

Bakalářská práce

Využití střídavého zvlákňování k tvorbě kompozitního materiálu pro tkáňové inženýrství

Studijní program:

B0723A270001 Textilní technologie, materiály
a nanomateriály

Autor práce:

Lenka Dembická

Vedoucí práce:

Ing. Radek Jirkovec, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných
materiálů

Liberec 2024



Zadání bakalářské práce

Využití střídavého zvlákňování k tvorbě kompozitního materiálu pro tkáňové inženýrství

Jméno a příjmení:

Lenka Dembická

Osobní číslo:

T21000197

Studijní program:

B0723A270001 Textilní technologie, materiály a nanomateriály

Zadávající katedra:

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Akademický rok:

2022/2023

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma
2. Výběr vhodných materiálů pro přípravu kompozitních vláknenných vrstev
3. Příprava polymerních roztoků a vláknenných vrstev
4. Charakterizace vyrobených kompozitních vláknenných vrstev
5. Zpracování výsledků a závěr

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) Nemati, S., et al. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. Nano Convergence, 2019, vol. 6.
- 2) Sivan, M., et al. AC electrospinning: impact of high voltage and solvent on the electrospinnability and productivity of polycaprolactone electrospun nanofibrous scaffolds. Materials Today Chemistry, 2022, vol. 26.
- 3) Chuan, D., et al. Stereocomplex poly(lactic acid)-based composite nanofiber membranes with highly dispersed hydroxyapatite for potential bone tissue engineering. Composites Science and Technology, 2020, vol. 192.

Vedoucí práce: Ing. Radek Jirkovec, Ph.D.
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce: 1. listopadu 2022
Předpokládaný termín odevzdání: 20. května 2024

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

L.S.

doc. Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.
garant studijního programu

V Liberci dne 1. listopadu 2022

Prohlášení

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

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

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

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si 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 bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

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

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce Ing. Radku Jirkovcovi, Ph.D. za připomínky a pomoc během zpracovávání práce, také Ing. Sentě Müllerové za věnovaný čas, pomoc a trpělivost při provádění biologického testování materiálů a doc. RNDr. Janě Horákové, Ph.D. za poskytnuté konzultace.

Anotace

Práce se zabývá výrobou kompozitního materiálu vhodného pro použití v kostním tkáňovém inženýrství pomocí technologie střídavého elektrického zvlákňování. Pro výrobu kompozitních materiálů byl použit polykaprolakton v kombinaci s hydroxyapatitovými mikro- a nanočásticemi. Variací hmotnostních koncentrací přidaných anorganických částic do polymerního roztoku docházelo ke změně vlastností roztoků i výsledných vlákněných vrstev. U připravených roztoků byla měřena dynamická viskozita a elektrická vodivost. Vyrobené vlákněné vrstvy byly charakterizovány pomocí elektronové mikroskopie, velikosti průměrů vláken, smáčivosti a povrchové energie. Vybrané materiály byly podrobeny zkoumání cytotoxicity, adheze a proliferace lidských osteoblastů MG-63.

Klíčová slova:

střídavé elektrické zvlákňování, kostní tkáňové inženýrství, polykaprolakton, hydroxyapatitové částice

Annotation

The thesis deals with producing a composite material suitable for bone tissue engineering via alternating electrospinning technology. Polycaprolactone was combined with hydroxyapatite micro- and nanoparticles to produce composite materials. The properties of the solutions and resulting fiber layers varied by the mass concentrations of inorganic particles in the polymer solution. The dynamic viscosity and electrical conductivity of the prepared solutions were measured. The produced fiber layers were characterized by electron microscopy, and then the diameter of fibers, as well as wettability and surface energy, were measured. Selected materials were investigated for cytotoxicity, adhesion, and proliferation of MG-63 human osteoblasts.

Keywords:

alternating current electrospinning, bone tissue engineering, polycaprolactone, hydroxyapatite particles

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Úvod	8
2. Teoretická část	10
2.1. Úvod do tkáňového inženýrství	10
2.2. Scaffoldy	12
2.2.1. Buněčná adheze ke scaffoldu.....	14
2.2.2. Smáčení a povrchová energie	17
2.2.3. Technologie výroby vlákenných scaffoldů.....	23
2.2.3.1. Stejnoseměrné elektrické zvlákňování	24
2.2.3.2. Střídavé elektrické zvlákňování	25
2.2.4. <i>In vitro</i> testování	27
2.3. Kostní tkáň	29
2.3.1. Mezibuněčná hmota kostní tkáně	30
2.3.2. Kostní buňky.....	30
2.3.3. Struktura kostní tkáně	32
2.3.4. Osifikace	33
2.4. Léčba kostních defektů	34
2.4.1. Kostní tkáňové inženýrství	36
2.4.1.1. Homogenní materiály	38
2.4.1.2. Kompozitní materiály	42
2.4.1.3. Vlákenné scaffoldy funkcionalizované hydroxyapatitem	43
3. Experimentální část	45
3.1. Příprava a charakterizace polymerních roztoků	46
3.1.1. Dynamická viskozita.....	46
3.2. Zvlákňování polymerních roztoků a charakterizace vytvořených vrstev	47
3.2.1. Výroba vlákenných vrstev	47

3.2.2.	Analýza vlákných vrstev	49
3.3.	Příprava a charakterizace modifikovaných polymerních roztoků s μ HA	52
3.3.1.	Dynamická viskozita.....	52
3.3.2.	Elektrická vodivost	53
3.4.	Zvláknění polymerních roztoků s μ HA a charakterizace vrstev	54
3.4.1.	Výroba vlákných vrstev	54
3.4.2.	Analýza vlákných vrstev	54
3.5.	Příprava a charakterizace modifikovaných polymerních roztoků s nHA	62
3.5.1.	Dynamická viskozita.....	62
3.5.2.	Elektrická vodivost	63
3.6.	Zvláknění polymerních roztoků s nHA a charakterizace vrstev	64
3.6.1.	Výroba vlákných vrstev	64
3.6.2.	Analýza vlákných vrstev	64
3.7.	Biologické testování <i>in vitro</i>	72
3.7.1.	Cytotoxicita extraktů vybraných materiálů.....	72
3.7.2.	Buněčná adheze a proliferace	75
4.	Závěr	83
5.	Použitá literatura	87
	Seznam obrázků	98
	Seznam grafů	101
	Seznam tabulek	102

Seznam zkratek

ALP	Alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
ATP	Adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BET	Metoda Brunauer–Emmett–Teller
BMP	Kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
CCK-8	Cell counting kitt-8
DAPI	4', 6-diamidin-2-fenylindol
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ECM	Mezibuněčná hmota (extracellular matrix)
FBS	Fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FITC	Fluorescein-5-isothiokyanát
HA	Hydroxyapatit
hm.%	Hmotnostní procento
LBL	Metoda vrstvení (layer by layer)
MEM	Minimální esenciální médium dle Eagla (Eagle's Minimum Essential Medium)
MG-63	Buněčná linie lidských osteoblastů z osteosarkomu
MSC	Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NC	Negativní kontrola
nHA	Nanočástice hydroxyapatitu
obj.%	Objemové procento
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PC	Pozitivní kontrola

PCL	Polykaprolakton
PDA	Polydopamin
PEEK	Polyetheretherketon
PEMF	Pulzní magnetoterapie (pulsed electromagnetic field therapy)
PGA	Polyglykolid
PHB	Polyhydroxybutyrát
PLA	Polylaktid
PLDA	Poly-D-laktid
PLGA	Kopolymer polylaktidu a polyglykolidu
PLLA	Poly-L-laktid
PMMA	Polymethylmethakrylát
PTFE	Polytetrafluorethylen
RGD	Tripeptidová sekvence arginin-glycin-aspartát
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)
SLA	Stereolitografie
SLS	Selective laser sintering
TCP	Fosforečnan trivápenatý (tricalcium phosphate)
TGF- β	Transformující růstový faktor beta
THF	Tetrahydrofuran
UHMWPE	Ultravysocemolekulární polyethylen (ultra high molecular weight polyethylene)
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
μ HA	Mikročástice hydroxyapatitu

1. Úvod

Kostní defekty od nadkritické velikosti ztrácejí schopnost vlastní regenerace. Samotný vznik kostního defektu může být způsoben na základě úrazu, odstranění nádoru, chronické infekce, osteoporózy nebo po nezdařené artroplastice (Alonzo et al. 2021). Samotná kritická velikost není jednotně definována, což vede k rozdílným názorům v postupech léčby kostních defektů. Obecně lze říci, že se jedná o defekt, který by i po chirurgickém zásahu nebyl schopen se regenerovat bez nutnosti další operace. Schemitsch (2017) uvádí, že často se hraniční velikost defektu pohybuje v rozsahu 1–2 cm a při ztrátě tkáně větší než polovina obvodu kosti, avšak existuje mnoho faktorů, které i tuto definici vylučují.

Defekty tohoto rozsahu mohou být léčeny pouze traumatologickou nebo ortopedickou operací. V České republice je standardní léčbou těchto defektů transplantace za využití kostních štěpů, které mohou být alogenního, autologního nebo xenogenního původu. Samotná příprava transplantátů tkání je pod záštitou Národního centra tkání a buněk. Byť je proces prováděn pod přísnými regulacemi s cílem zamezit infekčním onemocněním, zánětům a reoperacím, je i tak tato forma léčby spjata s komplikacemi.

Za alternativu je považován přístup stojící na tkáňovém inženýrství, který si klade za cíl vytvářet funkční biologické náhrady, jejichž úkolem je dopomoci k regeneraci tkáně či orgánů nebo zlepšit jejich funkci, případně ji zachovat díky využití poznatků přírodních věd a materiálového inženýrství (Langer a Vacanti 1993). Pro kostní náhrady jsou využívány kovové, keramické, polymerní, případně kompozitní materiály (Ghassemi et al. 2018). V rámci kostního tkáňového inženýrství nabývají na významu kompozitní materiály kombinující biodegradabilní polymery a keramiku (Mahmud et al. 2023), kdy tkáňový nosič imitující mezibuněčnou hmotu kostní tkáně představuje dočasné lešení pro osteoblasty. V průběhu léčby dochází k jeho degradaci adekvátně vůči rychlosti růstu nové tkáně.

Od vývoje vhodného materiálu až po implementaci v rámci klinické léčby je dlouhá cesta. Z toho důvodu standardní přístup představuje stále hlavní směr léčby, přičemž souběžně dochází k rozvoji a výzkumu na poli vývoje vhodných materiálů pro náhradu a regeneraci kostní tkáně (Koordinační středisko transplantací 2019; Lo et al. 2020).

Tato práce se zabývá výrobou kompozitního materiálu prostřednictvím technologie střídavého elektrického zvlákňování pro aplikaci v kostním tkáňovém inženýrství.

V rámci experimentální části byly vytvořeny vlákenné vrstvy z polykaprolaktonu (PCL) a hydroxyapatitových mikro- (μ HA) a nanočástic (nHA) o hmotnostních koncentracích 5; 10; 15; 20 a 30 %. Práce sestává z teoretické a experimentální části. Teoretická část popisuje obor tkáňového inženýrství, scaffoldy, specifika kostní tkáně a léčbu kostních defektů. V experimentální části jsou chronologicky popsány provedené pokusy a získané výsledky s ohledem na vlastnosti připravených roztoků, vyrobených vrstev, průběh zvláknování a výsledky *in vitro* testování zohledňující cytotoxicitu extraktů vybraných vzorků a dále adhezi a proliferaci buněčné linie osteoblastů MG-63 na těchto materiálech.

2. Teoretická část

Proces tkáňového inženýrství zahrnuje návrh scaffoldu, k němuž je nutná znalost nahrazované tkáně. V návaznosti na to dochází k výběru materiálů a příslušné technologie výroby scaffoldu (tkáňového nosiče), která určí jeho výslednou strukturu. Nosič je následně charakterizován a je zkoumáno jeho chování při interakci s buněčnými kulturami. Nejprve v laboratorních podmínkách, *in vitro*, kdy se jedná například o testy cytotoxicity, buněčné adheze a proliferace (proliferace znamená schopnost buněk se rychle množit). Další pomyslný krok představuje v rámci preklinických testů testování na zvířatech, *in vivo* (v rámci živého organismu). Následuje série klinických testů, které jsou rozdělovány na tři fáze, kdy dochází ke kontrolovaným testům na lidech pod kontrolou národních a nadnárodních orgánů (Lo et al. 2020).

V návaznosti na tyto postupy je sestavená i teoretická část. První podkapitola uvádí do oboru tkáňového inženýrství, následuje část věnující se scaffoldům, jejich vlastnostem, technologiím výroby vlákných scaffoldů a *in vitro* testování. Další podkapitola se věnuje specifikům kostní tkáně a následují způsoby léčby kostních defektů.

2.1. Úvod do tkáňového inženýrství

Poškození tkáně nebo orgánu vlivem onemocnění, zranění či na základě vývojové vady představuje problém zdravotnický i ekonomický. V současné době je v rámci klinické léčby využíváno transplantací vlastní tkáně (autologní) nebo transplantace dárcovských orgánů a tkání (alogenní), případně využití dárce jiného živočišného druhu (xenogenní). Avšak nedostatky týkající se problémů s dárci orgánů nepředstavuje v dlouhodobém hledisku praktický přístup léčby, a tak jsou hledány alternativy (Chandra et al. 2020). Nevýhody spočívají v nedostatku dárců orgánů, stárnoucí populaci, komplikované logistice při nutnosti dodržení transplantace v určitém časovém horizontu od odběru dárcovského orgánu (Langer a Vacanti 1993; Chandra et al. 2020).

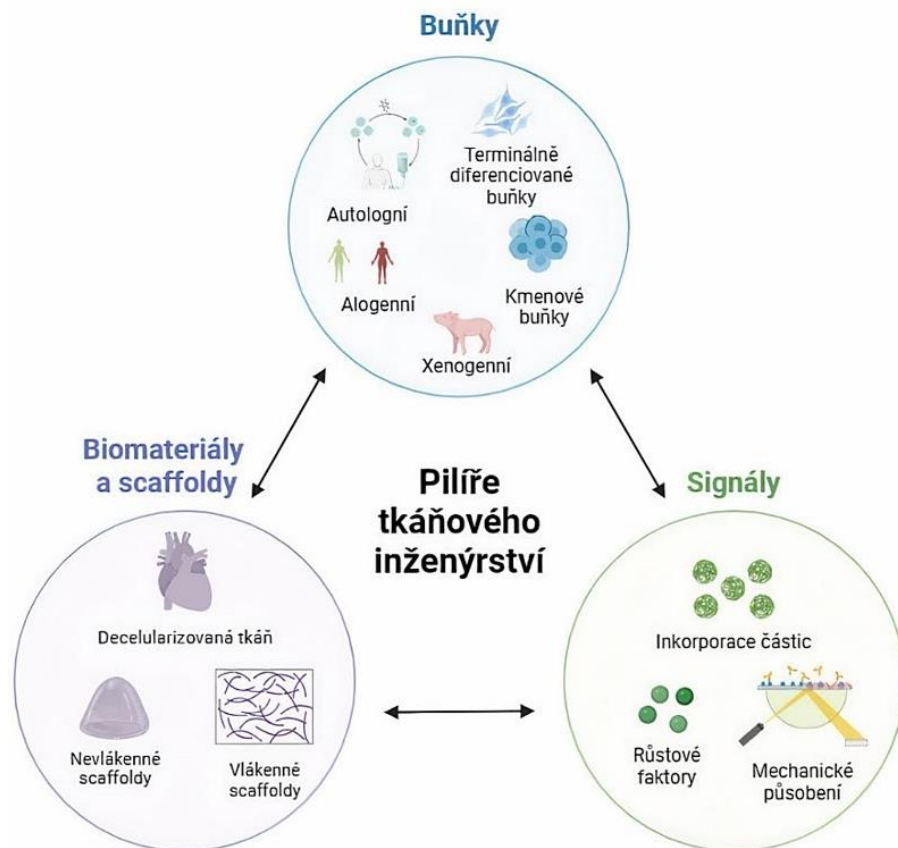
V České republice je čekatel na dárcovský orgán zapsán na čekací listině v Národním registru osob čekajících na transplantaci. Čekací doba je závislá především na tom, zda je vhodný dárců k dispozici. Stěžejním faktorem jsou medicínská kritéria (např.: krevní skupina, naléhavost transplantace, váhový a velikostní poměr mezi dárcem a příjemcem) (Koordinační středisko transplantací 2019). V rámci České republiky je na základě zákona o darování, odběrech a transplantacích tkání aplikován princip předpokládaného souhlasu s dárcovstvím orgánů a tkání. Pokud osoba písemně nevyjádří svůj nesouhlas

vůči tomuto principu, může se osoba po smrti dárce stát. Z toho vyplývá, že se rozlišují dárce orgánů a tkání na žijící a zemřelé. Dárce je vždy podroben sérii vyšetření tak, aby byla minimalizována rizika spjatá s přenosem orgánů. Odběry se provádějí v transplantačních centrech nebo tkáňových zařízeních. Tato zařízení se nacházejí na seznamu držitelů povolení činnosti v oblasti lidských tkání a buněk (Koordinační středisko transplantací 2019). Ve spojitosti s odběrem kostních štěpů tímto oprávněním disponuje například Next Fertility IVF prof. Zech Pilsen s.r.o., Oblastní nemocnice Kladno a.s. nebo Nemocnice Pardubického kraje, a. s. (Státní ústav pro kontrolu léčiv 2023).

Jak již bylo naznačeno v úvodu práce, tkáňové inženýrství představuje odvětví zabývající se regenerací a nahrazováním poškozených tkání a orgánů. Díky propojení znalostí přírodovědných oborů a materiálového inženýrství je možné čelit obtížím, které jsou s transplantací orgánů a tkání spjaté (Olson et al. 2011). I navzdory tomu, že se jedná o poměrně mladý obor, proběhl významný pokrok napříč tímto odvětvím a vědecké poznatky začaly postupně přecházet na komerční trh (Parveen et al. 2006).

Obecně lze konstatovat, že nejdůležitější části tkáňového inženýrství představují buňky, signály a tkáňové nosiče, jak je znázorněno na *obrázku 1*. Buňky představují důležitou část. Na základě jejich původu je můžeme dělit na *autologní*, které jsou odebrány přímo od pacienta a jsou mu vlastní. Dále na *alogenní*, které jsou odebrány dárce, který není následně jejich příjemcem. V neposlední řadě se jedná o *xenogenní*, které pocházejí od jiného živočišného druhu. Rovněž lze buněčné kultury rozdělit na základě stupně diferenciaci na kmenové nebo již diferenciované (Aker 2016; Tsiklin et al. 2022). Dále jsou zmíněny *signály*, které představují určité stimuly. Na základě nahrazované tkáně je pro dané buňky potřeba vytvořit prostředí, které bude účelné pro jejich růst, proliferaci. Je jim dodáváno to, co je jim v rámci nativní tkáně vlastní s cílem podpořit proliferaci na tkáňovém nosiči. Může se jednat o signály fyzikální, které zahrnují dynamické procesy, jako je mechanické namáhání nebo elektrostimulaci. Dále mohou být použity chemické signály zahrnující diferenciační faktory pro podporu diferenciaci kmenových buněk nebo růstové faktory pro podporu jejich růstu. Mimo jiné mohou být do *objemové fáze* scaffoldů inkorporované molekuly či částice. Funkcionalizovat scaffoldy lze také pomocí částic adsorbovaných na jejich *povrchu* (Szwed-Georgiou et al. 2023). Modifikace povrchu je prováděna například pomocí plazmové úpravy nebo působením ultrafialového záření (Bacakova et al. 2011).

Dále metody stojící na nekovalentních interakcích, jako je technika vrstvení layer by layer (LBL), která využívá adsorpci opačně nabitých polymerů k vytvoření povlaku (Nemati et al. 2019) nebo metoda využívající vrstvu polydopaminu (PDA), která je inspirována slávkou jedlou, která se dokáže adhezivně přichytit na povrch ve vodě pomocí proteinů (Yang et al. 2012). Rovněž uspořádání vláken (izotropní, či anizotropní) u vlákněných tkáňových nosičů má vliv na proliferaci a diferenciaci buněk (Nemati et al. 2019).



Obrázek 1: Schéma klíčových oblastí tkáňového inženýrství. Vytvořeno pomocí Biorender.com, vychází z: (Murphy et al. 2013; Akter 2016; Chandra et al. 2020)

2.2. Scaffoldy

Jeden ze tří zmiňovaných pilířů tkáňového inženýrství představují scaffoldy, taktéž nazývané jako tkáňové nosiče nebo lešení pro příslušné buňky. Jedná se o vytvořený materiál, který imituje funkci mezibuněčné hmoty (ECM) nativní tkáně a umožňuje buňkám jejich růst (Nemati et al. 2019; Chandra et al. 2020). Z hlediska struktury scaffoldů je možné rozdělit tkáňové nosiče na nevlákněné, pod které spadají hydrogely (prostorová síť, která botná ve vodě), porézní scaffoldy (strukturou připomínající houby či pěny), decelularizovanou tkáň (je zbavena buněk) a vlákněné scaffoldy (Wolfová 2015;

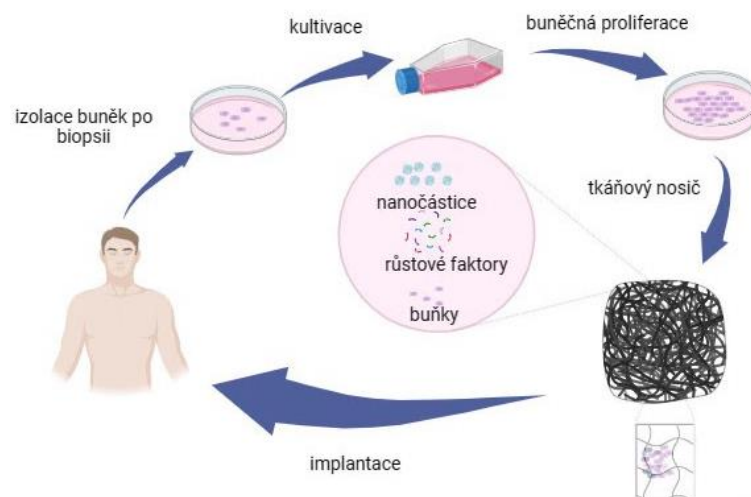
Akter 2016; Isaeva et al. 2022). Dělení na vláknenné a nevláknenné není náhodné, ale souvisí se složením mezibuněčné hmoty, která disponuje amorfni a fibrilární fází.

Důležité jsou vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti scaffoldů směrem k nahrazované tkáni. Jedná se o prostorovou strukturu, porozitu, mechanické vlastnosti. V rámci *struktury* je myšleno, zda se bude jednat o 2D útvar (vytvořený například pomocí elektrostatického zvlákňování), nebo je nutné vytvořit prostorový útvar (například prostřednictvím 3D tisku), což má souvislost se schopnostmi a potřebami buněk dané tkáně. Neméně důležitá je *porozita*, která ovlivňuje růst buněk příslušnou strukturou scaffoldu (Lutzweiler et al. 2020). Zmíněné vlastnosti, které jsou v rámci dané aplikace potřebné, mají zásadní vliv pro volbu technologie výroby příslušného scaffoldu. Nezbytnou vlastností je také *biokompatibilita* scaffoldu. Tato vlastnost dle Ratnera (2011) značí o schopnosti materiálu nebýt vůči buňkám a organismu toxický a umožňuje spouštět nebo řídit regeneraci tkáně pomocí materiálu tím způsobem, že nedochází k jeho opouzdření kolagenními vlákny prostřednictvím fibroblastů (vazivových buněk).

Na základě použitého materiálu přichází v úvahu i možnost degradace materiálu v cílové tkáni ve smyslu chtěné kontrolované postupné ztráty mechanických vlastností, označováno termínem *biodegradabilita*. Tkáňový nosič je v tomto případě pouze dočasným lešením pro buňky, kdy rychlost jeho degradace by měla být úměrná rychlosti tvorbě nových buněk, které budou vytvářet ECM, a tou nahrazovat tkáňový nosič (Dong et al. 2009; Guo a Ma 2014; Jenčová et al. 2021b).

Samotné scaffoldy se mohou osazovat buňkami, případně růstovými faktory, které jsou kultivovány *in vitro*, kdy dojde k vytvoření umělé tkáně, která je následně na postižené místo implantována. Nebo jsou tkáňové nosiče aplikovány do živého organismu, ve kterém dojde ke kultivaci (navýšení jejich počtu), jedná se o metodu *in vivo* (O'Brien 2011; Dulany et al. 2020; Bara a Guilak 2020). Rovněž je znám *in situ* přístup, který umožňuje regeneraci v rámci prostředí organismu v defektní části po implantaci scaffoldu bez předchozí kultivace buněk v umělých podmínkách (Sengupta et al. 2014).

Hlavní principy tkáňového inženýrství jsou často popisovány prostřednictvím *in vitro* přístupu, který zahrnuje izolaci buněk z tkáně, jejich kultivaci, následnou *in vitro* implementaci na scaffold, kultivaci buněk na scaffoldu a v neposlední řadě implantaci na poškozené místo, jak je zobrazeno na *obrázku 2*.



Obrázek 2: Schéma základního principu tkáňového inženýrství, zde konkrétně metoda *in vitro*. Vytvořeno v Biorender.com, vychází z: (Dvir et al. 2011; Asadian et al. 2020)

2.2.1. Buněčná adheze ke scaffoldu

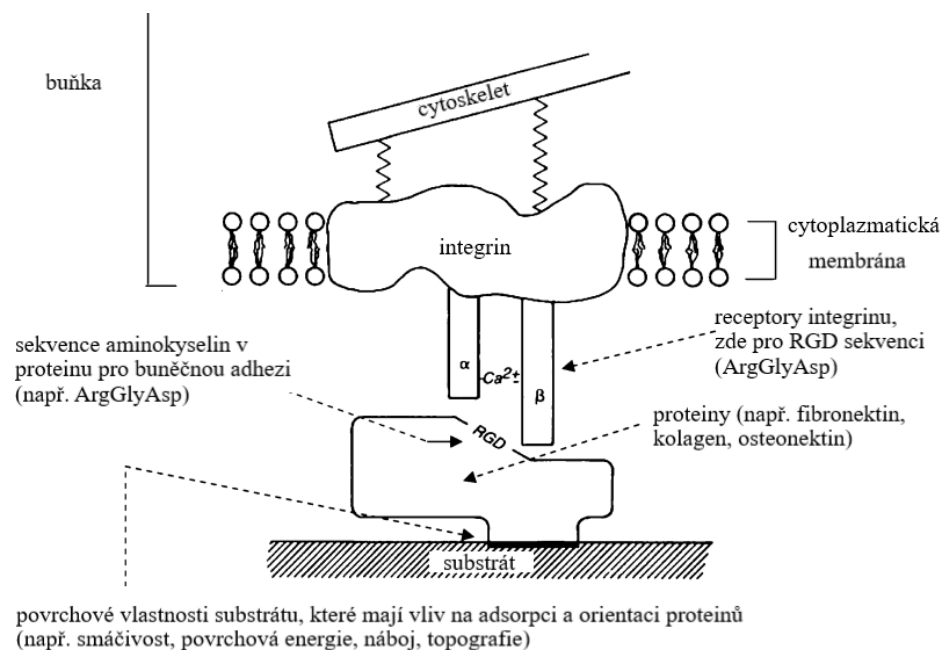
Obecně adheze představuje stav, kdy materiály dokáží k sobě přilnout a držet pohromadě. V rámci buněčné adheze se jedná o schopnost jedné buňky přilnout ke druhé nebo k mezibuněčné hmotě (ECM), případně k materiálu (scaffoldu). Dále bude popsán způsob uplatňovaný při buněčné adhezi ke scaffoldu. Buněčná adheze je dynamickým procesem a má zásadní vliv na buněčnou komunikaci, buněčný cyklus a migraci (Khalili a Ahmad 2015). Klíčovou roli pro buněčnou adhezi představuje buněčná membrána (Lotfi et al. 2013).

Cytoplazmatická membrána buněk je tvořena lipidy a bílkovinami. Lipidová souvislá dvouvrstva má amfipatický charakter, kdy hydrofobní konce jsou orientovány dovnitř struktury membrány a hydrofilní do cytosolu a extracelulárního prostoru. Z membránových lipidů jsou zastoupeny fosfolipidy, steroly a glykolipidy. Samotná membrána se chová jako tekutina, v závislosti na složení uhlovodíkových řetězců fosfolipidů a přítomnosti sterolů (cholesterolu) se její tekutost liší. Buněčnou membránu lze označovat také jako polopropustnou, což značí o její schopnosti transportovat látky a samotnou buňku ohraničovat, vymezovat (Alberts et al. 2005).

Prostup malých nepolárních molekul membránou je založen na difuzi. U iontů a větších polárních molekul již není prostup přes membránu tímto způsobem možný, a tak je využíváno *membránových transportních proteinů*, které mohou plnit funkci přenašečů, receptorů, enzymů katalyzujících reakce nebo *spojníků*, mezi které se řadí protein *integrin*. Funkce integrinů spočívá ve spojování aktinových filament v rámci cytoskeletu

uvnitř buňky s proteiny extracelulární matrice (Alberts et al. 2005). Jsou tvořeny dvěma řetězci (podjednotkami) (α , β), variant kombinací těchto řetězců je několik (Lotfi et al. 2013). Samotná mezibuněčná hmota se složením odlišuje v návaznosti na danou tkáň, avšak obecně platí, že se skládá z vlákněných proteinů, adhezních bílkovin a amorfni hmoty (Alberts et al. 2005).

Po implementaci tkáňového nosiče do organismu a rovněž při kontaktu tkáňového nosiče s buněčnou kulturou *in vitro* nedochází k přímému kontaktu mezi buňkami a scaffoldem, ale dochází k navázání specifické aminokyseliny v adsorbovaných proteinech na jeho povrch. Během několika sekund, případně minut, se na pevném povrchu vytvoří vrstva adsorbovaného proteinu (Horbett 2004; Webster a Ahn 2007). Typ proteinu, který se zpočátku adsorbuje a biologická aktivita proteinu, jakmile jsou adsorbovány, určuje buněčnou adhezi. V závislosti na *chemickém složení, smáčivosti, drsnosti, náboji* povrchu scaffoldu, se adsorpce proteinů odlišuje. Adsorpce zprostředkovává buněčnou adhezi a poskytuje buňce signály prostřednictvím buněčných adhezních receptorů, integrinů. Buňky na základě toho mohou přilnout k povrchu scaffoldu a uvolňovat aktivní sloučeniny pro signalizaci, ukládání extracelulární matrice, buněčnou proliferaci a diferenciaci (Vagaská et al. 2010). Například osteoblasty přilnou k vybrané tripeptidové sekvenci arginin-glycin-aspartát (RGD), která je nezbytná pro adhezivní schopnost buněk k ECM, v adsorbovaných proteinech viz *obrázek 3*.



Obrázek 3: Interakce buněk s proteiny adsorbovaných na substrátu.

Převzato z: (Webster a Ahn 2007)

Odborně se tato interakce mezi buňkami a scaffoldy nazývá *fokální adheze* (Rikitake a Takai 2011), kdy dojde k připojení buňky, aktinových filament cytoskeletu buňky prostřednictvím integrinů ve fosfolipidové dvouvrstvě cytoplazmatické membrány na vybranou sekvenci aminokyselin, adsorbovaných proteinů (Chang a Wang 2011; Anon. 2023).

Zda tato a další aminokyselinové sekvence budou exponovány buňkám po adsorpci proteinů, bude mít vliv na to, zda buňky přilnou, nebo ne. Toho je využíváno při navrhování biomateriálů pro specifický integrin, které jsou využívány k řízení chování buněk pro zlepšení regenerace tkáně. Pojem *biomateriál* zastupuje neživý materiál, který je konstruován pro interakce s biologickými systémy pro lékařské aplikace například jako náhrada tkáně, orgánu. Jsou využívány slitiny kovů, keramika nebo polymery (Lotfi et al. 2013).

U vysoce hydrofilních povrchů dochází k velmi slabému navázání proteinů. Superhydrofobní povrchy s kontaktními úhly vyššími jak 150° umožňují adsorpci proteinů, avšak v denaturované a rigidní struktuře, případně mění konformaci, a tím zhoršují buněčnou adhezi (Bacakova et al. 2011). Optimální buněčná adheze probíhá na površích s kontaktními úhly v rozmezí $40\text{--}70^\circ$ (Al-Azzam a Alazzam 2022), taktéž označované v rámci literatury jako středně hydrofilní povrchy, které buněčnou adhezi zprostředkovávají ve vhodné konformaci, která zpřístupňuje specifická místa molekul adhezním receptorům buňky (Bacakova et al. 2011; Al-Azzam a Alazzam 2022).

V závislosti na velikosti nerovností, drsnosti, povrchu lze rozlišit *makrodrsnost* (100 μm –milimetry), *mikrodrsnost* (100 nm–100 μm) a *nanodrsnost* (<100 nm). V závislosti na typu (velikosti) buněk se odlišují také interakce. Obecně dle získaných výsledků platí, že mikrodrsnost by měla podporovat diferenciaci kultivovaných buněk ve srovnání s hladkými povrchy. Drsnost pod 100 nm má kladný vliv na buněčnou adhezi, jelikož ECM má rovněž koncepci kompartmentů v rámci nanometrů (nanokrystaly, nanovláknenné fibrily). Z toho důvodu nanodrsnost umožňuje receptorům buněčné adheze přístup k aminokyselinovým sekvencím jako je RGD, které slouží jako ligandy pro tyto receptory (Bacakova et al. 2011).

Náboj povrchu materiálů interagujících s buněčnými kulturami může významně ovlivnit jejich adhezi a proliferaci, a to zejména v rané fázi. Velké množství studií prokázalo vliv především pozitivního náboje, ale i záporný přinesl příznivé ovlivnění

adsorpce proteinů a podporu buněčné adheze (Chang a Wang 2011; Metwally a Stachewicz 2019). Povrchové funkční skupiny souvisí s nábojem a smáčivostí povrchu materiálu, čímž řídí adsorpci proteinů a následnou buněčnou adhezi (Metwally a Stachewicz 2019). V *tabulce 1* se nachází vliv funkčních skupin karboxylové (-COOH), hydroxylové (-OH), methylové (-CH₃) a aminoskupiny (-NH₂) na buněčnou adhezi.

Tabulka 1: Vliv funkčních skupin na buněčnou adhezi. Vychází z: (Thevenot et al. 2008; Chang a Wang 2011; Metwally a Stachewicz 2019)

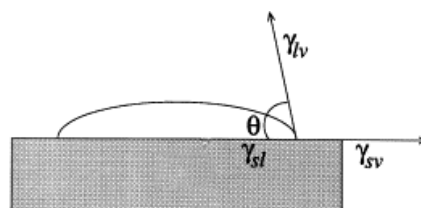
funkční skupina	náboj	smáčivost	buněčná odpověď
-CH ₃	neutrální	hydrofobní	zvýšení adheze leukocytů
-OH	neutrální	hydrofilní	zvýšená diferenciacie osteoblastů
-COOH	negativní	hydrofilní	zvýšené uchycení osteoblastů
-NH ₂	pozitivní	hydrofilní	podpora diferenciacie osteoblastů

2.2.2. Smáčení a povrchová energie

Na rozhraní tří fází, ze kterých jsou alespoň dvě tekutiny dochází ke *smáčení*, nebo až k úplnému rozestírání. Fáze představuje určitou část, ve které jsou stálé vlastnosti, nebo se spojitě v prostoru mění. Fázové rozhraní je tedy z makroskopického pohledu určitou hranicí, kde dochází ke skokové změně vlastností. Kontakt kapaliny s pevnou látkou je možné popsat pomocí smáčecího úhlu, také označovaného jako *kontaktní úhel* (Bartovská a Randová 2019).

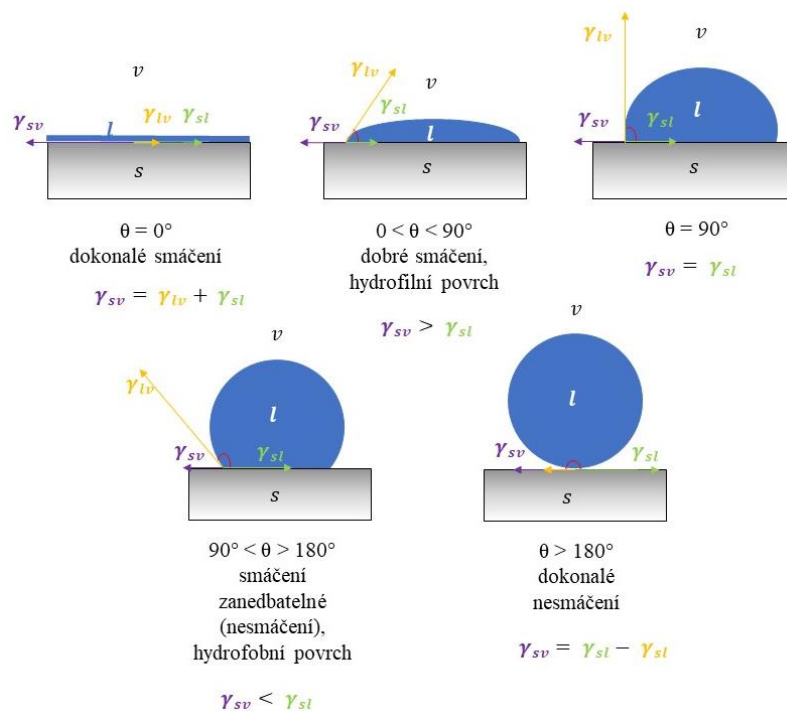
Na *obrázku 4* je zobrazena kapka kapaliny na pevné podložce. Kontaktní úhel θ je dán rovnováhou sil, respektive napětí, na styku tří fází (s-pevná látka, l-kapalina, v-plyn) a představuje způsob změření míry smáčivosti povrchu (Decker et al. 1999).

Velikost tohoto úhlu, a tudíž i tvar kapky závisí na velikosti mezifázových energií na rozhraní pevná látka-kapalina (γ_{sl}), kapalina-plyn (γ_{lv}) a pevná látka-plyn (γ_{sv}) (Kwok a Neumann 1999).



Obrázek 4: Kontaktní úhel kapaliny na pevné podložce. Převzato z: (Kwok a Neumann 1999)

V případě, kdy je tento úhel ostrý, kapalina daný povrch smáčí. V případě, kdy je kapalinou voda, jedná se o hydrofilní povrch. Pokud je tento úhel tupý, kapalina povrch pevné podložky nesmáčí. V situaci, kdy zvolenou kapalinu představuje voda, jde o hydrofobní povrch. Dané situace jsou zobrazeny na *obrázku 5*. Materiály vykazující hodnotu úhlu vyšší jak 150° jsou označovány jako *superhydrofobní* (Zhao a Jiang 2018). Příklad dokonalého nesmáčení by znamenal nulové interakce mezi pevnou látkou a kapalinou, tudíž jde o hypotetickou situaci (Bartovská a Randová 2019).



Obrázek 5: Kontaktní úhly kapaliny na pevné podložce. Vychází z: (Bartovská a Šišková 2005)

Na základě Youngovy rovnice (1) pro homogenní, ideální látku a povrchové napětí je dán vztah mezi kontaktním úhlem a povrchovým napětím povrchu pevného tělesa.

$$\gamma_{sv} = \gamma_{ls} + \gamma_{lv} \cdot \cos \theta_{\text{Youngův}} \quad (1)$$

Youngova rovnice definuje smáčivost absolutně hladkého, homogenního povrchu, avšak v praxi jsou povrchy nerovné nebo i chemicky heterogenní. Proto je rozdíl mezi skutečným úhlem θ_s smáčení a úhlem zdánlivým θ_z (*obrázek 6*). Drsnost povrchu zvětšuje plochu kontaktu mezi pevnou a kapalnou fází (Bartovská a Randová 2019).



Obrázek 6: Skutečný (θ_s) a zdánlivý (θ_z) úhel smáčení. Převzato z: (Bartovská a Randová 2019)

V této návaznosti Wenzel uvedl rovnici (2) pro kontaktní úhel pro drsný povrch, kdy se předpokládá, že kapka kapaliny zcela pronikne mezerou na povrchu pevného tělesa. Kde θ_W je představován teoretickou hodnotou Wenzelova kontaktního úhlu, tedy úhel zdánlivý (θ_z) a r je poměr skutečné plochy styku pevné látky s kapalinou k její předpokládané ploše (rovněž označován jako faktor drsnosti) a je vždy větší než 1 (Shaoxian a Shizhu 2019; Bartovská a Randová 2019).

$$\cos \theta_W = r \cdot \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}} = r \cdot \cos \theta_{Youngova} \quad (2)$$

Dle Wenzelova modelu je hydrofilní povrch více hydrofilní a hydrofobní více hydrofobní, jelikož nerovnosti a prohlubně na povrchu mohou působit jako kapilára, ve které kapalina stoupá u ostrého kontaktního úhlu ($\theta_{Youngova}$) a u tupého kontaktního úhlu ($\theta_{Youngova}$) na hladkém povrchu klesá, viz obrázek 7 (Shaoxian a Shizhu 2019; Bartovská a Randová 2019).



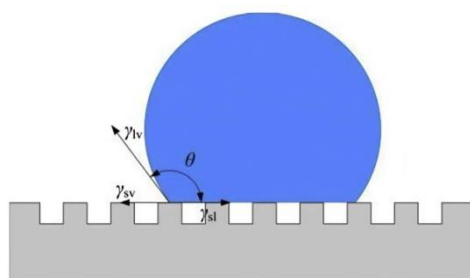
Obrázek 7: Úhel smáčení u hladkého ($\theta_y = \theta_{Youngova}$) a drsného povrchu (θ_z) (a) pro hydrofilní povrch, (b) pro hydrofobní povrch. Převzato z: (Bartovská a Randová 2019)

Tento model je však použitelný pouze pro homogenní povrchy. Dále následoval model dle Cassieho a Bartexa, kteří pojali povrch s nerovnoměrnou drsností jako povrch z různých materiálů a kontaktní úhel pevného povrchu s nerovnoměrným povrchem a kontaktní úhel považovali za součet smáčivosti jeho částí. Úpravou Youngovy rovnice (1) získali rovnici smáčivosti heterogenního povrchu (3). Pod proměnnou f_i se nachází podíl plochy odpovídající povrchu s příslušným kontaktním úhlem na celkové ploše povrchu. Kontaktní úhel θ_{CB} je předpokládaná hodnota Cassie-Baxterova modelu, tedy jedná se o úhel zdánlivý (θ_z) (Hebbar et al. 2017; Shaoxian a Shizhu 2019).

$$\cos \theta_{CB} = \sum_i f_i \cdot \cos \theta_i \quad (3)$$

Na *obrázku 8* je zobrazen případ, kdy kapka nezatéká do rýh na povrchu pevné podložky, jelikož je to energeticky nevýhodné. Po dosažení do (3) dojde k (4), kdy f je vždy menší jak 1, a tak povrch s vyšší mírou drsnosti má tendenci být více hydrofobní (Hebbar et al. 2017; Shaoxian a Shizhu 2019).

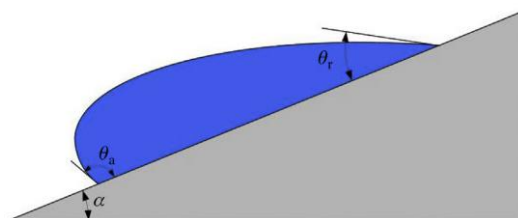
$$\cos\theta_{CB} = f(\cos\theta + 1) - 1 \quad (4)$$



Obrázek 8: Cassie-Baxterův model. Převzato z: (Shaoxian a Shizhu 2019)

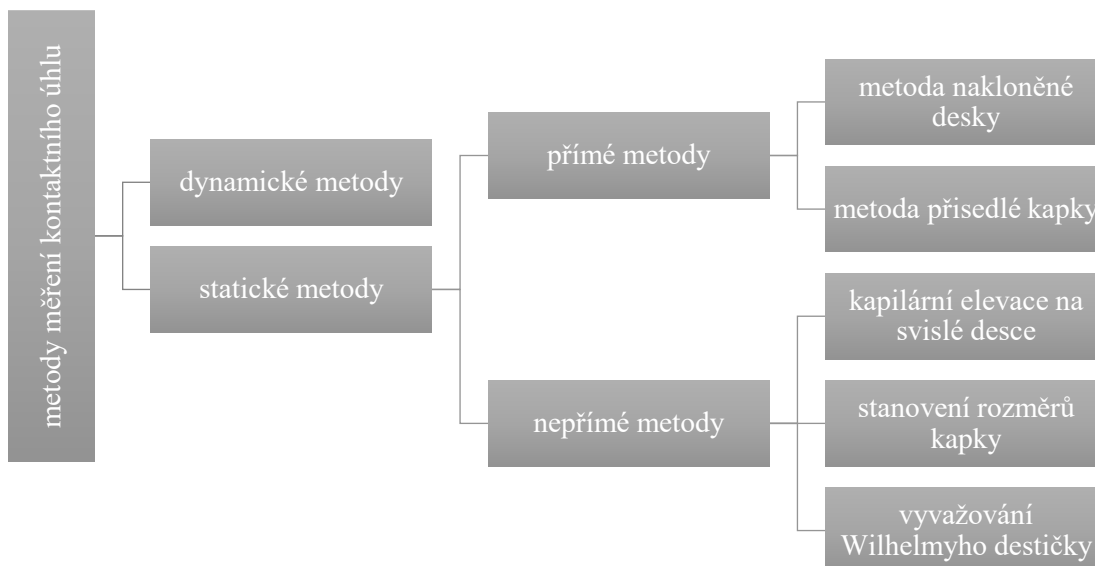
Povrchy s hierarchickou strukturou, kde je drsnost na úrovni makroskopické i v rámci nanosvětla jsou *superhydrofobní*, kdy kontaktní úhel přesahuje 150° . Tuto stavbu povrchu je možné pozorovat například na povrchu listu lotosu, čehož je využíváno při vývoji neadhezivních materiálů při tvorbě tzv. lotosového efektu (Klíčova et al. 2022).

Úhel smáčení závisí na podmínkách děje. Na *obrázku 9* je zobrazena kapka na nakloněné rovině, kde je vyznačen ustupující θ_r a postupující θ_a úhel smáčení. Platí, že $\theta_a > \theta_r$, přičemž může jít o rozdíl $20\text{--}30^\circ$. Rozdíl mezi těmito úhly je nazýván *hysterezi smáčení* (Bartovská a Randová 2019). Hystereze představuje vlastnost kapaliny vytvořit několik úhlů smáčení, které se velikostně liší od rovnovážného. Může být způsobena vlivem nečistot na povrchu, chemickou nestejnorodostí povrchu či jeho drsností (Gao a McCarthy 2006; Butt et al. 2022).



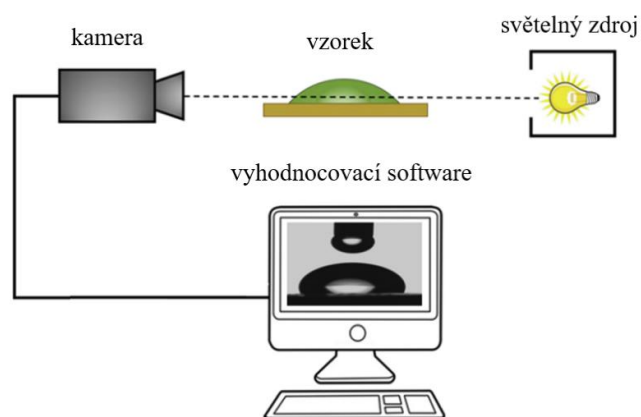
Obrázek 9: Kapka na nakloněné rovině pevného substrátu. Převzato z: (Shaoxian a Shizhu 2019)

Úhel smáčení je přímo měřitelnou vlastností na fázovém rozhraní. Možné metody měření kontaktního úhlu jsou zobrazeny na *obrázku 10* (Hebbar et al. 2017).



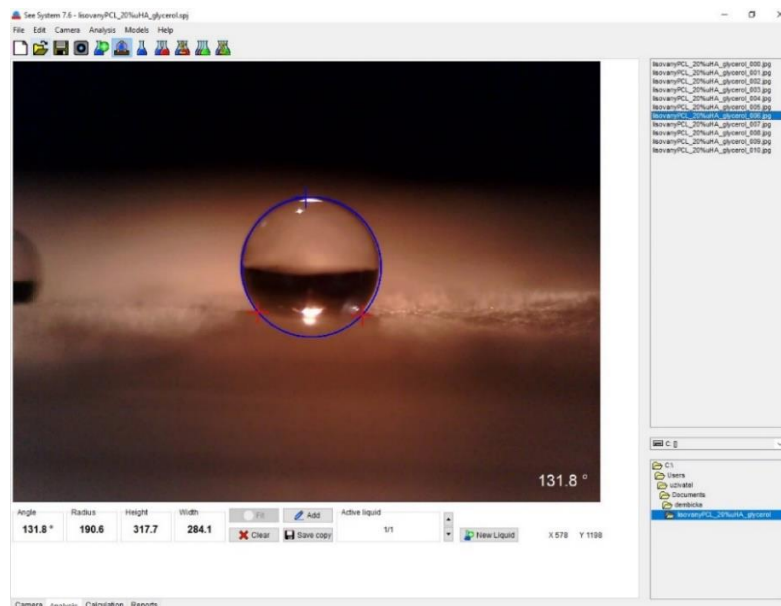
Obrázek 10: Metody měření kontaktního úhlu. Vychází z: (Krásný 2010)

Metoda přisedlé kapky (obrázek 11) spočívá ve snímání vzorku (pevné látky) s kapkou kapaliny kamerou, kdy dojde k pořízení snímku, na jehož základě se vyhodnotí prostřednictvím vhodného softwaru kontaktní úhel (Hebbar et al. 2017).



Obrázek 11: Metoda přisedlé kapky pro měření kontaktního úhlu. Převzato z: (Hebbar et al. 2017)

Příkladem vyhodnocovacího softwaru je SeeSystem 7.6., jehož pracovní prostředí je zobrazeno na obrázku 12. Po depozici kapaliny na vzorek, který je umístěn na destičce je pořízen snímek, na němž jsou označeny tři body, a to vrchol kapky a následně dva body označující hranici styku kapaliny s povrchem, poté se vytvoří model kapky pomocí metody nejmenších čtverců (Štyks 2022).



Obrázek 12: Pracovní prostředí programu See System 7.6.

Na fázovém rozhraní působí na molekuly síly, které jsou rozdílné od těch, které působí v rámci objemové fáze (části objemu systému, ve kterém jsou vlastnosti konstantní) (Bartovská a Randová 2019). V objemové fázi jsou síly působící na molekulu ze všech stran stejně velké. V rámci rozhraní kapalina-plyn jsou síly směřující do plynné fáze zanedbatelné ve srovnání se silami z kapalné fáze, což vede k výslednici sil směřující do kapaliny, a tak molekuly na povrchu mají tendenci se vracet do objemové fáze. U mobilních fázových rozhraní, tedy těch deformovatelných, kam spadají rozhraní mezi kapalinami nebo kapalinou a plynem je využíván pojem *povrchové (mezifázové) napětí*, kdy ve snaze zaujmout co nejmenší velikost je na hladině napětí, čímž je tvořena pružná blána. Fyzikální rozměr povrchového napětí v jednotkách SI soustavy je N/m (Bartovská a Šišková 2005; Krásný 2010). V rámci rozhraní pevná látka-plyn se jedná o *povrchovou energii*, jejíž rozměr je J/m^2 . U mobilních rozhraní jde o *mezifázovou energii*, avšak častěji se užívá zmíněného označení povrchové (mezifázové) napětí, které je definované jako tečná síla působící ve směru povrchu na jednotku délky, kdy u kapalin se obě veličiny (mezifázová energie a mezifázové napětí) shodují číselně i rozměrově (Bartovská a Šišková 2005; Štyks 2022).

Přímé měření volné povrchové energie látky je obtížné, z toho důvodu se hodnoty povrchových energií stanovují nepřímou. Je možné využít pro měření povrchových sil nebo měření kontaktního úhlu a následný výpočet numerické hodnoty povrchové energie (Anon. 2015). K výpočtu povrchového napětí, které závisí na nevazebných interakcích mezi příslušnými molekulami, se využívají různé matematické modely, které

se odlišují v parametrech, což má vliv na to, kdy je vhodné určitý model použít. Jednotlivé názvy příslušných modelů nesou jména jejich tvůrců. Jedná se například o Zismana, Fowkese, Owens-Wendt-Rrebel-Kaelbleho, Wueho, Kwok-Neumanna (Štyks 2022).

2.2.3. Technologie výroby vláknenných scaffoldů

Scaffoldy lze rozlišit na vláknenné a nevláknenné. Nevláknenné zastupují hydrogely (Wolfová 2015), pro tvorbu scaffoldů nevláknenného charakteru prostorové struktury je využíváno například 3D tisku. Konkrétně jsou využívány například technologie stereolitografie (SLA), selective laser sintering (SLS) či bioprinting, kdy hydrogelová suspenze obsahuje buňky, hydrogel a biologicky aktivní látky (Kirillova et al. 2021).

K výrobě *vláknenných* scaffoldů se využívá fázová separace, samosestavování, odstředivé zvláknování, technologie meltblown, stejnosměrné nebo střídavé zvláknování (Nemati et al. 2019; Kirillova et al. 2021; Sivan et al. 2022). Vzhledem k dimenzionální struktuře ECM a vláknité propletené struktuře, kdy průměry vláknité složky se pohybují přibližně v rozmezí 50–500 nm jsou vláknenné scaffoldy vhodnými materiály, jelikož vyráběné vláknenné vrstvy jsou tvořeny spleť mikro- a nanovláken. Co se týká velikostního vymezení nanovláken, neshoduje se s vymezením nanomateriálů, tam je pracováno v rozmezí 10–100 nm. Nanovláknena jsou označována do velikosti průměrů 500 nm, dále se jedná o submikronová vlákna, která mají horní hranici 1000 nm, poté jsou označována jako mikrovlákna (Stojanovska et al. 2022). Nanovláknena, respektive nanovláknenné vrstvy, jsou významné díky velkému měrnému povrchu a porositě, která v této aplikaci rovněž podporuje migraci buněk, jejich adhezi, diferenciaci a proliferaci, tudíž je zde strukturní podobnost s nativní ECM (Khorshidi et al. 2016; Nemati et al. 2019).

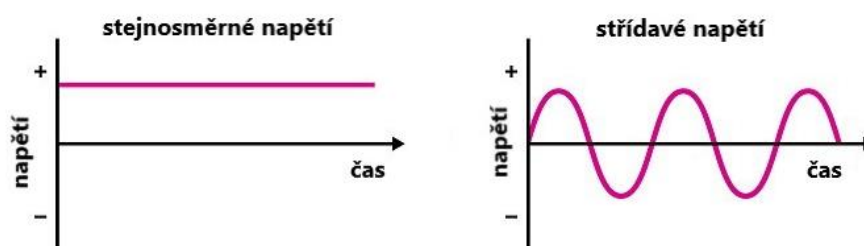
Výroba polymerních nanovláken umožňuje mnoho způsobů. Důležité je, aby bylo *překonáno povrchové napětí* kapaliny, což vede k transformaci hladiny do podoby vláken. V průběhu přetváření dochází k intenzivnímu vypařování rozpouštědla u polymerních roztoků, v případě tavenin k tuhnutí vlivem jejich ochlazení. Typ síly, která překoná povrchové napětí se liší v závislosti na použité technologii. Nejčastěji je využívána síla elektrická, mechanická nebo hydrodynamická (Jenčová et al. 2021a).

V rámci experimentální části byla využita technologie střídavého elektrického zvláknování. Dále jsou proto blíže popsány technologie stejnosměrného a střídavého

zvlákňování, které umožňují tvorbu nanovláken překonáním povrchového napětí kapaliny pomocí elektrické síly.

2.2.3.1. Stejnosemné elektrické zvlákňování

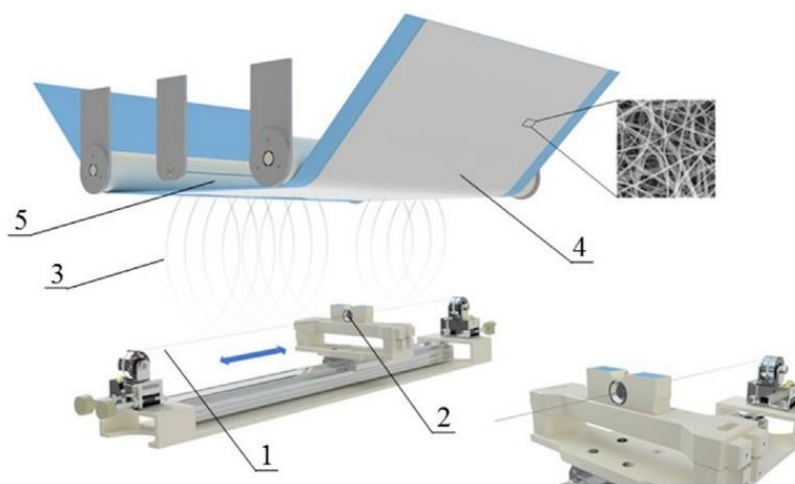
Napříč různými metodami výroby vlákenných scaffoldů je technologie stejnosměrného elektrického zvlákňování dle Nematih a kolektivu (2019) jednou z nejvyužívanějších. Dochází ke zvlákňování, tzn. k fyzikálnímu procesu výroby vláken, mezi zvlákňovací elektrodou a kolektorem. Potřebného rozdílu elektrického potenciálu mezi elektrodou a kolektorem se dosahuje připojením na póly zdroje vysokého napětí, nebo další možností je připojení na jeden pól zdroje a na uzemnění takovým způsobem, aby bylo dosaženo rozdílu elektrického potenciálu mezi zvlákňovací elektrodou a elektricky aktivním kolektorem. Jak je dáno názvem technologie, je využíváno *stejnosemného* zdroje vysokého napětí, kdy v průběhu se nemění jeho polarita, jak je zobrazeno na *obrázku 13* (Xue et al. 2019; Jenčová et al. 2021a).



Obrázek 13: Časový průběh stejnosměrného a střídavého napětí. Převzato z: (Roudný 2023)

Na základě typu elektrody je rozlišován *jehlový* a *bezjehlový* způsob zvlákňování. Na hrotu jehly nebo na volné hladině se při dosažení kritického napětí, kdy dojde k překonání povrchového napětí, tvoří polymerní tryska. Následně se polymerní tryska ve formě Taylorova kužele pohybuje směrem k *elektricky aktivnímu kolektoru*, což umožňuje odpaření rozpouštědla a vytvoření nanovláken. Maximální hodnoty tloušťky vlákenných vrstev se pohybují okolo 20–600 μm (Jirkovec et al. 2021b). Mezi proměnné, které ovlivňují tvorbu a strukturu vláken patří materiálové a procesní podmínky. *Procesní* charakteristiky zahrnují uspořádání spinnerety (soustavy elektroda-kolektor), vzdálenost od kolektoru, použité napětí, teplotu a vlhkost vzduchu. *Materiálové* podmínky se týkají typu polymeru, jeho molekulové hmotnosti a její distribuce, rozpouštědla, koncentrace pro roztoky, teploty pro taveniny, aditiv, elektrické vodivosti či viskozity (Jenčová et al. 2021a). Koncentrace polymeru, má vliv na zvlákňovitost, závisí na zapletenosti polymerních řetězců v roztoku, ovlivňuje také viskozitu a povrchové napětí roztoku. Zředěný roztok vytváří mechanicky slabá vlákna nebo kapičky (využíváno v modifikaci

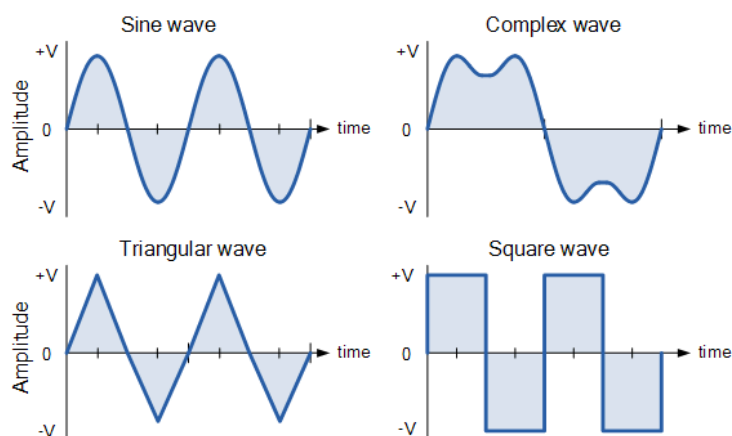
této technologie nazývané *electroblowing*). Naopak roztok koncentrovaný nad kritickou hodnotu brání tvorbě vláken. Při jehlovém zvlákňování lze měnit průměry jehel nebo jejich konfiguraci, kdy například koaxiální jehly umožňují modifikaci do podoby tzv. *koaxiálního* elektrostatického zvlákňování, kde se využívá jehel, které mohou současně zvlákňovat dva různé roztoky (Nemati et al. 2019). U bezjehlového zvlákňování může jako elektroda sloužit například tyčka, váleček, či struna. Jedná se o zvlákňování z volné hladiny. V průmyslu je hojně využíváno zařízení *Nanospider* (obrázek 14), které vychází z poznatku, že tzv. Taylorovy kužely se tvoří i na tenké vrstvě polymerního roztoku, v tomto případě na struně. Z tohoto důvodu se jedná o velmi produktivní způsob výroby nanovláken v porovnání s jehlovým způsobem (Jenčová et al. 2021a).



Obrázek 14: Schéma elektrostatického bezjehlového zvlákňování, zařízení *Nanospider*. 1 – kladně nabitá elektroda ve formě struny, 2 – průvlak se zásobníkem polymerního roztoku (cartridge), 3 – tvorba vláken a odpařování rozpouštědla, 4 – nanovláknenná vrstva na podkladové netkané textilii, 5 – záporně nabitá elektroda. Převzato z: (Klíčova et al. 2022)

2.2.3.2. Střídavé elektrické zvlákňování

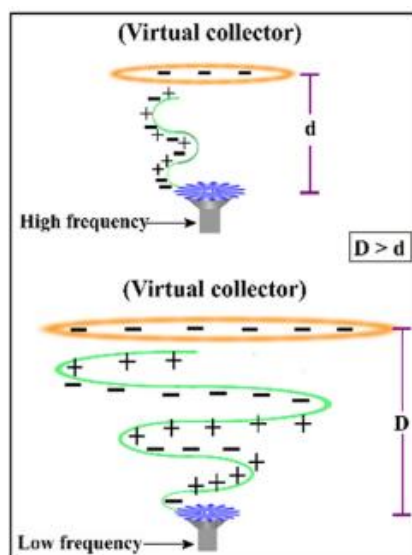
Jedná se o technologii, která byla v posledních letech zkoumána a rozvíjena, ale v současné chvíli nemá významné průmyslové využití. Pro překonání povrchového napětí polymerní kapaliny je využíváno *střídavého* elektrického napětí, jehož polarita je proměnlivá v průběhu času. Charakter průběhu může být různý, jak je zobrazeno na obrázku 15 (Xue et al. 2019; Jenčová et al. 2021a).



Obrázek 15: Časový průběh střídavého napětí. Převzato z: (AspenCore 2024)

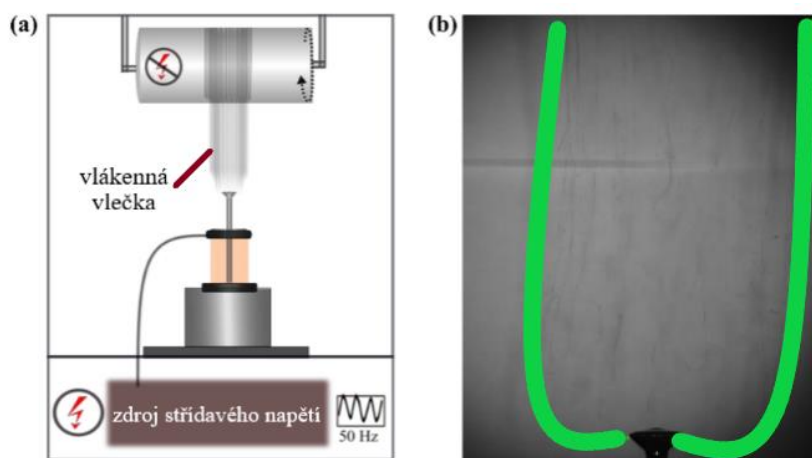
Při prvotních pokusech bylo využíváno uspořádání sestávající ze zvlákňovací elektrody a elektricky aktivního kolektoru, jako je tomu u stejnosměrného elektrického zvlákňování. Bylo však zjištěno, že tato technologie *nevyžaduje* elektricky aktivní kolektor, což umožňuje tvorbu *objemnějších vrstev* v porovnání se stejnosměrným zvlákňováním (Jirkovec et al. 2021b). Je to dáno tím, že nanovlákná sestávají z opačně nabitých segmentů vzniklých v předchozí půlplně, a tak emitovaná vlákna představují protielektrodu pro nově vznikající a následně tvoří kompaktní strukturu oblaku v zóně virtuálního kolektoru (Jenčová et al. 2021a; Sivan et al. 2022). Délka segmentů závisí především na frekvenci. Sivan a kolektiv (2021) došli k výsledku, že při nižších frekvencích bude nabitý segment každé polarity delší a oblak se vytvoří ve větší vzdálenosti od polymerní trysky ve srovnání s vyššími frekvencemi, viz *obrázek 16*. Dále je možné řídit amplitudu nebo posouvat offset, který umožňuje měnit polohu vln signálu v rámci záporné a kladné části, jelikož v základním stavu je střídavý proud vycentrován kolem nuly, jak je zobrazeno na *obrázku 15* (Jirkovec 2021).

Podmínky, které mají zásadní vliv na průběh zvlákňování lze i v tomto případě rozdělit na materiálové a procesní. Vliv má kromě zmiňovaného průběhu signálu vlhkost vzduchu, teplota vzduchu, rozpouštědlový systém, viskozita nebo koncentrace polymeru (Jenčová et al. 2021a). Tato technologie *nevyžaduje* přítomnost elektricky aktivního kolektoru, a tak mohou být vlákna zachycována prostřednictvím rotujícího válce, příze či dalších konstruktů (Mikeš a Lukáš 2015; Jenčová et al. 2021a).



Obrázek 16: Schématické zobrazení délek segmentů při nižších a vyšších frekvencích.
Převzato z: (Sivan et al. 2021)

Po zapnutí střídavého napětí vzniká na povrchu kapky zvlákňovaného roztoku řada polymerních trysek, dochází k odpařování rozpouštědla, a tím ke vzniku nanovláken, které jsou unášeny prostřednictvím elektrického větru nad elektrodou ve formě *vlákenné vlečky*, viz obrázek 17 (Mikeš a Lukáš 2015).

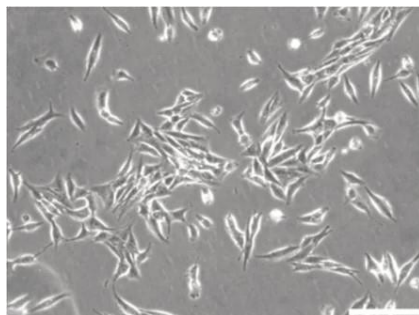


Obrázek 17: (a) schéma technologie střídavého zvlákňování, (b) vlákenná vlečka v detailu.
Převzato z: (Sivan et al. 2022), upraveno

2.2.4. *In vitro* testování

In vitro techniky testování představují alternativní cestu při prvotních testech, k testování na zvířatech (Russel a Burch 1959). V rámci tohoto směru jsou využívána zařízení, která umožňují práci s buněčnými kulturami, látky pro hodnocení toxicity a samotné buněčné kultury, respektive buněčné linie.

V rámci testování materiálů v experimentální části byla použita buněčná linie lidských osteoblastů MG-63, která představuje nádorovou linii pocházející z osteosarkomu lidské kostní tkáně, jejíž růst je adherentní a tvoří monovrstvu (monolayer). Morfologie je fibroblastoidní. Doba dělení představuje 28–38 hodin (Heremans et al. 1978; Šebek 2019).



Obrázek 18: Snímek z optického mikroskopu buněčné linie MG-63 zobrazovací metodou fázového kontrastu; měřítko 100 μm . Převzato z: (Anon. 2021)

Testování probíhá podle norem, aby výsledky mohly být dále porovnatelné s ostatními. Hodnocení toxicity zdravotnických prostředků *in vitro* podléhá požadavkům normy ČSN EN ISO 10993-5 části 5. Pojem *cytotoxicita* představuje schopnost určité látky být pro buňky škodlivá s ohledem na jejich životaschopnost. S ohledem na testované materiály se volí vhodné metody testování, a to přímý, nepřímý styk nebo eluční test zahrnující přípravu extraktů testovaných materiálu při inkubaci v kulturačním médiu (Rach et al. 2013).

Stanovování viability (životaschopnosti) buněk je založeno na sledování změn v rámci metabolické aktivity, přijímání barviv, uvolňování enzymů nebo produkci adenosintrifosfátu (ATP). Podle analyzovaných signálů lze tyto testy rozdělit na *kolorimetrické* (např. testy MTT, CCK-8), *luminiscenční* (ATP test), metody tzv. počítání buněk využívající vylučování barviva (např. trypanové modři), či *fluorimetrické* testy (Larramendy a Soloneski 2018).

Kolorimetrické metody obecně spočívají v *redukci tetrazoliových solí* živými, metabolicky aktivními, buňkami na nerozpustný formazan, kdy měřením absorbance se zjišťuje míra viability buněk. Je tedy sledována schopnost pohlcení elektromagnetického záření daným vzorkem (absorbance). Na základě Lambert-Beerova zákona, který je v rámci spektrofotometrických metod využíván platí, že absorbance je přímo úměrná molární koncentraci látky (Hardesty a Attili 2010). Druhů činidel, potažmo tetrazoliových solí, je několik. Vzájemně se odlišují nábojem, způsobem redukce,

absorpčními pásy či rozpustností, což má vliv na citlivost a průběh samotného testování (Scarcello et al. 2020).

V rámci experimentální části byl využit metabolický test CCK-8, který lze využít pro test cytotoxicity i buněčné adheze a proliferace. Je využíváno ve vodě rozpustné tetrazoliové soli WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium] (Cai et al. 2019). Buňkami je monotetrazoliová sůl redukována v přítomnosti elektronového přenašeče za vzniku ve vodě rozpustného formazanu oranžové barvy. Konkrétně je redukce prováděna dehydrogenázami (enzymy katalyzující oxidačně-redukční reakce). Množství formazanového barviva produkovaného buněčnými dehydrogenázami je úměrné počtu živých buněk. Z toho důvodu lze jejich životaschopnost odhadnout sledováním absorbance při vlnové délce 450 nm, jelikož oranžový formazan vzniká pouze ve chvíli, kdy k redukci WST-8 dojde v rámci metabolického cyklu buňky. V případě, kdy je ve sledovaném vzorku buněk méně, je nižší i koncentrace formazanu, tudíž i naměřená absorbance (Cai et al. 2019; Boster Biological Technology 2023). Výhodou tohoto testu oproti ostatním je uživatelská jednoduchost, cenová dostupnost oproti ATP testům a vyšší detekční citlivost, než jiné testy na bázi tetrazoliových solí jako je např. MTT. Navíc WST-8 má velmi nízkou cytotoxicitu, tudíž stejné buňky mohou být dále využity i v jiných testech. (Larramendy a Soloneski 2018; Cai et al. 2019).

Pokud je vyloučena cytotoxicita materiálu přistupuje se ke zkoumání buněčné adheze, která v závislosti na aplikaci může a nemusí být žádoucí. Hodnocení je prováděno prostřednictvím hodnocení metabolické aktivity a obrazové analýzy (Kirkpatrick et al. 1998).

2.3. Kostní tkáň

Skupina buněk, které mají podobnou strukturu, morfologii a plní specifickou funkci jsou nazývány tkáně. V rámci lidského těla je rozlišována tkáň epitelová, pojivová, svalová a nervová (Biga et al. 2019). *Pojivová* tkáň obsahuje značný podíl mezibuněčné hmoty oproti samotným buňkám. Vytvářená mezibuněčná hmota se skládá z *amorfní* hmoty, která je složena z polysacharidů a bílkovin. Další strukturální složkou ECM jsou *fibrilární* proteiny, jedná se především o kolagenní a elastinová vlákna. Další složka je představována *adhezivními bílkovinami* (fibronektin). Na základě povahy extracelulární matrice je pojivová tkáň vláknitá, podpurná nebo trofická. Vlákennitá je charakterizována

pružnou extracelulární matricí, která je tvořena proteinovými vlákny, proto je povaha ECM spíše měkká. Do této skupiny jsou řazeny šlachy a vazy. *Podpurná* je vyznačována mineralizovanou mezibuněčnou hmotou, kam patří kostní tkáň a chrupavka. *Trofická* zahrnuje tělní tekutiny například krev nebo lymfu (Miller 2020).

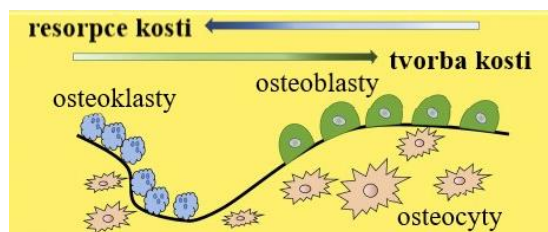
2.3.1. Mezibuněčná hmota kostní tkáně

Kost je tvořena kostními buňkami a mineralizovanou mezibuněčnou hmotou, která svým objemem nad nimi převažuje. Mezibuněčná hmota je složena z vlákenné, amorfní fáze a adhezivních bílkovin. Vlákenná složka ECM je tvořena *kolagenními* proteiny, především kolagenem typu I. Kolagen je přítomen ve formě vláken, které jsou tvořeny fibrilami, kde je strukturován ve formě trojšroubovice. Jeho hlavní funkcí je mechanická opora, dodání pevnosti. Fibrily jsou tvořeny rovněž *elastinem* a *fibrilinem* (Webster a Ahn 2007). Amorfní složka je tvořena *glykosaminoglykany* zahrnující kyselinu hyaluronovou, heparan sulfát. Díky hydrofilní povaze jsou schopné vytvářet struktury podobné hydrogelům, odolávat vnějšímu tlaku a zajišťovat hydrataci (Jenčová et al. 2021b). Adhezivní bílkoviny jsou zodpovědné za možnost spojení mezi vláknennou složkou ECM a buňkami. Jedná se o *glykoproteiny*, které umožňují vazbu integrinům. Pro regulaci mineralizace jsou významné: *sialoprotein* zahajující mineralizaci ECM, *osteonektin* a *osteopontin*. K samotné mineralizaci ECM dochází mezi kolagenovými fibrilami v tropokolagenové struktuře. Hlavní anorganickou složkou ECM představuje hydroxyapatit (Jenčová et al. 2021b). Hydroxyapatitové krystaly jsou uloženy v kolagenních fibrilách. Před mineralizací kolagenu dochází k ukládání fosforečnanu vápenatého a následně dochází k přechodu do krystalické fáze. Vzhledem k tomu, že samotný kolagen není schopen krystalizaci hydroxyapatitu indukovat, nukleaci hydroxyapatitu a jeho ukládání v mezerách mají na starost zmíněné nekolagenní proteiny (Lukášová 2020). Mezi další anorganické látky ECM se řadí draselné, vápenaté, sodíkové, citrátové a uhličitanové *ionty* (Junqueira et al. 2002). Na základě složení ECM je kost považována za kompozitní materiál tvořený z minerálů (50–70 hm.%), organických látek (20–40 hm.%), vody (5–10 hm.%) a tuků (<3 hm.%) (Clarke 2008).

2.3.2. Kostní buňky

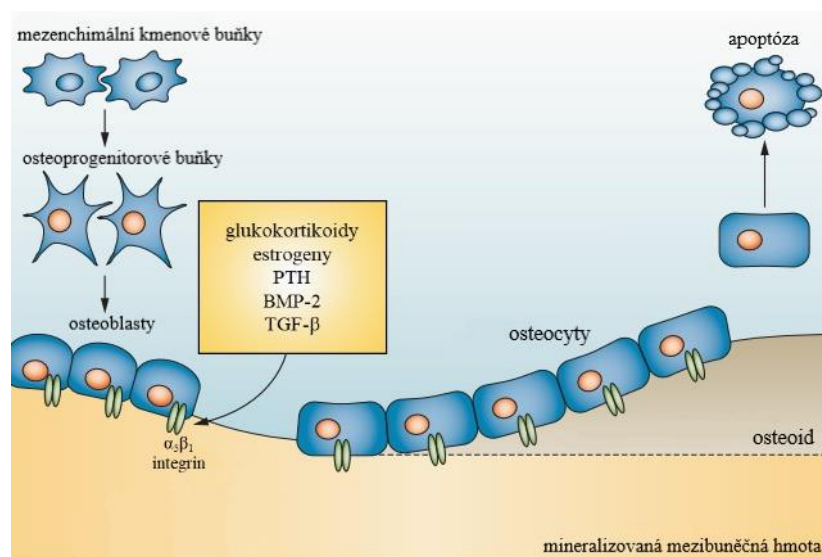
V rámci kostní tkáně a její tvorby se lze setkat s osteoblasty, osteocyty, osteoklasty a osteoprogenitorovými buňkami. *Osteoprogenitorové buňky* jsou kmenové buňky, které se nacházejí v kostní dřeni a jsou prekurzory osteocytů a osteoblastů (Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2024). *Osteoblasty*

produkují nemineralizovanou mezibuněčnou hmotu označovanou osteoid, do které se následně zanořují a stávají se osteocyty, které dále ECM neprodukují (Lukášová 2020; Jenčová et al. 2021b). Osteoblasty mají kubický tvar a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 20–50 μm (Qiu et al. 2019). Probíhající přeměnou těchto buněk se v kosti nacházejí současně osteoblasty (4–6 % kostních buněk) i osteocyty (90–95 % kostních buněk) (Florencio-Silva et al. 2015), viz *obrázek 19*. Osteoklasty představují pohyblivé buňky s výběžky, které se podílejí na vstřebávání (resorpci) kosti, ke kterému dochází při její přestavbě (remodelaci). Prostřednictvím enzymů rozkládají organickou složku a pohlcují odumřelé osteocyty (Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2024).



Obrázek 19: Kostní buňky. Převzato z: (Mulchandani et al. 2019)

Signální molekuly umožňují regulovat kostní metabolismus. Jedná se o růstové faktory (kostní morfogenetický protein (BMP), transformující růstový faktor TGF- β). Dále o hormony (parathormon (PTH) zajišťující rovnováhu vápníku v těle), estrogény nebo glukokortikoidy, jakožto hormony regulující funkci osteoklatů. Na *obrázku 20* jsou zobrazené osteoblasty syntetizující osteoid, dále diferenciace na osteocyty a mineralizace ECM prostřednictvím anorganických krystalů (Marie 2013).



Obrázek 20: Schématické zobrazení kostních buněk. Převzato z: (Marie 2013)

2.3.3. Struktura kostní tkáně

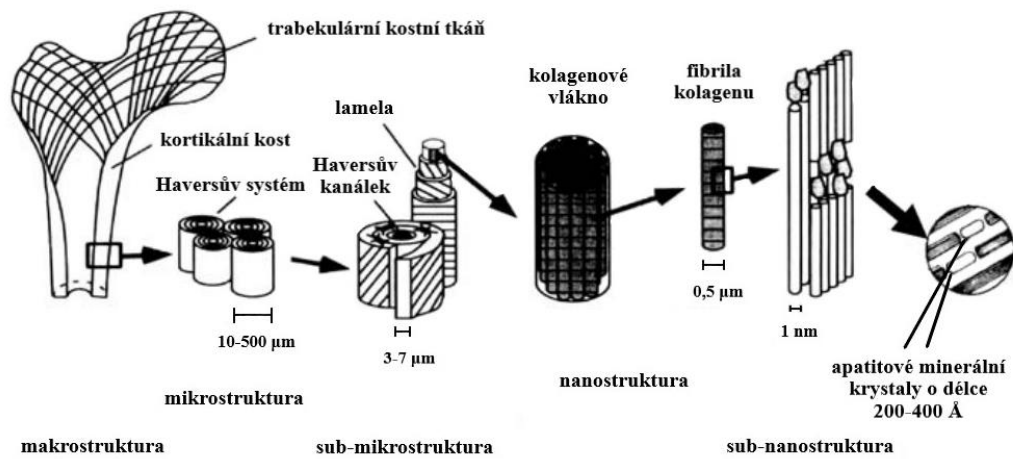
Kosti lze rozdělit na dlouhé, krátké, ploché, nepravidelné. Z hlediska hierarchické struktury lze postupovat z vnějšího makrosvětla až po nanostrukturu. Povrch kosti představuje vazivová okostice (periost), prokrvená blána s nervovými zakončeními, jejíž podráždění vyvolává bolest při poškození kosti (Novotný a Hruška 2015).

Povrchová část kosti je představována *kortikální* (kompaktní) kostí složené z hustě uložených Haversových kanálků. *Trabekulární* (spongiozní) kost se nachází v hlavicích dlouhých kostí a tvoří vnitřek kostí plochých a krátkých. Má trámčovou strukturu připomínající prostorovou síť, uspořádání těchto trámců odpovídá směru tlakových sil působících při zatížení kosti, a tak má menší hustotu než kost kompaktní (SEER Training Modules 2024). *Kostní dřev* se nachází ve středu většiny kostí, představuje pomyslnou síť vazivových vláken, buněk a rozvětvených cév. V mládí se jedná o červenou kostní dřev, ve které vznikají červené, bílé krvinky a krevní destičky. V průběhu let je nahrazována tukovou tkání a mění se na žlutou kostní dřev. V dospělosti se krvinky tvoří jen v červené kostní dřev krátkých a plochých kostí (tzn. žeberní obratle, pánevní, lebeční kosti) (Buck a Dumanian 2012a; Novotný a Hruška 2015).

Na mikroskopické úrovni je hustá kortikální kost a trabekulární kostní tkáň tvořena mineralizovanými kolagenními vlákny, která jsou paralelně poskládána do vrstev. Uspořádané destičky kostní tkáně se nazývají *lamely*, ve kterých se nacházejí *Haversovy kanálky*, kterými procházejí nervy a cévy. Haversovy kanálky probíhají souběžně s delší osou kosti. Lamely kolem kanálků jsou tvořeny v několika vrstvách ovinuté kolagenními vlákny zpevněné anorganickými částicemi. Struktura připomíná letokruhy kmene stromů (Novotný a Hruška 2015). V mezerách nazývaných *lakuny* se nacházejí osteocyty. Kolem Haversových kanálků jsou uspořádány soustředěně a jsou mezi sebou spojeny kanálky, které obsahují krevní cévy, jimiž je rovněž zajišťována výživa kosti a jsou odváděny zplodiny metabolismu. Struktura kolem Haversova kanálku představuje stavební jednotku kosti: *Haversův systém* (Buck a Dumanian 2012a; Novotný a Hruška 2015). V rámci kortikální kosti jsou Haversovy systémy uspořádány těsně u sebe a tvoří pevnou hmotu (SEER Training Modules 2024).

Každá z kolagenních fibril se skládá ze svazků makrofibril, které obsahují svazky kolagenních molekul. Molekuly kolagenu jsou uspořádány s určitou periodicitou. V místě, kde se stýkají dva konce, je malá mezera o velikosti 40 nm, nebo místo, kde se

nachází většina destiček apatitu. Vzhledem k tomu, že mikrostruktura kosti zahrnuje koordinaci vysoce rozptýlených nanokrystalů *hydroxyapatitu* v kolagenu, chová se jako houževnatý materiál při nízkých rychlostech deformace, a jako křehký materiál při vysokých rychlostech deformace. Kromě toho mikrostruktura funguje jako určité lešení pro regulaci buněk. Povrchové vlastnosti, se kterými buňky přicházejí do styku jsou většinou v rámci nanometrů, což znamená, že toto měřítko je rozhodující pro regulaci jejich chování (Webster a Ahn 2007). Schématicky je struktura kosti zobrazena na *obrázku 21*.



Obrázek 21: Hierarchická struktura kosti. Převzato: (Webster a Ahn 2007)

2.3.4. Osifikace

Růst kosti do délky v rámci vývoje nebo při hojení zlomenin je označován jako osifikace nebo osteogeneze. Na základě vývoje lze rozdělit formaci kosti na endochondrální a intramembranózní (Setiawati a Rahardjo 2019). *Intramembranózní* osifikace se týká vývoje plochých kostí lebky, většiny kostí obličeje, dolní čelisti nebo například klíční kosti. Začíná na konci embryonálního období, kolem 8. týdne těhotenství. Nejprve dochází ke kondenzaci mezenchymových buněk uvnitř mezenchymové tkáně, následuje růst a diferenciaci na osteoblasty. Osteoblasty následně tvoří osteoid, posléze se diferencují na osteocyty a dochází postupně ke kalcifikaci (Nováková a Šajdíková 2024).

V rámci *endochondrální* osifikace nejprve dochází k proliferaci mezenchymových buněk (MSC) v místě budoucí kosti, vlivem růstových faktorů se MSC dále diferencují na chondroblasty, které začnou formovat chrupavčitou tkáň a tvorbu hyalinní chrupavky. Následuje hypertrofie chondrocytů a resorpce chrupavčité tkáně, chrupavčitá tkáň kalcifikuje. Z důvodu nedostatečného zásobení živinami kalcifikovaná chrupavka

dochází k zániku chondrocytů v chrupavčitém modelu a do vznikajících prostorů migrují osteoprogenitorové buňky, které se diferencují na osteoblasty, které tvoří ECM a chrupavka je tak *nahrazena* kostní tkání (Setiawati a Rahardjo 2019; Nováková a Šajdíková 2024). Do šířky roste kost z hlubokých vrstev periostu přirůstáním nových vrstev kostních lamel (Novotný a Hruška 2015).

2.4.Léčba kostních defektů

V návaznosti na vnější zatížení, hormonální odezvy na změny hladin vápníku a fosforu prostřednictvím kostních buněk jejichž aktivita je regulována růstovými faktory a hormony dochází k remodelaci kostní tkáně (Kaucká 2006; Qiu et al. 2019). Znamená to, že kost v rámci regenerace zlomenin je schopná úplné regenerace v rámci určitých hranic. Zpravidla jsou rozlišovány dva mechanismy hojení v návaznosti na rozsahu fraktury. *Primární hojení* nastává v situaci, kdy části zlomené kosti jsou v těsné blízkosti. Prostřednictvím osteoklastů dochází ke tvorbě prostoru pro růst cév a nervů. Nedochozí ke tvorbě hematomu (Buck a Dumanian 2012b; Kohoutová 2015). U složitějších zlomenin je nutný *sekundární mechanismus*, který může trvat i několik let. Nejprve na postiženém místě vzniká hematoma, postupně dochází k produkci amorfní mezibuněčné hmoty a propojování příslušných fragmentů. Následuje tvorba vazivových vláken a vznik vazivového svalku (2–4 týdny) (Ghiasi et al. 2019), ve kterém dochází ke vzniku chrupavčitého. Ten se následně osifikuje a kalcifikuje ukládáním vápenatých solí, čímž dochází k přeměně na kostní sval (po 2–4 měsících) (Ghiasi et al. 2019). Navazuje přestavování na pevnou kost (několik měsíců až let) (Kohoutová 2015; Qiu et al. 2019; Ghiasi et al. 2019).

Po překročení kritické velikosti kostních defektů pravděpodobnost, že se zahojí samy klesá (Holzapfel et al. 2013; Schemitsch 2017). V případě, že jsou kostní defekty příliš velké nebo se nacházejí v menších kostech, je zpravidla zapotřebí chirurgický zákrok. Velká část klinických postupů léčby zahrnuje aplikaci autologních, alogenních *štěpů* nebo použití *syntetických materiálů* (Qiu et al. 2019).

Klinickou léčbu kostních defektů lze rozdělit na invazivní a neinvazivní způsoby. *Neinvazivní metody* představují využití biofyzikální stimulace, například pulzní magnetoterapie (PEMF), kdy dochází ke generování elektromagnetických pulzů a stimulaci opětovného růstu kostní tkáně. Invazivní přístupy zahrnují kromě využití

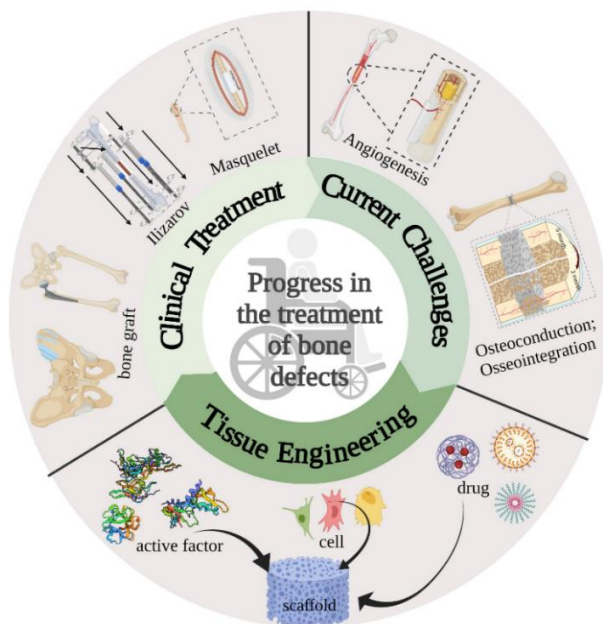
kostních štěpů a implantátů také Ilizarovu metodu či metodu Alina Masqueleta (Xue et al. 2022; Flatscher et al. 2023).

V rámci klinické praxe *kostní štěpy* představují hojně užívanou formu léčby defektů. Štěpy jsou rozdělovány dle původu na autologní, alogenní a xenogenní. *Autologní* štěpy jsou odebírány od pacienta, jsou osteoinduktivní, osteokonduktivní a vykazují osteogenezi. Nevýhodu představují rizika infekce, přecitlivělost místa odběru, nevhodnost pro děti a starší pacienty a morbiditu dárcovského místa (Xue et al. 2022). Odběr autologních štěpů je spjat s limity k jeho velikosti z důvodu snížení rizika morbiditý dárce. V případě, kdy je potřeba větší množství, než které je v rámci autologního štěpu možné odebrat, je využíváno *alogenních* štěpů, které pochází od dárce nebo *xenogenních*, které pochází od jiného živočišného druhu. Pro implementaci těchto druhů štěpů jsou odstraňovány osteoinduktivní a osteogenní prvky prostřednictvím denaturace proteinů a osteoprogenitorových buněk ke snížení rizika přenosu patogenů (Holzapfel et al. 2017; Qiu et al. 2019).

Invazivní přístupy dále zahrnují Ilizarovu a Masqueletovu metodu. U kostních defektů rozsahů větších jak 5 cm je využíváno právě zmíněných technik. *Ilizarova technika* je založena na trakční stimulaci, která má podporovat regeneraci a růst kosti. Překážkou jsou však složité operace, rizika infekce a dlouhá léčba (Xue et al. 2022). Další možností je dvoufázová metoda popsaná Alinem *Masqueletem*, kdy nejprve dochází v oblasti defektu k vyplnění cementovou vložkou z polymethylmethakrylátu (PMMA) po dobu šesti týdnů. Jejím úkolem je indukovat tvorbu pseudoperiostia, jakožto vrstvy vazivové tkáně s cévami (membrány) bohaté na kolagen typu I a růstové faktory (BMP, TGF- β , aj.). Následně je tato membrána naříznuta a vyplněna kostním štěpem. Přítomné růstové faktory a vaskularizovaný pseudoperiost podporují remodelaci vloženého štěpu prostřednictvím buněčné proliferace a diferenciací osteoblastů. Tato technika je vhodná i v případech, kdy se v defektní oblasti nachází infekce, protože do PMMA mohou být inkorporována antibiotika. Naopak mezi nevýhody této metody patří požadavek na více chirurgických zákroků, rizika infekce nebo neúplné zahojení kosti (Debnar et al. 2021; Mayfield et al. 2022).

Další možnost představuje tkáňové inženýrství, které i v pouhém odvětví věnující se kostním defektům poskytuje možnost využití trvalých umělých náhrad nebo biodegradabilních scaffoldů, které umožňují podpořit regeneraci kostní tkáně (Ghassemi

et al. 2018). Následující podkapitola se věnuje kostnímu tkáňovému inženýrství s ohledem na vlastnosti scaffoldů a používané materiály pro jejich výrobu.



Obrázek 22: Schéma zobrazující možnosti léčby kostních defektů. Převzato z: (Xue et al. 2022)

2.4.1. Kostní tkáňové inženýrství

Jak již bylo zmíněno, tkáňové inženýrství stojí na třech základních kamenech zahrnujících buňky, signály a scaffoldy. Tato kapitola se věnuje především vlastnostem a materiálům scaffoldů, které jsou v rámci kostního tkáňového inženýrství používány v rámci klinické praxe, a těm, které jsou předmětem výzkumu.

Směrem k vlastnostem scaffoldů pro kostní tkáňové inženýrství je nutné respektovat obecné požadavky, jakými jsou biokompatibilita, porozita, mechanické vlastnosti či (ne)degradabilita materiálu.

Konkrétně v rámci kostní tkáně s ohledem na velikost osteoblastů by velikost pórů měla být větší jak 20 μm , což je přibližná velikost osteoblastů. Je uváděno, že požadovaná velikost pórů pro osteokondukci je v rozmezí 80–100 μm (Qiu et al. 2019).

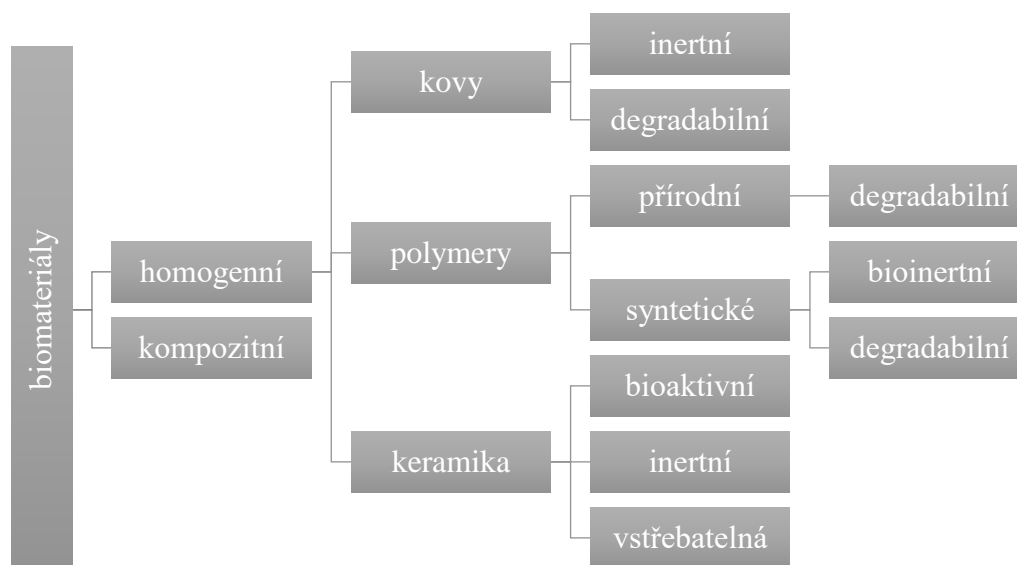
Po implementaci materiálu pro regeneraci kostních defektů lze na základě biologických vlastností říci, zda je zkoumaný materiál vhodný pro další vývoj, nebo nikoliv (Štěpanovská 2020). Mezi zmiňované vlastnosti spadá *angiogeneze* (schopnost novotvorby krevních kapilár), *osteoindukce*, která je spojena se schopností podporovat diferenciaci kmenových buněk na osteoblasty stimulací příslušného mikroprostředí. V souvislosti se scaffoldy to znamená, že tyto materiály musí do příslušného prostředí

produkovat substance diferenciaci podporující. A to zejména v podobě uvolňovaných iontů z materiálu, případně uvolňováním léčiv nebo růstových faktorů, které mohou být jejich součástí (Albrektsson a Johansson 2001; Xue et al. 2022). Další důležitou proměnou představuje *osteokondukce*, která odkazuje na umožnění růstu buněk na příslušném povrchu. Je tak zahrnuta schopnost adheze osteoblastů a progenitorovaných buněk, jejich proliferace a migrace (Albrektsson a Johansson 2001). V neposlední řadě hraje roli také *oseointegrace*, která představuje poslední krok v rámci procesu hojení kosti a interakci tkáně se scaffoldem. Cílem je umožnit osteoblastům tvořit shluky na povrchu scaffoldu, které následně produkují extracelulární matrix (Albrektsson a Johansson 2001; Štěpanovská 2020). Pro tvorbu vhodného materiálu je klíčový *povrch* scaffoldu, který proto bývá v návaznosti na konkrétní požadavky upravován například tvorbou výstupků, leptáním (Xue et al. 2022), nanášením povlaků fosforečnanu vápenatého nebo růstovými faktory (Štěpanovská 2020).

Na základě interakcí mezi příslušnými materiály a tkání lze biomateriály rozřadit na (a) *toxické*, kdy po jejich implementaci okolní tkáň odumře, (b) *netoxické*, které jsou po čase nahrazeny novou tkání (*biodegradabilní, bioresorbovatelné materiály*), (c) *netoxické bioinertní*, kdy na rozhraní vznikne vláknitá membrána oddělující materiál od tkáně nebo (d) *netoxické materiály s biologickou aktivitou (bioaktivní materiály)*, které umožňují tvorbu vazby přímo mezi materiálem a tkání (Qiu et al. 2019; Vaiiani et al. 2023).

Jak již bylo v práci zmíněno, při použití biodegradabilního materiálu je nutné, aby rychlost rozpadu, a tak i ztráta mechanických vlastností byla úměrná rychlosti tvorby nových buněk (Jenčová et al. 2021b). Zhou a kolektiv (2023) uvádí že integrita scaffoldu pro regeneraci kosti by měla být zachována minimálně po dobu 6–8 týdnů.

Pro výrobu kostních scaffoldů je využíváno kovů, keramiky a polymerních materiálů. Případně dochází k jejich kombinaci do podoby kompozitů (Ghassemi et al. 2018; Vaiiani et al. 2023). V dalším textu jsou zmíněny jednotlivé skupiny materiálů a uvedené příklady zástupců. Pro větší přehlednost je členění zobrazeno schématem na *obrázku 23*.



Obrázek 23: Biomateriály pro kostní tkáňové inženýrství

2.4.1.1. Homogenní materiály

Z materiálové skupiny *kovů* je využíváno pro umělé trvalé náhrady především jejich slitin. Využívány jsou s ohledem k vysoké pevnosti, odolnosti proti korozi, tepelné a elektrické vodivosti. Přibližně 70 % implantátů je vyráběno z kovových materiálů (Mahmud et al. 2023). V současné době se v klinické praxi pro velké kostní defekty běžně používá titanová slitina. Titan je netoxický, neškodlivý a má dobrou odolnost vůči korozi, navíc jeho modul pružnosti je blízký lidské tvrdé tkáni. Povrch titanové slitiny je však relativně hladký, což má za následek špatnou oseointegraci, proto je využíváno modifikací povrchů kostních náhrad, které zlepšují potřebné vlastnosti (Alonzo et al. 2021; Xue et al. 2022), povrch implantátu může být navíc i kolonizován autologními buňkami (Štěpanovská 2020). Rovněž je využívána nerezová ocel, slitiny chromu a kobaltu (Mahmud et al. 2023). Také jsou zkoumány *biologicky odbouratelné kovy*, jedná se zejména o hořčík, železo, zinek a jejich slitiny. Problémem scaffoldů na bázi hořčíku je, že po implantaci scaffoldu je nutná stabilita (min. 6–8 týdnů), což nesplňují vzhledem k jejich rychlé degradaci. A tak jsou zkoumány povrchové úpravy, které rozklad zpomalují. I v rámci materiálů ze železa je řešena rychlost degradace, avšak v opačném smyslu, tedy je naopak příliš pomalá. I zde je však využíváno povrchových úprav, zejména ve výrobě porézní struktury a zvrásnění povrchu. Rovněž jsou zkoumány slitiny zinku (Wei et al. 2020).

Polymery lze dále dělit dle několika hledisek, dle původu rozlišujeme přírodní a syntetické. Dle rigidity inertní a degradabilní. Mezi biodegradabilní *přírodní polymery*

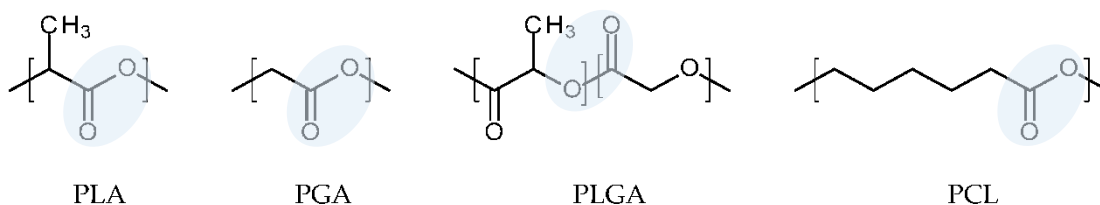
zkoumané v rámci tohoto odvětví patří například kolagen, jakožto hlavní složka fibrilární části mezibuněčné hmoty (Wei et al. 2020; Mahmud et al. 2023). Další představují fibrin, chitosan, přírodní hedvábí nebo kyselinu hyaluronovou (Ghassemi et al. 2018; Qiu et al. 2019; Wei et al. 2020). Hlavní výhodou přírodních polymerů je jejich biokompatibilita, osteokonduktivita. Na druhou stranu k jejich nevýhodám patří variabilita složení, která je závislá na zdroji, dále samotná degradace je velmi obtížně kontrolovatelná zejména s ohledem na enzymatický rozklad, který je v rámci každého jedince velmi individuální, tudíž obtížně řízený (Roseti et al. 2017).

Z *biodegradabilních syntetických polymerů* se jedná o polyhydroxybutyrát (PHB), polydioxanon (PDS) (Wei et al. 2020). Mezi nejzkoumanější patří polylaktid (PLA) (Chuan et al. 2020), polyglykolid (PGA) získávaný z obnovitelných zdrojů. Také kopolymer polylaktidu a polyglykolidu (PLGA) a polykaprolakton (PCL) získávaný z neobnovitelných zdrojů (Wei et al. 2020; Mahmud et al. 2023), který byl v rámci experimentální části použit, a tak je dále popsán detailněji.

Polykaprolakton (poly- ϵ -kaprolakton) představuje semikrystalický, hydrofobní polymer, termoplast. Teplota skelného přechodu se pohybuje okolo $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, což znamená, že se nachází běžně v kaučukovitém stavu (Guo a Ma 2014). Teplota tání se nalézá v rozmezí $59\text{--}64\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kirillova et al. 2021).

Výroba se uskutečňuje prostřednictvím polymerace za otevírání kruhu cyklického esteru, ϵ -kaprolaktonu (Kirillova et al. 2021). Konkrétně se jedná o alifatický polyester, degradující hydrolytickým mechanismem, kdy dochází ke štěpení esterové vazby.

Zásadní vliv na rychlost rozkladu má povaha chemických vazeb v rámci hlavního řetězce polymeru, hydrofilita, krystalinita, kompozice kopolymerů nebo přítomnost nízkomolekulárních sloučenin (Stewart et al. 2018). Mechanická integrita PGA je zachována po implantaci *in vivo* 2–4 týdny. U PLA díky sférickému bránění methylovou skupinou je hydrolytický rozklad zpomalen, a tak je integrita PLA 3–24 měsíců (Guo a Ma 2014). PCL je odbouráván ještě pomaleji, a to 2–4 roky (Woodruff a Hutmacher 2010; Hassan et al. 2014). Na *obrázku 24* jsou zobrazeny strukturní vzorce zmíněných polymerů, vyznačena je i esterová vazba. Degradace však nestojí jen na hydrolýze samotné, vliv mají také mikroorganismy či působení enzymů (Woodruff a Hutmacher 2010).



Obrázek 24: Strukturální vzorce PLA, PGA, PLGA a PCL. Převzato z: (Stewart et al. 2018)

Pro tvorbu polymerních roztoků jsou esenciální rozpouštědla. Pro PCL jsou využívána vysoce toxická organická rozpouštědla. Konkrétně se jedná například o chloroform, dimethylformamid (DMF), tetrahydrofuran (THF), dichlormethan, chloroform/methanol nebo DMF/THF (Sivan et al. 2022).

Rovněž při tvorbě polymerních vláken je polymerních roztoků využíváno. I navzdory tomu, že ze samotného principu tvorby nanovláken dochází k odpaření rozpouštědla, mohou se ve výsledných vlákenných vrstvách rezidua rozpouštědel nacházet. V případě, kdy se využívá biodegradabilního materiálu, mohou se případná rezidua při degradaci samotného materiálu rovněž uvolňovat, což může být pro buňky při aplikaci v rámci tkáňového inženýrství toxické. S ohledem na to se studie Sivana a kolektivu (2022) zabývala zvlákněním PCL prostřednictvím střídavého zvláknování pro aplikaci ve tkáňovém inženýrství za využití málo toxických rozpouštědel z klasifikační třídy 3 v rámci European Pharmacopoeia, kam spadá kyselina mravenčí, kyselina octová a aceton.

Výstupem bylo, že rozpouštědlový systém kyselina mravenčí/kyselina octová/aceton (1/1/1) představoval vhodný rozpouštědlový systém pro PCL v porovnání se systémy kyselina mravenčí/kyselina octová nebo samotná kyselina mravenčí. Všechny vyrobené vrstvy byly shledány jako biokompatibilní a netoxické.

V oblasti trvalých implantátů je využíváno rovněž *inertních syntetických polymerních* materiálů, které tvoří součásti kloubních náhrad. Jedná se zejména o ultravysocemolekulární polyethylen (UHMWPE), který má odolnost vůči opotřebení. Dále polytetrafluorethylen (PTFE), polyetheretherketony (PEEK), polymethylmethakrylát (PMMA), polystyren (PS) nebo polyethylentereftalát (PET), které jsou využívány kvůli mechanické odolnosti (Mahmud et al. 2023).

Pro náhrady tvrdých tkání je používána rovněž biokeramika. *Bioinertní biokeramika* nemá schopnost reagovat s biomolekulami a buňkami, tedy netvoří se mezi implantovaným materiálem a danou tkání chemická vazba, ale dochází k navázáním

prostřednictvím vazivového pouzdra. Jedná se o korundovou keramiku, dále o keramiku na bázi oxidu zirkoničitého (ZrO_2), oxidu titaničitého (TiO_2). Využívají se pro náhradu kostní tkáně nebo kloubů díky odolnosti vůči opotřebení, pevnosti a biokompatibilitě. Může být také využita v kombinaci s biodegradabilními polymery k regeneraci tkání nebo pro systémy dodávání léčiv (Ovčáčiková a Vlček 2013; Vaiani et al. 2023; Mahmud et al. 2023).

Další třídu tvoří *bioaktivní keramika*, která je po umístění do těla schopná vytvořit s danou tkání vazbu napřímo mezi kostní tkání a materiálem, nikoliv zprostředkovaně. Je využívána pro povlakování kovových implantátů nebo náhrady kloubů. Jedná se o biosklo, hydroxyapatit nebo sklokeramiku (Ovčáčiková a Vlček 2013). Biokeramika čítá také tzv. *bioresorbovatelnou keramiku*, kam se řadí porézní hydroxyapatit (HA) a fosforečnan trivápenatý (TCP), případně bioaktivní sklo. V ortopedické oblasti nachází využití i karbid křemíku (Ovčáčiková a Vlček 2013; Vaiani et al. 2023). V rámci experimentální části byl využit hydroxyapatit, a tak je dále více přiblížen.

Chemický vzorec **hydroxyapatitu** (HA) v rámci jedné buňky krystalové mřížky hexagonální symetrie je $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Patří do skupiny minerálních apatitů (mezi které patří fluorapatit, chlorapatit, hydroxyapatit, fluorkaronátapatit), tedy minerálů stejné struktury, ale odlišného složení (Legeros a Legeros 2008). Jedná se o bioaktivní i bioresorbovatelný materiál s ohledem na jeho porozitu a krystalickou strukturu. Jeho biologickou rozložitelnost nebo bioaktivitu lze navíc zvýšit přidávkem uhličitánů a dvojmocných iontů (hořečnatých, strontnatých) do prášku před zpracováním (Vaiani et al. 2023; Zhou et al. 2023). Vzhledem k podobné struktuře s anorganickou fází mineralizované ECM kostní tkáně, nachází uplatnění při regeneraci kostí a zubů (Legeros a Legeros 2008), avšak jeho samostatná působnost je omezena, jelikož je křehký a obtížně tvarovatelný, tudíž je využíván v podobě kompozitů nebo dále zmíněných kostních cementů (Zhou et al. 2023). Mimo jiné je využíván pro povlakování kovových náhrad s cílem zvýšit osteokonduktivitu implantátů. Dle původu je rozlišován syntetický a biologický HA. Biologický je získáván z korálů, hovězích kostí, nejedná se o čistý hydroxyapatit, ale uhličitánový apatit. Syntetický HA je používán právě k regeneraci kostí, a to buď jako samostatný materiál, nebo ve formě kompozitů s polymery, případně jinými keramickými zástupci, nebo jako zmiňované povlaky kovů (Legeros a Legeros 2008).

Další možností je využití fosforečnanů vápenatých v rámci regenerace kostní tkáně v kostních cementech, které se používají jako výplň defektní struktury. Výhodou je, že materiál je aplikován do volného prostoru, následně dochází k jeho tvrdnutí, tudíž je umožněno uzpůsobení tvaru pro konkrétní defekt (Zhou et al. 2023). V *tabulce 2* jsou uvedeny komerční názvy vstřebatelných výplní kostních defektů.

Tabulka 2: Komerční výplňové materiály založené na fosforečnanech vápenatých. Vychází z: (Xue et al. 2022; Graftys 2022; Finceramica 2024; SigmaGraft Biomaterials 2024)

název	výrobce	složení
InterOss Collagen Block®	SigmaGraft Biomaterials, Inc., USA	hydroxyapatit/kolagen
Graftys® QuickSet	Graftys, Francie	směs fosforečnanů vápenatých (HA, TCP a další) a hydroxypropylmethylcelulózy pro zajištění viskozity
SINTlife®	Finceramica, Itálie	hořečnaté ionty v nanočásticích hydroxyapatitu

2.4.1.2. Kompozitní materiály

Kompozitní materiály jsou často voleny, jelikož umožňují překonat negativní vlastnosti jednotlivých materiálů. Mezi hlavní nevýhody keramiky patří křehkost, což má souvislost s omezenou houževnatostí (Suamte et al. 2023). Polymery mají omezenou pevnost, syntetické jsou často hydrofobní povahy, což není vhodné s ohledem k buněčné adhezi (Hassan et al. 2014). Kovy podléhají problémům s korozí a biokompatibilitou (Mahmud et al. 2023), a tak bývají povlakovány biokeramikou (Qiu et al. 2019).

Souvislost s aktuálním trendem ve vývoji kompozitních materiálů má i tendenci imitovat vlastnosti nativní kostní tkáně. Tyto materiály sestávají většinou z polymerní matrice (přírodní nebo syntetické biodegradabilní) a výztužné fáze, která zvyšuje nejen pevnost materiálů, ale i biokompatibilitu a rovněž podporuje regeneraci kostní tkáně (Mahmud et al. 2023). Zejména pak kolagen/HA, kde je snaha o biomimetiku ECM kostní tkáně (Qiu et al. 2019). Keramika zajišťuje pevnost v tlaku a nízkou rychlost degradace, polymery zvyšují houževnatost a pevnost v tahu (Vaiani et al. 2023).

Rovněž jsou zmiňovány kompozity na bázi titan/uhlíková vlákna, které zvyšují pevnost a zároveň odlehčují výsledný implantát. Dále jsou zkoumány kompozity s přídavnými senzory nebo systémy dodávání léčiv (Mahmud et al. 2023).

Vzhledem k tématu práce jsou dále zmíněny vlákenné scaffoldy funkcionalizované hydroxyapatitem.

2.4.1.3. *Vlákenné scaffoldy funkcionalizované hydroxyapatitem*

Ve snaze funkcionalizovat vlákenné materiály lze provádět inkorporaci bioaktivními látkami, případně léčivy pro systémy dodávání léčiv pomocí různých technik. Mezi možné způsoby spadá začlenění částic nebo léčiv do vlákenné struktury pomocí enkapsulace za využití elektrosprayingu, další možnost představuje zmiňované koaxiální zvlákňování, kde funkční komponenty mohou být zapouzdřeny v jádru a obal může být tvořen například vodorozpustným polymerem (Hassan et al. 2014; Nemati et al. 2019). V rámci funkcionalizace nanovlákných materiálů je využíváno i metod, které přichází ve chvíli, kdy jsou vlákenné vrstvy již vyrobeny. Jedná se o úpravy povrchu pomocí plazmy, roubování povrchu, využití vrstev polydopaminu pro adhezi (Kulkarni et al. 2022).

V rámci studie se Chuan a kolektiv (2020) zabývali funkcionalizací nanovlákných stereokomplexních membrán na bázi polylaktidu. Jelikož PLA je chirální sloučeninou, jsou rozeznávány enantiomery poly-L-laktid a poly-D-laktid. Mají totožné chemické složení, ale liší se konfigurací opakujících se jednotek, které jsou schopny tvořit mezimolekulární komplex (stereokomplex), který vzniká v krystalické struktuře. Stereokomplex PLA nastává v důsledku nekovalentních interakcí enantiomerních řetězců poly-L-laktidu a poly-D-laktidu. Právě tvorba stereokomplexních krystalitů v kompozitních nanovlákných vrstvách má zásadní vliv na zvýšení mechanických vlastností. Pro funkcionalizaci byl PDLA roubován hydroxyapatitem, následně byl elektrostaticky zvlákněn blend s PLLA. Po zahřátí na 80 °C po dobu 1 hodiny se vytvořil stereokomplex. Dle *in vitro* testů vzorek obsahující 40 hm.% HA vykazoval diferenciaci kmenových buněk na osteoblasty a je vhodný pro použití v kostním tkáňovém inženýrství, respektive pro další výzkum v rámci tohoto odvětví.

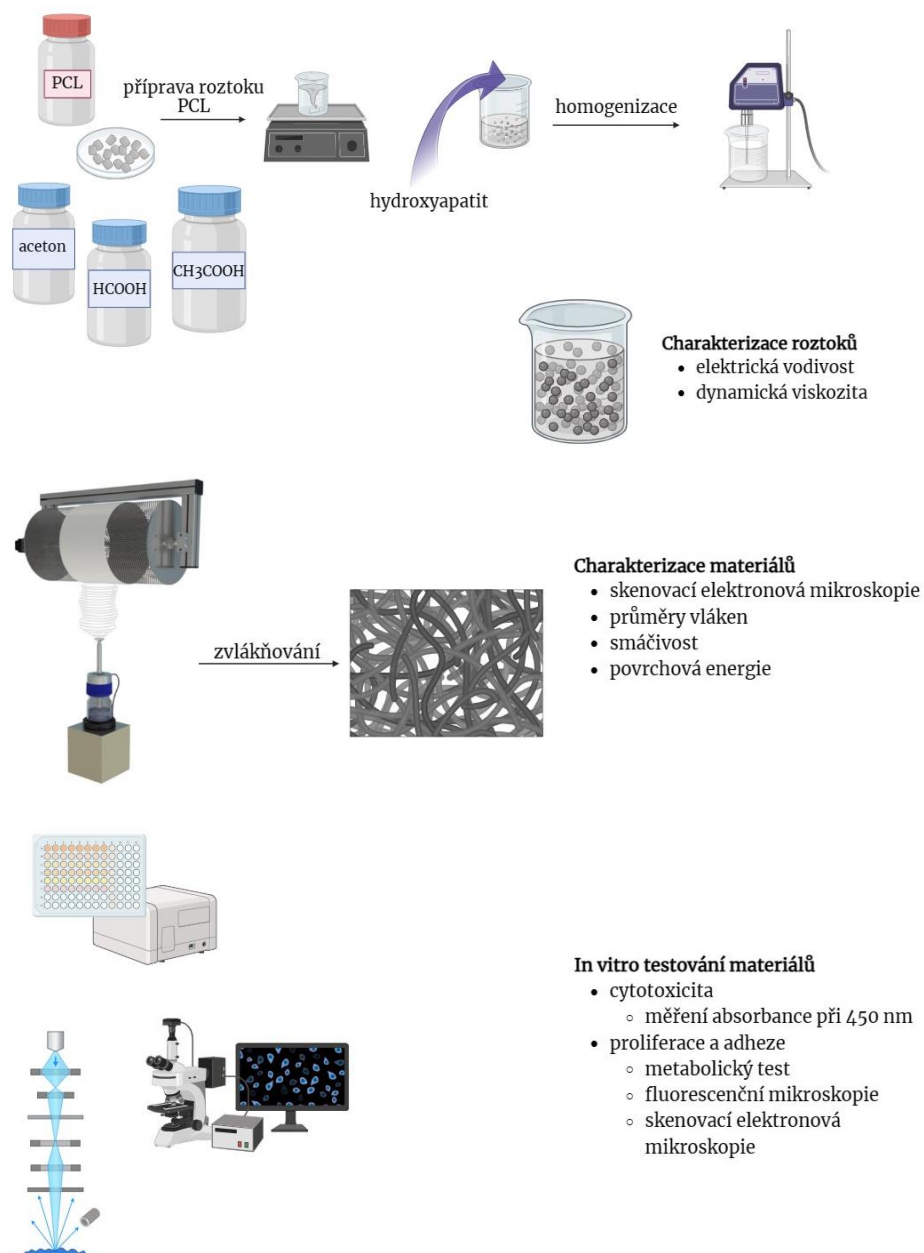
Rovněž pro funkcionalizace vlákenných materiálů pomocí střídavého elektrického zvláknování byly využity hydroxyapatitové mikročástice (μ HA) s procentuálním obsahem 0; 5; 10 a 15 hm.% z hmotnosti sušiny polymeru. Konkrétně se jednalo o směs

polymerních roztoků PCL, a to 16hm.% PCL o molekulové hmotnost Mn 45 000 a PCL 10 hm.% 80 000 v poměru 1/3. Použitý rozpouštědlový systém byl kyselina mravenčí/kyselina octová/acetón (1/1/1). Výsledky ukázaly, že přidaný hydroxyapatit ovlivňuje průměry vláken, pevnost a smáčivost. Kontaktní úhel s rostoucím hmotnostním procentem μ HA klesal, avšak stále se jednalo o hydrofobní povrchy. Vyšší koncentrace hydroxyapatitu vedla ke snížení pevnosti vrstev, což bylo dáno menšími průměry vláken a zapouzdřením anorganických částic ve vláknech, což narušilo strukturu vlákna a vyústilo ke snížení pevnosti (Jirkovec et al. 2021b).

Dále bylo využito kombinace technologií meltblown a stejnosměrného elektrického zvlákňování a naprašovacího zařízení, prostřednictvím kterého hydroxyapatitové částice v řádu mikrometrů dopadaly na vlákennou vrstvu z 16%hm. roztoku PCL. Hmotnostní koncentrace hydroxyapatitu ze sušiny polymeru představovala 10 %. Spojením technologie meltblown umožňující vytvoření vláken s průměry 1–5 μ m a stejnosměrným elektrickým zvlákňováním, kde mohou být vyráběna nanovlákná umožnily vyrobit porézní strukturu díky mikrovláknům a nanovlákná napomohla buněčné adhezi lidských osteoblastů MG-63 v rámci hodnocení *in vitro* testů, přidané hydroxyapatitové částice navíc biologickou aktivitu podpořily v porovnání s materiály z jednotlivých technologií funkcionalizované HA (Erben et al. 2015).

3. Experimentální část

V návaznosti na stavbu kostní tkáně byl zvolen materiál a technologie výroby vláknenného scaffoldu. Nejprve byly připravovány polymerní roztoky PCL o koncentraci 6; 8; 10 a 12 hm.%, které byly následně zvlákněny. Pro tvorbu kompozitních roztoků byl následně zvolen 10%hm. roztok PCL, který byl dále modifikován prostřednictvím mikročástic HA o koncentraci 5; 10; 15; 20 a 30 hm.% z hmotnosti sušiny polymeru. Totéž bylo provedeno s nanočásticemi HA o stejných koncentracích částic v polymerní matrici. Připravené roztoky byly charakterizovány, zvlákněny a materiály opět charakterizovány. Vybrané vzorky byly testovány pomocí *in vitro* testů.



Obrázek 25: Zobrazení kroků experimentální části. Vytvořeno v Biorender.com

3.1. Příprava a charakterizace polymerních roztoků

Pro přípravu polymerních roztoků byl zvolen polykaprolakton (PCL) o molekulové hmotnosti M_n 80 000 (440744, Sigma-Aldrich). Jako rozpouštědlový systém polykaprolaktonu byla zvolena směs složená z kyseliny octové (20000–11000, Penta), kyseliny mravenčí (19930–11000, Penta) a acetonu (10060–11000, Penta) v poměru 1:1:1 na základě výsledků studie Sivana a kolektivu (2022). Byly připraveny celkem čtyři roztoky o koncentraci 6; 8; 10 a 12 %hm. PCL, které byly promíchávány pomocí magnetického míchacího zařízení (M2-D, Chromservis) po dobu 24 hodin, následně došlo k jejich zvlákňování.

3.1.1. Dynamická viskozita

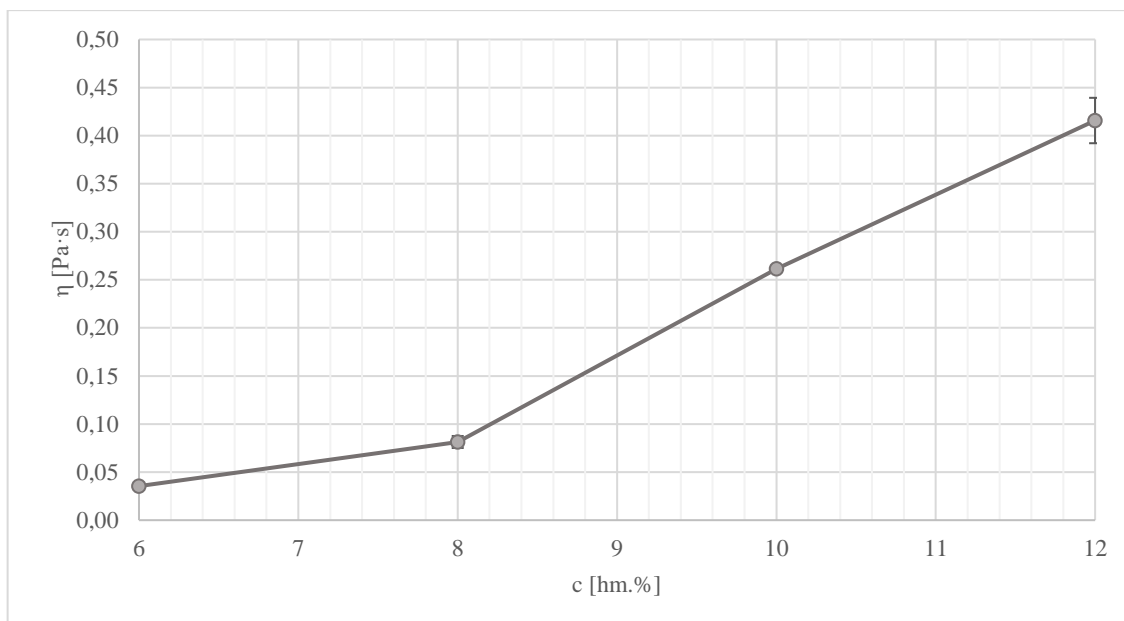
Pomocí reometru (HAAKE RotoVisco 1, Thermo Scientific) byla měřena dynamická viskozita (η) roztoků prostřednictvím softwaru (HAAKE RheoWin Data). Měření probíhalo při použití paralelních desek. Na statickou desku v dolní části bylo dávkováno 0,2 ml roztoku, rotující deska, přiléhající na statickou shora, se pohybovala konstantně rychlostí 1500 otáček za sekundu. Měření probíhalo po dobu 30 sekund. Pro každý vzorek bylo měření provedeno třikrát. V *tabulce 3* se nacházejí výsledné hodnoty ve formě aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

Tabulka 3: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky viskozity daných roztoků

koncentrace PCL v roztoku [hm.%]	$\eta \pm SD$ [Pa·s]
6	0,0372 \pm 0,0046
8	0,0800 \pm 0,0058
10	0,2499 \pm 0,0231
12	0,4027 \pm 0,0324

Jak ukazují naměřené hodnoty, platilo, že čím vyšší byla koncentrace polykaprolaktonu v polymerním roztoku, tím se hodnota dynamické viskozity postupně mírně zvyšovala, což souvisí s větší koncentrací polymerních řetězců v roztoku. Ty kladou odpor vůči tečení, tedy zvyšují viskozitu.

Graf 1 představuje grafické zobrazení závislosti dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci polykaprolaktonu v polymerním roztoku. V grafu jsou uvedeny hodnoty dynamické viskozity v Pascalsekundách v závislosti na jednotlivých hmotnostních koncentracích PCL a směrodatné odchylky těchto hodnot.



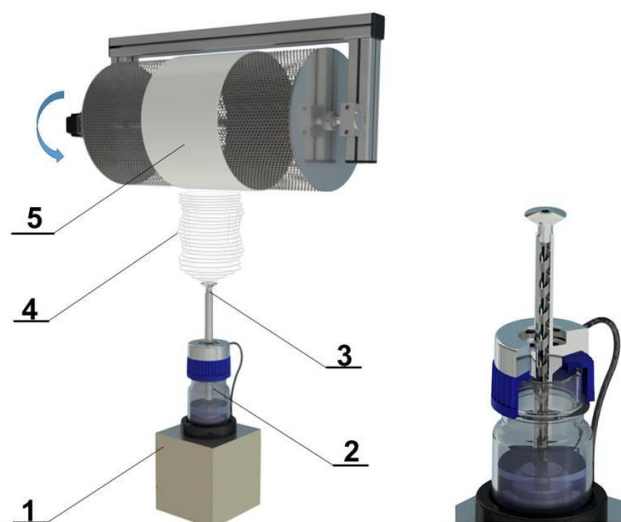
Graf 1: Závislost dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci polykaprolaktonu

3.2. Zvlákňování polymerních roztoků a charakterizace vytvořených vrstev

Polymerní roztoky byly po 24 hodinách od přípravy zvlákňovány a vytvořené vrstvy byly následně analyzovány.

3.2.1. Výroba vláknenných vrstev

Pro zvlákňování byla využita technologie využívající střídavého napětí, která umožňuje tvorbu vláken bez nutnosti elektricky aktivního kolektoru. Konkrétně bylo zvlákňování provedeno pomocí přeplavovací tyčové elektrody s kuželovou hlavou. Polymerní roztok se nacházel v reagenční lahvi a pomocí závitů na zavedené tyči v lahvi byl přečerpáván směrem k přeplavovací elektrodě. Byly zvoleny čtyři koncentrace PCL, z toho důvodu, že viskozita daného roztoku ovlivňuje vůli mezi šnekem a tyčkou, tedy pokud je koncentrace roztoku příliš nízká, nedochází k přečerpání roztoku k elektrodě a není možné roztok zvláknit za použití příslušné aparatury. Na *obrázku 26* je znázorněno schéma zvlákňovacího zařízení, a také průřez tyčkou se šnekem pro čerpání roztoku vzhůru k přeplavovací elektrodě.



Obrázek 26: Schéma zvlákňovacího zařízení pomocí střídavého elektrického napětí a průřez tyčkou. 1 – magnetická pumpa, 2 – šnekové čerpadlo se zásobou roztoku, 3 – přeplavovací elektroda, 4 – tvořící se vlákna ve vlákenné vlečce, 5 – rotující kolektor s vlákennou vrstvou. Převzato z: (Jirkovec 2021)

Na hranách elektrody vznikala vlákna, která byla unášena elektrickým větrem. Zachytávána byla na kolektor, rotující válec, pokrytý polypropylenovou spunbond netkanou textilií. Jeho rychlost otáčení byla 20 m/min. Teplota vzduchu v laboratoři představovala 21 °C, relativní vlhkost vzduchu 30 %. Zařízení pracovalo pod efektním napětím 36 kV a při frekvenci 50 Hz.

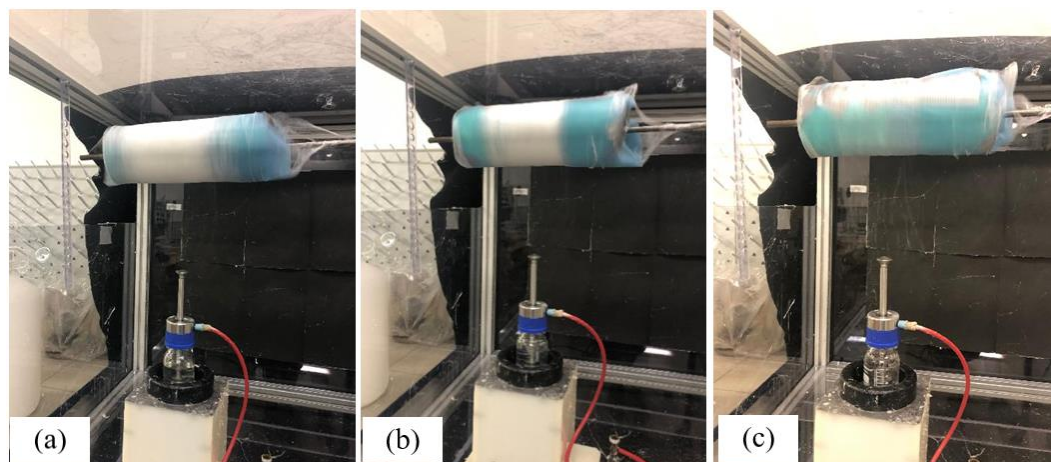
Při zvlákňování 6%hm. roztoku PCL nedošlo k jeho vytlačení čerpadlem k přeplavovací elektrodě vzhledem k nízké viskozitě roztoku, roztok zvlákněn nebyl.

Roztok o hm. koncentraci 8 % již zvlákněn byl. Působením elektrického napětí docházelo ke tvorbě vláken na hranách přeplavovací elektrody a tvořící se vlákna se formovala do vlákenné vlečky, která se však v průběhu procesu trhala a byla slabá. I navzdory tomu byla vyrobena z makroskopického hlediska homogenní vlákenná vrstva.

10%hm. roztok PCL byl rovněž zvlákněn. Tvořící se vlákenná vlečka byla v porovnání s vlečkou předchozího procesu hustší. Vlákna ve vlečce byla viditelnější, mohutnější a výsledná vrstva se jevila rovněž homogenně.

PCL o koncentraci 12 %hm. tvořil během zvlákňování provazovitou vlečku. Výsledná vlákenná vrstva byla nesouměrná vlivem nerovnoměrného rozprostření vláken v šířce rotujícího válce obaleného podkladovou textilií. Vytvořená vrstva byla po ukončení zvlákňování mokrá, což u předchozích vzorků nebylo shledáno. Jednalo se o důsledek nedostatečného odpaření rozpouštědlového systému ze zvlákňovaného roztoku.

Na *obrázku 27* je možné vidět přibližný charakter tvořících se vláknenných vrstev na rotujícím válci, který byl výše popsán.



Obrázek 27: Zvláknění roztoků o koncentraci PCL 8 hm.% (a), 10 hm.% (b), 12 hm.% (c)

3.2.2. Analýza vláknenných vrstev

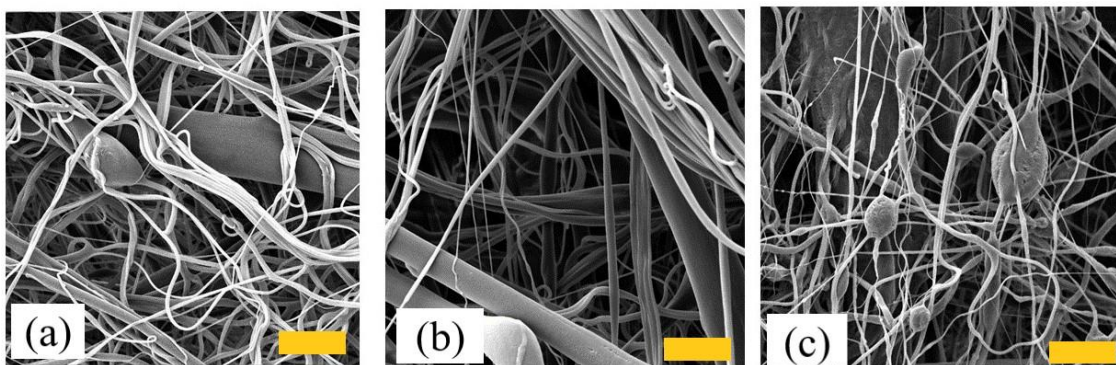
V *tabulce 4* jsou uvedeny zvlákněné roztoky a názvy výsledných vrstev, které jsou v textu dále používány.

Tabulka 4: Označení zvlákněných materiálů

koncentrace PCL v roztoku [hm.%]	název materiálu
8	PCL_8%
10	PCL_10%
12	PCL_12%

Za pomoci elektronového rastrovacího mikroskopu (TESCAN VEGA 3, SB Easy Probe) byly pořízeny snímky zvlákněných vrstev. Nejprve došlo k přípravě vzorků, kdy byla odštíhnutá část vrstvy, nalepena oboustrannou lepicí páskou na terčik a vložena do naprašovačky (Quorum Q150R ES, Quorum Technologies), kde došlo k jejímu pozlacení vrstvou 10 nm kvůli zvýšení elektrické vodivosti. Po vložení vzorků do elektronového mikroskopu byl odčerpán vzduch. Použité napětí pro urychlení proudu elektronů bylo 10 kV. Snímky výsledných zvlákněných vrstev byly pořízeny při zvětšeních 10 000x, 5000x, 2500x, 1000x, 500x, 100x pro možnost zjištění mikroskopického pohledu vrstev.

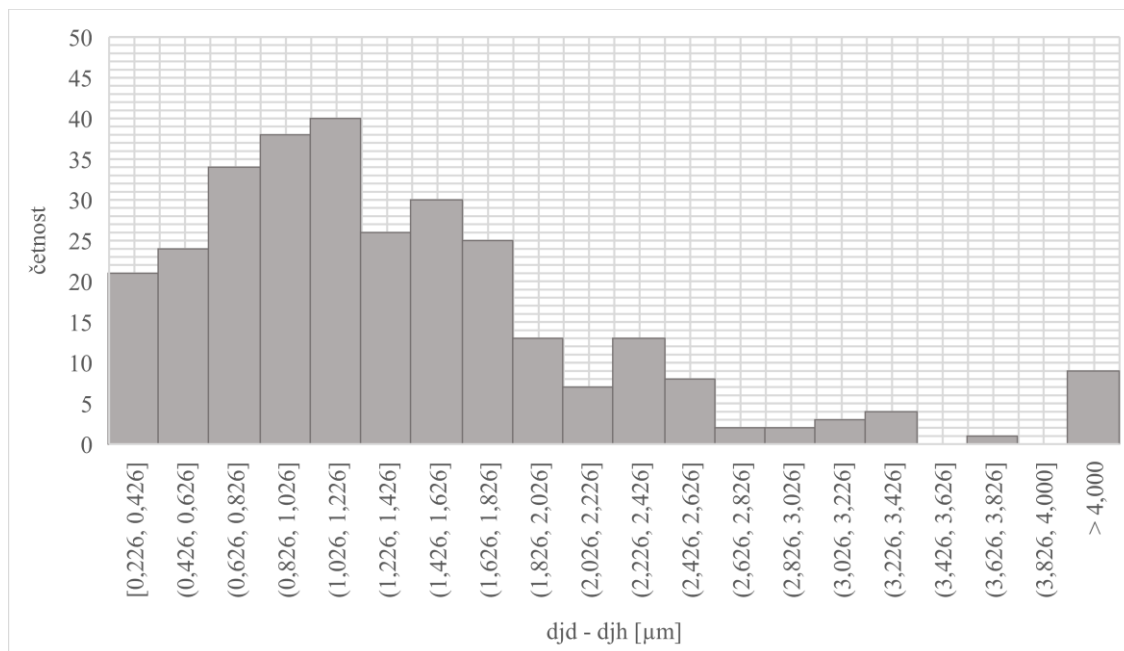
Jak je možné vidět na *obrázku 28*, výsledné vrstvy se lišily svou strukturou. Zatímco u materiálů PCL_8% a PCL_12% byly patrné defekty ve vytvořených vláknech, vykazovala vrstva vzorku PCL_10% ve srovnání s ostatními strukturu bez těchto defektních částí.



Obrázek 28: SEM snímky pro vzorky PCL_8% (a) , PCL_10% (b), PCL_12% (c);
zvětšení 2500x, měřítko 20 μm

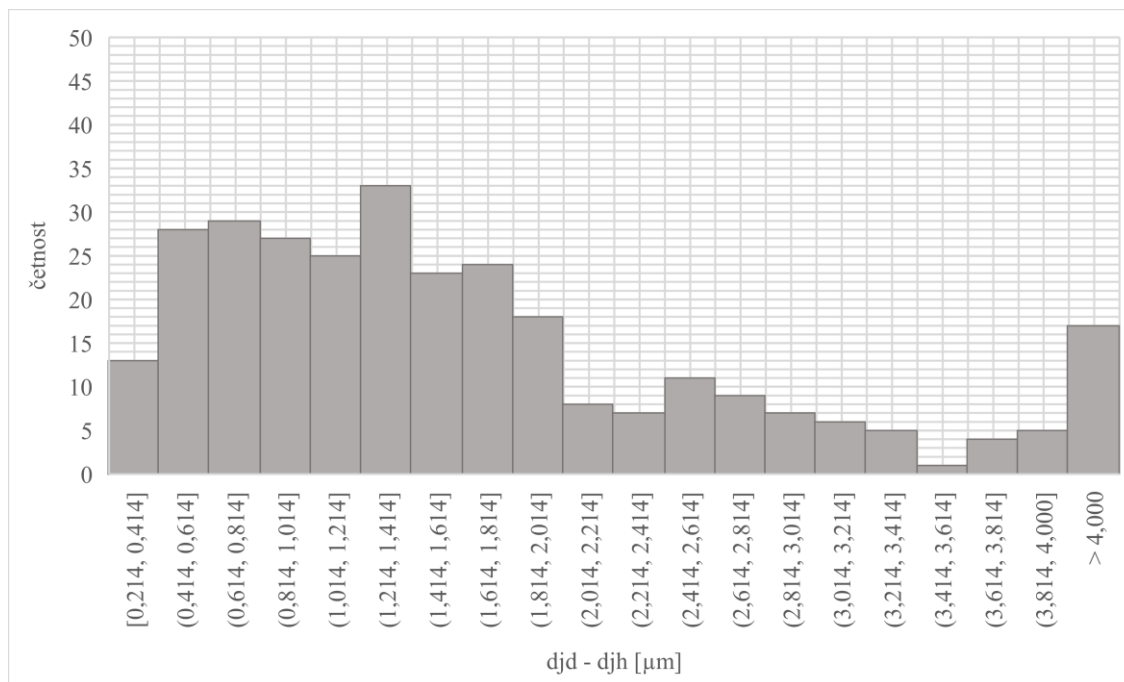
Pomocí softwaru ImageJ (NIH, Bethesda) bylo provedeno stanovení průměru vláken za pomoci snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) o velikosti zvětšení 2500x. Bylo měřeno 300 hodnot od každého materiálu. Výsledky jsou zobrazeny pomocí histogramů a ve formě průměrných hodnot \pm směrodatná odchylka průměrů vláken ve výsledné vrstvě materiálu.

Graf 2 zobrazuje četnost zastoupení jednotlivých průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_8%.



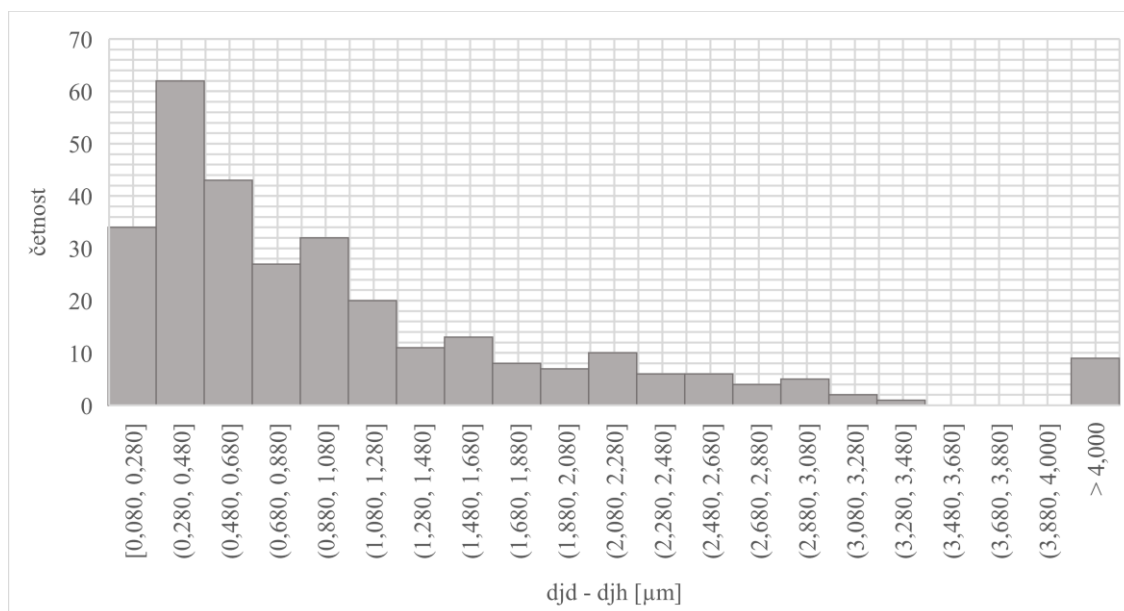
Graf 2: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_8%

Graf 3 zobrazuje četnost zastoupení jednotlivých průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_10%.



Graf 3: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_10%

Graf 4 zobrazuje četnost zastoupení jednotlivých průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_12%.



Graf 4: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_12%

V tabulce 5 jsou uvedeny průměry vláken se směrodatnou odchylkou daných vzorků zvlákněných vrstev. Vrstva vzorku PCL_12% čítala vysoký podíl nanovláken, konkrétně třída (0,280 μm ; 0,480 μm > vykazovala nejvyšší četnost, avšak při zohlednění morfologie

získané prostřednictvím SEM vykazovala velké množství defektů. Vzorek PCL_8% měl nejvyšší zastoupení průměrů v rozmezí (1,026 μm ; 1,226 μm), tedy submikronových vláken. Vzorek PCL_10% se v rámci průměrů vláken pohyboval spíše v oblasti mikrovláken, o čemž svědčí vysoký počet zastoupení v rámci třídy zahrnující vlákna větší jak 4 μm . Největší zastoupení bylo v rámci rozsahů (1,214 μm ; 1,414 μm), avšak i v rámci tohoto vzorku byla zastoupena nanovlákna.

Tabulka 5: Průměry vláken zvlákněných materiálů

materiál	průměry vláken [μm]
PCL_8%	1,448 \pm 1,381
PCL_10%	1,847 \pm 1,769
PCL_12%	1,104 \pm 1,095

Na základě průběhu zvláknování, mikroskopické struktury a distribuce průměrů vláken ve vzorcích byl pro následující tvorbu kompozitních vrstev zvolen roztok s obsahem 10 hm.% PCL.

3.3. Příprava a charakterizace modifikovaných polymerních roztoků s μHA

Bylo připraveno celkem pět kompozitních polymerních roztoků, které se vzájemně lišily koncentrací hydroxyapatitových mikročástic (μHA). Koncentrace μHA vzhledem k hmotnosti sušiny polymeru v jednotlivých vzorcích byla 5; 10; 15; 20 a 30 %.

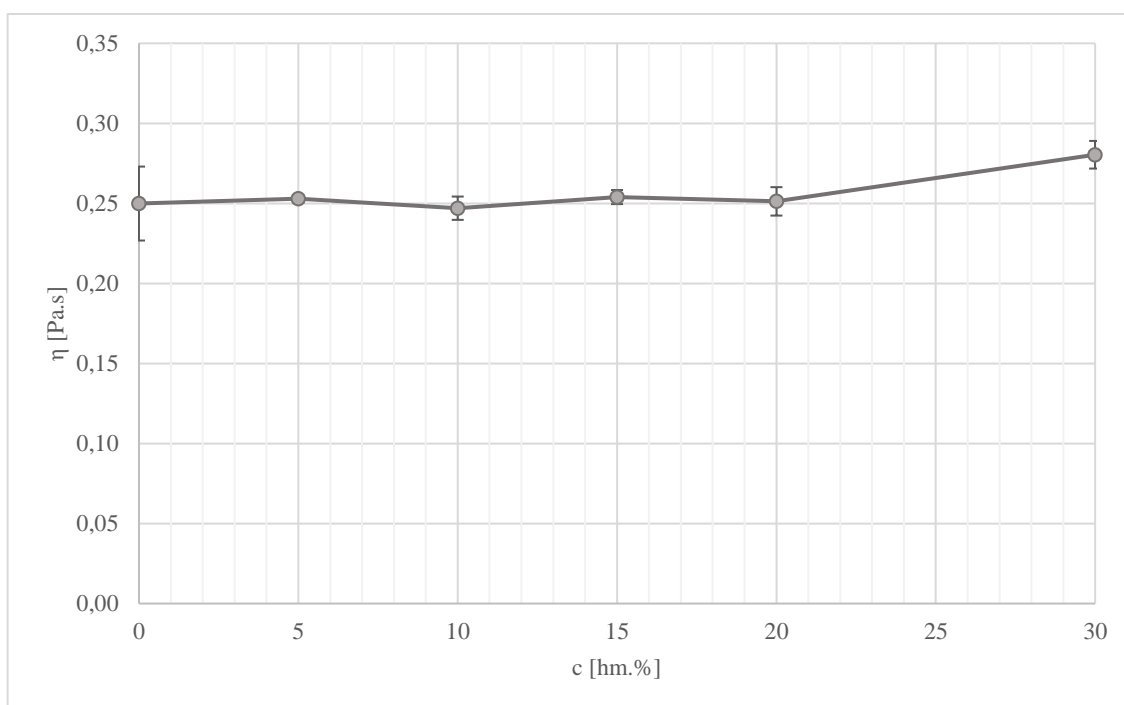
Po přidání μHA do polymerního roztoku byla disperze promíchávána pomocí magnetického míchadla na míchačce s ohřevem (MR Hei – Tec, Heidolph) při 400 otáčkách za minutu při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Dále byla disperze vložena do sonikátoru (Q500 Sonicator, QSONICA), kde docházelo pomocí ultrazvukových vln k rozbíjení částic, aby došlo k jejich rovnoměrnému rozptýlení v roztoku a snížila se pravděpodobnost tvorby shluků. Tento jev by měl vliv na strukturu, vlastnosti vlákněných vrstev a rovněž by byla ovlivněna měření dynamické viskozity či elektrické vodivosti. Celkem byly u každého kompozitního roztoku provedeny 3 cykly, při amplitudě 35 % po dobu 30 sekund při pulzech 30 sekund a 20 sekund pauza.

3.3.1. Dynamická viskozita

Měření dynamické viskozity (η) bylo prováděno na rotačním reometru typu paralelních desek (HAAKE RotoVisco 1, Thermo Scientific) za pomoci softwaru

HAAKE RheoWin Data. Měření viskozity probíhalo při konstantních otáčkách 1500 otáček za sekundu po dobu 30 s. Bylo dávkováno 0,2 ml roztoku pomocí injekční stříkačky. Od každého roztoku byly provedeny tři měření. Pro ověření, zda nedochází k odpařování rozpouštědla, a tím i poklesu hodnoty viskozity bylo provedeno i měření o délce 60 sekund. Neukázalo se, že k tomuto jevu docházelo.

Graf 5 ukazuje závislost dynamické viskozity na koncentraci μ HA v polymerním roztoku. Hodnoty viskozity jsou velmi blízké, mírné poklesy konkrétně u vzorků s 10%hm. a 20 %hm. μ HA nepředstavují kvůli směřodatným odchylkám významnou změnu, která je mírně patrná u roztoku s 30 %hm. μ HA. V grafu je rovněž zobrazena hodnota pro 10%hm. roztok PCL, kde byla koncentrace μ HA nulová.

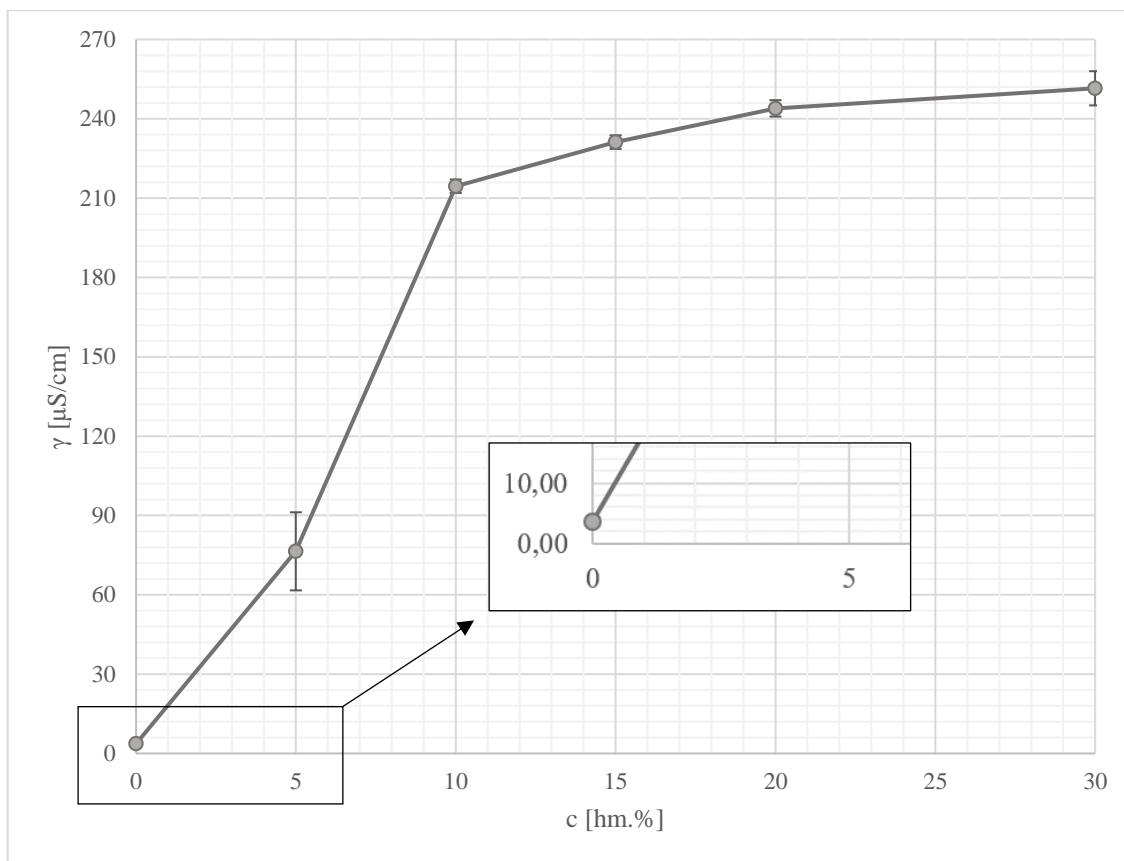


Graf 5: Závislost dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci μ HA v polymerním roztoku

3.3.2. Elektrická vodivost

Měření (měrné) elektrické vodivosti (γ) probíhalo za pomoci měřicí sondy (Eutech Instruments NOC 510, Chromservis). Bylo změřeno celkem pět hodnot od každého vzorku. Závislost elektrické vodivosti na koncentraci mikročástic hydroxyapatitu je zobrazena v *grafu 6* společně se směřodatnými odchylkami od průměrných hodnot.

V grafu je zobrazena i elektrická vodivost pro polymerní roztok bez přidaných částic, což ukazuje, že přidáním částic došlo ke zvýšení vodivosti, následně došlo ke skokovému růstu i při koncentraci 10 %hm. μ HA. U zbyvajících roztoků nebyly změny tak výrazné.



Graf 6: Závislost měrné elektrické vodivosti na hmotnostní koncentraci μHA

3.4. Zvlákňování polymerních roztoků s μHA a charakterizace vrstev

3.4.1. Výroba vláknenných vrstev

Zvlákňování probíhalo pomocí technologie využívající střídavé elektrické napětí (viz kapitola 3.2.1.). Zvlákňováno bylo při teplotě $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vlhkosti vzduchu 26% na rotační buben s podkladovou spunbond netkanou textilií. Rychlost otáčení bubnu byla 20 m/s . Pumpa, která vytlačovala roztok šnekem vzhůru k elektrodě udělovala 500 otáček za minutu. Efektivní napětí bylo 38 kV . Při těchto laboratorních podmínkách došlo ke zvlákňování všech roztoků obsahující μHA .

Co se týká samotného procesu zvlákňování, vláknenná vlečka se netrhala, byla rovnoměrně unášena elektrickým větrem směrem ke kolektoru. S přibývajícím koncentrací hydroxyapatitových částic byla výsledná vrstva vizuálně objemnější. Všechny se jevily makroskopicky jako homogenní struktury.

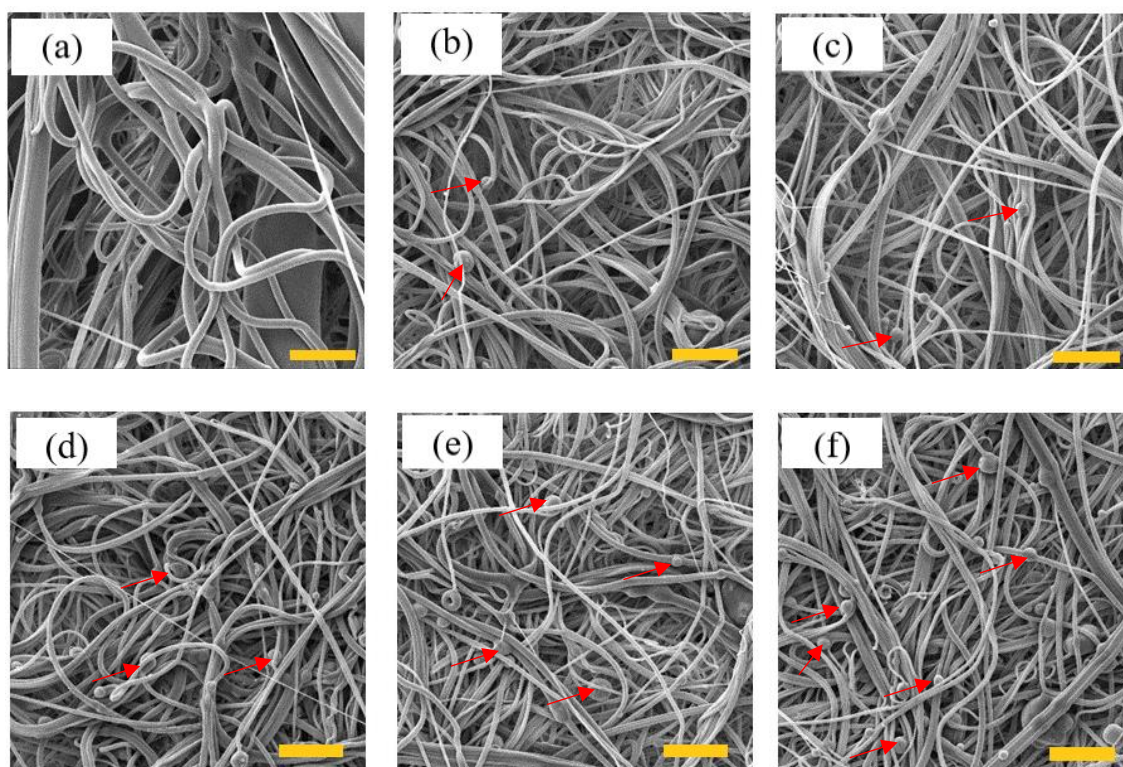
3.4.2. Analýza vláknenných vrstev

Tabulka 6 zobrazuje označení ve vztahu ke koncentraci μHA , které je dále v textu používáno.

Tabulka 6: Označení materiálů o dané koncentraci mikročástic hydroxyapatitu

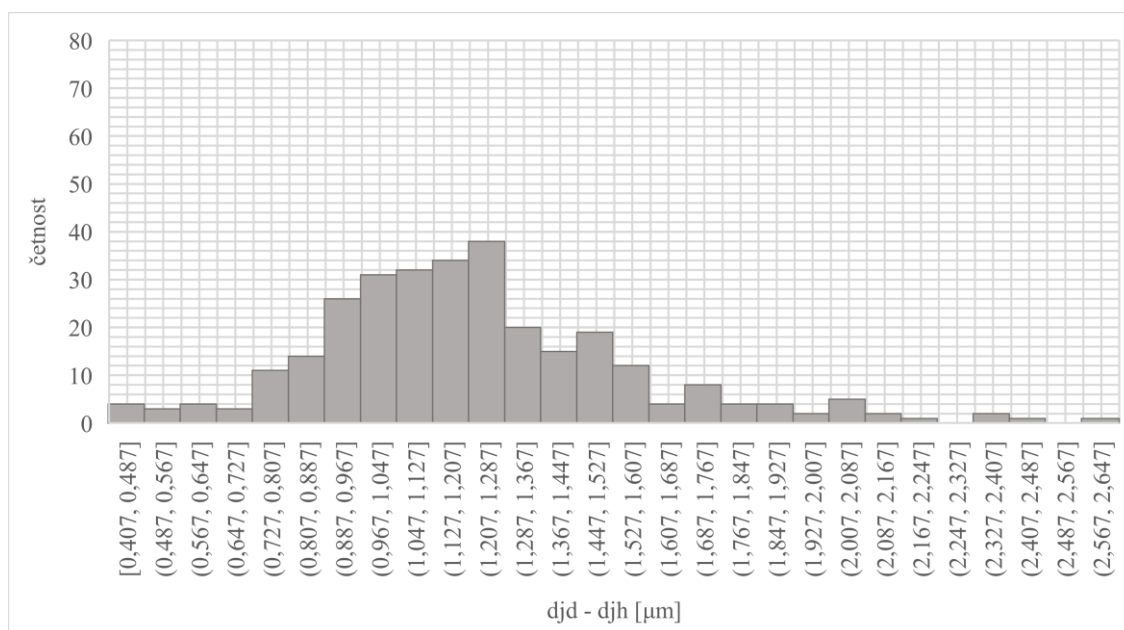
koncentrace μHA [% hm. ze sušiny polymeru]	označení materiálu
5	PCL_5% μHA
10	PCL_10% μHA
15	PCL_15% μHA
20	PCL_20% μHA
30	PCL_30% μHA

Prostřednictvím rastrovacího elektronového mikroskopu (TESCAN VEGA 3, SB Easy Probe) byly pořízeny snímky zvlákněných vrstev kompozitních roztoků s mikročásticemi hydroxyapatitu. Příprava vzorků zahrnovala naprašení deseti nanometry zlata pomocí naprašovačky (Quorum Q150R ES, Quorum Technologies). Následně byly vzorky vloženy do mikroskopu. Použité napětí pro urychlení proudu elektronů bylo 10 kV. Na obrázku 29 jsou snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu jednotlivých vzorků. Je patrné, že se zvyšující se koncentrací se nacházely mikročástice i mimo hmotu vlákn. Šípky na obrázku ukazují na μHA .



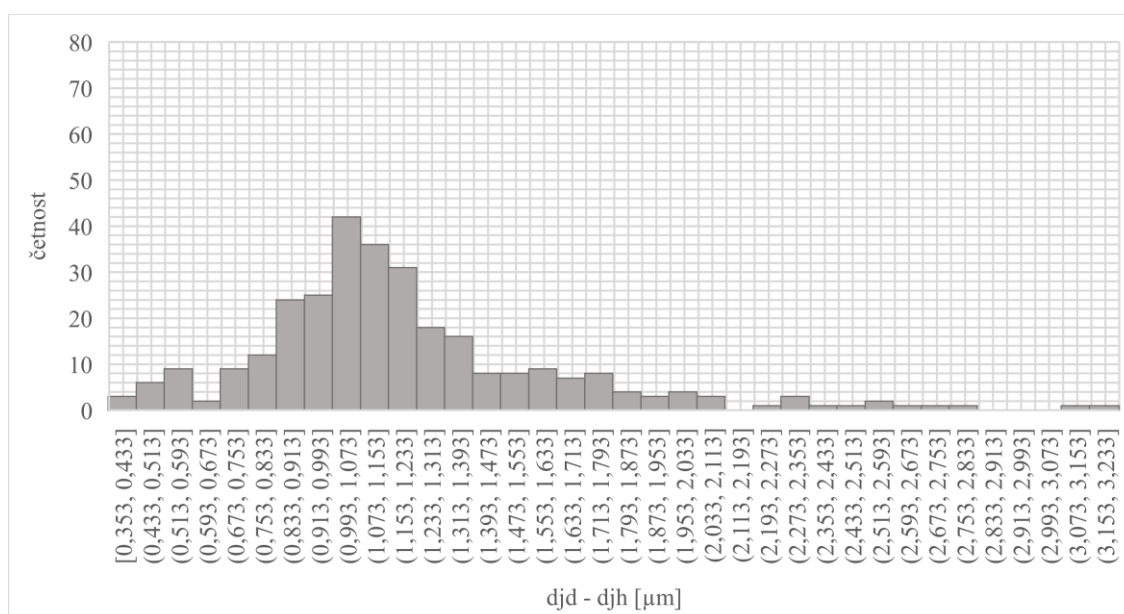
Obrázek 29: SEM snímky vzorků při zvětšení 2500x (a) PCL_10%, (b) PCL_5% μHA , (c) PCL_10% μHA , (d) PCL_15% μHA , (e) PCL_20% μHA , (f) PCL_30% μHA ; měřítko 20 μm

Průměry vláken byly měřeny prostřednictvím softwaru ImageJ (NIH, Bethesda) za využití snímků z elektronové mikroskopie o zvětšení 2500x. Bylo měřeno 300 hodnot od každého vzorku. Výsledky jsou uvedeny prostřednictvím histogramů a průměrných hodnot \pm směrodatná odchylka (SD). *Graf 7* zobrazuje graficky početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vlákně vrstvě vzorku PCL_5% μ HA.



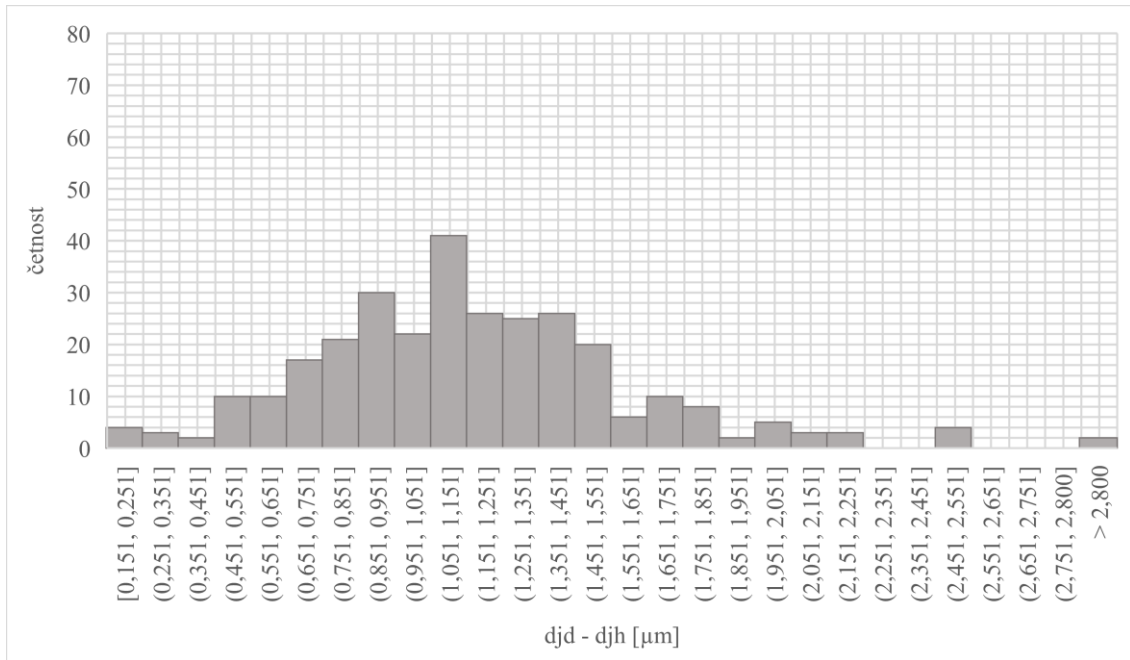
Graf 7: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_5% μ HA

Graf 8 zobrazuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vlákně vrstvě vzorku PCL_10% μ HA.



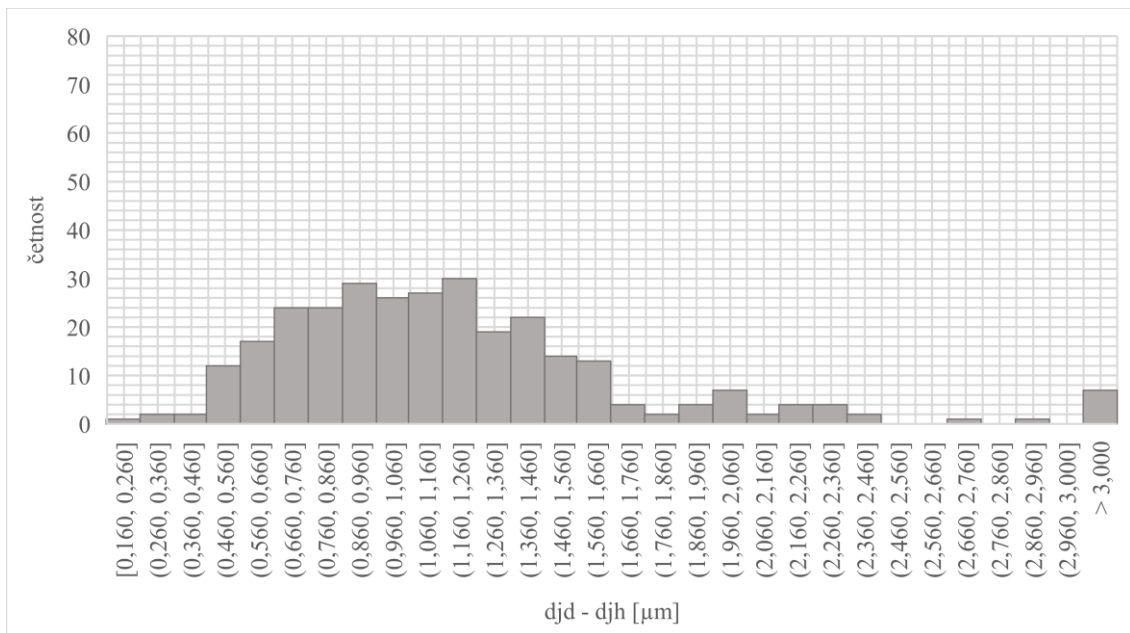
Graf 8: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_10% μ HA

Graf 9 zobrazuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vlákně vrstvě vzorku PCL_15% μ HA.



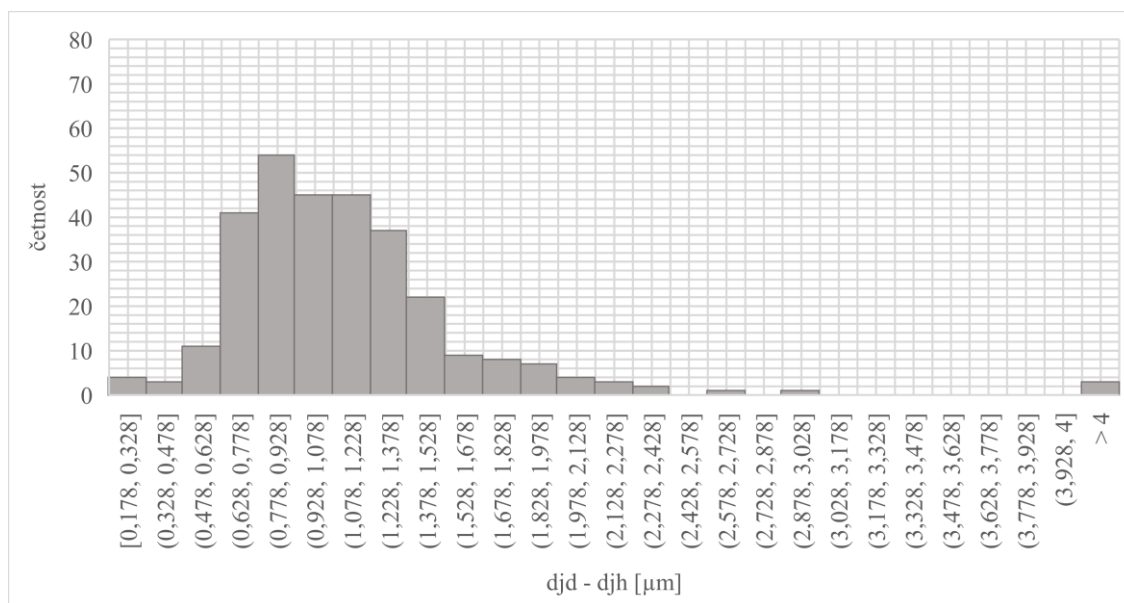
Graf 9: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_15% μ HA

Graf 10 zobrazuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vlákně vrstvě vzorku PCL_20% μ HA.



Graf 10: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_20% μ HA

Graf 11 zobrazuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vlákně vrstvě vzorku PCL_30% μ HA.



Graf 11: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_30% μ HA

V tabulce 7 jsou uvedeny průměry vláken se směrodatnou odchylkou daných materiálů. Jak vyplývá z uvedených histogramů, největší početní zastoupení vyrobených vrstev představovaly vlákna submikronová napříč všemi vzorky pohybující se průměry v rámci 500–1000 nm. Z výsledných průměrných hodnot vyplývá, že s přibývajícím koncentrací částic se průměr vláken mírně snižoval.

Tabulka 7: Průměry a směrodatné odchylky kompozitních vlákněných vrstev s μ HA

materiál	průměr \pm SD [μ m]
PCL_5% μ HA	1,246 \pm 0,416
PCL_10% μ HA	1,205 \pm 0,449
PCL_15% μ HA	1,173 \pm 0,468
PCL_20% μ HA	1,204 \pm 0,578
PCL_30% μ HA	1,128 \pm 0,507

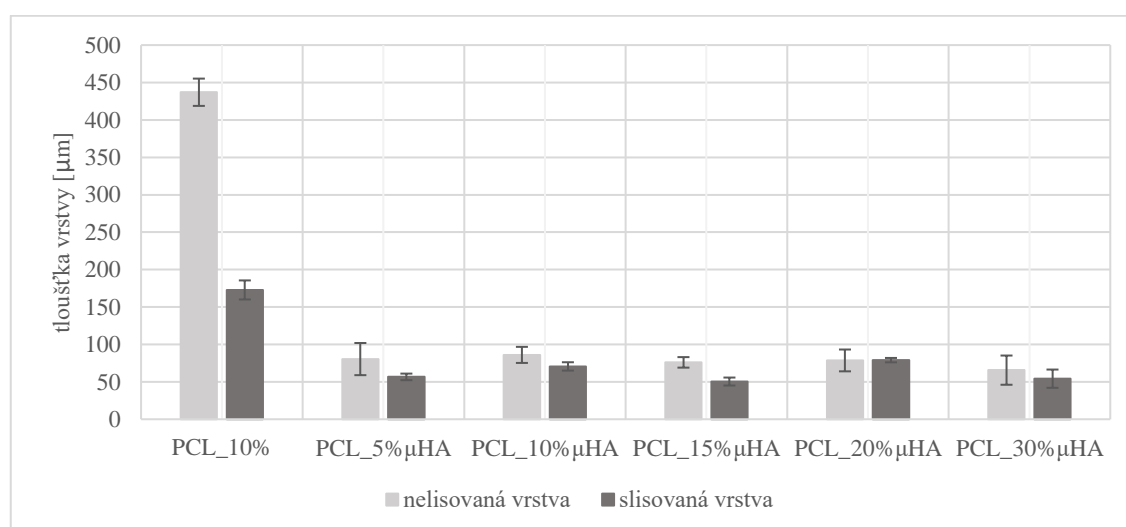
Kontaktní úhel byl měřen pomocí metody přisedlé kapky za pomoci zařízení See System E od firmy Advex Instruments. U každého vzorku bylo provedeno 16 měření, ze kterých byl následně získán úhel smáčení. Použitým roztokem byla destilovaná voda, kdy bylo pomocí mikropipety dávkováno 8 μ l. Dále byla z naměřených kontaktních úhlů na základě Kwock-Neumannova modelu pomocí softwaru SeeSystem 7.6. vypočítána povrchová energie jednotlivých vzorků.

V tabulce 8 se nachází výsledné kontaktní úhly a hodnoty povrchové energie zvlákněných vrstev. Výsledné vrstvy vykazovaly hydrofobní chování, a i s narůstající koncentrací hydroxyapatitových částic nedošlo k výrazné změně povrchového chování. Při zvážení odchylek měření nebyly výsledky od sebe takřka odlišné.

Tabulka 8: Kontaktní úhly a povrchová energie vyrobených materiálů

materiál	kontaktní úhel \pm SD [°]	povrchová energie [mJ/m ²]
PCL_10%	129 \pm 4	8
PCL_5% μ HA	128 \pm 9	9
PCL_10% μ HA	131 \pm 5	8
PCL_15% μ HA	127 \pm 6	9
PCL_20% μ HA	132 \pm 5	7
PCL_30% μ HA	124 \pm 8	10

Na základě naměřených hodnot kontaktních úhlů byla stanovena hypotéza, která předpokládala vliv struktury (drsnosti) povrchu vlákenné vrstvy na hodnotu kontaktního úhlu. Pro verifikaci této hypotézy bylo provedeno nejprve slisování vyrobených vrstev na laboratorním lisu (HVL 15.2, Pracovní stroje Teplice spol. s.r.o.) při lisovací síle 70 kN po dobu 3 sekund a pokojové teplotě a následovalo opětovné změření kontaktních úhlů. Tloušťka vrstev před a po slisování byla změřena pomocí digitálního tloušťkoměru s plochými měřicími keramickými plochami o přesnosti \pm 5 μ m (INSIZE, INSIZE Czech s.r.o.) pro dokumentaci slisování povrchu. Celkem bylo proměřeno 5 míst na vlákenné vrstvě a dále vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka, výsledky jsou zobrazeny v grafu 12.



Graf 12: Tloušťky slisovaných a nelsisovaných vrstev jednotlivých vzorků vlákenných vrstev

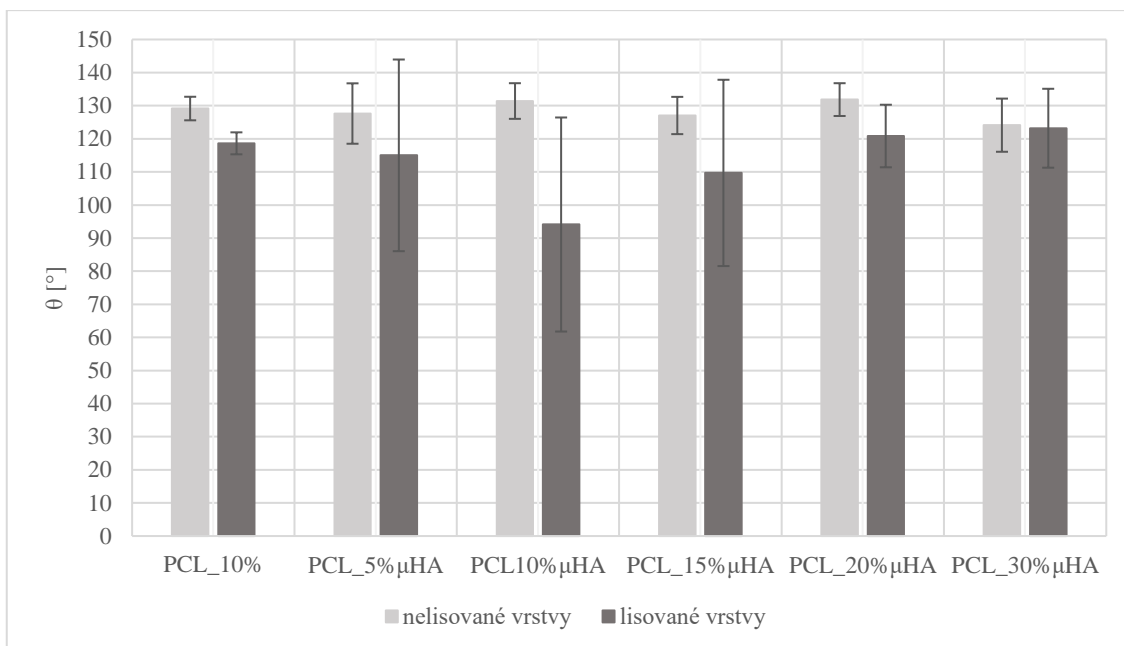
V *tabulace 9* se nachází hodnoty kontaktních úhlů a povrchových energií pro slisované vzorky. Chování těchto vzorků bylo v porovnání s nesisovanými vzorky odlišné. U vzorků s vysokými směrodatnými odchylkami docházelo k velkým výkyvům smáčivosti, konkrétně PCL_5% μ HA, PCL_10% μ HA a PCL_15% μ HA.

Obecně lze říci, že slisováním vrstvy došlo ke změně struktury povrchu, čímž došlo i k mírnému snížení kontaktního úhlu. Byla tím potvrzena hypotéza, že drsnost povrchu vlákně vrstvy měla vliv na smáčivost. Avšak i u slisovaných vrstev byla velká variabilita v závislosti na testovaném místě vrstvy. Povrchové vlastnosti ani v tomto případě nebyly rovnoměrné, v určitých místech docházelo ke smáčení tzn. kontaktní úhel nižší než 90°, ale jednalo se pouze o určitá místa ve vzorcích, což je důvodem takto velkých směrodatných odchylek od průměrného kontaktního úhlu při těchto měřeních, viz *tabulka 9*. Kontaktní úhel je kromě struktury povrchu, respektive jeho drsnosti rovněž ovlivňován jeho chemickým složením. V tomto případě je nutné vzít v úvahu, že se nejednalo o modifikaci povrchu, ale částice byly dispergovány v polymerním roztoku. Na základě studie od Jirkovce a kolektivu (2021a) bylo zjištěno, že hydrofobní polymer PCL zvlákněný prostřednictvím střídavého elektrického zvláknění má hydrofobní chování i ve formě vlákně vrstvy, avšak jeho zvláknění prostřednictvím stejnosměrného elektrického zvláknění je utvořena vlákně vrstva hydrofilní povahy, kdy použitou technologií dojde ke změně konformace.

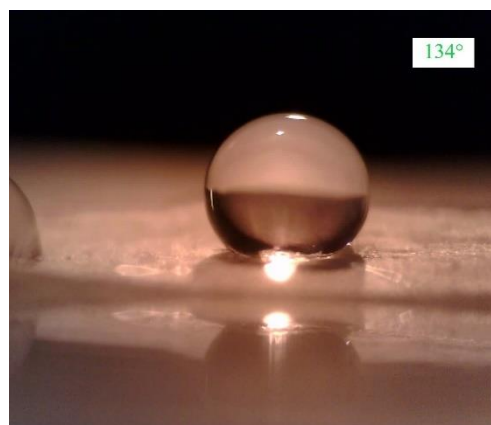
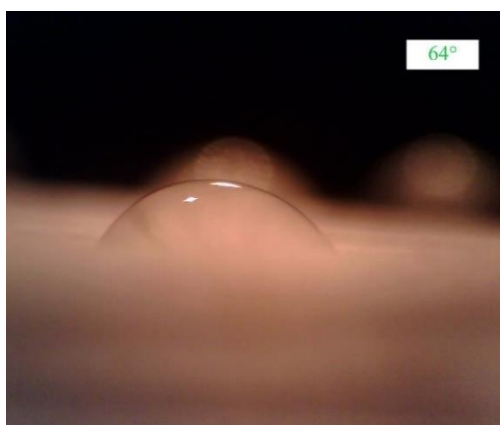
Tabulka 9: Kontaktní úhel a povrchová energie lisovaných vrstev

materiál	kontaktní úhel \pm SD [°]	povrchová energie [mJ/m²]
PCL_10%	119 \pm 3	13
PCL_5%μHA	115 \pm 29	15
PCL_10%μHA	94 \pm 32	26
PCL_15%μHA	110 \pm 28	18
PCL_20%μHA	121 \pm 9	8
PCL_30%μHA	123 \pm 12	11

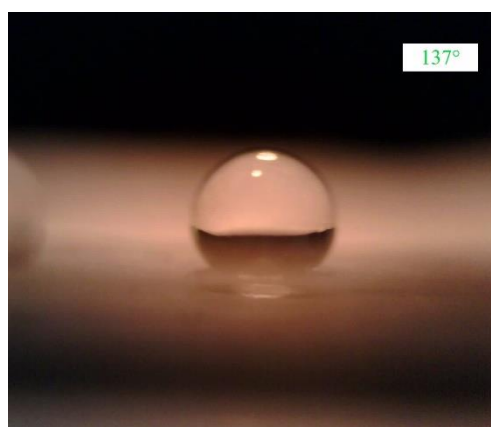
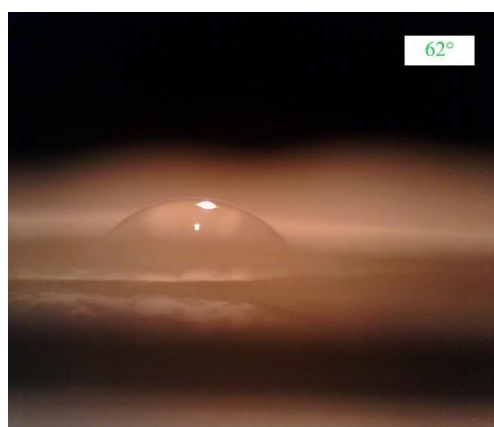
Graf 13 shrnuje situaci kontaktních úhlů pro lisované a nesisované vrstvy. U slisovaných vrstev vzorků PCL_5% μ HA, PCL_10% μ HA a PCL_15% μ HA docházelo k vysoké variabilitě hodnot kontaktních úhlů, avšak i s narůstající koncentrací μ HA se jednalo o hydrofobní povrchy, viz *obrázky 30–32*.



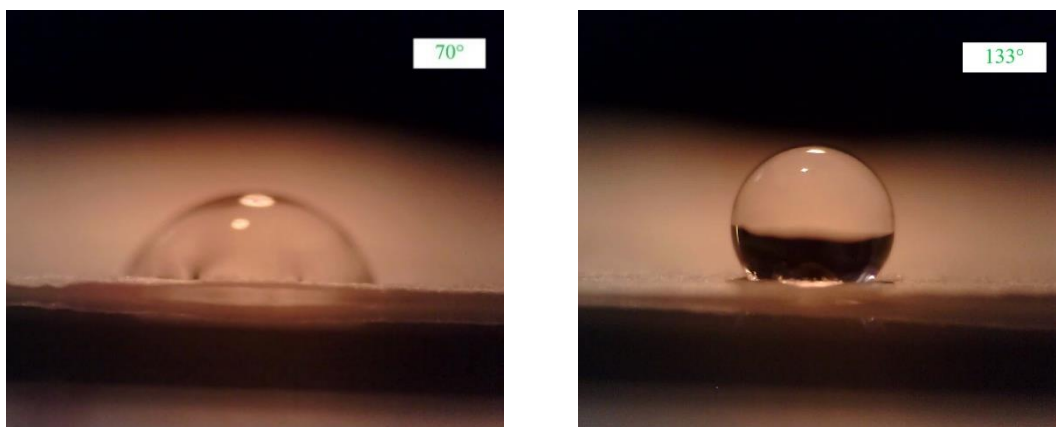
Graf 13: Porovnání kontaktních úhlů nelisovaných a lisovaných vrstev



Obrázek 30: Variabilita kontaktních úhlů lisovaného vzorku PCL_5%μHA



Obrázek 31: Variabilita kontaktních úhlů lisovaného vzorku PCL_10%μHA



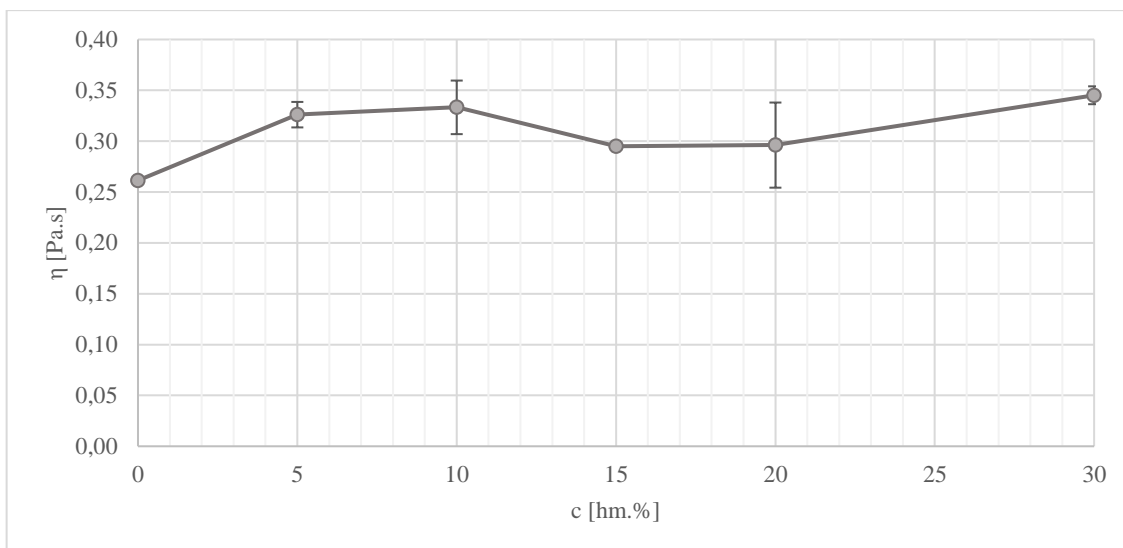
Obrázek 32: Variabilita kontaktních úhlů lisovaného vzorku PCL_15% μ HA

3.5. Příprava a charakterizace modifikovaných polymerních roztoků s nHA

Bylo připraveno pět kompozitních polymerních roztoků o hmotnostní koncentraci nanočástic hydroxyapatitu (nHA) ze sušiny polymeru 5; 10; 15; 20 a 30 %. Po přidání částic do polymerního roztoku byl využit sonikátor (Q500 Sonicator, QSONICA) pro dosažení homogenizace.

3.5.1. Dynamická viskozita

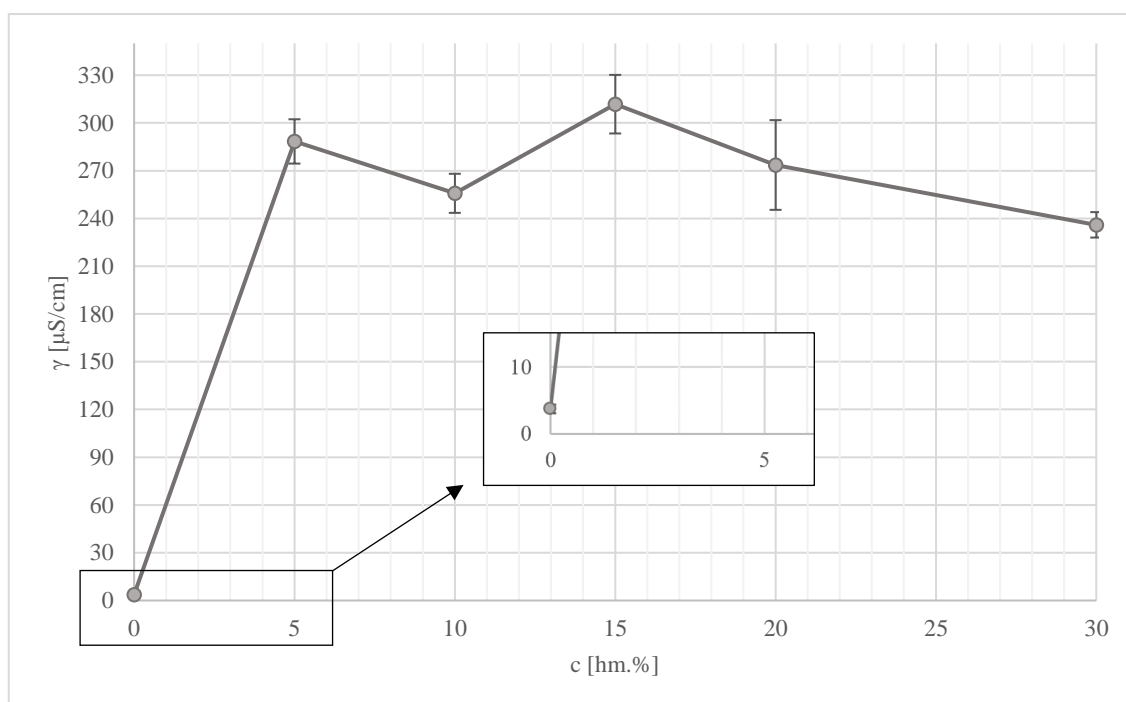
Měření dynamické viskozity (η) bylo prováděno na rotačním reometru (HAAKE RotoVisco 1, Thermo Scientific), pro měření bylo využito metody paralelních desek. Měření viskozity probíhalo při konstantních otáčkách 1500 otáček za sekundu po dobu 30 sekund. Bylo dávkováno 0,2 ml roztoku na statickou desku. Od každého roztoku byly provedeny tři měření. V *grafu 14* je možné vidět průměrné hodnoty viskozity pro jednotlivé roztoky kompozitních vzorků s nanočásticemi a 10%hm. roztok PCL. Na ose x je zobrazena koncentrace hydroxyapatitových částic ve hmotnostních procentech, osa y nese hodnotu dynamické viskozity v Pascalsekundách. Hodnota viskozity se přidáním 5 %hm. částic do polymerního roztoku zvýšila, další přídavky anorganických částic nevykazovaly exponenciální nárůst dynamické viskozity, ale hodnoty jsou konkrétně u 20%hm. a 30%hm. koncentraci částic nižší, avšak při zvážení směrodatných odchylek se nejedná o výrazný pokles.



Graf 14: Závislost dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci nanočástic hydroxyapatitu

3.5.2. Elektrická vodivost

Měření (měrné) elektrické vodivosti (γ) probíhalo za pomoci měřicí sondy (Eutech Instruments NOC 510, Chromservis). Na základě pěti změřených hodnot byl stanoven aritmetický průměr a směrodatná odchylka. V grafu 15 jsou výsledné hodnoty zobrazeny graficky, osa x představuje koncentraci nHA v hmotnostních procentech a na ose y se nachází měrná elektrická vodivost. Přidání hydroxyapatitových částic zapříčinilo zvýšení vodivosti, ale jednotlivé koncentrace přidaných částic již nevykazovaly směrodatné rozdíly této veličiny.



Graf 15: Závislost měrné elektrické vodivosti na hmotnostní koncentraci nHA

3.6. Zvlákňování polymerních roztoků s nHA a charakterizace vrstev

3.6.1. Výroba vláknenných vrstev

Kompozitní roztoky byly zvlákňovány střídavým zvlákňováním pomocí přeplavovací elektrody při teplotě 22,9 °C a relativní vlhkosti vzduchu 35 %. Zvlákňováno bylo na rotující válec se spunbond textilií. Efektivní napětí dosahovalo hodnoty 34,4 kV. Za těchto podmínek došlo ke zvláknění všech připravených roztoků. Vláknenná vlečka byla však slabá, místy trhaná, docházelo k jejímu přerušování. U vzorku PCL_15%nHA tento jev byl nejvýraznější. Výsledkem však byly v makroskopickém pojetí homogenní vláknenné vrstvy od všech kompozitních roztoků s nHA.

3.6.2. Analýza vláknenných vrstev

V *tabulce 10* jsou uvedeny označení vytvořených materiálů, na které je v textu odkazováno.

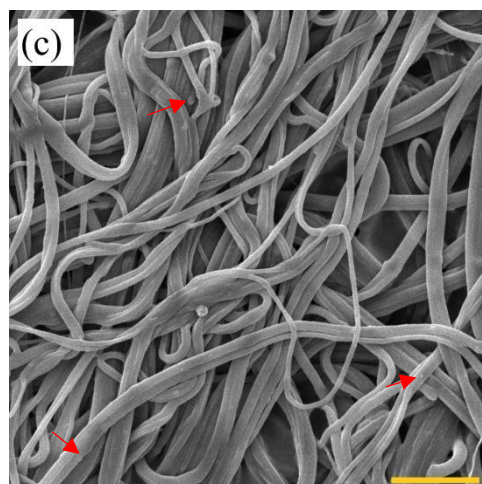
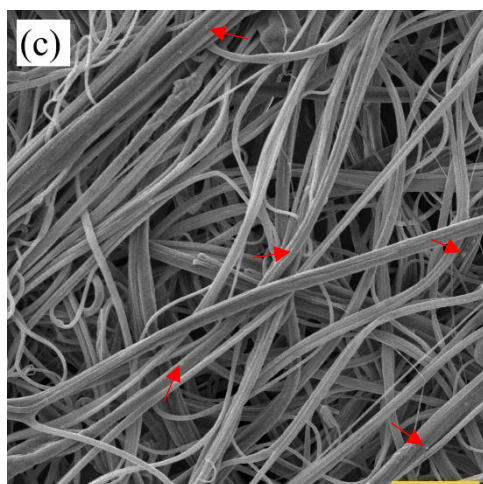
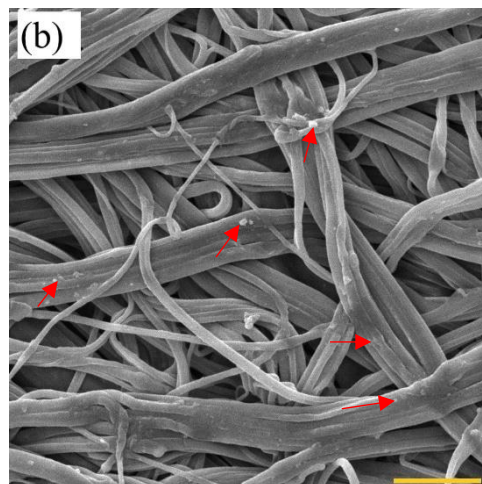
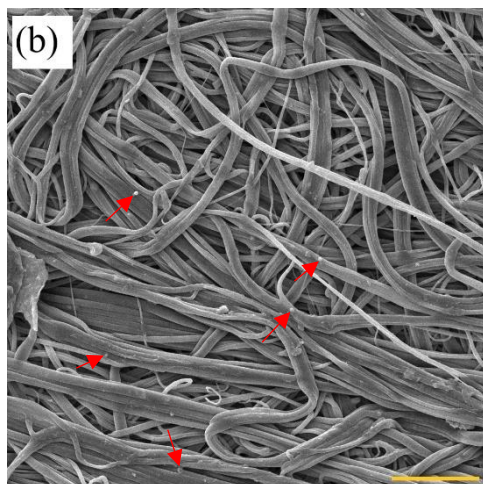
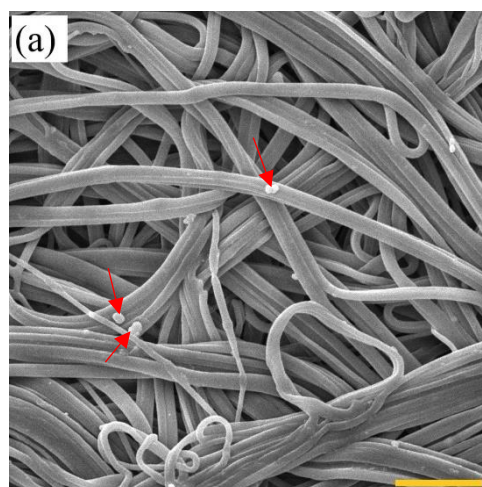
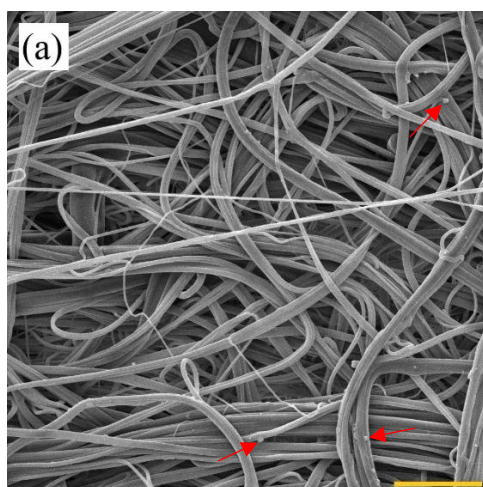
Tabulka 10: Označení materiálů o dané koncentraci nanočástic hydroxyapatitu

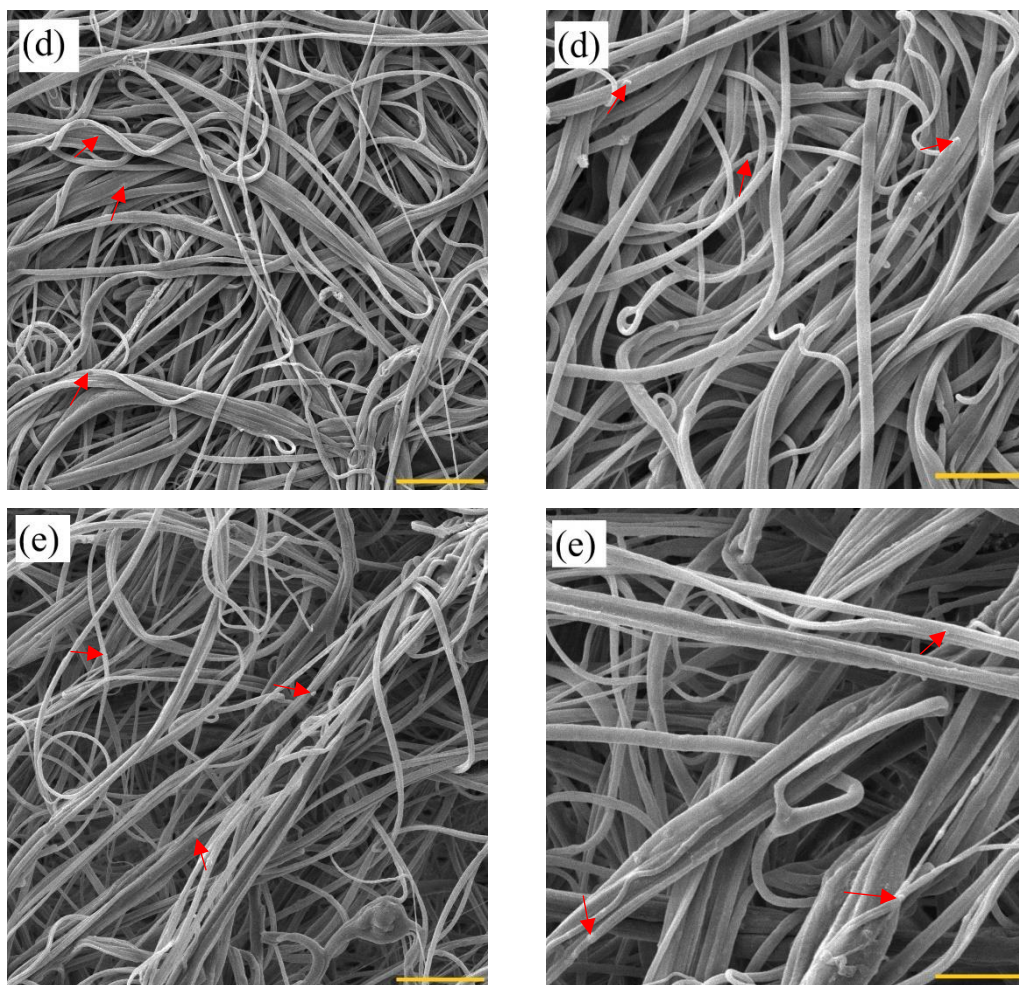
koncentrace nHA [% hm. ze sušiny polymeru]	označení materiálu
5	PCL_5%nHA
10	PCL_10%nHA
15	PCL_15%nHA
20	PCL_20%nHA
30	PCL_30%nHA

Prostřednictvím rastrovacího elektronového mikroskopu (TESCAN VEGA 3, SB Easy Probe) byly nasnímány jednotlivé vláknenné vrstvy vzorků. Vrstvy byly nejprve pozlaceny v naprašovačce (Quorum Q150R ES, Quorum Technologies) a následně vloženy do mikroskopu. Katoda, ze které se uvolňovaly elektrony byla vystavena napětí 10 kV. Na *obrázku 33* je možné vidět strukturu vrstev jednotlivých vzorků. Šípkami jsou označena některá místa, kde se nanočástice nacházely.

zvětšení 2500x; měřítko 20 μm

zvětšení 5000x; měřítko 10 μm

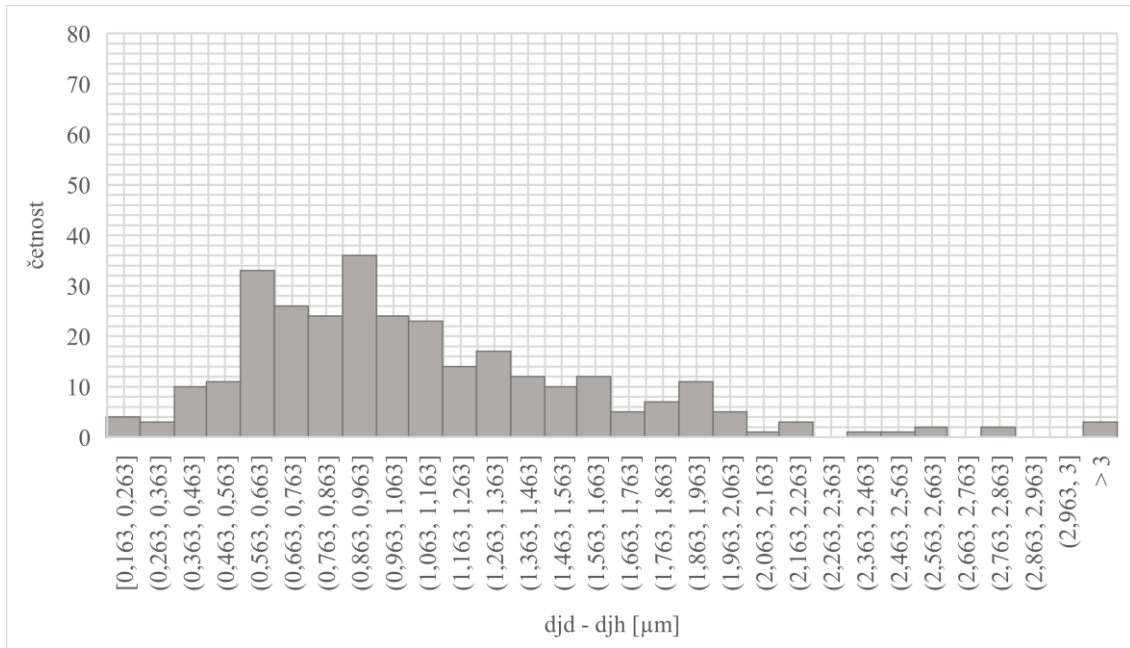




Obrázek 33: SEM snímky vzorků PCL_5%*n*HA (a), PCL_10%*n*HA (b), PCL_15%*n*HA (c), PCL_20%*n*HA (d), PCL_30%*n*HA (e)

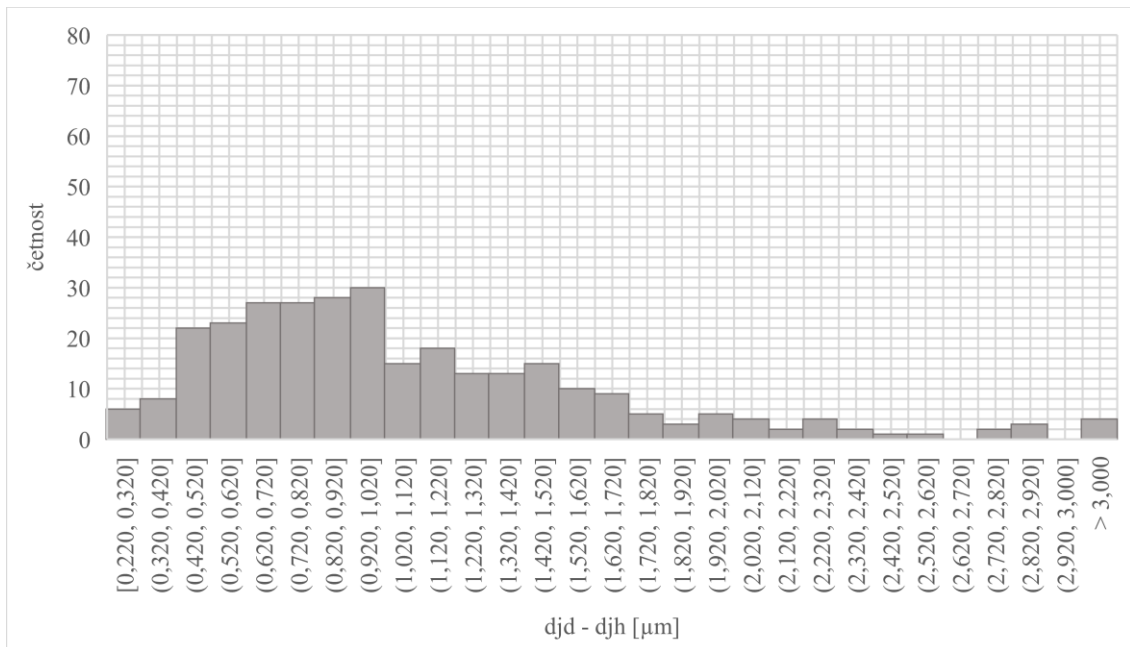
Na základě pořízených snímků z elektronového mikroskopu byly měřeny průměry vláken daných vrstev pomocí softwaru ImageJ (NIH, Bethesda). Bylo měřeno 300 hodnot z každé vrstvy. Výsledky jsou zobrazeny prostřednictvím histogramů a ve tvaru průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Graf 16 představuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vláknenné vrstvě vzorku PCL_5%nHA.



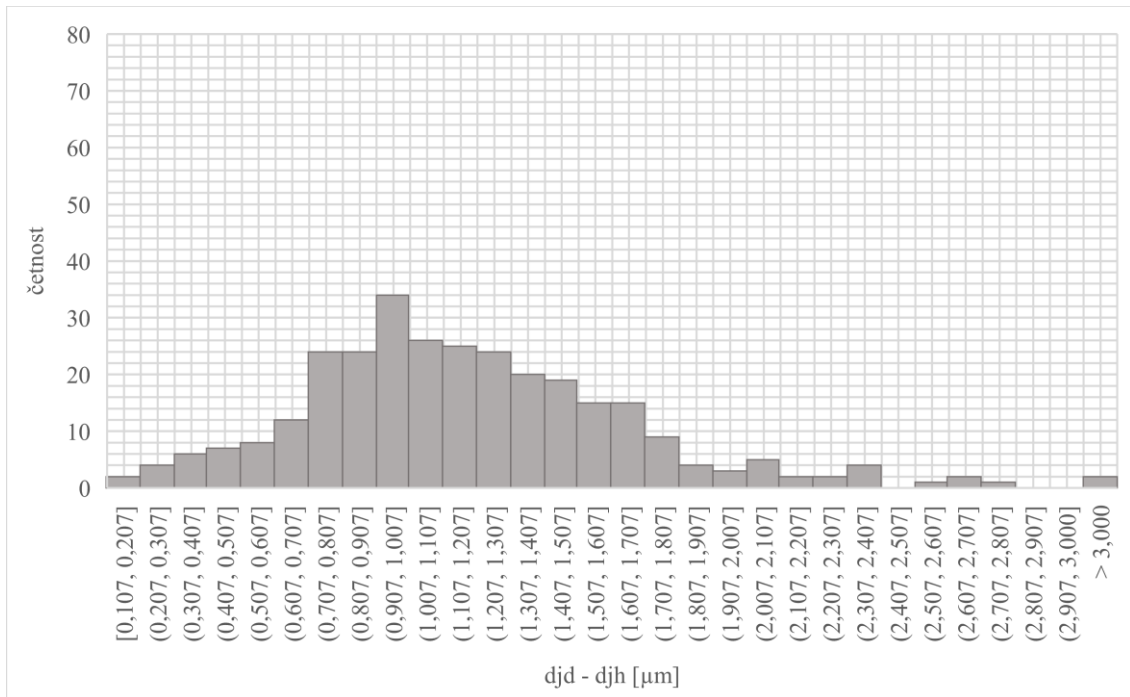
Graf 16: Histogram distribuce průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_5%nHA

Graf 17 představuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vláknenné vrstvě vzorku PCL_10%nHA.



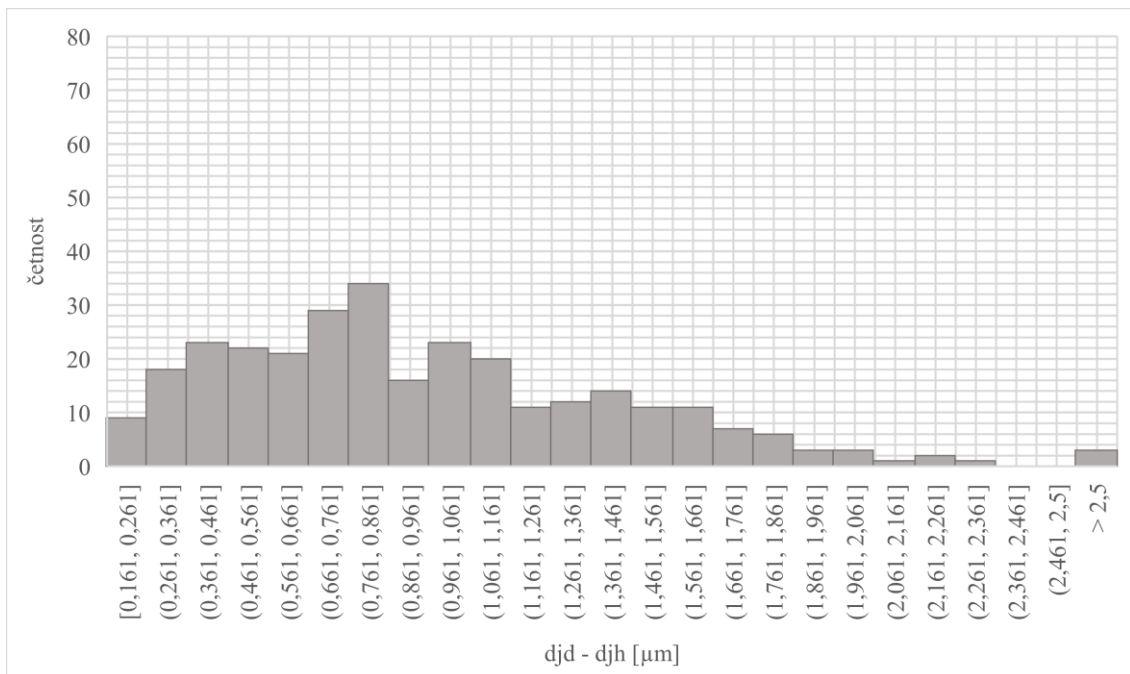
Graf 17: Histogram distribuce průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_10%nHA

Graf 18 představuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vláknenné vrstvě vzorku PCL_15%nHA.



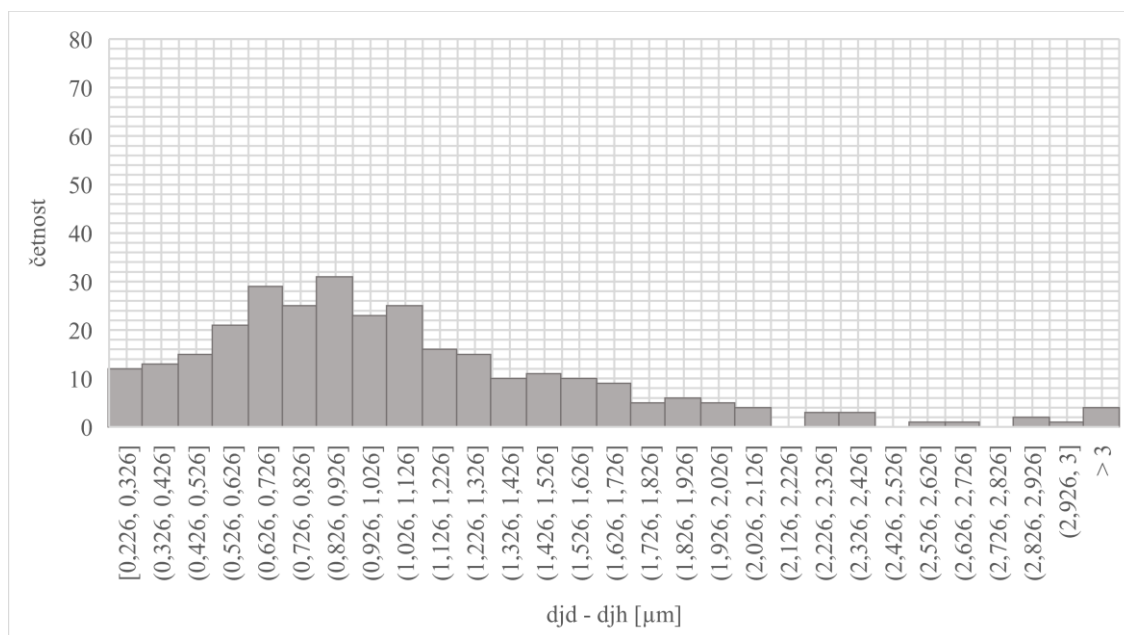
Graf 18: Histogram distribuce průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_15%nHA

Graf 19 představuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vláknenné vrstvě vzorku PCL_20%nHA.



Graf 19: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_20%nHA

Graf 20 představuje početní zastoupení průměrů vláken v jednotlivých třídách ve vláknenné vrstvě vzorku PCL_30%nHA.



Graf 20: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_30%nHA

V tabulce 11 se nachází zobrazení průměrů vláken daných vzorků se směrodatnou odchylkou. V porovnání s průměry materiálů s mikročásticemi byla vytvořena vlákna o menších průměrech, což značí vliv velikosti částic na velikost průměrů vláken. Avšak napříč materiály s nanočásticemi nebyly v rámci průměrných hodnot velké rozdíly. Jednalo se o nanovlákna a vlákna submikronových rozměrů.

Tabulka 11: Průměry a směrodatné odchylky kompozitních vláknenných vrstev s nHA

materiál	průměr \pm SD [μm]
PCL_5%nHA	1,101 \pm 0,541
PCL_10%nHA	1,102 \pm 0,631
PCL_15%nHA	1,182 \pm 0,492
PCL_20%nHA	0,951 \pm 0,504
PCL_30%nHA	1,075 \pm 0,601

Kontaktní úhly byly měřeny pomocí zařízení See System E (Advex Instruments). Depozice kapky byla prováděna ručně pomocí mikropipety, kdy bylo dávkováno 8 μl destilované vody. Pomocí kamery byla kapka na povrchu vzorku vyfocena, 16 kapek na každém vzorku. Následně bylo z fotek pomocí označení tří bodů, a to vrcholu kapky a míst styku kapky s povrchem, vytvořen model kapky a vypočítán kontaktní úhel.

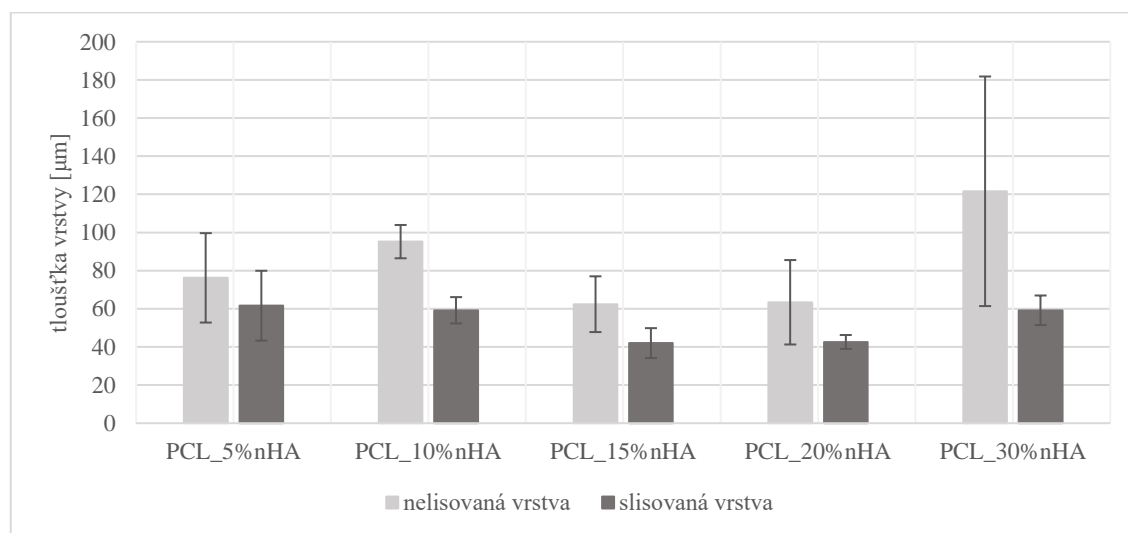
Z výsledných hodnot byla na základě Kwok-Neumannova modelu vypočítána rovněž povrchová energie.

V tabulce 12 jsou zobrazeny kontaktní úhly a povrchové energie jednotlivých vrstev. I v tomto případě kontaktní úhel s narůstající koncentrací nanočástic hydroxyapatitu ve vzorku neklesal, respektive vrstva byla hydrofobní a nebyly zaznamenány odlišnosti mezi těmito vzorky, kdy kapky po depozici na vrstvě setrvaly a nebyl znatelný rozdíl mezi materiály v rámci tohoto chování. Z toho důvodu byly vzorky slisovány jako u vrstev s mikročásticemi pro zjištění vlivu struktury povrchu na naměřené hodnoty.

Tabulka 12: Kontaktní úhly a povrchová energie vrstev vyrobených materiálů

materiál	kontaktní úhel \pm SD [°]	povrchová energie [mJ/m ²]
PCL_5%nHA	123 \pm 10	11
PCL_10%nHA	116 \pm 12	14
PCL_15%nHA	123 \pm 8	11
PCL_20%nHA	119 \pm 7	13
PCL_30%nHA	118 \pm 6	13

Pomocí lisu (HVL 15.2, Pracovní stroje Teplice spol. s.r.o.) při síle 70 kN po dobu tři sekund a pokojové teplotě došlo ke slisování vzorků a opětovnému změření kontaktních úhlů. Pro dokumentaci byla změřena tloušťka vrstev za využití digitálního tloušťkoměru s plochými měřicími keramickými plochami o přesnosti \pm 5 μ m (INSIZE, INSIZE Czech s.r.o.). Celkem bylo proměřeno 5 míst na vláknenné vrstvě a dále vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka, výsledky jsou graficky zobrazeny v grafu 21.

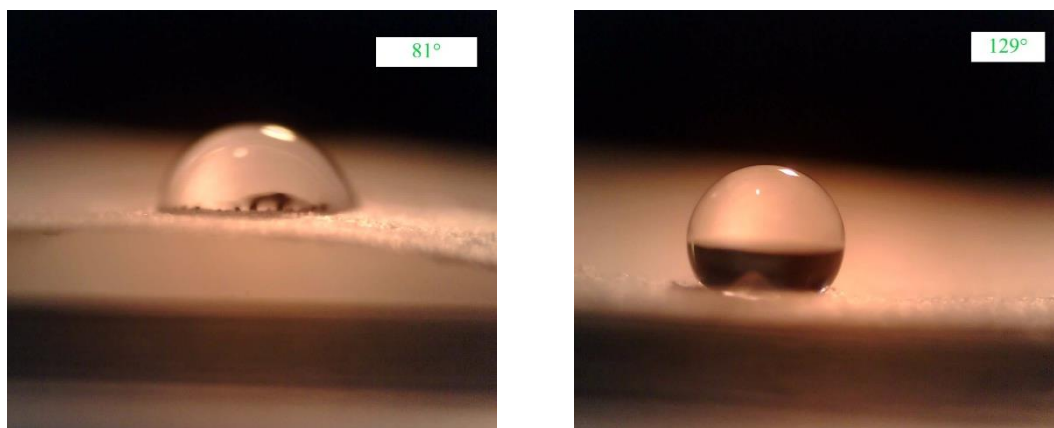


Graf 21: Tloušťky slisovaných a nelsisovaných vrstev jednotlivých vzorků vláknenných vrstev

V *tabulce 13* jsou zobrazeny hodnoty kontaktních úhlů a povrchových energií slisovaných vrstev. Změnou struktury povrchu po slisování došlo ke změně hodnot smáčecích úhlů, avšak i přesto se jednalo o hydrofobní povrchy. U vzorku PCL_10%nHA docházelo místy k dobrému smáčení, viz *obrázek 34*.

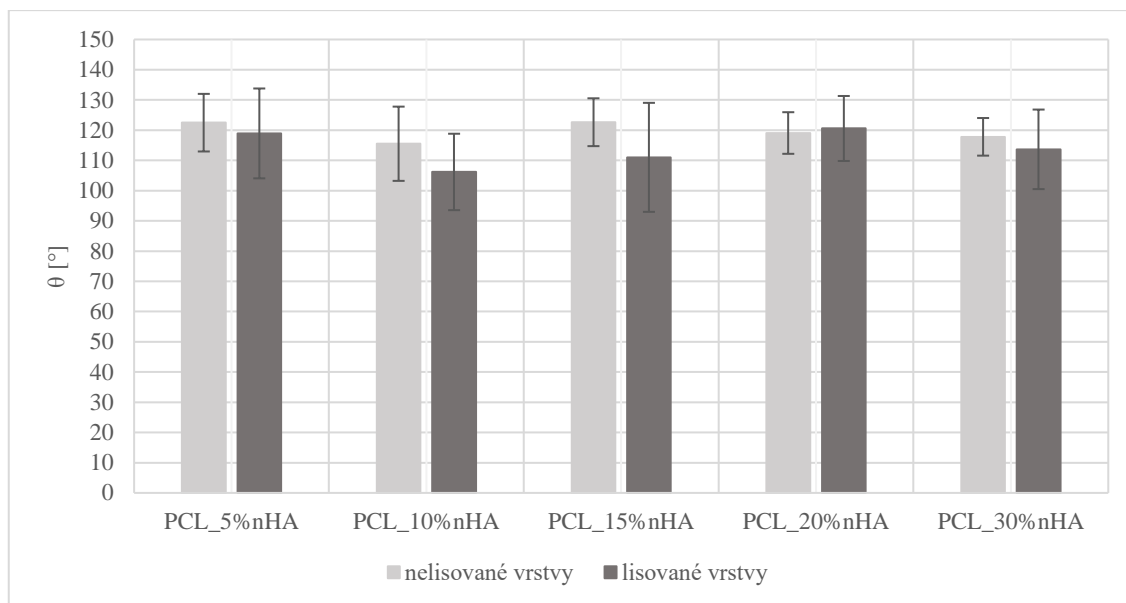
Tabulka 13: Kontaktní úhly a povrchové energie slisovaných vrstev s nHA

materiál	kontaktní úhel \pm SD [°]	povrchová energie [mJ/m ²]
PCL_5%nHA	119 \pm 15	13
PCL_10%nHA	106 \pm 13	19
PCL_15%nHA	111 \pm 18	17
PCL_20%nHA	121 \pm 11	12
PCL_30%nHA	114 \pm 13	15



Obrázek 34: Variabilita kontaktních úhlů na lisovaném vzorku PCL_10%nHA

Graf 22 zobrazuje hodnoty kontaktních úhlů nelisovaných a lisovaných vrstev vzorků s nanočásticemi hydroxyapatitu. Velikost úhlů lisovaných a nelisovaných vrstev se vzhledem ke směrodatným odchylkám neodlišují, což naznačuje, že struktura povrchu není stěžejním faktorem povrchového chování vzhledem k jeho smáčivosti a vliv bude mít především chemické složení povrchu.



Graf 22: Kontaktní úhly nelisovaných a slisovaných vrstev s nanočásticemi hydroxyapatitu

3.7. Biologické testování *in vitro*

Pro biologické testování cytotoxicity, proliferace a buněčné adheze byly vybrány zvlákněné vzorky PCL_10%, PCL_5% μ HA, PCL_15% μ HA, PCL_30% μ HA, PCL_5%nHA, PCL_15%nHA a PCL_30%nHA. Z důvodu omezené kapacity pro testování materiálů byly vybrány pouze tyto materiály. Vzorek bez modifikace hydroxyapatitem byl vybrán pro možné porovnání, zda hydroxyapatit měl vliv na proliferaci. Dále bylo také zkoumáno, zda velikost částic a jejich koncentrace ovlivnila chování buněčné linie lidských osteoblastů z osteosarkomu MG-63.

3.7.1. Cytotoxicita extraktů vybraných materiálů

Testování probíhalo na základě normy ČSN EN ISO 10993-5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*.

Příprava pro testování zahrnovala sterilizaci vzorků o hmotnosti 100 mg uložených ve zkumavkách typu Falcon. Připravené vzorky byly sterilizovány pomocí ethylenoxidu ve sterilizátoru (Aprolene, Andersen Products Inc.) a následně odvětrány po dobu dvou týdnů.

Buněčná linie MG-63 lidských osteoblastů byla kultivována v inkubátoru (Sartorius) při 37 °C a 5% obsahu CO₂ v kompletním médiu sestávajícího z minimálního esenciálního média dle Eagla (MEM, Capricorn Scientific), další složky představovaly 1%obj. pyruvát sodný (Capricorn Scientific), 1%obj. antibiotika (penicilin, streptomycin, amphotericin B, Capricorn Scientific) a 10%obj. fetální bovinní sérum (FBS, Biosera).

Při dosažení konfluence (porostlosti plochy plastiku) 70–80 % docházelo k pasážování buněk neboli jejich naředění pro umožnění jejich růstu. Pasážování spočívalo v odsátí stávajícího média, opláchnutí buněk fosfátovým pufrům (PBS, Capricorn Scientific). Následovalo uvolnění adherovaných buněk od kultivačního povrchu za využití trávicího enzymu štěpícího peptidové vazby, trypsinu (Biosera). Po jeho aplikaci byla kultivační láhev umístěna do inkubátoru po dobu dvou minut. Po následné kontrole pod optickým mikroskopem byla patrná změna tvaru buněk z rozvětveného multipolárního tvaru na kulovitý. Po resuspendaci následovalo odebrání buněčné suspenze do zkumavky typu Falcon.

Dalším krokem bylo stanovení počtu živých buněk v rámci buněčné suspenze pomocí automatického počítáče buněk Luna (Logos Biosystems). Nejprve bylo odebráno 10 μ l buněčné suspenze do mikrozkušavky Eppendorf, ke které bylo přidáno 10 μ l trypanové modři. Směs byla promíchána a následně napipetována do destičky pro automatický počítáč buněk. V příslušné směsi bylo zjištěno $6,9 \cdot 10^5$ buněk/ml. Do jamkové kultivační destičky byla následně napipetována buněčná suspenze v koncentraci 10^4 buněk/jamku, došlo tedy k naředění buněčné suspenze kompletním médiem a aplikování buněčné suspenze do jamek kultivační desky. Byla využita pasáž číslo 16.

Pro testování cytotoxicity byly připravovány výluhy z jednotlivých materiálů, kdy ke sterilizovaným vzorkům (100 mg) bylo přidáno 10 ml kompletního média a po dobu 24 hodin byly louhovány v třepačce (N-Biotek) při 37 °C a 60 otáčkách/minutu. Současně bylo do zkumavky odebráno kompletní médium, které bylo ponecháno v tentýž podmínkách pro následující práci s kontrolami.

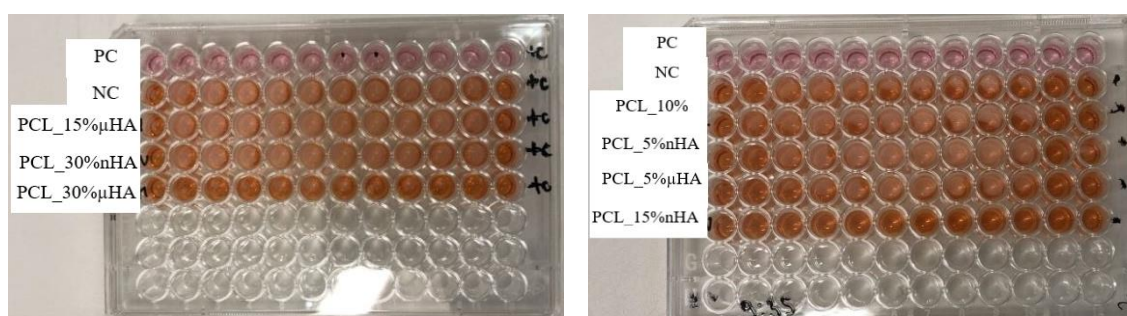
Po 24 hodinách bylo v 96 jamkové destičce odsáto médium, namísto kterého bylo napipetováno 100 μ l připravených extraktů z jednotlivých vyrobených vzorků. Rovněž byla vytvořena negativní kontrola (NC), kam bylo po odsátí stávajícího média přidáno nové kompletní médium MEM.

Dále byla součástí testu cytotoxicity pozitivní kontrola (PC), kdy po odsátí média byl do jednotlivých jamek přidán 0,1%obj. roztok Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) v MEM. Triton X-100, jakožto povrchově aktivní látka zapříčiňuje buněčnou smrt poškozením cytoplazmatické membrány. Následovala kultivace po dobu 24 hodin.

Po uplynutí inkubační doby bylo odsáto z jednotlivých jamek médium i s příslušnými kompartmenty a bylo pipetováno 100 μ l 10%obj. roztoku CCK-8 v kompletním médiu

MEM do každé jamky. Přidaný roztok obsahoval monotetrazoliovou sůl WST-8, která byla redukována buněčnými dehydrogenázami na formazan oranžové barvy. Po 3 hodinách inkubace při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO₂ v atmosféře inkubátoru byla pomocí spektrofotometru (Spark, TECAN) a příslušného softwaru SparkControl (TECAN) vyhodnocena absorbance WST-8 při referenční vlnové délce 450 nm.

Na *obrázku 35* je možné vidět jamkové destičky, kdy v řádcích, kde byly buňky přítomné došlo k viditelné změně barvy z růžového aplikovaného 10%obj. roztoku CCK-8 v MEM na oranžový formazan. Je patrné, že v rámci řádků pro pozitivní kontrolu (PC) barva roztoku CCK-8 barvu z původní růžové na oranžovou nezměnila. Znamená to, že nedošlo k redukci tetrazoliové soli z důvodu nepřítomnosti buněk v těchto jamkách vlivem jejich usmrcení pomocí surfaktantu. Hodnocení vychází z Lambert-Beerova zákona, který udává přímou úměru mezi absorbancí a koncentrací látky (v tomto případě oranžového formazanu). Koncentrace formazanu se tak váže k metabolické aktivitě buněk.

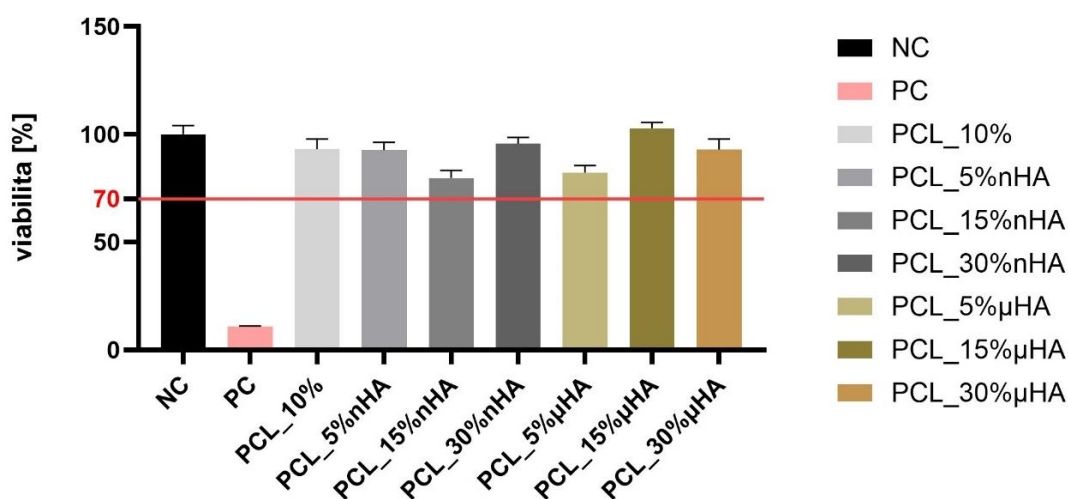


Obrázek 35: Kultivační destičky po inkubaci 10% roztoku CCK-8 v MEM

Negativní kontrola v rámci měření sloužila jako prostředí, kde na buňky nepůsobily žádné destruktivní faktory. Naproti tomu pozitivní kontrola zastávala funkci případu, kdy docházelo k usmrcení buněk. Pro negativní, pozitivní kontrolu a rovněž výluhy materiálů bylo testování provedeno dvanáctkrát. Prostřednictvím optického mikroskopu bylo rovněž kontrolováno, zda se buňky v přítomných jamkách nacházejí, tedy zda experiment probíhá s ohledem ke kontrolám dle požadavků. V rámci vyhodnocování byla životaschopnost kultivovaných buněk udávána v procentech a vyjadřovala, kolika procentů životaschopnost buněk byla po kultivaci v extraktu, přičemž za 100% viabilitu byla považována negativní kontrola (tedy kompletní MEM s buňkami).

Hodnoty životaschopnosti buněk pohybující se nad 70 % představují dobrý výsledek vypovídající o netoxicitě připravených výluhů pro nasazené buňky podle použité normy ISO 10993-5.

V grafu 23 jsou zobrazeny výsledky tohoto testování pro zvolené vzorky, pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrolu. Pro každý vzorek bylo provedeno dvanáct opakování. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Výstupy ukázaly, že u všech zkoumaných materiálů byla překonána hranice 70 %, která zaručuje netoxičnost uvolňovaných substancí z materiálu pro buněčnou linii lidských osteoblastů MG-63. Což je velmi důležité, jelikož pro výrobu těchto vlákenných vrstev byla využita toxická rozpouštědla a případná rezidua by mohla mít právě cytotoxické vlastnosti. V grafu jsou rovněž zobrazeny hodnoty NC, jakožto 100% viability a PC, kde byly buňky porušeny prostřednictvím surfaktantu, tudíž hodnota viability se pohybuje v rámci nižších desítek procent.



Graf 23: Zobrazení viability buněčné linie lidských osteoblastů MG-63 po inkubaci v extraktech příslušných materiálů; NC (negativní kontrola), PC (pozitivní kontrola)

3.7.2. Buněčná adheze a proliferace

Příprava materiálů pro test adheze a proliferace zahrnovala vyražení vlákenných vrstev do tvaru jamek 24 jamkové kultivační destičky, které byly dále zatíženy pomocí skleněných kroužků. Následovala sterilizace ethylenoxidem ve sterilizátoru (Aprolene, Andersen Products Inc.) a odvětrávání.

Od každého vzorku bylo připraveno 5 preparátů. Tři byly využity pro hodnocení metabolické aktivity pomocí CCK-8, dalšími metodami hodnocení byly fluorescenční a skenovací elektronová mikroskopie, kdy bylo využito po jednom vzorku pro každou formu mikroskopie. Výsledky byly sledovány první, sedmý a čtrnáctý den po nasazení buněk na materiály. Konkrétně se jednalo o koncentraci 10^4 buněk/jamku.

I v tomto případě bylo pracováno s buněčnou linií MG-63. Kultivace buněk probíhala v kompletním médiu MEM obsahující 10%obj. FBS, 1%obj. pyruvát sodný a 1%obj. antibiotika (jako v kapitole 3.7.1.). Adherované buňky na dně kultivační láhve byly podrobeny trypsinizaci a resuspendaci, kdy trypsin umožnil uvolnění adherovaných buněk a následným přidáním kompletního MEM byla vytvořena buněčná suspenze. Z té byl následně stanoven počet buněk v 1 ml buněčné suspenze pomocí automatického počítáče (bylo popsáno v kapitole 3.7.1.). Výsledek představoval $1,165 \cdot 10^6$ buněk/ml. V rámci tohoto experimentu se pracovalo s pasáží číslo 18.

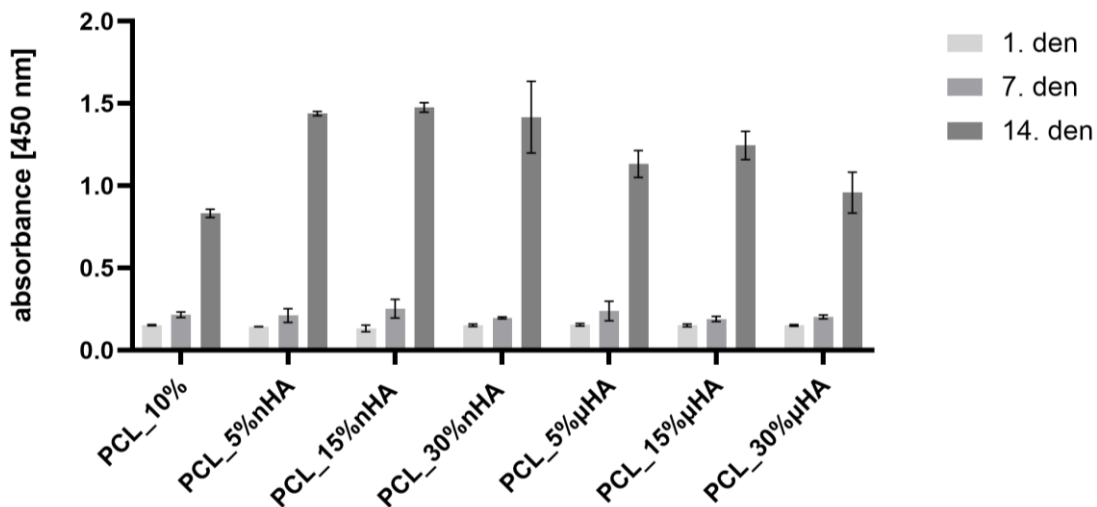
Na připravené vzorky ve 24 jamkové destičce byly nasazeny osteoblasty o koncentraci 10^4 buněk/jamku, kdy k materiálům bylo pipetováno 1 ml buněčné suspenze. Rovněž byly připraveny kontroly. Jednalo se o kontrolu obsahující příslušný materiál s médiem, dále byla do prázdných jamek s kroužky nasazena pouze buněčná suspenze, což bylo označováno za buněčnou kontrolu, která sloužila pro vizuální kontrolu optickým mikroskopem během provádění experimentu. Následovala kultivace v inkubátoru po dobu 24 hodin.

Pro testování *metabolické aktivity* bylo využito CCK-8 využívajícího WST-8 tetrazoliové soli, která je redukována dehydrogenázami na oranžový formazan.

Nejprve došlo k odsátí média od materiálů a kontrol. Následovala aplikace 1 ml 10%obj. CCK-8 v MEM. Po tříhodinové inkubaci při 37 °C a 5% obsahu CO₂ byl redukovaný formazan od příslušných materiálů a kontrol o objemu 100 µl pipetován do 96 jamkové destičky. Pomocí spektrofotometru byla následně změřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Graf 24 zobrazuje metabolickou aktivitu buněk po 1.; 7. a 14. dnu od nasazení na příslušných materiálech. Na ose y se nachází bezrozměrná veličina absorbance, která je přímo úměrná koncentraci oranžového formazanu dle Lambert-Beerova zákona. Po prvním dnu byla patrná nízká metabolická aktivita, která byla dána poměrně brzkou dobou testování od nasazení buněk na materiály, jelikož MG-63 mají dobu dělení delší jak 24 hodin, tudíž je pochopitelné, že se jedná o takto nízké hodnoty absorbance, které se pohybují okolo stejných hodnot u všech vzorků. Po dvou týdnech kultivace buněk na materiálech bylo patrné, že došlo k proliferaci osteoblastů v rámci všech vzorků. Je možné pozorovat, že materiály modifikované s hydroxyapatitovými částicemi disponovaly vyšší absorbcí v porovnání s PCL_10%. Rovněž je patrný rozdíl mezi

materiály s μ HA a nHA, u kterých je míra metabolické aktivity po dvoutýdenní kultivaci vyšší.



Graf 24: Metabolická aktivita MG-63 nasazených na materiály 1.;7. a 14. den

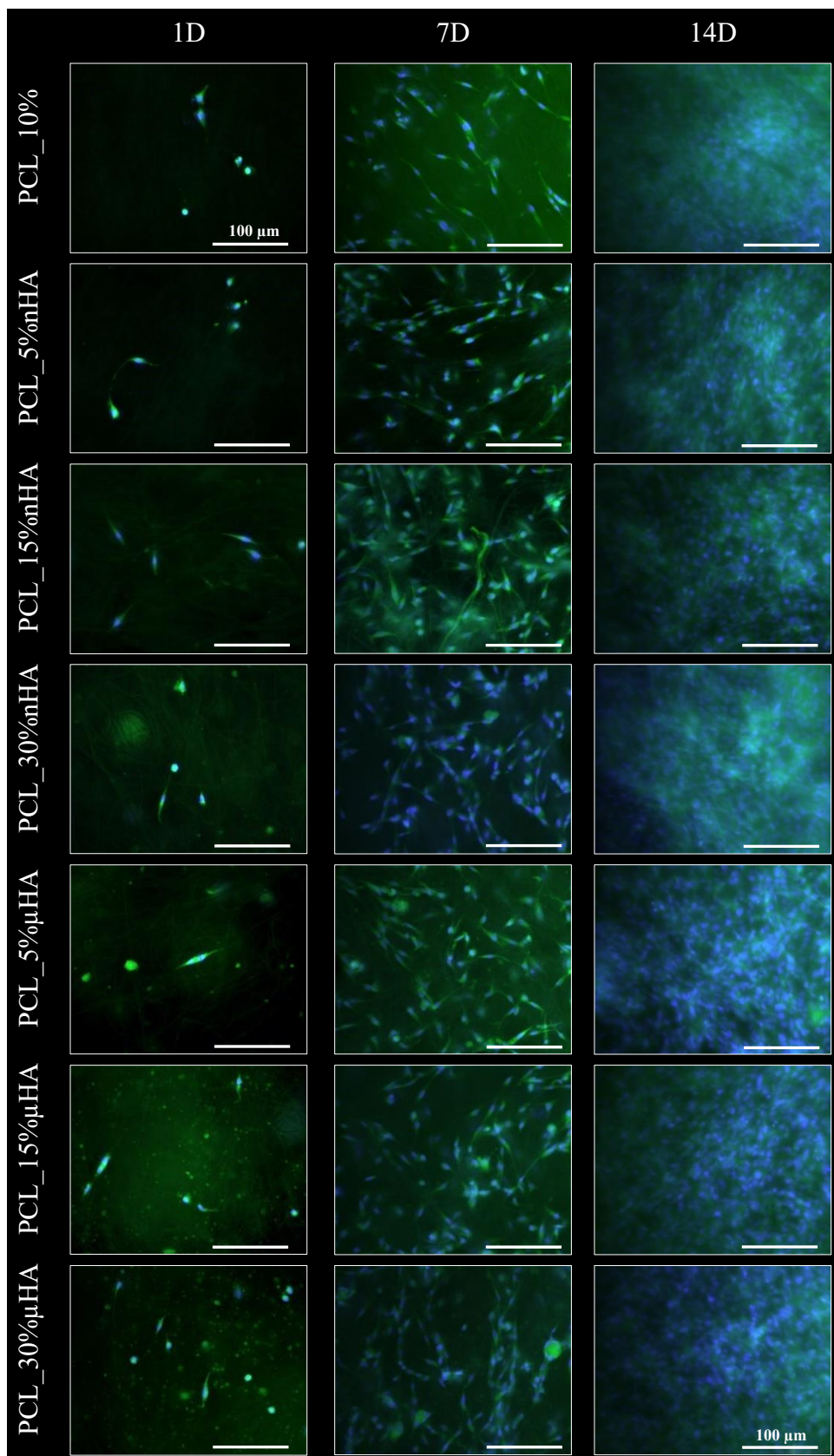
K hodnocení proliferace bylo využito také fluorescenční a elektronové skenovací mikroskopie (SEM).

V rámci přípravy vzorků pro *fluorescenční mikroskopii* byly nasazené buňky na materiálech, respektive buněčná jádra a aktinová filamenta cytoskeletu barvena fluorescenčními barvivy. Buněčná jádra byla barvena modře pomocí roztoku barviva 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI, Sigma Aldrich) naředěného 1:1000 v PBS a aktinová vlákna zeleně pomocí barviva phalloidin-fluorescein-5-isothiokyanát (FITC, Sigma Aldrich) naředěného 1:1000 v permeabilizačním roztoku. Permeabilizační roztok obsahoval 0,1%obj. roztok Tritonu-X-100 a 0,01 g bovinního sérového albuminu (BSA, VWR Chemicals) v PBS.

Nejprve byly vzorky (1 od každého materiálu) propláchnuty pomocí PBS. Následně byly materiály přesunuty do nové 24 jamkové kultivační desky, kde byly buňky na materiálech fixovány po dobu 15 minut při 5 °C pomocí 2,5%obj. glutaraldehydu (Sigma Aldrich). Po uplynulé době byly materiály propláchnuty PBS a došlo k permeabilizaci buněčné membrány, což má za následek zvýšení průniku následně aplikovaných barviv skrz cytoplazmatickou membránu směrem do intracelulárního prostoru pomocí permeabilizačního roztoku, který byl inkubován po dobu 5 minut. Vzorky byly dále propláchnuty PBS. Posléze byl aplikován barvicí roztok phalloidin-FITC, který působil po dobu 5 minut bez přístupu světla. Barvivo bylo poté odsáto, materiály propláchnuty

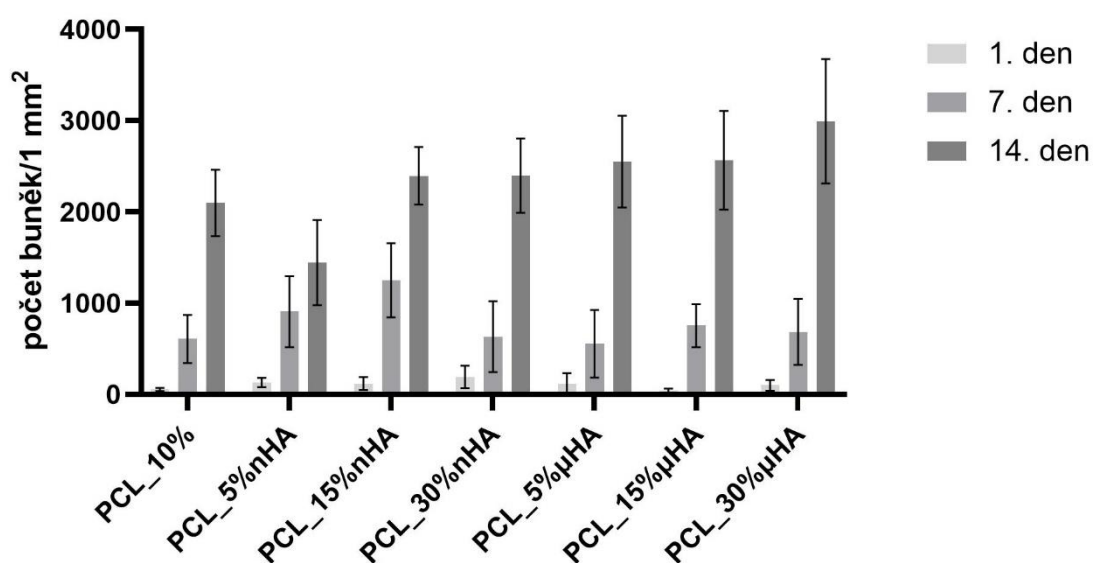
PBS, který byl opět odsán. Dále byl přidán roztok DAPI, následovala inkubace ve tmě 5 minut. Po uplynutí doby působení byl roztok odsát, nakonec byl proveden proplach PBS a na závěr bylo k takto připraveným vzorkům napipetováno do jamek PBS a destička byla zabalena do alobalu.

Následně bylo přistoupeno ke snímání pomocí fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse-Ti-E, Nikon Imaging) za využití softwaru NIS-Elements. Na *obrázku 36* se nachází zobrazení stavu během 1.; 7. a 14. testovacího dne od nasazení buněk na materiály, kdy modře jsou zobrazena buněčná jádra a zeleně mikrofilamenta cytoskeletu buněk. Je patrné, že první testovací den byl povrch materiálů nevýrazně osídlen. Sedmý testovací den už bylo značné, že došlo k proliferaci buněk na všech materiálech. Po dvou týdnech se na površích materiálů formovala téměř plně konfluentní vrstva buněk.



Obrázek 36: Snímky z fluorescenčního mikroskopu o zvětšení 20x. Modře barvená buněčná jádra (DAPI), zeleně barvená aktinová vlákna cytoskeletu (phalloidin-FITC); měřítko 100 μm

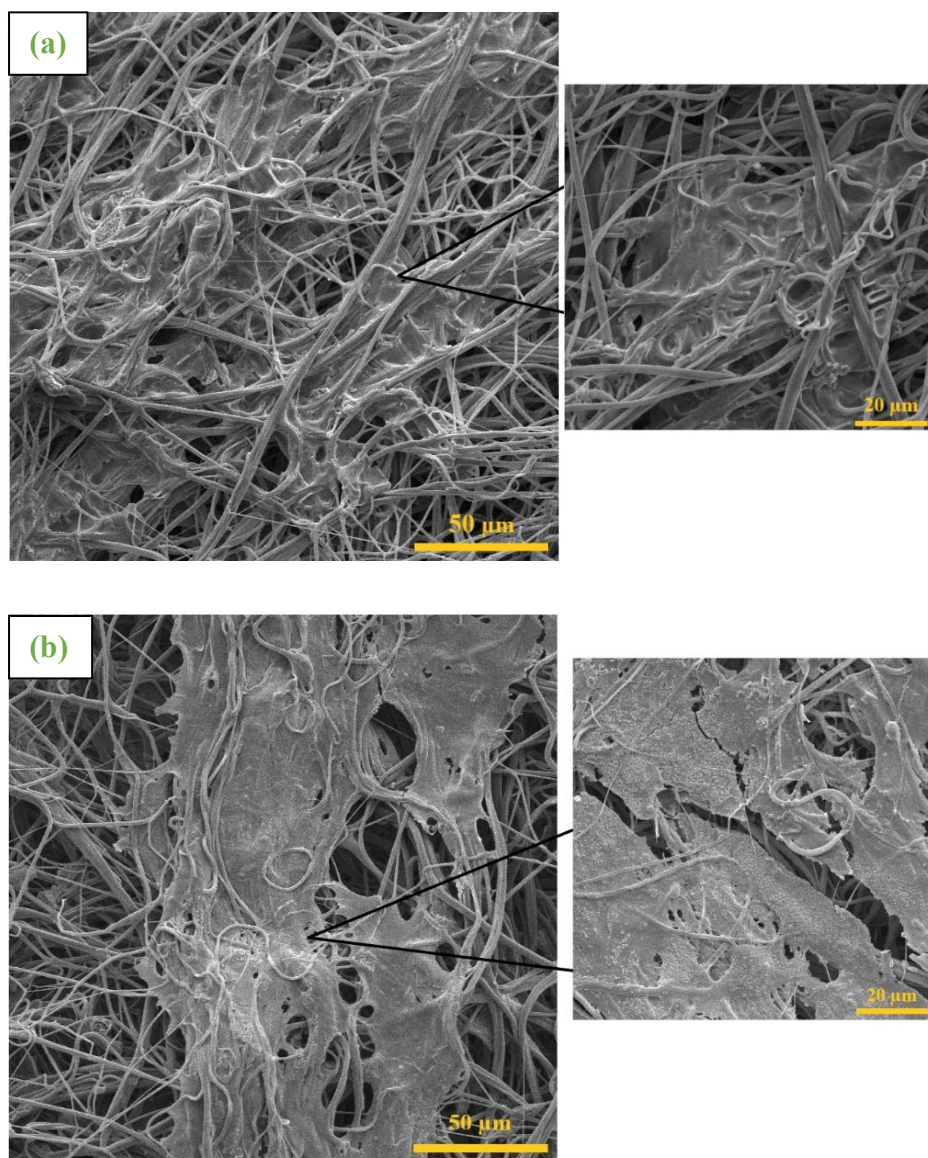
Pro dokumentaci počtu buněk na ploše 1 mm^2 materiálu v jednotlivých testovacích dnech byly využity snímky z fluorescenčního mikroskopu, konkrétně 10 snímků od každého materiálu při zvětšení 10x při použití filtru pro barvivo DAPI, které se navázalo na nukleovou kyselinu v jádře. Vyhodnocení probíhalo prostřednictvím softwaru MATLAB (MathWorks). Výsledky jsou zobrazeny prostřednictvím *grafu 25*. Počet jader se s dobou kultivace zvyšoval na všech materiálech. Je patrná neshoda s výsledky metabolické aktivity prezentovaných v *grafu 24*, kde byla vyšší metabolická aktivita v rámci dvoutýdenní kultivace zaznamenána u materiálů s nanočásticemi. Zde je počet buněk na ploše materiálu po dvoutýdenní kultivaci srovnatelný s materiály s mikročásticemi. Navíc vzorek PCL_5%nHA vykazuje v tento testovací den nižším počtem buněk na příslušné ploše. To může být způsobeno vybráním 10 náhodných míst na materiálu, které byly použity pro výpočet buněčných jader. Výsledky z metabolické aktivity v průběhu dvoutýdenní kultivace buněk na materiálech zohledňují celkovou buněčnou aktivitu, kdy došlo k redukci WST-8 dehydrogenázami buněk a odběru formazanu. Avšak je možné pozorovat, že v rámci 7. testovacího dne byl značný rozdíl mezi počtem buněk na materiálech s nano- a mikročásticemi HA.



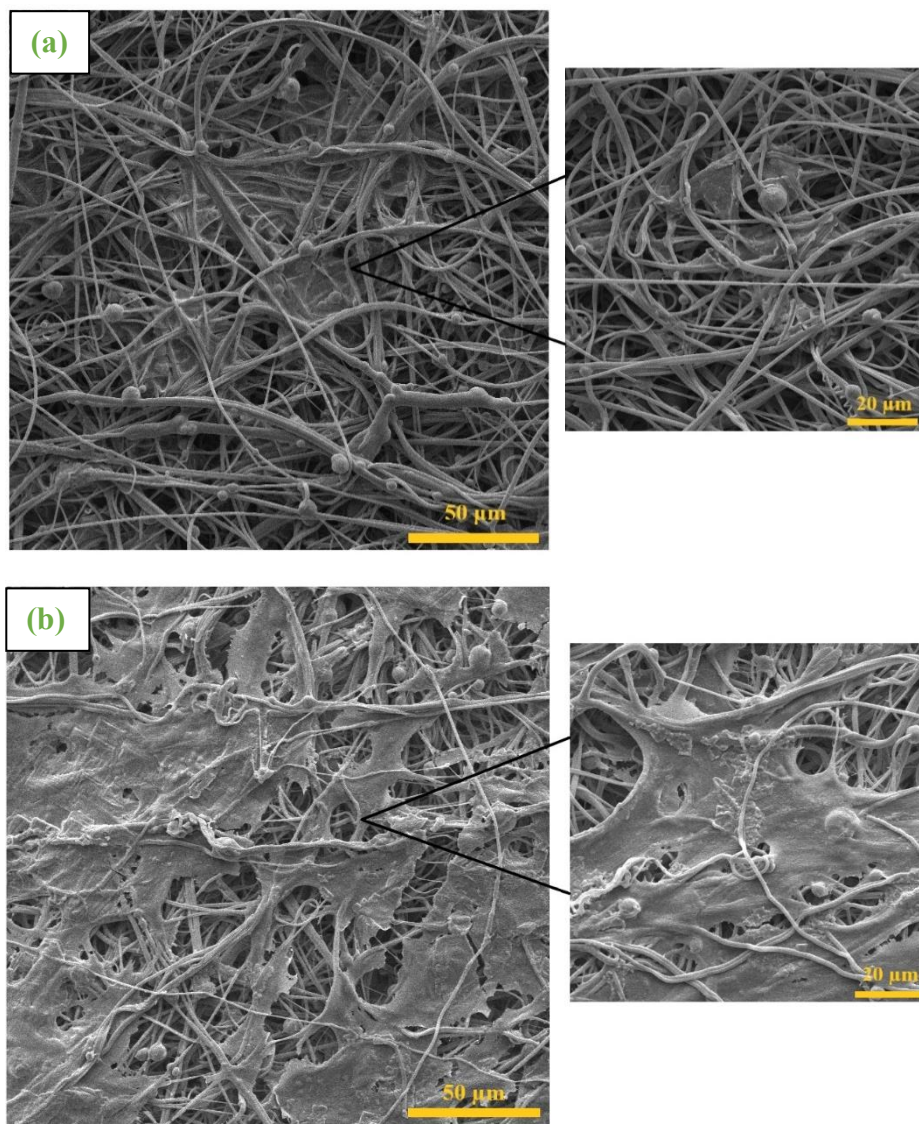
Graf 25: Počet buněk MG-63 na 1 mm^2 materiálu 1.; 7. a 14. den

Rovněž byla využita skenovací elektronová mikroskopie. Příprava vzorků spočívala v odsátí kultivačního média z jamkové destičky, kde byly prvně buňky na materiály nasazeny. Následovalo promytí materiálů PBS, jeho odsátí a vložení materiálů do nové 24 jamkové kultivační destičky. První krok spočíval ve fixaci buněk na materiálu pomocí 2,5%obj. glutaraldehydu (Sigma Aldrich). Následovalo vysoušení prostřednictvím

etalonové řady tak, že každých 5 minut byl k materiálům přidáván 60; 70; 80; 90; 96 a 100%obj. ethanol (Technisolv). Po dokončení byly jednotlivé materiály sušeny na parafilmu. Následoval standardní postup přípravy materiálu pro SEM zahrnující nalepení na terčík a naprášení 10 nm zlata pro zvýšení elektrické vodivosti vzorku. Na *obrázcích 37 a 38* jsou zobrazeny materiály PCL_5% n HA a PCL_30% μ HA po sedmi a čtrnácti dnech kultivace, kdy je větší pokrytí materiálu buňkami v rámci delší kultivační doby. Tyto materiály byly vybrány s ohledem na výsledky metabolické aktivity, kdy naměřená absorbance dosahovala vyšších hodnot u materiálů s nanočásticemi než mikročásticemi, tudíž jsou zde zástupci obou skupin.



Obrázek 37: SEM snímky PCL_5% n HA po 7 (a) a 14 (b) dnech kultivace MG-63; měřítko 50 μ m, 20 μ m



Obrázek 38: SEM snímky PCL_30%µHA po 7 (a) a 14 (b) dnech kultivace MG-63; měřítko 50 µm, 20 µm

4. Závěr

V rámci experimentální části byly vyrobeny kompozitní materiály prostřednictvím technologie střídavého elektrického zvlákňování. V prvotní fázi byla stanovena optimální koncentrace polykaprolaktonu v polymerním roztoku na 10 hm.%. Následovala příprava modifikovaných polymerních roztoků hydroxyapatitovými mikro- a nanočásticemi, u kterých byla stanovována elektrická vodivost a dynamická viskozita. Konkrétně se jednalo o koncentrace 5; 10; 15; 20 a 30 hm.% částic z hmotnosti sušiny polymeru. Pro buněčnou adhezi jsou stěžejní vlastnosti povrchu scaffoldů (smáčivost, náboj, chemické složení). U vytvořených vlákenných materiálů byl proto stanoven kontaktní úhel a povrchová energie. Dále byl sledován vliv drsnosti povrchu na smáčivost. Součástí analýzy bylo rovněž stanovení průměrů vláken a obrazová analýza materiálů prostřednictvím elektronové mikroskopie. Následovalo biologické testování vybraných materiálů.

Průměry vláken u kompozitních materiálů obsahující mikročástice hydroxyapatitu se pohybovaly v největším zastoupení v rozmezí 500–1000 nm. Se zvyšující se koncentrací částic se průměr vláken mírně snižoval. Kontaktní úhly vyrobených vrstev s mikročásticemi se neodlišovaly od materiálu PCL_10%, který obsahoval pouze hydrofobní polykaprolakton, nedošlo k výrazné změně vlastností přidáním mikročástic. PCL_10% vykazoval kontaktní úhel $129 \pm 4^\circ$ a povrchovou energii 8 mJ/m^2 , materiál PCL_30% μ HA disponoval smáčecím úhlem o hodnotě $124 \pm 8^\circ$ a povrchovou energií 10 J/m^2 . Následně bylo provedeno lisování materiálů, které zapříčinilo změnu drsnosti povrchu. Po opětovném měření kontaktních úhlů a povrchové energie na slisovaných materiálech došlo ke změně smáčivosti. U vzorků s hmotnostní koncentrací 5; 10 a 15 μ HA bylo možné pozorovat změnu ve smáčivosti povrchu v určitých částech materiálů. Konkrétně u PCL_5% μ HA došlo ke změně z $128 \pm 9^\circ$ na $115 \pm 29^\circ$, PCL_10% μ HA z $131 \pm 5^\circ$ na $94 \pm 32^\circ$ a PCL_15% μ HA z $127 \pm 6^\circ$ na $110 \pm 28^\circ$. Po slisování došlo ke snížení kontaktního úhlu, avšak na určitých místech, což je příčinou vysokých směrodatných odchylek těchto úhlů. Stále se jednalo o hydrofobní vrstvy. U materiálu PCL_30% μ HA byl kontaktní úhel před lisováním $124 \pm 8^\circ$ a po slisování $123 \pm 12^\circ$. V návaznosti na tyto výsledky je zřejmé, že drsnost povrchu neměla stěžejní vliv na hodnoty smáčecího úhlu. Předpokladem je vliv chemického složení povrchu, nejednalo se o úpravu povrchu, ale modifikaci samotného roztoku, tudíž částice byly rozmístěny náhodně v celém objemu.

U materiálů s nanočásticemi se průměry vláken od sebe navzájem výrazně neodlišovaly, jednalo se o nano- a submikronová vlákna. V porovnání s průměry vláken s mikročásticemi byla vytvořena vlákna menších průměrů. Pro měření kontaktního úhlu bylo rovněž využito metody přisedlé kapky. I u těchto materiálů se úhel smáčení s rostoucí hmotnostní koncentrací nanočástic hydroxyapatitu významně nesnižoval, vrstvy byly hydrofobní. Z těchto důvodů bylo přistoupeno ke slisování povrchu materiálů za účelem zjištění vlivu drsnosti materiálů na rovnovážný kontaktní úhel. Slisováním byly změněny hodnoty kontaktních úhlů jednotlivých materiálů, jednalo se ovšem stále o hydrofobní povrchy. U vzorku PC_5%nHA došlo ke změně z $123 \pm 10^\circ$ na $119 \pm 15^\circ$, PCL_15%nHA z $123 \pm 8^\circ$ na $111 \pm 18^\circ$ a PCL_30%nHA z $118 \pm 6^\circ$ na $114 \pm 13^\circ$, tudíž nevýznamné změny směrem ke směrodatným odchylkám. Dle teoretického předpokladu by povrch scaffoldu měl disponovat kontaktním úhlem vyhýbající se hraničním stavům přílišné hydrofility a hydrofobity povrchu pro umožnění adheze buněk k materiálu. V rámci literatury se za ideální hodnoty smáčecího úhlu považuje rozmezí $40-70^\circ$ (Al-Azzam a Alazzam 2022), vyrobené materiály se však v tomto rozmezí nepohybovaly, avšak i přesto na vybraných materiálech podrobených biologickému testování adheze k uchycení buněk a jejich proliferaci došlo.

Interakce s buněčnou linií MG-63 lidských osteoblastů byla konkrétně sledována na materiálech PCL_10%, PCL_5% μ HA, PCL_15% μ HA, PCL_30% μ HA, PCL_5%nHA, PCL_15%nHA a PCL_30%nHA. Nejprve byla zkoumána cytotoxicita těchto materiálů, respektive jejich extraktů, které byly shledány jako netoxické pro tuto buněčnou linii dle normy ČSN EN ISO 10993-5.

Pro sledování buněčné adheze a proliferace buněčné linie MG-63 na netoxických materiálech byl využit metabolický test CCK-8, dále obrazová analýza v podobě fluorescenční a skenovací elektronová mikroskopie. Na materiály byly nasazeny osteoblasty o koncentraci 10^4 buněk/jamku. Po 1.; 7. a 14. dnu od nasazení buněk na materiály byla sledována metabolická aktivita buněk pomocí spektrofotometru umožňujícího zachytit prostup elektromagnetického záření o vlnové délce 450 nm redukovanou monotetraziolovou solí WST-8 buněčnými dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk. Naměřená absorbance byla přímo úměrná koncentraci redukované WST-8 na oranžový formazan. Po prvním dnu byla metabolická aktivita nízká, hodnoty byly srovnatelné u všech materiálů z důvodu doby dělení MG-63 okolo 38 hodin (Šebek 2019). Po týdenní kultivaci byl patrný mírný nárůst metabolické aktivity u všech

materiálů. 14. testovací den poskytl skokový nárůst absorbance, což značilo proliferaci napříč všemi materiály. Materiály modifikované hydroxyapatitem vykazovaly vyšší metabolickou aktivitu ve srovnání s PCL_10%. Při porovnání materiálů s nano- a mikročásticemi byly hodnoty naměřené absorbance v rámci 14. testovacího dne vyšší u materiálů s nanočásticemi – PCL_5%nHA, PCL_15%nHA a PCL_30%nHA.

Jako podpůrná metoda získaných výsledků z metabolické aktivity byla využita také obrazová analýza. Pomocí fluorescenčního mikroskopu, byly snímány materiály s fixovanými a obarvenými buněčnými jádry a mikrofilamenty buněčného cytoskeletu během testovacích dnů, které potvrdily výsledky metabolické aktivity ve smyslu proliferace osteoblastů napříč všemi materiály. Rovněž byl zjišťován počet buněk na 1 mm² materiálu v jednotlivých testovacích dnech, avšak získané hodnoty se zcela neshodovaly s výsledky metabolické aktivity, což mohlo být ovlivněno deformací materiálu při manipulaci se vzorky a náhodným výběrem snímaných míst. Avšak i tato data vykazují trend růstu buněk na materiálech. Je zde rovněž patrné, že po týdenní kultivaci se na materiálech PCL_5%nHA a PCL_15%nHA nacházel větší počet buněk na příslušné ploše než u ostatních vzorků.

Bylo zjištěno, že i přes zvyšující se koncentraci hydroxyapatitových částic se jednalo o hydrofobní povrchy. Změnou drsnosti povrchu bylo ověřeno, že drsnost nemá stěžejní vliv na výsledný kontaktní úhel vrstev. Zkoumané materiály (PCL_10%, PCL_5% μ HA, PCL_15% μ HA, PCL_30% μ HA, PCL_5%nHA, PCL_15%nHA a PCL_30%nHA) byly pro MG-63 netoxické. Při zkoumání metabolické aktivity na těchto materiálech vykazovaly materiály s nHA a μ HA po dvoutýdenní kultivaci vyšší metabolickou aktivitu než na PCL_10% bez hydroxyapatitu. V porovnání skupin materiálu s nanočásticemi a mikročásticemi hydroxyapatitu byly vyšší hodnoty absorbance, tedy koncentrace oranžového formazanu odpovídajícího metabolicky aktivním buňkám vyšší na materiálech s nanočásticemi – PCL_5%nHA, PCL_15%nHA a PCL_30%nHA.

Při uvážení závislosti kontaktních úhlů a adheze a proliferace buněk na materiálech byla na hydrofobním povrchu materiálu PCL_5%nHA s kontaktním úhlem $123 \pm 10^\circ$ pozorována adheze a proliferace buněk stejně tak jako na materiálech PCL_15%nHA ($123 \pm 8^\circ$) a PCL_30%nHA ($118 \pm 6^\circ$).

Uplatnění by materiály mohly nalézt v rámci kostního tkáňového inženýrství pro regeneraci kostní tkáně. Vyrobený scaffold, jehož úkolem je imitovat mezibuněčnou

hmotu kostní tkáně, je vyroben z polykaprolaktonu a hydroxyapatitových nanočástic, tudíž volně imituje kompozitní povahu nativní kostní tkáně, jejíž hlavní anorganickou složku představuje hydroxyapatit.

Následující fáze by zahrnovala výrobu materiálů PCL_5%nHA, PCL_15%nHA, PCL_30%nHA v podobě objemnějších vrstev, což použitá technologie výroby umožňuje.

Další metody charakterizace by zohledňovaly porozitu materiálů za využití metody BET pro stanovení měrného povrchu, kdy při měření dochází k navázání molekul plynu. Zaznamenávána je adsorpční izoterma, ze které je následně možné vypočítat i objem pórů a jejich rozložení. Další možnosti představují volbu rentgenové tomografie, případně bublinkové metody.

Rovněž by bylo vhodné sledovat chemické složení povrchu materiálů, například prostřednictvím infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací nebo pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie.

Co se biologického testování týče, v rámci experimentální části byla zkoumána cytotoxicita a proliferace za využití CCK-8. Jak u materiálů s μ HA, tak nHA a PCL_10% by se mohla rovněž zkoumat funkce osteoblastů směrem k aktivitě alkalické fosfatázy (ALP), jakožto enzymu účastnícího se mineralizace kosti. Tento test je v rámci testování scaffoldů pro kostní tkáňové inženýrství využíván a umožňuje hodnocení osteogenní bioaktivity materiálu, tedy specifické funkce osteoblastů směrem k materiálové analýze vyrobených vzorků, což by poskytlo další souvislosti pro zhodnocení vhodnosti materiálů pro tuto aplikaci a jejich optimalizaci.

5. Použitá literatura

- AKTER, F., 2016. Principles of Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering Made Easy* [online]. B.m.: Elsevier Inc., s. 3–16. ISBN 9780128092286. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3
- AL-AZZAM, Nosayba a Anas ALAZZAM, 2022. Micropatterning of cells via adjusting surface wettability using plasma treatment and graphene oxide deposition. *PLOS ONE* [online]. **17**(6), e0269914. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0269914
- ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2005. *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. 2.vyd. B.m.: Espero. ISBN 80-902906-2-0.
- ALBREKTSSON, T. a C. JOHANSSON, 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* [online]. **10**, S96–S101. ISSN 09406719. Dostupné z: doi:10.1007/s005860100282
- ALONZO, Matthew, Fabian ALVAREZ PRIMO, Shweta ANIL KUMAR, Joel A. MUDLOFF, Erick DOMINGUEZ, Gisel FREGOSO, Nick ORTIZ, William M. WEISS a Binata JODDAR, 2021. Bone tissue engineering techniques, advances, and scaffolds for treatment of bone defects. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. **17**, 100248. ISSN 24684511. Dostupné z: doi:10.1016/j.cobme.2020.100248
- Anon., 2015. *Volná povrchová energie*. 2015. Brno: Masarykova Univerzita.
- Anon., 2021. *Example Protocol for the Culture of the MG63 Cell Line on Alvetex™ Scaffold in Well Insert Format* [online]. 2021. Kanagawa: Reprocell Int. [vid. 2024-03-20]. Dostupné z: www.reprocell.com
- Anon., 2023. *Fokální adheze* [online]. 2023. Praha: Národní lékařská knihovna. [vid. 2023-12-01]. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/bmc/link.do?id=M0356350>
- ASADIAN, Mahtab, Ke Vin CHAN, Mohammad NOROUZI, Silvia GRANDE, Pieter COOLS, Rino MORENT a Nathalie DE GEYTER, 2020. Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds. *Nanomaterials* [online]. **10**(1), 119. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano10010119
- ASPENCORE, 2024. AC Waveform and AC Circuit Theory. *ElectronicTutorials* [online] [vid. 2024-02-11]. Dostupné z: <https://www.electronics-tutorials.ws/wp-content/uploads/2018/05/accircuits-acp2.gif>
- BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUMML a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. **29**(6), 739–767. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
- BARA, Jennifer J. a Farshid GUILAK, 2020. Engineering functional tissues: in vitro culture parameters. In: *Principles of Tissue Engineering* [online]. United States: Elsevier, s. 157–177. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818422-6.00011-3
- BARTOVSKÁ, Lidmila a Alena RANDOVÁ, 2019. *Fázová rozhraní, koloidy a nanosystémy*. 1.vyd. Praha: VŠCHT. ISBN 978-80-7592-050-8.

- BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ, 2005. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Version 1. Praha: VŠCHT Praha [vid. 2024-01-26]. ISBN 80-7080-579-X. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/025.html
- BIGA, Lindsay M., Sierra DAWSON, Amy HARWELL, Robin HOPKINS, Joel KAUFMANN, Mike LEMASTER, Philip MATERN, Katie MORRISON-GRAHAM a Devon QUICK, 2019. 4.3. *Connective Tissue Supports and Protects* [online]. 2019. B.m.: OpenStax/Oregon State University. [vid. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/4-1-types-of-tissues/>
- BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY, 2023. *What Is The CCK-8 Assay?* [online] [vid. 2024-02-12]. Dostupné z: <https://www.bosterbio.com/blog/post/what-is-the-cck-8-assay>
- BUCK, Donald W. a Gregory A. DUMANIAN, 2012a. Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. *Plastic & Reconstructive Surgery* [online]. **129**(6), 1314–1320. ISSN 0032-1052. Dostupné z: [doi:10.1097/PRS.0b013e31824eca94](https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824eca94)
- BUCK, Donald W. a Gregory A. DUMANIAN, 2012b. Bone Biology and Physiology: Part II. Clinical Correlates. *Plastic & Reconstructive Surgery* [online]. **129**(6), 950e–956e. ISSN 0032-1052. Dostupné z: [doi:10.1097/PRS.0b013e31824ec354](https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824ec354)
- BUTT, Hans Jürgen, Jie LIU, Kaloian KOYNOV, Benedikt STRAUB, Chirag HINDUJA, Ilia ROISMANN, Rüdiger BERGER, Xiaomei LI, Doris VOLLMER, Werner STEFFEN a Michael KAPPL, 2022. *Contact angle hysteresis* [online]. 1. červen 2022. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18790399. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cocis.2022.101574](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2022.101574)
- CAI, Ling, Xijiang QIN, Zhihui XU, Yiyang SONG, Huijun JIANG, Yuan WU, Hongjie RUAN a Jin CHEN, 2019. Comparison of Cytotoxicity Evaluation of Anticancer Drugs between Real-Time Cell Analysis and CCK-8 Method. *ACS Omega* [online]. **4**(7), 12036–12042. ISSN 24701343. Dostupné z: [doi:10.1021/acsomega.9b01142](https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01142)
- CLARKE, Bart, 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **3**(Supplement_3), S131–S139. ISSN 1555-9041. Dostupné z: [doi:10.2215/CJN.04151206](https://doi.org/10.2215/CJN.04151206)
- DEBNAR, M., L. KOPP a R. MIŠIČKO, 2021. Management of bone defects using the Masquelet technique of induced membrane. *Rozhledy v chirurgii: měsíčník Československé chirurgické společnosti* [online]. **100**(8), 390–397 [vid. 2024-02-19]. ISSN 0035-9351. Dostupné z: [doi:10.33699/PIS.2021.100.8.390-397](https://doi.org/10.33699/PIS.2021.100.8.390-397)
- DECKER, E L, B FRANK, Y SUO a S GAROFF, 1999. *Physics of contact angle measurement* [online]. Dostupné z: www.elsevier.nl/locate/colsurfa
- DONG, Yixiang, Susan LIAO, Michelle NGIAM, Casey K. CHAN a Seeram RAMAKRISHNA, 2009. Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* [online]. **15**(3), 333–351 [vid. 2024-01-23]. ISSN 19373368. Dostupné z: [doi:10.1089/TEN.TEB.2008.0619](https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2008.0619)
- DULANY, Krista, Katie HEPBURN, Allison GOINS a Josephine B. ALLEN, 2020. In vitro and in vivo biocompatibility assessment of free radical scavenging nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* [online]. **108**(2), 301–315. ISSN 15524965. Dostupné z: [doi:10.1002/jbm.a.36816](https://doi.org/10.1002/jbm.a.36816)

- DVIR, Tal, Brian P. TIMKO, Daniel S. KOHANE a Robert LANGER, 2011. *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues* [online]. 2011. B.m.: Nature Publishing Group. ISSN 17483395. Dostupné z: doi:10.1038/nano.2010.246
- ERBEN, Jakub, Katerina PILAROVA, Filip SANETRNIK, Jiri CHVOJKA, Vera JENCOVA, Lenka BLAZKOVA, Jiri HAVLICEK, Ondrej NOVAK, Petr MIKES, Eva PROSECKA, David LUKAS a Eva KUZELOVA KOSTAKOVA, 2015. The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Materials Letters* [online]. **143**, 172–176. ISSN 18734979. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2014.12.100
- FINCERAMICA, 2024. *Sintlif* [online]. 2024. B.m.: Arrow Books. [vid. 2024-04-01]. Dostupné z: https://www.finceramica.it/wps/wcm/connect/internet/06134032-3489-408f-afba-b7427d2bb6f8/Finceramica+SINTLIFE+MDU009000-10-01+ENG+Low.pdf?MOD=AJPERES&CONVERT_TO=url&CACHEID=ROOTWORKSPACE.Z18_M1H4H9O0PGD000QM03CV7O0002-06134032-3489-408f-afba-b7427d2bb6f8-nVoJCZW
- FLATSCHER, Jonas, Elizabeth PAVEZ LORIÈ, Rainer MITTERMAYR, Paul MEZNIK, Paul SLEZAK, Heinz REDL a Cyrill SLEZAK, 2023. *Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF)—Physiological Response and Its Potential in Trauma Treatment* [online]. 1. červenec 2023. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms241411239
- FLORENCIO-SILVA, Rinaldo, Gisela RODRIGUES DA, Silva SASSO, Estela SASSO-CERRI, Manuel Jesus SIMÕES a Paulo Sérgio CERRI, 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells [online]. [vid. 2024-02-15]. Dostupné z: doi:10.1155/2015/421746
- GAO, Lichao a Thomas J. MCCARTHY, 2006. *Contact angle hysteresis explained* [online]. 4. červenec 2006. ISSN 07437463. Dostupné z: doi:10.1021/la060254j
- GHASSEMI, Toktam, Azadeh SHAHROODI, Mohammad H EBRAHIMZADEH, Alireza MOUSAVIAN, Jebraeel MOVAFFAGH a Ali MORADI, 2018. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The archives of bone and joint surgery* [online]. **6(2)**, 90–99. ISSN 2345-4644. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29600260>
- GHIASI, Mohammad S., Jason E. CHEN, Edward K. RODRIGUEZ, Ashkan VAZIRI a Ara NAZARIAN, 2019. Computational modeling of human bone fracture healing affected by different conditions of initial healing stage. *BMC Musculoskeletal Disorders* [online]. **20(1)**, 562. ISSN 1471-2474. Dostupné z: doi:10.1186/s12891-019-2854-z
- GRAFTYS, 2022. *Graftys QuickSet* [online]. 2022. [vid. 2024-04-01]. Dostupné z: https://graftys.com/wp-content/uploads/2022/06/brochure-final-3_compressed-1.pdf
- GUO, Baolin a Peter X. MA, 2014. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: A brief review. *Science China Chemistry* [online]. **57(4)**, 490–500. ISSN 16747291. Dostupné z: doi:10.1007/s11426-014-5086-y
- HARDESTY, Jon a Bassam ATTILI, 2010. *Spectrophotometry and the Beer-Lambert Law: An important analytical technique in chemistry*. 2010. B.m.: Collin College. Department of Chemistry.
- HASSAN, Mohd Izzat, Naznin SULTANA a Salehuddin HAMDAN, 2014. Bioactivity assessment of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite electrospun fibers for bone tissue

engineering application. *Journal of Nanomaterials* [online]. **2014**. ISSN 16874129. Dostupné z: doi:10.1155/2014/573238

HEBBAR, R. S., A. M. ISLOOR a A. F. ISMAIL, 2017. Contact Angle Measurements. In: *Membrane Characterization* [online]. B.m.: Elsevier Inc., s. 219–255. ISBN 9780444637918. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00012-7

HEREMANS, H., A. BILLIAU, J.J. CASSIMAN, J.C. MULIER a P. DE SOMER, 1978. In Vitro Cultivation of Human Tumor Tissues II. Morphological and Virological Characterization of Three Cell Lines. *Oncology* [online]. **35**(6), 246–252. ISSN 0030-2414. Dostupné z: doi:10.1159/000225298

HOLZAPFEL, B. M., M. RUDERT a D. W. HUTMACHER, 2017. Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering. *Der Orthopäde* [online]. **46**(8), 701–710. ISSN 0085-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s00132-017-3444-0

HOLZAPFEL, Boris Michael, Johannes Christian REICHERT, Jan-Thorsten SCHANTZ, Uwe GBURECK, Lars RACKWITZ, Ulrich NÖTH, Franz JAKOB, Maximilian RUDERT, Jürgen GROLL a Dietmar Werner HUTMACHER, 2013. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **65**(4), 581–603. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.07.009

HORBETT, Thomas A., 2004. THE ROLE OF ADSORBED PROTEINS IN TISSUE RESPONSE TO BIOMATERIALS. In: Buddy D. RATNER, Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS, ed. *Biomaterials science*. 2nd edition. B.m.: Elsevier, s. 237–245. ISBN 0-12-582463-7.

CHANDRA, Prafulla K., Shay SOKER a Anthony ATALA, 2020. Tissue engineering: current status and future perspectives. In: *Principles of Tissue Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–35. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6

CHANG, Hsin-I a Yiwei WANG, 2011. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* [online]. B.m.: InTech. Dostupné z: doi:10.5772/21983

CHUAN, Di, Rangrang FAN, Yuelong WANG, Yangmei REN, Chao WANG, Ying DU, Liangxue ZHOU, Jie YU, Yingchun GU, Haifeng CHEN a Gang GUO, 2020. Stereocomplex poly(lactic acid)-based composite nanofiber membranes with highly dispersed hydroxyapatite for potential bone tissue engineering. *Composites Science and Technology* [online]. **192**. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/j.compscitech.2020.108107

ISAEVA, E. V., E. E. BEKETOV, N. V. ARGUCHINSKAYA, S. A. IVANOV, P. V. SHEGAY a A. D. KAPRIN, 2022. Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review). *Sovremennye Tehnologii v Medicine* [online]. **14**(3), 57–69. ISSN 2309995X. Dostupné z: doi:10.17691/stm2022.14.3.07

JENČOVÁ, Věra, Eva KOŠŤÁKOVÁ KUŽELOVÁ, Petr MIKEŠ, Věra HEDVIČÁKOVÁ a David LUKÁŠ, 2021a. Technologie výroby nanovlákných materiálů. In: *NANOVLÁKNA Teorie, technologie a použití*. 1. vyd. Liberec: Technická univerzita v Liberci, s. 17–53. ISBN 978-80-7494-539-7.

JENČOVÁ, Věra, Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, Petr MIKEŠ, Věra HEDVIČÁKOVÁ a David LUKÁŠ, 2021b. Aplikace nanovláken pro tkáňové

inženýrství. In: *Nanovlákná: teorie, technologie a použití*. 1.vyd. Liberec: Technická univerzita v Liberci, s. 167–184. ISBN 978-80-7494-539-7.

JIRKOVEC, Radek, 2021. *Studium smáčení vlákných struktur pomocí biokompatibilních hydrogelů*. Liberec. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci.

JIRKOVEC, Radek, Jakub ERBEN, Petr SAJDL, Jiri CHALOUPEK a Jiri CHVOJKA, 2021a. The effect of material and process parameters on the surface energy of polycaprolactone fibre layers. *Materials and Design* [online]. **205**. ISSN 18734197. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2021.109748

JIRKOVEC, Radek, Pavel HOLEC, Šárka HAUZEROVÁ, Alžběta SAMKOVÁ, Tomáš KALOUS a Jiří CHVOJKA, 2021b. Preparation of a Composite Scaffold from Polycaprolactone and Hydroxyapatite Particles by Means of Alternating Current Electrospinning. *ACS Omega* [online]. **6**(13), 9234–9242. ISSN 24701343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.1c00644

JUNQUEIRA, L. Carlos., Robert O. KELLEY, Richard JELÍNEK a José. CARNEIRO, 2002. *Základy histologie*. 1.vyd. Jinočany: H & H. ISBN 80-85787-37-7.

KAUCKÁ, Markéta, 2006. *Zákonitosti tvorby kostní tkáně* [online]. Brno [vid. 2024-02-17]. bakalářská práce. Masarykova univerzita. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/illw1/bakalarska_prace.pdf

KHALILI, Amelia Ahmad a Mohd Ridzuan AHMAD, 2015. *A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications* [online]. 5. srpen 2015. B.m.: MDPI AG. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160818149

KHORSHIDI, Sajdeh, Atefeh SOLOUK, Hamid MIRZADEH, Saeedeh MAZINANI, Jose M. LAGARON, Shahriar SHARIFI a Seeram RAMAKRISHNA, 2016. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. **10**(9), 715–738. ISSN 19326254. Dostupné z: doi:10.1002/term.1978

KIRILLOVA, Alina, Taylor R. YEAZEL, Darya ASHEGHALI, Shannon R. PETERSEN, Sophia DORT, Ken GALL a Matthew L. BECKER, 2021. *Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers* [online]. 22. září 2021. B.m.: American Chemical Society. ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.0c01200

KIRKPATRICK, C. J., F. BITTINGER, M. WAGNER, H. KOHLER, T. G. VAN KOOTEN, C. L. KLEIN a M. OTTO, 1998. Current trends in biocompatibility testing. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* [online]. **212**(2), 75–84. ISSN 09544119. Dostupné z: doi:10.1243/0954411981533845

KLÍČOVÁ, Markéta, Zuzana OULEHLOVÁ, Andrea KLÁPŠŤOVÁ, Matěj HEJDA, Michal KREJČÍK, Ondřej NOVÁK, Jana MULLEROVÁ, Jakub ERBEN, Jáchym ROSENDORF, Richard PALEK, Václav LIŠKA, Anna FUCIKOVA, Jiří CHVOJKA, Iveta ZVERCOVA a Jana HORÁKOVÁ, 2022. Biomimetic hierarchical nanofibrous surfaces inspired by superhydrophobic lotus leaf structure for preventing tissue adhesions. *Materials and Design* [online]. **217**. ISSN 18734197. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2022.110661

KOHOUTOVÁ, Lenka, 2015. Aplikace tkáňového inženýrství. In: Lucie WOLFOVÁ, Lucy VOJTOVÁ, Lucie JUREČKOVÁ a Lenka KOHOUTOVÁ, ed. *Úvod do tkáňového inženýrství*. B.m.: MediaBros, s. 78–81.

KOORDINAČNÍ STŘEDISKO TRANSPLANTACÍ, 2019. *Koordinační středisko transplantací* [online]. B.m.: Koordinační středisko transplantací [vid. 2024-01-26]. Dostupné z: <https://kst.cz/>

KRÁSNÝ, Ivo, 2010. *Měření kontaktních úhlů smáčení a určování povrchové energie plastů*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

KULKARNI, Deepak, Shubham MUSALE, Prabhakar PANZADE, Ana Cláudia PAIVA-SANTOS, Pratiksha SONWANE, Monika MADIBONE, Puja CHOUNDHE, Prabhanjan GIRAM a Simona CAVALU, 2022. Surface Functionalization of Nanofibers: The Multifaceted Approach for Advanced Biomedical Applications. *Nanomaterials* [online]. **12**(21), 3899. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano12213899

KWOK, D.Y. a A.W. NEUMANN, 1999. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. **81**(3), 167–249. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(98)00087-6

LANGER, Robert a Joseph P. VACANTI, 1993. Tissue Engineering. *Science* [online]. **260**(5110), 920–926. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.8493529

LARRAMENDY, Marcelo L. a Sonia SOLONESKI, ed., 2018. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. B.m.: InTech. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.69556

LEGEROS, R Z a J P LEGEROS, 2008. Hydroxyapatite. In: *Bioceramics and their Clinical Applications* [online]. B.m.: Elsevier, s. 367–394. Dostupné z: doi:10.1533/9781845694227.2.367

LO, Chi, Darren HICKERSON, James J. YOO, Anthony ATALA a Julie ALLICKSON, 2020. Moving into the clinic. In: *Principles of Tissue Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, s. 53–61. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818422-6.00003-4

LOTFI, M., M. NEJIB a M. NACEUR, 2013. Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. In: *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* [online]. B.m.: InTech. Dostupné z: doi:10.5772/53542

LUKÁŠOVÁ, Věra, 2020. *Cell-free scaffolds functionalized with bioactive compounds in bone tissue engineering*. Praha. Disertační práce. Školitel Michala Rampichová. Univerzita Karlova.

LUTZWEILER, Gaëtan, Albana NDREU HALILI a Nihal ENGIN VRANA, 2020. The Overview of Porous, Bioactive Scaffolds as Instructive Biomaterials for Tissue Regeneration and Their Clinical Translation. *Pharmaceutics* [online]. **12**(7), 602. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12070602

MAHMUD, Md. Zobair Al, Md Hosne MOBARAK, Nayem HOSSAIN, Md. Aminul ISLAM a Md. Thohid RAYHAN, 2023. Emerging breakthroughs in biomaterials for orthopedic applications: A comprehensive review. *Bioprinting* [online]. **36**, e00323. ISSN 24058866. Dostupné z: doi:10.1016/j.bprint.2023.e00323

MARIE, Pierre J., 2013. *Targeting integrins to promote bone formation and repair* [online]. květen 2013. ISSN 17595029. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2013.4

MAYFIELD, Cory K., Mina AYAD, Elizabeth LECHTHOLZ-ZEY, Yong CHEN a Jay R. LIEBERMAN, 2022. 3D-Printing for Critical Sized Bone Defects: Current Concepts and Future Directions. *Bioengineering* [online]. 9(11), 680. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering9110680

METWALLY, Sara a Urszula STACHEWICZ, 2019. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications [online]. [vid. 2024-03-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.109883

MIKEŠ, Petr a David LUKÁŠ, 2015. Střídavé elektrické zvlákňování. In: *Fyzikální principy tvorby nanovláken I*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, s. 53–55. ISBN 978-80-7494-249-5.

MILLER, Christine, 2020. 7.4 Tissues [online]. 2020. B.m.: Thompson Rivers University. [vid. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://humanbiology.pressbooks.tru.ca/chapter/7-3-tissues/>

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR A ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR, 2024. Národní zdravotnický informační portál. *Kostní buňky* [online]. B.m.: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [vid. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3594>

MULCHANDANI, Neha, Arbind PRASAD a Vimal KATIYAR, 2019. Resorbable polymers in bone repair and regeneration. In: *Materials for Biomedical Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, s. 87–125 [vid. 2024-03-04]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818415-8.00004-8

MURPHY, Ciara M., Fergal J. O'BRIEN, David G. LITTLE a Aaron SCHINDELER, 2013. *Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad* [online]. 20. září 2013. B.m.: AO Research Institute Davos. ISSN 14732262. Dostupné z: doi:10.22203/eCM.v026a09

NEMATI, Sorour, Se jeong KIM, Young Min SHIN a Heungsoo SHIN, 2019. *Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering* [online]. 1. prosinec 2019. B.m.: Korea Nano Technology Research Society. ISSN 21965404. Dostupné z: doi:10.1186/s40580-019-0209-y

NOVÁKOVÁ, Lucie a Martina ŠAJDÍKOVÁ, 2024. *Funkční morfologie kostí a chrupavky* [online]. 2024. Praha: Univerzita Karlova. [vid. 2024-02-19]. Dostupné z: <https://fbllt.cz/skripta/iv-pohybova-soustava/1-funkcni-morfologie-kosti-a-chrupavky/>

NOVOTNÝ, Ivan a Michal HRUŠKA, 2015. Soustavy lidského těla, anatomie a fyziologie. In: *Biologie člověka*. 5. rozš. a upr. vyd. Praha: Nakladatelství Fortuna, s. 17–20. ISBN 978-80-7373-128-1.

O'BRIEN, Fergal J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 14(3), 88–95. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X

OLSON, Jennifer L, Anthony ATALA a James J YOO, 2011. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. © *Chonnam Medical Journal* [online]. 47, 1–13 [vid. 2024-01-22]. Dostupné z: doi:10.4068/cmj.2011.47.1.1

- OVČAČÍKOVÁ, Hana a Jozef VLČEK, 2013. *Speciální keramické materiály*. 2013. Ostrava: Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. ISBN 978-80-248-3365-1.
- PARVEEN, S, K KRISHNAKUMAR a SK SAHOO, 2006. New Era in Health Care: Tissue Engineering. *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine* [online]. **1**(1), 8–24. ISSN 09737154. Dostupné z: doi:10.46582/jsrm.0101003
- QIU, Zhi-Ye, Yun CUI a Xiu-Mei WANG, 2019. Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. In: *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–22 [vid. 2024-03-04]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102717-2.00001-1
- RACH, Jessica, Beat HALTER a Michaela AUFDERHEIDE, 2013. Importance of material evaluation prior to the construction of devices for in vitro techniques. *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. **65**(7–8), 973–978. ISSN 09402993. Dostupné z: doi:10.1016/j.etp.2013.01.011
- RATNER, Buddy D., 2011. The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *Journal of Cardiovascular Translational Research* [online]. **4**(5), 523–527. ISSN 1937-5387. Dostupné z: doi:10.1007/s12265-011-9287-x
- RIKITAKE, Yoshiyuki a Yoshimi TAKAI, 2011. Directional Cell Migration: Regulation by Small G Proteins, Nectin-like Molecule-5, and Afadin. *International Review of Cell and Molecular Biology* [online]. **287**, 97–143 [vid. 2024-02-26]. ISSN 1937-6448. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386043-9.00003-7
- ROSETI, Livia, Valentina PARISI, Mauro PETRETTA, Carola CAVALLO, Giovanna DESANDO, Isabella BARTOLOTTI a Brunella GRIGOLO, 2017. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C* [online]. **78**, 1246–1262. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.05.017
- ROUDNÝ, Petr, 2023. *Vektorový graf stejnosměrného a střídavého proudu* [online]. 2023. B.m.: iStock. [vid. 2024-03-20]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/vektor/vektorov%C3%BD-graf-nebo-graf-stejnosm%C4%9Brn%C3%A9ho-a-st%C5%99%C3%ADdav%C3%A9ho-proudu-stejnosm%C4%9Brn%C3%BD-proud-gm1466292262-498332483>
- RUSSEL, W.M.S. a R.L. BURCH, 1959. *The principles of Humane Experimental Technique*. first edition. London: METHUEN CO L.T.D.
- SCARCELLO, Eleonora, Alexia LAMBREMONT, Rita VANBEVER, Pascal J. JACQUES a Dominique LISON, 2020. Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PLoS ONE* [online]. **15**(4). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0231634
- SEER TRAINING MODULES, 2024. *Structure of Bone Tissue* [online]. 2024. B.m.: U.S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. [vid. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>
- SENGUPTA, Debanti, Stephen D. WALDMAN a Song LI, 2014. From in vitro to in situ tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. **42**(7), 1537–1545. ISSN 15739686. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-014-1022-8

- SETIAWATI, Rosy a Paulus RAHARDJO, 2019. Bone Development and Growth. In: Haisheng YANG, ed. *Osteogenesis and Bone Regeneration* [online]. B.m.: IntechOpen, s. 6–16. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.82452
- SHAOXIAN, Bai a Wen SHIZHU, 2019. Vapor-condensed gas lubrication of face seals. In: *Gas Thermohydrodynamic Lubrication and Seals* [online]. B.m.: Elsevier, s. 143–165. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816716-8.00007-3
- SCHEMITSCH, Emil H., 2017. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *Journal of Orthopaedic Trauma* [online]. **31**, S20–S22. ISSN 15312291. Dostupné z: doi:10.1097/BOT.0000000000000978
- SIGMAGRAFT BIOMATERIALS, Inc., 2024. *InterOss® Collagen Block* [online] [vid. 2024-04-01]. Dostupné z: <https://sigmagraft.com/bone-substitute/inteross-collagen-block/>
- SIVAN, M., D. MADHESWARAN, S. HAUZEROVA, V. NOVOTNY, V. HEDVICAKOVA, V. JENCOVA, E. K. KOSTAKOVA, M. SCHINDLER a D. LUKAS, 2022. AC electrospinning: impact of high voltage and solvent on the electrospinnability and productivity of polycaprolactone electrospun nanofibrous scaffolds. *Materials Today Chemistry* [online]. **26**. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2022.101025
- SIVAN, Manikandan, Divyabharathi MADHESWARAN, Jan VALTERA, Eva Kuzelova KOSTAKOVA a David LUKAS, 2021. Alternating current electrospinning: The impacts of various high-voltage signal shapes and frequencies on the spinnability and productivity of polycaprolactone nanofibers. *Materials and Design* [online]. **213**. ISSN 18734197. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2021.110308
- STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV, 2023. *Přehled držitelů povolení činnosti v oblasti lidských tkání a buněk, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online] [vid. 2023-12-01]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/prehled-drzitelu-povoleni-cinnosti-v-oblasti-lidskyh-tkani>
- STEWART, Sarah, Juan DOMÍNGUEZ-ROBLES, Ryan DONNELLY a Eneko LARRAÑETA, 2018. Implantable Polymeric Drug Delivery Devices: Classification, Manufacture, Materials, and Clinical Applications. *Polymers* [online]. **10**(12), 1379. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10121379
- STOJANOVSKA, E., S.J. RUSSELL a A. KILIC, 2022. Nanofibre and submicron fibre web formation. In: *Handbook of Nonwovens* [online]. B.m.: Elsevier, s. 279–300. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818912-2.00003-3
- STRYKER, 2014. *HydroSet* [online]. 2014. [vid. 2024-04-01]. ISBN 90-01603. Dostupné z: <https://www.strykermeded.com/media/1187/hydroset-brochure.pdf>
- SUAMTE, Laldinthari, Akriti TIRKEY, Jugal BARMAN a Punuri JAYASEKHAR BABU, 2023. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing* [online]. **1**, 100011 [vid. 2024-03-02]. ISSN 2772-8102. Dostupné z: doi:10.1016/J.SMMF.2022.100011
- SZWED-GEORGIU, Aleksandra, Przemysław PŁOCIŃSKI, Barbara KUPIKOWSKA-STOBBA, Mateusz M. URBANIAK, Paulina RUSEK-WALA, Konrad SZUSTAKIEWICZ, Paweł PISZKO, Agnieszka KRUPA, Monika BIERNAT, Małgorzata GAZIŃSKA, Mirosław KASPRZAK, Katarzyna NAWROTEK, Nuno

Pereira MIRA a Karolina RUDNICKA, 2023. Bioactive Materials for Bone Regeneration: Biomolecules and Delivery Systems. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. **9**(9), 5222 [vid. 2023-12-25]. ISSN 23739878. Dostupné z: doi:10.1021/ACSBIOMATERIALS.3C00609

ŠEBEK, Jaroslav, 2019. Typy buněčných kultur. In: Lubomír HOUDEK, ed. *Buněčné kultury v medicíně*. Praha: Galén, s. 23–123. ISBN 978-80-7492-380-7.

ŠTĚPANOVSÁ, Jana, 2020. *Dynamická kultivace buněk na titanových maticích*. Praha. Disertační práce. České vysoké učení technické v Praze.

ŠTYKS, Martin, 2022. *Měření kontaktního úhlu a povrchové energie na povrchu povlaků beta-fosforečnanu vápenatého*. Praha. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze.

THEVENOT, Paul, Wenjing HU a Liping TANG, 2008. *Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility*.

TSIKLIN, Ilya L., Aleksey V. SHABUNIN, Alexandr V. KOLSANOV a Larisa T. VOLOVA, 2022. In Vivo Bone Tissue Engineering Strategies: Advances and Prospects. *Polymers* [online]. **14**(15). ISSN 20734360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14153222

VAGASKÁ, B., L. BAČÁKOVÁ, E. FILOVÁ a K. BALÍK, 2010. Osteogenic Cells on Bio-Inspired Materials for Bone Tissue Engineering. *Physiological Research* [online]. 309–322. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.931776

VAIANI, Lorenzo, Antonio BOCCACCIO, Antonio Emmanuele UVA, Gianfranco PALUMBO, Antonio PICCININNI, Pasquale GUGLIELMI, Stefania CANTORE, Luigi SANTACROCE, Ioannis Alexandros CHARITOS a Andrea BALLINI, 2023. Ceramic Materials for Biomedical Applications: An Overview on Properties and Fabrication Processes. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. **14**(3), 146 [vid. 2024-03-30]. ISSN 20794983. Dostupné z: doi:10.3390/JFB14030146

WEBSTER, Thomas J. a Edward S. AHN, 2007. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineering Bone. In: Lee KYONGBUM a David KAPLAN, ed. *Tissue Engineering II* [online]. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, s. 275–308. Dostupné z: doi:10.1007/10_021

WEI, Shuai, Jian-Xiong MA, Lai XU, Xiao-Song GU a Xin-Long MA, 2020. Biodegradable materials for bone defect repair. *Military Medical Research* [online]. **7**(1), 54. ISSN 2054-9369. Dostupné z: doi:10.1186/s40779-020-00280-6

WOLFOVÁ, Lucie, 2015. Úvod do tkáňového inženýrství. In: Lucie WOLFOVÁ, VOJTOVÁ LUCY, JUREČKOVÁ LUCIE a KOHOUTOVÁ LENKA, ed. *Úvod do tkáňového inženýrství*. Praha: MediaBros, s. 1–17. ISBN 978-80-260-9720-4.

WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER, 2010. *The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century* [online]. 2010. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

XUE, Jiajia, Tong WU, Yunqian DAI a Younan XIA, 2019. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical reviews* [online]. **119**(8), 5298 [vid. 2024-02-11]. ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/ACS.CHEMREV.8B00593

XUE, Nannan, Xiaofeng DING, Rizhong HUANG, Ruihan JIANG, Heyan HUANG, Xin PAN, Wen MIN, Jun CHEN, Jin-Ao DUAN, Pei LIU a Yiwei WANG, 2022. Bone Tissue

Engineering in the Treatment of Bone Defects. *Pharmaceuticals* [online]. **15**(7), 879. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph15070879

YANG, Haowei, Yue LAN, Wei ZHU, Weina LI, Dan XU, Jiecheng CUI, Dezhong SHEN a Guangtao LI, 2012. Polydopamine-coated nanofibrous mats as a versatile platform for producing porous functional membranes. *Journal of Materials Chemistry* [online]. **22**(33), 16994–17001. ISSN 09599428. Dostupné z: doi:10.1039/c2jm33251e

ZHAO, Tianyi a Lei JIANG, 2018. Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **161**, 324–330 [vid. 2024-01-26]. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.056

ZHOU, Keran, Farah Alwani AZAMAN, Zhi CAO, Margaret BRENNAN FOURNET a Declan M. DEVINE, 2023. Bone Tissue Engineering Scaffold Optimisation through Modification of Chitosan/Ceramic Composition. *Macromol* [online]. **3**(2), 326–342. ISSN 2673-6209. Dostupné z: doi:10.3390/macromol3020021

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma klíčových oblastí tkáňového inženýrství. Vytvořeno pomocí Biorender.com, vychází z: (Murphy et al. 2013; Akter 2016; Chandra et al. 2020)	12
Obrázek 2: Schéma základního principu tkáňového inženýrství, zde konkrétně metoda in vitro. Vytvořeno v Biorender.com, vychází z: (Dvir et al. 2011; Asadian et al. 2020).....	14
Obrázek 3: Interakce buněk s proteiny adsorbovaných na substrátu. Převzato z: (Webster a Ahn 2007).....	15
Obrázek 4: Kontaktní úhel kapaliny na pevné podložce. Převzato z: (Kwok a Neumann 1999).....	17
Obrázek 5: Kontaktní úhly kapaliny na pevné podložce. Vychází z: (Bartovská a Šišková 2005).....	18
Obrázek 6: Skutečný (θ_S) a zdánlivý (θ_Z) úhel smáčení. Převzato z: (Bartovská a Randová 2019).....	19
Obrázek 7: Úhel smáčení u hladkého ($\theta_Y = \theta_{Youngův}$) a drsného povrchu (θ_Z) (a) pro hydrofilní povrch, (b) pro hydrofobní povrch. Převzato z: (Bartovská a Randová 2019).....	19
Obrázek 8: Cassie-Baxterův model. Převzato z: (Shaoxian a Shizhu 2019).....	20
Obrázek 9: Kapka na nakloněné rovině pevného substrátu. Převzato z: (Shaoxian a Shizhu 2019).....	20
Obrázek 10: Metody měření kontaktního úhlu. Vychází z: (Krásný 2010).....	21
Obrázek 11: Metoda přisedlé kapky pro měření kontaktního úhlu. Převzato z: (Hebbar et al. 2017).....	21
Obrázek 12: Pracovní prostředí programu See System 7.6.	22
Obrázek 13: Časový průběh stejnosměrného a střídavého napětí. Převzato z: (Roudný 2023).....	24
Obrázek 14: Schéma elektrostatického bezjehlového zvlákňování, zařízení Nanospider. 1 – kladně nabitá elektroda ve formě struny, 2 – průvlak se zásobníkem polymerního roztoku (cartridge), 3 – tvorba vláken a odpařování rozpouštědla, 4 – nanovláknenná vrstva na podkladové netkané textilií, 5 – záporně nabitá elektroda. Převzato z: (Klíčova et al. 2022)	25
Obrázek 15: Časový průběh střídavého napětí. Převzato z: (AspenCore 2024).....	26

Obrázek 16: Schématické zobrazení délek segmentů při nižších a vyšších frekvencích. Převzato z: (Sivan et al. 2021).....	27
Obrázek 17: (a) schéma technologie střídavého zvlákňování, (b) vlákenná vlečka v detailu. Převzato z: (Sivan et al. 2022), upraveno	27
Obrázek 18: Snímek z optického mikroskopu buněčné linie MG-63 zobrazovací metodou fázového kontrastu; měřítko 100 μm . Převzato z: (Anon. 2021)	28
Obrázek 19: Kostní buňky. Převzato z: (Mulchandani et al. 2019).....	31
Obrázek 20: Schématické zobrazení kostních buněk. Převzato z: (Marie 2013)	31
Obrázek 21: Hierarchická struktura kosti. Převzato: (Webster a Ahn 2007).....	33
Obrázek 22: Schéma zobrazující možnosti léčby kostních defektů. Převzato z: (Xue et al. 2022).....	36
Obrázek 23: Biomateriály pro kostní tkáňové inženýrství	38
Obrázek 24: Strukturní vzorce PLA, PGA, PLGA a PCL. Převzato z: (Stewart et al. 2018)	40
Obrázek 25: Zobrazení kroků experimentální části. Vytvořeno v Biorender.com.....	45
Obrázek 26: Schéma zvlákňovacího zařízení pomocí střídavého elektrického napětí a průřez tyčkou. 1 – magnetická pumpa, 2 – šnekové čerpadlo se zásobou roztoku, 3 – přeplavovací elektroda, 4 – tvořící se vlákna ve vlákenné vlečce, 5 – rotující kolektor s vlákennou vrstvou. Převzato z: (Jirkovec 2021)	48
Obrázek 27: Zvlákňování roztoků o koncentraci PCL 8 hm. % (a), 10 hm. % (b), 12 hm. % (c).....	49
Obrázek 28: SEM snímky pro vzorky PCL_8% (a) , PCL_10% (b), PCL_12% (c);.....	50
Obrázek 29: SEM snímky vzorků při zvětšení 2500x (a) PCL_10%, (b) PCL_5% μHA , (c) PCL_10% μHA , (d) PCL_15% μHA , (e) PCL_20% μHA , (f) PCL_30% μHA ; měřítko 20 μm	55
Obrázek 30: Variabilita kontaktních úhlů lisovaného vzorku PCL_5% μHA	61
Obrázek 31: Variabilita kontaktních úhlů lisovaného vzorku PCL_10% μHA	61
Obrázek 32: Variabilita kontaktních úhlů lisovaného vzorku PCL_15% μHA	62
Obrázek 33: SEM snímky vzorků PCL_5%nHA (a), PCL_10%nHA (b), PCL_15%nHA (c), PCL_20%nHA (d), PCL_30%nHA (e)	66
Obrázek 34: Variabilita kontaktních úhlů na lisovaném vzorku PCL_10%nHA	71
Obrázek 35: Kultivační destičky po inkubaci 10% roztoku CCK-8 v MEM.....	74

Obrázek 36: Snímky z fluorescenčního mikroskopu o zvětšení 20x. Modře barvená buněčná jádra (DAPI), zeleně barvená aktinová vlákna cytoskeletu (phalloidin-FITC); měřítko 100 μm	79
Obrázek 37: SEM snímky PCL_5% μHA po 7 (a) a 14 (b) dnech kultivace MG-63; měřítko 50 μm , 20 μm	81
Obrázek 38: SEM snímky PCL_30% μHA po 7 (a) a 14 (b) dnech kultivace MG-63; měřítko 50 μm , 20 μm	82

Seznam grafů

Graf 1: Závislost dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci polykaprolaktonu ..	47
Graf 2: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_8%	50
Graf 3: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_10%	51
Graf 4: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_12%	51
Graf 5: Závislost dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci μ HA v polymerním roztoku	53
Graf 6: Závislost měrné elektrické vodivosti na hmotnostní koncentraci μ HA	54
Graf 7: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_5% μ HA	56
Graf 8: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_10% μ HA	56
Graf 9: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_15% μ HA	57
Graf 10: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_20% μ HA	57
Graf 11: Histogram distribuce průměrů vláken vzorku PCL_30% μ HA.....	58
Graf 12: Tloušťky slisovaných a neslisovaných vrstev jednotlivých vzorků vlákných vrstev	59
Graf 13: Porovnání kontaktních úhlů nelisovaných a lisovaných vrstev.....	61
Graf 14: Závislost dynamické viskozity na hmotnostní koncentraci nanočástic hydroxyapatitu	63
Graf 15: Závislost měrné elektrické vodivosti na hmotnostní koncentraci nHA	63
Graf 16: Histogram distribuce průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_5%nHA	67
Graf 17: Histogram distribuce průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_10%nHA.....	67
Graf 18: Histogram distribuce průměrů vláken ve vrstvě vzorku PCL_15%nHA.....	68
Graf 19: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_20%nHA.....	68
Graf 20: Histogram distribuce průměrů vláken vrstvy vzorku PCL_30%nHA.....	69
Graf 21: Tloušťky slisovaných a neslisovaných vrstev jednotlivých vzorků vlákných vrstev	70
Graf 22: Kontaktní úhly nelisovaných a slisovaných vrstev s nanočásticemi hydroxyapatitu	72
Graf 23: Zobrazení viability buněčné linie lidských osteoblastů MG-63 po inkubaci v extraktech příslušných materiálů; NC (negativní kontrola), PC (pozitivní kontrola)	75
Graf 24: Metabolická aktivita MG-63 nasazených na materiály 1.;7. a 14. den	77
Graf 25: Počet buněk MG-63 na 1 mm ² materiálu 1.; 7. a 14. den	80

Seznam tabulek

Tabulka 1: Vliv funkčních skupin na buněčnou adhezi. Vychází z: (Thevenot et al. 2008; Chang a Wang 2011; Metwally a Stachewicz 2019).....	17
Tabulka 2: Komerční výplňové materiály založené na fosforečnanech vápenatých. Vychází z: (Xue et al. 2022; Graftys 2022; Finceramica 2024; SigmaGraft Biomaterials 2024)	42
Tabulka 3: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky viskozity daných roztoků	46
Tabulka 4: Označení zvlákněných materiálů	49
Tabulka 5: Průměry vláken zvlákněných materiálů.....	52
Tabulka 6: Označení materiálů o dané koncentraci mikročástic hydroxyapatitu	55
Tabulka 7: Průměry a směrodatné odchylky kompozitních vlákněných vrstev s μ HA ..	58
Tabulka 8: Kontaktní úhly a povrchová energie vyrobených materiálů	59
Tabulka 9: Kontaktní úhel a povrchová energie lisovaných vrstev	60
Tabulka 10: Označení materiálů o dané koncentraci nanočástic hydroxyapatitu	64
Tabulka 11: Průměry a směrodatné odchylky kompozitních vlákněných vrstev s nHA	69
Tabulka 12: Kontaktní úhly a povrchová energie vrstev vyrobených materiálů	70
Tabulka 13: Kontaktní úhly a povrchové energie slisovaných vrstev s nHA	71