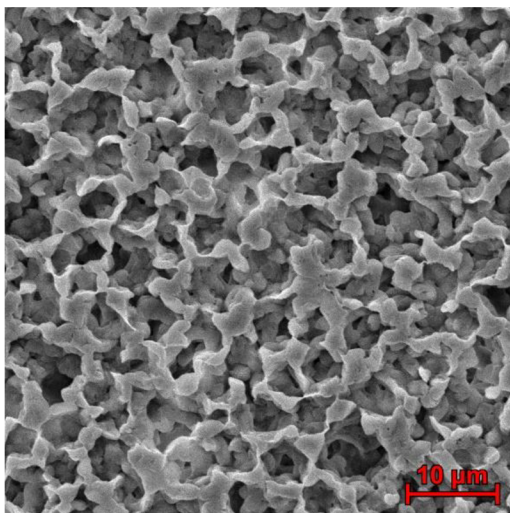




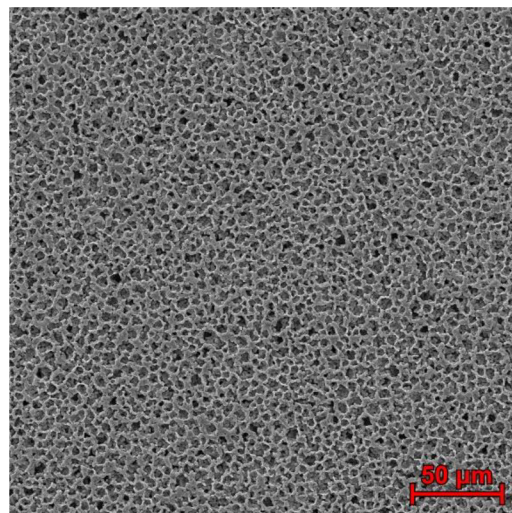
*Graf 1: Vývoj podmínek v klimatizované komoře během experimentu.*

Třetí sada vzorků byla připravena z 3% roztoku PDX (šarže S21002279-01). Sklíčka byla opět rovnoměrně rozmístěna po klimatizační komoře s rozstupem alespoň 15 cm. Nastavené podmínky byly tentokrát  $RH = 65 \%$ ,  $t = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , skutečné naměřené podmínky se pohybovaly v rozmezí 61-65 % RH a 22-23  $^{\circ}\text{C}$ . Cílem bylo ověřit, jaký vliv má zvýšení vlhkosti z 55 % na 60-65 % na morfologii struktur vznikajících díky Breath-figure self-assembly.

**Vyhodnocení:** Ze všech připravených vzorků byly pořízeny SEM snímky, které jsou vidět na Obrázcích 17 až 24.

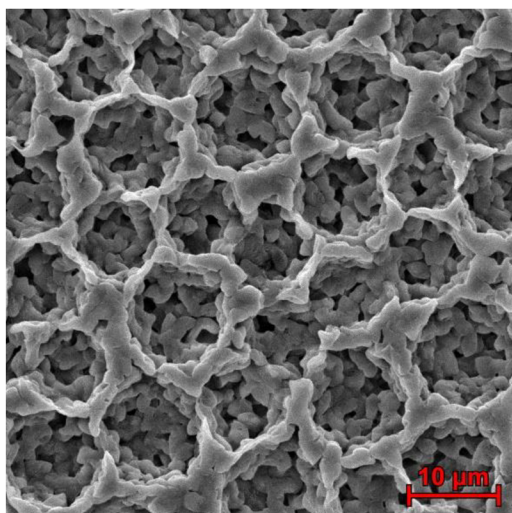


Přední strana, zvětšení 5000×

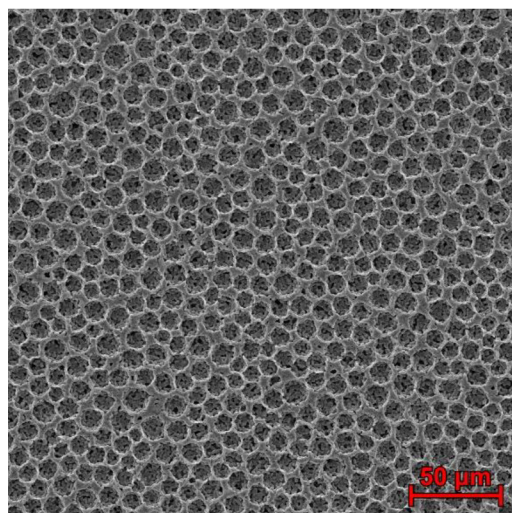


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 17: SEM snímky vzorku č. 1 z experimentu v klimatizované komoře č. 1 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky blízko sebe).

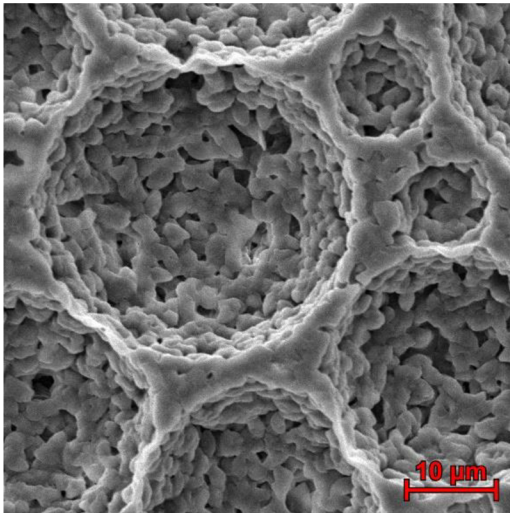


Přední strana, zvětšení 5000×

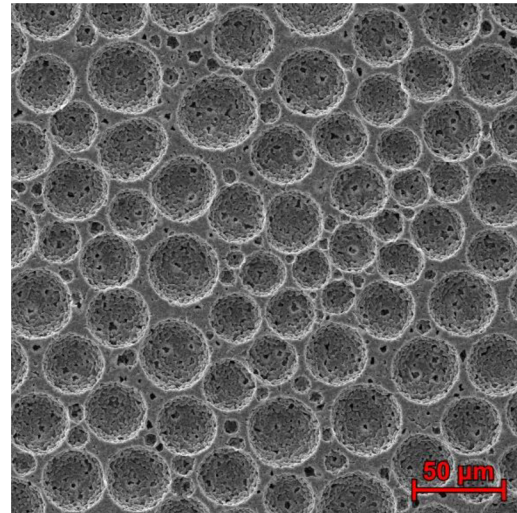


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 18: SEM snímky vzorku č. 2 z experimentu v klimatizované komoře č. 1 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky blízko sebe).

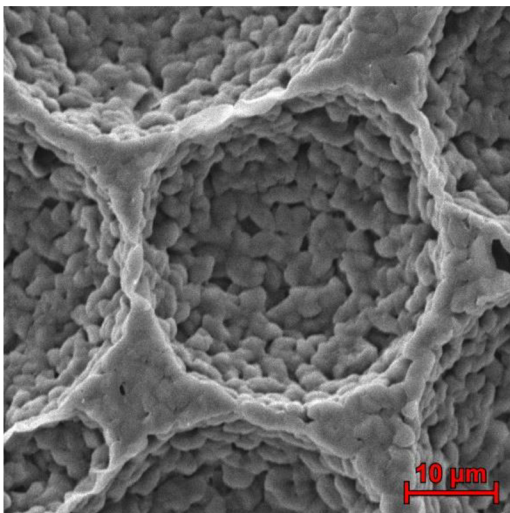


Přední strana, zvětšení 5000×

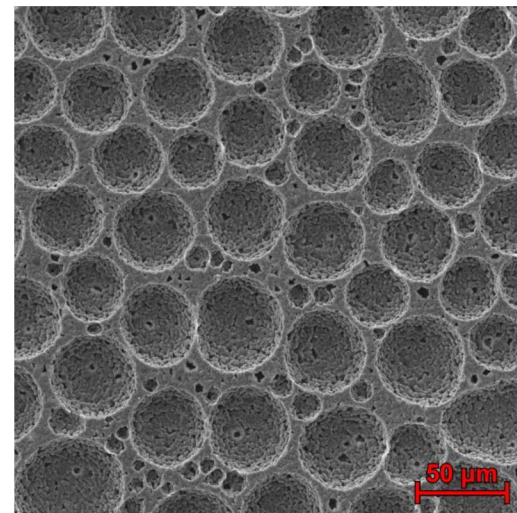


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 19: SEM snímky vzorku č. 3 z experimentu v klimatizované komoře č. 1 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky blízko sebe).



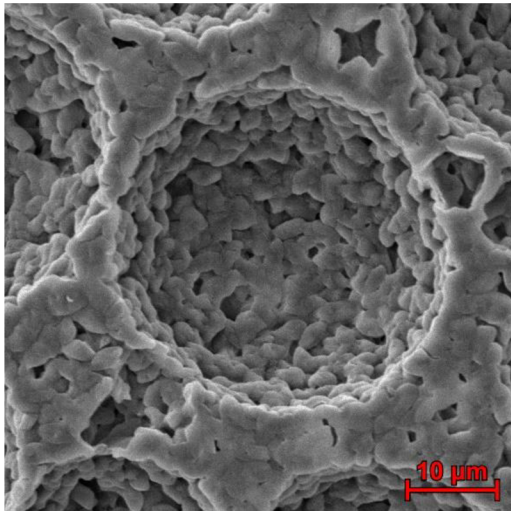
Přední strana, zvětšení 5000×



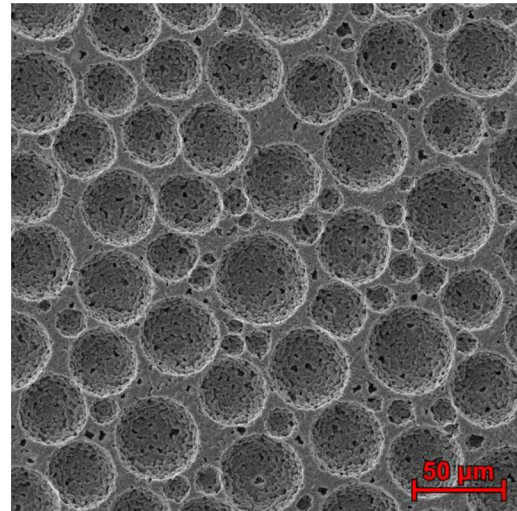
Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 20: SEM snímky vzorku č. 1 z experimentu v klimatizované komoře č. 2 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky s rozestupy 15 cm).



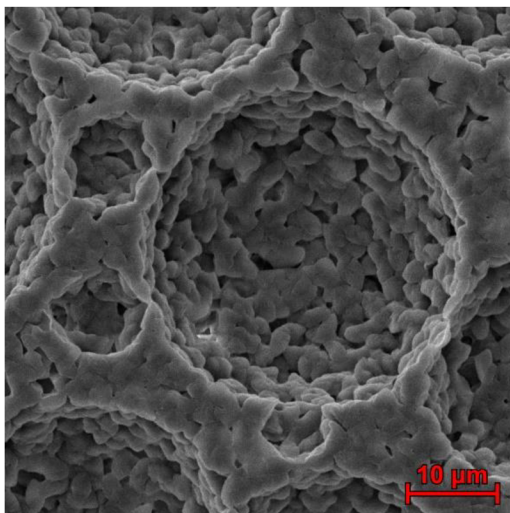


Přední strana, zvětšení 5000×

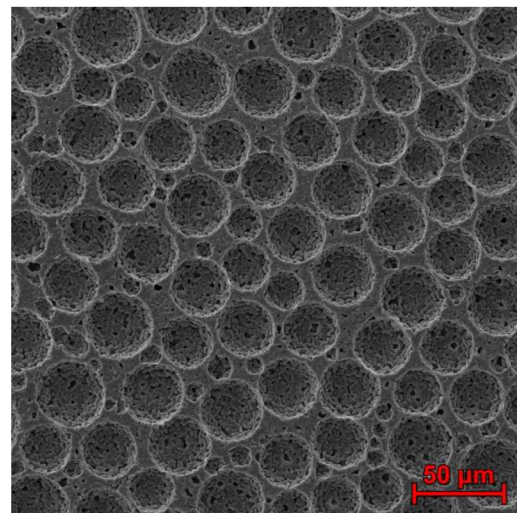


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 21: SEM snímky vzorku č. 2 z experimentu v klimatizované komoře č. 2 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky s rozestupy 15 cm).

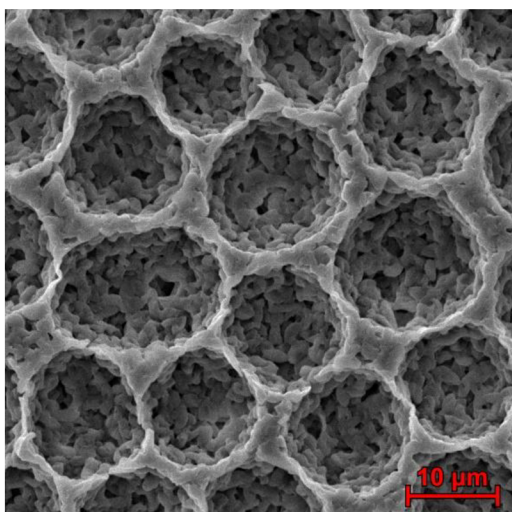


Přední strana, zvětšení 5000×

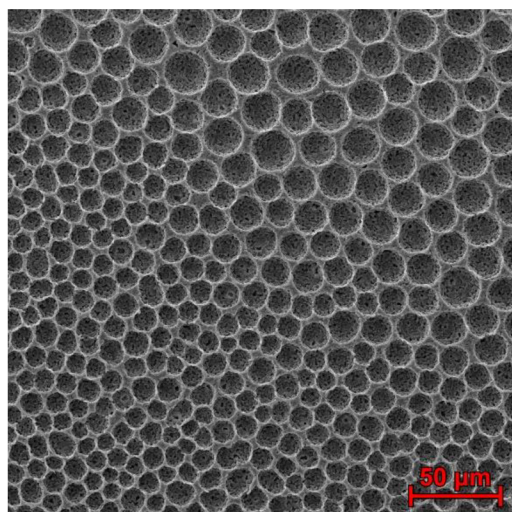


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 22: SEM snímky vzorku č. 3 z experimentu v klimatizované komoře č. 2 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky s rozestupy 15 cm).

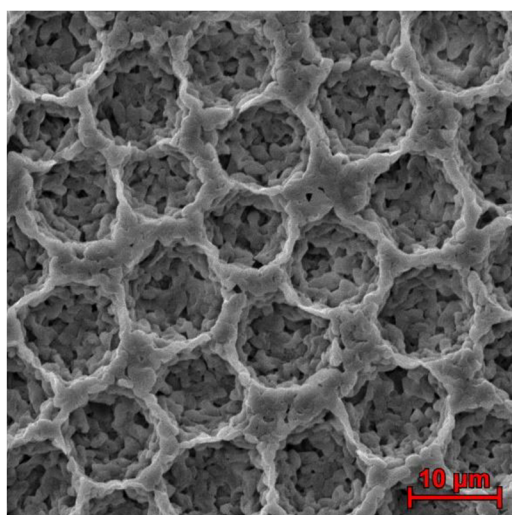


Přední strana, zvětšení 5000×

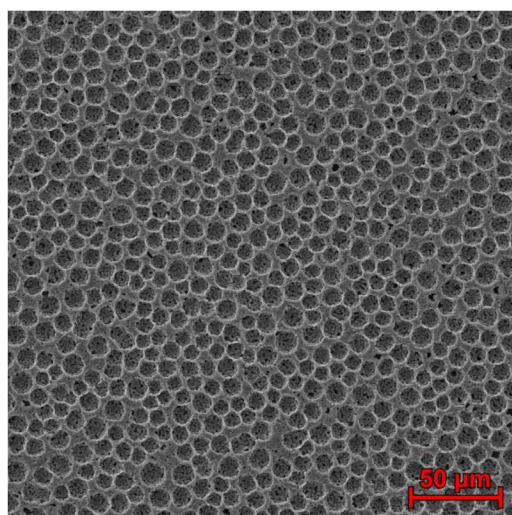


Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 23: SEM snímky vzorku č. 1 z experimentu v klimatizované komoře č. 3 (teplota 23 °C, vlhkost 65 %, vzorky s rozestupy 15 cm).



Přední strana, zvětšení 5000×



Přední strana, zvětšení 1000×

Obrázek 24: SEM snímky vzorku č. 2 z experimentu v klimatizované komoře č. 3 (teplota 23 °C, vlhkost 65 %, vzorky s rozestupy 15 cm).

**Diskuse:** Při prvním experimentu, kdy byly vzorky umístěny blízko sebe na jedné velké Petriho misce, se morfologie všech vzniklých fólií velice lišila – na jedné z fólií vznikly konkávní struktury o průměru přibližně 10-30  $\mu\text{m}$ , na druhé fólie vznikaly prohlubně znatelně menší (o rozměru cca 5-10  $\mu\text{m}$ ), na třetí fólii nedošlo k BFSA vůbec. Není vyloučeno, že při rozmístění vzorků takto blízko sebe se navzájem ovlivňuje tok plynů nad nimi (buď díky vzájemné fyzické blokaci, nebo díky vypařování plynů z povrchu jednotlivých vzorků), přičemž intenzita a geometrie proudění vzduchu nad vzorky má dle literatury vliv na průběh BFSA [87]. Proto byly při následujících experimentech vzorky rozmístovány dále od sebe, aby byl jejich vzájemný vliv minimalizován.

Druhý experiment, kde byly vzorky rozmístěny dále od sebe na samostatných Petriho miskách, vedl ke vzniku fólií s mnohem konzistentnější strukturou. Největší konkávní struktury na těchto fóliích dosahovaly rozměrů 30-50  $\mu\text{m}$  a v mezerách mezi nimi se místy vyskytovaly mnohem menší prohlubně o rozměru okolo 5  $\mu\text{m}$ . Nejvíce se lišil vzorek číslo 3, kde byly prohlubně celkově o něco menší. To je pravděpodobně způsobeno tím, že sklíčko s roztokem nebylo uloženo zcela vodorovně a roztok tak během odpařování rozpouštědla stekl více k jedné straně. Rovnoměrnost/tloušťka vrstvy roztoku, a tedy výsledné fólie se zdá být dalším parametrem, který má vliv na výslednou morfologii systému konkávních struktur (to je v souladu s odbornou literaturou [88, 89, 90]).

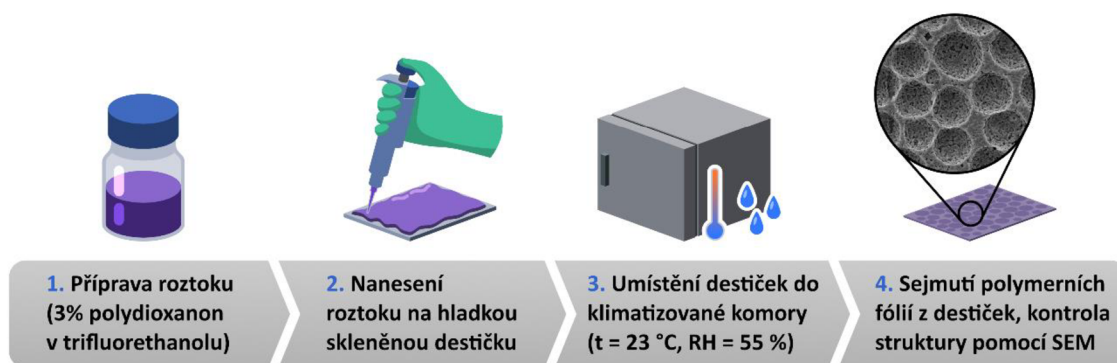
Příčinou, proč jsou na fóliích připravovaných při vlhkosti 55 % a teplotě 23 °C pozorovatelné jak velké prohlubně (30-50  $\mu\text{m}$ ), tak malé prohlubně (jednotky  $\mu\text{m}$ ), a proč je uspořádání celkově poměrně nepravidelné, je pravděpodobně jev zvaný koalescence – spojování zkondenzovaných kapiček vody do větších kapek dříve, než dojde k odpaření veškerého rozpouštědla a ztuhnutí materiálu [91]. Při zvýšení vlhkosti na 65 % při třetím experimentu vznikla pravidelnější struktura o uniformnější velikosti konkávních struktur, okolo 20  $\mu\text{m}$ . Zvýšení vlhkosti dle [54] vede ke vzniku větších pórů a dle jejich jednotnější velikosti, těsnému uspořádání a pravidelnější struktury zde pravděpodobně ke koalescenci nedošlo, nebo jen v omezené míře. Rozdíl v koalescenci je pravděpodobná příčina toho, proč při zvýšení vlhkosti vznikly menší prohlubně, což by mělo být v rozporu s běžně platnými zákonitostmi BFSA – Dle literatury vede obvykle zvýšení vlhkosti k tvorbě větších pórů [54, 92], případně je vliv změny vlhkosti nepatrný (toto chování pozorovali například Zhang *et al.* při použití roztoku polyvinylbutyralu v ethylacetátu o koncentraci



40 mg/ml [93]. Vznik menších pórů při zvýšení vlhkosti je tak nutné přisoudit jinému jevu, pravděpodobně právě rozdílu v koalescenci.

**Závěr:** Experimenty ukázaly, že použitá klimatizovaná komora může být poměrně úspěšně použita k přípravě sad fólií se strukturovaným povrchem, které mají všechny přibližně stejnou morfologii. Je však potřeba dbát na dodržení celé řady parametrů, kromě konzistentního nastavení teploty a vlhkosti záleží také na fyzickém rozmístění vzorků v komoře, které pravděpodobně ovlivňuje proudění vzduchu nad nimi, je také důležité zajistit vodorovné uložení sklíček a přesné dávkování roztoku, aby byla vrstva roztoku, pokud možno stejně silná na všech sklíčkách. Toho lze docílit např. pomocí vyvažovacích stolků a přesného dávkování roztoku pomocí automatické pipety. Bylo také zjištěno, že regulace teploty má výrazný vliv na morfologii systému konkávních struktur, kdy při vlhkosti 55 % obecně vznikaly větší prohlubně, než při vlhkosti 65 %. Toto chování je na první pohled neobvyklé v porovnání s výsledky reportovanými v odborné literatuře, jeho příčinou je pravděpodobně rozdílná míra koalescence vodních kapek způsobená změnou podmínek.

Optimalizovaný postup přípravy fólií s využitím klimatizační komory znázorňuje schéma na Obrázku 25. Pro další experimenty (povlákňování fólií a *in vitro* testování) jsou využívány fólie připravované tímto způsobem za vlhkosti 55 % a teploty 23 °C, pokud není uvedeno jinak.



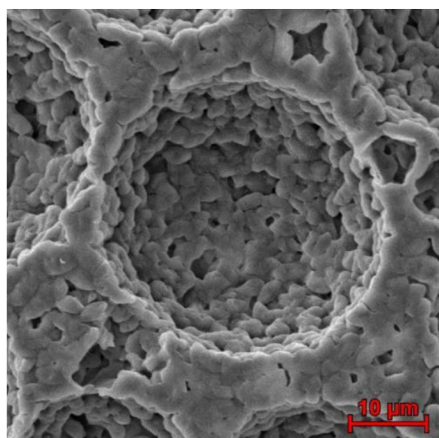
Obrázek 25: Schéma optimalizovaného postupu pro přípravu strukturovaných PDX fólií.

## 5.5 Vliv stáří roztoku na morfologii povrchu

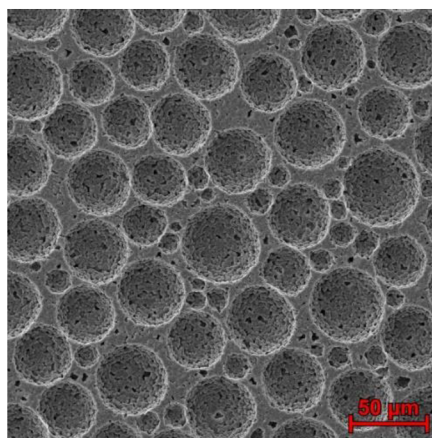
Na přípravu všech vzorků v dosud popsaných experimentech byl používán roztok připravovaný den před experimentem, v době umístění vzorků do klimatizační komory byl tedy roztok vždy zhruba 24 hodin starý. Následující experiment měl za cíl zjistit, zdá má stáří roztoku nějaký vliv na morfologii povrchu výsledné fólie.

**Metodika:** Byl připraven 3% roztok PDX (šarže M20000153) v TFE. Před použitím byl roztok ponechán 4 dny v klidu za pokojové teploty. Následně z něj byly připraveny fólie za použití klimatizované komory s podmínkami  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH} = 55\text{ }\%$  (postup přípravy byl popsán v Kapitolách 5.1 a 5.4). Výsledné fólie byly pozorovány pomocí SEM.

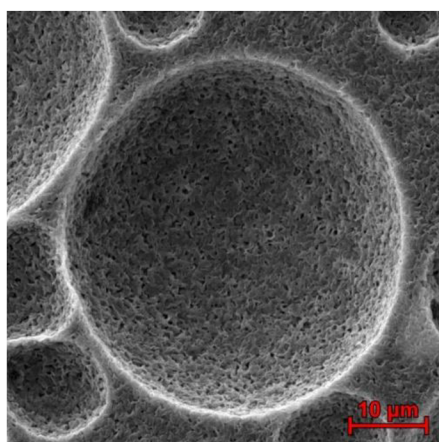
**Vyhodnocení:** Na připravených fóliích byl pozorován vznik prohlubní prostřednictvím BFSA. Na Obrázku 26 níže je uvedeno porovnání struktury fólie připravené z 24 h starého roztoku a fólie připravené ze 4 dny starého roztoku.



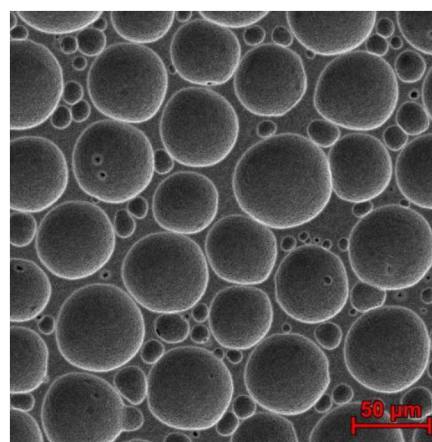
Z roztoku starého 24 h, zvětšení 5000×



Z roztoku starého 24 h, zvětšení 1000×



Z roztoku starého 4 dny, zvětšení 5000×



Z roztoku starého 4 dny, zvětšení 1000×

Obrázek 26: Porovnání morfologie fólie připravené z 24 h starého roztoku a fólie připravené ze 4 dny starého roztoku.

Morfologie a průměr konkávních struktur byly podobné jako u fólií připravovaných z 24 h starého roztoku, povrch struktury se však jevil znatelně hladší. To je pravděpodobně způsobeno tím, že řetězce PDX mohou při dlouhodobém vystavení TFE podléhat degradaci, čímž dochází ke zmenšení jejich molekulové hmotnosti. Kratší řetězce jsou fyzicky menší, a tak se při utváření struktury fólie uspořádají těsněji k sobě a výsledný povrch je proto hladší.

**Závěr:** Stáří roztoku nemá významný vliv na velikost vznikajících prohlubní, vede však k vytvoření struktury s hladším povrchem. Při *in vitro* testech popsaných v Kapitole 6.6 se nezdálo, že by hladší struktura měla významný vliv na buněčnou adhezi a proliferaci, mnohem více záleželo na přítomnosti a velikosti konkávních struktur.

## 5.6 Povlákňování fólií PDX a PCL nanovláknů

V rámci tohoto experimentu bylo vyzkoušeno, zda je možné připravené PDX fólie pokrýt vrstvou PDX a PCL nanovláken pomocí zařízení Nanospider pro stejnosměrné elektrické zvlákňování.

**Metodika:** Pro povlákňování PDX vláknů byl připraven 10% roztok PDX v TFE stejným způsobem, jako roztok připravovaný pro výrobu fólií (pouze s rozdílnou koncentrací – 10 hm. % místo 3 %) Metoda přípravy tohoto roztoku je popsána v Kapitole 5.1.

Pro povlákňování PCL vláknů byl připraven 16% roztok PCL rozpuštěním granulátu PCL ( $M_r = 45\,000$ ) v rozpouštědlovém systému chloroform ( $\text{CHCl}_3$ )/ethanol (EtOH)/kyselina octová (AA) v hmotnostním poměru 8:1:1 (výrobce rozpouštědel: Penta). Roztok byl míchán 24 hodin při pokojové teplotě, aby došlo k úplnému rozpuštění polymeru.

Povlákňovány byly PDX fólie o rozměru přibližně  $4,5 \times 7$  cm, připravené v rámci předchozích experimentů metodou popsanou v Kapitole 5.1. Ke tvorbě nanovláken bylo použito zařízení Nanospider NS 1WS500U s připojenou klimatizační jednotkou NS AC150 (Výrobce: Elmarco). Před zvlákňováním byla vždy sada PDX fólií pomocí oboustranné lepicí pásky připevněna ke spunbondové textilií (páska byla aplikována na rohy materiálu, které byly později odstříženy), která je převíjena skrze komoru zvlákňovacího zařízení jako podklad pro zachytávání nanovláken (podrobněji o zařízení Nanospider pojednává Kapitola 4.3). Povlákňována byla hladká strana fólií (ta na které nebyl vytvořen systém

konkávních struktur). Před povlákňením fólií byl vždy vyroben vzorek samotných nanovláken přímo na spunbond, aby bylo možné později porovnat morfologii samotných nanovláken s nanovláknem na fólii). Zvlákňování z 10% roztoku PDX v TFE probíhalo s parametry uvedenými v Tabulce 2, pro zvlákňování z 16% roztoku PCL byly použity parametry uvedené v Tabulce 3. Parametry pro zvlákňování PCL vycházejí z výzkumu publikovaného Rosendorfem *et al.*, jehož výsledkem byla PCL vlákna s dobrou cytocompatibilitou [48], pro zvlákňování PDX byly dle zkušeností z předchozích experimentů na KNT zvoleny takové parametry, aby bylo docíleno vláken o podobném průměru.

*Tabulka 2: Parametry použité pro zvlákňování PDX vláken.*

Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	182	
Napětí [kV]	Elektroda 1	Elektroda 2
	-10	+40
Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]	400	
Rychlost převíjení podkladu [mm/min]	28	
Průměr otvoru průvlaku [mm]	0,6	
Teplota [°C]	22 nastaveno, reálně naměřeno ~25	
Relativní vlhkost vzduchu [%]	55	

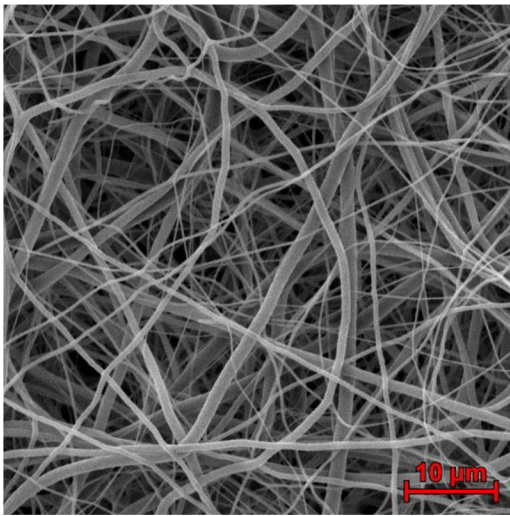
*Tabulka 3: Parametry použité pro zvlákňování PCL vláken.*

Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	174	
Napětí [kV]	Elektroda 1	Elektroda 2
	-10	+40
Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]	480	
Rychlost převíjení podkladu [mm/min]	40	
Průměr otvoru průvlaku [mm]	0,6	
Teplota [°C]	22	
Relativní vlhkost vzduchu [%]	50	

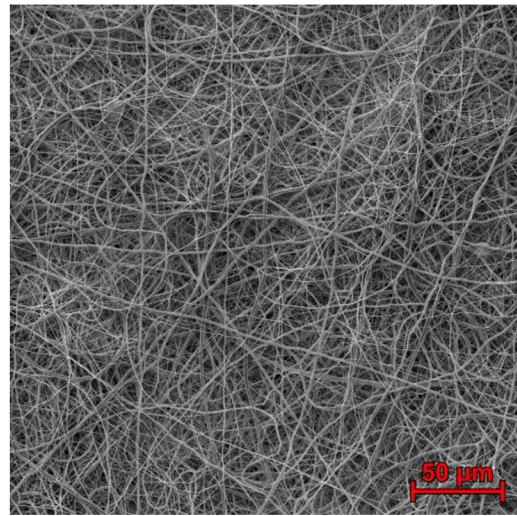
Po ukončení zvlákňování byly povlákňené fólie sejmuty ze spunbondu a byly z nich vystřiženy vzorky pro pozorování pod SEM. Pro SEM byl odebrán také vzorek vláken nanovlákněných přímo na spunbondu.



**Vyhodnocení:** Níže (Obrázek 27 až 30) jsou uvedeny SEM snímky samostatných nanovláken a snímky vláken navlákněných na fólii.

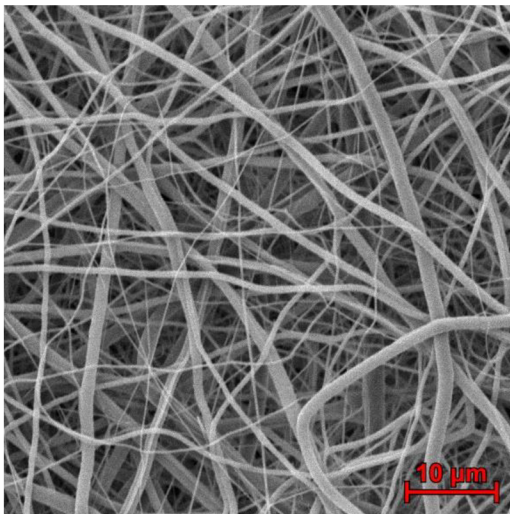


Zvětšení 5000×

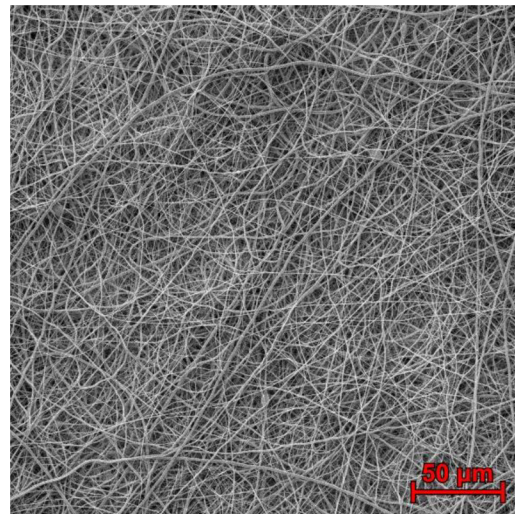


Zvětšení 1000×

Obrázek 27: SEM snímky samostatných PDX nanovláken zvlákněných na spunbond.

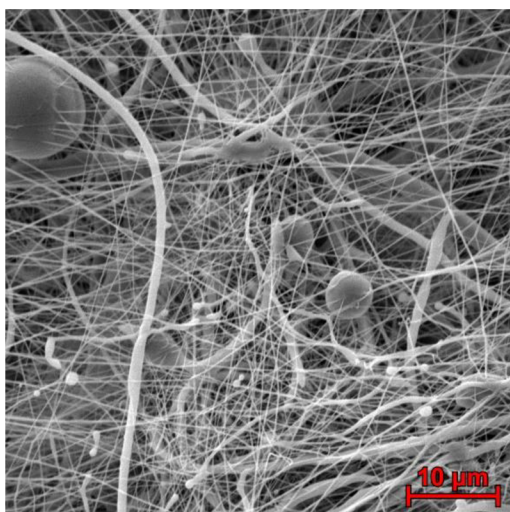


Zvětšení 5000×

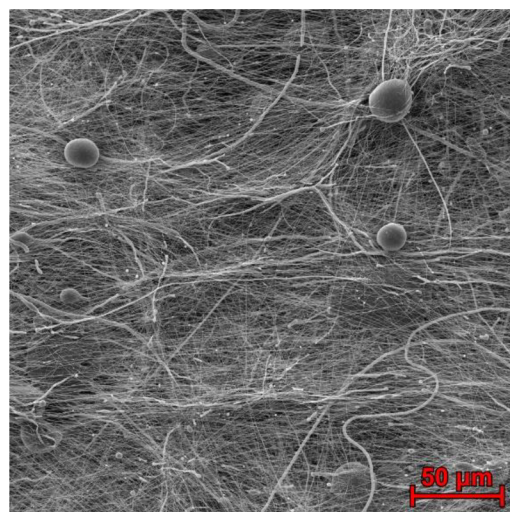


Zvětšení 1000×

Obrázek 28: SEM snímky PDX nanovláken zvlákněných na hladkou stranu PDX fólie.

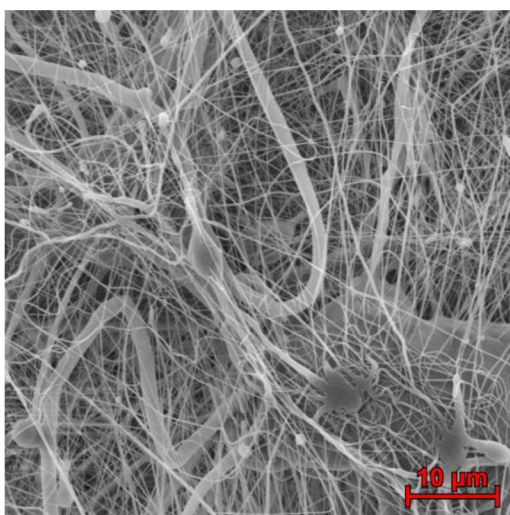


Zvětšení 5000×

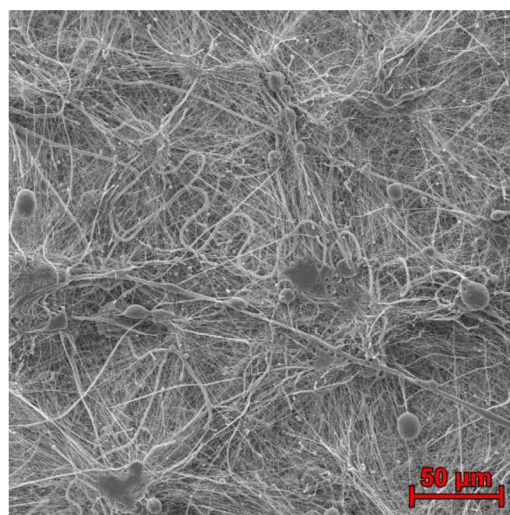


Zvětšení 1000×

Obrázek 29: SEM snímky PCL nanovláken zvlákněných na spunbond.



Zvětšení 5000×



Zvětšení 1000×

Obrázek 30: SEM snímky PCL nanovláken zvlákněných na hladkou stranu PDX fólie.

**Diskuse:** Ze snímků je patrné, že morfologie vláken nanesených na fólie se výrazně neliší od morfologie vláken zvlákněných samostatně na spunbond. PDX tvoří hladká vlákna bez patrných kapek nebo defektů, z nichž nejsilnější mají průměr okolo 1 mikrometru a mnohem čtenější tenčí vlákna dosahují tloušťky v řádu stovek nanometrů, nejčastěji okolo 300-400 nm (měření průměrů vláken je popsáno v Kapitole 6.3). PCL tvoří mnohem méně uspořádaná vlákna, která jsou protkána množstvím kapek různých velikostí, od velmi malých, o rozměrech srovnatelných s rozměry vláken (stovky nm až mikrometry), po poměrně velké o rozměrech v řádu desítek mikrometrů. Tloušťka vláken je srovnatelná s PDX vlákny (viz histogramy v Kapitole 6.3).



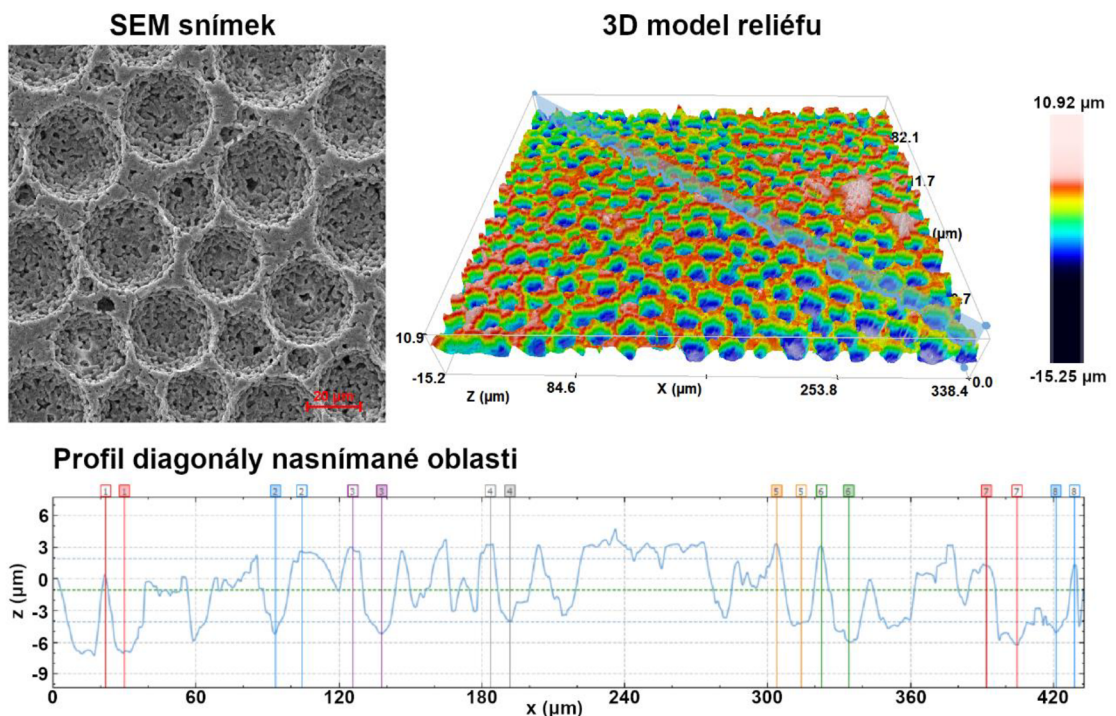
Použití PCL vláken o této morfologii má význam, protože dle série studií publikované J. Rosendorfem *et al.* [48, 84, 94] jsou biokompatibilní a nevyvolávají nežádoucí imunitní odezvu, což bylo dokázáno sérií *in vitro* a *in vivo* testů. Strana materiálu pokrytá těmito vlákny by tak měla podporovat buněčnou adhezi a proliferaci. Polydioxanonová vlákna mají na pohled odlišnou morfologii, dosahují však podobných rozměrů a o jejich použití v biomedicíně také existují záznamy v odborné literatuře [36, 95]. Při použití PDX vláken očekávat dobrou adhezi mezi oběma komponentami, protože se jedná o stejný polymer, z jakého je vyrobena fólie, a navíc se lze vyvarovat vlivu na lokální pH, který je spojený s degradací PCL vláken [95, 96]. Kromě toho by se jednalo o zajímavou ukázkou toho, že samotná morfologie materiálu může ovlivnit buněčnou interakci a přípravky pro cílené řízení buněčné proliferace tak mohou být vyráběny pouze z jednoho typu polymeru.

**Závěr:** Podařilo se úspěšně pokrýt hladké strany PDX fólií dvěma různými typy nanovláken. Tím byl připraven dvouvrstvý materiál, jehož cytotoxicita a vliv na buněčnou proliferaci byly později otestovány *in vitro* (viz Kapitola 6.5 a 6.6).

## 6 CHARAKTERIZACE A *IN VITRO* TESTY

### 6.1 Charakterizace morfologie fólií optickým profilometrem

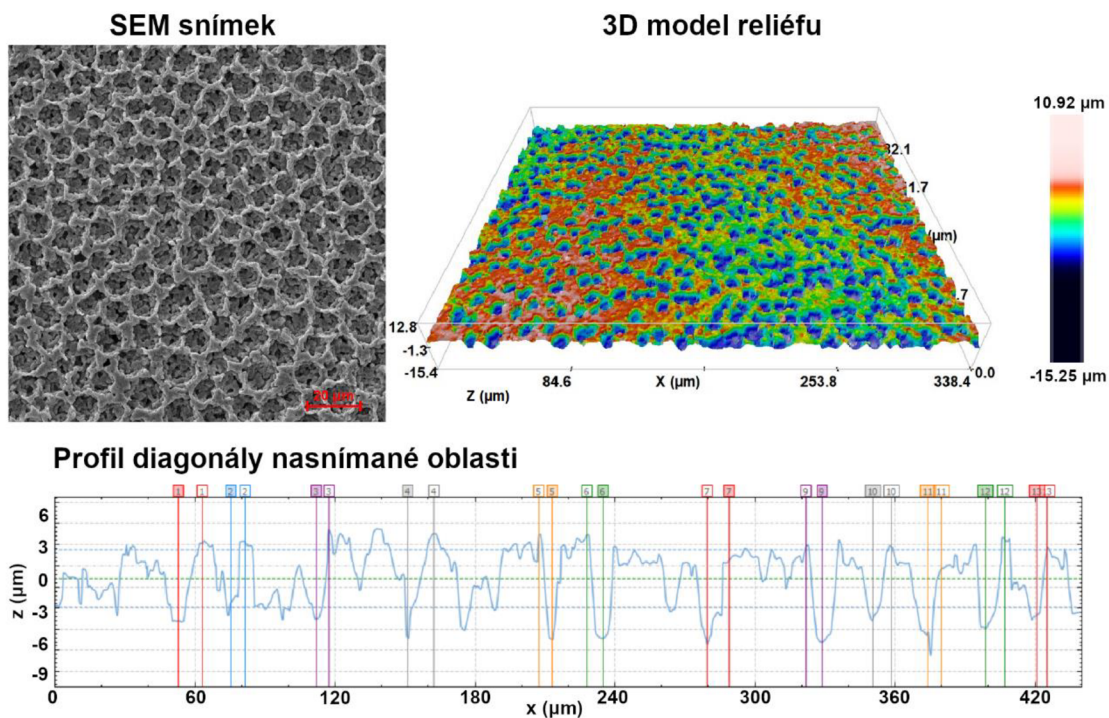
Dva vzorky fólií připravené optimalizovaným postupem s využitím klimatizační komory (viz Kapitola 5.4) byly charakterizovány optickým profilometrem Sensofar S Neox, který poskytuje informace o trojrozměrné struktuře povrchu materiálů. První vzorek zastupoval fólie s většími prohlubněmi, dle SEM snímků o průměru cca 20-25  $\mu\text{m}$  (přibližně odpovídá fóliím připravovaným při vlhkosti 55 %, které mají konkávní struktury v rozmezí 20-40  $\mu\text{m}$ ), druhý vzorek měl těsnější strukturu prohlubní o průměru okolo 10  $\mu\text{m}$ , která spíše odpovídá vzorkům připravovaným při 65 % RH, i když někdy se vyskytovala i na částech fólií připravovaných při 55 % RH. Analyzovaná oblast měla pro oba vzorky rozměr cca 340  $\times$  280  $\mu\text{m}$ . Na přímce diagonálně protínající měřenou oblast byl u obou vzorků určen profil materiálu a byla několikrát určena hloubka prohlubní jako rozdíl mezi lokálním minimem a maximem profilu. Výsledky analýzy prvního vzorku (s většími prohlubněmi) jsou uvedeny níže na Obrázku 31 (na 3D modelu není podél všech os stejné měřítko, reliéf je roztažený podél osy z).



Obrázek 31: Výsledek analýzy prvního vzorku (fólie s většími prohlubněmi).

Hloubka konkávních struktur na prvním vzorku byla měřena na osmi místech profilu, průměrná naměřená hloubka je  $7,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$ .

Výsledky analýzy druhého vzorku (s menšími prohlubněmi) jsou uvedeny níže na Obrázku 32.



Obrázek 32: Výsledek analýzy druhého vzorku (fólie s menšími prohlubněmi).

Hloubka konkávních struktur na druhém vzorku byla měřena na dvanácti místech profilu, průměrná naměřená hodnota je  $3,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ .

**Závěr:** U fólií připravených při 65% rel. vlhkosti dosahuje hloubka prohlubní podobných hodnot, jako jejich poloměr, můžeme tedy předpokládat, že prohlubně jsou téměř půlkulové otisky vodních kapek zkondenzovaných na povrchu během procesu odpařování rozpouštědla a tuhnutí polymeru. U fólií připravených při 55% vlhkosti je hloubka spíše menší než průměr, což by mohl být další důkaz, že tyto větší prohlubně vznikají procesem koalescence, tedy spojením několika menších, původně kulových, kapek.

Obzvláště u větších konkávních struktur je hloubka ve stejném řádu, jako rozměr eukaryotních buněk, což by mohlo hrát roli v míře buněčné proliferace na povrchu takto strukturovaného materiálu – buňky adherované uvnitř prohlubní jsou ze všech stran (mimo horní) fyzicky blokovány materiálem.



## 6.2 Měření tloušťky fólií

K určení tloušťky připravených fólií a nanovláknenných nánosů byl použit analogový tloušťkoměr (model neznámý, přesnost 0,01 mm). Metoda měření vycházela z normy DIN 53855 pro měření tloušťky netkaných textilií: Zařízení měří tloušťku materiálu o ploše přibližně 2500 mm<sup>2</sup> při zatížení odpovídajícímu tlaku 0,5 kPa. Odečet hodnot probíhal přibližně 10 sekund po zatížení. Měřeno bylo 10 hodnot na vzorcích nanovláken a nepovlákněných fólií a pouze 5 hodnot tloušťky povlákněných fólií, z důvodu jejich malé celkové plochy.

Nejprve byla měřena tloušťka jedné z nepovlákněných PDX fólií, připravených postupem s využitím klimatizované komory při relativní vlhkosti 55 % a teplotě 23 °C (Kapitola 5.4.). Průměrná naměřená hodnota byla **(0,5 ± 0,2) mm**. Následně byla proměřena fólie povlákněná vrstvou PDX vláken, jejíž tloušťka byla rovna **(0,44 ± 0,07) mm**. Tloušťka fólie pokryté PCL vlákny byla určena jako **(0,44 ± 0,06) mm**.

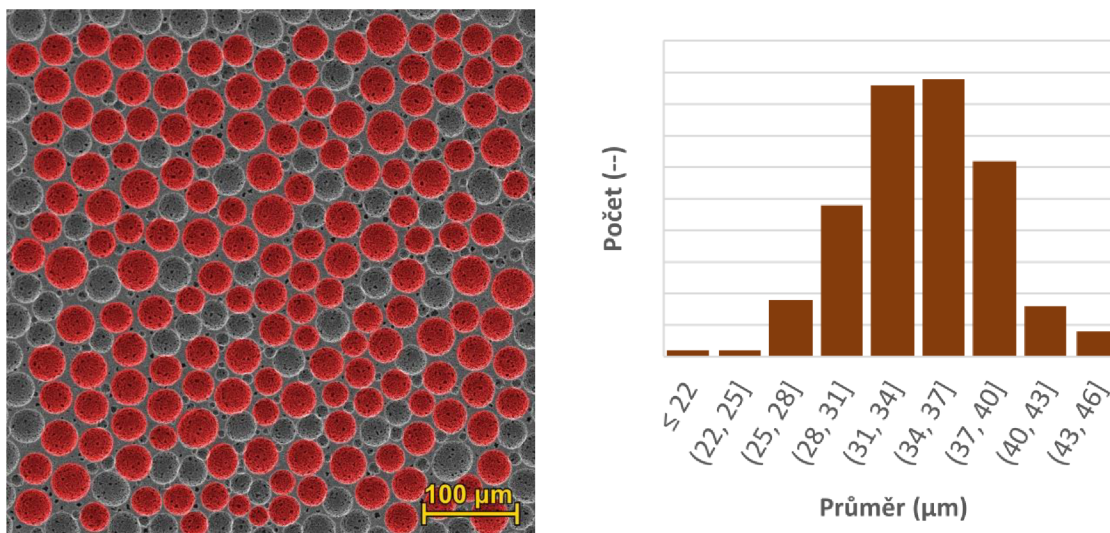
Protože tloušťky povlákněných a nepovlákněných fólií jsou vzájemně poměrně podobné a jsou zatíženy velkou nejistotou měření, není možné spolehlivě určit tloušťku nánosů nanovláken porovnáním tloušťky nepovlákněné a povlákněné fólie. Z toho důvodu byla změřena tloušťka samotných PCL a PDX vrstev navlákněných na spunbondu, na kterém byly při povláknování upevněny i fólie. Tloušťka spunbondu s PDX vlákny byla určena jako **(0,34 ± 0,02) mm** a tloušťka spunbondu s PCL vlákny jako **(0,39 ± 0,05) mm**. Poté byla změřena tloušťka samotného (nepovlákněného) spunbondu, naměřená hodnota byla **(0,2 ± 0,02) mm**. Po odečtení lze usoudit, že vrstva nánosů PDX zřejmě dosahuje tloušťky okolo 0,1-0,15 mm, tloušťka nánosů PCL vláken se jeví být o něco silnější a mohla by ležet v rozmezí 0,15-0,25 mm.

**Závěr:** Pomocí tloušťkoměru byla určena přibližná tloušťka fólií a nanovláknenných nánosů. Zdá se, že tloušťka fólií se pohybuje okolo 0,5 mm, nános nanovláken pak dosahuje mocnosti cca 0,1-0,25 mm. Hodnoty jsou velmi orientační, protože z důvodu malého rozměru fólií nebylo možné provést velké množství měření na stejném vzorku, fólie jsou navíc obvykle po přípravě lehce zvlhčené, a protože se jedná o poměrně pevný a pružný materiál, je možné, že toto zvlhčení vnáší do měření další nepřesnost.

### 6.3 Měření charakteristických rozměrů konkávních struktur a vláken

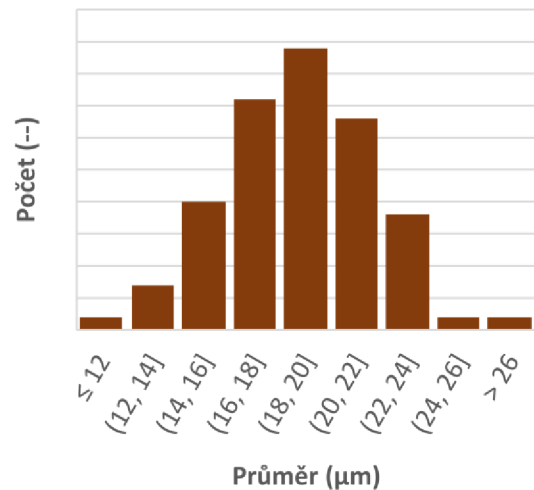
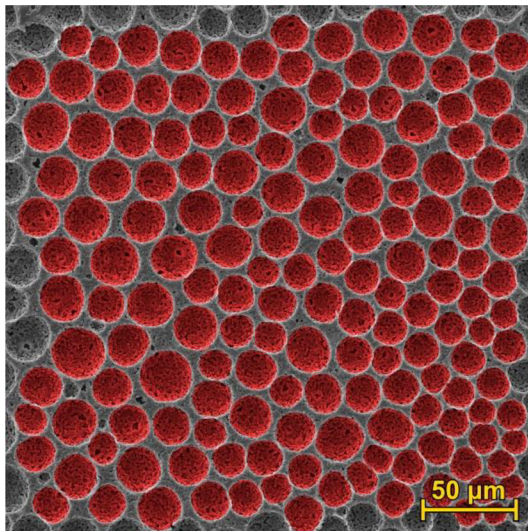
Pomocí Java aplikace ImageJ byly změřeny charakteristické rozměry (tloušťka vláken a průměr prohlubní) na SEM snímcích fólií a nanovláken připravených v rámci experimentů popsaných v předchozích kapitolách. Pro určení průměru konkávních struktur byla nejprve v softwaru označena plocha prohlubně ( $S$ ) a průměr ( $d$ ) byl následně dopočítán pomocí vzorce  $d = 2\sqrt{S/\pi}$ , kde  $\pi$  je Ludolfovo číslo (je předpokládáno, že prohlubně mají přibližně kruhový tvar). Průměr vláken byl měřen přímo pomocí označení kolmého průřezu vlákna na dobře viditelné části úsečkou s kolmicemi. Z naměřených hodnot byl vždy sestaven histogram.

První měření bylo provedeno na snímku fólie s většími prohlubněmi (zvětšení 500×), připravené při relativní vlhkosti 55 %. Tato fólie reprezentuje většinu fólií připravovaných a používaných během experimentů v praktické části. K výpočtu průměru bylo na snímku označeno 164 různých prohlubní (červeně vybarvené oblasti na levé části Obrázku 33).



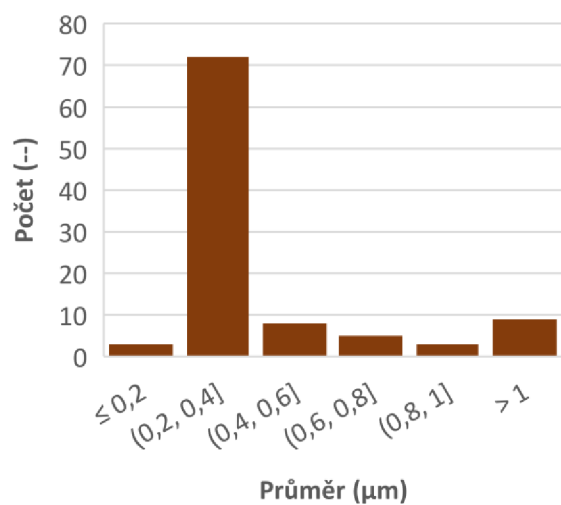
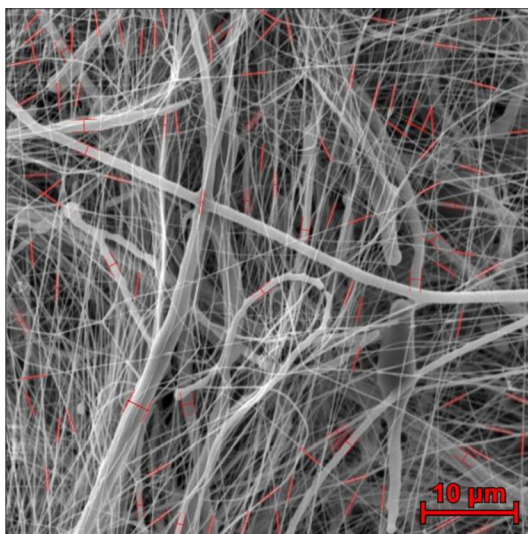
Obrázek 33: Analyzovaný SEM snímek fólie s většími prohlubněmi a histogram vypočtených průměrů.

Vynechány byly prohlubně, které se příliš těsně dotýkaly již označených prohlubní (software dvě dotýkající se oblasti považuje za jednu) a prohlubně velmi nekulatého tvaru. Z naměřených dat vyplývá, že průměrný průměr prohlubní na první fólii je  $(34 \pm 5) \mu\text{m}$ . Stejným způsobem bylo provedeno měření na snímku vzorku fólie (zvětšení 1000×) připravené při vlhkosti 65 %. Měřeno bylo celkem 162 konkávních struktur.



Obrázek 34: Analyzovaný SEM snímek fólie s menšími prohlubněmi a histogram vypočtených průměrů.

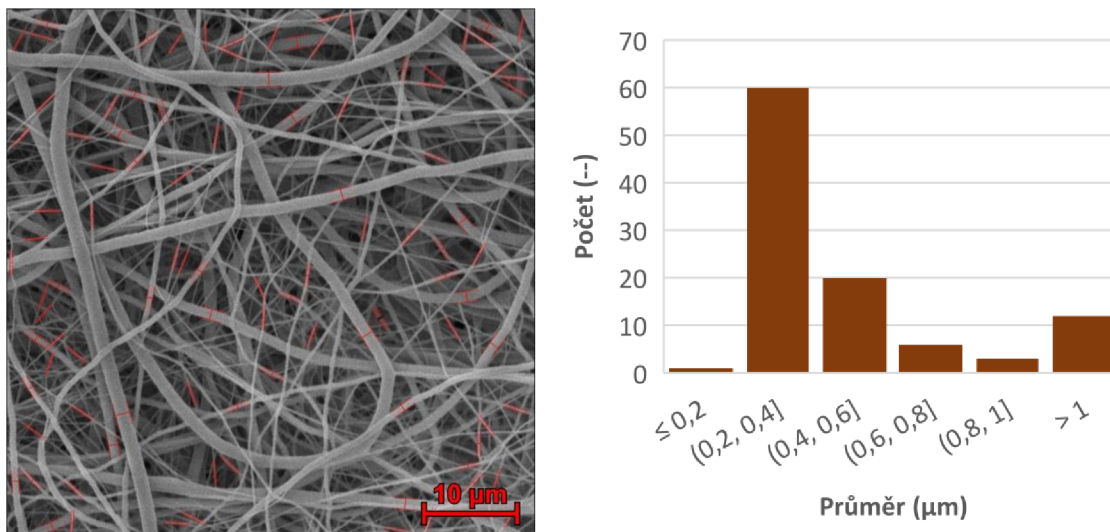
Z naměřených dat vyplývá, že průměrný průměr prohlubní na druhé fólii je  $(19 \pm 3) \mu\text{m}$ . Dále bylo změřeno 100 průměrů vláken na snímku PCL vláken (zvětšení 5000×), připravených postupem popsáním v Kapitole 5.6:



Obrázek 35: Analyzovaný SEM snímek PCL vláken a histogram naměřených průměrů vláken.

Z naměřených dat vyplývá, že průměrný průměr PCL vláken je  $(0,4 \pm 0,3) \mu\text{m}$ . Na analyzovaném úseku materiálu výrazně převažují vlákna o průměru 200-400 nm, přítomna jsou však také silnější vlákna, která dosahují průměru i přes 1 mikrometr.

Nakonec byl obdobně analyzován i SEM snímek připravených PDX vláken (zvětšení 5000×). Měřeno bylo opět 100 různých vláken:



Obrázek 36: Analyzovaný SEM snímek PDX vláken a histogram naměřených průměrů vláken.

Z naměřených dat vyplývá, že průměrný průměr PDX vláken je  $(0,5 \pm 0,3) \mu\text{m}$ . Distribuce jednotlivých průměrů je podobná jako u PCL vláken, více jsou však zastoupeny silnější vlákna.

**Závěr:** Z naměřených a vypočtených dat vyplývá, že průměrná velikost konkávních struktur na fóliích připravovaných při 55% vlhkosti se pohybuje okolo 35 mikrometrů, zvýšení vlhkosti tento průměr sníží zhruba na polovinu. Podrobnější diskuse vlivu vlhkosti na morfologii fólie je uveden v závěru Kapitoly 5.4.

Oba typy nanovláknenných materiálů dosahují podobných průměrů jednotlivých vláken. Nejvíce zastoupená jsou v obou případech vlákna o průměru okolo 200-400 nm, v menší míře se vyskytují vlákna o průměru přes 1 mikrometr. Biokompatibilita nanovláken připravených stejným způsobem byla již testována, lze tedy očekávat dobrou míru buněčné adheze a proliferace [48, 84, 94].



## 6.4 Určení smáčivosti měřením kontaktního úhlu

Měření kontaktního úhlu poskytuje informaci o smáčivosti materiálu. Měření obvykle probíhá na kapce testovací kapaliny přisedlé na povrch testovaného materiálu. Kontaktní úhel je pak definován jako úhel, který svírá tečna povrchu kapaliny (vedená v bodě kontaktu se všemi třemi fázemi – materiálem, kapalinou a okolním prostředím) s povrchem materiálu [97]. Pokud je kontaktní úhel menší než  $90^\circ$ , převládají adhezní síly mezi materiálem a kapalinou nad kohezními silami, působícími vzájemně mezi molekulami kapaliny. Pokud úhel překračuje  $90^\circ$ , převládají místo toho kohezní síly kapaliny. Čím vyšší jsou adhezní síly, tím vyšší je povrchová energie materiálu. Nejčastěji používanou testovací kapalinou je voda, podle smáčivosti vodou lze materiály dělit na hydrofilní (kontaktní úhel  $<90^\circ$ ) a hydrofobní (kontaktní úhel  $>90^\circ$ ). Měření kontaktního úhlu má v biomedicíně význam, protože míra buněčné proliferace na polymerním scaffoldu je obvykle přímo úměrná jeho hydrofilitě [98].

**Metodika:** Pro měření byl použit přístroj See System od společnosti Advex Instruments, umožňující statické měření kontaktního úhlu přisedlé kapky. Z testovaných materiálů (hladká strana fólie, strana fólie s malými prohlubněmi (průměr okolo  $10\ \mu\text{m}$ ), strana fólie s velkými prohlubněmi (průměr  $20\text{-}25\ \mu\text{m}$ ), PCL vlákna a PDX vlákna) byly odstřiženy kusy o rozměrech přibližně  $2 \times 5\ \text{cm}$  a pomocí oboustranné lepicí pásky byly upevněny na laboratorní sklíčka. Měření probíhalo následovně: Na testovaný materiál umístěný na posuvný stolek byla nanесena kapka destilované vody o objemu  $8\ \mu\text{l}$  pomocí automatické pipety. Následně byl CCD kamerou pořízen snímek kapky, na kterém byl pomocí softwaru změřen kontaktní úhel. Měření bylo opakováno desetkrát pro každý testovaný materiál. Protože materiály vykazovaly spíše hydrofilní chování, byl použit kontinuální režim, kdy kamera snímala obraz každých  $0,3$  sekund. Měření poté probíhalo na prvním snímku, kde kapka zcela dosedla na materiál. Po skončení měření byl softwarem See System vypočítán průměrný kontaktní úhel včetně směrodatné odchylky pro každý materiál, a také volná povrchová energie podle Kwokova-Neumannova modelu [99].

**Vyhodnocení:** Vypočtené výsledky, zaokrouhlené dle odchylky na jednu platnou číslici, jsou shrnuty v Tabulce 4:



Tabulka 4: Výsledky měření kontaktního úhlu a výpočtu volné povrchové energie.

Materiál	Kontaktní úhel [°]	Volná povrchová energie [ $\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ ]
Fólie – hladká strana	$40 \pm 20$	$58 \pm 7$
Fólie s menšími prohlubněmi	$60 \pm 30$	$50 \pm 20$
Fólie s většími prohlubněmi	$67 \pm 9$	$43 \pm 7$
PCL vlákna	$40 \pm 20$	$60 \pm 20$
PDX vlákna	$17 \pm 6$	$70 \pm 3$

**Závěr:** Ačkoliv měření nebylo příliš přesné kvůli velkému rozptylu naměřených hodnot kontaktních úhlů pro jednotlivé vzorky, z dat vyplývá, že strana fólie se systémem konkávních struktur je obecně hydrofobnější než hladká strana fólie nebo nanovlákna. To je jeden z faktorů, který by mohl přispívat nižší míře buněčné proliferace na strukturované straně fólie. Za zmínku stojí rozdíl mezi PDX nanovláknem a PDX fólií strukturovanou prohlubněmi – ačkoliv se chemicky jedná o ten samý materiál, bez dodatečných modifikací měnících chemické složení, míra smáčivosti se poměrně znatelně liší. To dokazuje, že stejný materiál může mít různé povrchové vlastnosti v závislosti pouze na morfologii jeho povrchu.

## 6.5 Testy toxicity povlákňených fólií

Cílem tohoto testu je ověřit, že je vyrobený dvouvrstvý materiál sám o sobě netoxický pro buňky. Samotné použité polymery jsou netoxické a používají se v biomedicínských aplikacích (viz Kapitola 3), potenciální toxicita by ale mohla být způsobena přítomností reziduálních rozpouštědel. Testy byly prováděny dva. První test sloužil k vyvrácení toxicity nepovlákňené fólie. Protože rozpouštědlo (TFE) se může z fólie postupně odpařovat, byl test proveden na dvou vzorcích fólií různého stáří – 4 a 12 týdnů. Druhý test sloužil k vyhodnocení toxicity fólií pokrytých nanovláknem a toxicity vláken samotných.

**Metodika:** Testy toxicity byly provedeny podle normy ISO 10993:5 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* [100]. Vzorky každého ze zkoumaných materiálů (nepovlákňená fólie, fólie povlákňená PCL vlákny, fólie povlákňená PDX vlákny, samotná PCL vlákna a samotná PDX vlákna) byly nastříhány na malé kusy a před experimentem sterilizovány ethylenoxidem. Po sterilizaci byly vzorky týden odvětrávány.

Toxicita byla testována na 8. pasáži linii myších fibroblastů 3T3. Tato linie byla nejprve zpasážována a to následujícím postupem: Z kultivační láhve bylo odsáto staré kultivační médium a dno láhve bylo opláchnuto fosfátovým pufrem (PBS). Následně bylo do láhve napipetováno malé množství roztoku trypsinu, předem ohřátého ve vodní lázni na 37 °C. Kultivační láhev byla umístěna na 4 minuty do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Pod mikroskopem bylo zkontrolováno, zda došlo k oddělení buněk od podkladu. Následně bylo dno láhve několikrát opláchnuto buněčným médiem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, objem dvojnásobný oproti trypsinu), aby došlo k deaktivaci trypsinu a ke spláchnutí co největšího množství uvolněných buněk. Vznikla buněčná suspenze, z níž byl odebrán vzorek do mikrozkuumavky. K tomuto vzorku suspenze byla přidána trypanová modř (v objemovém poměru 1:1), výsledný roztok byl napipetován do testovací destičky a vložen do optického cytometru. Analýzou na cytometru byla určena viabilita a koncentrace buněk v suspenzi. Suspenze byla naředěna DMEM ohřátým na 37 °C tak, aby vznikl roztok o koncentraci 10<sup>4</sup> buněk/ml.

K testování byly použity dvě 96jamkové mikrotitrační destičky. Do jamek bylo napipetováno po 100 µl buněčné suspenze následujícím způsobem:

- **1. destička:** 36 jamek pro testování nepovlákněné fólie staré 4 týdny; 36 jamek pro testování nepovlákněné fólie staré 12 týdnů; 12 jamek pozitivní kontrola; 12 jamek negativní kontrola
- **2. destička:** 12 jamek pro testování fólie povlákněné PDX vlákny; 12 jamek pro testování fólie povlákněné PCL vlákny; 12 jamek samotných PDX vláken; 12 jamek samotných PCL vláken; 12 jamek pozitivní kontrola; 12 jamek negativní kontrola

Destičky s buněčnou suspenzí byly kultivovány v inkubátoru po dobu 24 hodin. Z každého z testovaných materiálů byl připraven výluh (koncentrace 10 mg materiálu na 1 ml DMEM, louhování probíhalo po dobu 24 h za stálého míchání a inkubace při 37 °C). Za stejných podmínek byl inkubován také roztok DMEM, který poslouží jako základ roztoku pro pozitivní a negativní kontrolu.

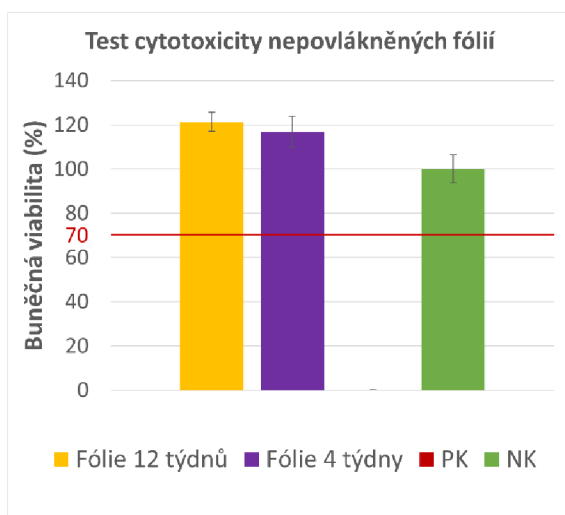
Po 24 h byly destičky s nasazenými buňkami vyjmuty z inkubátoru a pod optickým mikroskopem byl zkontrolován stav buněčné populace. Následně bylo ze všech jamek odsáto kultivační médium a nahrazeno po 100 µl výluhu příslušných testovaných materiálů (dle klíče uvedeného výše), po 100 µl čistého DMEM inkubovaného při 37 °C pro jamky

odpovídající negativní kontrole (negativní kontrola představuje prostředí netoxické pro buňky a je vůči ní posuzována viabilita buněk na testovaných vzorcích) a po 100  $\mu$ l 0,1% roztoku Tritonu X-100 pro jamky odpovídající pozitivní kontrole (Triton X-100 je povrchově aktivní látka, která narušuje fosfolipidovou membránu a způsobuje buněčnou lýzi, pozitivní kontrola tedy simuluje prostředí pro buňky toxické). Destička s výluhy a kontrolami byla na dalších 24 hodin umístěna do inkubátoru.

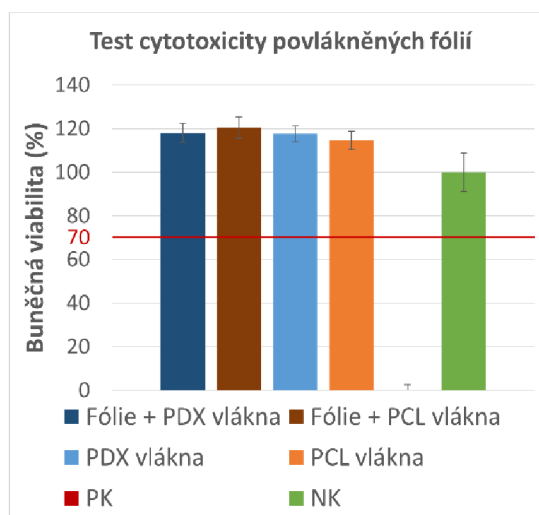
Po 24 hodinách byla vyhodnocena viabilita buněk prostřednictvím testu metabolické aktivity CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*). Klíčovou komponentou této testovací sady je chemikálie WST-8, což je tetrazoliová sůl rozpustná ve vodě, kterou jsou metabolicky aktivní buňky schopné prostřednictvím enzymu dehydrogenázy transformovat na formazan. Ten má oranžovou barvu a významně absorbuje světlo vlnové délky 450 nm. Pomocí UV/Vis spektrofotometru je poté možné změřit absorbanci a porovnáním s kontrolním měřením určit viabilitu buněk.

Pro test byl připraven 10% roztok CCK-8 v DMEM. Z jamek se vzorky, s pozitivní a s negativní kontrolou bylo odsáto médium. Jamky byly propláchnuty PBS. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l 10% roztoku CCK-8. Kultivační destičky se vzorky byly umístěny na 3 hodiny do inkubátoru. Následně byla na UV/Vis spektrometru změřena absorbance roztoků v jednotlivých jamkách pro vlnovou délku 450 nm, která je úměrná koncentraci formazanu vyprodukovaného metabolicky aktivními buňkami. Absorbance byla přepočítána na viabilitu buněk vztahem k negativní kontrole (hodnota absorbance naměřená pro negativní kontroly byla vzata jako 100% viabilita). Aby mohl být vzorek považován za netoxický, musí být jeho viabilita (včetně chybového intervalu statistické odchylky) vyšší než 70 % oproti negativní kontrole.

**Vyhodnocení:** Po změření absorbance byly hodnoty příslušné každému ze vzorků zprůměrovány a znázorněny graficky, včetně chybových úseček znázorňujících směrodatnou odchylku. Graf 2 znázorňuje hodnoty testování nepovlákněných fólií a Graf 3 hodnoty pro povlákněné fólie a nanovláknna (Grafy jsou uvedeny na následující stránce).



Graf 2: Cytotoxicita nepovlákněných fólií.



Graf 3: Cytotoxicita povlákněných fólií a nanovláken.

(u obou grafů značí **červená linie** limitní hranici buněčné viability, pod kterou je materiál považován za toxický. PK = pozitivní kontrola = prostředí pro buňky toxické. NK = negativní kontrola = prostředí pro buňky netoxické)

**Závěr:** Žádný z testovaných vzorků není dle normy ISO 10993:5 cytotoxický. Cytotoxicita by u těchto materiálů mohla být způsobena především uvolňováním toxických dávek reziduí rozpouštědel, test tuto možnost vyvrátil. Přítomnost reziduálních rozpouštědel by do budoucna bylo vhodné ověřit i jinak, např. chemickými testy. Pro tuto práci je však zásadní především důkaz, že materiál není cytotoxický a lze na něm provést *in vitro* test buněčné proliferace.

## 6.6 *In vitro* testy buněčné proliferace

Cílem tohoto experimentu je zjistit, do jaké míry dochází k buněčné proliferaci na dvouvrstevném materiálu sestávajícím z PDX fólie, jejíž jedna strana je pokryta konkávními strukturami v rozměru řádu desítek mikrometrů, a druhá strana je povlákněna dvěma různými typy nanovláken (PDX a PCL).

**Metodika:** K testování bylo použito celkem 12 PDX polymerních fólií, připravených metodou popsanou v Kapitolách 5.1 a 5.4. Při přípravě byla použita teplota 23 °C a vlhkost 55 stupňů, byly tedy získány fólie se středním průměrem konkávních struktur cca 35 μm (určení středního průměru prohlubní je popsáno v Kapitole 6.3). Čtyři fólie byly použity bez dalších úprav, 4 byly z hladké strany povlákněny PCL nanovláknem a 4 byly povlákněny PDX nanovláknem (k přípravě nanovláken bylo použito zařízení Nanospider,

metodika povlákňování je popsána v Kapitole 5.6). Dále byly připraveny samostatné vzorky PCL a PDX nanovláken. Ze všech materiálů byly vystříženy kulaté vzorky o průměru přibližně 1 cm a rozmístěny do 24jamkových kultivačních destiček. Byly připraveny dvě sady materiálů – na testování po 2 a po 6 dnech. Od každého testovaného materiálu byly připraveny tři testovací vzorky a jedna negativní kontrola (samotný materiál bez osazení buňkami). Pro každý testovací den byly také připraveny tři pozitivní kontroly (buněčné médium osazené buňkami bez testovacího materiálu). Kromě toho byly z každého z testovacích dnů připraveny vzorky na fluorescenční mikroskopii a na SEM. Vzorky byly zatíženy skleněnými kroužky a všechny destičky se vzorky byly sterilizovány ethylenoxidem a týden odvětrávány.

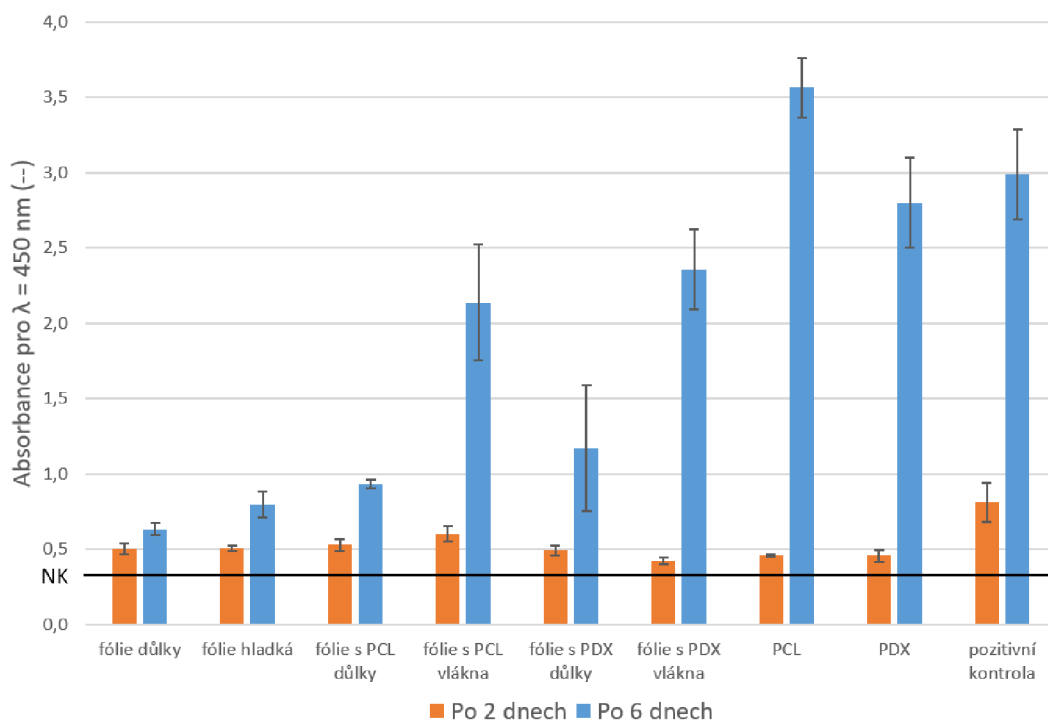
Výchozí buněčnou kulturou byla 20. pasáž linie myších fibroblastů 3T3. Tato linie byla zpasážována, stejným postupem, jaký byl popsán v Kapitole 6.5. Tím byla získána buněčná suspenze, která byla naředěna tak, aby obsahovala přibližně  $10^4$  buněk/ml. Do každé jamky obsahující vzorek na test metabolické aktivity, vzorek na mikroskopii a také do jamek pro pozitivní kontroly byl napipetován 1 ml naředěné buněčné suspenze. Do každé z jamek s negativní kontrolou bylo napipetováno 1 ml DMEM bez buněk (negativní kontrola při testu proliferace představuje materiál bez buněk, naměřená hodnota absorbance při MTT testu je tedy pro negativní kontrolu nejnižší. To je opačná situace než při testu toxicity, kde negativní kontrola představuje netoxické prostředí a tedy 100% viabilitu buněk). Do provedení dalších testů byly kultivační destičky se vzorky uchovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Kultivace první sady vzorků probíhala po dobu dvou dnů, kultivace druhé sady po dobu šesti dnů. Po každém z těchto intervalů byl proveden test metabolické aktivity a byly připraveny vzorky na fluorescenční a elektronovou mikroskopii.

**Testování metabolické aktivity pomocí CCK-8:** Princip CCK-8 testu metabolické aktivity a jeho průběh byl popsán v Kapitole 6.5. Test v tomto případě probíhal obdobným způsobem.

Hodnoty absorbance získané měřením na UV/Vis spektrometru byly pro každý testovaný materiál zprůměrovány a vloženy do grafu (Graf 4 na následující stránce).





*Graf 4: Naměřená absorbance pro jednotlivé vzorky.*

*(Linie označená „NK“ značí přibližnou hodnotu absorbance příslušnou negativní kontrole, která pro všechny vzorky vycházela okolo 0,33)*

Z grafu je patrné, že naměřená absorbance (a tedy viabilita buněk) je vždy znatelně vyšší na straně fólie s nanovláknem než na straně fólie s konkávními strukturami. Hladká strana nepovlákněné fólie má viabilitu jen o málo vyšší než strana s prohlubněmi. Tyto výsledky korelují s předpokladem, že strukturovaná strana fólie neposkytuje příznivé prostředí pro růst a diferenciaci buněk, naopak nanovláknata fungují jako scaffold a růst buněk stimuluje.

**Fixování a barvení vzorků pro mikroskopii:** Ze všech jamek destiček se vzorky pro mikroskopii bylo odsáto médium a byly propláchnuty PBS. Následně byl do každé jamky napipetován 1 ml 2,5% roztoku glutaraldehydu, který slouží k fixaci buněk. Destičky byly následně umístěny do lednice.

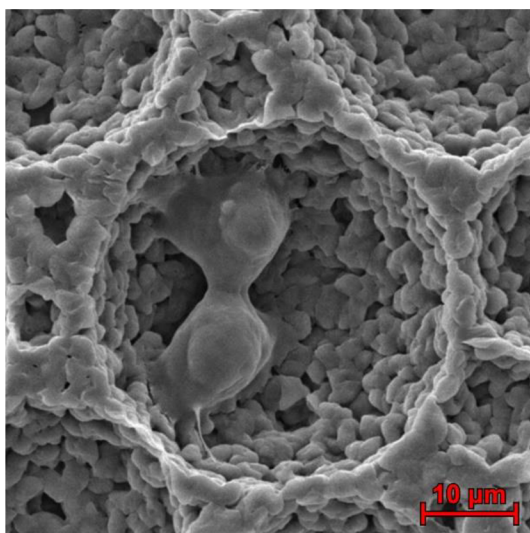
Po přibližně 30 minutách byly destičky vyjmuty z lednice a roztok glutaraldehydu byl odsát pipetou. Jamky se vzorky byly propláchnuty PBS. Následně byl do každé z jamek určených pro FM napipetován přibližně 1 ml předem připraveného permeabilizačního roztoku (PBS + Triton X-100 + fetální bovinní sérum) k narušení buněčných membrán a umožnění vstupu barviv do buněk. Tento roztok na vzorky působil 5 minut, následovalo odsání a proplach PBS. Poté bylo do všech jamek napipetováno 300  $\mu$ l roztoku FITC (peptid phalloidin nesoucí barvivo fluorescein – látka se váže na cytoskelet buněk, ale

také na nanovlákněný scaffold). V tomto roztoku byly vzorky ponechány 30 minut. Po výplachu PBS následovalo přidání DAPI – barviva, které se váže na DNA v buněčném jádře (preferenčně na báze páry adenin-thymin). Po pěti minutách působení byl roztok DAPI odsát, vzorky byly propláchnuty PBS a v roztoku PBS byly ponechány až do zahájení práce s mikroskopem, aby se zamezilo vyschnutí. Protože barviva jsou citlivá na světlo, byla destička před mikroskopováním obalena alobalem.

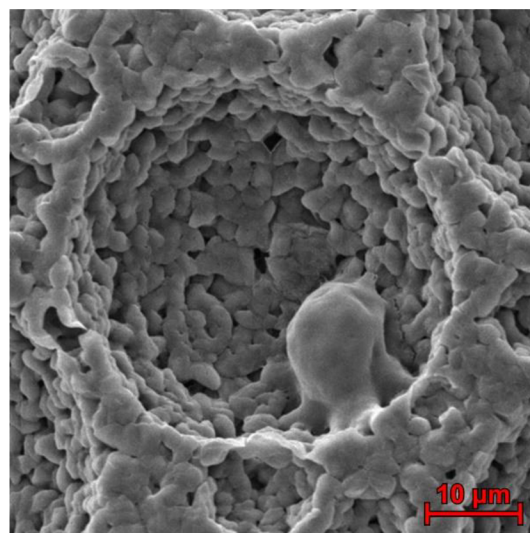
Série vzorků určená pro pozorování elektronovým mikroskopem byla odvozněna vzestupnou ethanolovou řadou – z jamek bylo odsáto médium, do každé z nich byl napipetován cca 1 ml 60% roztoku ethanolu, po 5 minutách působení byl roztok odsát a postup byl opakován se 70%, 80%, 96% a 100% ethanolem. Po odsátí 100% ethanolu byly vzorky ponechány bez roztoku k vyschnutí.

**SEM snímky:** Na skenovacím elektronovém mikroskopu byly pořízeny snímky všech vzorků po dvou i šesti dnech kultivace, na kterých je patrné, jakým způsobem a do jaké míry jsou jednotlivé materiály porůstány buňkami. Vybrané snímky jsou uvedeny níže:

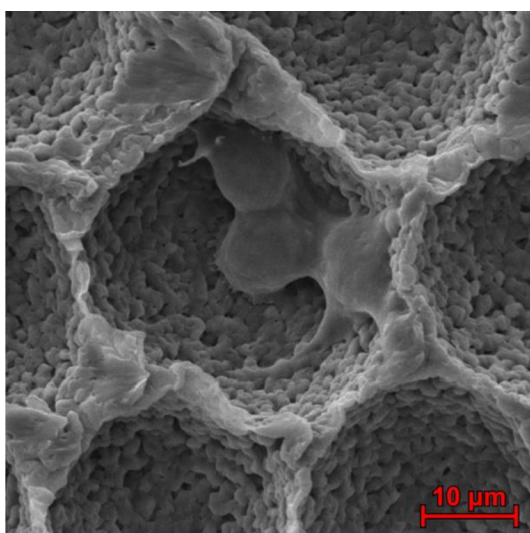
- Obrázky 37 a 38 znázorňují vybrané snímky buněk na strukturovaných stranách fólií (nepovlákněných i povlákněných) po dvou a šesti dnech kultivace.
- Obrázek 39 znázorňuje vybrané snímky buněk na hladké nepovlákněné straně fólie po dvou a šesti dnech kultivace.
- Obrázek 40 znázorňuje vybrané snímky buněk na PDX vláknech navlákněných na fólii po dvou a šesti dnech kultivace.
- Obrázek 41 znázorňuje vybrané snímky buněk na PDX vláknech navlákněných na fólii po dvou a šesti dnech kultivace.
- Obrázek 42 znázorňuje vybrané snímky buněk na samostatných PDX a PCL vláknech po dvou a šesti dnech kultivace.



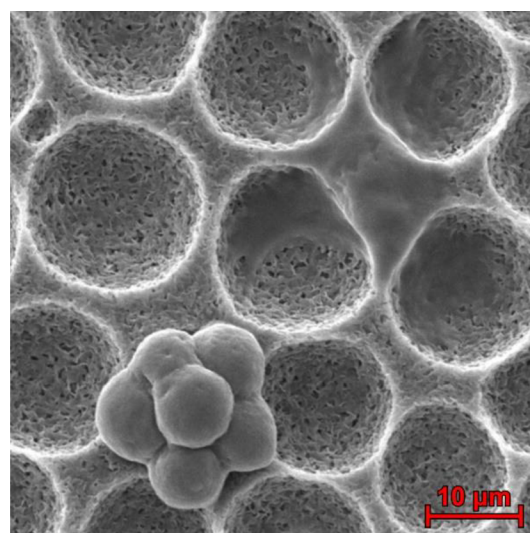
Zvětšení 5000×



Zvětšení 5000×

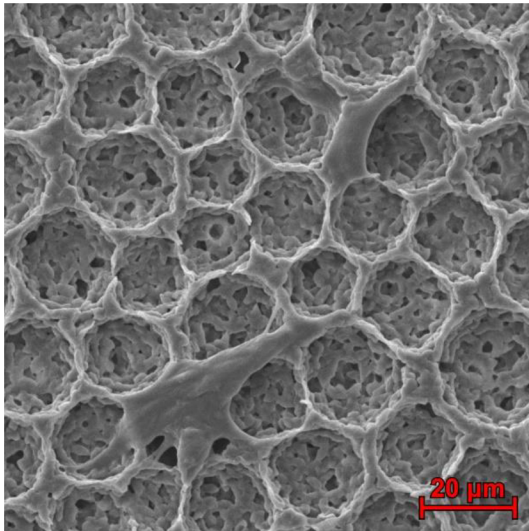


Zvětšení 5000×

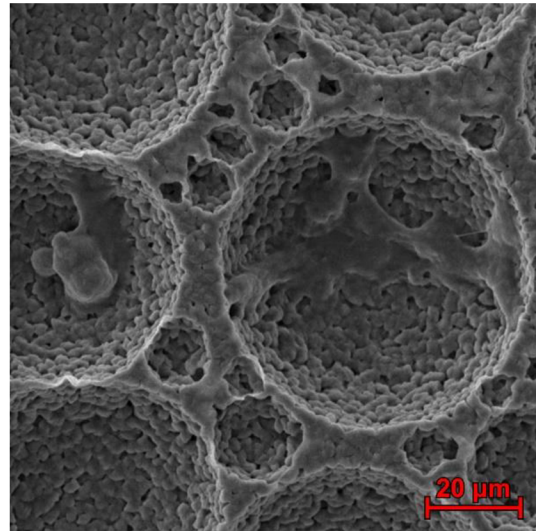


Zvětšení 5000×

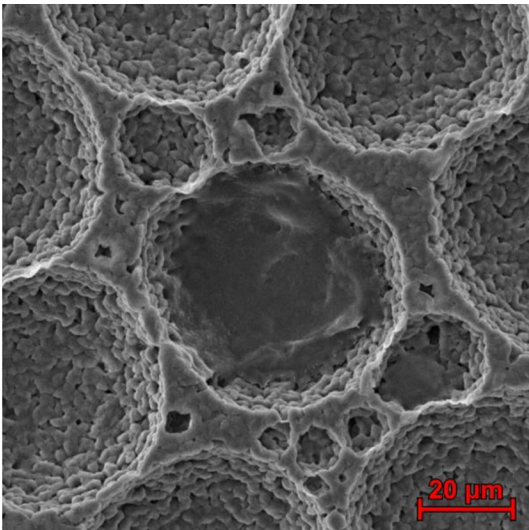
Obrázek 37: Buněčná proliferace na strukturovaných stranách fólií, po 2 dnech kultivace.



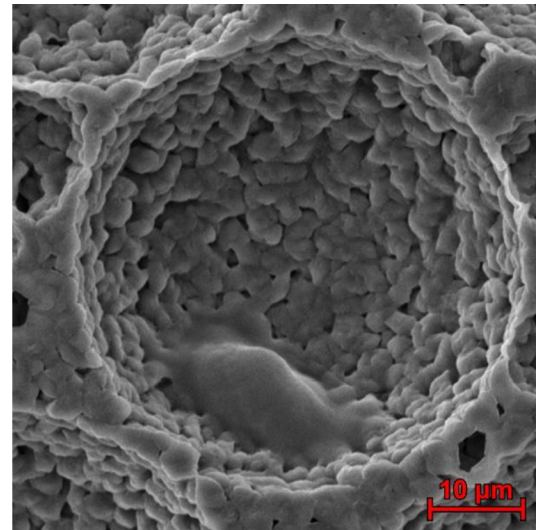
Zvětšení 2500×



Zvětšení 2500×



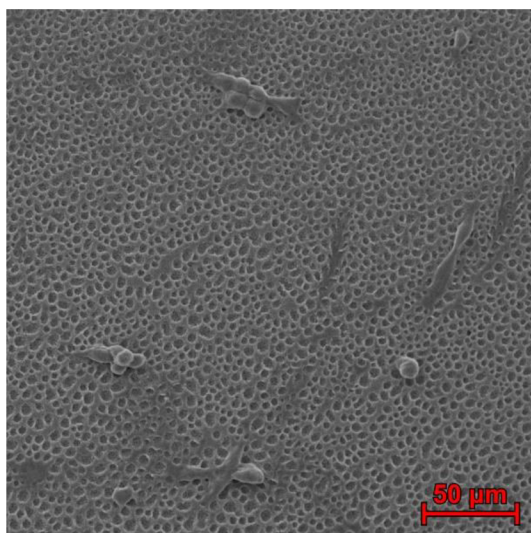
Zvětšení 2500×



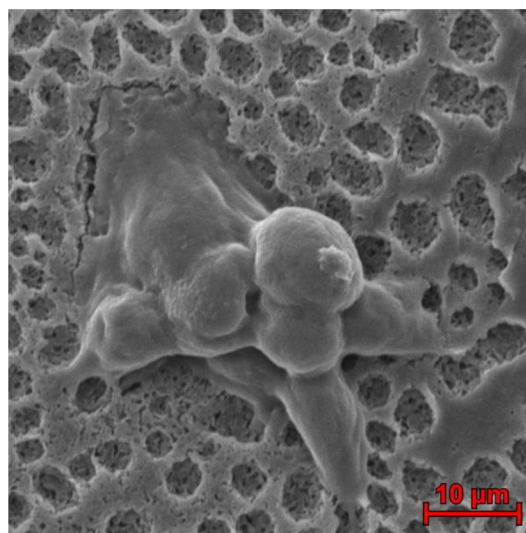
Zvětšení 5000×

Obrázek 38: Buněčná proliferace na strukturovaných stranách fólií, po 6 dnech kultivace.

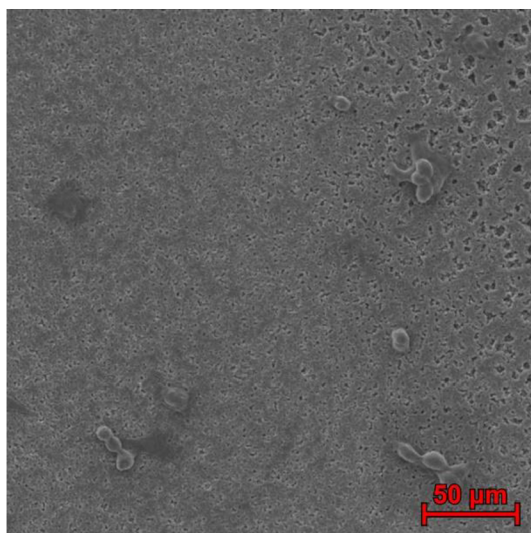




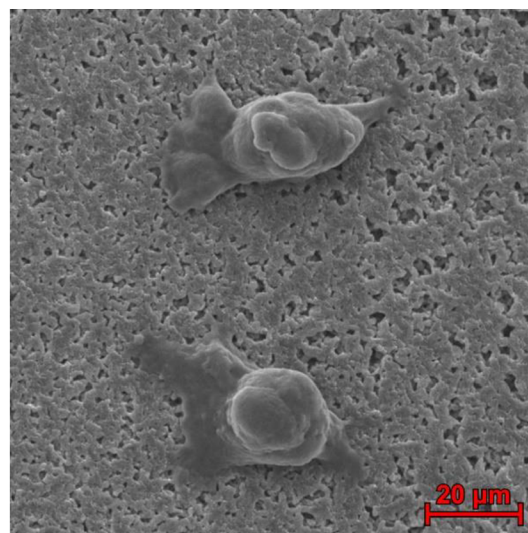
Po dvou dnech, zvětšení 1000×



Po dvou dnech, zvětšení 5000×



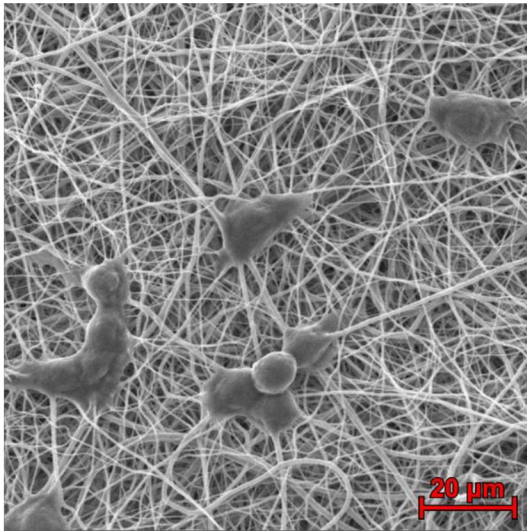
Po šesti dnech, zvětšení 1000×



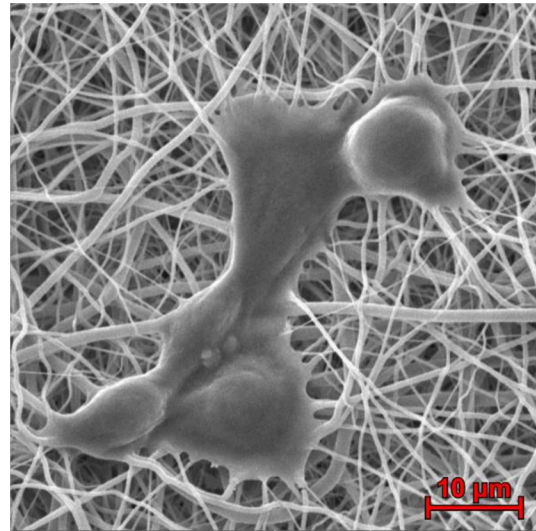
Po šesti dnech, zvětšení 2500×

*Obrázek 39: Buněčná proliferace na hladkých stranách fólií.*

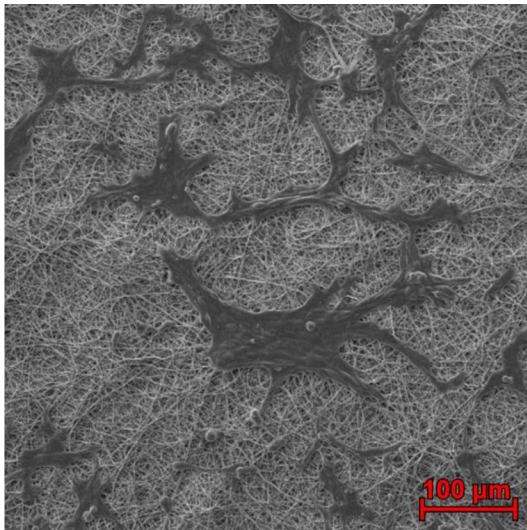




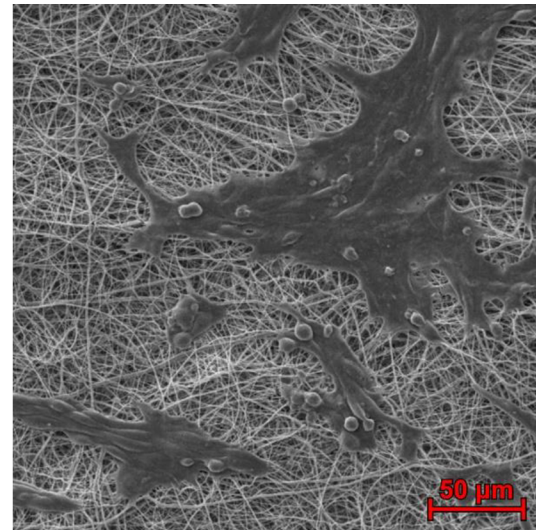
Po dvou dnech, zvětšení 2500×



Po dvou dnech, zvětšení 5000×

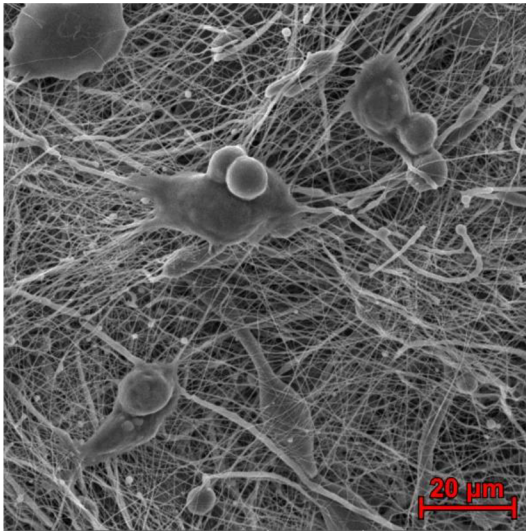


Po šesti dnech, zvětšení 500×

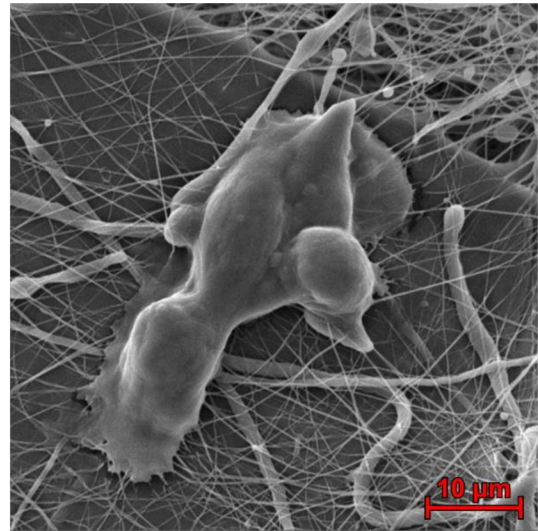


Po šesti dnech, zvětšení 1000×

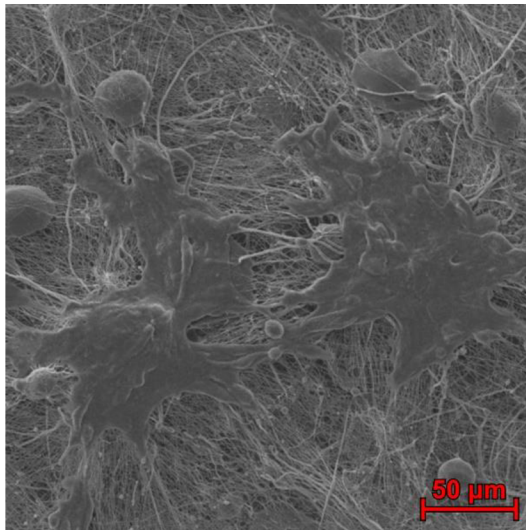
Obrázek 40: Buněčná proliferace na stranách fólií povlákňených PDX vlákny.



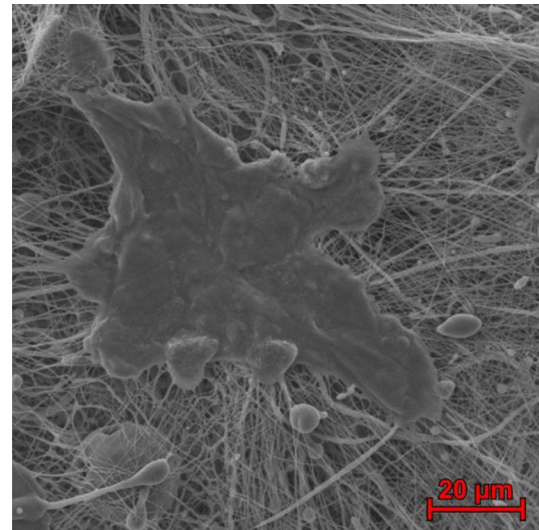
Po dvou dnech, zvětšení 2500×



Po dvou dnech, zvětšení 5000×



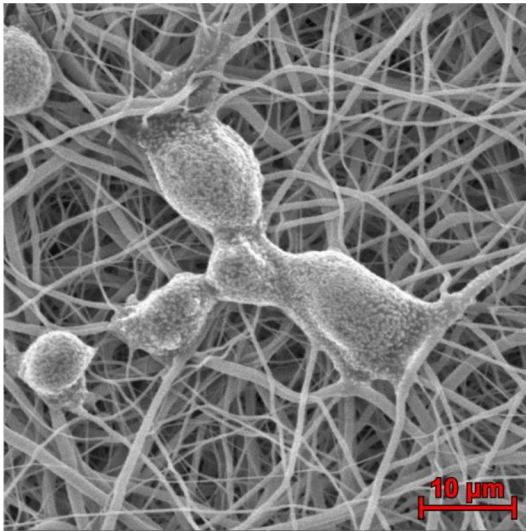
Po šesti dnech, zvětšení 1000×



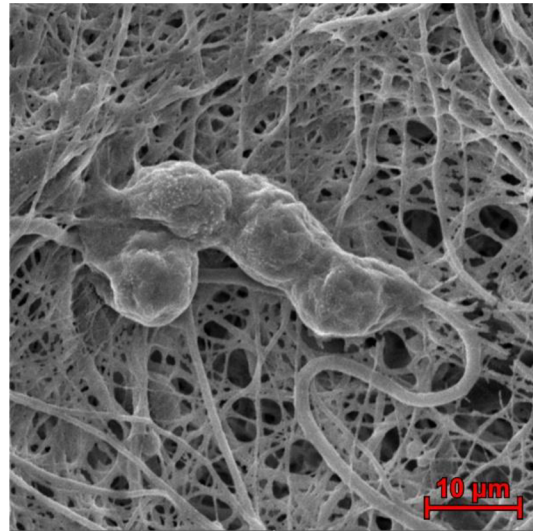
Po šesti dnech, zvětšení 2500×

Obrázek 41: Buněčná proliferace na stranách fólií povlákkněných PCL vlákny.

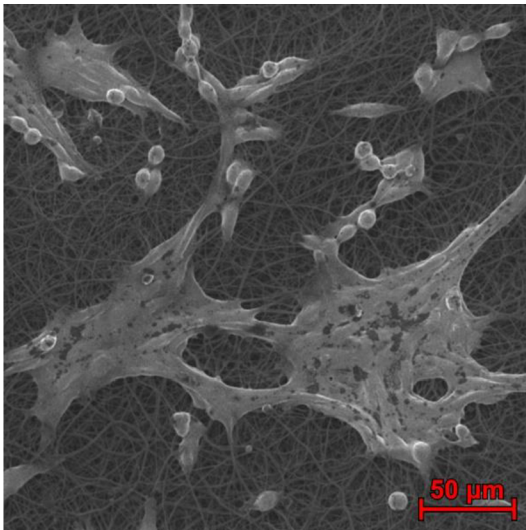




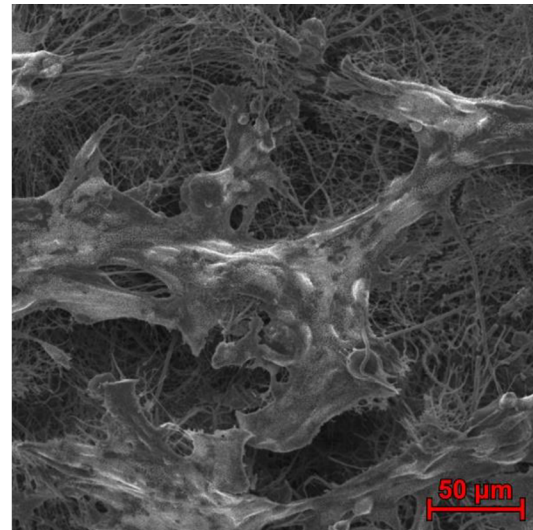
PDX, po dvou dnech, zvětšení 5000×



PCL, po dvou dnech, zvětšení 5000×



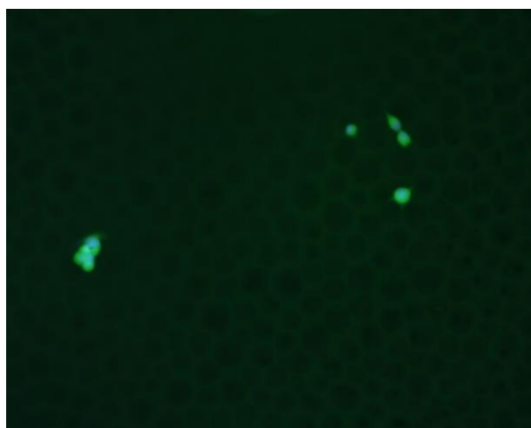
PDX, po dvou dnech, zvětšení 1000×



PCL, po šesti dnech, zvětšení 1000×

Obrázek 42: Buněčná proliferace na samostatných PDX a PCL vláknech.

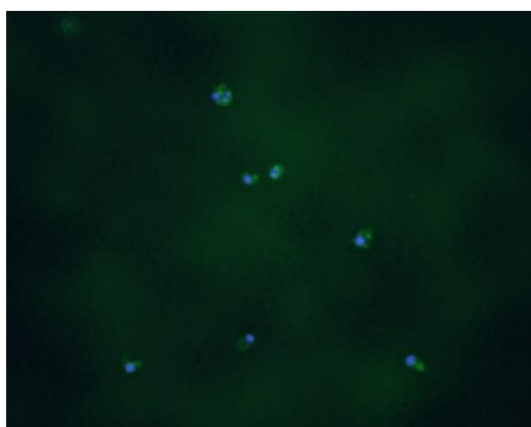
**Snímky z fluorescenčního mikroskopu:** Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu níže (Obrázek 43 až 45) je dobře patrné rozmístění a počet buněk na snímaných oblastech. Modře jsou zbarvená jádra buněk obarvená barvivem DAPI, zelené jsou cytoskelety buněk vázající FITC. Všechny snímky jsou pořízeny s 20× zvětšením.



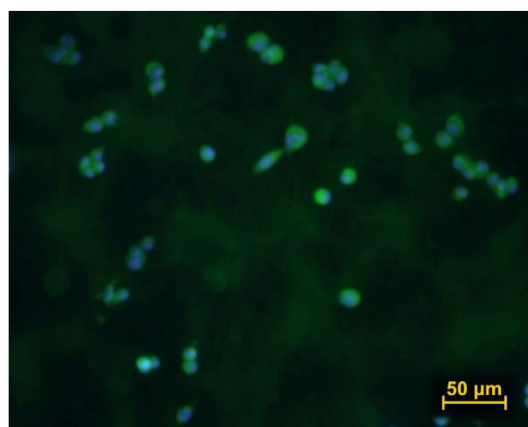
Strana s prohlubněmi nepovlákněné fólie po 2 dnech kultivace



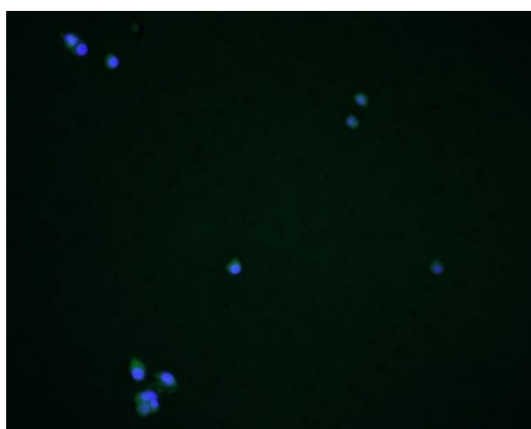
Hladká strana nepovlákněné fólie po 2 dnech kultivace



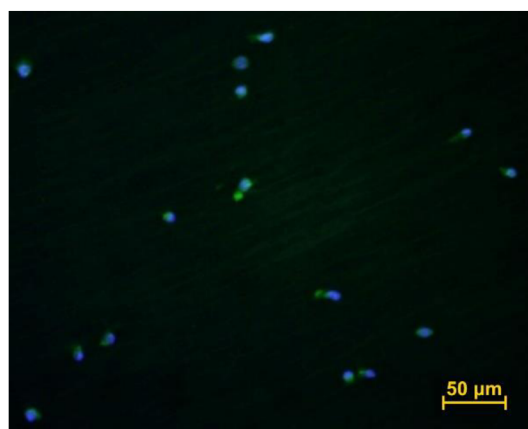
Strana s prohlubněmi fólie povlákněné PCL po 2 dnech kultivace



Strana s vlákny fólie povlákněné PCL po 2 dnech kultivace

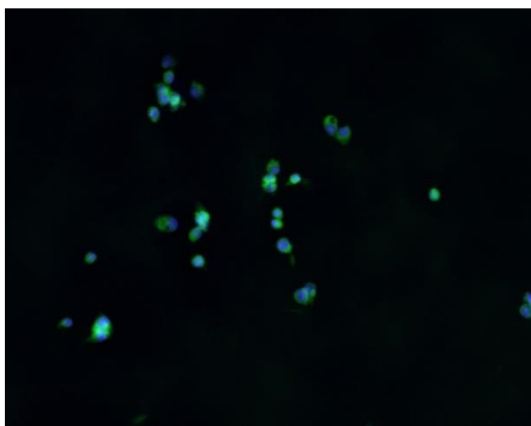


Strana s prohlubněmi fólie povlákněné PDX po 2 dnech kultivace

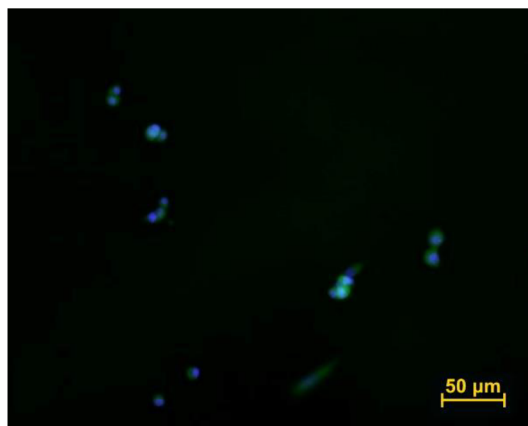


Strana s vlákny fólie povlákněné PDX po 2 dnech kultivace

Obrázek 43: První část snímků z fluorescenční mikroskopie.



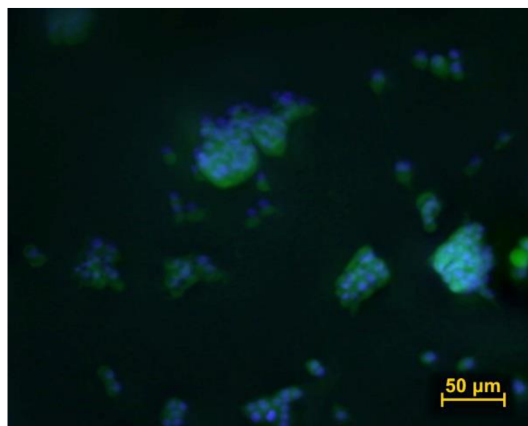
Samostatná PCL vlákna po 2 dnech kultivace



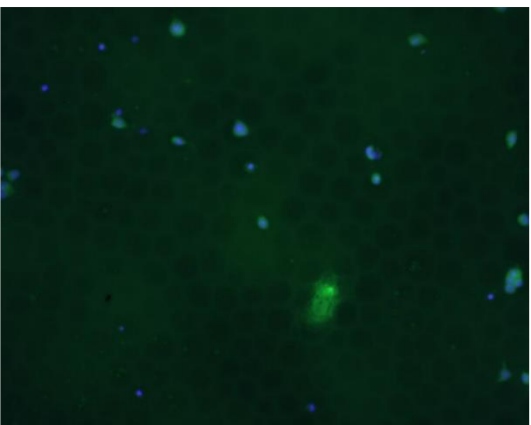
Samostatná PDX vlákna po 2 dnech kultivace



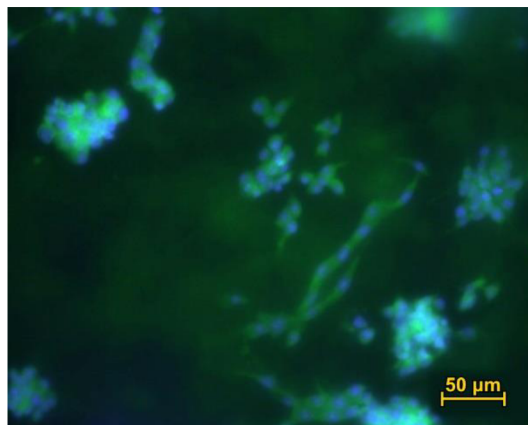
Strana s prohlubněmi nepovlákněné fólie po 6 dnech kultivace



Hladká strana nepovlákněné fólie po 6 dnech kultivace



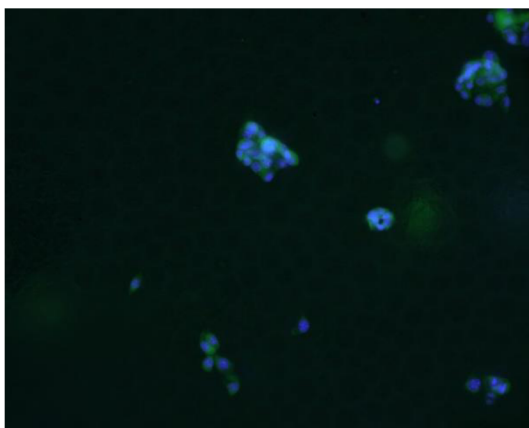
Strana s prohlubněmi fólie povlákněné PCL po 6 dnech kultivace



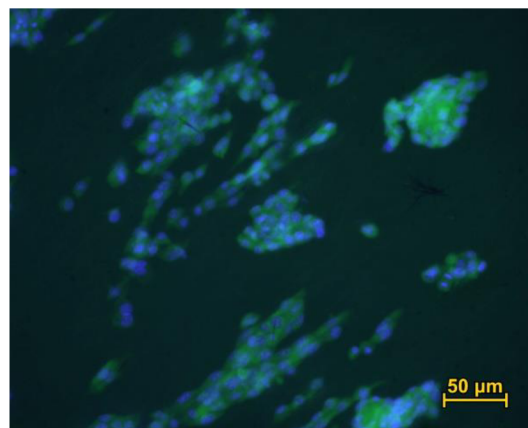
Strana s vlákny fólie povlákněné PCL po 6 dnech kultivace

Obrázek 44: Druhá část snímků z fluorescenční mikroskopie.

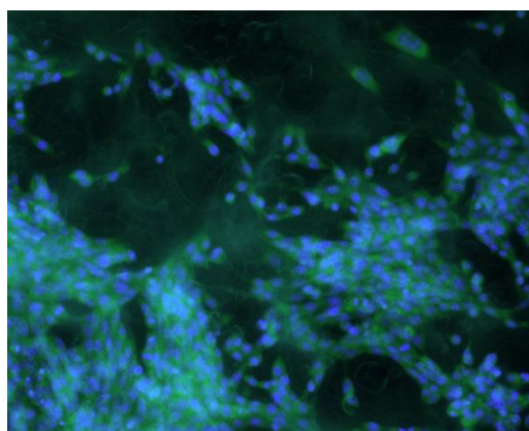




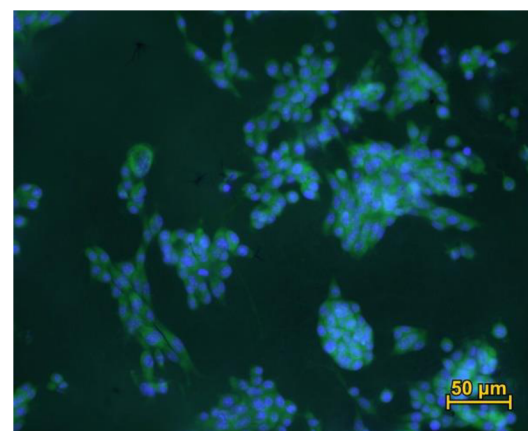
Strana s prohlubněmi fólie povlákněné PDX po 6 dnech kultivace



Strana s vlákny fólie povlákněné PDX po 6 dnech kultivace



Samostatná PCL vlákna po 6 dnech kultivace



Samostatná PCL vlákna po 6 dnech kultivace

Obrázek 45: Třetí část snímků z fluorescenční mikroskopie.

**Závěr:** Provedená série *in vitro* testů buněčné proliferace ukázala, že po cca týdnu dochází na straně PDX fólie povlákněné nanovláknem PCL nebo PDX k výrazně většímu nárůstu buněčné populace než na straně pokryté konkávními strukturami s průměrem v řádu desítek mikrometrů. Ze snímků pořízených na SEM a FM je patrné, že buňky rostoucí na nanovlákněch mívají roztažený/hvězdicovitý tvar charakteristický pro fibroblasty v přívětivém prostředí a po týdnu vytvářejí velké shluky tvořené patrně desítkami až stovkami buněk. Buněčná populace na stranách pokrytých prohlubněmi se z většiny tolik nerozvíjí, buňky často zůstávají jednotlivě nebo v menších skupinách na dně prohlubní, větší shluky jsou méně časté a obvykle jsou tvořeny menším počtem buněk. Buňky navíc častěji mívají zakulacený, méně roztažený tvar, typický pro buňky v nepřívětivém prostředí. Buňky kultivované na hladké straně nepovlákněné fólie proliferují více než buňky na strukturované straně, ale zřetelně méně než buňky na nanovlákněch.

Velikost konkávních struktur nebývá zcela konzistentní po celé ploše fólií, což se zdá mít určitý vliv na buněčnou populaci. Zdá se, že větší prohlubně (o průměru 40-50 mikrometrů) brání buněčné populaci v růstu více, než menší prohlubně rozměru do 20 mikrometrů – častěji se stává, že buňka nebo malý shluk buněk zůstane uzavřený uvnitř jedné struktury a nepřerůstá přes její okraje do okolních prohlubní a prostotu mezi nimi. Ačkoliv cílem bylo udržet rozměr konkávních struktur co nejkonzistentnější, toto pozorování poskytuje zajímavé poznatky o tom, jak morfologie povrchu fólie ovlivňuje chování buněk (všechny fólie jsou tvořeny stejným materiálem, můžeme tedy vyloučit vliv rozdílů v chemických vlastnostech materiálu). I přes variabilitu rozměru prohlubní však ve všech případech strukturovaná strana podporuje růst buněk méně než strana s vlákny, základní hypotéza experimentu tedy byla potvrzena.

Materiály snižující buněčnou proliferaci na základě morfologie svého povrchu spojené se sníženou smáčivostí byly již zkoumány, jako příklad lze uvést již zmíněné PCL vlákenné vrstvy, které využívaly konvexních struktur vytvořených pomocí electrosprayingu a plazmové depozice [49]. Materiál vyvinutý v rámci této práce využívá naopak konkávních struktur, vytvořených pomocí Breath-figure self-assembly, což je metoda jednoduchá a v případě nalezení optimálních parametrů aplikovatelná v poměrně velkém měřítku. Minimálně z hlediska jednoduchosti výroby by tak zde prezentovaný materiál mohl být lepší variantou než jiné vyzkoušené postupy.

## 6.7 Zhodnocení degradability materiálu

Během *in vitro* testování bylo pozorováno velmi rychlé zhoršení mechanických vlastností materiálů. U vzorků vystavených kultivačnímu médiu DMEM s myšimi fibroblasty již po uplynutí dvou dnů došlo ke znatelnému zvýšení křehkosti a při pokusu o manipulaci se materiál snadno trhal. Po šesti dnech docházelo u části vzorků k patrnému drolení a manipulace s materiálem bez jeho rozpadu nebyla možná. Z tohoto důvodu také nebylo možné kvantifikovat počet buněk na jednotlivých vzorcích z fluorescenčních snímků – bylo by zapotřebí z každého vzorku pořídit 10 snímků při 20× zvětšení a využít skript softwaru Matlab ke spočítání obarvených buněčných jader na snímcích a z nich určení průměrné hustoty osídlení buňkami na vzorcích. Kvůli pokročilé degradaci se však pro tento úkon nepodařilo odebrat dostatečně velké kusy materiálu.

Degradace vrstev pokrytých vlákny nebyla tak výrazná jako u samostatných nepovlákněných vrstev, obzvláště v případě PCL vláken. To může být způsobeno vyšší celkovou mocností povlákněného materiálu, zdá se však, že PCL vlákna degradují pomaleji než PDX vlákna a fólie. Degradace materiálu je podstatně rychlejší, než bylo očekáváno, uvádí se, že doba degradace PDX a PCL se obvykle pohybuje v řádu měsíců [36, 44]. Degradace však závisí na celé řadě faktorů, kromě prostředí také na tloušťce materiálu. Protože materiál testovaný v rámci této práce sestává z tenké fólie se strukturovaným povrchem a z poměrně řídké vrstvy submikronových vláken a nanovláken, specifický povrch materiálu (poměr plochy povrchu ku objemu) je velmi vysoký, což pravděpodobně přispívá k vysoké rychlosti degradace.

Vzhledem k chování pozorovaném při *in vitro* testech lze u materiálu očekávat vysokou míru biodegradability při aplikaci v živém organismu. Rychlost biodegradability je však nutné před případnými *in vivo* testy důkladně charakterizovat některou z normovaných metod testování biodegradability.

## 7 DISKUSE

### 7.1 Návrh materiálu

Úkolem této diplomové práce bylo navrhnout, připravit a otestovat materiál založený na biodegradabilní polymerní (polyesterové) fólii, který by mohl nalézt uplatnění v oblasti tkáňového inženýrství. Výstupem práce je dvouvrstvý materiál, skládající se z polydioxanonové fólie se strukturou pórů/prohlubní, vytvořenou pomocí Breath-figure self-assembly metody, a vrstvy nanovláken z polydioxanonu nebo polykaprolaktonu, připravené metodou stejnosměrného elektrického zvlákňování.

Fólie v klasickém slova smyslu je velmi tenký a obvykle neprodyšný materiál z polymeru nebo kovu [101]. Materiál této podoby lze jen těžko rozumným způsobem uplatnit v tkáňovém inženýrství, kde je obvykle nutné, aby byl materiál prodyšný, objemný a celkově aby připomínal strukturu mezibuněčné hmoty, alespoň tedy pokud je požadována jeho pozitivní interakce s tkáněmi a buňkami [20–23]. Je ale možné fólii využít jako jednu komponentu vícevrstvého přípravku, nebo využít nějakou metodu úpravy jejího povrchu. Tak lze získat materiál se dvěma stranami, z nichž každá interaguje s živou hmotou v biologickém systému jiným způsobem. Existují medicínské aplikace, které by těchto vlastností mohly využívat, jedním z dosud uspokojivě nevyřešených problémů jsou např. intraperitoneální adheze – nežádoucí přirůstání tkáně k vnitřní straně břišní dutiny nebo k jiným tkáním po operativním zákroku v této oblasti. Komerčně dostupné výrobky spolehlivě bránící intraperitoneální adhezi zatím nejsou dostupné [102], vyvíjené zdravotnické prostředky tohoto typu mívají problém s biodegradabilitou, což znemožňuje jejich aplikaci uvnitř lidského těla [103, 104], nebo využívají látek se spornými účinky na organismus pro dosažení požadovaných vlastností [105]. Materiál navržený v rámci této práce využívá pouze biokompatibilní a biodegradabilní polymery již využívané v medicíně, bez dodatečných modifikací jejich chemické struktury. Rozdílná interakce s tkání je zapříčiněna pouze rozdíly v morfologii materiálu. Tento přípravek má tedy potenciál obejít běžné problémy, se kterými se vědci při vývoji biodegradabilních materiálů pro prevenci tkáňových adhezí potýkají.

Jako surovina pro výrobu fólie byl zvolen polydioxanon. To je biopolymer, ve kterém se opakují etherové a esterové jednotky a jednotlivé monomery jsou spojené esterovými

vazbami, lze ho tedy zařadit mezi polyestery. Polydioxanon byl již od doby, kdy byl poprvé syntetizován, využíván v medicíně, nejprve primárně jako materiál pro výrobu šicích nití a stentů [36, 37], v posledních dvou dekadách však nachází uplatnění i při vývoji moderních biomedicínských prostředků, jako jsou scaffoldy pro tkáňové inženýrství nebo prostředky pro řízenou dopravu a uvolňování léčiv [36, 39, 40]. Mezi výhodné vlastnosti PDX patří vysoká pevnost a relativně dlouhá doba degradace bez vzniku metabolitů ovlivňujících lokální pH. Proto by PDX mohl být vhodným polymerem pro výrobu přípravků které setrvávají po delší dobu v lidském těle, např. právě materiálů pro fortifikaci vnitřních pooperačních ran.

Aby byl povrch jedné ze stran fólie co nejméně adhezivní pro buňky, bylo přistoupeno k jeho modifikaci prostřednictvím self-assembly metody známé jako Breath Figures, díky které byl na fólii vytvořen systém konkávních struktur o průměru v řádu desítek mikrometrů (v podobném rozpětí se pohybují rozměry běžných eukaryotních buněk). Modifikace povrchu materiálů prostřednictvím BFSA se v biomedicínském výzkumu obvykle využívá spíše ke zvýšení buněčné adheze oproti hladkému povrchu, tento efekt však obvykle mívají malé póry o rozměru v řádu jednotek mikrometrů, zatímco větší póry mohou mít účinek opačný. Např. Cheng *et al.* pozorovali zvýšení proliferace fibroblastů 3T3 a Neuro-2A buněk na PLA filmech s póry o rozměru 3-4  $\mu\text{m}$  oproti hladkým filmům, filmy s většími póry (7-8  $\mu\text{m}$ ) však vykazovaly podobnou míru buněčné aktivity jako hladké filmy, v případě Neuro-2A buněk byla po třech dnech kultivace aktivita dokonce nižší oproti hladkému materiálu [106]. Birch *et al.* zjistili, že kultivace krysích osteoblastů na PCL fólii s póry průměru okolo 3-4  $\mu\text{m}$  vede ke zvýšení počtu fokálních adhezí buněk k podkladu a míry produkce mineralizované mezibuněčné hmoty, u větších pórů (10-15  $\mu\text{m}$ ) však množství fokálních adhezí pokleslo, a to i oproti hladkému povrchu [107]. Větší póry obecně mohou vést k „uvěznění“ buněk uvnitř jednotlivých prohlubní, což vede k omezení mezibuněčných interakcí a laterální migrace buněk po povrchu materiálu [108]. Fukuhira *et al.* tohoto efektu využili, když připravili pomocí BFSA polymerní film z PLA s navzájem propojenými póry o průměru okolo 5  $\mu\text{m}$ , u kterého bylo *in vivo* testy na krysách prokázáno, že do určité míry snižoval riziko intraperitoneální adheze [55]. Podobnou strukturu měl materiál vyvinutý Heng *et al.*, připravený z polymeru na bázi tetrafenyletheru, připomínajícího struhengkturu glykogenu, který má potenciál inhibovat růst rakovinných buněk, což bylo dokázáno testy s HeLa buňkami [57]. Ze zmíněných



informací lze vyvodit, že ačkoliv většinou je na BFSA pohlíženo spíš jako na metodu, jak zvýšit buněčnou adhezi k povrchu, při vhodné velikosti a morfologii pórů touto metodou vytvořených (většinou s póry o větší velikosti, než jaké buněčnou adhezi podporují) může materiál sloužit naopak k inhibici buněčné aktivity. Tohoto efektu se pokusila využít i tato práce, jedna strana PDX fólie byla proto opatřena strukturou pórů o velikosti v rozpětí 10-40  $\mu\text{m}$  s využitím metody BFSA.

K podpoření buněčné proliferace na druhé straně materiálu bylo přistoupeno k jeho pokrytí dvěma různými typy nanovláken. Polykaprolaktonová nanovláknina byla zvolena, protože existuje série studií dokazující jejich biokompatibilitu a příznivé účinky při využití jako scaffoldu pro regeneraci tkáně [48, 49, 84, 94]. Druhým typem vláken byla PDX vláknina, jejichž využití v medicíně je také známo [36]. Vhodným nastavením parametrů se podařilo připravit vlákna o podobné distribuci tlouštěk, jaká měla PCL vlákna. Protože se jedná o stejný polymer, z jakého je vyrobena fólie, lze při jejich použití vláken očekávat dobrou adhezi mezi oběma komponentami, a navíc se lze vyvarovat vlivu na lokální pH, který je spojený s degradací PCL vláken [95, 96]. Kromě toho by se jednalo o zajímavou ukázkou toho, že samotná morfologie materiálu může ovlivnit buněčnou interakci a přípravky pro cílené řízení buněčné proliferace tak mohou být vyráběny pouze z jednoho typu polymeru.

## 7.2 Příprava materiálu

K přípravě fólií byl využit polydioxanon rozpuštěný v 2,2,2-trifluorethanolu, v tomto rozpouštědle je totiž polymer dobře rozpustný a zároveň je velmi těkavé, což je pro průběh BFSA důležité. V odborné literatuře nelze dohledat příklad, kdy by byl materiál strukturovaný metodou BFSA připravován z této kombinace polymeru a rozpouštědla. Proto bylo nutné proces otestovat a optimalizovat pouze na základě obecných zákonitostí, kterými se Breath-figure self-assembly řídí a které byly publikovány [54]. Na základě experimentů s různými koncentracemi bylo usouzeno, že 3% (hm.) roztok PDX v TFE je vhodný pro použití pro další experimenty – takto připravené fólie měly uspokojivé mechanické vlastnosti, roztok není příliš viskózní a již při vlhkosti okolo 50 % na něm docházelo k BFSA, ačkoliv pro vhodnou morfologii a velikost pórů bylo nutné později vlhkost zvýšit.

Při další sérii experimentů byly vyzkoušeny různé metody, jak BFSA řídit a dosahovat různé morfologie prohlubní. Vzhledem k nutnosti spolehlivé charakterizace parametrů procesu a opakovatelnosti přípravy se nejvíce osvědčilo využití klimatizované komory, ve které byl průběh BFSA řízen nastavováním různých kombinací teploty a vlhkosti. Využití konstantního proudění vlhkého vzduchu o definovaných parametrech je nejčastější způsob, kterým bývá BFSA prováděna, tyto parametry je však nutné zvolit s ohledem na konkrétní polymer, rozpouštědlo a požadovanou velikost a morfologii pórů. Odpařování rozpouštědla za teploty 23 °C a relativní vlhkosti 55 % vedlo nejčastěji ke vzniku nepravidelně rozmístěných konkávních struktur o průměrné velikosti okolo 30-40  $\mu\text{m}$ , mezi kterými se místy vyskytovaly menší prohlubně o velikosti jednotek  $\mu\text{m}$ . Dle D. Beyense vznikají struktury této podoby ve chvíli, kdy je odpařování rozpouštědla dostatečně pomalé na to, aby došlo ke koalescenci – spojování zkondenzovaných kapiček vody do větších kapek dříve, než dojde k odpaření veškerého rozpouštědla a ztuhnutí materiálu [91]. Při zvýšení vlhkosti na 65 % vznikla pravidelnější struktura pórů o uniformnější velikosti, okolo 20  $\mu\text{m}$ , tedy menší než při 55% vlhkosti. Zvýšení vlhkosti dle [54] vede k urychlení kondenzace vodních kapek a dle jednotnější velikosti, těsnému uspořádání a pravidelnější struktury pórů zde pravděpodobně ke koalescenci nedošlo, nebo jen v omezené míře. Rozdíl v koalescenci je pravděpodobná příčina toho, proč při zvýšení vlhkosti vznikly menší póry, což by jinak mělo být v rozporu s běžně platnými zákonitostmi BFSA. Zdá se, že míra koalescence obecně kolísá mezi jednotlivými vzorky fólií, i při dodržování přesně definovaných podmínek je totiž morfologie a rozměr pórů mezi jednotlivými vzorky někdy odlišná. Příčinou mohou být parametry, které nebyly důkladně zkoumány, například způsob, jakým v použité klimatizační komoře cirkuluje vzduch (průběh BFSA závisí i na velikosti a geometrii toku vlhkého vzduchu nad vzorky [87]). V rámci této práce je však cílem především otestování základní hypotézy o tom, že strukturou pórů vytvořenou BFSA lze inhibovat buněčnou adhezi na jedné straně vícevrstvého materiálu, a protože póry pozorované na všech připravených fóliích dosahovaly stejné nebo větší velikosti jako póry, které dle publikovaných studií mohou omezit adhezi nebo laterální migraci buněk [55, 57, 106, 107, 108], byla dosažená konzistence při přípravě struktury pórů metodou BFSA považována za dostačující a její další optimalizace může být spíše předmětem budoucího výzkumu. Zvládnutí opakovatelné přípravy metodou BFSA je lákavé z toho důvodu, že se jedná o metodu s jednoduchým postupem poměrně

snadno aplikovatelným ve větším měřítku. V kombinaci s poloprůmyslovou metodou elektrického zvlákňování pomocí zařízení Nanospider by tak zde představený materiál mohl být produkován v poměrně velkém množství, což je důležité pro případné komerční využití a výslednou cenu produktu.

K podpoření buněčné proliferace na straně fólie bez struktury pórů byl materiál pokryt vrstvou PCL a PDX nanovláken. Odůvodnění výběru těchto dvou polymerů již bylo diskutováno v Kapitole 7.1. Parametry elektrického zvlákňování PCL vláken byly nastaveny stejně jako ve studii, kterou publikoval Rosendorf *et al.* [48], tím byla získána vlákna o podobné struktuře (vlákna ve zmíněné studii dosahovala průměru  $385 \pm 239$  nm, vlákna připravená v rámci této práce mají průměr  $0,4 \pm 0,3$   $\mu\text{m}$ ). Parametry zvlákňování PDX vycházely z předešlého výzkumu na KNT a byly optimalizovány tak, aby byla získána vlákna o podobném průměru, jaký měly PCL vlákna, konkrétně bylo dosaženo průměrné tloušťky  $0,5 \pm 0,3$   $\mu\text{m}$ .

Důležitý faktor, který ovlivňuje buněčnou adhezi k materiálu je smáčivost povrchu. Je známo, že hydrofilní povrch obvykle vede k lepší buněčné adhezi, než hydrofobní povrch [98]. Některé materiály určené k omezení buněčné adheze této skutečnosti využívají tím, že svou strukturou napodobují notoricky hydrofobní plochy známé z přírody, např. lotosový list [49]. Měření kontaktního úhlu prokázalo, že strana PDX fólie modifikovaná BFSa metodou je hydrofobnější než hladká strana fólie a oba typy nanovláken, což by mělo přispívat k zamýšlenému chování vícevrstvého materiálu.

### **7.3 Vyhodnocení *in vitro* testů**

Test cytotoxicity dle normy ISO 10993:5 ukázal, že žádný z připravených materiálů není toxický. Toxicita nebyla prokázána ani u fólií, ani u nanovláken. Zdá se také, že stáří fólií nemá významný vliv na toxicitu (alespoň ne po několika týdnech od přípravy), lze tedy předpokládat, že v připravených fóliích nezbyvá žádné zbytkové rozpouštědlo, nebo se velmi brzy po přípravě odpaří.

Test buněčné proliferace ukázal, že na nanovlákně straně dvouvrstvého materiálu dochází ke zdatelně větší buněčné proliferaci než na straně s fólií opatřenou konkávními strukturami. Přesné hodnoty počtu buněk na materiálu nebylo možné určit, protože fólie byly po několikadenní kultivaci v buněčném médiu a následnému barvení pro mikroskopii

částečně zdegradované, díky čemuž nebylo možné odebrat z mikrotitrační destičky dostatečně velký vzorek pro softwarovou analýzu počtu buněk. Podařilo se však alespoň určit relativní rozdíly mezi všemi materiály pomocí testu metabolické aktivity CCK-8. Výsledky tohoto testu neukázaly příliš velké rozdíly mezi hladkou (neupravenou) fólií a fólií s konkávními strukturami vytvořenými BFSA (výsledky byly navíc zatíženy poměrně velkou statistickou chybou), na SEM snímcích fólií s konkávními strukturami však byly poměrně často pozorovány buňky zakulaceného tvaru a buňky nebo shluky buněk vyplňující pouze jednu prohlubeň a nepřesahující mimo ní, zatímco na snímcích hladkých fólií byly obvykle pozorovány velmi roztažené buňky (obzvláště po 6 dnech kultivace) u kterých bylo patrné, že nic nebrání jejich laterálnímu růstu a migraci. Použití struktury s konkávními strukturami tedy patrně význam má a je podpořeno i literárními zdroji (Viz Kapitola 7.1), rozdíl mezi hladkou a strukturovanou fólií by však bylo vhodné kvantifikovat důkladněji (větší testovací sada, delší kultivace, kombinace s jinými metodami, např. počítání buněk na snímcích z fluorescenční mikroskopie).

Výsledek naznačuje, že materiál má potenciál sloužit svému zamýšlenému účelu, tedy jako rozhraní podporující růst/hojení tkáně na vnitřní straně, a bránící nežádoucí adhezi jiné tkáně na straně vnější. Některé výzkumy již dokázaly, že systémy pórů/konkávních struktur vytvářené pomocí Breath-figure self-assembly metody mohou inhibovat adhezi a laterální migraci buněk, studie provedená Fukuhirou *et al.* dokonce s určitým úspěchem testovala podobný materiál přímo v roli bariéry bránící intraperitoneální adhezi [55]. Nebyl však nalezen žádný výzkum, který by využíval stejný princip vícevrstvého materiálu, který kromě zabraňování adhezi z vnější strany zároveň podporuje proliferaci ze strany vnitřní, v tom se tedy zdá být tato práce unikátní.

#### **7.4 Potenciální úskalí a směry dalšího výzkumu**

Ačkoliv doba degradace polydioxanonu i polykaprolaktonu bývá uváděna v řádu měsíců, nebo i let [37, 44], při *in vitro* testech došlo již po týdnu kultivace ke znatelnému zhoršení mechanických vlastností vrstev. Bez vnějších zásahů byly vrstvy stále celistvé, při manipulaci však byly velmi křehké a trhaly/lámaly se na malé kusy. Díky tomu mimo jiné nebylo možné odebrat velké kusy materiálu pro počítání narostlých buněk. Je otázkou, jak problematické by toto chování bylo při použití výrobku v živém organismu, kde by požadovaná doba aplikace byla minimálně několik týdnů, než by došlo k zahojení

ošetřeného místa. Degradace materiálu určitě vyžaduje důkladnější prozkoumání, např. prostřednictvím degradačních testů. V případě, že by se ukázalo, že degradace je příliš rychlá, existuje možnost nahradit použité polymery jinými, např. polydioxanon lze teoreticky zaměnit za polyhydroxybutyrát, který se vyznačuje dlouhou dobou degradace [109]. Lze experimentovat také s přípravou silnější fólie (použití většího množství roztoku) a silnější vrstvy vláken.

Dalším faktorem, který nebyl přímo analyzován, je adheze nanovlákněné vrstvy k fólii. Po přípravě dvouvrstvého materiálu bylo patrné, že vlákna na fólii dobře drží, nedocházelo k jejich samovolnému či snadnému odlupování a ani po týdnu kultivace nedošlo k oddělení vlákněné vrstvy od fólie. Minimálně v případě PDX vláken lze očekávat dobrou adhezi, neboť se jedná o ten samý polymer, z jakého je vyrobena fólie, bylo by však vhodné adhezi nějakým způsobem analyzovat, např. pomocí odtrhové zkoušky.

Testy smáčivosti byly prováděny pouze s destilovanou vodou. Tak bylo sice dokázáno, že vnitřní strana materiálu (s nanovláknem) je více hydrofilní než vnější strana, pro aplikaci produktu v lidském organismu by však bylo vhodné smáčivost otestovat s více kapalinami, zejména se simulovanými tělními tekutinami. Není totiž vyloučeno, že v prostředí organismu bude rozdíl ve smáčivosti obou stran menší a jeho zvýšení (např. úpravou parametrů BFSa) by mohlo dále přispět k většímu rozdílu v proliferaci buněk na vnitřní a vnější straně.



## 8 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byl navržen, připraven a otestován dvouvrstvý materiál skládající se z polydioxanonové fólie, jejíž povrch nese systém konkávních struktur připravený pomocí Breath-figure self-assembly metody, a z vláknenné vrstvy PCL nebo PDX připravené elektrickým zvlákňováním. Myšlenkou práce bylo vytvořit materiál, jehož vnitřní a vnější strana mají výrazně odlišnou morfologii, která by vedla k rozdílné míře buněčné proliferace na každé ze stran, a to bez nutnosti materiál chemicky modifikovat např. zavedením nových funkčních skupin. Výsledný materiál by mohl být uplatněn v oblasti medicíny a tkáňového inženýrství jako rozhraní, které podporuje obnovu tkáně na vnitřní straně, ale brání přirůstání tkáně z vnější strany.

Použité polymery byly vybrány, protože díky jejich vlastnostem jsou široce zkoumány a používány v biomedicíně a tkáňovém inženýrství a byly již využity i pro velmi podobné aplikace, jako ta zamýšlená pro tento materiál. Ze stejného důvodu bylo přistoupeno k užití nanovláken jako jedné z vrstev výsledného produktu. (dlouholetá studie, které se účastní TUL ve spolupráci s Lékařskou fakultou UK v Plzni a dalšími pracovišti prokázala výbornou biokompatibilitu PCL nanovláken a využívá těchto a dalších materiálů k vývoji krycích vrstev pro výztuž střevních anastomóz, které by zároveň bránily intra-peritoneální adhezi).

Breath-figure self-assembly je jednoduchá metoda strukturace povrchu využívající přirozeného chování vody nebo jiných kapalin při kondenzaci. Její využití v oblasti tkáňového inženýrství bylo mnohokrát popsáno, obvykle k úpravě materiálu pro zvýšení buněčné adheze, některé studie však naznačují, že při vhodné morfologii a rozměru struktur touto metodou připravených může docházet naopak ke snížení adheze buněk a migrace po jejich povrchu. Proto bylo přistoupeno k využití této metody k přípravě povrchu potlačujícího přirůstání tkáně, který by mohl být alternativou k jiným materiálům vyvíjeným pro stejný účel, které využívají např. napodobování přírodních superhydrofobních mikrostruktur.

Využití Breath-figure self-assembly metody ke strukturizaci vrstev připravených z polydioxanonu za využití trifluoroethanolu jako rozpouštědla není v odborné literatuře popsáno. Jedním z přínosů této práce je tedy prozkoumání chování tohoto jevu při použití polymerního roztoku, jenž pro tyto účely není často využíván. Po sérii experimentů

zaměřených na nalezení optimální koncentrace roztoku a kombinace parametrů (zejména kombinace vlhkosti a teploty) byl navržen postup, jakým lze připravovat tenké PDX fólie s konkávními strukturami o rozměru v řádu 10-40  $\mu\text{m}$ . Opakovatelnost procesu by bylo možné dále vylepšit, je však uspokojivá. Kromě toho byl prozkoumán vliv dalších proměnných, například stáří roztoku, na morfologii výsledných struktur.

Připravené fólie byly následně povlákány za využití zařízení pro stejnosměrné elektrické zvlákňování Nanospider 1WS500U. Ty samé nanovláknenné struktury, které prokázaly v odborných studiích výbornou cytokompatibilitu se tak podařilo nanést na vnitřní stranu materiálu, který má z vnější strany strukturu, jež je pro buněčnou proliferaci mnohem méně přívětivá.

Připravené fólie byly charakterizovány několika metodami – rozměr a trojrozměrná morfologie konkávních struktur, stejně jako vláken, byla určena pomocí skenovací elektronové mikroskopie a optické profilometrie. Také byla změřena tloušťka fólií a vláknenných nanosů a otestována jejich smáčivost, čímž se ukázalo, že strukturovaný povrch fólií je nejvíce hydrofobní, nanovláknena nejvíce hydrofilní a smáčivost neupraveného povrchu fólií leží mezi těmito hodnotami.

Testy cytotoxicity vyvrátily přítomnost rizikových reziduí rozpouštědel a *in vitro* testy buněčné proliferace vedly ke zjištění, že vnitřní (vláknenná) strana materiálu skutečně podporuje buněčnou proliferaci znatelně více než strana vnější, opatřená konkávními strukturami. Práce tak nastínila postup, jakým lze připravit vícevrstvý materiál ovlivňující buněčnou proliferaci pouze na základě své mikrostruktury, přičemž celý materiál může být vyroben z jednoho typu polymeru bez dodatečných chemických úprav.

Pro spolehlivé zhodnocení, zda je možné produkt využít v biomedicíně, by bylo vhodné provést další charakteristiky, mezi které patří měření degradačního profilu či hodnocení smáčivosti a jiného chování v simulovaných tělních tekutinách. V případě neuspokojivých výsledků je možné použité polymery nahradit jinými, změnit tloušťku obou vrstev materiálu či provést Breath-figure self-assembly metodu s jinými parametry, a tak získat povrch fólie s rozdílnou morfologií a vlastnostmi. Ze získaných výsledků lze však usoudit, že základní princip je funkční a při dalším rozvoji této myšlenky by mohly výstupem být zajímavé materiály pro biomedicínu a tkáňové inženýrství, umožňující selektivní řízení buněčné proliferace.

## Seznam použitých zdrojů

- [1] LANGER, R. aj. P. VACANTI, 1993. Tissue Engineering. *Science* [online]. **260**(5110), 920–926. ISSN 0036-8075, 1095-9203 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1126/science.8493529
- [2] PAUL, C. N., 2008. Skin grafting in burns. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*. **20**(7), 199–202. ISSN 1044-7946.
- [3] NORDHAM, K. D. a S. NINOKAWA, 2022. The history of organ transplantation. *Baylor University Medical Center Proceedings* [online]. **35**(1), 124–128. ISSN 0899-8280, 1525-3252 [cit. 06.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1080/08998280.2021.1985889
- [4] PETIT, F., A. B. MINNS, J.-M. DUBERNARD, S. HETTIARATCHY a W. P. A. LEE, 2003. Composite Tissue Allotransplantation and Reconstructive Surgery: First Clinical Applications. *Annals of Surgery* [online]. **237**(1), 19–25. ISSN 0003-4932 [cit. 06.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1097/00000658-200301000-00004
- [5] O'BRIEN, F. J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. **14**(3), 88–95. ISSN 13697021 [cit. 06.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [6] ROGNINI, G., F. M. PETRINI, S. RASPOPOVIC, G. VALLE, G. GRANATA, I. STRAUSS, M. SOLCÀ, J. BELLO-RUIZ, B. HERBELIN, R. MANGE, E. D'ANNA, R. DI IORIO, G. DI PINO, D. ANDREU, D. GUIRAUD, T. STIEGLITZ, P. M. ROSSINI, A. SERINO, S. MICERA a O. BLANKE, 2019. Multisensory bionic limb to achieve prosthesis embodiment and reduce distorted phantom limb perceptions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. **90**(7), 833–836. ISSN 0022-3050, 1468-330X [cit. 12.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp-2018-318570
- [7] BUMBAŠIREVIĆ, M., A. LESIC, T. PALIBRK, D. MILOVANOVIĆ, M. ZOKA, T. KRAVIĆ-STEVOVIĆ a S. RASPOPOVIC, 2020. The current state of bionic limbs from the surgeon's viewpoint. *EFORT Open Reviews* [online]. **5**(2), 65–72. ISSN 2396-7544, 2058-5241 [cit. 12.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1302/2058-5241.5.180038
- [8] VIS, A., M. ARFAEE, H. KHAMBATI, M. S. SLAUGHTER, J. F. GUMMERT, J. T. B. OVERVELDE aj. KLUIN, 2022. The ongoing quest for the first total artificial heart as destination therapy. *Nature Reviews Cardiology* [online]. **19**(12), 813–828. ISSN 1759-5002, 1759-5010 [cit. 12.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1038/s41569-022-00723-8
- [9] VACANTI, C. A., 2006. History of Tissue Engineering and A Glimpse Into Its Future. *Tissue Engineering* [online]. **12**(5), 1137–1142. ISSN 1076-3279, 1557-8690 [cit. 27.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2006.12.1137
- [10] CAO, Y., J. P. VACANTI, K. T. PAIGE, J. UPTON a C. A. VACANTI, 1997. Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear: Plastic & Reconstructive Surgery [online]. **100**(2), 297–302. ISSN 0032-1052 [cit. 25.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1097/00006534-199708000-00001
- [11] VACANTI, C. A., L. J. BONASSAR, M. P. VACANTI a J. SHUFFLEBARGER, 2001. Replacement of an Avulsed Phalanx with Tissue-Engineered Bone. *New England Journal of Medicine* [online]. **344**(20), 1511–1514. ISSN 0028-4793, 1533-4406 [cit. 25.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM200105173442004
- [12] AKTER, F., 2016. Principles of Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering Made Easy* [online]. Elsevier, s. 3–16. ISBN 978-0-12-805361-4 [cit. 17.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3

- [13] GORECKA, J., V. KOSTIUK, A. FEREDDOONI, L. GONZALEZ, J. LUO, B. DASH, T. ISAJI, S. ONO, S. LIU, S. R. LEE, J. XU, J. LIU, R. TANIGUCHI, B. YASTULA, H. C. HSIA, Y. QYANG a A. DARDIK, 2019. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. 10(1), 87. ISSN 1757-6512 [cit. 19.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1186/s13287-019-1185-1
- [14] NISHIKAWA, S., R. A. GOLDSTEIN a C. R. NIERRAS, 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 9(9), 725–729. ISSN 1471-0072, 1471-0080 [cit. 19.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2466
- [15] MORA, C., M. SERZANTI, A. CONSIGLIO, M. MEMO a P. DELL'ERA, 2017. Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 33(4), 351–360. ISSN 0742-2091, 1573-6822 [cit. 19.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-017-9384-y
- [16] QIN, H., A. ZHAO a X. FU, 2017. Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 74(19), 3553–3575. ISSN 1420-682X, 1420-9071 [cit. 19.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-017-2586-x
- [17] PISKIN, E., 1995. Biodegradable polymers as biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 6(9), 775–795. ISSN 0920-5063, 1568-5624 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1163/156856295X00175
- [18] WILLIAMS, D. F., 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 29(20), 2941–2953. ISSN 01429612 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- [19] LYONS, F. G., A. A. AL-MUNAJJED, S. M. KIERAN, M. E. TONER, C. M. MURPHY, G. P. DUFFY a F. J. O'BRIEN, 2010. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials* [online]. 31(35), 9232–9243. ISSN 01429612 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.056
- [20] BRAUKER, J. H., V. E. CARR-BRENDEL, L. A. MARTINSON, J. CRUDELE, W. D. JOHNSTON a R. C. JOHNSON, 1995. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 29(12), 1517–1524. ISSN 0021-9304, 1097-4636 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.820291208
- [21] YANG, S., K.-F. LEONG, Z. DU a C.-K. CHUA, 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* [online]. 7(6), 679–689. ISSN 1076-3279, 1557-8690 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1089/107632701753337645
- [22] WHANG, K., K.E. HEALY, D.R. ELENZ, E.K. NAM, D.C. TSAI, C.H. THOMAS, G.W. NUBER, F.H. GLORIEUX, R. TRAVERS a S.M. SPRAGUE, 1999. Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture. *Tissue Engineering* [online]. 5(1), 35–51. ISSN 1076-3279, 1557-8690 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1089/ten.1999.5.35
- [23] YANNAS, I. V., E. LEE, D. P. ORGILL, E. M. SKRABUT a G. F. MURPHY, 1989. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 86(3), 933–937. ISSN 0027-8424, 1091-6490 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.86.3.933
- [24] DHANDAYUTHAPANI, B., Y. YOSHIDA, T. MAEKAWA a D. S. KUMAR, 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2011, 1–19. ISSN 1687-9422, 1687-9430 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1155/2011/290602

- [25] NAM, J., Y. HUANG, S. AGARWAL a. LANNUTTI, 2008. Materials selection and residual solvent retention in biodegradable electrospun fibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 107(3), 1547–1554. ISSN 00218995, 10974628 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/app.27063
- [26] IGE, O. O., L. E. UMORU a S. ARIBO, 2012. Natural Products: A Minefield of Biomaterials. *ISRN Materials Science* [online]. 2012, 1–20. ISSN 2090-6099 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.5402/2012/983062
- [27] NAIR, L. S. a C. T. LAURENCIN, 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online]. 32(8–9), 762–798. ISSN 00796700 [cit. 31.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- [28] IKADA, Y., 2006. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 3(10), 589–601. ISSN 1742-5689, 1742-5662 [cit. 31.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2006.0124
- [29] ASGHARI, F., M. SAMIEI, K. ADIBKIA, A. AKBARZADEH a S. DAVARAN, 2017. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 45(2), 185–192. ISSN 2169-1401, 2169-141X [cit. 31.03.2023]. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2016.1146731
- [30] NOROTTE, C., F. S. MARGA, L. E. NIKLASON a G. FORGACS, 2009. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* [online]. 30(30), 5910–5917. ISSN 01429612 [cit. 31.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.034
- [31] LEE, K., E. A. SILVA a D. J. MOONEY, 2011. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 8(55), 153–170. ISSN 1742-5689, 1742-5662 [cit. 26.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2010.0223
- [32] VASITA, R. a D. S. KATTI, 2006. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Review of Medical Devices* [online]. 3(1), 29–47. ISSN 1743-4440, 1745-2422 [cit. 26.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1586/17434440.3.1.29
- [33] MAHADIK, B. P., N. A.K. BHARADWAJ, R. H. EWOLDT a . A.C. HARLEY, 2017. Regulating dynamic signaling between hematopoietic stem cells and niche cells via a hydrogel matrix. *Biomaterials* [online]. 125, 54–64. ISSN 01429612 [cit. 26.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2017.02.013
- [34] CHOI, J. S. a B. HARLEY, 2012. The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* [online]. 33(18), 4460–4468. ISSN 01429612 [cit. 26.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.010
- [35] MARTIN, Y. a P. VERMETTE, 2005. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* [online]. 26(35), 7481–7503. ISSN 01429612 [cit. 26.03.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.057
- [36] BOLAND, E. D., B. D. COLEMAN, C. P. BARNES, D. G. SIMPSON, G. E. WNEK a G. L. BOWLIN, 2005. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 1(1), 115–123. ISSN 17427061 [cit. 22.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2004.09.003



- [37] M. A. DE GREGORIO, E. CRIADO, J. A. GUIROLA, E. ALVAREZ-ARRANZ, M. PÉREZ-LAFUENTE, M. BARRUFET, M. D. FERRER-PUCHOL, S. LOPEZ-MINGUEZ, J. URBANO, C. LANCIEGO, A. AGUINAGA, A. CAPEL, M. D. PONCE-DORREGO a A. GREGORIO, 2020. Absorbable stents for treatment of benign biliary strictures: long-term follow-up in the prospective Spanish registry. *European Radiology* [online]. 30(8), 4486–4495. ISSN 0938-7994, 1432-1084 [cit. 02.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1007/s00330-020-06797-7
- [38] LOSKOT, J., D. JEZBERA, Z. O. ZMRHALOVÁ, M. NALEZINKOVÁ, D. ALFERI, K. LELKES, P. VODA, R. ANDRÝS, A. M. FUČÍKOVÁ, T. HOSSZÚ a A. BEZROUK, 2022. A Complex In Vitro Degradation Study on Polydioxanone Biliary Stents during a Clinically Relevant Period with the Focus on Raman Spectroscopy Validation. *Polymers* [online]. 14(5), 938. ISSN 2073-4360 [cit. 02.04.2023]. Dostupné z: doi:10.3390/polym14050938
- [39] LI, M.-X., R.-X. ZHUO a F.-Q. QU, 2003. Study on the preparation of novel functional poly(dioxanone) and for the controlled release of protein. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 55(2), 185–195. ISSN 13815148 [cit. 02.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/S1381-5148(02)00246-8
- [40] LI, F., J. FENG a R. ZHUO, 2006. Synthesis and characterization of novel biodegradable poly(p-dioxanone-co-ethyl ethylene phosphate)s. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 102(6), 5507–5511. ISSN 0021-8995, 1097-4628 [cit. 02.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/app.23966
- [41] HUANG, Y.-T., W.-C. WANG, C.-P. HSU, W.-Y. LU, W.-J. CHUANG, M. Y. CHIANG, Y.-C. LAI a H.-Y. CHEN, 2016. The ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone and l-lactide using aluminum complexes bearing benzothiazole ligands as catalysts. *Polymer Chemistry* [online]. 7(26), 4367–4377. ISSN 1759-9954, 1759-9962 [cit. 02.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1039/C6PY00569A
- [42] MALIKMAMMADOV, E., T. E. TANIR, A. KIZILTAY, V. HASIRCI a N. HASIRCI, 2018. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 29(7–9), 863–893. ISSN 0920-5063, 1568-5624 [cit. 22.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2017.1394711
- [43] MCKEEN, L. W., 2017. Environmentally Friendly Polymers. In: *Permeability Properties of Plastics and Elastomers* [online]. Elsevier, s. 305–323 [cit. 22.02.2023]. ISBN 978-0-323-50859-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-50859-9.00013-0
- [44] WOODRUFF, M. A. a D. W. HUTMACHER, 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online]. 35(10), 1217–1256. ISSN 00796700 [cit. 22.02.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002
- [45] RESEARCH TRIANGLE INSTITUTE, 1985. Capronor. Hypotenuse. 2–5. PMID: 12340513.
- [46] CHU, C. C., 2013. Materials for absorbable and nonabsorbable surgical sutures. In: *Biotextiles as Medical Implants*. Elsevier, s. 275–334. ISBN 978-1-84569-439-5 [cit. 04.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1533/9780857095602.2.275
- [47] Synbiosys - Innocore Pharma [online]. 2011. Innocore Pharmaceuticals. [cit. 04.04.2023]. Dostupné z: <https://www.innocorepharma.com/nl/Synbiosys>
- [48] ROSENDORF, J., M. KLICOVA, L. CERVENKOVA, J. HORAKOVA, A. K LAPSTOVA, P. HOSEK, R. PALEK, J. SEVCIK, R. POLAK, V. TRESKA, J. CHVOJKA a V. LISKA, 2021. Reinforcement of Colonic Anastomosis with Improved Ultrafine Nanofibrous Patch: Experiment on Pig. *Biomedicines* [online]. 9(2), 102. ISSN 2227-9059 [cit. 04.04.2023]. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9020102

- [49] KLICOVA, M., Z. OULEHLOVA, A. Klapstova, M. HEJDA, M. KREJCIK, O. NOVAK, J. MULLE-ROVA, J. ERBEN, J. ROSENDORF, R. PALEK, V. LISKA, A. FUCIKOVA, J. CHVOJKA, I. ZVERCOVA aj. HO-RAKOVA, 2022. Biomimetic hierarchical nanofibrous surfaces inspired by superhydrophobic lotus leaf structure for preventing tissue adhesions. *Materials & Design* [online]. 217, 110661. ISSN 02641275 [cit. 04.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2022.110661
- [50] WHITESIDES, G. M. a B. GRZYBOWSKI, 2002. Self-Assembly at All Scales. *Science* [online]. 295(5564), 2418–2421. ISSN 0036-8075, 1095-9203 [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1126/science.1070821
- [51] ZHANG, A., H. BAI a L. LI, 2015. Breath Figure: A Nature-Inspired Preparation Method for Ordered Porous Films. *Chemical Reviews* [online]. 115(18), 9801–9868. ISSN 0009-2665, 1520-6890 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00069
- [52] BEYSENS, D., 1995. The formation of dew. *Atmospheric Research* [online]. 39(1–3), 215–237. ISSN 01698095 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/0169-8095(95)00015-J
- [53] WIDAWSKI, G., M. RAWISO a B. FRANÇOIS, 1994. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films. *Nature* [online]. 369(6479), 387–389. ISSN 0028-0836, 1476-4687 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1038/369387a0
- [54] MUÑOZ-BONILLA, A., M. FERNÁNDEZ-GARCÍA a J. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, 2014. Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach. *Progress in Polymer Science* [online]. 39(3), 510–554. ISSN 00796700 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.08.006
- [55] FUKUHIRA, Y., M. ITO, H. KANEKO, Y. SUMI, M. TANAKA, S. YAMAMOTO a M. SHIMOMURA, 2008. Prevention of postoperative adhesions by a novel honeycomb-patterned poly(lactide) film in a rat experimental model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 86B(2), 353–359. ISSN 15524973, 15524981 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31026
- [56] TANAKA, M., K. NISHIKAWA, H. OKUBO, H. KAMACHI, T. KAWAI, M. MATSUSHITA, S. TODO a M. SHIMOMURA, 2006. Control of hepatocyte adhesion and function on self-organized honeycomb-patterned polymer film. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 284–285, 464–469. ISSN 09277757 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2005.11.098
- [57] HENG, L., R. HU, S. CHEN, M. LI, L. JIANG a B. Z. TANG, 2013. Ordered Honeycomb Structural Interfaces for Anticancer Cells Growth. *Langmuir* [online]. 29(48), 14947–14953. ISSN 0743-7463, 1520-5827 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/la403720s
- [58] MANABE, K., S. NISHIZAWA a S. SHIRATORI, 2013. Porous Surface Structure Fabricated by Breath Figures that Suppresses *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 5(22), 11900–11905. ISSN 1944-8244, 1944-8252 [cit. 19.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/am4035762
- [59] GARG, K. a G. L. BOWLIN, 2011. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* [online]. 5(1), 013403. ISSN 1932-1058 [cit. 12.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1063/1.3567097
- [60] BHARDWAJ, N. a S. C. KUNDU, 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. 28(3), 325–347. ISSN 07349750 [cit. 12.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

- [61] YALCINKAYA, F., 2019. Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 12(8), 5162–5172. ISSN 18785352 [cit. 12.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2016.12.012
- [62] CHENG, H., Y. HUANG, H. YUE a Y. FAN, 2021. Electrical Stimulation Promotes Stem Cell Neural Differentiation in Tissue Engineering. *Stem Cells International* [online]. 2021, 1–14. ISSN 1687-9678, 1687-966X [cit. 27.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1155/2021/6697574
- [63] HUMPOLICEK, P., V. KASPARKOVA, P. SAHA a J. STEJSKAL, 2012. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. 162(7–8), 722–727. ISSN 03796779 [cit. 08.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2012.02.024
- [64] RAMANAVICIENE, A., A. KAUSAITE, S. TAUTKUS a A. RAMANAVICIUS, 2010. Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 59(2), 311–315. ISSN 0022-3573, 2042-7158 [cit. 08.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1211/jpp.59.2.0017
- [65] LIU, L., P. LI, G. ZHOU, M. WANG, X. JIA, M. LIU, X. NIU, W. SONG, H. LIU a Y. FAN, 2013. Increased Proliferation and Differentiation of Pre-Osteoblasts MC3T3-E1 Cells on Nanostructured Polypyrrole Membrane Under Combined Electrical and Mechanical Stimulation. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 9(9), 1532–1539. ISSN 15507033 [cit. 08.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2013.1650
- [66] MIN, Y., Y. LIU, Y. POOJARI, J.-C. WU, B. E. HILDRETH III, T. J. ROSOL a A. J. EPSTEIN, 2014. Self-doped polyaniline-based interdigitated electrodes for electrical stimulation of osteoblast cell lines. *Synthetic Metals* [online]. 198, 308–313. ISSN 03796779 [cit. 08.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2014.10.035
- [67] SENGUPTA, P. a B. L. V. PRASAD, 2018. Surface Modification of Polymers for Tissue Engineering Applications: Arginine Acts as a Sticky Protein Equivalent for Viable Cell Accommodation. *ACS Omega* [online]. 3(4), 4242–4251. ISSN 2470-1343, 2470-1343 [cit. 10.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.8b00215
- [68] HAWTHORNE, A. C., S. P. XAVIER, R. OKAMOTO, S. L. SALVADOR, A. A. ANTUNES a L. A. SALATA, 2013. Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. *Clinical Oral Implants Research* [online]. 24(10), 1164–1172. ISSN 09057161 [cit. 10.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02528.x
- [69] BASSI, A., V. BIZELLI, T. FRANCA, A. FERREIRA, J. PEREIRA, H. AL-SHARANI, F. LUCAS a L. FAVERANI, 2021. Bone Regeneration Assessment of Polycaprolactone Membrane on Critical-Size Defects in Rat Calvaria. *Membranes* [online]. 11(2), 124. ISSN 2077-0375 [cit. 09.04.2023]. Dostupné z: doi:10.3390/membranes11020124
- [70] BASSI, A., V. BIZELLI, L. BRASIL, J. PEREIRA, H. AL-SHARANI, G. MOMESSO, L. FAVERANI a F. LUCAS, 2020. Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property? *Membranes* [online]. 10(9), 230. ISSN 2077-0375 [cit. 10.04.2023]. Dostupné z: doi:10.3390/membranes10090230
- [71] Cuticell® Epigraft [online]. 2018. Medisist Surgicals. [cit. 08.04.2023]. Dostupné z: <https://medisistsurgicals.com/product/cuticell-epigraft/>
- [72] FANTI, P. A., E. DIKA, S. VACCARI, C. MISCIALI, A. ISMAILI, A. BARISANI a A. PATRIZI, 2014. Repair of the donor areas defects after split-thickness skin grafts utilizing an advanced epithelialization dressing. *Journal of Dermatological Treatment* [online]. 25(5), 434–437. ISSN 0954-6634, 1471-1753 [cit. 08.04.2023]. Dostupné z: doi:10.3109/09546634.2012.757286

- [73] SCHNEIDER, S., D. GRUNER, A. RICHTER a P. LOSKILL, 2021. Membrane integration into PDMS-free microfluidic platforms for organ-on-chip and analytical chemistry applications. *Lab on a Chip* [online]. 21(10), 1866–1885. ISSN 1473-0197, 1473-0189 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1039/D1LC00188D
- [74] WU, Q., J. LIU, X. WANG, L. FENG, J. WU, X. ZHU, W. WEN a X. GONG, 2020. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. 19(1), 9. ISSN 1475-925X [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1186/s12938-020-0752-0
- [75] HO, C.-T., R.-Z. LIN, R.-J. CHEN, C.-K. CHIN, S.-E. GONG, H.-Y. CHANG, H.-L. PENG, L. HSU, T.-R. YEOW, S.-F. CHANG a C.-H. LIU, 2013. Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue. *Lab on a Chip* [online]. 13(18), 3578. ISSN 1473-0197, 1473-0189 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1039/c3lc50402f
- [76] HUH, D., B. D. MATTHEWS, A. MAMMOTO, M. MONTOYA-ZAVALA, H. Y. HSIN a D. E. INGBER, 2010. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science* [online]. 328(5986), 1662–1668. ISSN 0036-8075, 1095-9203 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1126/science.1188302
- [77] NOVAK, R., M. DIDIER, E. CALAMARI, C. F. NG, Y. CHOE, S. L. CLAUSON, B. A. NESTOR, J. PUERTA, R. FLEMING, S. J. FIROOZINEZHAD a D. E. INGBER, 2018. Scalable Fabrication of Stretchable, Dual Channel, Microfluidic Organ Chips. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (140), 58151. ISSN 1940-087X [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.3791/58151
- [78] HEGDE, M., R. JINDAL, A. BHUSHAN, S. S. BALE, W. J. MCCARTY, I. GOLBERG, O. B. USTA a M. L. YARMUSH, 2014. Dynamic interplay of flow and collagen stabilizes primary hepatocytes culture in a microfluidic platform. *Lab Chip* [online]. 14(12), 2033–2039. ISSN 1473-0197, 1473-0189 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC00071D
- [79] KANE, B. J., M. J. ZINNER, M. L. YARMUSH a M. TONER, 2006. Liver-Specific Functional Studies in a Microfluidic Array of Primary Mammalian Hepatocytes. *Analytical Chemistry* [online]. 78(13), 4291–4298. ISSN 0003-2700, 1520-6882 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/ac051856v
- [80] SCHNEIDER, O., L. ZEIFANG, S. FUCHS, C. SAILER a P. LOSKILL, 2019. User-Friendly and Parallelized Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microtissues in a Centrifugal Heart-on-a-Chip. *Tissue Engineering Part A* [online]. 25(9–10), 786–798. ISSN 1937-3341, 1937-335X [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2019.0002
- [81] METZ, S., C. TRAUTMANN, A. BERTSCH a P. RENAUD, 2004. Polyimide microfluidic devices with integrated nanoporous filtration areas manufactured by micromachining and ion track technology. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 14(3), 324–331. ISSN 0960-1317, 1361-6439 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/14/3/002
- [82] STUCKI, A. O., J. D. STUCKI, S. R. R. HALL, M. FELDER, Y. MERMOUD, R. A. SCHMID, T. GEISER a O. T. GUENAT, 2015. A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab on a Chip* [online]. 15(5), 1302–1310. ISSN 1473-0197, 1473-0189 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC01252F
- [83] BUNYARATAVEJ, P. a H.-L. WANG, 2001. Collagen Membranes: A Review. *Journal of Periodontology* [online]. 72(2), 215–229. ISSN 0022-3492, 1943-3670 [cit. 06.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1902/jop.2001.72.2.215

- [84] ROSENDORF, J., M. KLICOVA, L. CERVENKOVA, R. PALEK, J. HORAKOVA, A. K LAPSTOVA, P. HOSEK, V. MOULISOVA, L. BEDNAR, V. TEGL, O. BRZON, Z. TONAR, V. TRESKA, D. LUKAS a V. LISKA, 2021. Double-layered Nanofibrous Patch for Prevention of Anastomotic Leakage and Peritoneal Adhesions, Experimental Study. In Vivo [online]. 35(2), 731–741. ISSN 0258-851X, 1791-7549 [cit. 04.04.2023]. Dostupné z: doi:10.21873/invivo.12314
- [85] STENZEL, M. H., C. BARNER-KOWOLLIK a T. P. DAVIS, 2006. Formation of honeycomb-structured, porous films via breath figures with different polymer architectures. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry [online]. 44(8), 2363–2375. ISSN 0887-624X, 1099-0518 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/pola.21334
- [86] GOVOR, L. V., I. A. BASHMAKOV, R. KIEBOOMS, V. DYAKONOV a J. PARISI, 2001. Self-Organized Networks Based on Conjugated Polymers. Advanced Materials [online]. 13(8), 588–591. ISSN 0935-9648, 1521-4095 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/1521-4095(200104)13:8<588::AID-ADMA588>3.0.CO;2-C
- [87] FRITTER, D., C. M. KNOBLER a D. A. BEYSENS, 1991. Experiments and simulation of the growth of droplets on a surface (breath figures). Physical Review A [online]. 43(6), 2858–2869. ISSN 1050-2947, 1094-1622 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevA.43.2858
- [88] BILLON, L., M. MANGUIAN, V. PELLERIN, M. JOUBERT, O. ETERRADOSSI a H. GARAY, 2009. Tailoring Highly Ordered Honeycomb Films Based on Ionomer Macromolecules by the Bottom-Up Approach. Macromolecules [online]. 42(1), 345–356. ISSN 0024-9297, 1520-5835 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/ma8020568
- [89] CONNALL, L. A., P. A. GURR, G. G. QIAO a D. H. SOLOMON, 2005. From well defined star-microgels to highly ordered honeycomb films. Journal of Materials Chemistry [online]. 10.1039/b414421j. ISSN 0959-9428, 1364-5501 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1039/b414421j
- [90] EJIMA, H., T. IWATA a N. YOSHIE, 2008. Morphology-Retaining Carbonization of Honeycomb-Patterned Hyperbranched Poly(phenylene vinylene) Film. Macromolecules [online]. 41(24), 9846–9848. ISSN 0024-9297, 1520-5835 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/ma8017348
- [91] BEYSENS, D., 2006. Dew nucleation and growth. Comptes Rendus Physique [online]. 7(9–10), 1082–1100. ISSN 16310705 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.crhy.2006.10.020
- [92] MARUYAMA, N., O. KARTHAUS, K. IJIRO, M. SHIMOMURA, T. KOITO, S. NISHIMURA, T. SAWADAISHI, N. NISHI a S. TOKURA, 1998. Mesoscopic pattern formation of nanostructured polymer assemblies. Supramolecular Science [online]. 5(3–4), 331–336. ISSN 09685677 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-5677(98)00027-3
- [93] ZHANG, R., J. WANG, M. WANG a Y. HE, 2012. Fabrication of honeycomb polyvinyl butyral film under humidity provided by super saturated salt solutions. Journal of Applied Polymer Science [online]. 124(1), 495–500. ISSN 00218995 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/app.34795
- [94] ROSENDORF, J., J. HORAKOVA, M. KLICOVA, R. PALEK, L. CERVENKOVA, T. KURAL, P. HOSEK, T. KRIZ, V. TEGL, V. MOULISOVA, Z. TONAR, V. TRESKA, D. LUKAS a V. LISKA, 2020. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. Scientific Reports [online]. 10(1), 1134. ISSN 2045-2322 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-58113-4
- [95] GOONOO, N., R. JEETAH, A. BHAW-LUXIMON a D. JHURRY, 2015. Polydioxanone-based biomaterials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics [online]. 97, 371–391. ISSN 09396411 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.024



- [96] CAN, E., G. UDENIR, A. I. KANNECI, G. KOSE a S. BUCAK, 2011. Investigation of PLLA/PCL Blends and Paclitaxel Release Profiles. *AAPS PharmSciTech* [online]. 12(4), 1442–1453. ISSN 1530-9932 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-011-9714-y
- [97] ZHAO, T. a L. JIANG, 2018. Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 161, 324–330. ISSN 09277765 [cit. 02.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.056
- [98] ZAN, F., Q. WEI, L. FANG, M. XIAN, Y. KE a G. WU, 2020. Role of Stiffness versus Wettability in Regulating Cell Behaviors on Polymeric Surfaces. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 6(2), 912–922. ISSN 2373-9878, 2373-9878 [cit. 13.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1021/acsbomaterials.9b01430
- [99] KWOK, D. Y. a A. W. NEUMANN, 2000. Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 161(1), 31–48. ISSN 09277757 [cit. 02.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/S0927-7757(99)00323-4
- [100] ČSN EN ISO 10993-5. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010. Třídící znak 855220.
- [101] PETRÁČKOVÁ, V., J. KRAUS, A. ERHART a M. ŠTĚPÁNEK, 1997. *Akademický slovník cizích slov*. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-0607-3.
- [102] KO, J. E., Y.-G. KO, W. I. KIM, O. K. KWON a O. H. KWON, 2017. Nanofiber mats composed of a chitosan-poly(d, l-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene oxide) blend as a postoperative anti-adhesion agent: Chitosan-PLGA-PEO Blend Nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 105(7), 1906–1915. ISSN 15524973 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33726
- [103] Klapstová, A., J. Horáková, M. Tunak, A. Shynkarenko, J. Erben, J. Hlavata, P. Bulir aj. Chvojka, 2021. A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as a glaucoma drainage implant. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 119, 111637. ISSN 09284931 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111637
- [104] LLADÓ, A., E. SOLOGAISTUA, J. GUIMERÁ a M. MARÍN, 1999. Expanded polytetrafluoroethylene membrane for the prevention of peridural fibrosis after spinal surgery: a clinical study. *European Spine Journal* [online]. 8(2), 144–150. ISSN 0940-6719, 1432-0932 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1007/s005860050145
- [105] PARK, H., S. BAEK, H. KANG a D. LEE, 2020. Biomaterials to Prevent Post-Operative Adhesion. *Materials* [online]. 13(14), 3056. ISSN 1996-1944 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.3390/ma13143056
- [106] CHENG, K.-Y., C.-H. CHANG, Y.-W. YANG, G.-C. LIAO, C.-T. LIU a J.-S. WU, 2017. Enhancement of cell growth on honeycomb-structured polylactide surface using atmospheric-pressure plasma jet modification. *Applied Surface Science* [online]. 394, 534–542. ISSN 01694332 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2016.10.093
- [107] BIRCH, M. A., M. TANAKA, G. KIRMIZIDIS, S. YAMAMOTO a M. SHIMOMURA, 2013. Microporous “Honeycomb” Films Support Enhanced Bone Formation In Vitro. *Tissue Engineering Part A* [online]. 19(17–18), 2087–2096. ISSN 1937-3341, 1937-335X [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2012.0729

[108] CALEJO, M. T., T. ILMARINEN, H. SKOTTMAN a M. KELLOMÄKI, 2018. Breath figures in tissue engineering and drug delivery: State-of-the-art and future perspectives. *Acta Biomaterialia* [online]. 66, 44–66. ISSN 17427061 [cit. 14.05.2023]. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2017.11.043

[109] SULTANA, N. a M. WANG, 2008. Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 19(7), 2555–2561. ISSN 0957-4530, 1573-4838 [cit. 04.04.2023]. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-007-3214-3

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Reakční schéma výroby polydioxanonu (vytvořeno v ACD ChemSketch 2022.1.2 na základě zdroje [36])	strana 25
Obrázek 2: Schéma polymerizační reakce používané k výrobě PCL (vytvořeno v ACD ChemSketch 2022.1.2 na základě zdroje [41])	strana 27
Obrázek 3: Princip Breath-figure self-assembly metody (vytvořeno v Affinity Designer 1.10 na základě zdroje [54])	strana 30
Obrázek 4: Schéma aparatury pro elektrické zvlákňování z jehly (vytvořeno v Affinity Designer 1.10)	strana 32
Obrázek 5: Schéma zařízení Nanospider (vytvořeno v Affinity Designer 1.10)	strana 33
Obrázek 6: Diagram experimentálního výzkumu provedeného v praktické části (vytvořeno v Affinity Designer 1.10)	strana 41
Obrázek 7: Fólie připravené z roztoků PDX různých koncentrací (fotografie)	strana 43
Obrázek 8: SEM snímky předních stran fólií připravených z různých koncentrací roztoku PDX	strana 44
Obrázek 9: Podoba zadní strany fólie (shodná pro všechny připravené vzorky)	strana 45
Obrázek 10: SEM snímky vzorku 1 (sklíčko ochlazené na 0 °C, ošetřeno proudem páry, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca t = 25 °C, RH = 85 %)	strana 48
Obrázek 11: SEM snímky vzorku 2 (sklíčko ochlazené na 0 °C, ošetřeno proudem páry, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca t = 25 °C, RH = 85 %)	strana 48
Obrázek 12: SEM snímky vzorku M (sklíčko ochlazené na 0 °C, odpar rozpouštědla v prostředí laboratoře za podmínek cca t = 23,2 °C, RH = 48 %)	strana 49
Obrázek 13: SEM snímky vzorku A1 (sklíčko ochlazené na 0 °C, odpar rozpouštědla v prostředí laboratoře za podmínek cca t = 22 °C, RH = 51 %)	strana 49
Obrázek 14: SEM snímky vzorku A2 (sklíčko o pokojové teplotě, odpar rozpouštědla v prostředí laboratoře za podmínek cca t = 22 °C, RH = 51 %).	strana 50
Obrázek 15: SEM snímky vzorku B (Sklíčko o pokojové teplotě, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca t = 27 °C, RH = 72 %)	strana 50

Obrázek 16: SEM snímky vzorku C (sklíčko ochlazené na 0 °C, odpar rozpouštědla v komoře Nanospideru za podmínek cca t = 27 °C, RH = 72 %)	strana 51
Obrázek 17: SEM snímky vzorku č. 1 z experimentu v klimatizované komoře č. 1 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky blízko sebe)	strana 55
Obrázek 18: SEM snímky vzorku č. 2 z experimentu v klimatizované komoře č. 1 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky blízko sebe)	strana 55
Obrázek 19: SEM snímky vzorku č. 3 z experimentu v klimatizované komoře č. 1 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky blízko sebe)	strana 56
Obrázek 20: SEM snímky vzorku č. 1 z experimentu v klimatizované komoře č. 2 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky s rozestupy 15 cm)	strana 56
Obrázek 21: SEM snímky vzorku č. 2 z experimentu v klimatizované komoře č. 2 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky s rozestupy 15 cm)	strana 57
Obrázek 22: SEM snímky vzorku č. 3 z experimentu v klimatizované komoře č. 2 (teplota 23 °C, vlhkost 55 %, vzorky s rozestupy 15 cm)	strana 57
Obrázek 23: SEM snímky vzorku č. 1 z experimentu v klimatizované komoře č. 3 (teplota 23 °C, vlhkost 65 %, vzorky s rozestupy 15 cm)	strana 58
Obrázek 24: SEM snímky vzorku č. 2 z experimentu v klimatizované komoře č. 3 (teplota 23 °C, vlhkost 65 %, vzorky s rozestupy 15 cm)	strana 58
Obrázek 25: Schéma optimalizovaného postupu pro přípravu strukturovaných PDX fólií (vytvořeno v Affinity Designer 1.10)	strana 60
Obrázek 26: Porovnání morfologie fólie připravené z 24 h starého roztoku a fólie připravené ze 4 dny starého roztoku	strana 61
Obrázek 27: SEM snímky samostatných PDX nanovláken zvlákněných na spunbond	strana 64
Obrázek 28: SEM snímky PDX nanovláken zvlákněných na hladkou stranu PDX fólie	strana 64
Obrázek 29: SEM snímky PCL nanovláken zvlákněných na spunbond	strana 65
Obrázek 30: SEM snímky PCL nanovláken zvlákněných na hladkou stranu PDX fólie	strana 65
Obrázek 31: Výsledek analýzy prvního vzorku (fólie s většími prohlubněmi)	strana 67
Obrázek 32: Výsledek analýzy druhého vzorku (fólie s menšími prohlubněmi)	strana 68
Obrázek 33: Analyzovaný SEM snímek fólie s většími prohlubněmi a histogram vypočtených průměrů	strana 70
Obrázek 34: Analyzovaný SEM snímek fólie s menšími prohlubněmi a histogram vypočtených průměrů	strana 71
Obrázek 35: Analyzovaný SEM snímek PCL vláken a histogram naměřených průměrů vláken	strana 71
Obrázek 36: Analyzovaný SEM snímek PDX vláken a histogram naměřených průměrů vláken	strana 72
Obrázek 37: Buněčná proliferace na strukturovaných stranách fólií, po 2 dnech kultivace	strana 81

Obrázek 38: Buněčná proliferace na strukturovaných stranách fólií, po 6 dnech kultivace	strana 82
Obrázek 39: Buněčná proliferace na hladkých stranách fólií	strana 83
Obrázek 40: Buněčná proliferace na stranách fólií povlákňených PDX vlákny	strana 84
Obrázek 41: Buněčná proliferace na stranách fólií povlákňených PCL vlákny	strana 85
Obrázek 42: Buněčná proliferace na samostatných PDX a PCL vláknech	strana 86
Obrázek 43: První část snímků z fluorescenční mikroskopie	strana 87
Obrázek 44: Druhá část snímků z fluorescenční mikroskopie	strana 88
Obrázek 45: Třetí část snímků z fluorescenční mikroskopie	strana 89

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled vybraných polymerních fólií a jejich aplikací v biomedicině	strana 38
Tabulka 2: Parametry použité pro zvlákňování PDX vláken	strana 64
Tabulka 3: Parametry použité pro zvlákňování PCL vláken	strana 64
Tabulka 4: Výsledky měření kontaktního úhlu a výpočtu volné povrchové energie	strana 74

## Seznam grafů

Graf 1: Vývoj podmínek v klimatizované komoře během experimentu	strana 54
Graf 2: Cytotoxicita nepovlákňených fólií	strana 77
Graf 3: Cytotoxicita povlákňených fólií a nanovláken	strana 77
Graf 4: Naměřená absorbance pro jednotlivé vzorky	strana 79