



## Diplomová práce

# Funkcionalizace povrchu nanovláknenných materiálů

*Studijní program:*

N0723A270001 Textilní inženýrství

*Autor práce:*

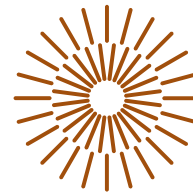
**Bc. Michaela Radová**

*Vedoucí práce:*

Ing. Senta Müllerová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Liberec 2023



## Zadání diplomové práce

# Funkcionalizace povrchu nanovláknenných materiálů

*Jméno a příjmení:*

**Bc. Michaela Radová**

*Osobní číslo:*

T21000027

*Studijní program:*

N0723A270001 Textilní inženýrství

*Zadávající katedra:*

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

*Akademický rok:*

2022/2023

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma: funkcionalizace povrchů nanovláknenných materiálů na bázi grafenu.
2. Experimentální část: funkcionalizace povrchu nanovláknenných materiálů na bázi grafenu dopaminem, biologické testy vyrobených materiálů.
3. Zpracování výsledků experimentů do podoby odborné diskuze a porovnání výsledků se současnou 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. BACA KOVA, L., FILOVA, E., PARIZEK, M., RUM L, T., SVORCIK, V., 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 29(6), 739–767. ISSN 0734-9750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
2. HAKOVA, M., CHOCHOLOUS, P., VALACHOVIC, A., ERBEN, J., CHVOJKA, J., SOLICH, P., SVEC, F., SATINSKY, D., 2020. On-line polydopamine coating as a new way to functionalize polypropylene fiber sorbent for solid phase extraction. *Talanta*. 219. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121189
3. GHORBANI, F., ZAMANIAN, A., AIDUN, A., 2019. Bioinspired polydopamine coating-assisted electrospun polyurethane-graphene oxide nanofibers for bone tissue engineering application. *Journal of Applied Polymer Science*. 136(24). ISSN: 0021-8995. DOI: 10.1002/app.47656

*Vedoucí práce:* Ing. Senta Müllerová  
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

*Datum zadání práce:* 1. listopadu 2022  
*Předpokládaný termín odevzdání:* 2. června 2023

L.S.

doc. Ing. Vladimír Bajzík, Ph.D.  
děkan

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

V Liberci dne 1. listopadu 2022

## Prohlášení

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

Jsem si vědoma 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 vědoma 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.

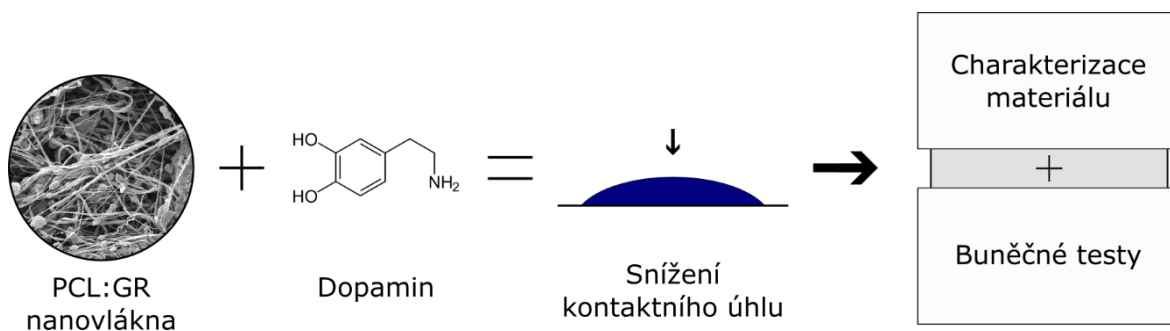
Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

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

## Anotace

Diplomová práce je zaměřena na funkcionalizaci povrchu polydopaminem pro zvýšení smáčivosti nanovláknenného materiálu vyrobeného technologií AC electrospinning, a tím k podpoření buněčné adheze a proliferace. Pracuje se s materiály s vysokou koncentrací inkorporovaného grafenu v kompozitu polykaprolakton/grafen v poměru 9:0, 9:1, 9:5 a 9:9, které jsou velmi hydrofobní.

Teoretická část se zabývá literární rešerší, která je nutná k pochopení tématu, a průzkumu aktuálního výzkumu v dané oblasti. V praktické části práce je provedena úprava povrchu polydopaminem pro snížení kontaktního úhlu vlivem přítomnosti aminových a hydroxylových skupin, a tím ke zlepšení adheze a proliferace buněk. Dále je provedena charakterizace materiálu, kdy jsou kromě změny kontaktního úhlu také změřeny průměry vláken a plošná elektrická rezistivita. Rovněž je potvrzena přítomnost vzniklé polydopaminové vrstvy. Následně jsou vyhodnoceny buněčné testy cytotoxicity a *in vitro* test buněčné adheze a proliferace, a na závěr je vypracována diskuse výsledků.



## Klíčová slova

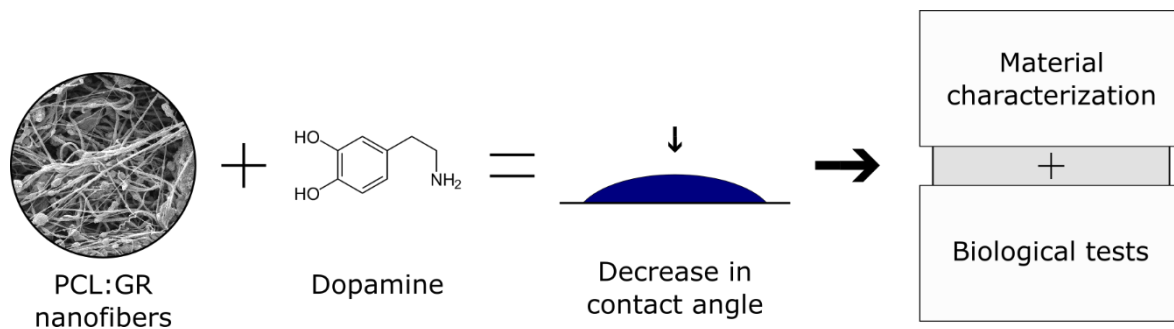
AC electrospinning, buněčné testy, coating polydopaminem, funkcionalizace polydopaminem, grafen, hydrofilizace, nanovláknna, polydopamin, polykaprolakton

# Annotation

## Surface functionalization of nanofibrous materials

This thesis is focused on functionalization of a surface with polydopamine to increase wettability of a nanofibrous material produced by AC electrospinning technology, and thus to support cell adhesion and proliferation. Materials with a high concentration of incorporated graphene in a polycaprolactone/graphene composite in the ratio 9:0, 9:1, 9:5 and 9:9, which are very hydrophobic, were used.

The theoretical part deals with literature research, which is necessary to understand the topic, and an exploration of current research in the given area. In the practical part, the functionalization of the surface with polydopamine is carried out to reduce the contact angle due to the presence of amine and hydroxyl groups, thereby improving cell adhesion and proliferation. The material is further characterized when, in addition to the change in contact angle, fiber diameters and surface electrical resistivity are also measured. The presence of the formed polydopamine layer is also confirmed. Subsequently, cell cytotoxicity tests and an *in vitro* cell adhesion and proliferation test are evaluated, and a discussion of the results is made at the end.



## Key Words

AC electrospinning, biological tests, surface functionalization by polydopamine, graphene, hydrophilization, nanofibers, polycaprolactone, polydopamine, polydopamine coating

## Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala všem, kteří se na tvorbě této diplomové práce přímo i nepřímo podíleli. Jmenovitě bych chtěla poděkovat panu Ing. Jakubu Erbenovi ohledně konzultace protokolu k povrstvování, panu Ing. Pavlovi Holci za zvláknění materiálů PCL:GR, panu doktoru Pavlovi Kejzlarovi za vyhotovení krásných detailních SEM snímků a panu profesorovi Oldřichu Jirsákovi za přeměření elektrické rezistivity. Také děkuji paní Ing. Petře Honzíkové za pomoc s přípravou buněk a za vstřícnost ohledně přístupu k laboratořím, společně s paní Ing. Zdeňkou Hodkovou. Také bych chtěla poděkovat paní sekretářce Petře Štěpánové za vstřícné jednání a celkově Katedře netkaných textilií a nanovlákněných materiálů za podporu v rámci celého studia a zajímavou výuku.

Především bych však chtěla poděkovat paní Ing. Sentě Müllerové za velkou trpělivost, ochotu, osobní přístup a podporu při vedení mé diplomové práce. Velmi si toho cením. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, jež mi byli velkou oporou.

## Obsah

Seznam zkratk.....	11
Úvod.....	13
<b>1. Význam nanovláknenných materiálů pro tkáňové inženýrství.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Výroba nanovláken .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Elektrické zvlákňování .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 DC electrospinning.....	17
1.2.2 AC electrospinning.....	18
<b>1.3 Materiály ve tkáňovém inženýrství.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Poly-ε-kaprolakton .....	20
<b>2. Grafen a jeho inkorporace do nanovláken.....</b>	<b>22</b>
2.1 Syntéza grafenu .....	22
2.2 Biokompatibilita a cytotoxicita grafenu .....	25
2.3 Inkorporace grafenu do nanovláken .....	26
<b>3. Dopamin a katecholaminy .....</b>	<b>28</b>
3.1 Dopamin.....	28
3.2 Katecholaminy.....	28
3.3 Princip syntézy polydopaminu na povrchu substrátu .....	29
3.3.1 Syntetický polydopamin.....	29
<b>4. Aktuální literatura týkající se problematiky funkcionalizace povrchu nanovláknenných materiálů na bázi grafenu.....</b>	<b>31</b>
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>5. Metody.....</b>	<b>36</b>
5.1 Výroba PCL:GR nanovláken.....	36
5.2 Povrstvení polydopaminem .....	37
5.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	39
5.4 Měření průměrů vláken.....	39
5.5 Měření kontaktního úhlu.....	39
5.6 Měření plošné elektrické rezistivity.....	40
5.7 Buněčné testy .....	40
5.7.1 Cytotoxicita .....	40
5.7.2 Test buněčné adheze a proliferace.....	41
5.8 Statistické zpracování .....	42
<b>6. Výsledky .....</b>	<b>43</b>



<b>6.1 Povrstvení polydopaminem .....</b>	<b>43</b>
<b>6.2 Charakterizace materiálu .....</b>	<b>43</b>
6.2.1 Struktura vláken.....	44
6.2.2 Průměr vláken.....	45
6.2.3 Kontaktní úhel .....	48
6.2.4 Plošná elektrická rezistivita .....	49
<b>6.3 Prokázání přítomnosti polydopaminu.....</b>	<b>51</b>
<b>6.4 Buněčné testy .....</b>	<b>53</b>
6.4.1 Cytotoxicita .....	53
6.4.2 Test buněčné adheze a proliferace .....	55
<b>7. Diskuse výsledků .....</b>	<b>60</b>
<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
<b>8. Seznam použité literatury.....</b>	<b>66</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>77</b>
<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>79</b>

## Seznam zkratek

AC	Střídavý proud
BSA	Hovězí sérový albumin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CNT	Uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes)
CVD	Chemická depozice z plynné fáze
DAPI	4-6-Diamidino-2-fenylindol
DC	Stejnoseměrný proud
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DOPA	Dihydroxyfenylalanin
ECM	Extracelulární matrix
FESEM	Field-Emission Scanning Electron Microscopy
GO	Oxid grafenu
GR	Grafen
hm%	Hmotnostní procento
IS	Interval spolehlivosti
NC	Negativní kontrola
ot/min	Otáčky za minutu
PBS	Fosfátový pufr
PC	Pozitivní kontrola
PCL	Polykaprolakton
PDA	Polydopamin
PS	Polystyren
PU	Polyuretan

RES	Retikuloendotelový systém
rGO	Redukovaný oxid grafenu
ROS	Reaktivní metabolity kyslíku
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SMF	Simulovaná tělní tekutina
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TFME	Tenkvrstvá mikroextrakce (thin-film microextraction)
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometan
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie

# Úvod

Ve tkáňovém inženýrství je stále větší poptávka po scaffoldech z vodivých materiálů, jež by podporovaly buněčnou adhezi a proliferaci. Takové materiály by umožňovaly šíření elektrických vzruchů, a tím podporovaly buněčnou diferenciaci kmenových buněk. Je zkoumána možnost využití scaffoldů, jež využívají nanočástice z uhlíkových derivátů, jako jsou uhlíkové nanotrubičky (CNT) nebo grafen, a to z toho důvodu, že by takové materiály měly mít vysokou vodivost, pevnost, a tím, že jsou v ideálním případě z čistého uhlíku, dobrou biokompatibilitu. Dokonce je v případě grafenu prokázána podpora buněčné proliferace. Otázka cytotoxicity takových materiálů je však stále otevřená, jelikož vlivem svých malých rozměrů mají tyto částice potenciál přímo interagovat a případně poškozovat buňky. Zároveň je grafen silně hydrofobní.

Cílem této práce je funkcionalizace povrchu kompozitního nanovláknenného materiálu z polykaprolaktonu (PCL) a grafenu (GR), jenž je přidán ve vysokých koncentracích, pro zvýšení smáčivosti a tím podpoření buněčné adheze, pomocí polydopaminu.

Polydopamin je polymer, který se velmi podobá přírodnímu melaninu, jenž se běžně vyskytuje v lidském těle. Vzniká oxidací dopaminu a vyznačuje se schopností přilnout na téměř jakýkoli povrch. V mnoha studiích je experimentováno s jeho využitím na úpravu tkáňových nosičů, a to zejména pro jeho biokompatibilitu, podporu buněčné adheze a schopnost zvyšovat smáčivost.

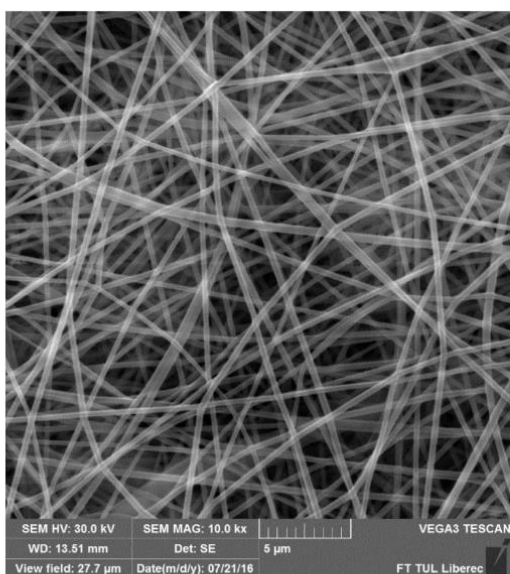
Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části je vypracována literární rešerše, kde je popsán význam nanovláknenných materiálů pro tkáňové inženýrství a jejich výroba. Následuje kapitola týkající se syntézy grafenu, jeho biokompatibility a možností jeho inkorporace do nanovláken. Další kapitola je věnována dopaminu jakožto katecholaminu a je představen princip syntézy polydopaminu. Nakonec je zařazen přehled aktuální literatury, jež se týká problematiky řešené v praktické části, tedy povrstvování polydopaminem na nanovláknenném materiálu z polykaprolaktonu a grafenu.

Základem praktické části je povrstvení hydrofobního nanovláknenného PCL:GR materiálu o koncentraci 9:0, 9:1, 9:5 a 9:9, pro podpoření smáčivosti. Materiál je dále charakterizován, tedy je změřen kontaktní úhel, průměr vláken, plošná elektrická rezistivita

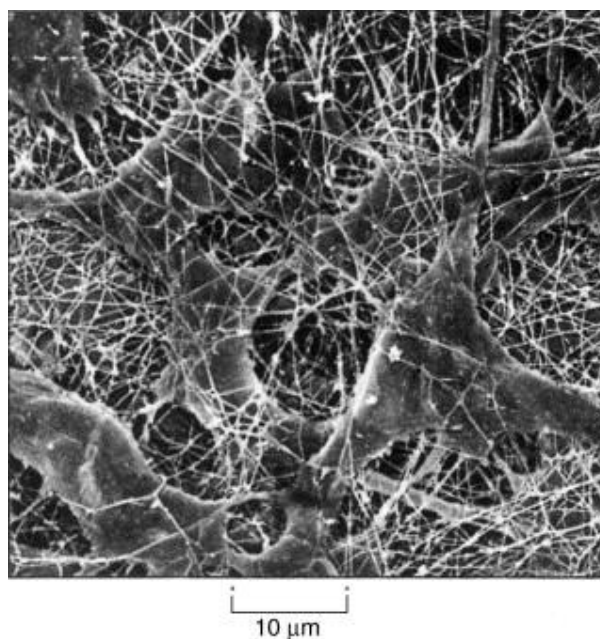
a vlákenná struktura. Zároveň je potvrzena přítomnost polydopaminové vrstvy. Poté jsou vyhodnoceny buněčné testy cytotoxicity výluhu materiálů a *in vitro* test buněčné adheze a proliferace. Nakonec je zařazena diskuse výsledků.

# 1. Význam nanovláknenných materiálů pro tkáňové inženýrství

Nanovláknna jsou vlákna o průměru menším než 1 mikrometr a jsou hojně využívána v tkáňovém inženýrství jako scaffoldy (tzv. nosiče) pro buňky. To je dáno tím, že se uspořádáním a strukturou velice podobají mezibuněčné hmotě, tedy extracelulárnímu matrixu (ECM), což umožňuje jeho imitaci a následnou buněčnou adhezi. Podobnost lze vidět na následujícím obrázku, kde jsou porovnána nanovláknna vyrobená elektrostatickým zvlákněním a přírodní ECM pojivové tkáně. [1; 2]



Obrázek 1: SEM snímek nanovláknenné vrstvy vyrobené z 14 % PVA, metodou jehlového elektrického zvláknění. Měřítka 5 μm. [64]



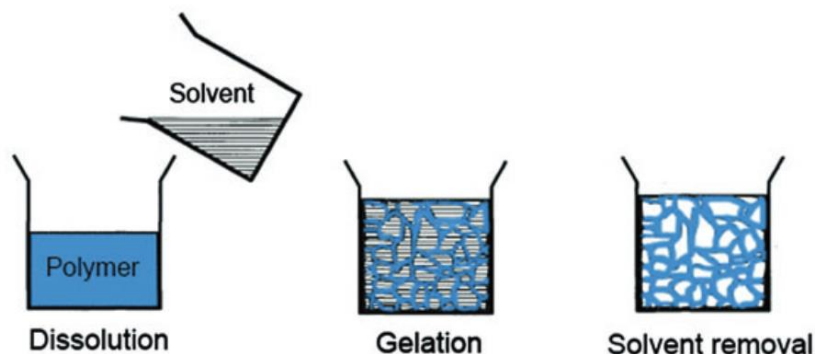
Obrázek 2: SEM snímek extracelulárního matrixu pojivové tkáně. Měřítka 10 μm. [65]

## 1.1 Výroba nanovláken

Existuje více způsobů tvorby nanovláken. Jednou z často zmiňovaných metod je „self-assembly“, kde jsou molekuly v roztoku spojeny na základě jejich vnitřních interakcí, tedy mezimolekulárních sil. Jedná se o velmi propracovanou a složitou metodu, která je zdoluhavá a málo efektivní, jelikož je obtížné ovlivňovat velikost vznikajících vláken. Ta navíc mohou být tvořena jen malými aktivními částicemi, jež spolu interagují

žádoucím způsobem na základě vnitřního či vnějšího stimulu. Touto metodou je však možné při vhodných podmínkách tvořit i velmi tenká nanovlákna. [3; 4]

Dále se uplatňuje metoda **fázové separace**, která je založena na neslučitelnosti dvou fází. Zde je polymer nejdříve rozpuštěn a poté je udržován o teplotě vhodné pro proces gelace, při které dochází k tvoření polymerních sítí. Po dokončení gelace je ze směsi extrahováno rozpouštědlo a hotová síť je zafixována. Proces je znázorněn na Obrázku 3.



Obrázek 3: Tvorba nanovláken pomocí fázové separace [4]

Výhodou této metody je jistá podobnost vzniklé 3D struktury s přírodním kolagenem, a také její nenáročnost na vybavení. Vlastnosti polymerní sítě, jako je pórovitost či mechanické vlastnosti, lze ovlivňovat koncentrací polymeru v roztoku. Jistým omezením je, že lze použít pouze polymery, jež jsou schopné procesu gelace, například polylaktid (PLA) či polyglykolid, a nelze tvořit dlouhá, souvislá vlákna. [3; 4; 5]

Nanovlákna mohou být dále tvořena například metodou „**drawing**“, při které se mikropipetou či ostrým hrotem „vytahují“ vlákna z kapky polymeru, čímž může být dosaženo plné kontroly nad orientací vláken, ovšem za ceny nízké produktivity a nároků na viskoelastické vlastnosti polymeru, aby nedocházelo k přetržení vlákna. [4]

Nejvyužívanější metodou je však technologie elektrického zvláknování neboli electrospinning.

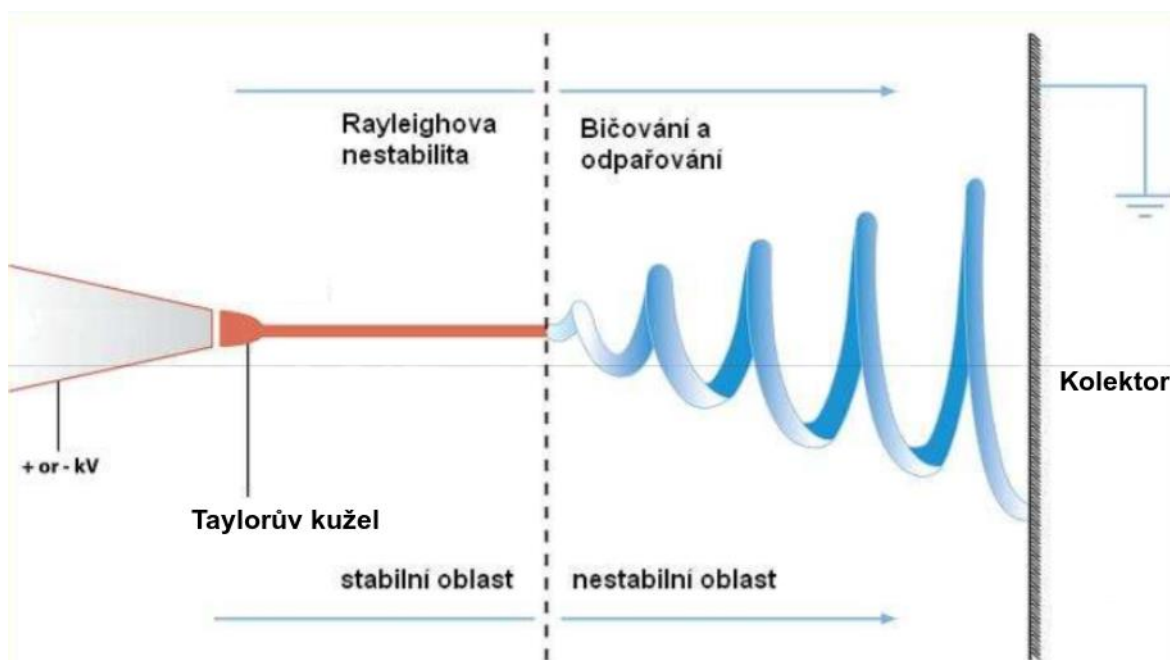
## 1.2 Elektrické zvlákňování

Elektrické zvlákňování neboli elektrospinning je technologie, při které z vodivého polymerního roztoku či taveniny, jež je přivedena na elektrodu o vysokém elektrickém napětí, tryskají tenká vlákna. Zdroj vysokého napětí může být na bázi stejnosměrného (DC) či střídavého (AC) proudu. [6]

Výhody této technologie tkví v jednoduchém nastavení procesu, cenové dostupnosti, širokému uplatnění a chemické všestrannosti. Největším omezením je relativně špatná migrace buněk do hlubších částí scaffoldu, zvláště pokud jsou vlákna příliš nahuštěna. [4; 1]

### 1.2.1 DC electrospinning

Vlákna vyrobená za pomoci stejnosměrného proudu jsou vlivem elektrického pole vedena k druhé, uzemněné či opačně nabitě elektrodě (kolektoru), kde jsou zachytávána. Průběh samotného zvlákňování je znázorněn na Obrázku č. 4. [4; 7]



Obrázek 4: Zvlákňovací prostor, elektrostatické zvlákňování [8], vlastní úprava

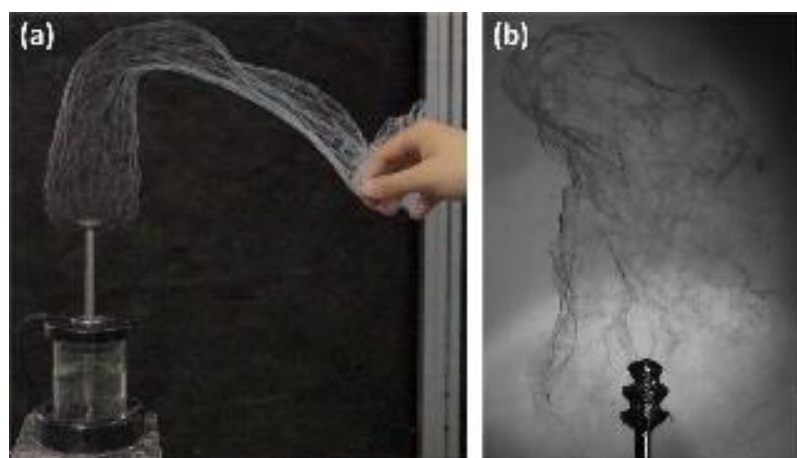


Nejprve se kapka vlivem elektrického pole zformuje do kuželovitého tvaru (tzv. Taylorův kužel) a při zvýšení napětí nad kritickou hodnotu se z kapky ke kolektoru vytvoří souvislý proud, jenž je zpočátku stabilní, a poté nestabilní. V nestabilní části proudu, také nazývané jako oblast bičujícího pohybu, dochází k dloužení vlákna a s tím souvisejícímu odpaření rozpouštědla, případně tunutí taveniny.

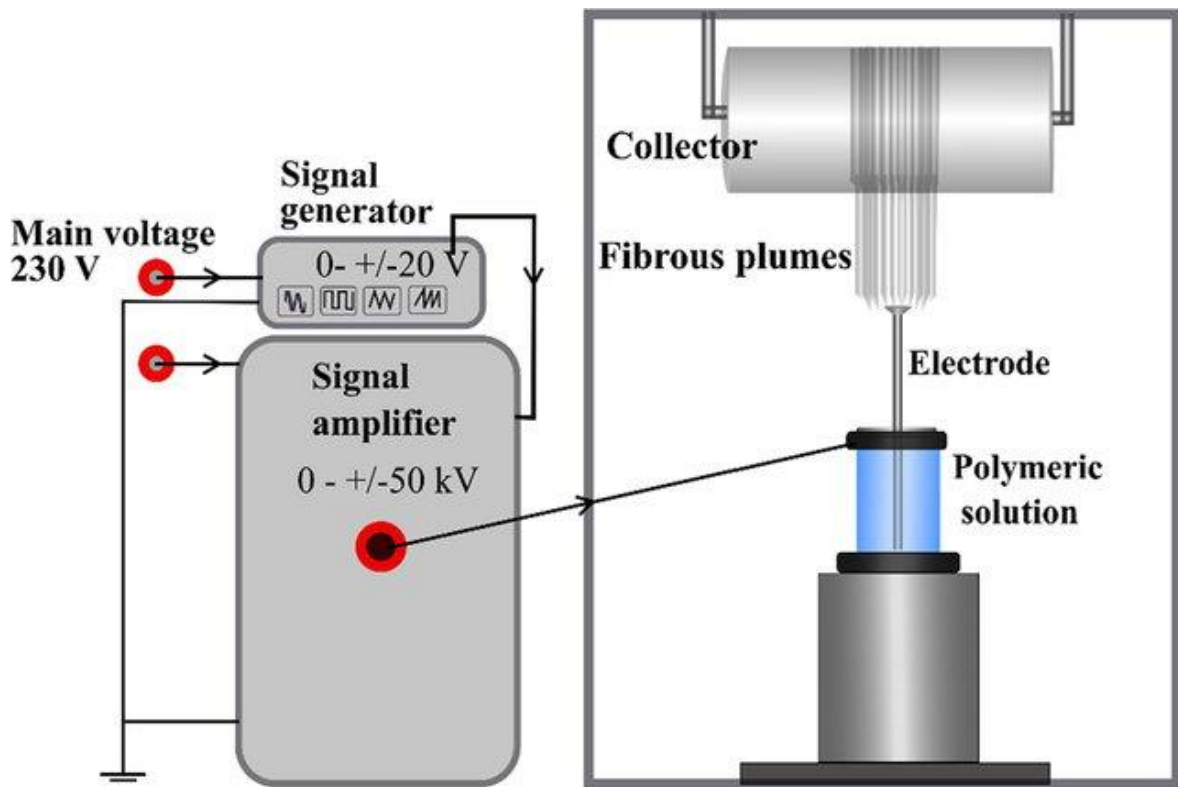
Metodu DC elektrického zvlákňování je možné rozdělit na zvlákňování z jehly a na zvlákňování bez jehly, kam patří například technologie Nanospider™. Ta původně využívala válec, který se točil a namáčel v polymeru, jehož tenkou vrstvou se obalil. Na něm se poté vlivem koncentrace napětí vytvořilo mnoho Taylorových kuželů, které nahrazovaly funkci jehel. V současné době se místo válce využívá ocelový drát, na nějž je polymer nanášen posuvným jezdcem. Výsledek zvlákňovacího procesu, zejména uspořádání vláken, ovlivňuje také tvar a rychlost otáčení kolektoru, na který vlákna dopadají. [4; 7]

### 1.2.2 AC electrospinning

Při zvlákňování střídavým proudem je zdroj střídavě nabíjen kladným a záporným nábojem, čímž jsou z polymeru vystřelovány střídavě kladně nabitá a záporně nabitá vlákna. Na rozdíl od DC electrospinningu není ve zvlákňovacím procesu třeba mít elektricky aktivní kolektor. Jeho místo (jako tzv. virtuální kolektor) zaujímá ionizovaný vzduch. Vlákna jsou poté ve formě nanovláknenné vlečky (viz obr. 5) na podklad unášena elektrickým větrem. Schéma zvlákňovacího zařízení je vyobrazeno na obr. 6. [9; 10]



Obrázek 5: Nanovláknenná vlečka [11]



Obrázek 6: Schéma AC electrospinning [12]

Na Obrázku 6 je možné vidět zvlákňovací zařízení na bázi střídavého napětí. To může být generováno v různě probíhajících frekvencích, a následně je umocněno do oblasti vysokého napětí a přivedeno na elektrodu s polymerním roztokem.

Je uvedeno, že produktivita zvlákňování střídavým proudem je desetkrát větší než jednosměrným proudem. Struktura vláken vyrobených těmito metodami se také liší. Vláknena vyrobena metodou DC elektrospinning bývají tenčí oproti vláknům vyrobeným střídavým zvlákňováním, což může být způsobeno absencí bičujícího pohybu, kde se vlákna významně tenčí, a jež se vyskytuje u DC zvlákňování, ale již ne tolik u metody využívající střídavé napětí. Zároveň bývají vlákna z DC elektrospinningu stejnoměrnější než u AC elektrospinningu, kde mají průměry vláken tendenci kolísat. Je to však závislé na typu použitého polymeru. [13; 14; 10]

### 1.3 Materiály ve tkáňovém inženýrství

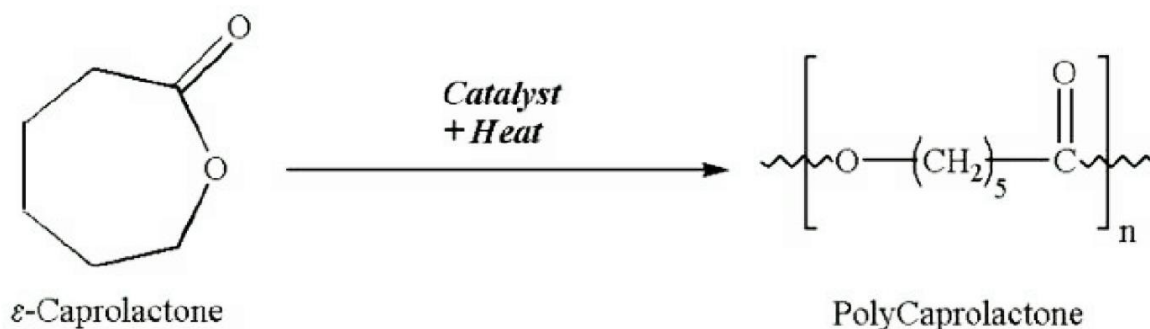
K tomu, aby nanovláknenné scaffoldy mohly být využívány, je třeba brát v potaz, z jakého materiálu jsou vyrobeny a zdali jsou jejich vlastnosti vhodné pro konkrétní aplikaci. Obecně musí mít scaffoldy mechanické vlastnosti odpovídající nahrazované tkáni, být pórovité a umožnit tak migraci buněk a živin, a být biokompatibilní (nevyvolávající imunologickou reakci systému), a to včetně jejich produktů degradace. Zároveň musí být biodegradabilní s vhodnou rychlostí rozpadu, aby měly buňky dostatek času prorůst scaffoldem a vytvořit novou mezibuněčnou hmotu, bez toxických reziduí a sterilizovatelné. [15]

Materiály vhodné pro implantaci do organismu, mohou být přírodního i syntetického původu. Výběr materiálu se odvíjí od umístění a požadovaných vlastností nahrazované tkáně, jako je například odolnost úměrná namáhání či vodivost. Zároveň musí biomateriály umožnit interakci s okolní tkání. Využívají se přírodní (např. keratin, chitosan, gelatin, polysacharidy) a syntetické polymery (např. kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová, polyuretany, polydioxanon, polykaprolakton), biokeramika či jejich kompozity. [1; 16; 17]

Nicméně je nutné podotknout, že některé scaffoldy mají potenciál především v *in vitro* kultivaci buněk, a i tak je smýšlen materiál vyvíjený v této práci. Vzhledem k tomu, že se v této práci pracuje i s poly- $\epsilon$ -kaprolaktonem (PCL), je mu věnována následující podkapitola.

#### 1.3.1 Poly- $\epsilon$ -kaprolakton

Poly- $\epsilon$ -kaprolakton se řadí do polyesterů a vzniká otevřením kruhu  $\epsilon$ -kaprolaktonu za pomoci různých katalyzátorů (viz obr.7). Je to pro medicínu schválený termoplastický alifatický polyester semikrystalické a hydrofobní povahy, který je hojně využíván ve tkáňovém inženýrství, a to zejména pro jeho biokompatibilitu, biodegradabilitu, dobré mechanické vlastnosti, strukturní stabilitu a dostupnost.



Obrázek 7: Syntéza poly- $\varepsilon$ -kaprolaktonu [18]

Jeho degradace probíhá hydrolyticky (štěpení esterové vazby). Rychlost degradace je v řádu měsíců až let (obvykle 1-2 roky) a odvíjí se od molekulové hmotnosti, stupně krystalinity a místě aplikace. Pomalá degradace s možností jejího kontrolování tento polymer předurčuje k využití na různé typy scaffoldů s delší potřebnou dobou na obnovu tkáně či na řízené uvolňování léčiv. Teplota tání je okolo 60 °C a teplota skelného přechodu se pohybuje mezi -65 °C a -61 °C. Jeho molekulovou hmotnost je možné ovlivňovat volbou katalyzátorů a její průměrná hodnota je v rozpětí 3 000 - 80 000 g/mol. [18; 19; 20; 21]

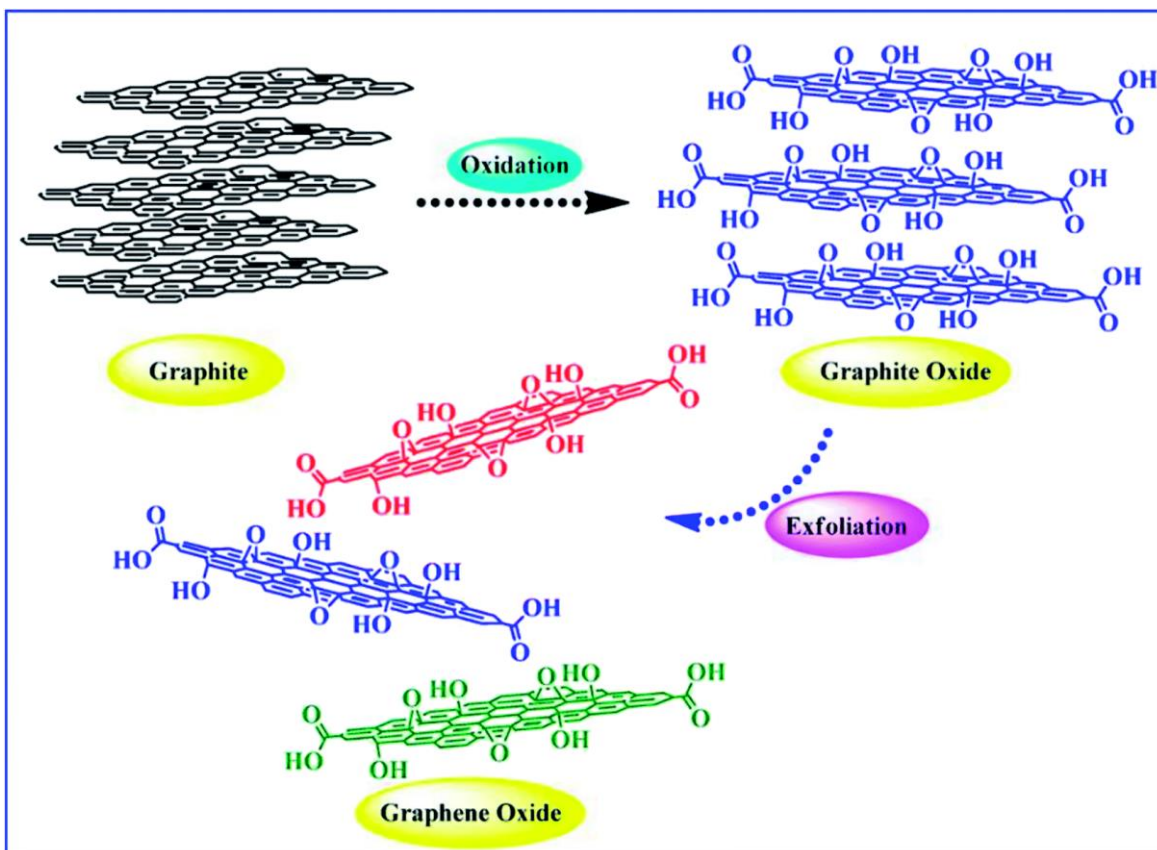
## 2. Grafen a jeho inkorporace do nanovláken

Grafen je uhlíková vrstva o výšce jednoho atomu s hexagonální krystalickou strukturou připomínající včelí plástev. Je považován za nejtenčí a nejpevnější nanomateriál. Navíc se vyznačuje výbornou elektrickou a tepelnou vodivostí, vysokou tepelnou odolností, propustností světla téměř 98 % a velkým specifickým povrchem. Nej kvalitnější grafen má sice jen jednu vrstvu, obvykle je však dostupný jako vícevrstevný.

Jeho aplikace se předpokládá v elektronice, například v oblasti ukládání energie (vícevrstevný) či jako displejů (jednovrstevný), dále jako senzory, kompozity či katalyzátory. Své využití by mohl mít i ve filtraci. Uplatněn může být grafen i v biomedicině, kde může být médiem pro podávání léků, fototermální terapii v léčbě nádorů, jako biosenzor, ale také v oblasti tkáňového inženýrství, kde bylo zjištěno, že grafen podporuje adhezi a proliferaci některých savčích buněčných linií. Také se uvádí, že grafen a jeho oxidovaný derivát vykazují antibakteriální aktivitu proti širokému spektru bakterií. [22; 23; 24]

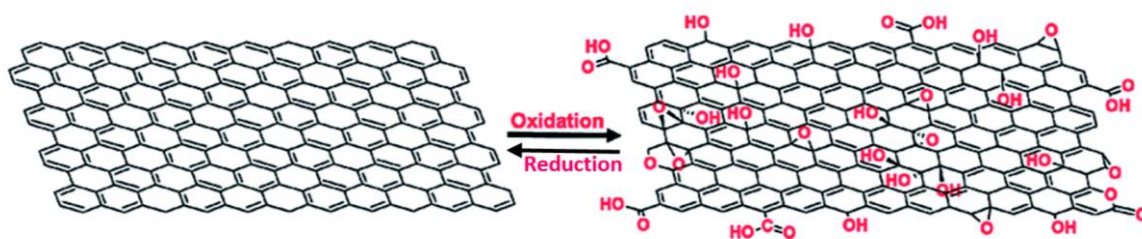
### 2.1 Syntéza grafenu

V literatuře se uvádí dva hlavní přístupy k výrobě grafenu. Prvním přístupem je tzv. „bottom up“, kdy dochází k syntéze grafenu z jiných látek. Nejčastějším zástupcem tohoto přístupu je redukce oxidu grafenu (GO – graphene oxide) (viz obr. 9), což je oxidovaná verze grafenu. GO je zároveň vrstva oxidovaného grafitu, tzv. oxidu grafitu, jak je znázorněno na Obrázku 8.



Obrázek 8: Příprava oxidu grafenu [25]

Na Obrázku 9 je dobře vidět rozdíl mezi vrstvou grafenu a jeho oxidu. Je možné vidět, že oxid grafenu, narozdíl od grafenu, obsahuje hydroxylové, karboxylové, karbonylové i epoxydové skupiny (především na okrajích). Z toho také vyplývá, že oproti grafenu, který je hydrofobní, je GO hydrofilní. Ve struktuře mohou být dokonce přítomné organosulfáty. To poté souvisí s defektivitou. [26]



Obrázek 9: Oxidace grafenu na oxid grafenu / redukce oxidu grafenu na grafen [25], vlastní úprava

K redukci na grafen bývají použita činidla, která jsou často agresivní (např. hydrazin), případně jsou využité elektro-chemické metody, jež mají být šetrnější [27]. Grafen vyrobený z GO se často označuje jako „highly reduced GO“ (HRG) či „reduced GO“ (rGO) a mívá mnoho chemických a strukturních defektů (vzniklé díry a vakance). Je prokázáno, že stupeň oxidace grafitu koreluje s mírou defektivy [28], která může výsledný produkt činit nevhodným na mechanické a elektrické použití. Tento způsob výroby je však možné aplikovat ve větším měřítku, čímž je umožněna masová výroba a komercializace grafenu. [26; 29]

Druhý přístup, označovaný jako „top down“, přistupuje k syntéze grafenu jako k získávání grafenu přímo z grafitu, což umožňuje výrobu vysoce kvalitního grafenu s nízkým množstvím chemických a strukturních defektů. Příkladem je metoda „scotch tape“, neboli metoda lepicí pásky, kterou je možné oddělit tenkou vrstvou grafenu z grafitu, či se používá chemická depozice z plynné fáze (CVD – chemical vapour deposition). Tyto metody jsou však časově náročné a nevhodné pro masovou produkci. [22]

Způsoby výroby se stále vyvíjejí a jsou předmětem zkoumání. Například ve studii *Byeong-Ju Park et al.* (2018) byly bezchybné vrstvy grafenu syntetizovány (při 150 °C) na substrátu, který byl funkcionalizován ultratenkou katalytickou vrstvou titanu, jehož afinita k uhlíku je silná. Titan byl před a po syntéze grafenu vystaven oxidaci a vlastnosti substrátu ani grafenu tím nebyly ovlivněny. [30]

Velmi slibná a využívaná je top down metoda zvaná „flash graphene synthesis“, což je syntéza grafenu za pomoci „flash Joule heating“, které představuje rychlé zahřívání elektrickým proudem. To dodá potřebnou energii na oddělení vrstev v grafitu, čímž je vytvořen grafen. Tato metoda má mnoho výhod. Produkty této metody, jež byly nazvány „flash graphene“, v sobě nemají rezidua z oxidačních a redukčních procesů a mají nejméně defektů v porovnání s ostatními v tu dobu (rok 2020) dostupnými metodami. Další výhodou je velmi vysoká produktivita výroby a dostupnost vstupních materiálů, které musí být bohaté na uhlík. To může zahrnovat například uhlí, ropu, koks či biouhel, avšak lze využívat i některý odpad vyprodukovaný domácnostmi, jako jsou zbytky potravin, gumové pneumatiky či plastové lahve. Tento způsob výroby slibuje masovou produkci grafenu o nízké ceně a vysoké kvalitě. [31; 24]

## 2.2 Biokompatibilita a cytotoxicita grafenu

Přestože se jedná o látku, jež obsahuje pouze uhlík, existuje obava ohledně zdravotních rizik, která by mohl grafen představovat. Obavy zejména vyvolávají jeho kraje, které by mohly být ostré a poškozovat buňky, jako se to stávalo s uhlíkovými nanotrubicemi. V literatuře není ohledně tohoto tématu jednotný názor.

Například ve studii, jež byla provedena v roce 2010, byl do myši injektován (20 mg/kg), grafen, který byl funkcionalizován polyetylenglykolem. Poté byla sledována distribuce jodu-125 ( $I^{125}$ ), který tam byl též navázán, v časových intervalech 1 hodina, 6 hodin, 1 den, 3 dny, 7 dní, 15 dní, 30 dní a 60 dní a získané informace byly ověřeny pitvou. Bezprostředně po vpíchnutí látky byl grafen uložen v různých orgánech, nejvíce však v orgánech souvisejících s retikuloendotelovým systémem (RES), jako jsou játra či slezina. Po třech dnech většina orgánů (kromě RES) vykazovala pouze minimální množství grafenu. Část větších grafenových částic (10-30 nm) byla poměrně rychle vyloučena žlučí do stolice, část menších částic byla vyloučena v moči. Největší koncentrace grafenu byla zjištěna v játrech a slezině, kde zůstaly zbytky grafenu, které pomalu, avšak konstantně v průběhu času ubývaly. [32]

Ve studii z roku 2013 byl opět do myši nitrožilně vpraven grafen, jehož distribuce v těle byla sledována využitím konfokální Ramanové mikroskopie. Výsledky nasvědčují tomu, že grafen v počátku inicioval prozánětlivou reakci, na jejíž impuls byla vyvolána reakce makrofágů, které grafen pohltily fagocytózou a způsobily jeho degradaci. [33]

V roce 2019 byla provedena studie, jež zkoumala dlouhodobou biodegradabilitu a cytokompatibilitu oxidu grafenu, jenž byl modifikován fosfátem. Testy byly provedeny *ex vivo* a bylo zjištěno, že tato látka byla degradována a produkty degradace byly cytokompatibilní s lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami. [34]

Naopak ve studii z roku 2019, která se zabývala nanotoxicitou různě velkých částic grafenu a oxidu grafenu a jež byla provedena *ex vivo* a *in vivo* na dáníech pruhovaných, se cytotoxicita potvrdila. Při experimentech *in vitro* byly použity buňky HEK 293T, což jsou lidské embryonální ledvinové buňky a bylo zjištěno, že velké i malé částice grafenu i GO způsobili významný pokles viability buněk, zvýšily poškození DNA a zároveň byly



produkovány reaktivní metabolity kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species), které mohou způsobovat oxidační stres. Při *in vivo* testech bylo odhaleno, že vystavení dáníí grafenu a GO způsobilo vývojovou toxicitu a generovalo ROS. Grafen vykazoval vyšší akutní toxicitu a schopnost snižovat míru přežití buněk, kdežto GO poškozoval DNA a generoval ROS. Velikost toxicity byla daná mírou oxidace, velikostí částic, koncentrací látek a citlivostí použitých *in vitro* a *in vivo* modelů. Pro porovnání vlivu velikosti částic byla při koncentraci 100 mg/L viabilita při použití malých částic grafenu 14,57 %, velkých částic grafenu 31,30 %, středních částic grafenu 75,56 %. Při stejné koncentraci oxidu grafenu byla viabilita po vystavení malých částic GO 63,51 %, velkých částic GO 65,95 % a středních částic GO 86,14 %. Velikost částic tedy hraje v toxicitě stěžejní roli a nejvyšší cytotoxicitu vykazují malé částičky, následované velkými částicemi, přičemž částice o střední velikosti jsou nejméně závadné. [35] Nicméně zdá se, že při nižších koncentracích nedochází k výraznému poničení buněk. [23] Biokompatibilita se také odvíjí od metodiky syntézy grafenu, jeho dispergace, použitého polymerního základního materiálu, formě scaffoldu, povrchových úprav, či typu buněk. [36]

Toxické vlastnosti grafenu mohou být potlačeny v případě jeho inkorporace do polymerních materiálů. [36] V experimentální části této práce je grafen uložen v nanovlákněném nosiči a je zkoumána cytokompatibilita celého tohoto kompozitního materiálu, kdy je hodnoceno, zda došlo k synergickému efektu, a zda by tento materiál mohl být pro buňky vhodný.

### **2.3 Inkorporace grafenu do nanovláken**

Inkorporace grafenu do nanovláken je obvykle provedena přidáním grafenu do polymerního roztoku, jenž je poté zvlákněn. Dle studie z roku *Heidari et al.* (2017), kde byl grafen zvlákněn v PCL/gelatinovém roztoku (PCL:gelatin 25:75, 50:50, 75:25, koncentrace grafenu 0,1, 1,5 a 2 hm%), se může podíl grafenu ku polymeru pozitivně projevit na průměru vláken, kdy roztok s vyšším podílem grafenu tvořil tenčí a rovnoměrnější vlákna do koncentrace 1,5 hm %, což nejspíše zapříčinila zvýšená vodivost roztoku, čímž byl zvýšen elektrický odpor na jeho povrchu při tvorbě Taylorova kuželu. Poté však začal průměr vláken mírně stoupat, což mohlo být způsobeno agregací grafenových nanočástic, a tím zvýšením viskozity a zhoršení procesu zvláknování.

Zároveň i malé množství grafenu rapidně zvýšilo elektrickou vodivost a pevnost vláken. Zvláknění probíhalo při elektrickém napětí 10-20 kV, rychlost dávkování roztoku byla 0,2-1,8 ml/h a vzdálenost kolektoru byla 15 cm. [37]

Dalším příkladem je studie z roku 2020, ve které byla metodou electrospinning zvlákněna polyvinylalkoholová (PVA) vlákna s přidaným rGO, kde byla glukóza použita jako redukční a stabilizační činidlo, o koncentraci grafenu 0-1 hm%. Tento materiál byl dále kovalentně zesíťován v acetonovém roztoku obsahujícím glutaraldehyd (0,7 hm%) a HCl (0,05 M). Koncentrace rGO v PVA roztoku byla 0, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5 a 1 hm%, a byl v něm dispergován ultrazvukem. Zvláknění probíhalo na zařízení NanoNC-electrospinning machine (Soul, Jižní Korea), napětí bylo 16-18 kV, vzdálenost kolektoru, jenž byl překrytý hliníkovou folií, byla 15-17 cm, rychlost dávkování roztoku byla 10  $\mu$ l/min. Bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací grafenu se zvětšoval průměr vláken, hydrofobicita a termické vlastnosti. Zároveň se do koncentrace 0,5 hm% snižovala pevnost v tahu a tažnost, nejspíše vlivem nerovnoměrné distribuce grafenu a tvorbě tuhých acetalových vazeb glutaraldovými zesíťovacími činidly při nízkém pH, ale při dalším vzrůstu koncentrace pevnost v tahu a tažnost opět mírně vzrostly. Při testech buněčné proliferace a viability buňky na materiálu dobře proliferovaly. [36]

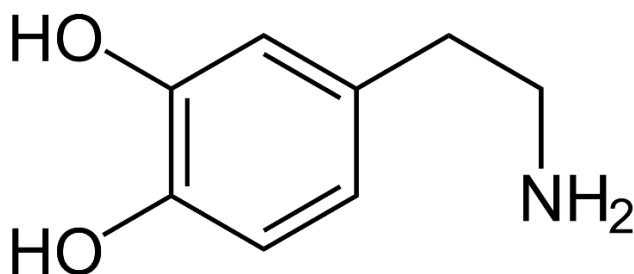
Inkorporace grafenu do nanovláken může kromě jednoduchého přidání do polymerního roztoku probíhat i dalšími způsoby, například využitím metody CVD či vytvořením kovalentních vazeb. [38; 39] Například ve studii z roku 2012 byl redukovaný grafen oxid (rGO), který byl v disperzi v bezvodém dimethylformamidu, kovalentně spojen s polykaprolaktonem, a to tak, že byly řetězce polykaprolaktonu esterifikací spojeny s karboxylovými skupinami, jež byly na okrajích rGO. Koncentrace grafenu byla 0,1, 0,5, 1 a 5 hm%. Takto vytvořený kompozit vykazoval vysokou homogenitu a konzistentní degradaci zachovávající poměr PCL a grafenu během degradačního procesu. V této studii byl také připraven PCL/grafenový materiál, kde byl dobře dispergovaný grafen jednoduše vmíchán do roztoku PCL. Obsah grafenu byl 0,1, 0,5, 5 a 17 hm%. Tento materiál vykazoval známky nehomogenity, což se odrazilo i na jeho nerovnoměrné degradaci. Produkty degradace nebyly ani v jednom případě pro proliferující buňky toxické, U obou typů materiálů při zvýšení koncentrace grafenu došlo ke zvýšení elektrické vodivosti a Youngova modulu, a naopak ke snížení tažnosti. [38]

### 3. Dopamin a katecholaminy

Tato kapitola pojednává o dopaminu jako katecholaminu. Zároveň je popsán syntetický polydopamin a jeho syntéza.

#### 3.1 Dopamin

Dopamin je běžně se v těle vyskytující neurotransmitter, jenž iniciuje vzruchy mezi buňkami spojené s jednoduchým odměnovým signálem, ale i s mnohem komplexnějšími situacemi, kde zaznamenává důležitost událostí ve vnějším světě. Špatně fungující dopaminový systém je spojen se vznikem Parkinsonovy choroby, poruchami pozornosti s hyperaktivitou a může přispívat i ke schizofrenii. V oblasti psychiatrie některé velmi rozšířené léky fungují právě na dopaminergním (tj. týkajícím se dopaminu jako neurotransmiteru či uvolňujícím dopamin) mechanismu. Je to jeden ze tří hlavních katecholaminů v mozku. Zbylé dva jsou norepinefrin (neboli noradrenalin) a epinefrin (neboli adrenalin), jejichž syntéza vychází právě z dopaminu. [40]

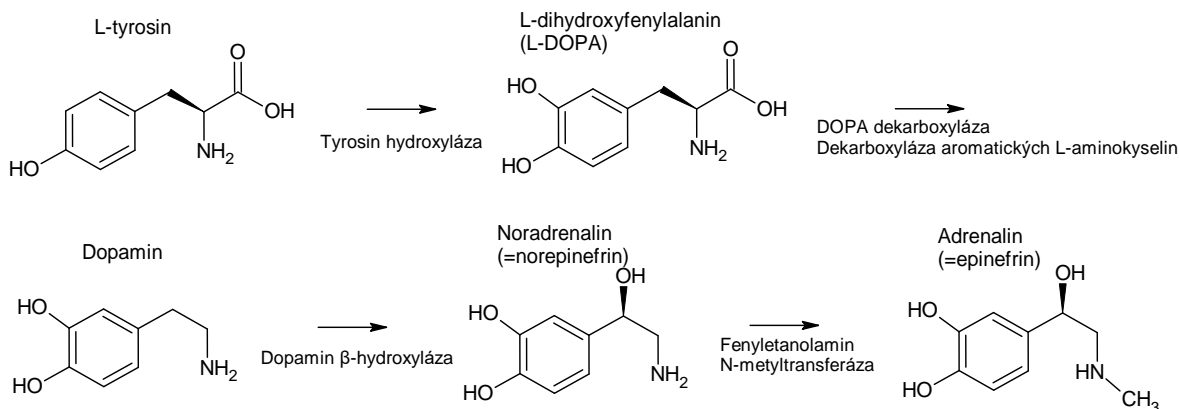


Obrázek 10: Strukturální vzorec dopaminu

#### 3.2 Katecholaminy

Katecholaminy jsou v nízkých koncentracích přítomny v mozku, kde hrají zásadní roli v regulaci velkého množství aspektů funkce centrální nervové soustavy. Jsou to deriváty 3,4-dihydroxyfenyletylaminu, tedy obsahují benzenové jádro se dvěma připojenými hydroxylovými a jednou etylaminovou skupinou ukončenou aminovou skupinou. Tento řetězec může mít další substituenty. [41; 42]

Syntéza katecholaminů probíhá na nervových zakončeních i v samotných buňkách. Nejvýznamnějším enzymem v syntéze katecholaminů je 3,4-dihydroxy-l-fenylalanin (L-DOPA), jenž je iniciátorem tvorby dopaminu, norepinefrinu a epinefrinu. Tyrosin hydroxyláza katalyzuje přeměnu L-Tyrosinu na právě zmíněný L-DOPA. [41]



Obrázek 11: Syntéza katecholaminů  
Zdroj: [43], vlastní úprava

### 3.3 Princip syntézy polydopaminu na povrchu substrátu

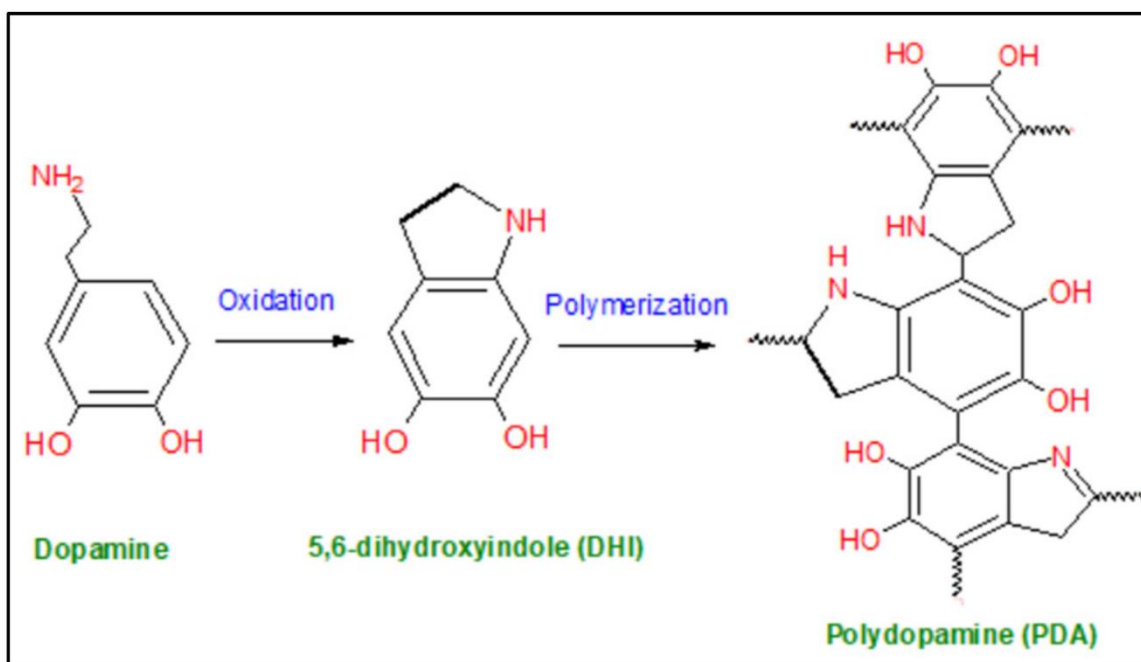
Polydopamin je využívaným polymerem pro funkcionalizaci povrchu tkáňových nosičů. Jeho účinnost tkví v přítomnosti katecholových a aminových skupin, jež slouží jako kotvení body pro biologicky aktivní molekuly, jako jsou peptidy či proteiny, čímž podporuje buněčnou adhezi. Zároveň podporuje smáčivost. [44]

#### 3.3.1 Syntetický polydopamin

Polydopaminy (PDA), jež jsou syntetizovány oxidací dopaminu (viz Obrázek 12), jsou velmi podobné přírodnímu melaninu, což je polymer v těle se běžně vyskytující, avšak oproti polydopaminu obsahující karboxylovou skupinu. Povrstvování polydopaminem bylo inspirováno mušlemi, které mají schopnost přilnout na téměř jakýkoli povrch vylučováním sekretu, který obsahuje především dihydroxyfenylalanin (DOPA) a lysin, což je bazická aminokyselina. [45]

Polymerace dopaminu je možné dosáhnout vystavením prostředí se zvýšeným pH (tzv. „pH-induced“) (nejčastěji uváděná hodnota pH 8,5) či přidáním oxidantu (tzv. „oxidant-induced“), například peroxodisíran amonný. Metody lze i kombinovat, kdy přidané oxidanty mohou proces polymerace v zásaditém prostředí urychlit. Tvorba polydopaminové vrstvy na polymerním substrátu pravděpodobně probíhá za pomoci vodíkových můstků,  $\pi$ - $\pi$  vazeb, Wan der Waalsových sil a případně kovalentních vazeb thiolových a aminových skupin prostřednictvím Schiffovy báze či Michaelovy adice. Výhoda využití dopaminu na povrstvování je jeho schopnost polymerace na široké škále substrátů, například kovy a jejich oxidy, polymery či silně hydrofobní povrchy, dále kontrolovatelná tloušťka vrstvy se slibnou trvanlivostí, a především jeho biokompatibilita. [46; 47; 48]

Například ve studii *Lynge et al.* a *Steeves et al.* bylo prokázáno, že myoblasty a buněčné linie osteosarcoma (MG-63) výrazně lépe adherovaly a proliferovaly na povrchu povrstveném právě polydopaminem. [49; 50]



Obrázek 12: Polymerizace dopaminu

## 4. Aktuální literatura týkající se problematiky funkcionalizace povrchu nanovláknenných materiálů na bázi grafenu

Tato kapitola je věnována rešerši odborné literatury, jež se věnuje problematice povrstvování povrchu nanovláknenných materiálů na bázi grafenu. Je sem zařazena, jelikož souvisí s experimentální částí diplomové práce.

*Ghorbani et al.* (2019) elektrostaticky zvláknili nanovláknenný scaffold, který byl určen pro aplikaci v kostním tkáňovém inženýrství. Byl vytvořen z polyuretanu (PU), který je schválený pro aplikaci *in vivo*, a GO, jehož koncentrace byla 1,5 hm%. Zvláknění proběhlo pod napětím 10 kV, vzdálenost kolektoru byla 20 cm, rychlost dávkování roztoku byla 0,2 ml/h. Tento materiál byl dále povrstven polydopaminem. Pro povrstvení byl použit dopamin hydrochloride (dopamin HCl), který se přidal do roztoku složeného z 1,5 mg/l HCl v 10 mM Tris pufru. Výsledné pH bylo 8,5. Materiál PU-GO byl poté v roztoku ponechán po dobu 24 hodin, za stálého míchání a v tmavém prostředí. Po uplynutí dané doby byl vzorek vyndán, třikrát propláchnut destilovanou vodou a usušen na vzduchu. Výsledný materiál se oproti nepovrstvenému materiálu vyznačoval výrazně menším kontaktním úhlem a tedy vyšší hydrofilitou, a také lepší nasákavostí. Pro určení vlivu polydopaminového filmu na bioaktivitu byl proveden test, kde byl materiál po dobu 28 dní namočen v simulované tělní tekutině (SMF) a poté byla pomocí FESEM (Field-Emission Scanning Electron Microscopy) sledována struktura mineralizované vrstvy hydroxyapatitu, který se chemicky velmi podobá anorganické části kostní matrice, a jenž byl přítomen u materiálů s PDA. Při *in vitro* buněčných testech buňky dobře prosperovaly na obou materiálech, nicméně u upraveného materiálu byla pozorována větší hustota buněk a jejich šíření. Kontrolní dny byly po 1, 3 a 7 dnech a nejlépe proliferovaly buňky na materiálu PU-GO-PDA, poté PU-GO a nakonec kontrolní buňky na plastiku. [51]

V návaznosti na tuto studii byly PU materiály před povrstvením funkcionalizovány plazmou v O<sub>2</sub> prostředí. Hydrofilita a nasákavost se touto úpravou ještě více zvýšily, spolu s mineralizační aktivitou, jež souvisí s množstvím polydopaminu na vláknech. Průměr vláken se zvýšil vlivem tvorby tlusté vrstvy PDA, a také se zvýšila homogenita jeho nánosu. Při buněčných testech bylo zjištěno, že se buňky (MG-63) na předupraveném povrchu lépe rozrůstaly a více tvořily výběžky. Přestože buňky v porovnání s kontrolou

dobře adherovaly na obou površích, vedla nehomogenita PDA vrstvy materiálu bez plazmové úpravy k horší buněčné adhezi než u materiálu s plazmovou úpravou. To je přisuzováno většímu vystavení buněk nijak nepovrstvenému povrchu. [52]

V roce 2022 byl skupinou *Egghe et al.* proveden výzkum, kde byly porovnány vlastnosti materiálu PCL přímo povrstveném vrstvou PDA, a PCL, kde před povrstvením PDA proběhla funkcionalizace povrchu plazmou v argonovém prostředí pro dočasné snížení kontaktního úhlu. Vedlo k tomu zjištění, že coating PDA přímo na hydrofobní substrát může vést k jeho nerovnoměrné distribuci z důvodu nehomogenního smáčení disperzí na všech částech materiálu. Povrstvování probíhalo v prostředí s pH 8,5 použitím Tris-HCl pufru (10mM), do kterého byl přidán dopamin (dopamine hydrochloride) v koncentraci 2 mg/ml. Vzorky byly vloženy do 24-jamkové destičky a byl k nim přidán 1 ml tohoto roztoku. Za stálého míchání na orbitální třepače rychlostí 50 ot/min byly vzorky povrstvovány po dobu 30 min, 2h nebo 4h. Poté byly z lázně vyjmuty a byly dvakrát propláchnuty destilovanou vodou a vysušeny přes noc ve vakuu při pokojové teplotě. V případě vzorků, jejichž povrch byl předtím upraven plazmou, byl proces povrstvování započat do 90 minut od plazmové aktivace. Výsledkem byla rovnoměrná depozice polydopaminu, bez bílých nepovrstvených míst, jako tomu bylo u vzorků bez předúpravy plazmou. Na SEM snímcích nebyla zjištěna výrazná změna průměru vláken po povrstvení PDA. Naopak pórovitost byla lehce snížena. Při buněčných testech byly zkoumány materiály PCL, PCL + plazma, PCL + plazma + PDA, délka experimentu byla 7 dní, s kontrolními dny 1. a 7. den. Bylo potvrzeno zlepšení cytocompatibility obou materiálů s povrchovými úpravami, kdy po nasazení buněk (HFF, lidské fibroblasty) byl jejich povrch buňkami zcela porostlý, oproti čistému PCL, kde jich bylo výrazně méně a nepokrývaly některé části materiálu. Materiály upravené kyslíkovou plazmou vykazovaly podobnou buněčnou adhezi a rozvinutí jako na materiálu PCL v částech, kde byly buňky dobře narostlé, avšak s výjimkou, že byly takto narostlé rovnoměrně po celém materiálu. Buňky na materiálu s PDA byly rovnoměrně a velmi hustě porostlé, tvořící souvislou vrstvu. [53]

Ve studii *Qian et al.* z roku 2018 byla vyrobena integrovaná vícevrstvá pomocí 3D tisku a metodou layer-by-layer casting (LBLC), kde se otáčel válec s jehlovými výstupky, na který byly tryskou nanášeny vrstvy. Nejdříve byla nanášena vrstva polydopaminu (PDA) a sekvence arginin-glycin-kyselina asparágová (RGD), pro zlepšení adheze buněk. Ta byla

překryta vrstvou PCL s přidaným jednovrstvým (SG)/vícevrstvým (MG) grafenem (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 4 %) který byl rozpuštěn v dichlormetanu. Po ztuhnutí následovala další vrstva PCL/GR a poslední vnější vrstva byla opět z PDA a RGD. Při testování cytotoxicity bylo zjištěno, že materiály s 1 % grafenu vykazovaly větší viabilitu než materiály s 2 % a 4 %, které měly negativní vliv na funkci buněk a tkání. 1 % materiály vykazovaly také lepší buněčnou proliferaci než 0,1 % a 0,2 %, a proto se výzkum dále zabývá pouze touto koncentrací. Po vytažení jehel vznikl perforovaný tubulární scaffold, na nějž byly na 1, 3, 5 a 7 dní nasazeny Schwannovy buňky. Testovaly se materiály PDA/RGD-SG/PCL, PDA/RGD-MG/PCL, PDA/RGD-PCL a PCL. Do 5. dne narůstaly buňky na všech materiálech shodně s bezmateriálovou kontrolní jamkou, avšak 7. den byly výsledky na materiálech s jednovrstvým i vícevrstvým grafenem výrazně lepší než u ostatních materiálů, přičemž PDA/RGD-SG/PCL scaffold byl nejslibnější. [54]

V roce 2017 *Fernández et al.* zkoumali mechanické vlastnosti elektricky zvlákněného PCL s PDA povrstvením, a kompozit PCL/uhlíkové nanotrubičky (CNT). Před zvlákněním byly CNT vmíchány do kyseliny mravenčí a byly ultrazvukem sonikovány po dobu 20 minut pro jejich lepší dispergaci. Poté bylo přidáno PCL a proces sonikace byl zopakován. Následně byl roztok zmrazen při  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  a ve vakuu lyofilizován ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 0,4 mbar, 24h) pro eliminaci kyseliny mravenčí. Následovalo zvláknění při  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 40% vlhkosti, vzdálenosti hliníkového (pro PCL) a měděného (PCL/CNT) kolektoru 20 cm, napětí 24 kV a rychlosti dávkování roztoku 0,4 ml/h, po dobu 1,5h. Průměry vzniklých vláken byly v rozmezí 100-200 nm. Čisté PCL materiály byly povrstveny vrstvou PDA, kdy dopamin hydrochlorid byl rozpuštěn v 700 ml Trizma-HCl v koncentraci 2 mg/l. PCL materiály byly upevněny ve vertikální pozici pro zajištění přísunu účinných látek a eliminaci usazenin na materiálu. Poté za stálého míchání v neuzavřené skleněné nádobě probíhala polymerace po dobu 1, 2, 3, 5, 8 a 24 hodin. Poté byly materiály omyty vodou, pověšeny na háčky a usušeny při pokojové teplotě. Bylo zjištěno, že při době povrstvení mezi 1 a 3 hodinami byla na vláknech vytvořena tenká souvislá vrstva PDA (15-27 nm), jejíž tloušťka s narůstajícím časem povrstvování sílila. Při 5 hodinách se na vláknech začaly tvořit agregáty, jež byly s delší dobou coatingu více zřetelné. Po 24 hodinách jimi byl pokrytý celý povrch, čímž byla narušena nanovláknenná struktura, a výška nánosu narostla na téměř 40 nm. Povrstvení bylo potvrzeno XPS analýzou. Další testy byly uskutečňovány s materiálem s 1h dobou povrstvování. Materiály byly zkoušeny v prostředí



simulujícím běžné namáhání v lidském těle, a to při teplotě 21 °C a 37 °C. Byla provedena tahová zkouška a únavová zkouška v tekutém prostředí při frekvenci 1 Hz, což simuluje klidový srdeční tep. Bylo zjištěno, že 0,5 % koncentrace CNT v PCL vláknech zlepšila mez únavy. Při tahové zkoušce bylo zjištěno, že se vlivem PDA povrstvení snížil Youngův modul z 25,5 MPa na 13,6 MPa při teplotě 21 °C. [44]

Ve studii z roku 2016 vedenou *Zhang et al.* byl připraven kompozitní nanovláknenný materiál polystyren/grafen (PS/GR), který byl vyrobený technologií DC electrospinning a funkcionalizován polydopaminem. Materiál byl určen jako adsorbent pro determinaci aldehydových metabolitů v lidské moči. Celý materiál byl vyroben na filtračním papíře a byl použit pro tenkovrstvou mikroextrakci (thin-film microextraction, TFME). Pro výrobu nanovláknenné vrstvy bylo nejdříve 40 mg grafenu ultrazvukem 5 hodin dispergováno v 10 ml DMF (dimethylformamid). Poté bylo 1,5 g PS rozpuštěno při zahřátí v roztoku a vše bylo mícháno 48 hodin pro co největší homogenitu roztoku. Ten byl poté zvlákněn. Kolektor byl vzdálen 20 cm a byl pokryt hliníkovou fólií a filtračním papírem. Napětí bylo 18 kV, rychlost dávkování roztoku byla 0,8 ml/h, doba zvláknování 4h. Nakonec bylo vše sušeno při 60 °C. Poté byla tato vláknenná vrstva funkcionalizována polydopaminem. Nejdříve byl dopamin hydrochlorid rozpuštěn v roztoku Tris-HCl (pH 8,5, 10 nM) a metanolu, v poměru 1:1. Koncentrace dopaminu byla 2 mg/ml. Poté byl vložen materiál, na němž se nechal polymerizovat dopamin po dobu 24 hodin. Po vyndání byl několikrát propláchnut destilovanou vodou a hodinu sušen ve vakuu při 70 °C. Na TEM (Transmisní elektronová mikroskopie) bylo zjištěno, že povrch materiálu s grafenem měl listovitou strukturu, což indikuje, že grafen byl nejspíše inkorporován ve vláknech. Naopak na materiálech povrstvených PDA byly přítomny velké shluky částic potvrzující jeho přítomnost. Pomocí SEM a TEM byla potvrzena vrstva PDA 40 nm. Povrstvením bylo dosaženo významného snížení kontaktního úhlu, u materiálu PS/GR z 137,8 ° na 74,7 °. Tato funkcionalizace výrazně zlepšila účinnost extrakce, k čemuž byla navrhována. Doba povrstvování byla zvolena na základě empirických testů, kdy z časů 0h, 12h, 24h a 36h byla účinnost extrakce při 24h nejvyšší, což je zdůvodněno korelací doby polymerace se vzrůstající filtrační účinností, ale i s ucpáváním pórů. [55]

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části byla hydrofilizace PCL materiálu s vysokým obsahem grafenu (PCL:GR 9:0, 9:1, 9:5 a 9:9), aby byla podpořena adheze a následně i proliferace buněk, jež obvykle preferují hydrofilní materiály. Zvýšení smáčivosti bylo provedeno povrstvením polydopaminem, jenž by měl podle literatury zvýšit přilnavost vlivem přítomnosti hydroxylových (katecholových) a dusíkatých (aminových) skupin, jimiž může být na materiál navázán.

Výsledné materiály byly poté charakterizovány. Byly změřeny průměry vláken, elektrická rezistivita a kontaktní úhel a porovnán vzhled vlákenné vrstvy. Byla potvrzena přítomnost polydopaminu. Nakonec byly uskutečněny buněčné testy, kde byla zkoumána cytotoxicita výluhu materiálů, a byl proveden *in vitro* test buněčné adheze a proliferace, při kterém byly na materiály nasazeny buňky.



## 5. Metody

V této kapitole jsou uvedeny všechny postupy, jež byly použity v praktické části této diplomové práce.

### 5.1 Výroba PCL:GR nanovláken

Vlákna byla vyrobena metodou AC elektrospinning. Nejdříve byl PCL (9 hm. %) rozpuštěn v kyselině mravenčí, kyselině octové a acetonu v poměru 1:1:1. Poté byl přidán grafen. Poměr PCL:GR ve 100 g roztoku byl 9:0, 9:1, 9:5 a 9:9. Dle tohoto poměru byly pojmenovány hotové vrstvy. K lepší dispergaci grafenu bylo použito velmi malé množství povrchově aktivní látky (jar). Poté proběhlo zvlákňování. Parametry zvlákňování jsou uvedeny v Tabulce 1. Vzniklá nanovláknenná vrstva byla poté slisována pro snížení elektrické rezistivity. Lisování probíhalo na lisu typu HVL 15.2 (Pracovní stroje Teplice, Česká republika). Tyto parametry jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 1: Parametry zvlákňování

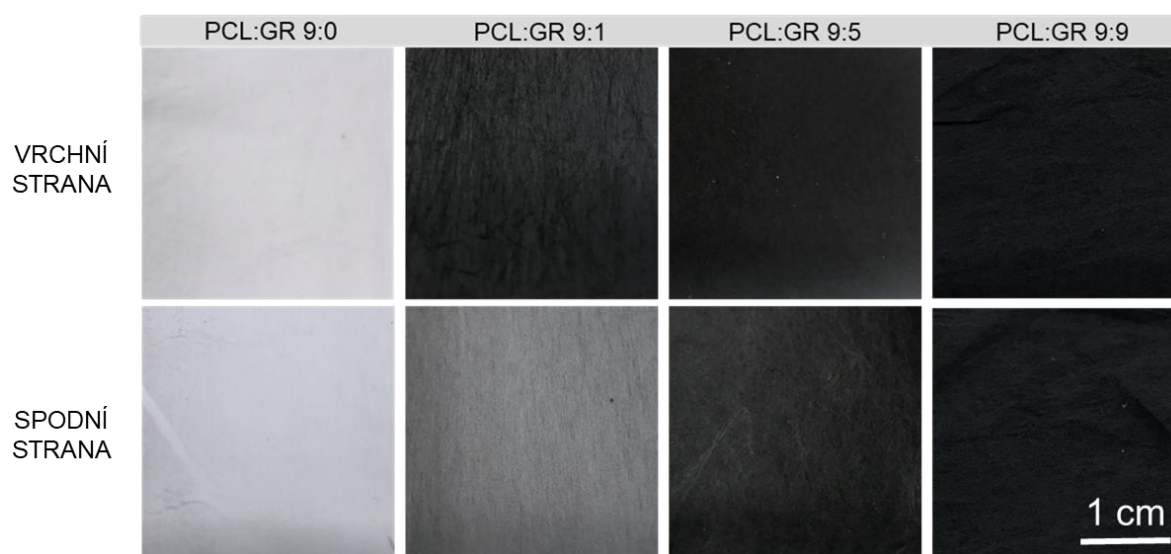
Parametry zvlákňování	
<b>Napětí</b>	35 kV
<b>Otáčky šnekového čerpadla</b>	600 ot/min
<b>Obvod bubnového kolektoru</b>	1 m
<b>Vzdálenost kolektoru</b>	200 mm
<b>Rychlost otáčení kolektoru</b>	30-45 ot/min
<b>Průměr hlavy zvlákňovací elektrody</b>	22 mm
<b>Teplota/vlhkost ve zvlákňovací komoře</b>	20-21 °C / 45-52 %
<b>Doba zvlákňování</b>	60 min

Tabulka 2: Parametry lisování

Parametry lisování	
<b>Síla</b>	70 kN
<b>Tlakování</b>	5 kN/s
<b>Doba lisování</b>	1 s
<b>Teplota desek</b>	20 °C
<b>Velikost lisovaného vzorku</b>	10x10 cm

Výsledná nanovláknenná vrstva nebyla homogenní (viz Obrázek 13), ale bylo vidět, že jedna strana obsahovala vyšší koncentraci grafenu, jelikož byla tmavší než druhá strana. Je to vidět především u materiálů s nižší koncentrací grafenu, hlavně PCL:GR 9:1, méně

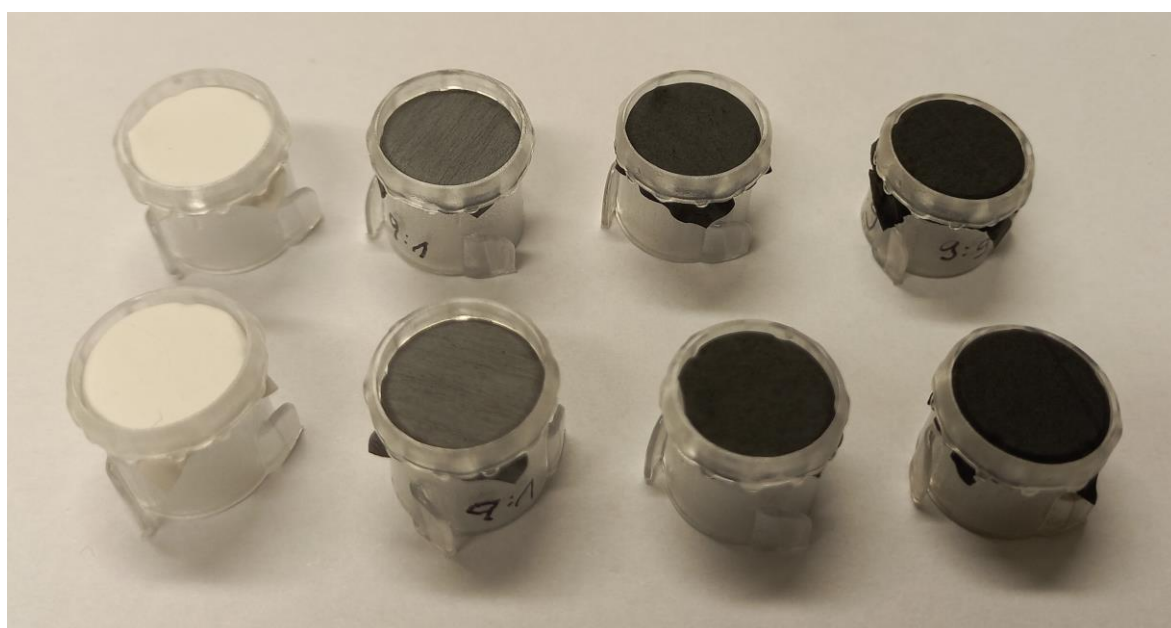
u PCL:GR 9:5. U PCL:GR 9:9 nebyl okem rozeznatelný rozdíl ve zbarvení vrstvy. Strany byly pečlivě označeny.



Obrázek 13: Rozdíl ve zbarvení vrchní a spodní strany materiálu

## 5.2 Povrstvení polydopaminem

Vzorky byly připraveny do korunek CellCrown™ (velikost do 24jamkové destičky), vrchní stranou směřující dovnitř korunky (viz Obrázek 14).



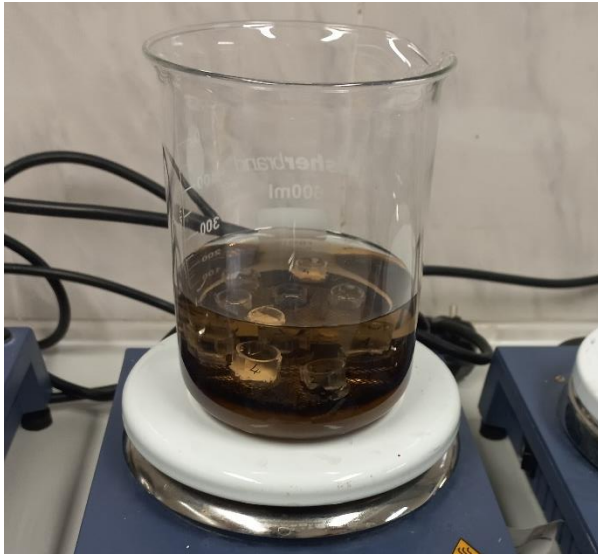
Obrázek 14: Připravené vzorky v korunkách CellCrown

Povrch vytvořené nanovlákněné vrstvy byl poté funkcionalizován vrstvou polydopaminu pro snížení kontaktního úhlu. K polymeraci dopaminu byl použit roztok s pH 8,5. Toho bylo dosaženo smícháním destilované vody s Tris-HCl. Z literatury je známé, že prostředí s alkalickým pH iniciuje samovolnou polymeraci dopaminu. Složení lázně je uvedeno v Tabulce 3.

*Tabulka 3: Složení povrstvovací lázně a použité vybavení*

<b>Složení povrstvovací lázně</b>	
<b>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</b>	0,30 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	250 ml
<b>35 % HCl</b>	66 µl
<b>3-Hydroxytyramine Hydrochloride</b>	0,50 g

Nejprve bylo naváženo 0,30 g Tris (Sigma Aldrich, ČR). To bylo poté kvantitativně převedeno do odměrného válce, který byl následně dolit destilovanou vodou do 250 ml. Poté byl obsah odměrného válce přelit do kádinky, do které bylo následně napipetováno 66 µl 35 % HCl (Penta Chemicals, ČR). Nakonec bylo přidáno 0,50 g dopaminu (3-Hydroxytyramine Hydrochloride) (TCI Chemicals, ČR), přidalo se míchátko a kádinka se umístila na míchačku značky DragonLab, na které byla nastavena rychlost 300 otáček za minutu. Po rozmíchání dopaminu byly otáčky sníženy na 250 otáček za minutu a bylo přidáno sítko, na které se vnitřní stranou dolů umístily připravené vzorečky (viz Obrázek 15). V tuto chvíli již začínala lázeň žloutnout. Vzorky byly ponechány v lázni po dobu čtyř hodin. Po uplynutí této doby byly vyzvednuty a propláchnuty destilovanou vodou nejdříve v kádince, poté stříčkou. Nakonec se nechaly přirozeně vyschnout po dobu alespoň tří dnů.



Obrázek 15: Povrstvovací lázeň

### 5.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Vzorky určené pro SEM s nižším přiblížením byly na zlatičce Quorum Q150R ES (Quorum Technologies) pokryty vrstvou zlata o výšce 10 nm a dále byly snímány na SEM TESCAN VEGA SB Easy Probe (TESCAN, Česká republika). Detailněji snímané vzorky byly pokryty vrstvou platiny o výšce 1 nm, opět na zlatičce Quorum Q150R ES (Quorum Technologies), a byly snímány na SEM ZEISS ultra plus FE-SEM.

### 5.4 Měření průměrů vláken

Po úspěšném zvláknění připravených směsí byla ověřena velikost a tvar vzniklých vláken. Byly tedy připraveny vzorky, jež byly prohlédnuty na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Na snímcích se zvětšením 5000x byly poté v programu ImageJ ručně změřeny průměry vláken. Na každém materiálu bylo provedeno 300 měření.

### 5.5 Měření kontaktního úhlu

U vrstev byla také hodnocena smáčivost, pomocí měření kontaktního úhlu (dpiMAX, dataphysics, Německo). Materiál byl vnitřní stranou vzhůru položen na podložní sklíčko

(případně na krajích přilepen oboustrannou lepicí páskou) a na materiál byly kapány kapičky destilované vody (objem 1  $\mu$ l). Pomocí softwaru dpiMAX pro měření kontaktního úhlu byl změřen kontaktní úhel. Pro každý materiál bylo provedeno 15 měření a kontaktní úhel byl snímán v prvních pěti vteřinách od kontaktu kapky s materiálem.

## 5.6 Měření plošné elektrické rezistivity

Na zařízení Keithley 8009 a Keithley 6517A electrometer (Tektronic, USA) byl změřen plošný elektrický odpor, který byl dále přepočítán na plošnou elektrickou rezistivitu, což je převrácená hodnota plošné elektrické vodivosti, dle vztahu:

$$\text{plošná rezistivita } [\Omega] = \frac{\text{průměr vzorku}}{\text{vzdálenost elektrod}} * \text{plošný odpor}$$

Vzdálenost elektrod byla 3,175 mm. Průměr vzorků bez povrstvení byl 20 mm a průměr vzorků s povrstvením byl 9,5 mm.

## 5.7 Buněčné testy

Pro uskutečnění buněčných testů byly všechny materiály sterilizovány etylenoxidem (Aprolene, UK) při 37 °C po dobu 12 hodin. Ten byl poté odvětráván po dobu sedmi dnů.

### 5.7.1 Cytotoxicita

Aby bylo zjištěno, zda jsou případné uvolňující látky z materiálů škodlivé pro buňky, bylo provedeno měření cytotoxicity dle normy ČSN EN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. K tomu byl připraven výluh ze všech zkoumaných materiálů. Ke 100 g materiálu bylo přidáno 10 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biosera, Francie), což je kultivační médium pro výživu buněk, které obsahuje například živiny, anorganické soli a pufrý, aminokyseliny, růstové faktory, glukózu, vitaminy, proteiny, peptidy a fenolovou červeň pro kontrolu stavu. [56] Materiál se s tímto médiem ponechal louhovat po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Pro zajištění stejných podmínek bylo čisté DMEM pro kontroly také

vloženo do třepačky. Tyto výluhy (10 ml) byly přidány do 100 µl mikrotitračních destiček k buněčné linii 3T3 myší fibroblasty, jež byly nasazeny předchozí den v koncentraci 10 000 buněk na jednu jamku. Byly připraveny i kontroly. Negativní kontrola bylo čisté DMEM přidáno k buňkám a pozitivní kontrolou byl 0,1 % TRITON-X v DMEM, který je pro buňky toxický (jako povrchově aktivní látka narušuje membránu). Následovala inkubace po dobu 24 hodin. Poté bylo vše odsáto a do každé jamky se přidalo 100 µl 10 % CCK-8 (Cell Counting Kit-8) rozpuštěného v DMEM. V závislosti na metabolické aktivitě buněk dochází ke změně zbarvení roztoku. Po tříhodinové inkubaci byla na spektrofotometru Spark (TECAN, Švýcarsko) změřena absorbance při vlnové délce 450 nm, z níž byla vypočtena procentuální viabilita buněk dle vztahu:

$$\text{viabilita buněk (\%)} = \frac{\text{průměrná absorbance vzorku}}{\text{průměrná absorbance NK}} * 100$$

### **5.7.2 Test buněčné adheze a proliferace**

Na materiály povrstvené polydopaminem byla nasazena buněčná linie 3T3 myší fibroblasty (10 000 buněk v 1 ml DMEM na jeden vzorek). DMEM se pravidelně měnilo každé 2-3 dny. Společně s povrstvenými materiály byly testovány i materiály bez PDA, a to pouze PCL:GR 9:0 a PCL:GR 9:9. Jako kontroly sloužily buňky kultivované na plastiku. Testovací dny byly po 2, 7, a 14 dnech od nasazení buněk, kdy byly dva vzorky od každého materiálu připraveny na focení na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika).

Příprava preparátů na fluorescenční mikroskopii probíhala následovně: bylo odsáto médium a byl proveden proplach PBS (fosfátový pufr), což je fosfátem pufovaný solný roztok, který slouží ke stabilizaci pH. Poté byly materiály přendány do nové destičky a byl přidán 1 ml 2,5 % glutaraldehyd pro zafixování vzorků v lednici po dobu 15-20 minut. Ten byl poté odsát, vše se opět propláchno PBS a byl přidán permeabilizační roztok (1 ml PBS, 1 µl TRITON-X, 1 mg BSA na jamku) pro narušení buněčné membrány, a tedy umožnění následného barvení buněčných jader a cytoskeletu. Doba působení byla 5 minut. Roztok byl poté odsát a provedl se oplach PBS. Cytoskelety zafixovaných buněk byly poté obarveny barvicím roztokem složeným z phalloidinu FITC a permeabilizačního roztoku v poměru 1:1000. Do každé jamky bylo přidáno 300 µl tohoto roztoku a vzorky se nechaly



inkubovat po dobu 30 minut. Během této byly vzorky obaleny v alobalu, aby se k nim nedostalo světlo. Toto barvivo bylo poté odsáto a buňky byly opět opláchnuty roztokem PBS. Jádra byla obarvena barvivem DAPI v PBS v poměru 1:1000. Opět bylo do každé jamky přidáno 300  $\mu$ l tohoto barviva. Poté byly vzorky inkubovány po dobu pěti minut. Následně bylo barvivo odsáto a buňky byly opláchnuty PBS.

Životaschopnost použitých buněk byla ověřena přidáním 1 ml 10 % CCK-8 rozpuštěném v médiu do kontrolních jamek s buňkami bez materiálu. Inkubace byla po dobu tří hodin v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté bylo 200  $\mu$ l obarveného média přepipetována do mikrotitrační destičky a zkontrolována na spektrofotometru Spark (TECAN, Švýcarsko).

## 5.8 Statistické zpracování

Výsledky byly vyhodnoceny v programu Microsoft Excel a následně GraphPad. Z naměřených hodnot se udělal průměr a byl určen 95 % interval spolehlivosti (IS), jehož rozsah znázorňují chybové úsečky a který říká, že s 95 % jistotou se průměr nachází v daném intervalu. IS byl buď v programu Microsoft Excel dopočítán funkcí CONFIDENCE na základě hladiny významnosti (0,05), směrodatné odchylky (SD) a počtu měření, jejíž hodnota byla přičtena a odečtena od průměru, či byl automaticky určen v programu GraphPad. Výsledky jsou ve formátu průměr  $\pm$  CONFIDENCE. Poté byly v programu GraphPad vytvořeny grafy a provedeny statistické analýzy. Nejdříve byla určena normalita dat dle p-hodnoty použitím Shapiro-Wilk testu normality. Pokud byla p-hodnota vyšší než 0,05, předpokládalo se Gaussovo rozdělení. Poté byla zvolena vhodná analýza rozdílnosti dat.

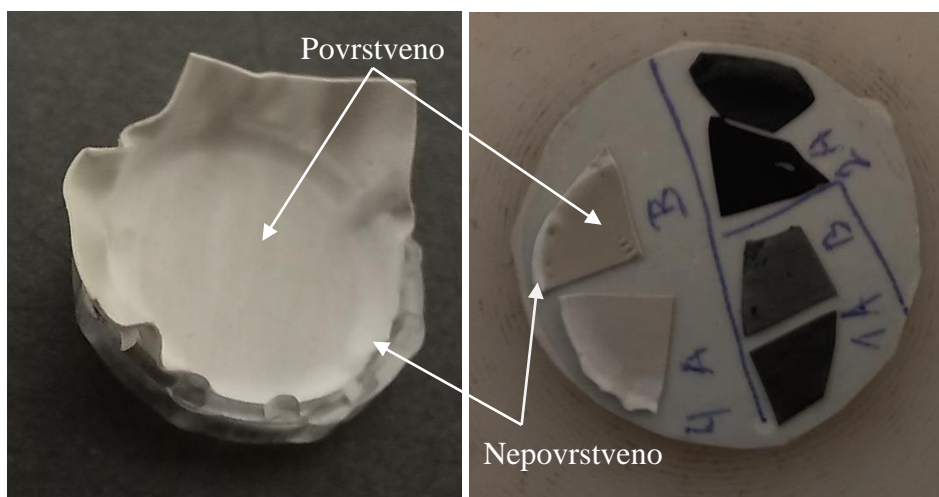
U dat s normálním rozdělením a předpokládanou stejnou směrodatnou odchylkou u datových sad, byla provedena analýza rozptylu ANOVA. Při předpokladu různých hodnot SD bylo použito Brown-Forsythe and Welch ANOVA testu. Při nenormálním rozdělení dat byl použit Kruskal-Wallis test. V případě sdružených dat s časovými návaznostmi byla provedena 2way ANOVA. Porovnání datových sad bylo učiněno pomocí Tukeyho metody vícenásobného porovnání (po 1way ANOVA a 2way ANOVA), případně Dunnettův T3 test vícenásobného porovnání (Brown-Forsythe and Welch ANOVA test), nebo Dunnův test (Kruskal-Wallis test).

## 6. Výsledky

V této kapitole jsou uvedeny a popsány výsledky, jichž bylo dosaženo postupy zveřejněnými v kapitole 5.

### 6.1 Povrstvení polydopaminem

Po povrstvení byla patrná změna barvy u materiálu z čistého PCL v místech, kde byl v kontaktu s lázní (viz Obrázek 16). U materiálu s přidaným grafenem toto ztmavnutí nebylo pozorováno z důvodu již přítomného tmavého zbarvení. V některých případech byla také pozorována nehomogenita polydopaminové vrstvy, kdy na materiálu PCL:GR 9:0 + PDA zůstala viditelná bílá místa.



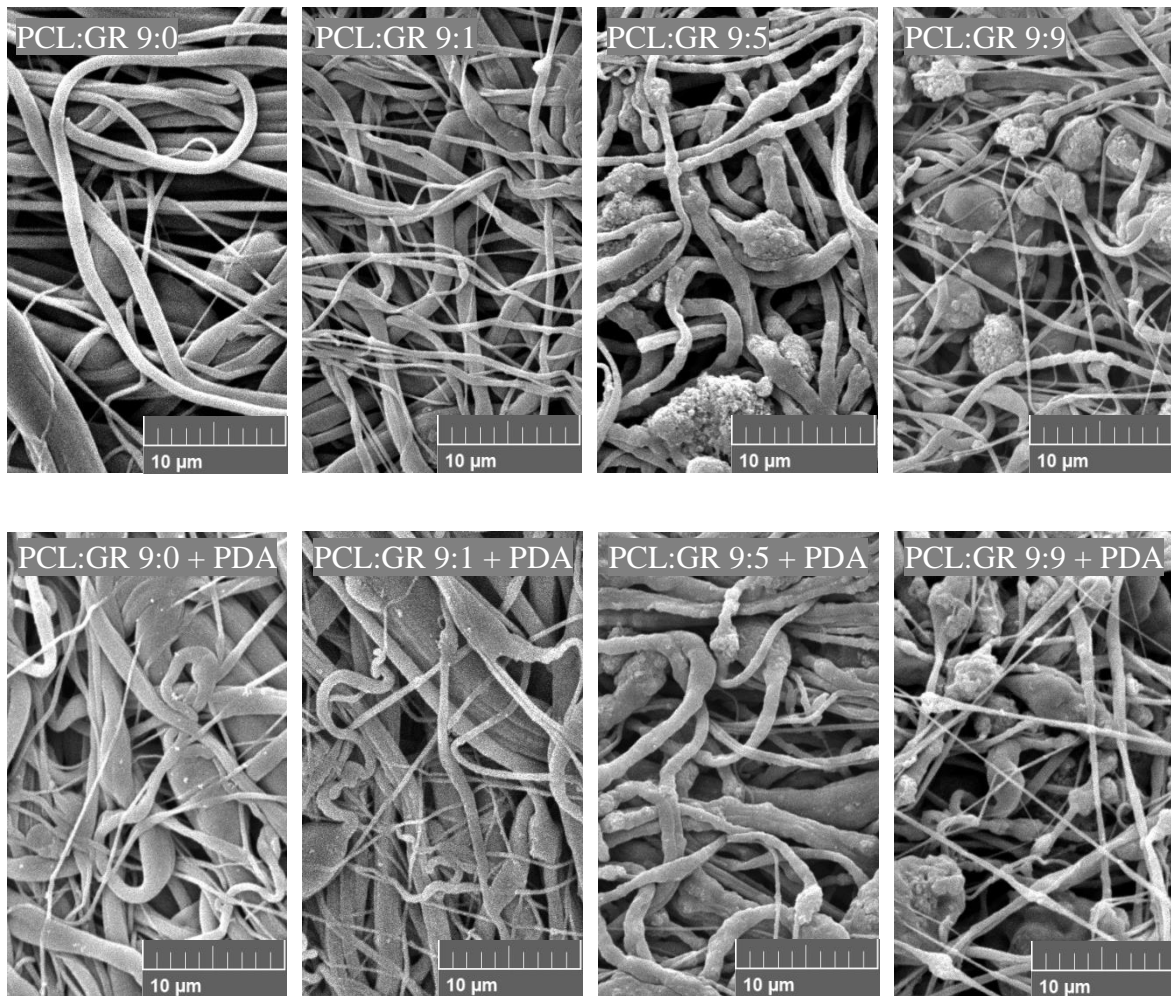
Obrázek 16: Změna zbarvení materiálu

### 6.2 Charakterizace materiálu

V rámci charakterizace materiálu byly měřeny průměry vláken, kontaktní úhel a plošná elektrická rezistivita. Zároveň byla prokázána přítomnost polydopaminu.

### 6.2.1 Struktura vláken

Ze snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (viz Obrázek 17) lze odhadnout, že se jedná převážně o izotropní nanovláknennou vrstvu, kde jsou v textiliích s vysokým obsahem grafenu dobře pozorovatelné shluky grafenových vloček. Dále je patrná vysoká nehomogenita průměrů vláken.



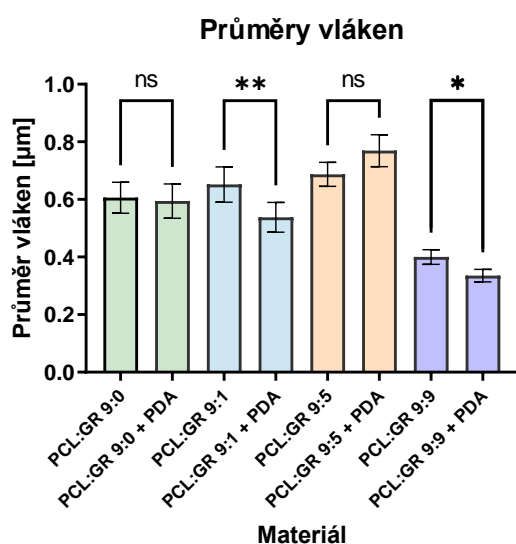
Obrázek 17: Struktura materiálů; 1. řada bez PDA, 2. řada s PDA

## 6.2.2 Průměr vláken

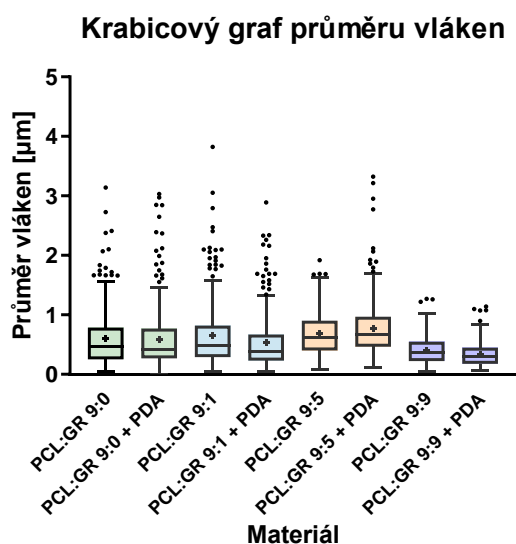
Výsledky z měření průměrů vláken rovněž naznačují, že se procesem povrstvování významně nezměnily rozměry vláken, tedy že nedošlo například k bobtnání či jejich poničení. U materiálů PCL:GR 9:1 a PCL:GR 9:9 je možné si povšimnout snížení průměru vláken. S přihlédnutím k IS, jenž se u materiálu těchto materiálů velmi těsně nepřekrývá, je možné říci, že tento rozdíl je patrný, ale není značný. Statisticky dle p-hodnoty je rozdíl hodnocen jednou až dvěma hvězdičkami, nicméně je nutné si uvědomit neparametrické rozložení hodnot a z toho vyplývající nižší přesnost statistického vyhodnocení. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4 a porovnány na Obrázku 18 a 19. Ve spojení s histogramy na Obrázku 20, kde jsou porovnány třídní četnosti průměrů, je možné získat ucelený přehled o velikosti i distribuci průměrů vláken v materiálech.

Tabulka 4: Průměry vláken

PRŮMĚRY VLÁKEN					
	Vzorek	Průměr [ $\mu\text{m}$ ]	95 % IS	SD	
PŮVODNÍ PCL:GR	9:0	0,606	(0,552;0,660)	0,4753	
	9:1	0,652	(0,590;0,713)	0,5392	
	9:5	0,687	(0,646;0,729)	0,3672	
	9:9	0,400	(0,374;0,426)	0,2257	
POVRSTVENÉ PCL:GR + PDA	9:0	0,594	(0,535;0,654)	0,5250	
	9:1	0,538	(0,486;0,589)	0,4515	
	9:5	0,770	(0,715;0,825)	0,4873	
	9:9	0,335	(0,313;0,357)	0,1934	



Obrázek 18: Průměry vláken; statistické zpracování – Kruskal-Wallis test (\*  $p < 0,0332$ , \*\*  $p < 0,0021$ , \*\*\*  $p < 0,0002$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; značí statistickou významnost rozdílnosti dat)



Obrázek 19: Box-plot distribuce průměru vláken

Průměry vláken se pohybovaly mezi 335 nm a 770 nm. Nejtenčí vlákna vykazoval materiál PCL:GR 9:9, bez přítomnosti i s přítomností PDA ( $400 \pm 26$  nm,  $335 \pm 22$  nm). Z boxplotu a histogramu je také vidět, že tyto materiály měly málo odlehlých měření a že byla vlákna stejnoměrnější, než je tomu u ostatních materiálů. Histogram povrstveného materiálu byl také špičatější než u původního materiálu, který má širší distribuci, a jeho průměr se blíží k mediánu. Medián PCL:GR 9:9 byl 363 nm a u PCL:GR 9:9 + PDA byl 300 nm.

Naopak největších průměrů vláken dosahoval materiál PCL:GR 9:5 + PDA, kde průměrná hodnota činila  $770 \pm 55$  nm a medián byl 623 nm, spolu s PCL:GR 9:5, jehož průměr byl  $687 \pm 42$  nm a medián byl 673 nm. Z Obrázku 19 a 20 je vidět, že má materiál PCL:GR 9:5 + PDA hodně odlehlých měření, které mají vliv na výši průměrné hodnoty, což je vidět na rozdílnosti hodnot průměru a mediánu. U PCL:GR 9:5 bylo odlehlých hodnot málo a byly posunuty níže, a ze všech materiálů se průměr nejbližší blíží mediánu. Z histogramu je patrná širší distribuce průměrů u povrstveného materiálu a grafy, především u povrstveného materiálu, byly nejméně špičaté ze zkoumaných vzorků.

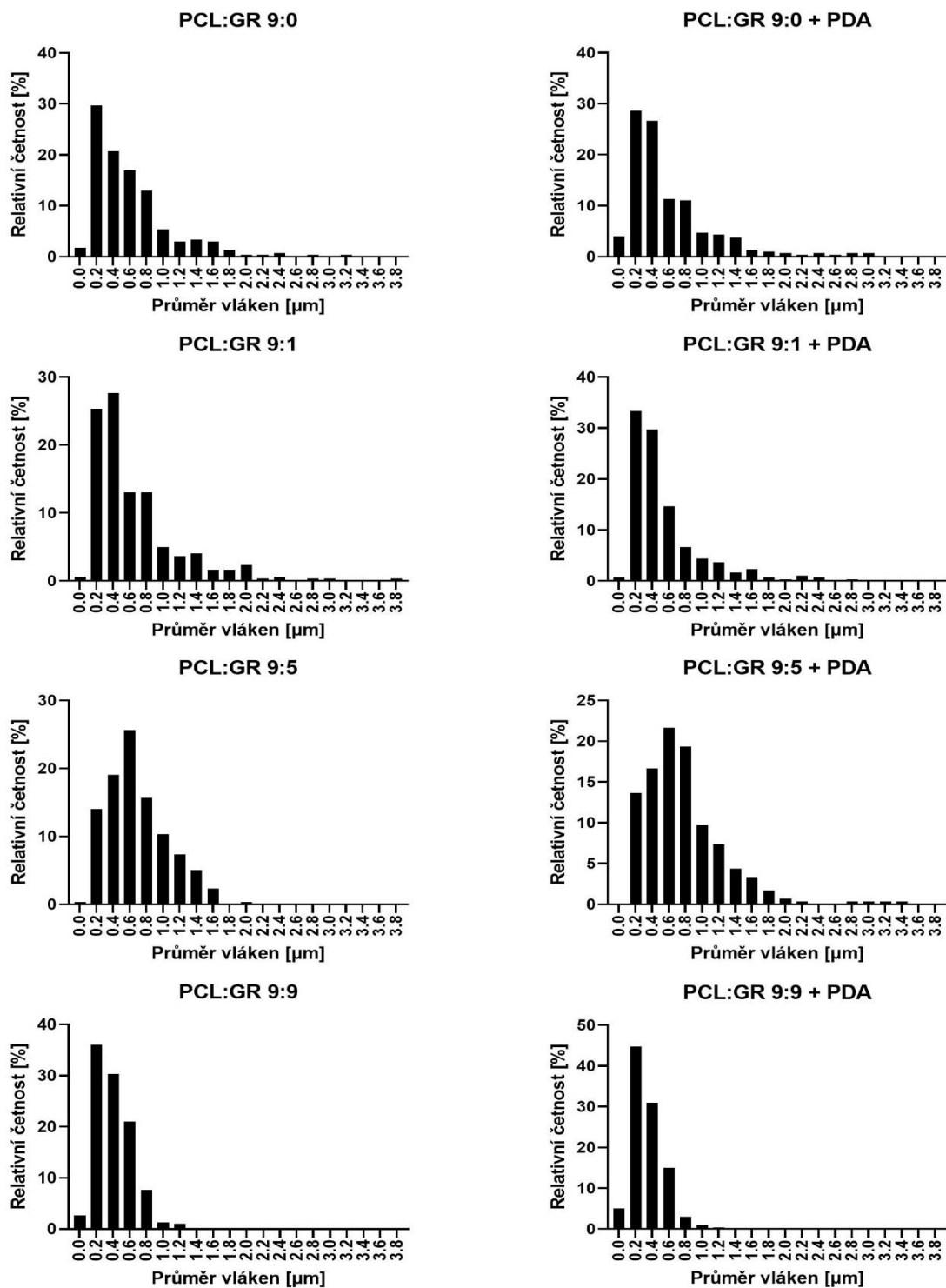
Průměr vláken materiálu PCL:GR 9:1 se po povrstvení změnil z  $652 \pm 61$  nm na  $538 \pm 51$  nm. Z box-plotu a histogramu je vidět, že PCL:GR 9:1 obsahuje velké množství odlehlých hodnot měření, které velmi výrazně posouvají průměr nahoru. Je to vidět i na hodnotách mediánu, které jsou pro materiál bez povrstvení 479 nm a pro materiál s coatingem 380 nm, což je značný rozdíl oproti průměru. Na histogramu je vidět velmi výrazné zešíkmení zprava u obou materiálů.

U materiálu PCL:GR 9:0 se průměrná hodnota vláken takřka nezměnila. Původní materiál má průměrnou hodnotu  $606 \pm 54$  nm a medián 468 nm, a průměr upraveného materiálu je  $594 \pm 60$  nm, s mediánem 409 nm. Tyto materiály také vykazují vysokou nehomogenitu průměru vláken, kdy je opět přítomno mnoho odlehlých hodnot, což je vidět na krabicovém grafu (Obrázek 19) i na histogramu (Obrázek 20).

Distribuce průměrů vláken byla tedy nerovnoměrná. U všech grafů je možné si povšimnout zešíkmení zprava, což posouvá průměr výše, než je medián. To je dobře vidět na grafu třídních četností průměrů vláken (Obrázek 20) i na krabicovém grafu (Obrázku 19). Největší homogenitu průměrů vláken dle histogramu i dle SD vykazovaly materiály PCL:GR 9:9 + PDA, poté PCL:GR 9:9 a materiál PCL:GR 9:5. Tyto se také nejvíce

podobají normálnímu rozdělení. Ostatní materiály byly silně nehomogenní, kdy největší heterogenitu průměrů vláken vykazovaly materiály PCL:GR 9:1, poté PCL:GR 9:0 + PDA, PCL:GR 9:5 + PDA, PCL:GR 9:0 a PCL:GR 9:1 + PDA.

## Distribuce průměru vláken - histogram



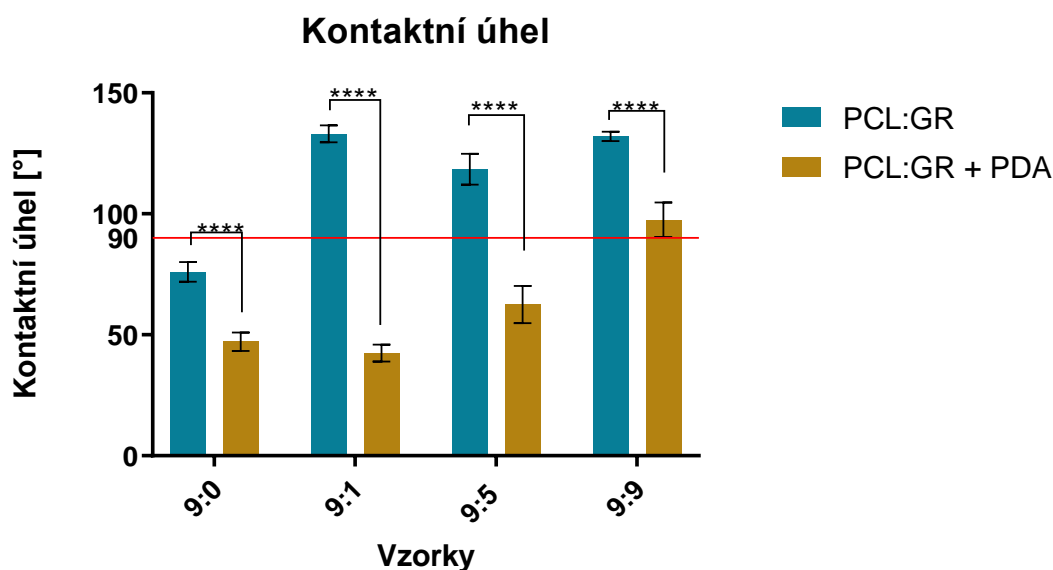
Obrázek 20: Relativní četnost rozložení průměru vláken

### 6.2.3 Kontaktní úhel

Kontaktní úhel určuje míru smáčivosti materiálu. Je-li tento úhel větší než 90°, jedná se o nesmáčivý (tj. hydrofobní) materiál, a pokud je úhel menší než 90°, je materiál smáčivý (tj. hydrofilní). Textilie byla smáčena destilovanou vodou. Výsledky jsou znázorněny v Tabulce 5 a na Obrázku 21.

Tabulka 5: Statistické zpracování výsledků měření kontaktního úhlu

KONTAKTNÍ ÚHEL				
	Vzorek	Kontaktní úhel [°]	IS	SD
PŮVODNÍ PCL:GR	9:0	75,96	(72,02;79,90)	7,362
	9:1	133,11	(129,73;136,50)	6,336
	9:5	118,48	(112,30;124,65)	11,54
	9:9	132,03	(130,18;133,87)	3,448
POVRSTVENÉ PCL:GR + PDA	9:0	47,14	(43,42;50,87)	6,957
	9:1	42,42	(39,03;45,81)	6,341
	9:5	62,50	(55,07;69,93)	13,89
	9:9	97,61	(90,73;104,49)	12,86



Obrázek 21: Výsledky měření kontaktního úhlu se statistickým zpracováním. Hvězdičky značí statistickou významnost rozdílnosti dat (\* = statisticky nevýznamná rozdílnost dat, \*\*\*\* = velmi rozdílná data). Byl použit Brown-Forsythe and Welch ANOVA test (\*  $p < 0,0332$ , \*\*  $p < 0,0021$ , \*\*\*  $p < 0,0002$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Bylo zjištěno, že ve všech případech se kontaktní úhel po povrstvení polydopaminem snížil. Toto snížení je statisticky významné (viz Obrázek 21). Původní materiály byly

s výjimkou čistého PCL hydrofobní, nicméně po úpravě kontaktní úhly odpovídají hydrofilním materiálům. Výjimku tvoří PCL:GR 9:9 + PDA, jenž je na hranici smáčivosti. Jeho kontaktní úhel se změnil z  $132,03 \pm 1,85^\circ$  na  $97,61 \pm 6,88^\circ$ . U materiálu PCL:GR 9:0 se kontaktní úhel snížil z  $75,96 \pm 3,94^\circ$  na  $47,14 \pm 3,725^\circ$ . U materiálu PCL:GR 9:1 byl rozdíl nejznatelnější, a to z  $133,11 \pm 3,39^\circ$  na  $42,42 \pm 3,39^\circ$ . Kontaktní úhel materiálu PCL:GR 9:5 se snížil z  $118,48 \pm 6,175^\circ$  na  $62,50 \pm 7,43^\circ$ . Pokud pomineme propad kontaktního úhlu na materiálu PCL:GR 9:1, jehož IS se však překrývá s IS PCL:GR 9:0 a mohou tedy mít stejnou průměrnou hodnotu, tak se dá říci, že kontaktní úhel u povrstvených materiálů vzrůstal v závislosti na koncentraci grafenu.

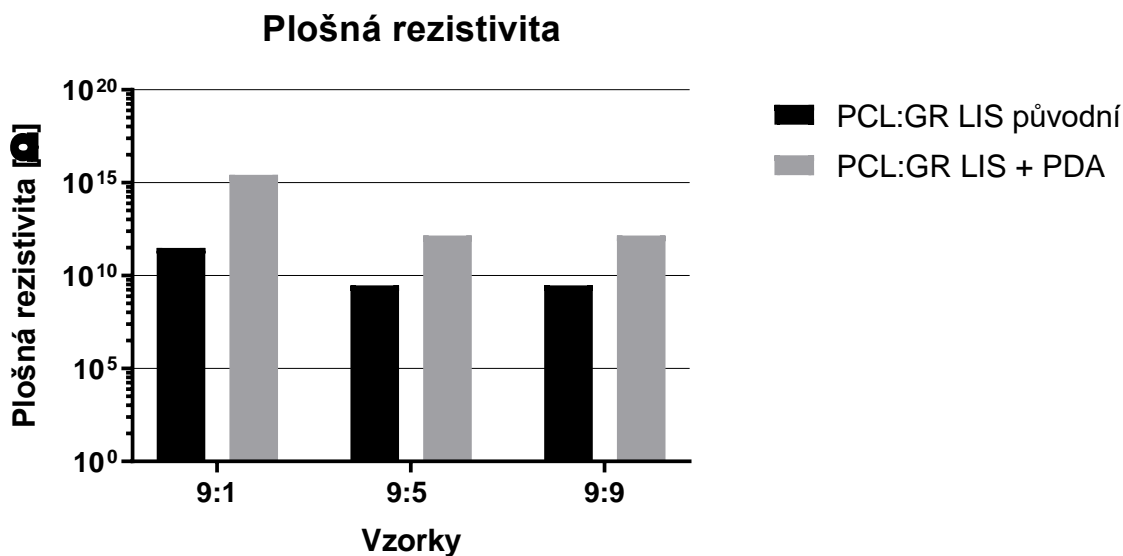
#### 6.2.4 Plošná elektrická rezistivita

V rámci charakterizace materiálu byla měřena plošná elektrická rezistivita. Vzhledem k vodivým vlastnostem grafenu se dá jeho přidáním očekávat snížení rezistivity materiálu, což může být velmi přínosné pro jeho aplikace například v oblasti neurologie. Tento materiál by mohl být vhodný pro elektrostimulaci buněk a podpořit šíření signálů mezi nimi, případně umožnit přemostění mezi přerušenými částmi nervů, pokud by byla schválena jeho aplikace *in vivo*. Výsledky jsou znázorněny v Tabulce 6 a na Obrázku 22.

Tabulka 6: Plošná rezistivita

PLOŠNÁ REZISTIVITA		
	Vzorek	Plošná rezistivita [ $\Omega$ ]
<b>PŮVODNÍ PCL:GR</b>	9:1	$3,09 \cdot 10^{11}$
	9:5	$3,01 \cdot 10^9$
	9:9	$3,02 \cdot 10^9$
<b>POVRSTVENÉ PCL:GR + PDA</b>	9:1	$2,69 \cdot 10^{15}$
	9:5	$1,44 \cdot 10^{12}$
	9:9	$1,44 \cdot 10^{12}$



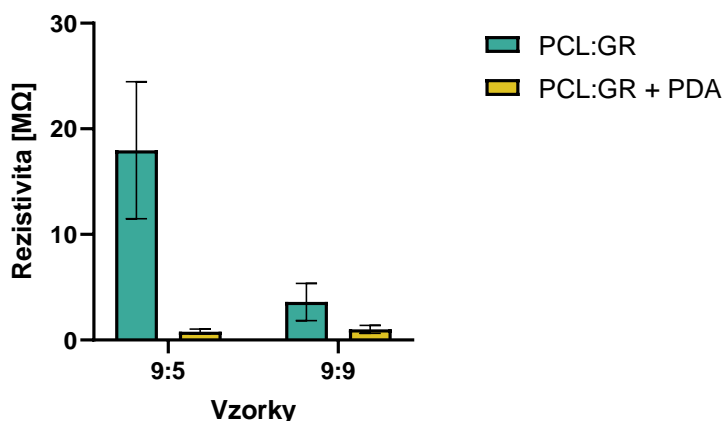


Obrázek 22: Plošná rezistivita, měřeno na zařízení značky Keithley

Je možné vidět, že u všech testovaných materiálů došlo k významnému zvýšení plošné rezistivity, a tedy snížení vodivosti, a to nejméně o tři řády. Rezistivita PCL:GR 9:1 se po povrstvení zvýšila z 309 GΩ na 2,69 PΩ (tedy z řádu 10<sup>11</sup> Ω na 10<sup>15</sup> Ω), dále rezistivita PCL:GR 9:5 se změnila 3,01 GΩ na 1,44 TΩ (z 10<sup>9</sup> Ω na 10<sup>12</sup> Ω) a obdobně se zvýšila i rezistivita materiálu PCL:GR 9:9 z 3,02 GΩ na 1,44 TΩ (10<sup>9</sup> Ω na 10<sup>12</sup> Ω). Mohlo by to být dáno tím, že vrstva PDA překrývá grafenové struktury na povrchu. V průběhu měření materiálu PCL:GR 9:0 a PCL:GR 9:0 PDA také narůstal elektrický odpor, což je nejspíše důsledek polarizace materiálů. Z tohoto důvodu nebyly do měření zařazeny.

Bylo provedeno kontrolní měření multimetrem TrueRMS SUPERMETER® HHM290 značky OMEGA™, jenž má měřící rozsah do 41 MΩ. Vzdálenost elektrod byla 1 cm a bylo provedeno 10 měření. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 23.

### Plošná rezistivita - měření multimetrem

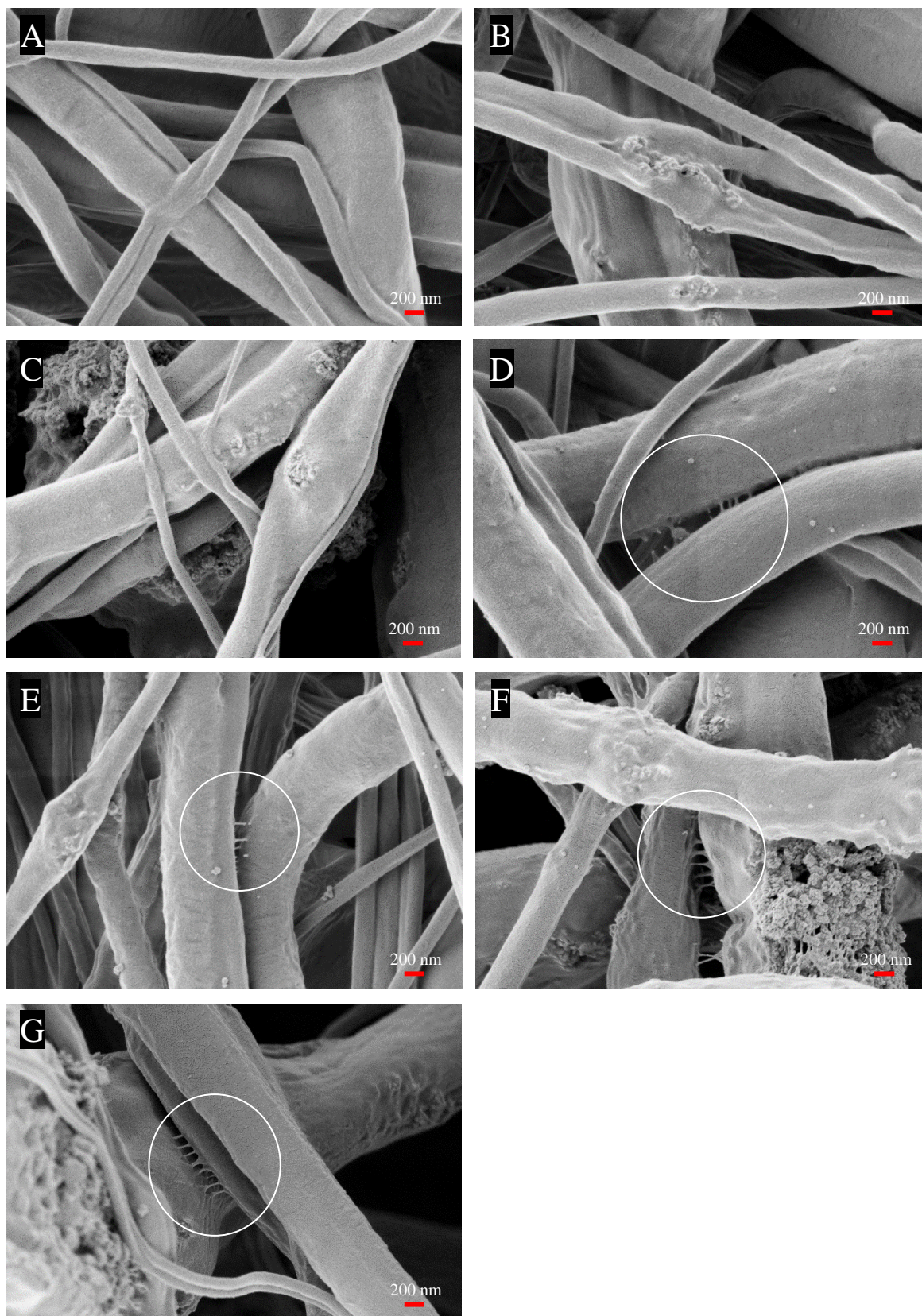


Obrázek 23: Plošná rezistivita – měřeno multimetrem

Multimetrem bylo možno naměřit pouze materiály PCL:GR 9:5 a 9:9, jelikož elektrický odpor PCL:GR 9:0 a 9:1 přesahoval rozsah měřicího přístroje. Průměrná hodnota rezistivity materiálu PCL:GR 9:5 byla  $17,97 \pm 6,49 \text{ M}\Omega$ , po povrstvení  $794 \pm 230 \text{ k}\Omega$ . Rezistivita materiálu PCL:GR 9:9 se také snížila, a to z  $3,6 \pm 1,766 \text{ M}\Omega$  na  $1,01 \pm 0,369 \text{ M}\Omega$ . Výsledky měření jsou velmi odlišná od měření na elektrometru Keithley, jelikož multimetr nemá přesně definovanou vzdálenost elektrod a přítlak. Zároveň na měření rezistivity má vliv i rozdílná vzdušná vlhkost, jež může vzorek učinit více vodivým, jelikož materiály nebyly před měřeními klimatizovány.

### 6.3 Prokázání přítomnosti polydopaminu

Pro pořízení snímků v galerii na Obrázku 24 byla použita jiná metodika a technika pro detailnější snímání vzorků pro hledání vizuálních důkazů přítomnosti povrstvení. Na snímcích povrstvených i nepovrstvených materiálů je možné s narůstající koncentrací grafenu pozorovat vznik shluků vloček, což je pravděpodobně agregovaný grafen. Dále některé z teček na vláknech by mohl být i povrstvený dopamin, nicméně od grafenových shluků je špatně rozeznatelný. Tyto body se tedy nedají považovat za důkaz povrstvení. Důkaz úspěšného coatingu je však možné hledat v místech křížení vláken. U povrstvených materiálů je možné v kontaktních místech vláken nalézt můstky, jež dokazují přítomnost tenké vrstvy substance na vláknech. U nepovrstvených materiálů tyto můstky nejsou patrné.



Obrázek 24: Místa křížení vláken – můstky u materiálů s PDA. A: kontrola PCL:GR 9:0; B: kontrola PCL:GR 9:1 a 9:5; C: kontrola PCL:GR 9:9; D: PCL:GR 9:0 + PDA; E: PCL:GR 9:1 + PDA; F: PCL:GR 9:5 + PDA; G: PCL:GR 9:9 + PDA. Měřítka byla 200 nm.

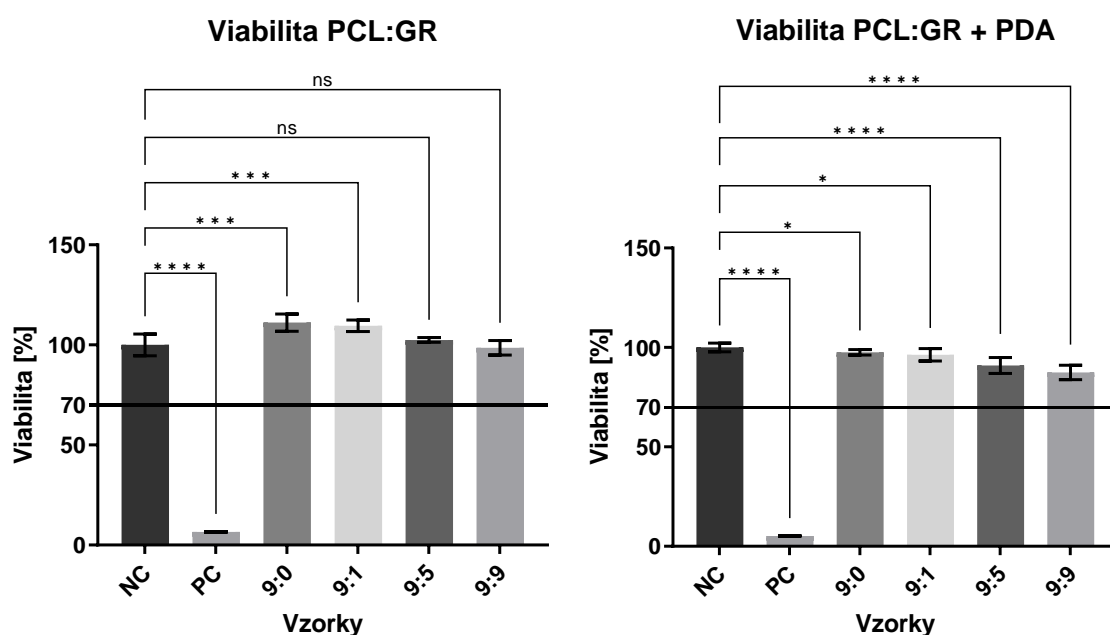
## 6.4 Buněčné testy

Pro odhadnutí potenciálu zkoumaného materiálu v oblasti tkáňového inženýrství byly provedeny buněčné testy, a to konkrétně test cytotoxicity a test buněčné adheze a proliferace.

### 6.4.1 Cytotoxicita

Měření cytotoxicity probíhalo *in vitro*. Na spektrofotometru byla změřena absorbance, která odpovídá metabolické aktivitě živých buněk po inkubaci s extrakty materiálů. Větší absorbance značí vyšší míru buněčné aktivity. Následně byla přepočtena na viabilitu, kde negativní kontrola (NC) je vždy 100 %.

Za hranici toxicity je považováno 70 %. Pokud viabilita klesne pod 70 %, značí to, že je materiál pro buňky toxický a vice versa. Pozitivní kontrola (PC) usmrtila většinu buněk. Výsledky jsou graficky znázorněny na Obrázku 25.

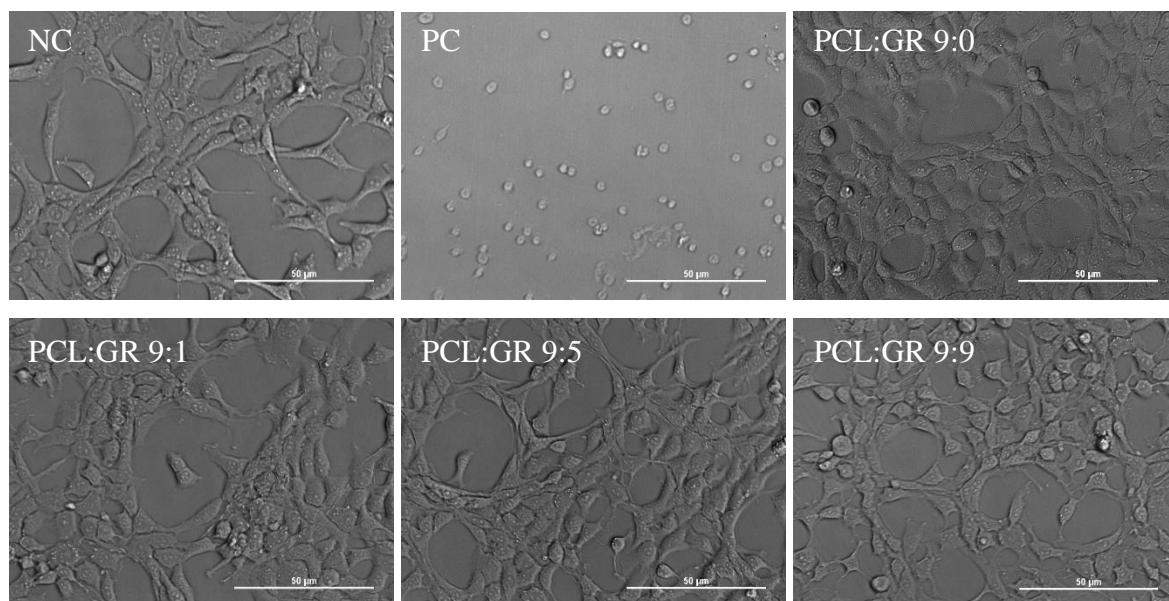


Obrázek 25: Viabilita PCL:GR a PCL:GR + PDA; statistické vyhodnocení Brown-Forsythe and Welch ANOVA test (\*  $p < 0,0332$ , \*\*  $p < 0,0021$ , \*\*\*  $p < 0,0002$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Hodnoty viability nepovrstvených materiálů byly velmi vysoké, kdy materiály PCL:GR 9:0 a PCL:GR 9:1 dokonce předčily NC a jejich hodnoty byly vyšší než 100 % (konkrétně 111,14 % a 109,62 %). Se vzrůstající koncentrací grafenu měla viabilita tendenci klesat, přesto i materiály PCL:GR 9:5 a PCL:GR 9:9 měly hodnoty na stejné úrovni jako NC, a to 102,44 % a 98,58 %. Hodnota viability PC byla 6,51 %. Viabilita povrstvených materiálů měla lehce horší, přesto však velmi dobré, hodnoty. Opět lze sledovat klesající tendenci v závislosti na obsahu grafenu. Vzorke PCL:GR 9:0 + PDA a PCL:GR 9:1+ PDA vykazovaly lehce horší viabilitu v porovnání s NC, a to 97,59 % a 96,27 %. U materiálů PCL:GR 9:5 + PDA a PCL:GR 9:9 + PDA byl rozdíl vůči NC statisticky více znatelný, kdy hodnoty viability byly 90,94 % a 87,43 %. Viabilita PC byla 5,20 %. Výsledky jsou vysoko nad hranicí toxicity.

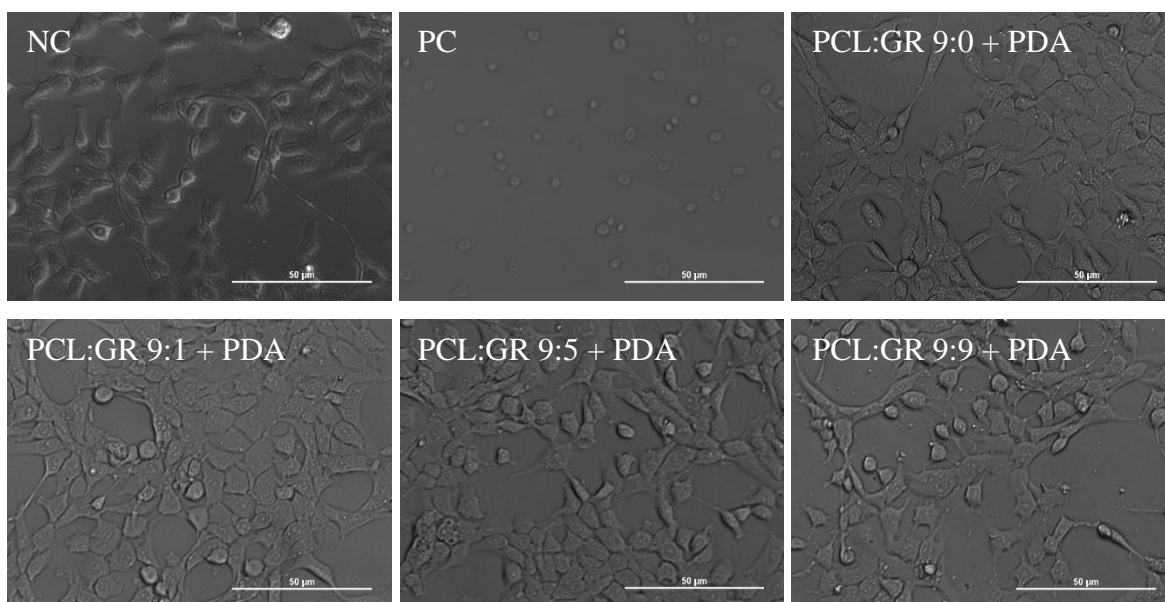
Z přiložených grafů je tedy vidět, že povrstvené i nepovrstvené materiály nebyly pro buňky toxické. Toto je možné vidět i na snímcích (Obrázek 26 a 27), kde buňky ve výluhu dobře prosperovaly. Buňky měly protáhlý tvar, tendenci se dotýkat a byly v dobré kondici. Pokud by byl výluh pro buňky toxický, jevíly by se buňky kulaté, jako tomu je u pozitivní kontroly.

#### Snímky buněk po měření cytotoxicity – bez PDA



Obrázek 26: Cytotoxicita výluhu nepovrstvených materiálů, měřítko 50 µm. Foceno na Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika)

### Snímky buněk po měření cytotoxicity – s PDA



Obrázek 27: Cytotoxicita výluhu materiálů s PDA, měřítko 50 µm. Foceno na Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika)

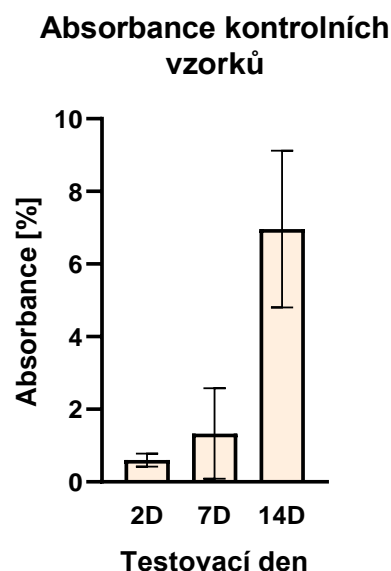
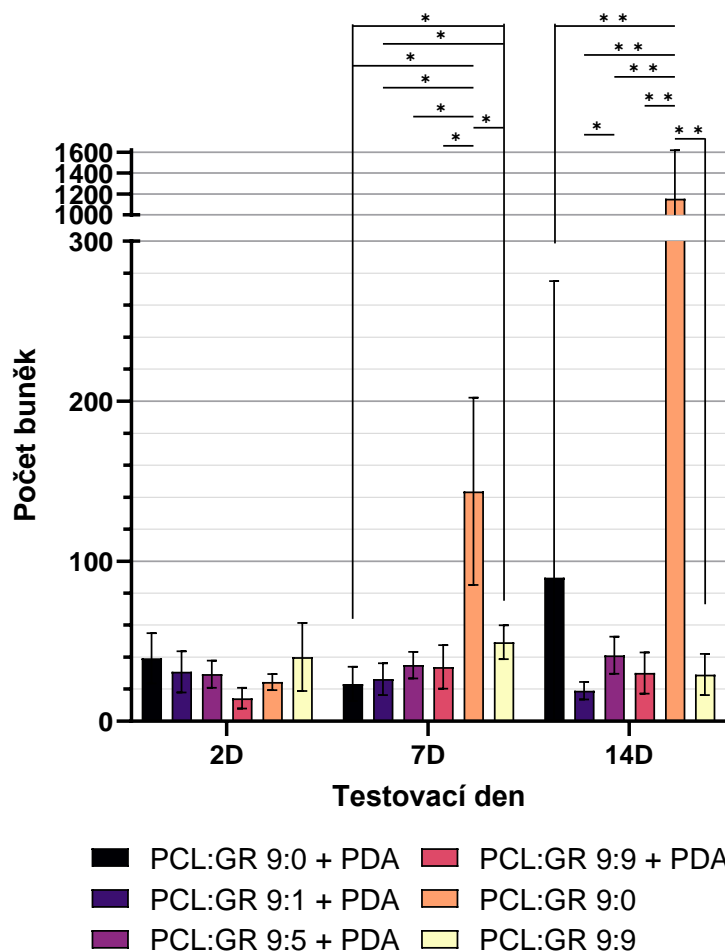
#### 6.4.2 Test buněčné adheze a proliferace

Testování proběhlo *in vitro*. Kontrolní dny byly po 2, 7 a 14 dnech, kdy byla obarvena buněčná jádra (barvivo DAPI) a cytoskelety (barvivo phalloidin FITC) pro snímání na fluorescenčním mikroskopu. Zároveň byla měřena metabolická aktivita kontrolních buněk, jež byly kultivovány na plastiku.

Pro vyhodnocení množství buněk na materiálu bylo na fluorescenčním mikroskopu z každého materiálu nafoceno deset snímků buněčných jader obarvených barvivem DAPI, při zvětšení 10x, jež reprezentuje plochu 0,5 mm<sup>2</sup>. Poté byly programem buňky na každém snímku spočítány a výsledky byly zprůměrovány. Výsledné hodnoty testování jsou znázorněny na Obrázku 28.

Při měření metabolické aktivity byly buňky, podobně jako u testu cytotoxicity, vystaveny působení CCK-8. Po inkubaci (3 hodiny) byla na spektrofotometru změřena absorbance média, v němž byly buňky kultivovány a které změnilo barvu v závislosti na aktivitě živých buněk. Tato kontrola podává informaci o stavu buněk. Výsledek je možné vidět na Obrázku 29.

## Vývoj počtu buněk na ploše 0,5 mm<sup>2</sup>



Obrázek 28: Vývoj počtu buněk na ploše 0,5 mm<sup>2</sup>; Vypočteno programem v MATLABu, metoda "View of field", zvětšení 10x, snímání obarvení jader DAPI; statistické vyhodnocení - 2way ANOVA (\*  $p < 0,0332$ , \*\*  $p < 0,0021$ , \*\*\*  $p < 0,0002$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Obrázek 29: Absorbance kontrol – nárůst metabolické aktivity

Na Obrázku 28, který znázorňuje počet buněk na 0,5 mm<sup>2</sup> je možné vidět, že buňky na materiálu s grafenem ani s polydopaminem dobře neproliferovaly. Po statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že druhý den experimentu nebyly rozdíly mezi materiály statisticky významné. To je možné vidět i na snímcích na Obrázku 30. Zároveň již v tuto dobu lze pozorovat, že buňky na materiálu s přidaným grafenem jsou kulaté, kdežto u materiálů PCL:GR 9:0 a PCL:GR 9:0 + PDA mají lehce protažený tvar.

Sedmý den je možné vidět jisté odlišení materiálu PCL:GR 9:0, jež vykazuje dobrou proliferaci, jeho počet buněk je statisticky větší než u všech ostatních materiálů.

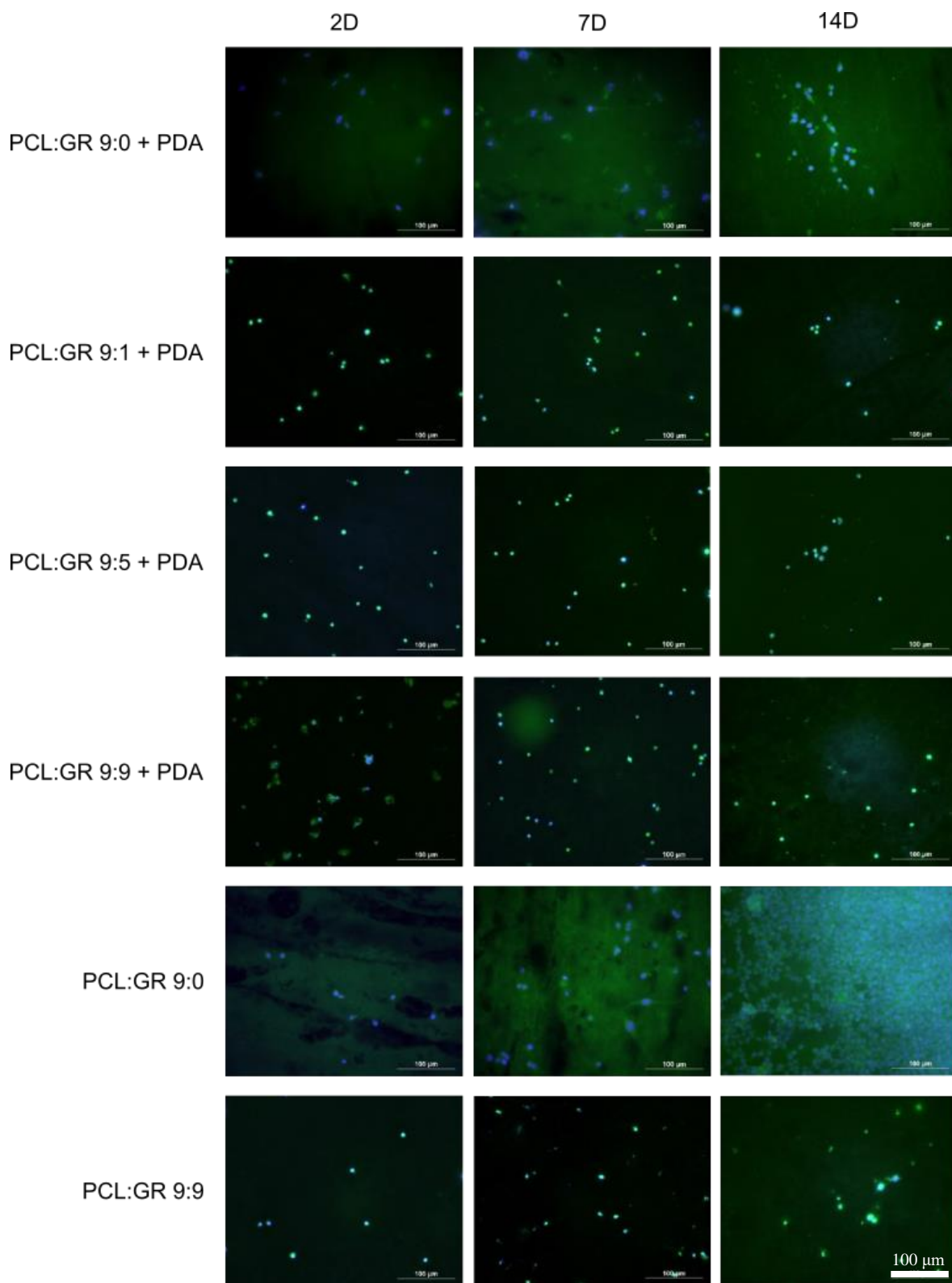
U ostatních materiálů ale buněčný nárůst stagnuje a s výjimkou PCL:GR 9:9, jehož počet buněk je nyní statisticky vyšší než u materiálu PCL:GR 9:0 + PDA a PCL:GR 9:1 + PDA, nejsou mezi materiály významné rozdíly. Na snímcích na Obrázku 30 buňky na materiálech s přidaným grafenem setrvávají v kulatém tvaru, a naopak u materiálů PCL:GR 9:0 + PDA jsou výrazněji protáhlé než sedmý den, především u materiálu PCL:GR 9:0, kde je vidět tendence buněk se dotýkat.

Čtrnáctý den experimentu se zvýšil rozdíl mezi materiálem PCL:GR 9:0, na kterém buňky dobře proliferovaly (přes 1100 buněk/0,5 mm<sup>2</sup>), a ostatními materiály, kde se počet buněk pohyboval řádově v jednotkách až desítkách buněk/mm<sup>2</sup>. Také je možné si povšimnout, že hodnoty u ostatních materiálů, s výjimkou PCL:GR 9:1 PDA a PCL:GR 9:5 + PDA, jež se od sebe lehce liší, jsou statisticky stejné. U materiálu PC:GR 9:0 + PDA je vidět velmi široký interval spolehlivosti. Je to dáno tím, že na tomto materiálu byl jeden shluk buněk, který je vyfocen na Obrázku 30, avšak kromě něj nebyly na vzorku nalezeny téměř žádné další buňky. Naopak povrch materiálu PCL:GR 9:0, což je často používaný a ozkoušený materiál v oblasti tkáňového inženýrství, je buňkami hustě porostlý.

Lze říci, že z grafenových materiálů byl PCL:GR 9:5 + PDA pro buňky vhodnějším než PCL:GR 9:1 + PDA. Avšak říci, že materiál PCL:GR 9:5 + PDA je nejlepší a PCL:GR 9:1 + PDA je nejhorší s jistotou nelze, jelikož se jejich IS překrývají s IS ostatních grafenových materiálů. V průběhu experimentu také u grafenových materiálů nedošlo k významné změně počtu buněk, což je vidět i na Obrázku 30. Nicméně se zdá, avšak není prokázáno, že u materiálu PCL:GR 9:9 s povrstvením i bez, byl nejvyšší počet buněk přítomný sedmý den, a poté se jejich počet snížil. U materiálu PCL:GR 9:1 + PDA buněk v průběhu experimentu nejspíše ubývalo, a u PCL:GR 9:5 + PDA naopak přibývalo, avšak na hladině významnosti 95 % to není statisticky prokazatelné. Zároveň lze říci, že u materiálů bez grafenu buňky výrazně lépe proliferovaly na materiálu bez PDA.

Stav kontrolních buněk nasazených na plastiku je znázorněn na Obrázku 29, kde byla měřena jejich metabolická aktivita. Dle vzrůstající absorpance je zřejmé, že se počet buněk v průběhu experimentu zvyšoval.





Obrázek 30: Snímky materiálu po 2, 7 a 14 dnech pořízené fluorescenčním mikroskopem, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

Z testu buněčné adheze a proliferace bylo zjištěno, že buňky na materiálu neprosplávaly a materiál s grafenem nebyl pro buňky vhodný. Buňky neproliferovaly ani na materiálu s polydopaminem, a to i v případě, kdy se jednalo o čistý poly- $\epsilon$ -kaprolakton. Tyto výsledky je možné zdůvodnit více faktory. Je možné, že grafenový materiál není pro buňky vhodný, navzdory dobrým výsledkům buněčné cytotoxicity. Také je možné, že na buněčnou proliferaci negativně působil polydopamin, případně že nebyla vhodná zvolená metodika povrstvování. Rovněž nelze vyloučit špatnou sterilizaci materiálu, jelikož na kontrolách buňky rostly (viz Obrázek 28). Chyba mohla být také v procesu samotného experimentu, kdy buňky mohly být ve špatném stavu z důvodu například nevhodné pasáže. Nevylučuje se také lidská chyba při možném zanesení nevhodných látek do testovaných materiálů. Experiment je nutné zopakovat, nicméně z časových důvodů toto nebylo realizováno, ale v budoucnu je to vhodné.

## 7. Diskuse výsledků

V této práci byl použit PCL nanovláknový materiál vyrobený technologií AC elektrospinning (v literatuře obvykle DC), do něhož byl inkorporován grafen o koncentraci v poměru k PCL 9:0, 9:1, 9:5 a 9:9. To je v porovnání s literaturou, kde se obvykle pracuje s obsahem grafenu do 2 hm%, velmi vysoká koncentrace. Grafen je slibným vodivým materiálem v tkáňovém inženýrství vzhledem k jeho potenciálu podporovat růst a diferenciaci některých buněčných linií. Zároveň je však silně hydrofobní, což je značná překážka pro buněčnou adhezi. Proto byl tento materiál povrstven vrstvou polydopaminu, jenž dokáže přilnout téměř na jakýkoli substrát a dle literatury podporuje buněčnou adhezi a snižuje kontaktní úhel [57; 58].

Pro aplikaci povrstvení byl materiál za stálého míchání po 4 hodiny ponechán v lázni s 0,5 g dopaminu a 250 ml Tris-HCl o pH 8,5, obdobně, jako to dělali *Fernández et al.* (2017) [44], s tím rozdílem, že jejich doba povrstvování byla 1,2,3,5,8 a 24 h., kdy bylo zjištěno, že při reakční době 1-3h byl povrch vlákna pokryt tenkou homogenní vrstvou o tloušťce 15-27 nm, a při reakční době 5h se již začaly objevovat polydopaminové shluky, jež s nárůstem doby povrstvování přibývaly. Byla tedy zvolena doba povrstvení 4h, aby byly co nejvíce zachovány vlastnosti vláken, a zároveň aby byla PDA vrstva dostatečně silná při zachování její homogenity. Na detailních SEM snímcích na Obrázku 24 byla přítomnost PDA vrstvy, kde je vidět tenký film mezi vlákny, potvrzena. Není však jasné, jakou míru homogenity vykazuje. V téže galerii na Obrázku 24 D (PCL:GR 9:0 + PDA) jsou také patrné tečky, které by, vzhledem k jejich absenci na Obrázku 24 A (PCL:GR 9:0), mohly značit počínající tvorbu polydopaminových agregátů, jež jsou však přítomny ve velmi malém množství. Dá se předpokládat, že se zvýšením doby působení lázně by byla vrstva silnější a lépe viditelná, s výraznějšími agregáty.

Důkazem úspěchu povrstvení bylo významné snížení kontaktního úhlu u všech materiálů. V tomto ohledu byl experiment úspěšný.

Jako důkaz přítomnosti PDA se dá považovat také změna povrchové elektrické rezistivity, jež se při měření přístrojem značky Keithley ve všech případech zvýšila nejméně o řád. Je možné, že při vyšší míře povrstvení by se povrchová rezistivita zvýšila ještě více. Může to být dáno tím, že vrstva PDA překrývá grafenové struktury na povrchu. V reakci na změnu

elektrické rezistivity je výhodné při funkcionalizaci povrchu vytvořit co nejtenčí vrstvu tak, aby byly dostatečně změněny vlastnosti povrchu, ale aby byl původní nosič co nejméně pozměněn.

Při kontrolním měření multimetrem byly naměřeny velmi rozdílné hodnoty. Je možné, že to bylo vlivem rozdílných klimatických podmínek, například teplotou či vzdušnou vlhkostí, jelikož vzorky předtím nebyly aklimatizovány. Zároveň byly pro toto měření uloženy povrstvené vzorky a nepovrstvené vzorky na jiných místech, kdy povrstvené byly uloženy v uzavíratelné nádobě, kdežto nepovrstvené materiály byly uloženy ve fóliích. Tím mohly nastat rozdíly například ve vlhkosti vzorků. Také je možné, že byla příčina v samotném zařízení, například v jeho rozsahu, nedefinovanosti přitlaku, či v měření. Mohlo se stát, že při tomto měření byly elektrody vloženy hlouběji do materiálu, čímž mohly narušit svrchní vrstvu.

S přihlédnutím k měřítku lze říci, že rezistivita materiálů PCL:GR 9:5 a PCL:GR 9:9, s i bez povrstvení, byla podobná. Do grafenové koncentrace PCL:GR 9:5 je však vidět, že se vzrůstajícím obsahem grafenu ve struktuře klesá plošná elektrická rezistivita. Toto je popsáno i ve studii *Xia et al.* [59], kde kromě teploty měla na konduktivitu kompozitního materiálu grafen-polymer kladný vliv i vzrůstající koncentrace grafenu. Zkoumali nicméně jen nízké koncentrace.

Ačkoli je však grafen považován za vodivý materiál, při měření elektrické rezistivity se toto nepotvrdilo. Příčina může být například v diskontinuitě grafenové vrstvy, kdy se částice drží ve shlucích a netvoří souvislou vodivou vrstvu.

Z testu cytotoxicity bylo zjištěno, že původní ani povrstvené materiály nevyvolávají látky, jež by byly pro buňky toxické. Přestože je možné pozorovat trend, kdy se vzrůstající koncentrací grafenu klesá buněčná viabilita, výsledky jsou stále vysoko nad hranicí cytotoxicity. Toto zjištění však neodpovídá výsledkům buněčné adheze a proliferace, kdy byly k materiálům nasazeny a dva týdny kultivovány 3T3 myší fibroblasty, u nichž buněčná proliferace stagnovala.

Tato stagnace by u materiálů s přidáním grafenu mohla mít příčinu v jeho příliš vysoké koncentraci, případně jeho nehomogennímu rozložení. Bohužel nebylo možné přesně

popsat, jak se materiál povrstvil a jak byl grafen ve vlákenné struktuře rozložen, dle snímků jsou ale patrné shluky. Ve studii *Qian et al.* (2018) bylo zjištěno, že nejvhodnější koncentrace grafenu pro jejich použití byla 1 %, a že nižší i vyšší koncentrace grafenu nebyly optimální. Jejich metodika tvorby scaffoldu byla sice velmi odlišná, ale k teorii přílišné grafenové koncentrace přispívá i fakt, že mezi materiály v podstatě nebyly rozdíly, což by mohlo naznačovat, že již hodnoty neměly kam klesnout. Z grafenových materiálů jediný, u kterého je možné tušit, avšak ne potvrdit, lehce rostoucí trend v průběhu experimentu, byl PCL:GR 9:5 + PDA, což byl materiál s největším průměrem i mediánem tloušťky vláken, s množstvím odlehlých měření. Je možné, že z tohoto důvodu byla na tomto materiálu vrstva PDA rovnoměrnější, jelikož mohla mít povrstvovací lázeň lepší přístup k jednotlivým vláknům. Také mohl mít příznivější kontaktní úhel, který byl  $62,50 \pm 7,43$  °.

Překvapivé je však výrazné zhoršení buněčné adheze a proliferace i u materiálu PCL:GR 9:0 po povrstvení PDA, kde původní materiál byl na konci experimentu celý porostlý buňkami, kdežto na upraveném materiálu byl jen jeden shluk. Oproti materiálům s grafenem, na nichž se buňky jeví kulaté, měly ale buňky na bezgrafenových materiálech protáhlejší tvar a tendenci se propojovat, což indikuje jejich lepší kondici. V literatuře, například ve studii vyhotovené *Sook Hee Ku a Chan Beum Park* (2010), kde byl čistý PCL povrstven PDA obdobným způsobem jako v této práci, byl buněčný nárůst více než dvakrát větší u povrstveného materiálu než u původního [60]. Může to být způsobeno nehomogenitou povrstvení vlákenné vrstvy.

Špatná dispergace polydopaminu může vést ke zhoršené buněčné adhezi a proliferaci z důvodu vystavení buněk nepovrstveným hydrofobním částem materiálu. Neúspěch experimentu při buněčných testech tedy mohla způsobit nehomogenita povrchu materiálu způsobená vysokou hydrofobicitou původních materiálů, jež mohla bránit disperzi v proniknutí na některá místa v materiálu. Rovnoměrnost povrstvení by se měla zlepšit například předúpravou povrchu plazmou těsně před coatingem, jako to udělali ve studii *Egghe et al.* (2022) [53] a *Ghorbani et al.* (2019) [52], případně využitím krystalické nanocelulózy, což je biodegradabilní a biokompatibilní nanočástice podporující smáčivost, při zvlákňování [61].

Zlepšení by také mohla přinést delší doba povrstvování, jež byla v této práci 4h, a tím zvýšit polydopaminovou vrstvu, jako tomu bylo ve studii *Ghorbani et al.* (2019) [51], jehož doba povrstvování byla 24h. Po 4 hodinách sice došlo ke snížení kontaktního úhlu, nicméně je možné, že při tlustší vrstvě by se buňky nedostaly do přímého kontaktu s grafenovým materiálem, či by s ním byly v kontaktu ve zmenšené míře. Druhou stranou mince však může být hrozící ucpání pórů při příliš silném nánosu PDA a tím znemožnění migrace živin a prorůstání buněk vláknennou strukturou.

Vliv mohlo mít i černé obarvení grafenového materiálu a nastavení mikroskopu. U bílého materiálu byly buňky mnohem lépe viditelné vlivem lepšího prostupu světla a nižší dobou expozice. Je tedy možné, že byly buňky méně viditelné. Také je možné, že grafen, který má velký specifický povrch, mohl navazovat použitá barviva, a tím znehodnocovat měření [62]. Grafen má silné absorpční účinky a není jasné, které všechny děje tato vlastnost ovlivňuje.

Také mohla být chyba ve volbě buněčné linie, jelikož polydopaminový film může být pro některé buňky cytotoxický a u jiných naopak podporovat adhezi [58].

Nelze vyloučit ani lidskou chybu, kdy mohly být vzorky kontaminovány, přítomnost reziduí ze zvláknování či z povrstvovací lázně, chybu samotné lázně, špatnou sterilizaci materiálů, či špatnou pasáž.

## Závěr

V této diplomové práci se pracovalo s nanovlákněným materiálem z polykaprolaktonu (PCL) a grafenu (GR), který byl vytvořen metodou AC electrospinning. Koncentrace grafenu v tomto kompozitním materiálu byla velmi vysoká, a to v poměru PCL:GR 9:0, 9:1, 9:5 a 9:9. Z důvodu jeho vysoké hydrofobicity, která je překážkou pro buněčnou adhezi a posléze proliferaci, byl povrch tohoto materiálu funkcionalizován vrstvou polydopaminu (PDA) pro zvýšení smáčivosti. Toho bylo dosaženo, a u povrstvených materiálů se kontaktní úhel významně snížil. Poté byl materiál charakterizován, tedy kromě kontaktního úhlu byly změřeny průměry vláken, plošná elektrická rezistivita a byla prokázána přítomnost polydopaminové vrstvy. Nakonec byly provedeny buněčné testy cytotoxicity a *in vitro* test buněčné adheze a proliferace. Z testu buněčné cytotoxicity bylo zjištěno, že výluhy materiálů nebyly ani v jednom případě toxické. U nepovrstvených materiálů byla buněčná viabilita dokonce podpořena. Naopak v testu buněčné adheze a proliferace bylo zjištěno, že materiály nejsou pro buňky vhodné. U materiálů s přidaným grafenem v jakémkoli poměru nárůst buněk stagnoval. PCL materiál s povrstvením také vykazoval výrazně horší buněčný nárůst, kdy byl 14. den experimentu přítomen pouze jeden shluk buněk, oproti čistému PCL, který byl buňkami zcela porostlý. Je více proměnných, které ovlivnily experiment, a je těžké určit, co přesně to způsobilo. Příčina může být v nehomogenitě materiálu a povrstvení, kdy mohla být polydopaminem překryta jen některá místa.

Experiment je třeba opakovat pro vyloučení lidské chyby (například vlivem kontaminace), špatné sterilizace materiálů či špatné kondice buněk. Také je třeba zvážit, zda snížit koncentraci grafenu, jehož vysoká koncentrace mohla způsobit neúspěch buněčných testů. V potenciální aplikaci jako vodivý scaffold dává smysl používat koncentrace vysoké, jelikož bylo potvrzeno, že větší množství grafenu značí nižší elektrickou rezistivitu. Nižší koncentrace na druhou stranu jsou dle literatury prospěšné pro buněčnou adhezi a proliferaci, a vysoké koncentrace mohou být pro buňky toxické. Při zachování vysoké koncentrace grafenu by zlepšení mohla přinést jeho důslednější dispergace, například ultrazvukem, před zvláknováním. Zároveň by měla být lehce pozměněna metodika povrstvování, kdy by byla zavedena předúprava materiálu plazmou těsně před samotnou procedurou (v řádu hodin). To by mělo zlepšit rovnoměrnost povrstvení materiálů

hydrofilizací, jelikož při současné metodice je možné, že povrstvovací lázeň vlivem hydrofobicity materiálu neměla přístup do všech míst. Bylo by vhodné prozkoumat i variantu delší doby polymerace. To by mohlo lépe překrýt původní materiál a podpořit buněčnou adhezi, případně ještě více snížit kontaktní úhel, nicméně zároveň je třeba brát v potaz změněné vlastnosti vláken, kdy je možné, že polydopaminová vrstva zvyšuje elektrickou rezistivitu tím, že překrývá grafenové částice, zvýšil by se průměr vláken, snížila pórovitost a vytvořily by se polydopaminové shluky. Zlepšení by dále mohla přinést změna použitého grafenu, kdy by byla použita jeho varianta s méně vrstvami, ideálně jednovrstevný. Vliv může mít i volba použité buněčné linie, která v tomto případě byla 3T3 myší fibroblasty. Za zvážení by stálo použít například myoblasty, jejichž afinita k polydopaminu je prokázána, či myší neonatální kardiomyocyty, jež byly ve studii *Li* (2021) [63] nasazeny na gelatinmetakrylátový hydrogelový scaffold s přidaným PDA a rGO a stimulovány elektrošoky, a dobře prosperovaly.



## 8. Seznam použité literatury

- [1] LANZA, Robert, Robert LANGER, Joseph VACANTI a Anthony ATALA, ed. *Principles of tissue engineering*. 5th. ed. Burlington, Mass.: Elsevier Academic Press, 2020. ISBN 9780128214015.
- [2] KRCHOVA, Silvie, Ladislav DZAN, David LUKAS, Petr MIKES, Vera JENCOVA, Jana HORAKOVA a Katerina STRNADOVA. Nanovlákná v hojení kožních ran. *Česká dermatovenerologie*. 2014, (4), 234-240.
- [3] SMITH, L.A. a P.X. MA. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2004, **39**(3), 125-131 [cit. 2022-10-31]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2003.12.004
- [4] ALGHORAIBI, Ibrahim a Sandy ALOMARI. Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication. In: BARHOUM, Ahmed, Mikhael BECHELANY a Abdel MAKHLOUF, ed., Ahmed BARHOUM, Mikhael BECHELANY, Abdel MAKHLOUF. *Handbook of Nanofibers* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 1-46 [cit. 2022-10-31]. ISBN 978-3-319-42789-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-42789-8\_11-2
- [5] VASITA, Rajesh a Dhirendra KATTI. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2006, **1**(1), 15-30 [cit. 2022-10-31]. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/nano.2006.1.1.15
- [6] KALOUS, Tomáš. *Studium technických možností střídavého elektrického zvlákňování* [online]. Liberec, 2021 [cit. 2022-10-31]. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/160769>. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Pokorný Pavel.
- [7] POKORNÝ, Pavel. *Analýza procesu elektrostatického zvlákňování a možnosti jeho řízení*. Liberec: Technická Univerzita v Liberci, 2011. Dostupné také z:

<https://dspace.tul.cz/handle/15240/142777>. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Lukáš David.

- [8] KOŠŤÁLKOVÁ, Eva, Pavel POKORNÝ a David LUKÁŠ. *Elektrostatické zvláknění: Výroba polymerních nanovláken a jejich využití v kompozitních materiálech* [Prezentace]. Technická univerzita v Liberci. Dostupné také z: <https://docplayer.cz/8913436-Elektrostaticke-zvlaknovani-vyroba-polymernich-nanovlaken-a-jejich-vyuziti-v-kompozitnich-materialechl.html>
- [9] FRIEDRICH, Ondřej. *Optimalizace zvláknovacího zařízení s diskovou elektrodou*. Liberec, 2021. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [10] POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRIK et al. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Phys. Chem. Chem. Phys* [online]. 2014, **16**(48), 26816-26822 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/C4CP04346D
- [11] VALTERA, Jan, Tomas KALOUS, Pavel POKORNY et al. Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2022-10-31]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-38557-z
- [12] SIVAN, Manikandan, Divyabharathi MADHESWARAN, Jan VALTERA, Eva KOSTAKOVA a David LUKAS. Alternating current electrospinning: The impacts of various high-voltage signal shapes and frequencies on the spinnability and productivity of polycaprolactone nanofibers. *Materials & Design* [online]. 2022, **213** [cit. 2022-10-31]. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2021.110308
- [13] POKORNY, P., L KOCIS, J CHVOJKA, D LUKAS, J BERAN, M BILEK a K PEJCHAR. *Alternating current electrispinning method for preparation of nanofibrous materials*. NANOCON 2013, 2013.
- [14] KESSICK, Royal, John FENN a Gary TEPPER. The use of AC potentials in

- electrospraying and electrospinning processes. *Polymer* [online]. 2004, **45**(9), 2981-2984 [cit. 2022-11-29]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2004.02.056
- [15] VALÁŠKOVÁ, Kristýna. *Scaffoldy pro tkáňové inženýrství*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2021, 101 s. (22 033 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/46934>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce Capáková, Zdenka.
- [16] BIKRAMJIT, Basu. *Biomaterials Science and Tissue Engineering Biomaterials Science and Tissue Engineering*. Bangalore: Cambridge university press, 2017. ISBN 9781108415156.
- [17] PINA, Sandra, Il KWON, Rui REIS a J. OLIVEIRA. Biocomposites and Bioceramics in Tissue Engineering: Beyond the Next Decade. In: CHOI, Andy H. a Besim BEN-NISSAN, ed., Andy CHOI, Besim BEN-NISSAN. *Innovative Bioceramics in Translational Medicine I* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2022, s. 319-350 [cit. 2022-10-31]. Springer Series in Biomaterials Science and Engineering. ISBN 978-981-16-7434-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-16-7435-8\_11
- [18] AZIMI, Bahareh, Parviz NOURPANAH, Mohammad RABIEE a Shahram ARBAB. Poly (ε-caprolactone) Fiber: An Overview. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* [online]. 2014, **9**(3) [cit. 2022-10-31]. ISSN 1558-9250. Dostupné z: doi:10.1177/155892501400900309
- [19] CHANDRA, R. a Renu RUSTGI. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. Velká Británie: Elsevier Science Ltd., 1998, **23**, 1273-1335. Dostupné z: doi:0079 – 6700(97)00039 – 7
- [20] MONDAL, Debasish, May GRIFFITH a Subbu VENKATRAMAN. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric*

*Biomaterials* [online]. 2016, **65**(5), 255-265 [cit. 2022-10-31]. ISSN 0091-4037.  
Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2015.1103241

[21] DIAS, Juliana, Aureliana SOUSA, Ana AUGUSTO, Paulo BÁRTOLO a Pedro GRANJA. Electrospun Polycaprolactone (PCL) Degradation: An In Vitro and In Vivo Study. *Polymers* [online]. 2022, **14**(16) [cit. 2022-10-31]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14163397

[22] SHAMS, S., Ruoyu ZHANG a Jin ZHU. Graphene synthesis: a Review. *Materials Science-Poland* [online]. 2015, **33**(3), 566-578 [cit. 2022-10-31]. ISSN 2083-134X.  
Dostupné z: doi:10.1515/msp-2015-0079

[23] SYAMA, S. a P.V. MOHANAN. Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **86**, 546-555 [cit. 2022-12-04]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.116

[24] WYSS, Kevin, Duy LUONG a James TOUR. Large-Scale Syntheses of 2D Materials: Flash Joule Heating and Other Methods. *Advanced Materials* [online]. 2022, **34**(8) [cit. 2022-11-30]. ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.202106970

[25] YU, Wang, Li SISI, Yang HAIYAN a Luo JIE. Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: a review. *RSC Advances* [online]. 2020, **10**(26), 15328-15345 [cit. 2022-10-31]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA01068E

[26] SUN, Ling. Structure and synthesis of graphene oxide. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2019, **27**(10), 2251-2260 [cit. 2022-10-31]. ISSN 10049541.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.cjche.2019.05.003

[27] SHARMA, Priyanka, Satish TUTEJA, Vijayender BHALLA, G. SHEKHAWAT, Vinayak DRAVID a C.Raman SURI. Bio-functionalized graphene-graphene oxide nanocomposite based electrochemical immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*

- [online]. 2013, **39**(1), 99-105 [cit. 2022-10-31]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2012.06.061
- [28] HU, Yang, Shaoxian SONG a Alejandro LOPEZ-VALDIVIESO. Effects of oxidation on the defect of reduced graphene oxides in graphene preparation. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2015, **450**, 68-73 [cit. 2022-10-31]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2015.02.059
- [29] COMPTON, Owen a SonBinh NGUYEN. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* [online]. 2010, **6**(6), 711-723 [cit. 2022-11-30]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/smll.200901934
- [30] PARK, Byeong-Ju, Jin-Seok CHOI, Ji-Ho EOM, Hyunwoo HA, Hyun KIM, Seonhee LEE, Hyunjung SHIN a Soon-Gil YOON. Defect-Free Graphene Synthesized Directly at 150 °C via Chemical Vapor Deposition with No Transfer. *ACS Nano* [online]. 2018, **12**(2), 2008-2016 [cit. 2022-10-31]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.8b00015
- [31] LUONG, Duy, Ksenia BETS, Wala ALGOZEEB et al. Gram-scale bottom-up flash graphene synthesis. *Nature* [online]. 2020, **577**(7792), 647-651 [cit. 2022-11-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-1938-0
- [32] YANG, Kai, Jianmei WAN, Shuai ZHANG, Youjiu ZHANG, Shuit-Tong LEE a Zhuang LIU. In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano* [online]. 2011, **5**(1), 516-522 [cit. 2022-12-03]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/nn1024303
- [33] GIRISH, Chundayil, Abhilash SASIDHARAN, G. GOWD, Shantikumar NAIR a Manzoor KOYAKUTTY. Confocal Raman Imaging Study Showing Macrophage Mediated Biodegradation of Graphene In Vivo. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2013, **2**(11), 1489-1500 [cit. 2022-12-04]. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201200489

- [34] ARNOLD, Anne, Brian HOLT, Caoxin TANG a Stefanie SYDLIK. Phosphate modified graphene oxide: Long-term biodegradation and cytocompatibility. *Carbon* [online]. 2019, **154**, 342-349 [cit. 2022-12-04]. ISSN 00086223. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbon.2019.08.005
- [35] JIA, Pan-Pan, Tai SUN, Muhammad JUNAID et al. Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo. *Environmental Pollution* [online]. 2019, **247**, 595-606 [cit. 2022-12-04]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.01.072
- [36] NARAYANAN, Kannan, Gyu PARK a Sung HAN. Electrospun poly(vinyl alcohol)/reduced graphene oxide nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2020, **191** [cit. 2023-05-22]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110994
- [37] HEIDARI, Mina, Hajir BAHRAMI a Marziyeh RANJBAR-MOHAMMADI. Fabrication, optimization and characterization of electrospun poly(caprolactone)/gelatin/graphene nanofibrous mats. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **78**, 218-229 [cit. 2022-12-04]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.04.095
- [38] SAYYAR, Sepidar, Eoin MURRAY, Brianna THOMPSON, Sanjeev GAMBHIR, David OFFICER a Gordon WALLACE. Covalently linked biocompatible graphene/polycaprolactone composites for tissue engineering. *Carbon* [online]. 2013, **52**, 296-304 [cit. 2022-12-04]. ISSN 00086223. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbon.2012.09.031
- [39] ZHANG, Zhongyang, Lasse KLAUSEN, Menglin CHEN a Mingdong DONG. Electroactive Scaffolds for Neurogenesis and Myogenesis: Graphene-Based Nanomaterials. *Small* [online]. 2018, **14**(48) [cit. 2023-05-20]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201801983
- [40] IVERSEN, Susan a Leslie IVERSEN. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in*

- Neurosciences* [online]. 2007, **30**(5), 188-193 [cit. 2023-03-06]. ISSN 01662236.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2007.03.002
- [41] GNEGY, Margaret E. Catecholamines. In: *Basic Neurochemistry* [online]. Elsevier, 2012, s. 283-299 [cit. 2023-03-12]. ISBN 9780123749475. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00014-6
- [42] MOLINOFF, P a J AXELROD. Biochemistry of Catecholamines. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1971, **40**(1), 465-500 [cit. 2023-03-13]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.40.070171.002341
- [43] NEUROTIKER. Catecholamines biosynthesis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biosynteza\\_katecholaminu.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biosynteza_katecholaminu.svg)
- [44] FERNÁNDEZ, Jorge, Oneka AUZMENDI, Hegoi AMESTOY, Alejandro DIEZ-TORRE a Jose-Ramon SARASUA. Mechanical properties and fatigue analysis on poly( $\epsilon$ -caprolactone)-polydopamine-coated nanofibers and poly( $\epsilon$ -caprolactone)-carbon nanotube composite scaffolds. *European Polymer Journal* [online]. 2017, **94**, 208-221 [cit. 2023-05-25]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.07.013
- [45] LIN, Chi-Chang a Shu-Juan FU. Osteogenesis of human adipose-derived stem cells on poly(dopamine)-coated electrospun poly(lactic acid) fiber mats. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **58**, 254-263 [cit. 2023-05-19]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.08.009
- [46] WEI, Qiang, Fulong ZHANG, Jie LI, Beijia LI a Changsheng ZHAO. Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings. *Polymer Chemistry* [online]. 2010, **1**(9) [cit. 2023-03-05]. ISSN 1759-9954. Dostupné z: doi:10.1039/c0py00215a
- [47] LI, Yaoxu, Cheng LI, Ran YU a Yumei DING. Application of polydopamine on the

implant surface modification. *Polymer Bulletin* [online]. 2022, **79**(8), 5613-5633 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0170-0839. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-021-03793-9

- [48] NEMATI, Sorour, Se-jeong KIM, Young SHIN a Heungsoo SHIN. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano Convergence* [online]. 2019, **6**(1) [cit. 2023-05-19]. ISSN 2196-5404. Dostupné z: doi:10.1186/s40580-019-0209-y
- [49] LYNGE, Martin, Ryosuke OGAKI, Anja LAURSEN, Jette LOVMAND, Duncan SUTHERLAND a Brigitte STÄDLER. Polydopamine/Liposome Coatings and Their Interaction with Myoblast Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2011, **3**(6), 2142-2147 [cit. 2023-05-23]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am200358p
- [50] STEEVES, Alexander, Aman ATWAL, Sarah SCHOCK a Fabio VARIOLA. Evaluation of the direct effects of poly(dopamine) on the in vitro response of human osteoblastic cells. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2016, **4**(18), 3145-3156 [cit. 2023-05-23]. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C5TB02510A
- [51] GHORBANI, Farnaz, Ali ZAMANIAN a Amir AIDUN. Bioinspired polydopamine coating-assisted electrospun polyurethane-graphene oxide nanofibers for bone tissue engineering application. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2019, **136**(24) [cit. 2023-05-23]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.47656
- [52] GHORBANI, Farnaz, Ali ZAMANIAN a Bahman TORABINEJAD. The effect of oxygen plasma pretreatment on the properties of mussel-inspired polydopamine-decorated polyurethane nanofibers. *Journal of Polymer Engineering* [online]. 2019, **40**(2), 109-119 [cit. 2023-05-23]. ISSN 2191-0340. Dostupné z: doi:10.1515/polyeng-2019-0219
- [53] EGGHE, Tim, Sheida ALIAKBARSHIRAZI, Yongjian GUO, Rouba GHOBEIRA, Rino MORENT, Richard HOOGENBOOM a Nathalie DE GEYTER. Comparison of the surface properties and cytocompatibility between plasma activated and



homogeneously polydopamine-coated PCL nanofibers as a result of a pre-plasma activation step. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2022, **447** [cit. 2023-05-23]. ISSN 02578972. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfcoat.2022.128808

[54] QIAN, Yun, Xiaotian ZHAO, Qixin HAN, Wei CHEN, Hui LI a Weien YUAN. An integrated multi-layer 3D-fabrication of PDA/RGD coated graphene loaded PCL nanoscaffold for peripheral nerve restoration. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1) [cit. 2023-05-19]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-02598-7

[55] ZHANG, Huifang, Sheng HU, Dandan SONG a Hui XU. Polydopamine-sheathed electrospun nanofiber as adsorbent for determination of aldehydes metabolites in human urine. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **943**, 74-81 [cit. 2023-05-26]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.09.028

[56] *Biosera* [online]. Cholet, France, 2023 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://www.biosera.com/>

[57] HÁKOVÁ, Martina, Petr CHOCHOLOUŠ, Adam VALACHOVIČ, Jakub ERBEN, Jiří CHVOJKA, Petr SOLICH, František ŠVEC a Dalibor ŠATÍNSKÝ. On-line polydopamine coating as a new way to functionalize polypropylene fiber sorbent for solid phase extraction. *Talanta* [online]. 2020, **219** [cit. 2023-05-31]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2020.121189

[58] LYNGE, Martin, Rebecca VAN DER WESTEN, Almar POSTMA a Brigitte STÄDLER. Polydopamine—a nature-inspired polymer coating for biomedical science. *Nanoscale* [online]. 2011, **3**(12) [cit. 2023-05-29]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/c1nr10969c

[59] XIA, Xiaodong, George WENG, Juanjuan ZHANG a Yang LI. The effect of temperature and graphene concentration on the electrical conductivity and dielectric permittivity of graphene–polymer nanocomposites. *Acta Mechanica* [online]. 2020, **231**(4), 1305-1320 [cit. 2023-05-31]. ISSN 0001-5970. Dostupné z:

doi:10.1007/s00707-019-02588-4

- [60] KU, Sook a Chan PARK. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(36), 9431-9437 [cit. 2023-05-26]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.071
- [61] SHENG, Libin, Rongjia JIANG, Yu ZHU a Yali JI. Electrospun Cellulose Nanocrystals/Polycaprolactone Nanocomposite Fiber Mats. *Journal of Macromolecular Science, Part B* [online]. 2014, **53**(5), 820-828 [cit. 2023-05-25]. ISSN 0022-2348. Dostupné z: doi:10.1080/00222348.2013.861311
- [62] KYZAS, George, Eleni DELIYANNI, Dimitrios BIKIARIS a Athanasios MITROPOULOS. Graphene composites as dye adsorbents: Review. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. 2018, **129**, 75-88 [cit. 2023-05-31]. ISSN 02638762. Dostupné z: doi:10.1016/j.cherd.2017.11.006
- [63] LI, Xiao-Pei, Kai-Yun QU, Bin ZHOU, Feng ZHANG, Yin-Ying WANG, Oluwatosin ABODUNRIN, Zhen ZHU a Ning-Ping HUANG. Electrical stimulation of neonatal rat cardiomyocytes using conductive polydopamine-reduced graphene oxide-hybrid hydrogels for constructing cardiac microtissues. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, **205** [cit. 2023-05-28]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111844
- [64] OBERREITER, Jiří. *Výroba a testování vlákněných vrstev ze směsí elektricky zvlákněných materiálů* [online]. Liberec, 2019 [cit. 2022-10-31]. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/154213>. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [65] KIM, Byung-Soo a David MOONEY. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. 1998, **16**(5), 224-230 [cit. 2022-10-31]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(98)01191-3

## Seznam obrázků

Obrázek 1: SEM snímek nanovlákněné vrstvy vyrobené z 14 % PVA, metodou jehlového elektrického zvlákňování. Měřítka 5 $\mu\text{m}$ . [64].....	15
Obrázek 2: SEM snímek extracelulárního matrixu pojivové tkáně. Měřítka 10 $\mu\text{m}$ . [65].	15
Obrázek 3: Tvorba nanovláken pomocí fázové separace [4] .....	16
Obrázek 4: Zvlákňovací prostor, elektrostatické zvlákňování [8], vlastní úprava.....	17
Obrázek 5: Nanovlákněná vlečka [11] .....	18
Obrázek 6: Schéma AC electrospinning [12].....	19
Obrázek 7: Syntéza poly- $\epsilon$ -kaprolaktonu [18] .....	21
Obrázek 8: Příprava oxidu grafenu [25].....	23
Obrázek 9: Oxidace grafenu na oxid grafenu / redukce oxidu grafenu na grafen [25], vlastní úprava .....	23
Obrázek 10: Strukturní vzorec dopaminu .....	28
Obrázek 11: Syntéza katecholaminů .....	29
Obrázek 12: Polymerizace dopaminu .....	30
Obrázek 13: Rozdíl ve zbarvení vrchní a spodní strany materiálu .....	37
Obrázek 14: Připravené vzorky v korunkách CellCrown .....	37
Obrázek 15: Povrstvovací lázeň.....	39
Obrázek 16: Změna zbarvení materiálu .....	43
Obrázek 17: Struktura materiálů; 1. řada bez PDA, 2. řada s PDA .....	44
Obrázek 18: Průměry vláken; statistické zpracování – Kruskal-Wallis test (* $p < 0,0332$ , ** $p < 0,0021$ , *** $p < 0,0002$ , **** $p < 0,0001$ ; značí statistickou významnost rozdílnosti dat)	45
Obrázek 19: Box-plot distribuce průměru vláken .....	45
Obrázek 20: Relativní četnost rozložení průměru vláken .....	47
Obrázek 21: Výsledky měření kontaktního úhlu se statistickým zpracováním. Hvězdičky značí statistickou významnost rozdílnosti dat (* = statisticky nevýznamná rozdílnost dat, **** = velmi rozdílná data). Byl použit Brown-Forsythe and Welch ANOVA test (* $p < 0,0332$ , ** $p < 0,0021$ , *** $p < 0,0002$ , **** $p < 0,0001$ ).....	48
Obrázek 22: Plošná rezistivita, měřeno na zařízení značky Keithley .....	50
Obrázek 23: Plošná rezistivita – měřeno multimetrem .....	51
Obrázek 24: Místa křížení vláken – můstky u materiálů s PDA. A: kontrola PCL:GR 9:0; B: kontrola PCL:GR 9:1 a 9:5; C: kontrola PCL:GR 9:9; D: PCL:GR 9:0 + PDA; E:	

PCL:GR 9:1 + PDA; F: PCL:GR 9:5 + PDA; G: PCL:GR 9:9 + PDA. Měřítka bylo 200 nm. ....	52
Obrázek 25: Viabilita PCL:GR a PCL:GR + PDA; statistické vyhodnocení Brown-Forsythe and Welch ANOVA test (* $p < 0,0332$ , ** $p < 0,0021$ , *** $p < 0,0002$ , **** $p < 0,0001$ ).....	53
Obrázek 26: Cytotoxicita výluhu nepovrstvených materiálů, měřítko 50 $\mu\text{m}$ . Foceno na Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika).....	54
Obrázek 27: Cytotoxicita výluhu materiálů s PDA, měřítko 50 $\mu\text{m}$ . Foceno na Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika).....	55
Obrázek 28: Vývoj počtu buněk na ploše 0,5 $\text{mm}^2$ ; Vypočteno programem v MATLABu, metoda "View of field", zvětšení 10x, snímání obarvení jader DAPI; statistické vyhodnocení - 2way ANOVA (* $p < 0,0332$ , ** $p < 0,0021$ , *** $p < 0,0002$ , **** $p < 0,0001$ ).....	56
Obrázek 29: Absorbance kontrol – nárůst metabolické aktivity .....	56
Obrázek 30: Snímky materiálu po 2, 7 a 14 dnech pořízené fluorescenčním mikroskopem, měřítko 100 $\mu\text{m}$ . ....	58

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Parametry zvlákňování.....	36
Tabulka 2: Parametry lisování.....	36
Tabulka 3: Složení povrstvovací lázně a použité vybavení .....	38
Tabulka 4: Průměry vláken .....	45
Tabulka 5: Statistické zpracování výsledků měření kontaktního úhlu.....	48
Tabulka 6: Plošná rezistivita .....	49