



# FYZIKÁLNÍ MODIFIKACE POLYKAPROLAKTONOVÝCH NANOVLÁKENNÝCH MATERIÁLŮ A JEJÍ VLIV NA PROLIFERACI FIBROBLASTŮ.

## Diplomová práce

*Studijní program:* N3106 – Textilní inženýrství  
*Studijní obor:* 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály  
*Autor práce:* **Bc. Aneta Horáková**  
*Vedoucí práce:* Mgr. Matej Buzgo





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC  
Faculty of Textile Engineering ■

# PHYSICAL MODIFICATION OF POLYCAPROLACTONE NANOFIBERS AND EFFECT ON FIBROBLASTS PROLIFERATION.

## Diploma thesis

*Study programme:* N3106 – Textile Engineering  
*Study branch:* 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials  
*Author:* **Bc. Aneta Horáková**  
*Supervisor:* Mgr. Matej Buzgo



Tento list nahradte  
originálem zadání.

## Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

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

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

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Mgr. Mateji Buzgovi za odborné konzultace a vedení diplomové práce. Poděkování patří také prof. RNDr. Evženu Amlerovi, CSc., jeho vynikajícímu kolektivu biologické laboratoře ÚEM AV ČR – IBC a konzultantům. Ráda bych také připojila poděkování svému manželovi a rodině za důvěru a podporu v průběhu celého svého studia.

**Abstrakt:**

Cílem této diplomové práce je analýza a interpretace vlivu fyzikálních modifikací na povrch poly- $\epsilon$ -kaprolaktonových (PCL) nanovláknenných buněčných nosičů (NBN). PCL je hydrofobní polyester, jehož chemické složení neumožňuje optimální buněčnou adhezi k povrchu materiálu. Ke zvýšení buněčné adheze je proto nutné využít vhodnou povrchovou modifikaci. PCL-NBN byly modifikovány RF doutnavým výbojem v prostředí  $N_2$  a  $O_2$ . Vlivem této modifikace došlo ke snížení obsahu uhlíku detekovaného XPS analýzou a výraznému zvýšení hydrofility povrchu. Druhou použitou fyzikální modifikací byla implantace svazkem urychlených iontů  $O^+$ ,  $N^+$ ,  $C^+$ . Touto modifikací bylo dosaženo zvýšeného obsahu uhlíku a zároveň mírného zvýšení hydrofobních vlastností PCL-NBN. Vlivem obou fyzikálních modifikací došlo k prokazatelnému zvýšení buněčné adheze. Biokompatibilita buněčných nosičů byla hodnocena na základě modelu myších 3T3 fibroblastů.

**Klíčová slova:**

*Elektrospinning, poly- $\epsilon$ -kaprolakton, fyzikální modifikace polymeru, myši 3T3 fibroblasty.*

**Abstract:**

The main goal of this diploma thesis is interpretation of physical modification effect on the surface of poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibrous scaffolds. PCL is hydrophobic polyester with chemical composition that does not allow sufficient cell adhesion to its surface. To improve cell adhesion it is thus necessary to employ a feasible surface modification. PCL scaffolds were modified by RF glow discharge in  $N_2$  and  $O_2$ . Due to this modification carbon content detected by XPS analysis was lowered and hydrophilicity of the surface was increased. Second physical method that was employed for PCL modification was implantation by ion beam consisting of  $O^+$ ,  $N^+$  or  $C^+$  ions. Using this method increased surface concentration of carbon and hydrophobic properties were obtained. Both methods of modification effectively increased cell adhesion. Biocompatibility of PCL scaffolds was evaluated by biological model of mouse 3T3 fibroblasts.

**Key words:**

*Electrospinning, poly- $\epsilon$ -caprolactone, physical modification of polymer, mouse 3T3 fibroblasts.*

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Teoretická část .....	3
2.1 Nanovláknenné buněčné nosiče pro tkáňové inženýrství.....	3
2.1.1 Princip elektrostatického zvlákňování .....	3
2.1.2 Parametry elektrostatického zvlákňování.....	6
2.2 Biologické požadavky na nanovláknenný buněčný nosič.....	8
2.2.1 Interakce mezi buňkami a nanovláknenným buněčným nosičem .....	14
2.3 Fyzikální modifikace biokompatibilních polymerů .....	15
2.3.1 Modifikace netermálním plazmatem.....	15
2.3.1.1 Plazmatická modifikace biokompatibilních polymerů .....	19
2.3.2 Modifikace implantací svazkem urychlených iontů.....	22
3 Experimentální část.....	26
3.1 Materiál a přístroje .....	26
3.2 Metodika .....	28
3.2.1 Příprava PCL nanovláknenné vrstvy.....	28
3.2.2 Plazmatická modifikace .....	29
3.2.3 Iontová implantace .....	29
3.2.4 Materiálová analýza .....	29
3.2.4.1 Plošná hmotnost a tloušťka materiálu .....	29
3.2.4.2 Morfologie PCL nanovláknenné vrstvy .....	30
3.2.4.4 Kontaktní úhel.....	30
3.2.4.4 $\zeta$ – potenciál .....	30
3.2.4.5 X-Ray Photoemission Spectrometry (XPS) .....	31
3.2.5 Testy biokompatibility materiálu .....	31
3.2.5.1 Nasazení 3T3 fibroblastů na PCL-NBN.....	31
3.2.5.2 MTS test buněčné viability .....	31
3.2.5.3 dsDNA kvantifikace.....	32
3.2.5.4 Konfokální mikroskopie.....	33
3.2.5.5 Statistické vyhodnocení biologických testů .....	33
4 Výsledky .....	34
4.1 Buněčné nosiče modifikované RF doutnavým výbojem.....	35

4.1.1 Materiálové vlastnosti .....	35
4.1.2 Biologická charakterizace růstu 3T3 fibroblastů .....	41
4.1.3 Konfokální mikroskop .....	44
4. 4.2 Buněčné nosiče modifikované iontovou implantací (C <sup>+</sup> , N <sup>+</sup> , O <sup>+</sup> ) .....	51
4.2.1 Materiálové vlastnosti .....	51
4.2.2 Biologická charakterizace růstu 3T3 fibroblastů .....	55
4.2.3 Konfokální mikroskop .....	60
5 Diskuse výsledků .....	64
6 Závěr .....	68
Seznam termínů a zkratk .....	69
Seznam obrázků .....	70
Seznam tabulek .....	70
Seznam grafů .....	71
Seznam příloh .....	71
Seznam literatury .....	72
Příloha A: Distribuce průměrů vláken .....	82
Příloha B: Atomární koncentrace prvků (XPS) .....	85



# 1 Úvod

Jednou z klíčových problematik řešených ve tkáňovém inženýrství je vývoj tkáňového nosiče, který by svými fyzikálně chemickými vlastnostmi splňoval požadavky biokompatibilní a zároveň biodegradovatelné nosné struktury, napodobující vlastnosti přírodní extra celulární matrix (ECM). Tento dočasný buněčný nosič by měl plně podporovat růst nové tkáně a zároveň v odpovídajícím časovém intervalu degradovat, aby ustoupil tvorbě nové ECM produkované buňkami v průběhu růstu nové tkáně.

Velmi rozšířenou technologií výroby těchto buněčných a následně tkáňových nosičů je elektrostatické zvlákňování. Tato technologie produkuje nanovláknenné vrstvy, které svou strukturou napodobují přírodní ECM a jsou proto velmi vhodné pro mnohé biomedicínské aplikace.

Některé z hlavních biomedicínských aplikací využívajících nanovláknenné struktury jsou: kryty ran, umělé cévy, srdeční chlopně, implantovatelné tkáňové nosiče, vazy, šlachy, membrány nebo biosenzory.

Tato diplomová práce si klade za cíl shrnout, na základě rešerše a provedených experimentů, vliv dvou fyzikálních modifikací na poly- $\epsilon$ -kaprolaktonové (PCL) nanovláknenné buněčné nosiče (NBN):

- a) Modifikace RF doutnavým výbojem buzeným v  $O_2$  a  $N_2$ .
- b) Modifikace implantací urychlených iontů  $O^+$ ,  $N^+$ ,  $C^+$  produkovaných urychlovačem Tandetron.

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na souhrnnou rešerši popisující princip a parametry výroby NBN. Dále jsou uvedeny biologické požadavky na NBN a některé interakce mezi buňkami a jejich okolní nosnou strukturou. Zároveň jsou v této kapitole charakterizovány obě fyzikální metody použité pro modifikaci PCL-NBN a jejich očekávaný vliv na PCL nanovláknenný materiál.

V diplomové práci jsou uvedeny a diskutovány výsledky povrchových změn materiálových a chemických analýz: hydrofilních vlastností materiálu, chemického složení povrchu, distribuce iontů pohybujících se na povrchu materiálu, změny morfologie nanovláknenné vrstvy, distribuce průměrů vláken, tloušťky a plošné hmotnosti v závislosti na typu a intenzitě fyzikální modifikace.

Biokompatibilita modifikovaných PCL-NBN byla podložena výsledky testů metabolické aktivity (MTS test) a kvantifikací DNA (PicoGreen). Buněčná proliferace byla potvrzena

na snímcích z konfokálního mikroskopu. PCL-NBN osazené myšími 3T3 fibroblasty byly barveny fluorescenčními barvivy: Propidium Iodid a DiOC 6 (3). Tyto biologické testy byly opakovány 1., 4., 7., a 11. den kultivace.

Materiálové analýzy poly- $\epsilon$ -kaprolaktonových nanovláknenných buněčných nosičů probíhaly v nově otevřené laboratoři Univerzitního centra energeticky efektivních budov ČVUT, Buštěhrad. Biologické analýzy byly realizovány v laboratoři ÚEM AV ČR - IBC, Praha 4. Fyzikální modifikace byly provedeny v Ústavu jaderné fyziky AV ČR, Řež a v Ústavu pro nanomateriály a pokročilé technologie, TUL, Liberec.

## 2 Teoretická část

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor využívající znalostí principů inženýrských a přírodních věd k vývoji biologických náhrad sloužících k obnově, podpoře nebo zlepšení funkce tkání. Proces tkáňového inženýrství bývá zobrazen do čtyř hlavních kroků: buněčná izolace, osazení buněčného nosiče (scaffoldu) buňkami, kultivace *in vitro* a implantace scaffoldu *in vivo* (*Langer and Vacanti*) [1].

Nanovlákná představují unikátní možnosti pro tkáňové inženýrství. Malé průměry nanovláken velmi dobře napodobují vlákna extracelulární matrix (ECM), tedy přírodního buněčného nosiče. Poměrně velký povrch nanovláken je výhodný pro buněčné uchycení a povrchovou modifikaci aktivními látkami [2]. V porovnání s makroskopickým povrchem, se u buněk adherovaných na nanovlákněném povrchu ukazuje několika násobně větší obsah specifických adsorpčních proteinů účastnících se fokální adheze (u fibroblastů např. vinculin) [3].

### 2.1 Nanovláknenné buněčné nosiče pro tkáňové inženýrství

Nanovláknenný materiál je možné produkovat řadou technologií (např. elektrostatické zvlákňování, fázová separace, technologie tažení nebo samouspořádání) [4]. Jednou z nejpoužívanějších technologií pro výrobu nanovláknenných struktur je právě elektrostatické zvlákňování, využívající elektrostatických sil k produkci syntetických nebo přírodních polymerních vláken s průměrem od 2 nm do několika mikrometrů [5-7]. Technologii elektrostatického zvlákňování, s použitím vysokého napětí jako první patentoval John F. Cooley roku 1902 (US patent: Apparatus for electrically dispersing fluids), kdy byla popsána experimentální aparatura navržená pro výrobu polymerních vláken za použití elektrostatických sil [8].

#### 2.1.1 Princip elektrostatického zvlákňování

Podle Renekera a Fonga [9] bylo elektrostatické zvlákňování rozděleno do několika fází: počáteční tryska, dloužení napřímených segmentů, počátek bičující nestability a tuhnutí polymeru do tvaru vlákna.

Elektrostatické zvlákňování lze popsat následujícími fyzikálními procesy:

##### 1) Tvorba kapky

Polymerní roztok je pomalu vytlačován směrem ke kapilárnímu hrotu, na němž se tvoří kapka. Bez použitého elektrického pole by kapka, tvořící se na konci kapiláry, spadla

vlivem gravitace. Na kapku o průměru  $r_0$  vytlačenou z kapiláry o vnitřním poloměru  $R$  působí síly povrchového napětí kapaliny  $\gamma$  a gravitační síla  $F_G$  podle vzorce

$$r_0 = \left( \frac{3R\gamma}{2\rho g} \right)^{1/3}, \quad (1)$$

kde  $\rho$  je hustota kapaliny a  $g$  je gravitační konstanta. Za použití dostatečně vysokého elektrického napětí dochází k působení elektrické  $F_E$  a gravitační síly  $F_G$  proti kapilárním silám (tj.,  $F_\gamma = F_E + F_G$ ) a dochází k redukci velikosti kapky na konci kapiláry na poloměr  $r$  ( $r < r_0$ ). V případě laboratorního elektrostatického zvlákňování (tvorba polymerních nanovláken) nebo elektrosprayingu (vlivem nízké molekulové hmotnosti polymeru dochází k tvorbě polymerních kapek spojených velmi tenkými vlákny) z kladně nabitě  $V$  kapiláry, ve vzdálenosti  $L$  od uzemněného povrchu kolektoru, může být velikost elektrických sil  $F_E$  popsána (podle Bugarski et al. [10]) rovnicí

$$F_E = \frac{(4\pi\epsilon V^2)}{\ln\left(\frac{4L}{R}\right)^2}, \quad (2)$$

kde  $\epsilon$  je permitivita media (pro většinu experimentů je mediem vzduch) a  $V$  je aplikované napětí. Bugarski et al. [10] popisují poloměr kapky pro podobné systémy rovnicí

$$r = \left\{ \left( \frac{3}{2} \rho g \right) \cdot \left[ R\gamma - \frac{2\epsilon V^2}{\ln\left(\frac{4L}{R}\right)} \right] \right\}^{1/3}. \quad (3)$$

Se zvyšujícím se napětím  $V$  se progresivně zmenšuje průměr kapky  $r$  pod vlivem nestability systému a dochází k elektrosprayingu. Stabilita elektricky nabitě kapky na konci kapiláry vyžaduje vnitřní napětí vyšší, než jsou síly povrchového napětí použitého polymeru podle vztahu

$$F_E \leq g\rho \left( \frac{r^2}{\beta} - V \right), \quad (4)$$

kde  $g$  je gravitační konstanta,  $V$  je objem kapky,  $\rho$  je hustota kapaliny a  $\beta$  je shape faktor kapky. Maximální povrchový náboj  $Q_R$  na povrchu kapky ve vakuu je nicméně limitován Rayleighho [11] podmínkou

$$Q_R = 8\pi(\epsilon\gamma r^3)^{1/2}. \quad (5)$$

Pokud je  $|Q| > Q_R$ , dochází nejprve k deformaci a poté k rozpadu kapky na velký počet malých částí. Tento jev nastává kvůli četným Coulombovským repulsním silám kladně nabitěho povrchu.

Základní podmínkou elektrostatického zvlákňování je poměr kapilárního tlaku  $p_c$  a elektrického tlaku  $p_e$  kapky, který se řídí vztahem

$$p_c \leq p_e, \quad (6)$$

kdy  $p_c$  je kapilární tlak a  $p_e$  je elektrický tlak. Oba tlaky působící na kapalinu jsou popsány rovnicemi [12]

$$p_c = \frac{2\gamma}{r} \quad (7)$$

$$p_e = \frac{1}{2} \varepsilon E^2. \quad (8)$$

## 2) Formování Taylorova kuželu

Dloužením kapky vzniká kónusový tvar, na jehož hrotu dochází k formování trysky [16, 17]. Taylorův kužel je formován za kritického napětí  $V_C$  aplikovaného na kapku na konci kapiláry o délce  $h$  a poloměru  $R$  podle rovnice

$$V_C^2 = \left(\frac{2L}{h}\right)^2 \cdot \left(\ln \frac{2h}{R} - 1,5\right) \cdot (0,117\pi RT) \quad (9)$$

Proces byl sledován u řady kapalin. Taylor určil rovnost mezi povrchovým napětím a elektrostatickými silami při úhlu poloviny vzniklého kuželu  $49,3^\circ$  [13]. Tato hodnota byla dále přezkoumána v závislosti na daném polymeru nebo tavenině.

## 3) Tvorba trysky na povrchu kapky

Elektrostatické síly (Coulombovská repulze) působící na kapku nejsou dostačující k tomu, aby vedly k rozpadu kapky, což je způsobeno četným provázáním polymerních řetězců koncentrovaného polymerního roztoku. Povrch kapky má snahu vyrovnávat povrchový nahromaděný náboj. Se zvyšujícím se nábojem dochází ke zvětšování povrchu kapky, které se projevuje kuželovitým protažením kapaliny ve směru uzemněného kolektoru. Z tohoto kužele se vytváří tenké vlákno, které představuje dodatečnou plochu potřebnou k vyrovnání povrchového náboje. Vlivem elektrostatických sil dochází k dloužení vlákna, které je po odtržení ukládáno na kolektor [14].

## 4) Dloužení přímých segmentů

Vznik trysky nastává prakticky okamžitě po přiložení kritického napětí. Dále dochází k dloužení trysky a ukládání vláken přímo na kolektor. Experiment Buera et al. prokázal zvyšující se rychlost letícího vlákna se zmenšující se vzdáleností mezi vláknem a kolektorem. Důsledkem je výrazný pokles průměru vlákna, ke kterému dochází díky prodloužení a vypařování rozpouštědla [15].

## 5) Nestabilní bičující zóna

Vlivem elektrického pole vznikají na povrchu trysky nestability. Pod vlivem silnějšího elektrického pole vzniká tzv. bičující nestabilita. Na trysku v této oblasti působí řada elektrostatických odpudivých sil, které nemusí mít nutně axiální směr [16]. Bičující nestabilita způsobuje, že se tryska směrem ke kolektoru formuje do tvaru rozšiřující se spirály [17]. Bičující nestabilita je primární mechanismus zodpovědný za redukcii průměru vláken během elektrostatického zvlákňování [18]. Ve spojení s nerovnoměrným rozložením povrchového náboje způsobuje vznik oblastí s vyšší hustotou náboje. Právě v těchto oblastech dochází k větvení polymerních vláken. K tomuto jevu může dojít např. použitím rozpouštědel s vyšší vodivostí nebo dielektrickou konstantou. Větvením dochází ke zmenšení průměrů vláken, což bylo pozorováno např. u poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) rozpuštěném v  $\text{CHCl}_3/\text{DMF}$  [19,20].

## 6) Formování vlákna

Doba, po kterou prochází tryska bičující nestabilitou, je také závislá na rychlosti odpařování rozpouštědla. Míra těkavosti rozpouštědla je důležitým parametrem určujícím tloušťku vláken. Za nejkvalitnější nanovlákna jsou považována kontinuální vlákna s kruhovým průřezem, neobsahující ve své struktuře kapkové defekty. Mohou však nastat i případy použití materiálu, kdy tato stejnoměrnost naopak není žádoucí.

Základní laboratorní vybavení nezbytné pro laboratorní elektrostatické zvlákňování:

- 1) Viskózní polymerní roztok nebo tavenina.
- 2) Elektroda, která je v kontaktu s polymerním roztokem.
- 3) Vysokonapětový stejnosměrný generátor napojený na elektrodu.
- 4) Uzemněný nebo opačně nabitý povrch, který slouží jako kolektor.

### 2.1.2 Parametry elektrostatického zvlákňování

Hlavní výhodou elektrostatického zvlákňování je poměrně široký rozsah parametrů, kterými může docházet ke změnám celého procesu zvlákňování a zároveň ke změnám fyzikálních a chemických vlastností výsledné nanovlákenné vrstvy. Tyto parametry můžeme členit do tří základních kategorií: procesní parametry, parametry polymerního roztoku a parametry okolního prostředí [19, 21].

#### 1) Procesní parametry

Procesní parametry zahrnují použité napětí, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem, průtok polymeru, tvar a materiál použité elektrody, geometrie kolektoru a rychlost odtahu a materiál nosné vrstvy (např. vliv antistatické úpravy) [2,4,20,21]. Počet Taylorových kuželů na plochu, průměrná délka, životnost a výkonnost trysek.

## 2) Parametry roztoku

Mezi parametry roztoku řadíme koncentraci, elektrickou vodivost, těkavost, povrchové napětí polymerního roztoku, molekulovou hmotnost a distribuci molekulové hmotnosti polymeru. Povrchové napětí polymerního roztoku má významný vliv na průměr vláken a hodnotu kritického napětí. Hodnota povrchového napětí závisí na koncentraci polymerního roztoku, rozpouštědla a přidaných chemických aditivech (např. NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pro zvýšení el. vodivosti) [2,4,21,22].

## 3) Parametry okolního prostředí

Jedním z velmi důležitých parametrů okolního prostředí je teplota (ovlivňující např. viskozitu polymerního roztoku) a rychlost proudícího vzduchu ve zvláknovací komoře. Vlhkost silně ovlivňuje těkavost rozpouštědel (hlavně vodných) a následkem toho i morfologii vláken [2,4,21,23].

Je však velmi důležité zvolit správnou kombinaci všech těchto parametrů k tomu, aby byla vyrobena nanovláknenná vrstva požadovaných chemických a mechanických vlastností. Pro nanovláknenné buněčné nosiče je velmi důležité zachování požadované geometrie a biokompatibility materiálu.

Tabulka 1\_Vliv parametrů přípravy na morfologii nanovláken [24].

<b>Parametry přípravy</b>	<b>Vliv na morfologii nanovláken</b>
Koncentrace/viskozita roztoku	↓-tvorba perliček, ↑-větší vlákna
Vodivost/hustota náboje roztoku	↑-rovnoměrná vlákna bez perliček, menší vlákna
Molekulární hmotnost polymeru/viskozita	↑-redukované množství perliček
Průtok polymer	↓-menší vlákna, ↑-větší vlákna
Intenzita pole/napětí	↓-větší vlákna, ↑-menší vlákna
Vzdálenost jehla-kolektor	↓-menší vlákna, ↑-větší vlákna
Tvar hrotu jehly a průměr	↑ průměr jehly – větší vlákna
Geometrie kolektoru	Kontrolovaná orientace vláken, tvar vrstvy
Parametry okolí (teplota a vlhkost)	↑ teplota - ↓ viskozita, ↑ vlhkost – tvorba kruhových pórů na vláknech

## 2.2 Biologické požadavky na nanovláknenný buněčný nosič

Nanovláknenné buněčné nosiče (NBN) by měly svými fyzikálně chemickými vlastnostmi napodobovat extracelulární matrix (ECM), resp. podporovat buněčnou adhezi, proliferaci, migraci a diferenciaci. Vlastnosti NBN jsou závislé na buněčném typu prorůstající tkáni a jejích růstových faktorech, hormonech a cytokinech [27]. Základními požadavky na nanovláknenný buněčný nosič je biokompatibilita, velký specifický povrch a chemické složení povrchu obsahující bioaktivní chemické skupiny (-CH<sub>3</sub>, -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). 3D struktura tkáňového nosiče by měla umožňovat buněčnou penetraci celým svým objemem prostřednictvím četného výskytu vzájemně propojených pórů [25,26].

ECM obsahuje fibrilární makromolekuly (kolageny, fibronectin nebo elastin) zachytávající specifické tkáňové složky (proteoglykany a glykoproteiny). Komponenty ECM jsou organizované do komplexní proteinové sítě a slouží jako nativní buněčné nosiče. Ve většině orgánů je ECM minoritní součástí tkání, jejíž funkcí je propojení nebo oddělení buněk, stabilizace tkání a orgánů. Oproti tomu v pojivových tkáních (kosti, chrupavky, kůže, šlachy, vazy) zodpovídá ECM za biomechanické vlastnosti tkáně. ECM je v těchto tkáních obsažena ve větším množství než buněčná složka. V závislosti na typu makromolekulární složky, poskytuje ECM dané tkáni elasticitu, tuhost, plasticitu, odolnost tahovým a torzním silám, obdobně jako v kostech, chrupavkách a šlachách [27].

### 1) Biokompatibilita NBN

Biokompatibilita může být definována jako schopnost materiálu vykazovat příznivou odezvu organismu pacienta. Biomateriály mohou být definovány jako materiály, které byly vyrobeny tak, aby vyvolaly specifickou odezvu biologického prostředí. Hlavním rozdílem mezi biomateriály a ostatními materiály je jejich schopnost zůstat v biologickém prostředí, aniž by poškodily okolní tkáň a zároveň schopnost plnit cílovou funkci při interakci s organismem [28]. Biokompatibilní NBN by tedy neměly vyvolávat chronické, vysoce zánětlivé anebo imunogenní reakce, a to nejen bezprostředně po implantaci, ale i v průběhu případné degradace. Pro výrobu nanovláknenných buněčných nosičů se proto používají biokompatibilní přírodní a syntetické polymery (popř. jejich kopolymery), s vysokou čistotou a možností reprodukovatelné výroby [29].

Přírodní polymery svým chemickým složením lépe napodobují ECM. Syntetické polymery dodávají buněčným nosičům spíše lepší mechanické vlastnosti. Výraznou výhodou syntetických polymerů, oproti přírodním polymerům, je reprodukovatelnost výroby [30,31]. Často využívané přírodní biokompatibilní polymery jsou: hedvábí, chitin/chitosan, kolagen a elastin, kyselina hyaluronová, želatina, laminin, fibrinogen.



Příklad syntetických biokompatibilních alifatických polyesterů používaných samostatně nebo v podobě kopolymerů jsou: kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polylaktidová (PLA), poly- $\epsilon$ -kaprolakton (PCL), polyvinylalkohol (PVA)[18,32].

Například PCL je biokompatibilní polymer vyrobený polymerizací  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Tato polymerizace může probíhat vlivem anionických, kationických a koordinačních iniciátorů nebo volnou radikálovou polymerizací otevřením kruhového řetězce [33]. Každá z těchto polymerizačních technologií produkuje PCL s odlišnými molekulovými hmotnostmi, odlišnou distribucí molekulové hmotnosti a možností kopolymerace s jinými monomery [34]. Molekulová hmotnost PCL se pohybuje v rozsahu 3000 – 80000 g/mol. Teplota skelného přechodu PCL je  $T_g = (-60 \text{ }^\circ\text{C})$ , teplota tání  $T_m = 59 - 64 \text{ }^\circ\text{C}$  [35]. PCL je rozpustný v organických rozpouštědlech jako např. chloroform, kyselina octová, aceton, dimethylformamid (DMF), tetrahydrofuran nebo toluen [36].

Hydrolytická degradace PCL probíhá výrazně pomaleji než např. u PLA nebo PGA. Biodegradace PCL probíhající mimo živý organismus je realizována vlivem bakterií a hub. V *in vivo* prostředí nedochází k biodegradaci PCL, ale pouze k jeho bioresorpci, kvůli nedostatku enzymů degradaci zprostředkujících. Bioresorpcí dochází ke štěpení polymerních řetězců a postupnému uvolňování kratších fragmentů [37,38,39]. Degradace PCL má tedy dvě fáze: v první fázi dochází k hydrolytickému štěpení esterových skupin a ve druhé fázi dochází k uvolňování krátkých fragmentů, které jsou fagocytovány například makrofágy [40]. Obecně lze říci, že bioresorbovatelné polymery mají velmi dobré biokompatibilní vlastnosti [41]. Pokud má okolní tkáň nízkou kapacitu eliminace uvolněných polymerních produktů, z důvodu nízké vaskularizace nebo metabolické aktivity, může vést chemické složení uvolněných polymerních fragmentů k dočasným zánětům. Jedním z příkladů může být zvýšení osmotického tlaku nebo změna pH, prokazující se např. lokální kumulací tekutin [42].

## 2) Biodegradace biokompatibilních polymerů

Důležitou vlastností NBN je bilance mezi degradačním procesem polymeru použitého pro výrobu NBN a růstem regenerované tkáně. NBN by měl mít po určitou dobu dostatečné mechanické vlastnosti pro to, aby byl nosnou strukturou proliferačních buněk a zároveň by měl vlivem degradace včas ustoupit nově se vytvářející ECM. Degradace polymeru závisí na obsahu povrchových hydrofilních skupin a celkovém chemickém složení, poměru mezi objemovou a povrchovou částí NBN, dále na krystalinitě polymeru, molekulové hmotnosti a molekulové distribuci, míře použitých síťovacích činidel, hustotě polymeru, mechanismech degradace polymeru a pH (1-9) okolního prostředí biologické tkáně [29].

Biodegradace polymerních materiálů obvykle probíhá rozštěpením hydrolyticky a enzymaticky citlivých polymerních vazeb. Přírodní polymery degradují vlivem enzymů. Syntetické polymery jako např. PLA, PGA, PLGA degradují hydrolýzou esterových vazeb. Rychlost hydrolytické degradace tedy výrazně závisí na morfologii, porositě a chemických vlastnostech povrchu porézní struktury uvnitř buněčného nosiče. Například k celkové degradaci syntetického polyesteru PCL, ( $M_w = 50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) *in vitro* dochází, v závislosti na objemu, po více než 12 měsících [43]. Doba průběhu degradace daného typu polymeru může být řízena kopolymerací polymerů s odlišným intervalem degradace nebo fyzikálními a chemickými modifikacemi [29,43].

### 3) Struktura nanovláknenného buněčného nosiče

Optimální velikost pórů NBN je dána druhem a velikostí kultivovaných buněk (obvykle 10-40  $\mu\text{m}$ ). Velikost pórů nanovláknenného materiálu je velmi závislá na hodnotách průměrů vláken. S klesajícím průměrem nanovláken klesá velikost pórů nanovláknenné vrstvy. K dosažení řízeného rozsahu velikosti pórů, např. 10 – 500  $\mu\text{m}$ , je výhodné použít kombinaci vláken mikronových a submikronových průměrů. Přibližně definované velikosti mezivláknenných pórů lze dosáhnout vlivem koncentrace polymerního roztoku, aplikovaným napětím nebo použitím speciálních kolektorů umožňujících odpovídající orientaci vláken [44].

Dalším důležitým prvkem je propojenost mezi jednotlivými póry. Prostřednictvím těchto mezipórových spojů dochází k buněčné migraci celým objemem NBN, k zajištění přísunu výživy a vyloučení odpadních látek. Buněčný nosič s vhodnou velikostí pórů a odpovídající četností vláknenných spojů mezi póry usnadňuje mezibuněčnou komunikaci a rychlejší proliferaci [29,45]. S těmito požadavky úzce souvisí porozita, která je dána poměrem porézní části buněčného nosiče k poměru polymerní složky. Typické hodnoty porozity nanovláknenných vrstev, produkovaných elektrostatickým zvlákněním se pohybují v rozmezí 70-95% [47].

Nosiče s větším rozsahem velikostí pórů mohou být využity pro kultivaci několika druhů buněk. Například PCL buněčný nosič se zvyšující se velikostí pórů (88-405  $\mu\text{m}$ ) v podélném směru, může vykazovat lepší růst chondrocytů a osteoblastů v oblasti s rozsahem velikostí pórů 380-405  $\mu\text{m}$ , zatímco v oblasti s rozsahem 186-200  $\mu\text{m}$  bude probíhat úspěšnější proliferace fibroblastů [29]. Odpovídající velikostí pórů je možné dosáhnout penetrace 3T3 fibroblastů na PCL buněčném nosiči až do hloubky 250  $\mu\text{m}$  [46]. Pro endoteliální buňky je například vhodná velikost pórů 50-60  $\mu\text{m}$  [29].

Vyjma efektu distribuce pórů je dalším sledovaným faktorem, ovlivňujícím interakci mezi buňkami a materiálem, povrchová drsnost, která zároveň souvisí s hydrofilními vlastnostmi materiálu. Nanostruktury o velikosti pod 100 nm jsou obecně považovány

za vhodné pro buněčnou adhezi a buněčný růst, zatímco mikrostruktury mají často kontroverzní vlastnosti. Mikrostruktury mohou zabraňovat tvorbě konfluentní buněčné vrstvy a buněčné proliferaci. Naopak výhodou je, že zvyšují buněčnou diferenciaci a to hlavně u kostních buněk [29,48].

Jedním z dalších strukturních prvků, který má vliv na interakci s buňkami je orientace vláken, jejímž vlivem lze dosáhnout požadovaného směru růstu buněk. K docílení směrového buněčného růstu např. pro nervovou, svalovou anebo vazivovou tkáň, je vhodné použít k výrobě nanovlákněné vrstvy kolektor umožňující paralelní uspořádání vláken. Naopak pro kožní a pojivové tkáně je vhodná neorientovaná vlákněná struktura, kolektorem potom může být například nosná textilie [32].

#### 4) Mechanické vlastnosti

Mechanické požadavky NBN musí odpovídat konkrétnímu použití podle typu tkáně. Záleží tedy na tom, zda je buněčný nosič vyroben pro měkkou (kůže, cévy, šlachy, játra, apod.), chrupavčitou nebo kostní tkáň. Mechanické vlastnosti těchto tkáňových nosičů jsou charakterizovány např. Youngovým modulem, modulem v tahu a mezi únavy polymerního materiálu [49,50]. Buňky vnímají fyzikální vlastnosti svého nosiče a reagují na ně svými vnitrobuněčnými chemickými signály, kterými řídí kontrolu buněčné exprese, produkci proteinů a fenotypové chování [29].

Kostní tkáň vyžaduje, v závislosti na typu implantátu, strukturu buněčného nosiče charakteristickou spíše vyšším modulem pružnosti. Kostní tkáň je svou strukturou kompozit zahrnující kolagenová vlákna s nanokrystaly hydroxyapatitu vysráženými podél fibril kolagenu. Kolagenová vlákna s nízkým modulem pružnosti mají podélnou orientaci ve směru hlavní zátěže. Vysoká hodnota modulu pružnosti minerálních složek hydroxyapatitu (dosahující přibližně 70 % suché kostní hmoty) ovlivňuje pevnost kostí. Kost je tedy anizotropní materiál, resp. hodnota pružnosti kostí je závislá na směru působení zátěže. Modul v tahu pro tkáňové nosiče kostních náhrad se pohybuje v rozsahu desítek až několika set MPa [49]. Na buněčných nosičích kostní tkáně se kultivují osteoblasty.

K regeneraci měkkých tkání se v chirurgii používá mnoho odlišných druhů buněčných nosičů. Tyto umělé tkáně pomáhají při léčbě nebo náhradě přirozených tkání, které jsou postižené jistým defektem vzniklým vlivem úrazu nebo vyříznutím nádoru. Tkáňové nosiče měkkých tkání slouží většinou jako dočasná mechanická podpora. Modul v tahu se u měkkých tkáňových nosičů pohybuje v rozsahu jednotek až desítek MPa [49]. Na těchto tkáňových nosičích se kultivují např. mezenchymální kmenové buňky, fibroblasty, chondrocyty, epitelové a endotelové buňky nebo keratinocyty.

Výše uvedené mechanické vlastnosti platí pro objemové mechanické vlastnosti daného tkáňového nosiče. Dále je však třeba zaměřit se na i na povrchové vlastnosti polymerních struktur přicházejících do kontaktu s buňkami v první fázi kultivačního procesu. Například velmi měkké a snadno deformovatelné povrchy nemohou odolávat tažným silám vyvolaných buněčnou adhezí. Buňky se nemohou na takovémto materiálu přichytit, rozvinout ani proliferovat, což může vést až k apoptóze [48].

### 5) Hydrofilita povrchu

Důležitým faktorem, hlavně u syntetických polymerů, jsou hydrofilní vlastnosti povrchu. Hydrofilita povrchu závisí na obsahu polárních a nepolárních molekul na povrchu materiálu. Polární povrch způsobuje nízký kontaktní úhel polárních kapalin. Molekulární polarita je závislá na rozdílu elektronegativit mezi jednotlivými atomy a na asymetrii struktury dané chemické sloučeniny. Například molekula vody je polární díky nerovnoměrnému rozložení elektronů a úhlu, který svírají atomy vodíku  $104,45^\circ$ . Vysoce hydrofilní materiály mohou zcela zabraňovat adsorpci buněčných proteinů nebo jsou jejich mezimolekulové vazby velmi slabé. Naopak vysoce hydrofobní povrchy adsorbují buněčné proteiny v rigidní a denaturované formě zabraňující buněčné adhezi. K optimální buněčné adhezi dochází na substrátech s mírně hydrofilními vlastnostmi a kladným nábojem [48].

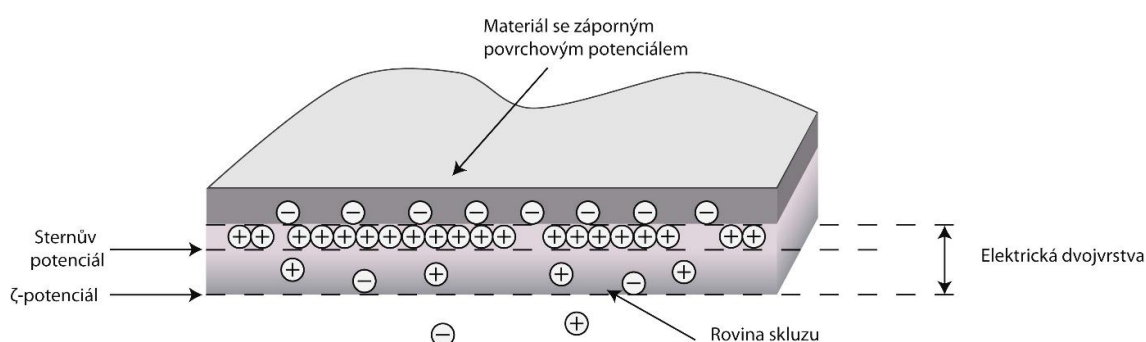
Tabulka 2\_Vliv povrchových skupin materiálu na buňky [59].

<b>Funkční skupina</b>	<b>Vlastnosti</b>	<b>Vliv na buňky</b>
<b>-CH<sub>3</sub></b>	Neutrální, hydrofobní	Zvýšení adheze leukocytů a migrace fagocytů
<b>-OH</b>	Neutrální, hydrofilní	Zvýšení diferenciac osteoblastů
<b>-COOH</b>	Negativní, hydrofilní	Zvýšení adheze osteoblastů
<b>-NH<sub>2</sub></b>	Positivní, hydrofilní	Zvýšení proliferace myoblastů a endoteliálních buněk, zvýšení diferenciac osteoblastů
<b>-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub></b>	Neutrální, hydrofilní	Zvýšení adheze ovariálních buněk čínského křečka

Hydrofilita povrchu může být efektivně regulována některými fyzikálními úpravami, jako je např. iontová implantace, plazmatický výboj, UV záření nebo  $\gamma$  záření. Těmito modifikacemi dochází k aktivování povrchu polymerního materiálu, který může být následně funkcionalizován řadou biomolekul a nanočástic vhodných pro daný buněčný typ a efektivně regulující buněčné funkce [48,51,52].

## 6) Povrchová energie a $\zeta$ – potenciál

Hydrofilní vlastnosti velmi úzce souvisí s hodnotou povrchové energie, která může být počítána např. z kontaktního úhlu kapalin s různou polaritou. K výpočtu povrchové energie z hodnot kontaktního úhlu slouží několik aproximačních metod používaných v závislosti na analyzovaném materiálu (planární povrch, mikročástice, atd.). Povrchová energie materiálu může být také stanovena na základě povrchového  $\zeta$  – potenciálu. Z hodnoty povrchového náboje lze tedy určit biomolekulární afinitu na povrchu polymerního implantátu. V závislosti na zvýšení obsahu polárních chemických skupin, resp. zvýšení hydrofility povrchu materiálu, dochází ke zvýšení hodnoty  $\zeta$  – potenciálu [48].



**Obrázek 1\_ Schematické znázornění povrchového  $\zeta$ -potenciálu.**

Polymerní vzorek je ponořen do vodného roztoku elektrolytu, kde je měřena distribuce kladně a záporně nabitých iontů vyskytujících se na hranici elektrické dvojrstvy (viz obrázek 1). Hodnota  $\zeta$  – potenciálu je tedy závislá na obsahu polárních molekul na povrchu polymerního materiálu a pH okolního vodného prostředí. Například  $\zeta$  – potenciál polymeru PCL je uváděn v záporných hodnotách napětí (mV) [53, 54].

Vhodná modifikace povrchového  $\zeta$  – potenciálu polymerních NBN je důležitá vzhledem k povrchovému náboji buněčných membrán kultivovaných buněk. Na povrchu buněčné membrány jsou dominantní negativně nabitě sulfátové proteoglykany, které ovlivňují buněčnou proliferaci a migraci. Z hodnot povrchového  $\zeta$  – potenciálu lze dále předpokládat průběh fagocytózy polymerních částic. Tento předpoklad může být využit u bioresorbovatelných polymerů (např. PCL), jejichž polymerní řetězce se štěpí na menší fragmenty, které jsou postupně uvolňovány do okolní tkáně [55]. Vliv  $\zeta$  – potenciálu nanovlákněných planárních povrchů na biologické procesy prochází v současné době intenzivním výzkumem.

## 2.2.1 Interakce mezi buňkami a nanovlákněným buněčným nosičem

Základním požadavkem na tkáňový nosič je umožnit buňkám dostatečný rozsah pevných adhezních vazeb. Tyto adhezní spoje zajišťují vazby mezi receptory buněčné adheze a aktivními molekulami ECM. Rozsah a pevnost buněčné adheze hrají rozhodující roli při regulaci aktivity buněčné proliferace a přepínání buněčného naprogramování mezi proliferací, diferenciací a dále ovlivňují velikost plochy adherovaných buněk. Nedostatečná buněčná adheze může způsobit apoptózu [48,60].

Buněčná adheze k syntetickým materiálům je závislá na fyzikálně chemických vlastnostech povrchu materiálu. K buněčné adhezi dochází díky adsorpci buněčných adhezních molekul (např. vitronektin, fibronektin) s výhodnou geometrickou konformací, která tvoří specifické aminokyselinové sekvence přístupné buněčným adhezním receptorům (např. integriny) [48,61].

Buněčná adheze probíhá skrze integrinové receptory. Integriny se selektivně navazují do míst obsahujících tripeptid arginin-glycin-asparagové kyseliny (RGD) [56,57]. Tato vazebná místa jsou detekována aktinovými filopodiemi. Při detekci RGD dochází ke zpětnému signálu z buněčného cytoskeletu obsahujícího filopodia a následnému navázání buněčných integrinových receptorů. Dochází tedy k lokalizaci většího množství integrinových receptorů v této buněčné oblasti. Integriny také fungují jako signální snímače aktivované cestou intracelulárních signálů reagujících na vazby s ECM. Buňka přijímá signály skrze integriny v závislosti na buněčném růstu, proliferaci a diferenciaci [58]. Maximální proliferace, stejně tak jako rychlosti migrace je dosaženo středním rozsahem buněčného roztažení a pevností adheze. Buňky s velmi velkou adhezní plochou a fokální adhezní vrstvou mají zvýšený obsah specifických adhezních molekul a přidružených proteinů (paxillin, talin, vinculin, tensin). Buňky jsou obvykle méně aktivní, pokud jde o migraci nebo proliferaci a naopak více aktivní pokud jde o expresi diferenciačních markerů [48,62].

Po umístění materiálu do biologického prostředí dochází v průběhu nanosekund k tvorbě "vodního pláště". V následujících sekundách až hodinách dochází k pokrytí vrstvou adsorbovaných proteinů, jako je fibronektin a vitronektin, původně přítomných v ECM. Ve třetí fázi dochází k interakci buněk a okolní tkáň s implantovaným materiálem, skrze adsorbovanou vrstvu proteinů. K této fázi dochází v průběhu několika minut až dní po implantaci. Rychlost průběhu je ovlivněna biologickými molekulami, biofyzikálními podmínkami a povrchovými vlastnostmi materiálu [63,64].

## 2.3 Fyzikální modifikace biokompatibilních polymerů

Polymery jsou málo reaktivními materiály, které mají obvykle nízkou povrchovou energii a důsledkem toho i nedostatečnou adhezi [69]. Některé přírodní/syntetické biokompatibilní polymery, používané pro výrobu nosných tkáňových struktur, tak nesplňují zcela požadavky kladené pro biomedicínské aplikace. Z tohoto důvodu je často přistupováno k modifikaci buďto přímo v průběhu výrobního procesu (například kopolymerací) nebo dodatečnými chemickými či fyzikálními modifikacemi. Dodatečnými modifikacemi vznikají kompozitní materiály obsahující odlišné povrchové a objemové vlastnosti [65]. Povrchové vlastnosti materiálu jsou velmi důležité v první fázi buněčné kultivace. Tyto vlastnosti ovlivňují počáteční buněčnou adhezi, proliferaci a migraci porézním materiálem. Velká část studií, zabývajících se přípravou tkáňových nosičů pro klinické aplikace, je proto orientována na vývoj efektivního způsobu modifikace polymerních povrchů [66].

Hlavním cílem fyzikálních modifikací polymerů jsou změny optických, adhezních, elektrických, magnetických, popř. tribologických vlastností. Dále tyto modifikace mohou měnit drsnost povrchu (velikost a hranice jednotlivých zrn) nebo přímo krystalovou strukturu polymeru. Přestože není hlavním záměrem fyzikálních metod změna chemického složení povrchu, některé tyto modifikace mohou vést k chemickým změnám prostřednictvím odstranění nebo přidání nových prvků [67, 89]. Z tohoto důvodu se také v některých případech zahrnují plazmatické modifikace do přechodné skupiny, tzv. chemicko-fyzikálních metod [68].

### 2.3.1 Modifikace netermálním plazmatem

Termínem plazma je označován kvazinetruální plyn obsahující nabitě a neutrální částice, vykazující kolektivní chování [70].

Pojem „plazma“ byl zaveden Tonksem a Langmuirem v roce 1928:

*„Vyjma oblasti blízko elektrod, kde jsou vrstvy obsahující velmi malý počet elektronů, ionizovaný plyn zahrnuje ionty a elektrony v přibližně stejném množství což způsobuje, že výsledný prostorový náboj je velmi malý. Můžeme užít název plazma k popisu této oblasti obsahující vyrovnaný náboj iontů a elektronů.“ [71]*

Plazma vzniká dodáním energie, která je danou látkou absorbována, čímž se látka dostává do excitovaného stavu. Celý systém se tak stává nestabilním a snaží se vrátit zpět do základního stavu. Zároveň dochází k přenosu energie mezi částicemi, vyzáření energie nebo její přeměně na teplo. Ke změně stavu částic dochází intenzivním ohříváním na teploty vyšší, než jsou vazebné energie. Dochází k rozpadu atomů na elektrony, záporné

a kladné ionty, a tak ke vzniku ionizovaného plynu. Teplota všech druhů částic obsažených v plazmatu může být stejná (izotermické plazma) nebo u nabitých částic vyšší (výbojové plazma). Pro výbojové plazma je velmi důležitá intenzita elektrického pole, které ve výboji vzniká přivedením napětí na elektrody. Tepelná rovnováha značí, že je teplota všech částic (elektronů, iontů, neutrálních a excitovaných částic) stejná. Plazma s velkou odchylkou od kinetické rovnováhy se označuje jako netermální. Tento druh plazmatu obsahuje elektrony s teplotou mnohem vyšší než je teplota iontů a neutrálních částic [72].

a) Vysokoteplotní (rovnovážné neboli izotermické) plazma

V případě chemie termálního plazmatu dochází primárně ke generování tepelného výkonu typicky v hodnotách kW – MW. Kvůli vysoké teplotě  $10^3 - 10^4$  K a vysoké specifické entalpii dochází k rozkladu chemických sloučenin, tzv. pyrolýze. Částice, které plazma vytvářejí, mají stejnou kinetickou teplotu. Hovoříme o tepelné rovnováze. Pro vysokoteplotní plazma je charakteristický velmi vysoký stupeň ionizace [73].

b) Nízkoteplotní (nerovnovážné neboli neizotermické) plazma

Netermální plazma má nižší výkon (např. koronový, doutnavý, bariérový výboj). Tento druh plazmatu se vyznačuje výrazně vyšší teplotou elektronů oproti ostatním složkám [74]. Teplota elektronů se typicky pohybuje v rozmezí  $T_e = 1 - 10$  eV (1 eV je roven 11 605 K) a koncentrace nosičů náboje  $n \approx 10^{14} - 10^{15} \text{ m}^{-3}$  [75].

Plazma může být iniciováno přiložením potenciálu na elektrody umístěné v dané plynné atmosféře. Po překročení průrazného napětí dochází k zapálení výboje [76]. Elektrickými výboji nazýváme všechny děje, při nichž se plyn nebo pára stávají elektricky vodivými. Plyny jsou za normálních podmínek izolanty, ale rozštěpením molekul plynu na jeden nebo více elektronů a kladný iont, získáme ionizovaný plyn. Znamená to, že v plynu nebo v páře jsou volně pohyblivé, elektricky nabitě částice (elektrony, ionty). Tyto částice se ve velkých množstvích vlivem elektrického a magnetického pole nebo difúze pohybují ve směru působících sil (kladné ionty ke katodě, záporné k anodě), čímž vzniká elektrický proud [72].

Podmínky plazmatu [70, 72]:

1. Plazma musí splňovat podmínku kvazineutality. Celkový náboj kladných a záporných elektrických nábojů tedy musí být roven nule.
2. Lineární rozměr plazmatu ( $L$ ) musí být výrazně větší než Debyova délka ( $\lambda_D$ ).



$$\lambda_D \ll L.$$

Pokud je jeden z rozměrů kratší, dochází k narušení kvazineutality a plazma nehoří. Debyova délka je definována vztahem

$$\lambda_D = \left( \frac{\varepsilon_0 K T_e}{n e^2} \right)^{1/2}, \quad (10)$$

kde  $K$  je Boltzmanova konstanta,  $T_e$  je teplota elektronů a  $n$  je hustota plazmatu.

Ze vztahu (10) je vidět, že s rostoucí hustotou klesá Debyova délka a naopak s rostoucí termální energií částic ( $KT$ ) se zvyšuje. Debyova délka je definována na základě teploty elektronů kvůli jejich vyšší mobilitě. Základní charakteristikou plazmatu je schopnost odstínění přiloženého elektrického potenciálu. Právě pohyb elektronů (vytváření nadbytku či nedostatku negativního náboje) způsobuje odstínění potenciálu.

3. 
$$N_D \gg 1$$

Vztah (10) je platný v případě dostatečného množství částic, toto množství je v Debyově sféře definováno jako

$$N_D = n \frac{4}{3} \pi \lambda_D^3 = 1.38 \cdot 10^6 \frac{T_e^{\frac{3}{2}}}{n^{\frac{1}{2}}} \quad (11)$$

4. 
$$\omega \tau > 1,$$

kde  $\omega$  představuje frekvenci oscilací plazmatu a  $\tau$  střední dobu mezi srážkami s neutrálními atomy.

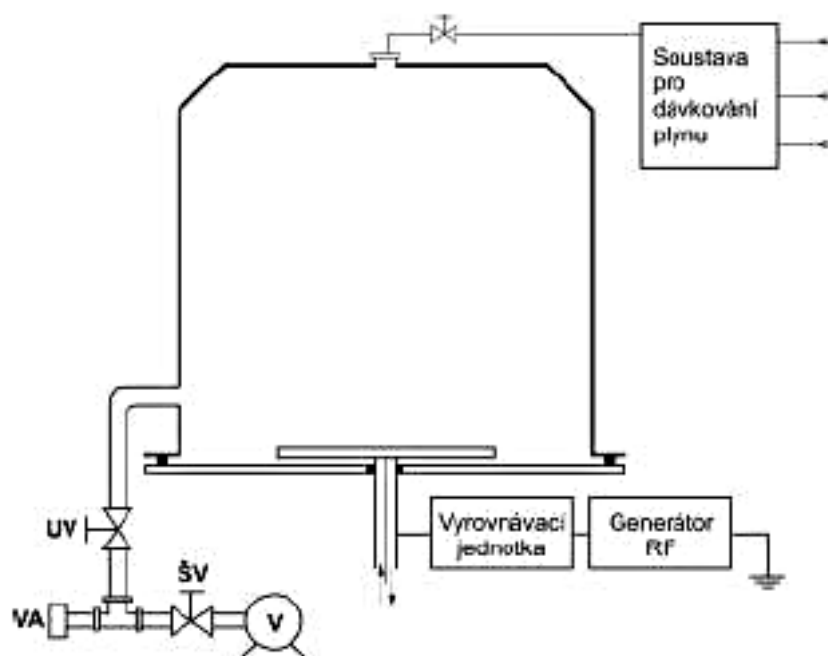
### RF doutnavý výboj

Radiofrekvenční doutnavý výboj je jeden z nejvíce využívaných zdrojů plazmatu vzhledem k jeho schopnosti vytvořit velký objem stabilního plazmatu. Schéma typického zařízení RF doutnavého výboje je zobrazeno na obrázku 2. V tomto výboji je primárním zdrojem radiofrekvenční pole (4 MHz - 13.56 MHz), které udržuje plazma. Tlak plazmatu při hořícím výboji se pohybuje v rozmezí ca  $10^{-3}$  až 100 torr. Elektronová hustota se pohybuje mezi  $10^9$  a  $10^{11} \text{ cm}^{-3}$ , elektrony dosahují teploty v jednotkách eV [76]. Oproti klasickému (DC) doutnavému výboji má RF výboj tu výhodu, že je možné v něm

modifikovat nejen vzorky elektricky vodivé ale i nevodivé (sklo, polystyren). Modifikací doutnavým výbojem dochází k bombardování povrchu materiálu pozitivně nabitými ionty. Modifikace nevodivých polymerů ovšem vyžaduje obnovování množství elektronů ztracených při modifikaci/odprášení povrchu materiálu. Tuto roli plní díky přivedenému RF napětí elektroda, která v tomto případě (obrázek 2) slouží zároveň jako nosný stolek. Aplikace RF pole umožňuje bombardování povrchu polymeru pozitivními ionty a elektrony [77].

Procesní parametry [51]:

- Záporné napětí (V),
- Průtok plynu (sccm),
- Vakuum (Pa),
- Doba modifikace (s),
- Druh plynu.



Obrázek 2\_Schéma aparatury RF reaktoru (Prevac Sp.z.o.o); (UV – uzavírací ventil; VA- vakuometr; ŠV – škrtkový ventil; V - vývěva).

Poly-ε–kaprolaktonové (PCL) nanovláknenné buněčné nosiče (NBN), použité pro experimentální část této diplomové práce, byly plazmaticky modifikovány doutnavým výbojem RF reaktoru (viz obrázek 2), který se skládá z vakuové komory s plazmovým reaktorem ve tvaru válce (průměr = 345 mm, výška = 360 mm), plnícím zároveň funkci horní elektrody (anody). Ve středu dolní části vakuové komory je umístěn stolek sloužící pro uchycení modifikovaného materiálu (katoda). Katoda má průměr  $d = 150$  mm. Tento rozměr zároveň udává maximální velikost vzorků, které mohou být pro danou aparaturu použity. Dolní elektroda je spojena s generátorem elektrické energie vytvářejícím napětí o frekvenci 13,56 MHz s maximálním výkonem 1200 W. Generátor je připojen k pracovní

elektrodě prostřednictvím impedanční vyrovnávací jednotky. Přístroj je také vybaven voltmetrem měřícím potenciál autopolarizace pracovní elektrody. Vakuový systém zajišťuje rotační vývěva. Regulátory pro dávkování plynu jsou řízeny pomocí nezávisle fungujících mikroprocesorových ovladačů, které jsou ručně ovladatelné a umožňují nastavení průtoku s přesností 0,1%.

### 2.3.1.1 Plazmatická modifikace biokompatibilních polymerů

Netermální plazma působí na polymerní substrát prostřednictvím excitačních, deionizačních a disociačních procesů vyvolaných účinkem volných radikálů, které vkládají, vytváří či odebírají funkční skupiny na povrchu materiálu [78].

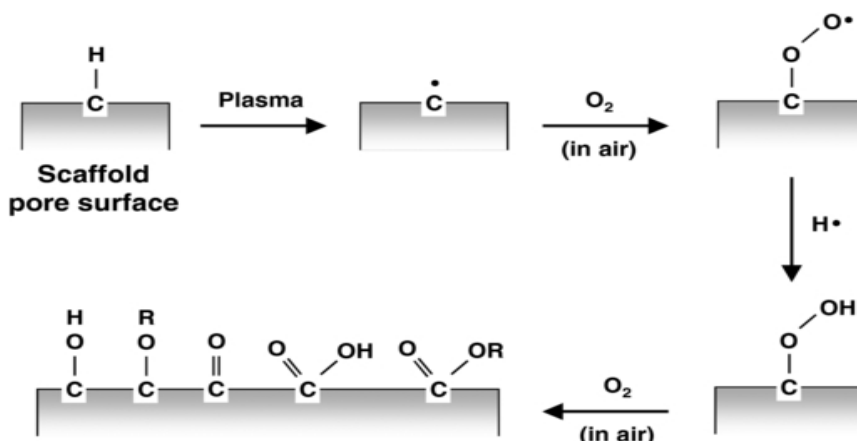
Reakce plazmatu s polymery mohou být děleny následovně [79]:

- 1) Povrchové reakce – dochází k reakci mezi složkami plynné fáze a povrchovými chemickými skupinami polymeru. Tvoří se nové funkční skupiny a dochází k síťování povrchu. K těmto reakcím dochází např. při použití Ar, NH<sub>3</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>O.
- 2) Plazmatická polymerizace – polymerizací organických monomerů v plazmatu vzniká tenký film na povrchu polymeru. Zahrnuje reakce mezi plynnými složkami, plynnou fází a povrchem a také reakce v rámci povrchu materiálu.
- 3) Leptání – fyzikálním leptáním a chemickými reakcemi za vzniku těkavých produktů dochází k odstranění malých částic z povrchu polymerního materiálu. K naleptání polymerů se často využívá plazma obsahující kyslík.

Netermální plazma, obsahující mix iontů, elektronů, neutronů, fotonů, volných radikálů, metastabilních excitovaných částic, molekulových a polymerních fragmentů, se používá k řízené funkcionalizaci povrchu polymerních vláken. Tloušťka modifikované vrstvy závisí na délce a intenzitě procesu. Celý proces probíhá za pokojové teploty. Schéma interakcí plazmatu s povrchem NBN je také znázorněno na obrázku 3. Ošetření kyslíkovým plazmatem se často využívá ke vnášení oxidovaných funkčních skupin na povrch polymeru. Například CO<sub>2</sub> se využívá k tvorbě karboxylových chemických skupin, amoniak a dusík ke tvorbě aminových skupin. Využívají se i inertní plyny, které vytvářejí na povrchu polymeru radikály využitelné pro následnou polymerizaci [51].

Při modifikaci plazmatem dochází k leptání vláken, což způsobuje jistá omezení. Tímto vlivem se snižují průměry vláken, zvyšuje se porozita a modifikuje se povrchová struktura vlákna. Vysoká intenzita plazmatu by mohla vést až k destrukci vlákně vrstvy. Procesní podmínky plazmatu je možné upravit dle požadované intenzity narušení nanovlákně vrstvy. Modifikace tedy nemusí nutně vyvolat změnu objemových

vlastností. S časem mírně roste koncentrace chemických skupin, ve kterých O<sub>2</sub> a C sdílí dvojnou vazbu, zatímco hlavní vlákenná struktura přetrvává [78].



Obrázek 3\_Schéma interakcí mezi buněčným nosičem a kyslíkovým plazmatem [80].

Faktory ovlivňující výběr parametrů plazmatické modifikace [81]:

- 1) Rozsah modifikované vrstvy. Většinou je žádoucí jen tenká povrchová modifikace (např. u nanovláknenných vrstev). U povrchových modifikací, které zasahují do větší hloubky, dochází zároveň ke změně mechanických vlastností (vhodné např. u řízené degradace polymeru).
- 2) Musí být zajištěna dostatečná atomární a molekulová mobilita, aby mohly nastat změny povrchu v příslušném časovém intervalu. Pro povrchové změny je důležitá nízká mezifázová energie.
- 3) Zamezením tvorby vratných reakcí by mělo být dosaženo maximální chemické stability. Stability polymerní vrstvy může být dosaženo síťováním anebo inkorporací objemných částic zabráňujícím pohybu povrchové struktury.
- 4) V některých případech je třeba pracovat s transparentními buněčnými nosiči, např. u optických senzorů nebo očních čoček, které musí zůstat transparentní i po plazmatické modifikaci.
- 5) V průběhu celého procesu musí být zajištěna rovnoměrnost modifikace, opakovatelnost procesu, stabilita modifikovaného povrchu, požadovaná rychlost procesu, kontrolovatelnost průběhu procesu a přiměřená cena.
- 6) Analýza funkčních skupin vznikajících na povrchu polymeru je také velmi důležitým ukazatelem průběhu modifikace. Tato oblast je prozatím jen velmi náročně predikovatelná. Na povrch polymeru se pojí mnoho chemických skupin, jako jsou např.: hydroxylové, etherové, karbonylové, karboxylové a karbonátové skupiny.

Výhody plazmatických modifikací [76]:

- Fyzika a chemie plazmatu je široce zkoumanou oblastí, ve které již bylo dosaženo rozsáhlého teoretického popisu.
- Plazmatické modifikace jsou poměrně spolehlivě opakovatelné metody s relativně nízkými náklady. Jedná se o modifikace aplikovatelné na různé materiály (kovy, polymery, keramika, kompozity) odlišných velikostí. Plazmatické procesy lze sledovat pomocí in-situ diagnostiky.
- Ošetření plazmatem má za následek změny řady povrchových chemických, elektrických, mechanických, biologických aj. vlastností. Vhodná aplikace vytváří kompaktní nánosy.
- Plazmatické ošetření může vytvářet sterilní povrchy s možným použitím i pro průmyslové aplikace.
- Plazmatické modifikační metody je možné využít s různými maskami pro vzorování povrchu.

Vliv plazmatické modifikace na PCL film

RF výboj (v prostředí O<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>) aplikovaný na PCL film - výrazné snížení kontaktního úhlu (H<sub>2</sub>O) z původní hodnoty  $\alpha = 80^\circ$  (před modifikací), na  $\alpha = 41^\circ$ - $65^\circ$  (po modifikaci). S narůstajícím časovým intervalem byla prokázána částečná vratnost vlivu plazmatického ošetření, Jokinen et al. [82].

RF výboj (vzdušná atmosféra) aplikovaný na PCL nanovláknennou vrstvu – Nárůst koncentrace O a N na povrchu materiálu. Modifikace neměla vliv na mechanické vlastnosti. Snížení kontaktního úhlu (H<sub>2</sub>O). Ve 3. a 7. dni došlo ke zvýšené proliferaci a rozvinutí morfologie buněk hladké svaloviny. *In vivo* testy neprokázaly zánětlivou reakci, naopak byla prokázána rychlejší tvorba nové tkáně, de Valence et al. [83].

Dielektrický bariérový výboj (vzdušná atmosféra, helium, argon) - PCL film a 3D porézní nosič. Snížení kontaktního úhlu, nejvíce u modifikace výbojem buzeným v He atmosféře. Vzorky modifikované v Ar a vzdušné atmosféře prokázaly nárůst výskytu O, u vzorků modifikovaných v He atmosféře se projevil nárůst O a N. Došlo ke zvýšené adhezi lidských fibroblastů, bez většího rozdílu mezi jednotlivými modifikacemi, Jacobs et al. [84].

### 2.3.2 Modifikace implantací svazkem urychlených iontů

Urychlovače částic byly původně využívány pro základní výzkum v oblasti jaderné a atomární fyziky. S rozvojem technologie umožňující produkci iontových svazků (obsahujících ionty prvků velké části periodické soustavy) s energiemi až stovek keV, se urychlovače staly důležitým nástrojem v materiálovém inženýrství [85]. Pro speciální aplikace jako je například tvorba dlouhých iontových drah v polymezech se používají energie v řádech až jednotek GeV [86].

Využití svazku urychlených iontů k implantaci polymerů představuje další fyzikální metodu umožňující modifikovat jak povrchové, tak částečně i objemové vlastnosti biopolymerních buněčných nosičů. Polymerní materiál může být modifikován do hloubky desítek nm až set  $\mu\text{m}$ . Určení penetrační hloubky je však často problematické. Nízké implantační dávky je těžké změřit, obzvláště v případech kdy je implantovaný prvek součástí základního materiálu. Je sice možné penetrační hloubku/dolet teoreticky určit pomocí specializovaných programů jako je např. SRIM [87], ale v případě nanovlákných s obtížně stanovitelnou hustotou daného výrobku, jsou hodnoty doletu pouze orientační.

Iontový svazek obsahuje vysokoenergetické ionty extrahované z iontového zdroje a urychlené pomocí elektrického pole. Celý proces probíhá v implantační komoře za vysokého vakua ( $10^{-1} - 10^{-5}$  Pa). Výsledná implantační dávka iontů, je dána dobou ozařování a nabývá většinou hodnot  $10^{12} - 10^{17}$  iontů/ $\text{cm}^2$ . Pro biologické účely se využívají ionty kyslíku, dusíku, halových prvků, vzácných plynů, popř. netoxických kovů (např. Ti, Au) [48].

Vlivem implantace iontovým svazkem je možné modifikovat řadu materiálových vlastností, např. tvrdost, Youngův modul, tření, nasákavost a adhezi buněk. Tuto fyzikální modifikaci je možné úspěšně použít i pro materiály vysoce odolné proti chemickému ošetření [65].

Rozdělení energie iontového svazku podle využití [86]:

- $> 1$  keV: ionty prakticky neprostupují do materiálu, používá se pro modifikaci povrchu
- 1 – 100 keV: nízkoenergetická implantace
- oblast MeV energií: hlubší implantace
- až GeV: tvorba iontových kanálů a drah v materiálu

Energetické ionty prostupující materiálem ztrácejí svou původní energii elastickými kolizemi s jádry atomů a neelastickými kolizemi s elektrony v atomovém obalu polymerních prvků. Účinek těchto kolizí na polymerní materiál je možné zobecnit tak, že elastické procesy vedou k degradaci materiálu (štěpení polymerních řetězců na kratší fragmenty) a neelastické k ionizaci a uvolňování vodíku neboli dehydrogenaci. Vazby narušené dehydrogenací snadno vytvářejí vazebné spoje mezi sousedními polymerními řetězci a dochází k tzv. síťování polymeru [48,88]. Z 1D struktur se tak stávají 3D struktury se zvýšenou tvrdostí a vyšší hodnotou Youngova modulu [65,48]. Vlivem dehydrogenace dochází také ke zvýšení koncentrace uhlíku v modifikované vrstvě materiálu, zvláště při vyšších dávkách. Tento proces se také označuje jako karbonizace materiálu a je provázen změnou barvy materiálu a snížením transparentnosti [48].

Degradované fragmenty polymerních makromolekul mohou reagovat s kyslíkem obsaženým v okolní atmosféře a vytvářet tak oxidované struktury (např. karbonylové, karboxylové, esterové skupiny) které zvyšují polaritu povrchu [48]. Štěpení polymerních řetězců, následné síťování a konjugace vazeb se také využívá pro modifikaci vodivosti materiálu. V závislosti na parametrech implantace a typu polymeru je možné vodivost zvýšit až o 20 řádů. Iontová implantace se dá dále použít i pro úpravu optických, magnetických či tribologických vlastností [89].

Procesní parametry:

- Elektrický proud svazku (nA)
- Energie (eV)
- Náboj a druh implantovaných iontů
- Doba implantace (min)

Tandetron MC 4130

Poly-ε-kaprolaktonové (PCL) nanovláknenné buněčné nosiče (NBN), použité pro experimentální část této diplomové práce, byly implantovány energetickými ionty z urychlovače Tandetron (MC 4130, HVE Europa B. V.).

Tandetron má možnost využít 3 druhy iontových zdrojů. Dva iontové zdroje jsou duoplazmatronového typu (produkce protonů a  $\alpha$ -částic) a třetí je tzv. sputter umožňující produkci iontů odprášených z pevných materiálů (např. BN, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiH, Si, Au apod.) bombardovaných Cs ionty o energii 5 keV.

Iontový urychlovač Tandetron je elektrostatický urychlovač tandemového typu. Nabitě částice procházejí urychlovací trubicí Tandetronu, která je dělena terminálovou elektrodou na nízkoenergetickou a vysokoenergetickou část. V nízkoenergetické části jsou záporně

nabité ionty urychleny směrem k terminálové elektrodě. Jedenkrát nabité ionty tak získají energii až 3 MeV. Na úrovni terminálové elektrody je umístěn tzv. stripper (úzký prostor obsahující dusík), kde záporně nabitě částice ztrácejí elektrony a stávají se z nich kladně nabitě ionty. Rozsah energií iontů je ca 400 keV – 20 MeV. Energie takto urychleného iontu lze vypočítat podle rovnice

$$E = (n + 1) \cdot U_T, \quad (12).$$

kde  $n$  představuje velikost iontového náboje a  $U_T$  terminálové napětí. Kationty s různou velikostí náboje jsou dále urychleny ve vysokoenergetické části urychlovací trubice, směrem od terminálové elektrody k separačnímu magnetu. Separační magnet má 5 výstupů pod úhly  $0^\circ$ ,  $\pm 10^\circ$ ,  $\pm 30^\circ$ . Zde se podle nastavení magnetu vyberou ionty požadované energie a náboje a svazek se zavede do pracovní komory na jedné z tras.

### 2.3.2.1 Iontová implantace biokompatibilních polymerů

Iontové urychlovače mohou být pro modifikaci polymerů využity dvojitým způsobem. Přímou modifikací povrchové vrstvy materiálu anebo odprašováním atomů/molekul vstupního materiálu a nanášením na povrch materiálu.

Vliv iontového svazku na modifikovaný polymer:

- 1) Dehydrogenace polymeru [48,88].
- 2) Síťování polymeru a karbonizace povrchu [48,88].
- 3) Štěpení polymerních makromolekul, změna optických vlastností [89].
- 4) Zvýšení elektrické vodivosti polymerní vrstvy [89].
- 5) Snížení drsnosti povrchu a změna kontaktního úhlu [90].
- 6) Změna Youngova modulu modifikovaného materiálu [65].
- 7) Změna barvy a transparentnosti [48].
- 8) Změna chemického složení povrchu, vznik povrchových domén [48].
- 9) Zvýšení proteinové adsorpce [91,94,95].
- 10) Změna buněčné diferenciaci [92].

Faktory ovlivňující výběr parametrů iontové implantace:

- 1) Hloubka modifikované vrstvy – pro modifikaci polymerů se většinou používají iontové urychlovače nízkých až středních energií, podle hustoty materiálu a hloubky modifikované vrstvy [87].
- 2) Implantační dávka (poč. iontů na  $\text{cm}^2$ ) – hustota iontů bombardující povrch polymerního materiálu je odvozená od intenzity a časového intervalu působícího svazku. V závislosti na chemickém složení a tloušťce materiálu, může při vyšších dávkách urychlených iontů dojít až k degradaci polymeru [89].



- 3) Hloubkový profil implantovaných iontů – hloubkový rozsah implantovaných iontů je možné simulovat například pomocí softwaru SRIM. Tento program lze však využít jen pro homogenní materiály s přesně definovanou hustotou [87].
- 4) Typ modifikovaného materiálu – chemické složení a krystalinita polymeru [48].

Výhody modifikace svazkem urychlených iontů:

- 1) Implantace svazkem urychlených iontů je velmi přesně fyzikálně charakterizovaný proces vedoucí k rovnoměrné a reprodukovatelné modifikační metodě [86].
- 2) Při použití vysokých energií lze implantovat ionty do velké hloubky [86,87].
- 3) Pro iontovou implantaci lze použít prvky velké části periodické tabulky [86].

### **Vliv iontové implantace na PCL film**

Implantace iontovým svazkem  $\text{Ar}^+$ ,  $E = 50 \text{ keV}$  (dávka  $10^{15} \text{ at/cm}^2$ ) - Výrazný úbytek kyslíku (22-34%), pokles množství  $\text{COO}^-$  vazeb a nárůst C-O-C, C-OH a C=O skupin. Snížení povrchové drsnosti z původních 4,43 nm (RMS roughness) na 0,94 nm. Kontaktní úhel PCL vzorku nebyl významně změněn. Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu se po implantaci v rozsahu pH 4-8 prakticky nelišily, rozdíl ukazuje pouze hodnota naměřená pro pH 9 (-40 mV bez modifikace, -36 mV po implantaci). Pro studium adsorpce RGD tripeptidů byly vzorky PCL implantovány přes masku, přičemž došlo k navázání pouze na modifikovaná místa PCL filmu, Satriano et al. [90].

Implantace iontovým svazkem Ar a He,  $E = 25$  a  $100 \text{ keV}$  (dávka  $10^{14} \text{ at/cm}^2$ ) - Obdobná změna chemických skupin pro oba typy iontů (-COO skupiny kaprolaktonu byly přeměněny na C-(C=O)-C a O-C-O). Zvýšení kontaktního úhlu, z původní hodnoty  $\alpha = 75.7^\circ$  až na  $\alpha = 82.7^\circ$ , pro implantaci Ar.  $\zeta$ -potenciál pro implantované vzorky vykázal mírný nárůst, z  $\zeta$ -potenciál = (-33) mV pro pH = 9, na (-37) mV po implantaci He. Pro Ar byl trend výraznější, při pH = 9  $\zeta$ -potenciál = (-43) mV. Byla testována adsorpce proteinů pro vzorek implantovaný Ar 25 keV. Byla naměřena dvojnásobná adsorpce BSA (bovine serum albumin) ve srovnání s nemodifikovaným vzorkem, Manso et al. [91].

Implantace PCL filmu iontovým svazkem  $\text{He}^+$ ,  $E = 10 \text{ keV}$  (dávka  $5 \cdot 10^{15} \text{ at/cm}^2$ ) – Úbytek 50% původního množství kyslíku. Mírné zvýšení kontaktního úhlu z  $\alpha = 70^\circ$  pro nemodifikovaný vzorek na  $\alpha = 75^\circ$ . Modifikovaný buněčný nosič byl osazen lidskými MSC. Po uplynutí 4 – 5 týdnů byla pozorována diferenciací MSC na funkční osteoblasty, Marletta et al. [92].

### 3 Experimentální část

Hlavním cílem experimentální části této diplomové práce bylo testování změn materiálových vlastností a ověření biokompatibility poly- $\epsilon$ -kaprolaktonových nanovlákných buněčných nosičů (PCL-NBN) v závislosti na dané fyzikální modifikaci. PCL-NBN byly modifikovány RF doutnavým výbojem (buzeném v prostředí  $O_2$ ,  $N_2$ ) a implantací iontovým svazkem ( $O^+$ ,  $N^+$ ,  $C^+$ ).

Charakterizace materiálových vlastností je zaměřena především na analýzu povrchu modifikovaného materiálu. Chemické a fyzikální vlastnosti povrchu buněčných nosičů mají výrazný vliv na adhezi proteinů a posléze buněčnou fyziologii. Tato diplomová práce uvádí výsledky analýz chemického složení povrchu, hydrofilních vlastností materiálu, distribuce iontů na povrchu materiálu, změny morfologie nanovlákné vrstvy, distribuce průměrů vláken, tloušťky a plošné hmotnosti v závislosti na typu a intenzitě fyzikální modifikace

Biokompatibilita fyzikálně modifikovaných PCL-NBN byla ověřena testy metabolické aktivity (MTS) a kvantifikací DNA (PicoGreen). Jako buněčný model byla použita linie myších 3T3 fibroblastů. Buněčná proliferace je potvrzena také na snímcích z konfokálního mikroskopu.

#### 3.1 Materiál a přístroje

Vliv fyzikálních modifikací na změnu povrchu PCL-NBN byl vyhodnocen materiálovou analýzou povrchu a biologickými testy metabolické aktivity a proliferace myších 3T3 fibroblastů. Materiál a přístroje používané v průběhu experimentů jsou uvedené v tabulce 3 a 4.

Tabulka 3\_Seznam použitých chemikálií.

Název	Katalogové číslo	Výrobce
Dioc 6 (3)	D 273	Invitrogen
DMEM L- glutamin (Dulbecco's modified eagle' medium)	D 6429	Sigma Aldrich
EDTA	E5134	Sigma Aldrich
Etanol	02850-1	Penta
Fetal bovine sérum	A11-102	PAA

Glycerol (85%)	14550-11000	Penta
Chloroform	C7559	Sigma Aldrich
KCl	16150-11000	Penta
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12290-31000	Penta
MTS	G3581	Promega
NaCl	7647-14-5	Penta
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15120-31000	Penta
PCL ( <i>M<sub>w</sub></i> = 45 000)	704105-100G	Sigma Aldrich
Penicilin/Streptomycin	P11-010	PAA
PicoGreen Quant - iT ds DNA assay kit	Q33120	Invitrogen
Propidium iodid	P 4864	Sigma Aldrich
SDS	L3771	Sigma Aldrich
Sodium deoxycholate	30970	Sigma Aldrich
Tris	T1503	Sigma Aldrich
Triton X-100	T8787	Sigma Aldrich
Trypsin – EDTA	L11-659	PAA

Tabulka 4\_ Seznam použitých přístrojů.

<b>Přístroj</b>	<b>Výrobní název</b>	<b>Výrobce</b>
Analytické váhy	T5939	Kern
CO <sub>2</sub> inkubátor	MCO-17AI	Sanyo
Fluorescenční reader	Infinite M 200 PRO	TECAN
Konfokální mikroskop	FV10i	Olympus
Laboratorní nanospider	NS 1WS500U	Elmarco
Laminární box	MSC 12	Thermo Scientific
Magnetická míchačka	MAG HS 7	Vitrum
Naprašovačka kovů/uhlíku pro SEM/TEM	Q 150R S	Quorum
Optický mikroskop	TH4-200	Olympus
RF-Plazmatická komora	Plazmatická komora	Prevac Sp.z.o.o
Skenovací elektronový mikroskop (SEM)	Vega3 SBU	Tescan

Sterilizátor	SteriVac	MAC
See system for surface energy measurement	See System E	Advex Instruments
Tandetron	MC 4130	HVE Europa B.V.
Termomechanická analýza	TMA PT 600LT	LINSEIS
Tloušťkoměr	Thickness lab - 1880	MESDAN LAB
Vibro viscometer	SV-10	A&D
Vodní lázeň	NB-301	BIOTEK
Vortex	VX-200 Lab Vortex	Labnet
X-Ray photoemission spectrometry (XPS)	Phoibos 100	Specs
Zetasizer – nano series	ZS90	Malvern Instruments

## 3.2 Metodika

PCL-NBN byly vyrobeny technologií elektrostatického zvlákňování. Tyto nanovlákněné vrstvy byly dále modifikovány fyzikálními metodami a analyzovány z hlediska vlivu dané fyzikální modifikace.

### 3.2.1 Příprava PCL nanovlákněné vrstvy

Pro výrobu nanovlákněné vrstvy byl zvolen syntetický biopolymer PCL, který se vyznačuje především velmi dobrými biokompatibilními i mechanickými vlastnostmi a dlouhodobou degradací polymerních řetězců.

Nanovlákněná vrstva byla zvlákněna z 24% roztoku poly- $\epsilon$ -kaprolaktonu ( $M_w = 45\ 000$ , Sigma Aldrich). Jako rozpouštědlo PCL byl použit roztok chloroform/etanol v poměru 9:1. Viskozita polymerního roztoku  $\eta$  byla měřena na vibračním viskozimetru (SV-10, A&D) při teplotě 20 – 50 °C.

Nanovlákněná vrstva byla zvlákněna technologií elektrostatického zvlákňování z roztoku na laboratorní lince typu Nanospider (NS 1WS500U, Elmarco). Polymer byl nanášen na ocelovou statickou strunovou elektrodu. Nanovlákněná vrstva byla vlivem elektrostatických sil nanášena na nosnou netkanou textilií Spunbond. Tato nosná textilie byla umístěna pod uzemněným kolektorem, ve vzdálenosti 180 mm nad strunovou elektrodou. Základní procesní parametry ve zvlákňovací komoře byly následující: vzdušná vlhkost 40-60 %, teplota prostředí 25 °C, napětí  $U = 50 - 60$  kV.

### 3.2.2 Plazmatická modifikace

Plazmatická modifikace PCL-NBN proběhla v nízkotlakém RF reaktoru (Prevac Sp.z.o.o). Vzorky PCL-NBN byly umístěny přímo na elektrodu (nosný stolek) a vystaveny RF doutnavému výboji (vybuzeném v O<sub>2</sub> nebo N<sub>2</sub> atmosféře) po dobu 15 s. Tlak v komoře byl pro všechny typy modifikací konstantní  $p = 8$  Pa. Rychlost průtoku plynů  $v_p = 10$  sccm (standard cubic centimeters per minute). Plazmatická modifikace byla provedena při napětí:  $U_1 = (-100V)$  a  $U_2 = (-200V)$ . Všechny vzorky PCL-NBN byly modifikovány oboustranně.

### 3.2.3 Iontová implantace

Kruhové vzorky PCL-NBN o průměru 5 cm byly uchyceny do držáku a umístěny do implantační komory urychlovače Tandetron MC 4130. Tlak v komoře byl v průběhu implantace snížen na hodnotu  $p = 5 \cdot 10^{-6}$  mbar. Pro produkci iontů byl v Tandetronu použit odprašovací (sputter) iontový zdroj. Zdrojovým materiálem pro anionty C, O a N (viz níže) byl nitrid boritý smíchaný s grafitem (BN+C). Vzorky byly implantovány iontovým svazkem o energii  $E = 800$  keV. Implantační dávka byla pro všechny vzorky konstantní, tj.  $D = 10^{12}$  at/cm<sup>2</sup>. Čas implantace pro C<sup>+</sup>, O<sup>+</sup> a N<sup>+</sup> nutný pro dosažení požadované dávky byl 23, 20 a 3 s, respektive. Všechny vzorky byly modifikovány oboustranně.

### 3.2.4 Materiálová analýza

Materiálová analýza PCL nanovlákných vrstev, modifikovaných RF doutnavým výbojem a iontovým svazkem tandemového urychlovače, byla zaměřena na charakterizaci vlivu těchto modifikací na povrch nanovlákného materiálu. Zhodnocení vlivu dané fyzikální modifikace na změnu materiálových vlastností bylo analyzováno na základě: chemického složení povrchu materiálu pomocí X-ray Photoemission Spectroscopy (XPS), povrchového  $\zeta$  – potenciálu, kontaktního úhlu (H<sub>2</sub>O), snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a změny plošné hmotnosti nanovlákného materiálu.

#### 3.2.4.1 Plošná hmotnost a tloušťka materiálu

Průměrná hodnota plošné hmotnosti PCL nanovlákné vrstvy byla určena z hmotnosti 5 kruhových vzorků vyražených raznicí o průměru 15, 8 mm. K vážení vzorků byly použity analytické váhy (T5939, Kern).

Průměrná hodnota tloušťky PCL nanovlákné vrstvy byla měřena laboratorním tloušťkoměrem (Thickness lab – 1880, MESDAN LAB). Uvedené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky byly počítány z deseti měření. Thickness lab - 1880 měří hodnotu tloušťky textilie za normovaného přítlaku 1 kPa na 20 cm<sup>2</sup>.

#### 3.2.4.2 Morfologie PCL nanovláknenné vrstvy

Vizualizace morfologických změn nanovláknenné vrstvy byla sledována na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) (Vega3 SBU, Tescan).

Vzorky nanovláknenných vrstev byly přilepeny na hliníkový nosný terčík a umístěny do vakuové komory naprašovačky kovů/ uhlíku (Quorum Q 150R S). Režim naprašování byl nastaven na QT Timed Gold s procesními parametry  $p = 10^{-1}$  mBar,  $I = 20$  mA. Na vzorky byla v Ar atmosféře nanášena tenká vrstva Au za účelem zvodivění povrchu polymeru PCL. Zvodivěním povrchu polymerního materiálu je zabráněno kumulaci náboje vytvořeného elektrony bombardujícími povrch materiálu. Pozlacené targety s nanovláknennými vzorky byly ve SEM sledovány v módu odražených elektronů s konfigurací optiky v modu Resolution, při napětí  $U = 30$  kV. Snímky byly pořízeny při zvětšení: 500x, 3000x a 30 000x. Tyto snímky byly dále použity k měření průměrů vláken. Aritmetický průměr byl vyhodnocen z 300 naměřených hodnot. K měření průměrů vláken byl použit software NIS-Elements.

#### 3.2.4.4 Kontaktní úhel

Změna kontaktního úhlu mezi testovací kapalinou a nanovláknennou textilií byla měřena přístrojem See System (Advex). Jako testovací kapalina byla použita destilovaná voda ( $H_2O$ ) s povrchovým napětím  $\sigma = 72,75$  mN/m [10,11]. Na nanovláknennou textilií, uchycenou na kovovém pomocném stolku, byly mikropipetou kapány kapky o objemu 5  $\mu$ l. Hrot špičky pipety byl uchycen ve stabilní vzdálenosti 3 cm nad povrchem textilie. Měření kontaktního úhlu bylo realizováno při teplotě 25 °C.

Záznam sekvence obrazu deformace kapaliny byl nastaven na časový interval 0,1 s. Kontaktní úhel mezi kapalinou a povrchem textilie byl měřen softwarem See system. Hodnota kontaktního úhlu je vypočtena aritmetickým průměrem z deseti měření.

#### 3.2.4.4 $\zeta$ – potenciál

$\zeta$ -potenciál byl měřen na přístroji Zeta sizer – nano series (ZS90, Malvern Instruments) v módu Surface zeta potential při teplotě 25 °C. Zdrojem světla tohoto přístroje je He-Ne laser o vlnové délce 633 nm. Měření probíhalo snímáním přímého rozptylu světla v pěti snímacích polohách se vzestupnou vzdáleností od vzorku s intervalem 125  $\mu$ m. Časová prodleva mezi jednotlivými měřeními byla 20 s.  $\zeta$ -potenciál rovinných povrchů je měřen na hranici elektrické dvojvrstvy (viz obrázek 1).

Nanovláknenný vzorek (4 x 7 mm) uchycený v držáku mezi dvěma elektrodami (ZEN 1020) byl ponořen do polystyrenové kyvety (REF 67.754, SARSTEDT AG &Co) obsahující vodný pufr Zeta potential transfer standard (DTS1235, Malvern Instruments), pH = 9.  $\zeta$ -potenciál částic obsažených v pufru je uveden v hodnotách ( $-42 \pm 4,2$ ) mV.

#### 3.2.4.5 X-Ray Photoemission Spectrometry (XPS)

Analýza chemického složení povrchu materiálu byla provedena metodou X-Ray photoemission spektrometry (XPS). Měření XPS bylo provedeno pomocí hemisférického analyzátoru Phoibos 100 (Specs GmbH) s úhlem vyzařování 90°. Elektronová emise byla vyvolána monochromatickým zdrojem rentgenového záření XR-50 (Specs GmbH) využívajícím Al K $\alpha$  spektrální linii (energie fotonů 1486.6 eV). Prvkové složení bylo stanoveno z přehledových spekter emitovaných elektronů s energií (tzv. pass energy) 40 eV. K vyhodnocení dat byl použit program CasaXPS.

#### 3.2.5 Testy biokompatibility materiálu

Biokompatibilní vlastnosti PCL-NBN byly testovány v průběhu jedenáctidenní kultivace 3T3 fibroblastů. Metabolická aktivita těchto buněk byla ověřena MTS testem. Průběh buněčné proliferace potvrzují výsledky DNA kvantifikace. Vizualizace buněčné proliferace byla porovnána na snímcích z konfokálního mikroskopu.

##### 3.2.5.1 Nasazení 3T3 fibroblastů na PCL-NBN

3T3 fibroblasty byly kultivovány v médiu DMEM L- glutamin (Dulbecco's modified eagle' medium) + 10% FBS + 1% ATB. Konfluentní vrstva adheovaných 3T3 fibroblastů byla před pasáží opláchnuta PBS za účelem odstranění přebytečného média. K přerušení buněčné adheze došlo působením 9% roztoku Trypsinu po dobu 3 min v prostředí CO<sub>2</sub> v inkubátoru temperovaného na teplotu 37 °C. Po uvolnění buněk ze dna kultivační lahvičky byl blokován účinek Trypsinu přidáním séra obsaženého v médiu.

PCL-NBN byly vyraženy kruhovou raznicí o průměru 6 mm. Před použitím k *in vitro* kultivaci byly buněčné nosiče sterilizovány etylenoxidem při teplotě 37 °C. Sterilizace proběhla na Oddělení centrálních operačních sálů a sterilizace, Ústřední vojenské nemocnice Střešovice, Praha.

Sterilní PCL-NBN byly v laminárním boxu (MSC 12, Thermo Scientific) umístěny do 96 – jamkových titračních destiček. Poté byla na PCL-NBN přidána buněčná suspenze 3T3 fibroblastů v kultivačním médiu. Objem buněčné suspenze odpovídal počtu přibližně 4 000 buněk na jamku. Počet buněk byl určen pomocí Bürkerovy komůrky. Po nasazení 3T3 fibroblastů byly mikrotitrační destičky vloženy na 20 min do CO<sub>2</sub> inkubátoru, za účelem intenzivnější adheze k PCL nanovlákněnému substrátu. Do každé jamky bylo přidáno médium o objemu 250  $\mu$ l. Kultivační médium bylo měněno 4. a 7. den kultivace.

##### 3.2.5.2 MTS test buněčné viability

Metabolická aktivita 3T3 fibroblastů byla vyhodnocena na základě absorbance roztoku buněčné suspenze a substrátu MTS. Metoda stanovení metabolické aktivity 3T3 fibroblastů pomocí MTS testu je založena na schopnosti metabolicky aktivních buněk štěpit tetrazoliovou sůl za vzniku formazanového barviva. Tato reakce probíhá na

mitochondriální membráně živých buněk. Přeměna MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) na formazánové barvivo probíhá působením dehydrogenáz.

PCL-NBN určené k analýze MTS testu byly sterilně vyjmuty z jamek mikrotitrační destičky a přesunuty do nových jamek naplněných 100  $\mu$ l DMEM. Poté bylo do každé jamky s buněčným nosičem přidáno 20  $\mu$ l roztoku MTS. Následně byly mikrotitrační destičky umístěny po dobu 120 min do CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Absorbance roztoků byla měřena fluorescenčním snímačem (Infinite M 200 PRO, TECAN) při vlnové délce  $\lambda = 490$  nm (referenční měření při vlnové délce  $\lambda_r = 690$  nm). Hodnoty aritmetického průměru absorbance byly počítány ze tří nezávislých hodnot. Výsledné hodnoty korelují s mírou metabolické aktivity. MTS test byl opakován v 1., 4., 7. a 11. kultivačním dnu.

### 3.2.5.3 dsDNA kvantifikace

Ke kvantifikaci DNA byla použita fluorescenční sonda PicoGreen (PG), která je selektivně vázána na dvouvláknennou DNA (dsDNA). Po interkalaci PG dochází ke zvýšení fluorescence v oblasti 500 – 600 nm. Fluorescence PG navázaného na dsDNA je zvýšena až tisíckrát. Naopak v přítomnosti proteinů, karbohydrátů, jednovláknenné DNA (ssDNA), RNA nebo volných nukleotidů k významnému zvýšení intenzity fluorescence nedochází. Citlivost detekce dsDNA pomocí PG je nižší než 250 pg/ml. Chemická struktura PG je (2-(n-bis-(3-dimethylaminopropyl)-amino)-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenyl-quinolinium) [96].

PCL-NBN s adherovanými myšními 3T3 fibroblasty byly v daném kultivačním dnu (1., 4., 7., a 11) přeloženy do roztoku lyzačního pufru. Tento pufr vlivem silného detergentního účinku lyzuje a extrahuje cytoplazmatické, membránové a jaderné proteiny z buněk savců [97]. PCL-NBN byly v lyzačním pufru třikrát zamrazeny při teplotě ( $-70$ ) °C a rozmrazeny při pokojové teplotě. Po každém rozmrazení byly vzorky vortexovány.

Pro měření fluorescence byly použity černé 96 jamkové mikrotitrační destičky (kvůli zamezení vzájemného vlivu fluorescence sousedních jamek) s transparentním dnem. Roztoky pro kvantifikaci dsDNA byly temperovány na pokojovou teplotu. Vzorky analyzovaného roztoku s obsahem sledované dsDNA byly odebrány o objemu 20  $\mu$ l a poté byly přidány do jamek mikrotitrační destičky s předem připraveným roztokem PG o objemu 200  $\mu$ l. Tyto vzorky byly připraveny v tripletu. Jako standard pro stanovení hmotnostního množství dsDNA byl použit roztok obsahující bakteriofág lambda ve stoupající řadě 0 – 10 ng. Standardy byly připraveny v dubletu. Vždy 10  $\mu$ l standardního roztoku se známou koncentrací dsDNA bylo smícháno s 200  $\mu$ l roztoku PG. Buněčná suspenze charakterizující obsah dsDNA na PCL-NBN o objemu 20  $\mu$ l.



Hodnota fluorescence PG byla měřena při vlnových délkách excitačního ( $\lambda_{ex}$ ) a emisního ( $\lambda_{em}$ ) maxima  $\lambda_{ex} = 502$  nm a  $\lambda_{em} = 523$  nm na fluorescenčním snímači (Infinite M 200 PRO, TECAN). K výpočtu aritmetického průmětu byly použity minimálně tři nezávislé hodnoty. Koncentrace dsDNA ve vzorcích byla počítána regresní analýzou z hodnot kalibrační křivky.

#### *3.2.5.4 Konfokální mikroskopie*

3T3 fibroblasty byly fixovány na PCL-NBN mraženým metanolem (- 20 °C) po dobu 10 min. Následně byly PCL-NBN inkubovány v roztoku 3,3'-dihexyloxacarboocyanin jodidu (D 273, Invitrogen) o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ , po dobu 45 min a poté v Propidium Iodidu (P 4864, Sigma Aldrich) o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ , po dobu 5 min. Barvení probíhalo při pokojové teplotě. Mezi jednotlivými kroky byly PCL-NBN proplachovány v roztoku PBS. 3T3 fibroblasty byly vizualizovány konfokálním mikroskopem (FV10i, Olympus) v 1., 4., 7., a 11. dnu kultivace. Pro vizualizaci 3T3 fibroblastů byla použita dvě fluorescenční barviva: Propidium Iodid (buněčná jádra)  $\lambda_{ex} = 560$ ,  $\lambda_{em} = 575\text{--}650$  nm a DiOC 6 (3)  $\lambda_{ex} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 505\text{--}550$  nm (vnitřní buněčné membrány).

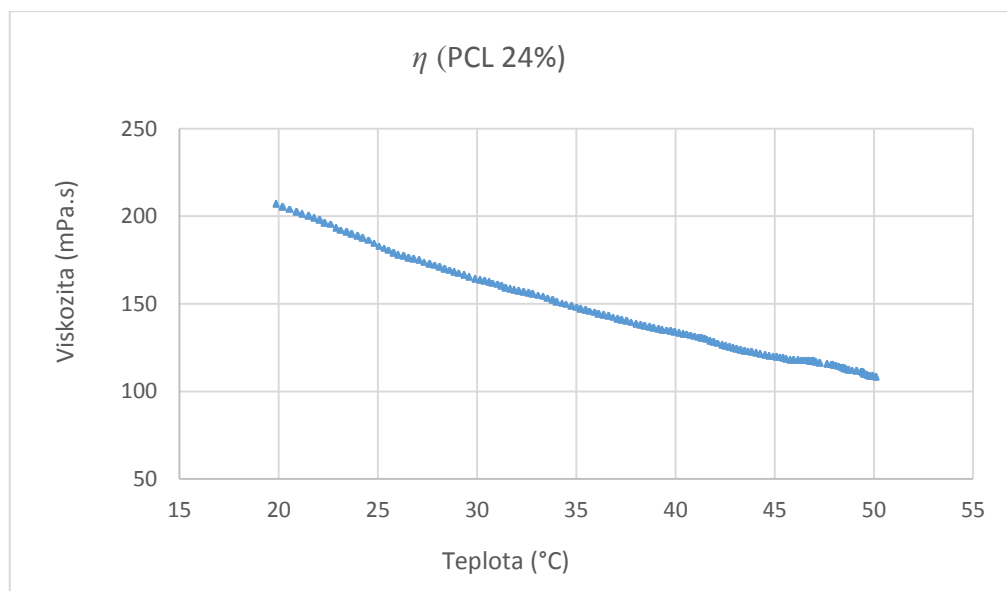
#### *3.2.5.5 Statistické vyhodnocení biologických testů*

Hodnoty absorbance (MTS) i fluorescence (PG) byly měřeny 1., 4., 7., a 11. den experimentu. Statistická významnost naměřených dat byla vyhodnocena v softwaru one-way ANOVA. Signifikantní odchylky ( $p \leq 0,05$ ) mezi jednotlivými měřeními byly vyhodnoceny metodou Student-Newman-Keuls.

## 4 Výsledky

Tato kapitola je rozdělena na dvě části podle druhu použité fyzikální modifikace poly- $\epsilon$ -kaprolaktonových nanovláknenných buněčných nosičů (PCL-NBN). V první části jsou popsány výsledky analýz PCL-NBN modifikovaných RF doutnavým výbojem v  $O_2$  a  $N_2$ . V druhé části jsou uvedeny výsledky analýz PCL-NBN modifikovaných svazkem urychlených iontů  $O^+$ ,  $N^+$  a  $C^+$  produkovaných na urychlovači Tandetron. Modifikace povrchu byly v obou případech provedeny oboustranně. Samotné výsledky analýz jsou členěny na materiálovou (chemická analýza povrchu, kontaktní úhel,  $\zeta$  – potenciál, morfologické vlastnosti nanovláknenné vrstvy a samotných vláken, průměr vláken, plošná hmotnost) a biologickou (metabolická aktivita, kvantifikace DNA, vizualizace na konfokálním mikroskopu) část. Cílem zvolených fyzikálních modifikací bylo dosáhnout příznivé změny povrchových vlastností materiálu tak, aby došlo ke zvýšení adheze a proliferace 3T3 fibroblastů.

NBN jsou zvlákněné technologií elektrostatického zvláknování z roztoku syntetického biopolymeru PCL. Viskozita ( $\eta$ ) 24% polymerního roztoku PCL (viz graf 1) byla měřena v závislosti na stoupající teplotě (v rozsahu 20 – 50 °C) přístrojem Vibro viscometer (SV-10, A&D). Se zvyšující se teplotou docházelo ke snížení hodnoty viskozity. Při teplotě polymerního roztoku  $t = 20$  °C byla naměřena hodnota viskozity  $\eta = 205,64$  mPa·s. Zvýšením teploty na  $t = 50$  °C došlo ke snížení viskozity na  $\eta = 108,78$  mPa·s. Polymerní roztok byl zvlákněn ze statické strunové elektrody.



Graf 1\_Viskozita 24% PCL v závislosti na teplotě ( $t = 20 - 50$  °C).

## 4.1 Buněčné nosiče modifikované RF doutnavým výbojem

Plazmatická modifikace PCL nanovlákných vrstev byla provedena v nízkotlakém RF reaktoru (Prevac Sp.z.o.o) při základních parametrech viz tabulka 5. RF doutnavý výboj byl vybuzen v O<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> atmosféře. Všechny vzorky byly modifikovány oboustranně.

Tabulka 5\_Základní parametry plazmatické modifikace.

Název vzorku	Tlak (Pa)	Čas (s)	Napětí (V)	Průtok plynu (sccm)
O <sub>2</sub> (-100V)	8	15	-100	10
O <sub>2</sub> (-200V)	8	15	-200	10
N <sub>2</sub> (-100V)	8	15	-100	10
N <sub>2</sub> (-200V)	8	15	-200	10

### 4.1.1 Materiálové vlastnosti

Uvedené výsledky charakterizují vliv velikosti záporného napětí a typu použitého plynu v průběhu plazmatické modifikace RF doutnavým výbojem na změnu morfologie a povrchových chemických vlastností PCL nanovlákné textilie.

Tabulka 6\_Materiálová charakterizace PCL nanovlákné vrstvy.

Vzorek	Plošná hmotnost (g/m <sup>2</sup> )	Tloušťka materiálu (μm)	Průměr vláken (nm)
PCL-K	62,89 ± 13,01	369 ± 89	266 ± 185
O <sub>2</sub> (-100V)	194,90 ± 17,13	274 ± 34	231 ± 166
O <sub>2</sub> (-200V)	135,01 ± 154,74	199 ± 27	255 ± 250
N <sub>2</sub> (-100V)	115,78 ± 11,45	164 ± 24	223 ± 172
N <sub>2</sub> (-200V)	70,13 ± 11,17	113 ± 15	221 ± 137

#### a) Plošná hmotnost a tloušťka

Modifikací RF doutnavým výbojem v O<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> atmosféře došlo k nárůstu plošné hmotnosti  $m_s$  a změnám v tloušťce materiálu  $h_m$  (viz tabulka 6) oproti nemodifikovanému kontrolnímu vzorku PCL-K s  $m_s = 62,89 \pm 13,01 \text{ g/m}^2$ ,  $h_m = 265,71 \pm 184,91 \mu\text{m}$ . U vzorku s označením O<sub>2</sub> (-100V)  $m_s = 194,90 \pm 17,13 \text{ g/m}^2$  je zároveň patrná nižší

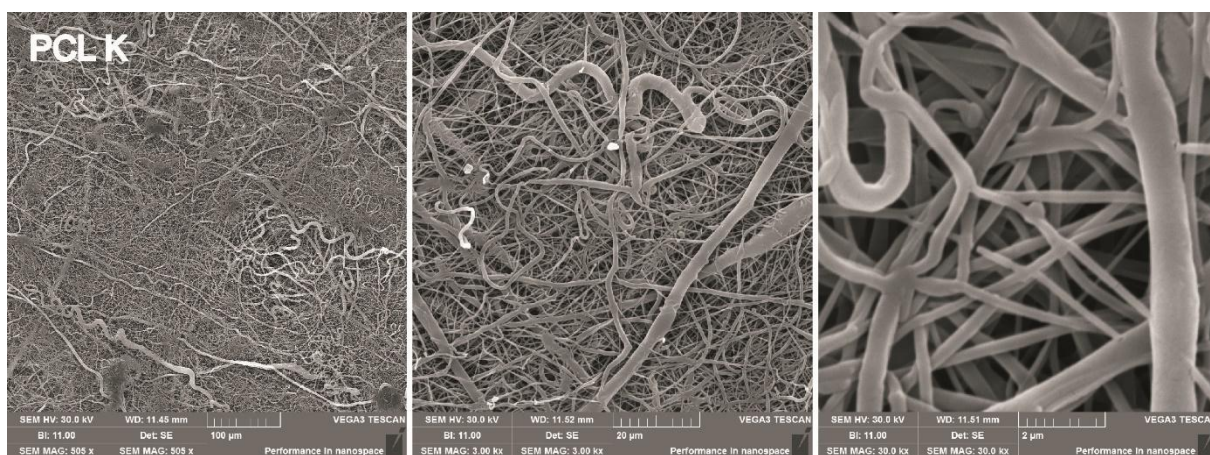
tloušťka nanovláknenného materiálu  $h_m = 274,96 \pm 34,71 \mu\text{m}$ . V případě vyššího napětí, u vzorku  $\text{O}_2$  (-200V), byla zaznamenána význameně nižší tloušťka  $h_m = 199,96 \pm 27,34 \mu\text{m}$  a plošná hmotnost  $m_s = 135,01 \pm 154,74 \text{ g/m}^2$  (viz tabulka 6). Nejnižší hodnota plošné hmotnosti u plazmaticky modifikovaných vzorků byla zaznamenána u vzorku  $\text{N}_2$  (-200V)  $m_s = 70,13 \pm 11,17 \text{ g/m}^2$ . U tohoto vzorku je uvedena i velmi nízká hodnota tloušťky  $h_m = 113,35 \pm 15,30 \mu\text{m}$ . Plošná hmotnost vzorku  $\text{N}_2$  (-100V) je přibližně dvojnásobná  $m_s = 115,78 \pm 11,45 \text{ g/m}^2$  oproti PCL-K.

Výsledky uvedené v tabulce 6 ukazují, že u vzorků modifikovaných RF doutnavým výbojem došlo k výraznému zvýšení plošné hmotnosti PCL nanovláknenného materiálu. Zároveň při zvýšení záporného napětí dochází ke snížení tloušťky materiálu.

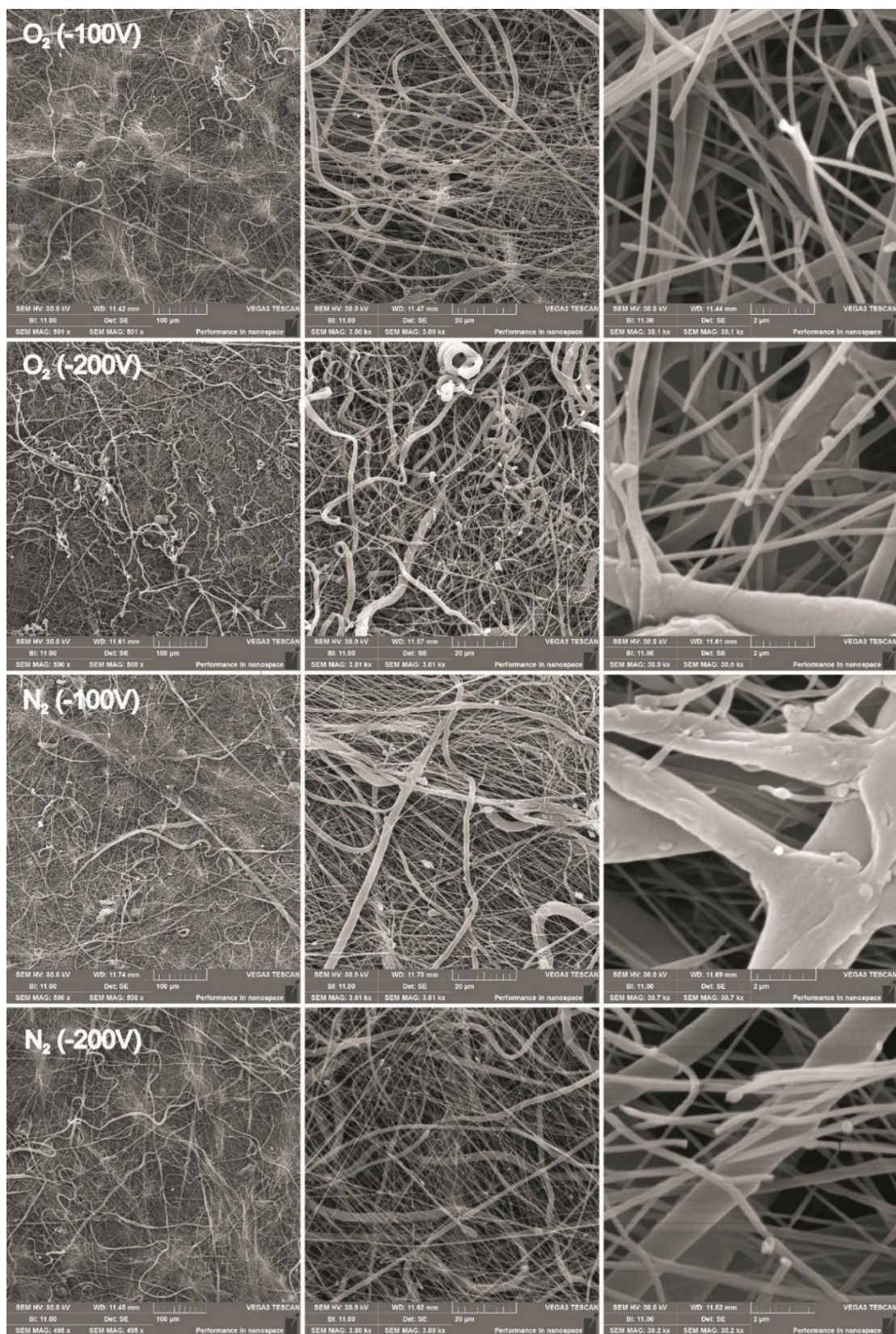
#### b) Morfologické vlastnosti

Změny morfologie povrchu nanovláknenného materiálu byly sledovány pomocí snímků ze SEM. Změnu morfologie jednotlivých vláken nelze na uvedených snímcích určit zcela přesně z důvodu nánosu tenké vrstvy zlata na povrch materiálu. Tato vrstva zakrývá některé méně výrazné změny na povrchu vláken.

Vliv plazmatické modifikace na PCL nanovláknennou vrstvu byl dále charakterizován změnou průměrů vláken, která byla vyhodnocena jako aritmetický průměr z 300 hodnot. Měření průměrů vláken bylo realizováno softwarem NIS – Element. Naměřené hodnoty průměrů vláken (viz tabulka 6) ukazují zvýšení četnosti nižších průměrů vláken u plazmaticky modifikovaných vrstev (viz příloha A, grafy 8-12). Vysoké hodnoty směrodatných odchylek ukazují na široký rozsah distribuce průměrů nanovláken.



**Obrázek 4\_ Snímky kontrolního vzorku PCL nanovláknenného materiálu (PCL-K) pořízené na SEM při zvětšení 500x, 3000x a 30 000x.**



**Obrázek 5. Plazmaticky modifikované vzorky PCL nanovláčenného materiálu. Snímky byly pořízeny na SEM při zvětšení 500x, 3000x a 30 000x.**

Charakteristickými vlastnostmi PCL nanovláknenné vrstvy použité pro experimentální část této diplomové práce jsou výrazné rozdíly ve velikosti průměrů vláken a spirálovité uspořádání některých vláken větších průměrů. Mezi vlákny PCL nanovláknenné vrstvy se občasné vyskytuje perličkový efekt, který je častým doprovodným jevem při zvláknění PCL.

Kontrolní nemodifikovaný vzorek PCL-K na obrázku 4 je charakteristický většími průměry vláken  $265,71 \pm 184,91$  nm (viz tabulka 6). Tento vzorek obsahuje vlákna s nejvyšší četností průměrů (četnost > 30) v hodnotách 150 – 300 nm (viz příloha, graf 8).

Vliv plazmatické modifikace RF doutnavým výbojem buzeným v O<sub>2</sub> atmosféře se projevuje snížením průměrů vláken v řádu desítek nm. S vyšší hodnotou použitého záporného napětí je průměr vláken nižší. Vzorky modifikované v O<sub>2</sub> atmosféře obsahují s vyšší četností (> 30) vlákna o průměrech 150 – 250 nm. Při větším zvětšení (30 000x) SEM snímků je patrná destrukce povrchové vrstvy vláken (viz obrázek 5).

Plazmatická modifikace RF doutnavým výbojem buzeným v N<sub>2</sub> atmosféře se projevuje nejvýraznějším poklesem průměrů vláken (viz tabulka 6). Zvýšení záporného napětí nemá na průměr vláken výraznější vliv. Vzorky modifikované v N<sub>2</sub> atmosféře obsahují vyšší četnost (> 30) vláken o průměrech 150 – 250 nm, průměry v hodnotách nad 400 nm se vyskytují jen omezeně. Při vyšším zvětšení (30 000x) je na SEM snímcích patrné naleptání povrchu vláken a popraskání vrchní vláknenné vrstvy (viz obrázek 5).

Z porovnání snímků ze SEM vyplývá, že plazmatická modifikace RF doutnavým výbojem v O<sub>2</sub> atmosféře, se stoupajícím záporným napětím zvyšuje nerovnoměrnost vláknenného uspořádání PCL nanovláknenné vrstvy. Naopak vlivem plazmatické modifikace v N<sub>2</sub> atmosféře dochází, v závislosti na stoupající zápornou hodnotu napětí, ke zmenšení průměrů vláken. Distribuce průměrů vláken modifikované vrstvy se zdá být naopak rovnoměrnější oproti vzorku PCL-K.

Charakteristickými vlastnostmi nemodifikované PCL nanovláknenné vrstvy použité pro experimentální část této diplomové práce jsou výrazné rozdíly ve velikosti průměrů vláken a spirálovité uspořádání některých vláken větších průměrů. Plazmatickou modifikací nedochází k výraznému poškození nanovláknenné vrstvy.

Tabulka 7\_ Charakterizace změny povrchových chemických skupin v závislosti na modifikaci RF doutnavým výbojem.

Název vzorku	Chemické složení povrchu (% at .)			Kontaktní úhel $\alpha$ (°)	Doba absorpce kapky (s)	$\zeta$ – potenciál (mV)
	C 1s	N 1s	O 1s			
PCL K	66,04	0,85	33,11	$65 \pm 5$	$1,7 \pm 0,7$	$-51,4 \pm 1,5$
O <sub>2</sub> (-100V)	57,45	0,25	42,30	$19 \pm 1$	$0,4 \pm 0,1$	$-35,1 \pm 1,8$
O <sub>2</sub> (-200V)	59,82	1,15	39,03	$14 \pm 2$	$0,3 \pm 0,1$	$-37,2 \pm 1,8$
N <sub>2</sub> (-100V)	61,13	2,96	35,91	$20 \pm 2$	$0,8 \pm 0,2$	$-27,6 \pm 1,9$
N <sub>2</sub> (-200V)	65,19	4,63	30,18	$34 \pm 4$	$1,1 \pm 0,3$	$-31,0 \pm 1,3$

#### c) Měření kontaktního úhlu a doba absorpce kapky

Hydrofilní vlastnosti materiálu byly testovány polární kapalinou (H<sub>2</sub>O). Hodnoty kontaktního úhlu jsou doplněny časovým intervalem doby absorpce kapky (viz tabulka 7) o objemu 5  $\mu$ l. Pro měření kontaktního úhlu byla použita destilovaná voda s povrchovým napětím  $\sigma = 72,75$  mN/m [10, 11]. Nejvyšší kontaktní úhel ( $\alpha$ ) byl naměřen na kontrolním vzorku PCL K  $\alpha = (65 \pm 5)^\circ$  s dobou absorpce kapky 1,7 s. Naopak nejnižší hodnota kontaktního úhlu byla naměřena u vzorku O<sub>2</sub> (-200V)  $\alpha = (14 \pm 2)^\circ$  s dobou absorpce kapky 0,3 s.

Hodnoty kontaktního úhlu závisí na výskytu polárních, resp. hydrofilních chemických skupin na povrchu materiálu. Výsledky ukazují, že v důsledku plazmatické modifikace v O<sub>2</sub> atmosféře dochází k výraznějšímu zvýšení hydrofility, oproti modifikaci v N<sub>2</sub> atmosféře. U obou typů plazmatických modifikací dochází k významnému navýšení prvků polárních skupin na povrchu materiálu a tím ke snížení kontaktního úhlu oproti PCL-K. Hodnota kontaktního úhlu je zároveň ovlivněna morfologií povrchu, která může vnést do výsledků odchylky nesouvisející s chemickým složením povrchu materiálu.

#### d) $\zeta$ – potenciál

$\zeta$  – potenciál PCL nanovláknenných vrstev byl měřen na přístroji Zetasizer – nano series (ZS90, Malvern Instruments).  $\zeta$  – potenciál je měřen za hranicí elektrické dvojvrstvy vyskytující se na rozhraní povrchu materiálu a okolního prostředí [53,54]. Hodnoty  $\zeta$  – potenciálu ovlivňují interakci povrchu s polárními strukturami (např. proteiny, polysacharidy). Hodnoty  $\zeta$  – potenciálu jsou závislé na pH použitého roztoku.

Výsledky měření (viz tabulka 7) ukazují výrazné snížení záporných hodnot povrchového  $\zeta$  – potenciálu u plazmaticky modifikovaných vzorků oproti kontrolnímu nemodifikovanému vzorku PCL-K  $\zeta = (-51,4 \pm 1,5)$  mV. Zároveň je zde patrné mírné

zvýšení záporných hodnot povrchového  $\zeta$  – potenciálu u vzorků plazmaticky modifikovaných při vyšším záporném napětí (-200 V), např. vzorek O<sub>2</sub> (-200V)  $\zeta = (-37,2 \pm 1,8)$  mV, vzorek N<sub>2</sub> (-200V)  $\zeta = (-31,0 \pm 1,3)$  mV. Při použití nižšího záporného napětí (-100 V) byly naměřeny nižší záporné hodnoty povrchového  $\zeta$  – potenciálu. Pro vzorek O<sub>2</sub> (-100V)  $\zeta = (-35,1 \pm 1,8)$  mV, vzorek N<sub>2</sub> (-100V)  $\zeta = (-27,6 \pm 1,9)$  mV.

Z analýzy prvkového složení povrchu nanovláknenného materiálu vyplývá souvislost mezi obsahem O 1s, N 1s na povrchu materiálu a hodnotou naměřeného povrchového  $\zeta$  – potenciálu. Se zvyšujícím se obsahem O 1s, N 1s lze předpokládat zvýšený výskyt polárních skupin. U plazmaticky modifikovaných vzorků dochází ke snížení záporných hodnot povrchového  $\zeta$  – potenciálu.

#### e) Chemická analýza povrchu

Chemická analýza povrchu PCL (s chemickým vzorcem  $\{O-CH_2(CH_2)_3CH_2-C=O\}_n$ ) nanovláknenného materiálu modifikovaného RF doutnavým výbojem (viz tabulka 7) byla provedena metodou X-Ray photoemission spectrometry (XPS). Kromě uhlíku a kyslíku daném přímo chemickým složením PCL, bylo u všech vzorků včetně PCL-K zjištěno i malé množství (< 4,7 %) dusíku, draslíku a fosforu (viz příloha, tabulka 11).

XPS analýzou kontrolního vzorku PCL-K bylo určeno následující prvkové složení: C 1s (63,99 %), N 1s (0,82 %) a O 1s (32,08 %). Analýza plazmaticky modifikovaných PCL nanovláknenných vrstev potvrdila výrazné zvýšení obsahu daného prvku v závislosti na plynu použitým při výboji. U vzorků modifikovaných v kyslíkové atmosféře došlo k procentuálnímu nárůstu obsahu tohoto prvku oproti PCL-K. Například u vzorku O<sub>2</sub> (-100V), O 1s (42,30 %), vlivem zvýšeného napětí došlo k odprášení části povrchu a tím tedy ke snížení procentuálního zastoupení kyslíku u vzorku, O<sub>2</sub> (-200V) O 1s (39,03 %). Procentuální nárůst obsahu se projevil u vzorku N<sub>2</sub> (-100V) N 1s (2,96 %) oproti vzorku N<sub>2</sub> (-200V) N 1s (4,63 %).

Zvýšením obsahu polárních skupin obsahujících N 1s a O 1s na povrchu materiálu došlo ke zvýšení hydrofility povrchu. Tento výsledek byl potvrzen hodnotami kontaktního úhlu (H<sub>2</sub>O). Při zvýšeném napětí je patrný nárůst C 1s u obou typů plazmatické modifikace. Tyto hodnoty však nepřevýšily hodnotu obsahu C 1s u nemodifikovaného vzorku PCL-K. Vzorky modifikované v kyslíkové atmosféře ukázaly snížení obsahu O 1s vlivem odprášení při vyšším aplikovaném napětí. Naopak u vzorků modifikovaných v dusíkové atmosféře došlo ke zvýšení obsahu N vlivem zvýšení záporného napětí.

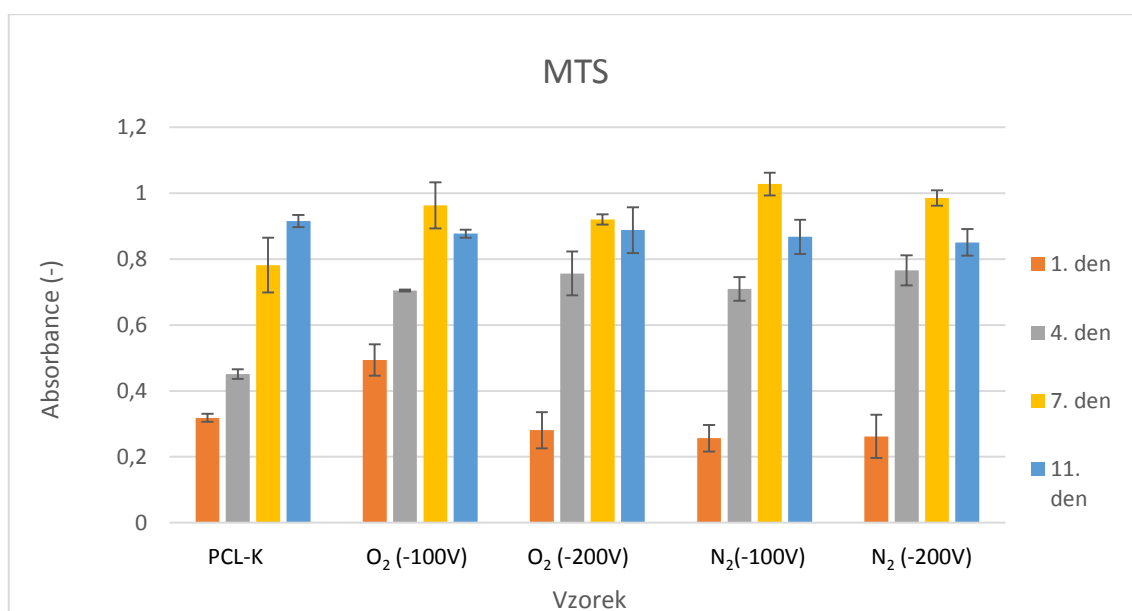


#### 4.1.2 Biologická charakterizace růstu 3T3 fibroblastů

Metabolická aktivita a proliferace 3T3 fibroblastů osazených na plazmaticky modifikované PCL-NBN v počtu 4000 buněk na jamku byla analyzována MTS testem a dsDNA kvantifikací. Hodnoty absorbance i fluorescence byly měřeny 1., 4., 7., a 11. den experimentu. Statistická významnost naměřených dat byla vyhodnocena v softwaru one-way ANOVA. Signifikantní odchylky ( $p \leq 0,05$ ) mezi jednotlivými měřeními byly vyhodnoceny metodou Student-Newman-Keuls.

##### a) MTS test metabolické aktivity

Výsledky MTS testu metabolické aktivity 3T3 fibroblastů osazených na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN (viz graf 2) byly vyhodnoceny na základě naměřené absorbance tří navzájem nezávislých měření.



Graf 2\_MTS test metabolické aktivity 3T3 fibroblastů na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN.

Výsledky MTS testu jsou signifikantně ( $p \leq 0,05$ ) rozdílné již v 1. testovacím dnu. Signifikantně nejvyšší hodnota absorbance byla v tomto testovacím dni prokázána u vzorku O<sub>2</sub> 100V ( $0,49 \pm 0,05$ ). Ostatní vzorky nevykazují signifikantní odchylku.

Ve 4. testovacím dnu měly všechny plazmaticky modifikované vzorky signifikantně ( $p \leq 0,05$ ) vyšší hodnotu absorbance než PCL-K ( $0,45 \pm 0,01$ ).

V 7. dnu bylo u všech plazmaticky modifikovaných vzorků dosaženo maxima metabolické aktivity 3T3 fibroblastů a zároveň došlo k signifikantně vyššímu nárůstu metabolické aktivity u všech plazmaticky modifikovaných vzorků oproti PCL-K. Toto pozorování ukazuje na vyšší metabolickou aktivitu buněk v interakci s plazmaticky

modifikovanými nosiči a z toho vyplývající zvýšenou biokompatibilitu plazmaticky modifikovaných PCL-NBN.

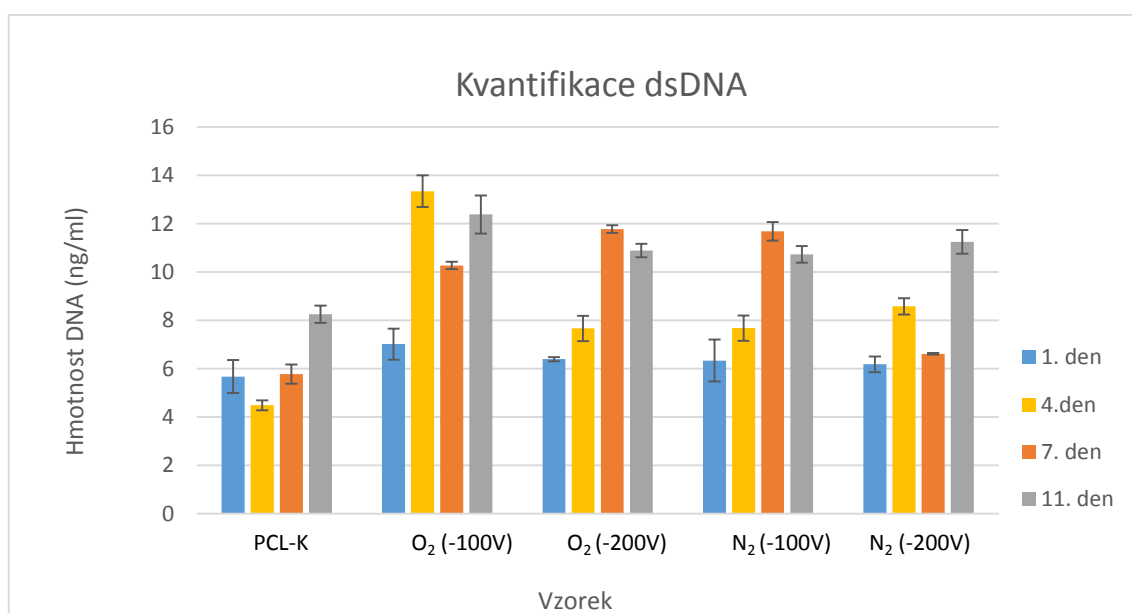
Nejvyšší hodnota absorbance byla v sedmém dnu naměřena u vzorku N<sub>2</sub> (-100V) ( $1,03 \pm 0,04$ ), oproti tomu nejnižší hodnota byla naměřena u PCL-K ( $0,78 \pm 0,01$ ).

Měření z 11. dne nevykazuje signifikantní výsledky u žádného vzorku. Metabolická aktivita buněk na nosičích PCL-K dosahuje srovnatelných hodnot jako plazmaticky modifikované nosiče.

Naměřené hodnoty absorbance ukazují výrazný nárůst u plazmaticky modifikovaných vzorků v průběhu 4. a 7. dne. V průběhu 11. dne došlo k vyrovnání hodnot metabolické aktivity u plazmaticky modifikovaných vzorků i PCL-K. Výsledky ze 4. dne ukazují závislost vyšší metabolické aktivity 3T3 fibroblastů u vzorků plazmaticky modifikovaných při vyšším napětí. Výsledky ze 7. dne ukazují opačný trend. Výsledek MTS testu ukazuje rychlejší zvýšení metabolické aktivity na plazmaticky modifikovaných vzorcích.

#### b) dsDNA kvantifikace

Kvantifikace obsahu dsDNA na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN (viz graf 3) byla měřena na základě signálu fluorescenční sondy PicoGreen (PG) interkalované do dsDNA. Hmotnost dsDNA (ng/ml) byla vypočítána na základě kalibrační křivky, která byla stanovena z hodnot dsDNA standardů podle dané ředící řady. Tato kvantifikační metoda dsDNA neumožňuje rozlišit živé a mrtvé buňky, tj. v uvedených výsledcích je stanovena celková hmotnost dsDNA 3T3 fibroblastů, které byly uvolněny do buněčné suspenze z PCL-NBN.



Graf 3\_ Kvantifikace dsDNA 3T3 fibroblastů na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN.

V 1. kultivačním dnu 3T3 fibroblastů nebyly patrné signifikantní ( $p \leq 0,05$ ) rozdíly v hmotnosti dsDNA. Tento výsledek ukazuje na homogenní nasazení 3T3 fibroblastů v počtu přibližně 4000 buněk na jamku.

Z měření obsahu dsDNA ve 4. testovacím dni vyplývá, že došlo k signifikantnímu zvýšení hmotnosti DNA u všech plazmaticky modifikovaných vzorků oproti kontrolnímu vzorku PCL-K ( $4,48 \pm 0,21$  ng/ml). Signifikantně nejvyšší obsah dsDNA byl naměřen u vzorku O<sub>2</sub> (-100V) ( $13,34 \pm 0,65$  ng/ml). Signifikantní rozdíl není patrný pouze pro vzorky O<sub>2</sub> (-200V) a N<sub>2</sub> (-100V).

7. den byl opět naměřen signifikantní nárůst hmotnosti dsDNA u všech plazmaticky modifikovaných vzorků oproti PCL-K ( $5,77 \pm 0,40$  ng/ml). Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u vzorků O<sub>2</sub> (-200V) a N<sub>2</sub> (-100V) mezi nimiž není signifikantní rozdíl.

V 11. dni zůstal zachován trend z předchozích testovacích dní, tedy výrazný nárůst dsDNA u plazmaticky modifikovaných vzorků oproti PCL-K ( $8,25 \pm 0,35$  ng/ml). Nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku O<sub>2</sub> (-100V) ( $12,37 \pm 0,78$  ng/ml). Naopak signifikantní rozdíl nebyl naměřen u vzorků O<sub>2</sub> (-200V), N<sub>2</sub> (-100V) a N<sub>2</sub> (-200V).

Z naměřených hodnot (viz graf 3) je patrné výrazné zvýšení hmotnosti dsDNA u vzorků s plazmatickou modifikací oproti PCL-K.

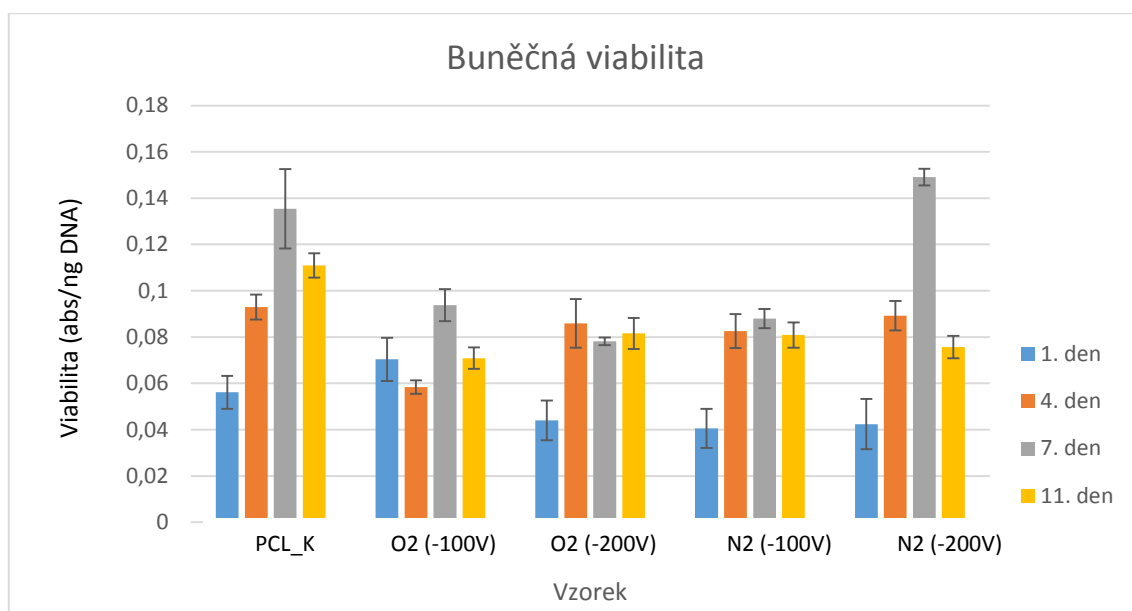
Hmotnost dsDNA přímo koreluje s počtem buněk adherovaných na buněčných nosičích, proto lze z výsledků PG testu kvantifikace dsDNA sledovat průběh buněčné proliferace. Výsledkem je tedy vyšší proliferace 3T3 fibroblastů u PCL-NBN modifikovaných plazmatem. Výsledky měření koncentrace dsDNA jsou v souladu s výsledky MTS testu.

### c) Buněčná viabilita

Vyhodnocení buněčné viability (viz graf 4) určuje přímou závislost mezi metabolickou aktivitou buněk a hmotností dsDNA.

V 1. testovacím dnu byly naměřeny signifikantně ( $p \leq 0,05$ ) nejvyšší hodnoty u vzorku O<sub>2</sub> (-100V) ( $0,07 \pm 0,01$  abs/ng DNA), naopak nejnižší hodnota byla naměřena u vzorku N<sub>2</sub> (-100V) ( $0,04 \pm 0,01$ ).

Ve 4. dnu vychází v porovnání s ostatními vzorky signifikantně nejnižší hodnota u vzorku O<sub>2</sub> (-100V) ( $0,06 \pm 0,003$  abs/ng DNA). Ostatní vzorky nemají signifikantní odchylky.



**Graf 4\_Buněčná viabilita 3T3 fibroblastů na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN.**

7. Den byla naměřena signifikantně nejvyšší hodnota u vzorku N<sub>2</sub> (-200V) ( $0,15 \pm 0,01$  abs/ng DNA). Signifikantní rozdíly nebyly 7. den naměřeny u vzorků O<sub>2</sub> (-100V), O<sub>2</sub> (-200V) a N<sub>2</sub> (-100V).

V 11. testovacím dni byla naměřena signifikantně nejvyšší hodnota buněčné viability u vzorku PCL-K ( $0,11 \pm 0,02$  abs/ng DNA), naopak signifikantně nejnižší hodnota vychází u vzorku O<sub>2</sub> (-200V) ( $0,082 \pm 0,007$  abs/ng DNA).

Z výsledků buněčné viability vyplývá, že 3T3 fibroblasty na PCL-NBN bez modifikace vykazovaly vyšší hodnoty metabolické aktivity než proliferace. Naopak na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN docházelo k rychlejší proliferaci. Analýza buněčné viability v tomto případě ale prokázal nižší průměrnou metabolickou aktivitu.

#### 4.1.3 Konfokální mikroskop

Snímky z konfokálního mikroskopu (FV10i, Olympus) vizualizují průběh adheze a proliferace 3T3 fibroblastů k PCL-NBN plazmaticky modifikovaných RF doutnavým výbojem (viz obrázek 6-10). 3T3 fibroblasty byly barveny fluorescenčními barvivy DiOC 6 (3) a Propidium iodid.

Na snímcích kontrolního vzorku PCL-NBN (PCL - K) z 1. dne je možné porovnat homogenitu nasazení a počáteční adhezi 3T3 fibroblastů. Buňky jsou poměrně rovnoměrně rozmístěny v celé ploše PCL-NBN. Tvar buněk je spíše kulovitý, buňky jsou stále svinuté mezi vlákny. Ve 4. dni začínají 3T3 fibroblasty proliferovat, od 4. dne mají již rozvinutý tvar a dochází k lepší vizualizaci buněčných jader. Na snímcích ze 7. dne je vytvořena téměř konfluentní vrstva pokrývající povrch celého nosiče. V 11. dni je buněčná vrstva na PCL-NBN plně konfluentní. Snímky z konfokálního mikroskopu

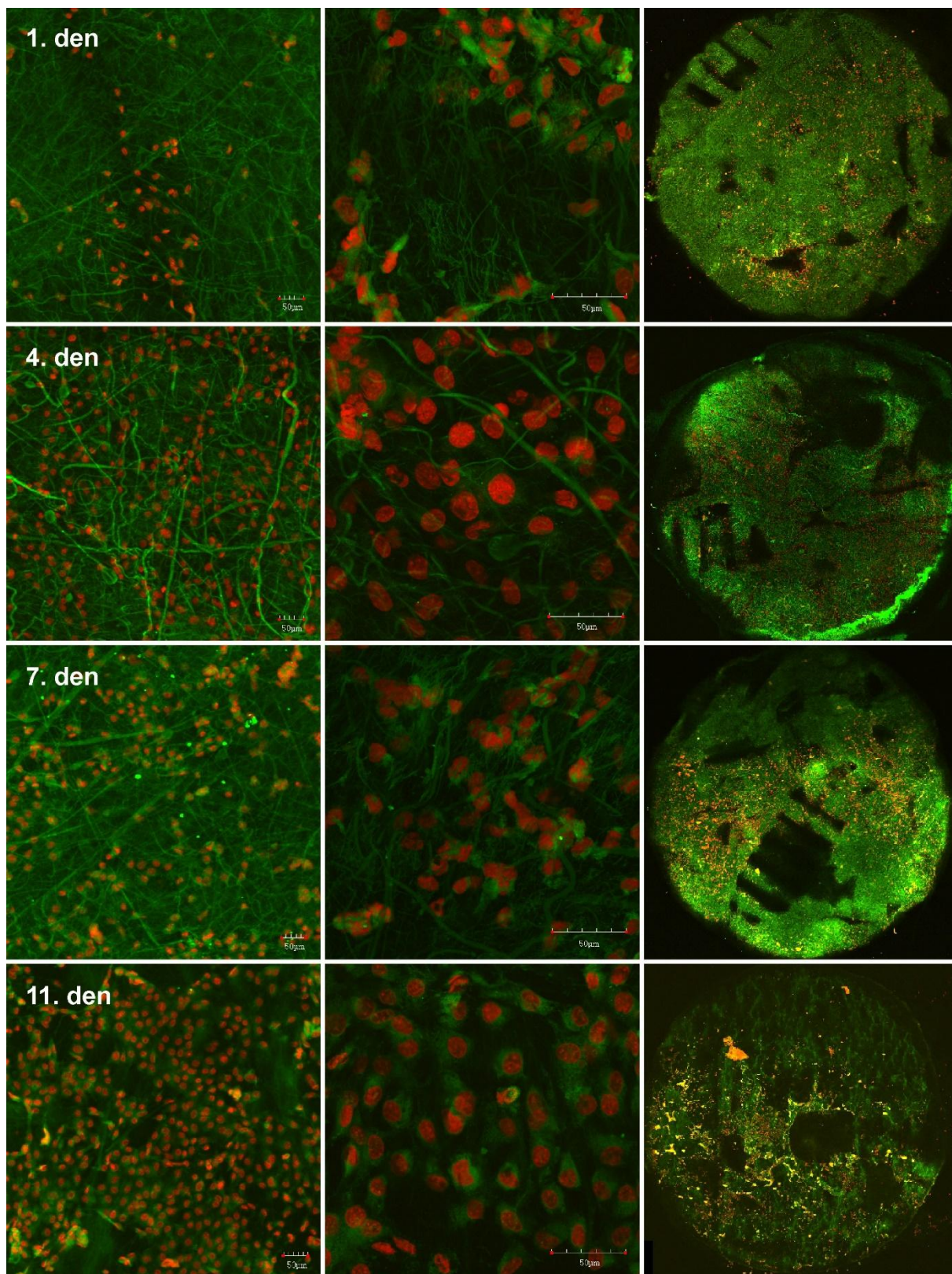
odpovídají výsledkům kvantifikace dsDNA (viz graf 3). Hmotnost dsDNA 3T3 fibroblastů na vzorku PCL-K dosahuje svého maxima v 11. dni.

Snímky plazmaticky modifikovaného PCL-NBN ( $O_2$  (-100V)) z 1. dne prokazují úspěšné nasazení 3T3 fibroblastů. Buňky jsou centrovány spíše do středu nanovláčenného nosiče. Již od 4. dne dochází k velmi rychlé proliferaci a tvorbě konfluentní buněčné vrstvy. Tento snímek potvrzují výsledky dsDNA kvantifikace, kdy bylo dosaženo maxima hmotnosti dsDNA právě ve čtvrtém kultivačním dnu. V průběhu 7. dne došlo u vzorku  $O_2$  (-100V) k mírnému poklesu hmotnosti dsDNA (viz graf 3). Snímek z konfokálního mikroskopu potvrzuje v některých místech nižší koncentraci buněk. V 11. dni je dosaženo poměrně konfluentní vrstvy na povrchu celého nosiče. Podle snímků z konfokálního mikroskopu a zároveň podle výsledků z grafu 2 lze hodnotit vzorek  $O_2$  (-100V) jako vzorek na kterém probíhala od 4. kultivačního dne nejvýraznější proliferace 3T3 fibroblastů.

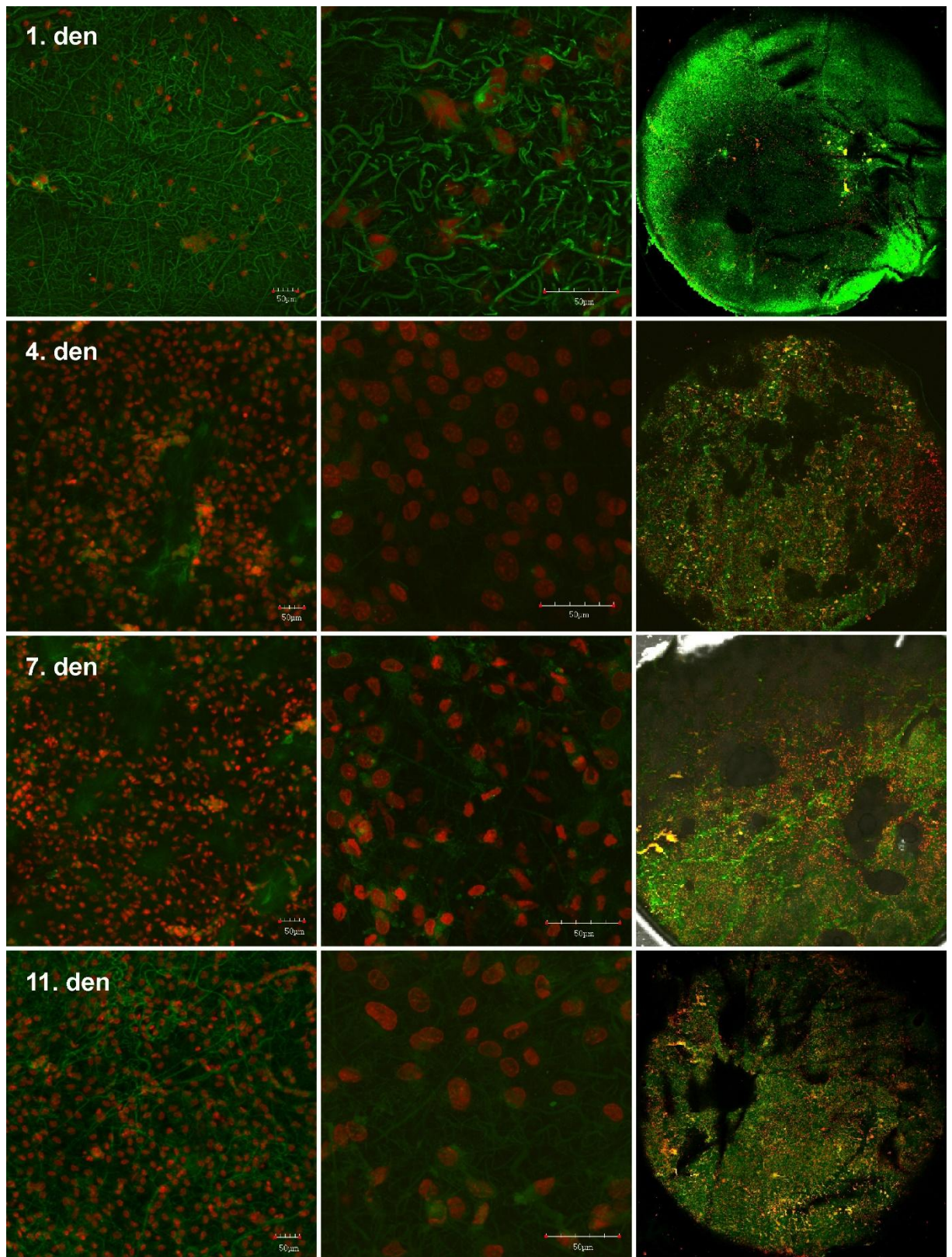
Snímky PCL-NBN ( $O_2$  (-200V)) potvrzují úspěšné nasazení buněk 1. den. Již v prvním dni je možné sledovat poměrně rozvinuté buňky adheující na nanovláčenný povrch. Ve 4. dni dochází k mírnému zvýšení proliferace a poměrně řídkému pokrytí necelé poloviny PCL-NBN. 7. den je patrný vyšší nárůst počtu buněk, hmotnost dsDNA dosahuje v tomto dni u vzorku  $O_2$  (-200V) svého maxima. V 11. dni dochází ke zcela zřetelné vizualizaci buněčných jader. Přibližně polovinu buněčného nosiče pokrývá konfluentní vrstva.

Snímky PCL-NBN ( $N_2$  (-100V)) v 1. dni po nasazení potvrzují úspěšné nasazení buněk na nanovláčenný nosič. 3T3 fibroblasty již od 1. dne vykazují podélnou směrovou orientaci. Ve 4. dni je tato orientace se zvyšujícím se počtem buněk ještě výraznější. Dochází k rovnoměrnému pokrytí buněčného nosiče po celém jeho obvodu. 7. den dochází u tohoto vzorku k výrazné proliferaci, ale nelze říci, že by docházelo k tvorbě konfluentní vrstvy po celém nosiči. V průběhu 11. dne dochází k nerovnoměrnému pokrytí buněčného nosiče. Zároveň dochází k mírnému poklesu dsDNA oproti předchozímu dni.

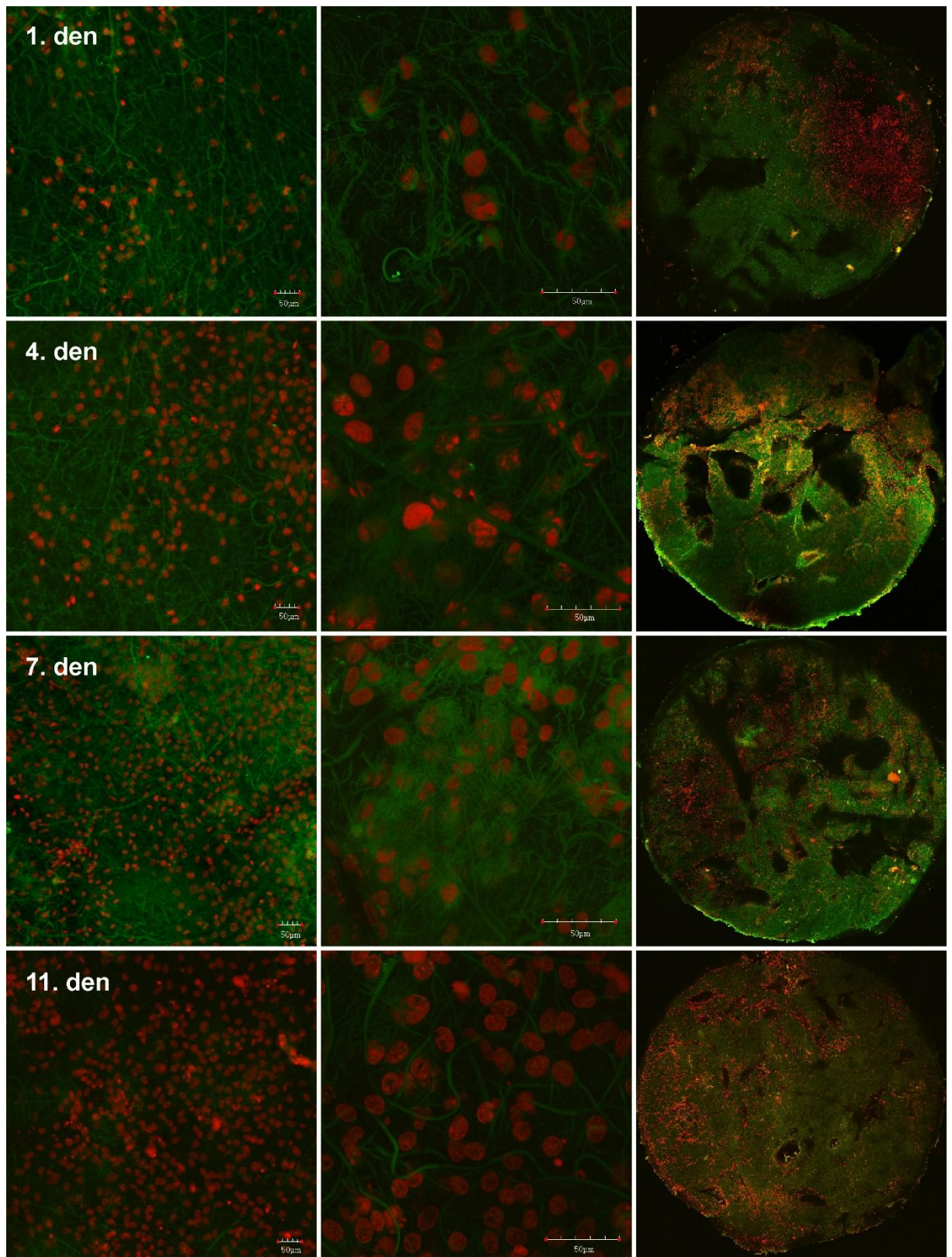
Snímky PCL-NBN ( $N_2$  (-200V)) v 1. dni potvrzují úspěšné nasazení 3T3 fibroblastů. Tvar buněčných jader je poněkud deformovaný do nepřirozeného tvaru. 4. den dochází k rovnoměrnému pokrytí buněčného nosiče a zvýšené proliferaci, potvrzené kvantifikací dsDNA. Buněčná jádra dosahují typicky kulovitého tvaru. V průběhu 7. dne dochází ke snížení počtu vizualizovaných buněčných jader a zároveň ke snížení hmotnosti dsDNA. 11. den se tvoří konfluentní vrstva na více než polovině buněčného nosiče. Hmotnost dsDNA je v tomto dni výrazně vyšší.



Obrázek 6\_Kontrolní vzorek PCL – K: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium iodid a Dioc 6 (3)

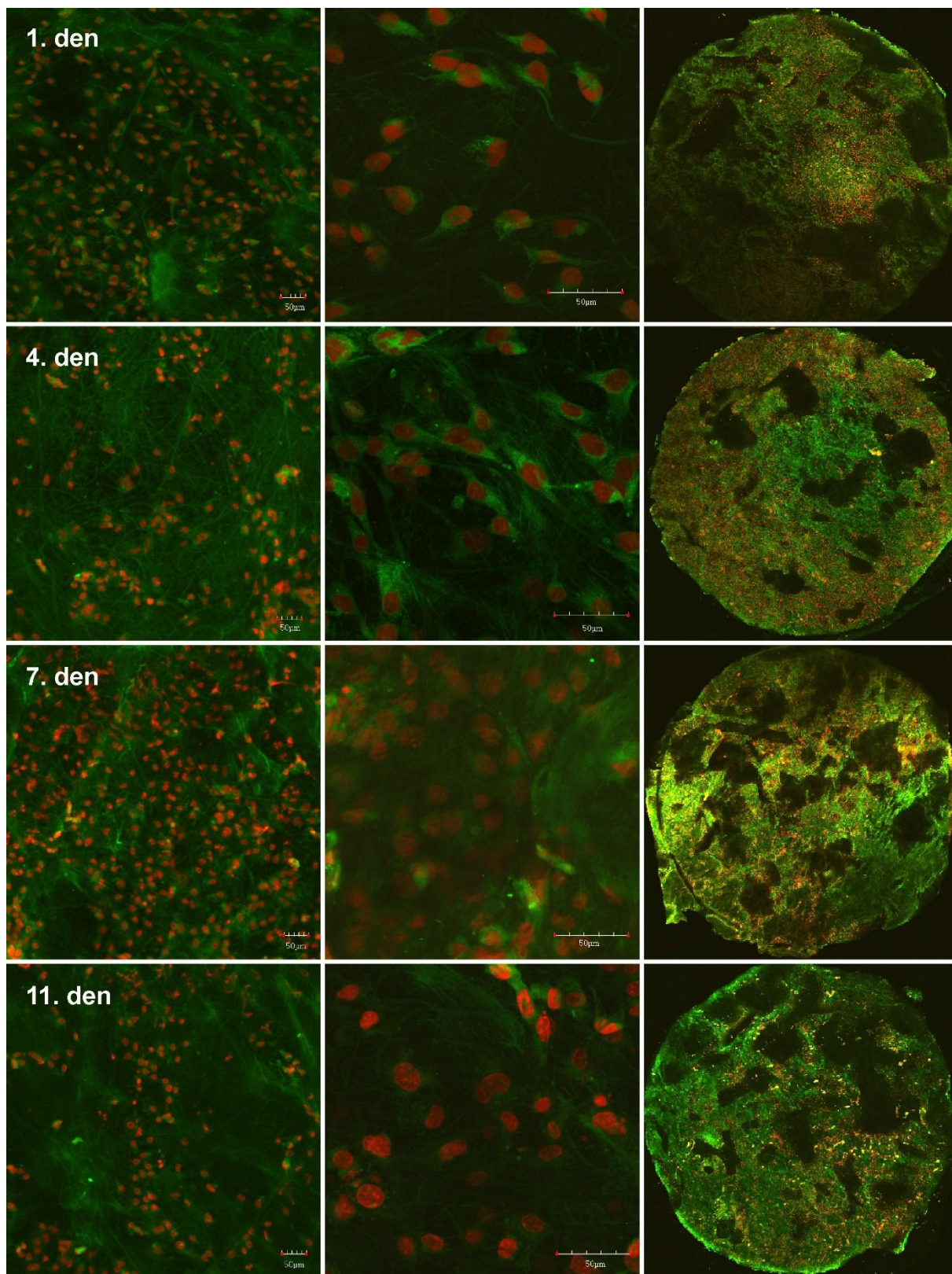


Obrázek 7\_O<sub>2</sub> (-100V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)

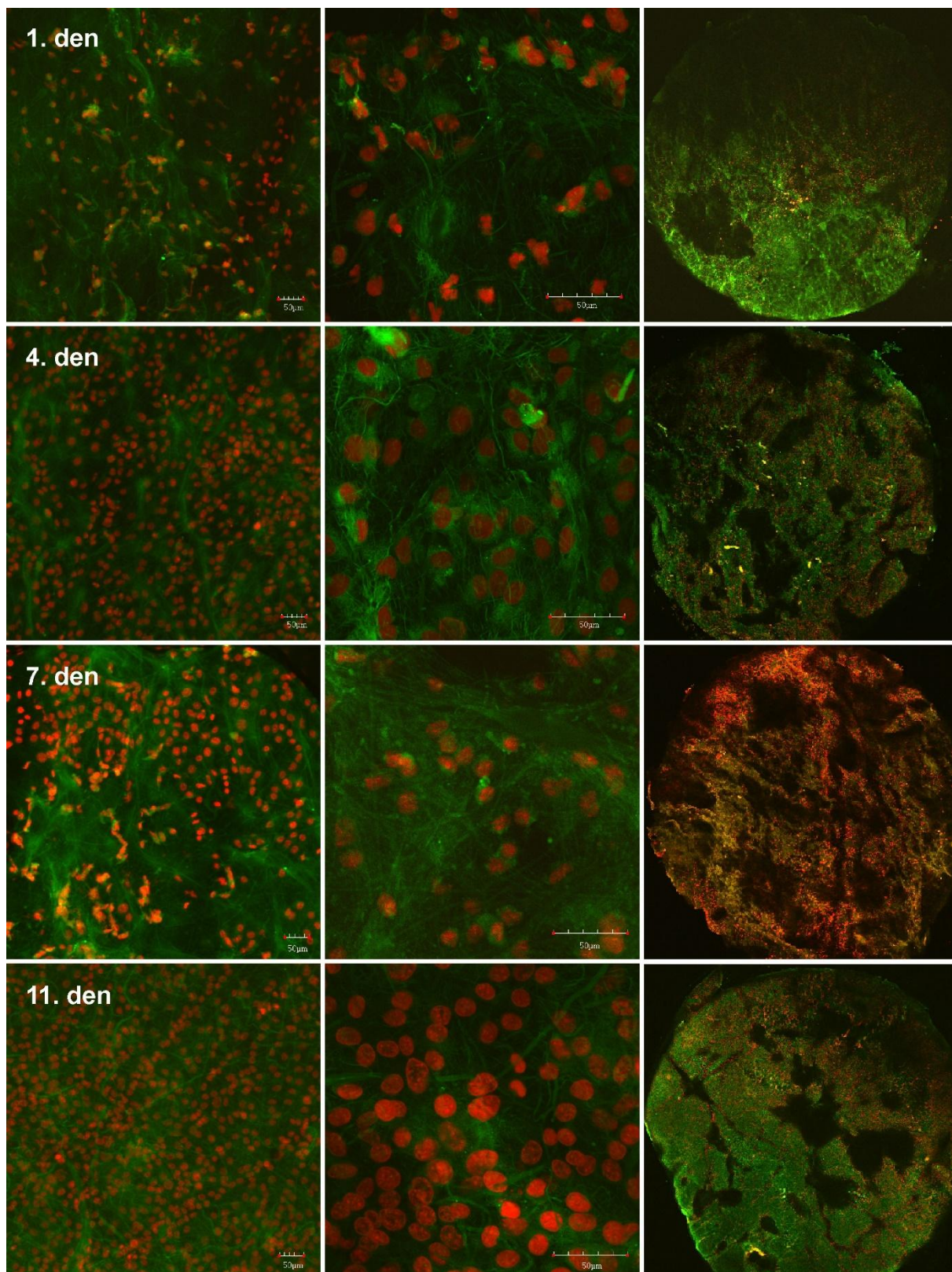


Obrázek 8\_O<sub>2</sub> (-200V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)





Obrázek 9\_N<sub>2</sub> (-100V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)



Obrázek 10\_N<sub>2</sub> (-200V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium iodid a Dioc 6 (3)

#### 4. 4.2 Buněčné nosiče modifikované iontovou implantací (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>)

Iontová implantace PCL nanovlákných vrstev byla provedena iontovým urychlovačem Tandetron (MC 4130, HVE Europa B.V.) při základních parametrech uvedených v tabulce 8. Všechny vzorky byly modifikovány oboustranně.

Tabulka 8\_Základní parametry iontové implantace.

Vzorek	Implantované ionty	Doba implantace (s)	Energie (keV)	Tlak v komoře (mbar)	Implantační dávka (at/cm <sup>2</sup> )
C <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	C <sup>+</sup>	23	800	5 · 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>12</sup>
N <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	O <sup>+</sup>	20	800	5 · 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>12</sup>
O <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	N <sup>+</sup>	3	800	5 · 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>12</sup>

##### 4.2.1 Materiálové vlastnosti

Charakterizace materiálových vlastností byla zaměřena na popis vlivu implantace daného typu urychleného kationtu (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>) na PCL nanovláknou vrstvu. Analýzy materiálových vlastností jsou zaměřeny na morfologické změny a změnu chemického složení povrchu PCL nanovlákné vrstvy.

Tabulka 9\_Materiálová charakterizace PCL nanovlákné vrstvy.

Vzorek	Plošná hmotnost (g/m <sup>2</sup> )	Tloušťka materiálu (μm)	Průměr vláken (nm)
PCL-K	62,89 ± 13,01	369 ± 89	266 ± 185
C <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	52,02 ± 6,41	326 ± 36	211 ± 104
N <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	71,62 ± 4,71	429 ± 34	340 ± 202
O <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	76,43 ± 1,94	446 ± 40	212 ± 123

##### a) Plošná hmotnost a tloušťka

Výsledky (viz tabulka 9) ukazují závislost mezi tloušťkou ( $m_s$ ) a plošnou hmotností ( $h_m$ ) PCL nanovlákné textilie. Nejnižší hodnoty jsou uvedeny u vzorku implantovaného iontovým svazkem C<sup>+</sup>  $m_s = 52,02 \pm 6,41 \text{ g/m}^2$ ,  $h_m = 326,10 \pm 35,64 \text{ μm}$ . V případě implantace N<sup>+</sup> a O<sup>+</sup> jsou hodnoty plošné hmotnosti a tloušťky naopak vyšší než u PCL-K  $m_s = 62,89 \pm 13,01 \text{ g/m}^2$ ,  $h_m = 368,72 \pm 89,34 \text{ μm}$ . Nejvyšší hodnota plošné hmotnosti a tloušťky PCL nanovlákného materiálu byla naměřena u nanovlákného vzorku

implantovaného  $O^+$  ionty  $m_s = 76,01 \pm 2,05 \text{ g/m}^2$ , v závislosti na zvýšení plošné hmotnosti byla zvýšena i tloušťka tohoto materiálu  $h_m = 445,65 \pm 39,58 \text{ }\mu\text{m}$ .

Výsledky plošné hmotnosti poměrně přesně odpovídají změnám tloušťky nanovláčenného materiálu. Vlivem implantace polárních prvků došlo ke zvýšení plošné hmotnosti. Vlivem implantace  $C^+$  došlo naopak ke snížení plošné hmotnosti i tloušťky.

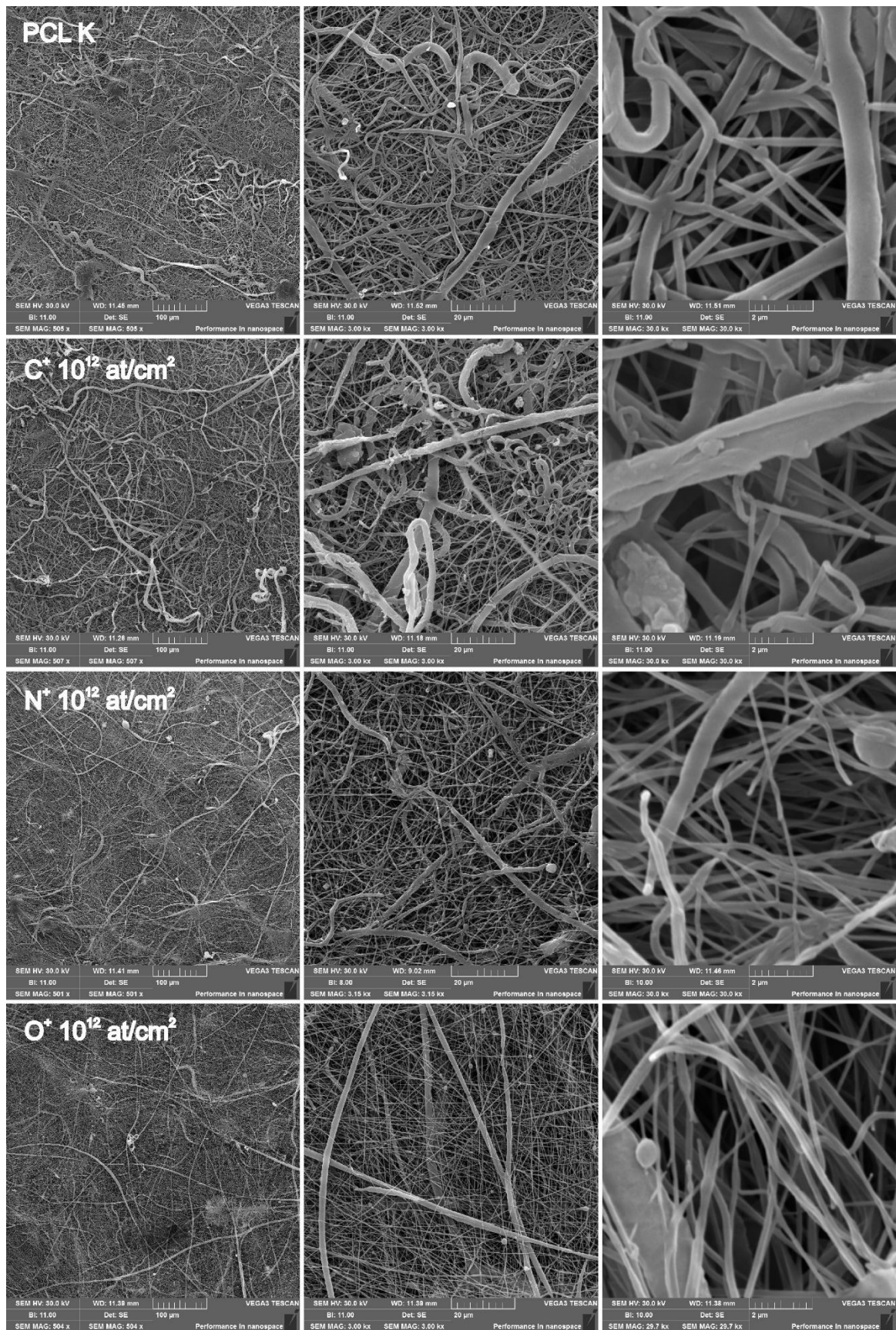
#### b) Morfologické vlastnosti

Morfologické změny PCL nanovláčenného materiálu v závislosti na iontové implantaci byly porovnávány na snímcích ze SEM (viz obrázek 11). Pozornost byla více zaměřena na změnu vláčenné struktury, než na změny povrchu jednotlivých vláčků. Nanovláčenná vrstva byla před vložením do komory SEM pokryta tenkou vrstvou zlata, čímž došlo k zakrytí méně výrazných defektů vyskytujících se na povrchu vláčků. Porovnáním snímků ze SEM byl také hodnocen vliv iontové implantace na změnu průměrů vláčků (viz tabulka 9), která byla určena z aritmetického průměru 300 naměřených hodnot a distribuci průměrů vláčků (viz graf 8 a 13-15). Měření průměrů vláčků bylo realizováno softwarem NIS – Element.

Kontrolní nemodifikovaný vzorek PCL-K je charakteristický vyššími průměry vláčků  $265,71 \pm 184,91 \text{ nm}$  (viz tabulka 9). Vzorek PCL-K obsahuje vláčků s nejvyšší četností průměrů (četnost  $> 30$ ) v hodnotách  $150 - 300 \text{ nm}$ .

U PCL nanovláčenné vrstvy implantované  $C^+$  byla naměřena vyšší četnost vláčků ( $> 30$ ) v rozsahu průměrů  $150 - 300 \text{ nm}$ , hodnota průměru vláčků je  $211,27 \pm 103,67 \text{ nm}$ . Maximální hodnota průměru vláčků tohoto vzorku je  $1250 \text{ nm}$ . Implantací  $N^+$  došlo k posunu distribuce vláčků s vyšší četností k hodnotám průměrů  $200 - 400 \text{ nm}$ , průměr vláčků je  $340,32 \pm 152,15 \text{ nm}$ . Tento vzorek obsahuje vláčků až do průměrů  $1200 \text{ nm}$ . Implantací  $O^+$  byl rozsah nejčastějších hodnot průměrů vláčků posunut do rozmezí  $160 - 220 \text{ nm}$ , průměr vláčků je  $212,07 \pm 122,71 \text{ nm}$ .

Charakteristickými vlastnostmi nemodifikované PCL nanovláčenné vrstvy jsou rozdílné velikosti průměrů vláčků. Uspořádání některých vláčků větších průměrů má spirálovitý charakter. Na snímcích ze SEM s větším zvětšením ( $30\ 000\times$ ) je možné sledovat přerušování některých vláčků u vzorků s implantovanými  $O^+$  a  $N^+$  ionty. Porovnání snímků ze SEM ukazuje, že implantací urychlených iontů  $O^+$  dochází ke zmenšení průměrů vláčků a narovnání původně spirálovitých vláčků vyšších průměrů oproti PCL-K. Povrch nanovláčenné vrstvy se stává hladším. Implantací urychlených iontů  $C^+$  dochází ke zmenšení průměrů vláčků, ale zároveň je patrné zvýšení výskytu neuspořádaných vláčků. Iontovou implantací  $N^+$  dochází ke zvýšení aritmetického průměru hodnoty průměru vláčků oproti PCL-K.



Obrázek 11\_PCL nanovláčenné vrstvy modifikované iontovou implantací. Snímky byly pořízeny na SEM při zvětšení 500x, 3000x a 30 000x.

Tabulka 10\_ Charakterizace změny povrchových chemických skupin v závislosti na iontové implantaci (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>).

Vzorek	Chemické složení povrchu (% at .)			Kontaktní úhel (°)	Doba absorpce kapky (s)	ζ – potenciál (mV)
	C 1s	N 1s	O 1s			
PCL-K	66,04	0,85	33,11	65 ± 5	1,7 ± 0,7	-51,4 ± 1,5
C <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	73,64	0,00	26,36	81 ± 15	51,8 ± 8,0	-32,4 ± 2,2
N <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	74,17	0,00	25,83	90 ± 6	118,5 ± 8,0	-20,7 ± 2,4
O <sup>+</sup> 10 <sup>12</sup> at/cm <sup>2</sup>	71,17	0,00	28,83	89 ± 6	381,7 ± 25,9	-37,3 ± 2,4

### c) Měření kontaktního úhlu a doba absorpce kapky

Charakterizace hydrofilních vlastností povrchu materiálu byla hodnocena na základě výsledků kontaktního úhlu polární kapaliny (H<sub>2</sub>O). Velikost kontaktního úhlu je doplněna časovým intervalem doby absorpce kapky (viz tabulka 10) o objemu 5 μl. Pro měření kontaktního úhlu byla použita destilovaná voda s povrchovým napětím  $\sigma = 72,75$  mN/m [10, 11].

Kontaktní úhel ( $\alpha$ ) byl naměřen u kontrolního vzorku PCL-K  $\alpha = (65 \pm 5)^\circ$  s dobou absorpce kapky ( $1,7 \pm 0,7$ ) s. Nejvyšší kontaktní úhel ( $\alpha$ ) byl naměřen na vzorku PCL nanovláčkové vrstvy implantované N<sup>+</sup> urychlenými ionty  $\alpha = (90 \pm 6)^\circ$  s dobou absorpce ( $118,5 \pm 8,0$ ) s. Přibližně stejná hodnota kontaktního úhlu jako u vzorku implantovaného N<sup>+</sup> urychlenými ionty, byla naměřena u vzorku implantovaného O<sup>+</sup> urychlenými ionty  $\alpha = (89 \pm 6)^\circ$ , ale došlo zde k několika násobnému zvýšení doby absorpce kapky ( $381,7 \pm 25,9$ ) s.

Implantací urychlených iontů (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>) do PCL nanovláčkové vrstvy došlo ke zvýšení kontaktního úhlu a prodloužení doby absorpce kapky. Výsledky XPS analýzy ukázaly nárůst procentuálního zastoupení C1s, z čehož lze odvodit nárůst hydrofobních povrchových chemických skupin obsahujících uhlík a následkem toho se snížila hydrofilita materiálu.

### ζ – potenciál

Měření ζ – potenciálu PCL nanovláčkových vrstev probíhalo na přístroji Zetasizer – nano series (ZS90, Malvern Instruments). ζ – potenciál je měřen za hranicí elektrické dvojvrstvy [53,54]. Hodnoty ζ – potenciálu mají vliv na interakci mezi povrchem polymeru a proteiny nebo polysacharidy.

Z naměřených výsledků (viz tabulka 10) je patrné výrazné snížení záporných hodnot ζ – potenciálu u PCL nanovláčkových vzorků modifikovaných iontovým svazkem v porovnání s kontrolním vzorkem PCL-K  $\zeta = (-51,4) \pm 1,5$  mV. Nejnižší zápornou hodnotu ζ – potenciálu vykazuje vzorek implantovaný kationty N<sup>+</sup>  $\zeta = (-20,7) \pm 2,4$  mV.

Výsledky XPS analýzy ukazují u vzorků modifikovaných iontovým svazkem absenci N 1s na povrchu materiálu. Z porovnáním výsledků povrchového  $\zeta$  – potenciálu a chemického složení povrchu PCL nanovláčenného materiálu vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem C 1s a naopak snižujícím se obsahem polárního O 1s na povrchu materiálu dochází ke snížení záporné hodnoty povrchového  $\zeta$  – potenciálu. Pro přesnější interpretaci vztahu mezi výsledky XPS analýzy a  $\zeta$  – potenciálem je nutné znát kromě procentuálního prvkového zastoupení i zastoupení chemických funkčních skupin přítomných na povrchu nanovláčenného nosiče. Tyto výsledky zároveň odpovídají zvýšenému kontaktnímu úhlu testovací kapaliny H<sub>2</sub>O.

#### d) Chemická analýza povrchu

XPS analýza povrchových chemických skupin (viz tabulka 10) PCL (s chemickým vzorcem  $\{O-CH_2(CH_2)_3CH_2-C=O\}_n$ ) nanovláčenného materiálu modifikovaného iontovým svazkem byla vyhodnocena metodou X-Ray photoemission spectrometry (XPS). XPS analýzou bylo na povrchu materiálu kromě uhlíku a kyslíku zjištěno i malé množství (< 2%) dusíku, draslíku, fosforu a sodíku (viz příloha, tabulka 12). U vzorků modifikovaných iontovým svazkem byla zjištěna absence dusíku.

Pro obě fyzikální modifikace (plazmatem i iontovým svazkem) byl použit stejný kontrolní vzorek PCL - K s následujícím prvkovým složením povrchu nanovláčenné vrstvy: C 1s (63,99 %), N 1s (0,82 %) a O 1s (32,08). Na povrchu PCL nanovláčenných vzorků modifikovaných urychlenými ionty (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>) nedocházelo při XPS analýze k navýšení procentuálního zastoupení implantovaného prvku. Procentuální změna obsahu implantovaných prvků při energii 800 keV není detekovatelná na povrchu, resp. v hloubce do 10 nm. XPS analýza byla u těchto vzorků zvolena s cílem porovnat vliv chemického povrchového složení na biokompatibilitu a proliferaci 3T3 fibroblastů. Na povrchu PCL nanovláčenných vzorků modifikovaných iontovým svazkem (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>) byly XPS analýzou detekovány dvě hlavní skupiny prvků C 1s a O 1s. Modifikací PCL nanovláčenných vrstev iontovým svazkem však došlo zcela k uvolnění N 1s (0%) z povrchu materiálu. Výskyt C 1s se pohybuje v rozmezí (71,17 - 74,17 %) a O 1s (25,83 - 28,83 %).

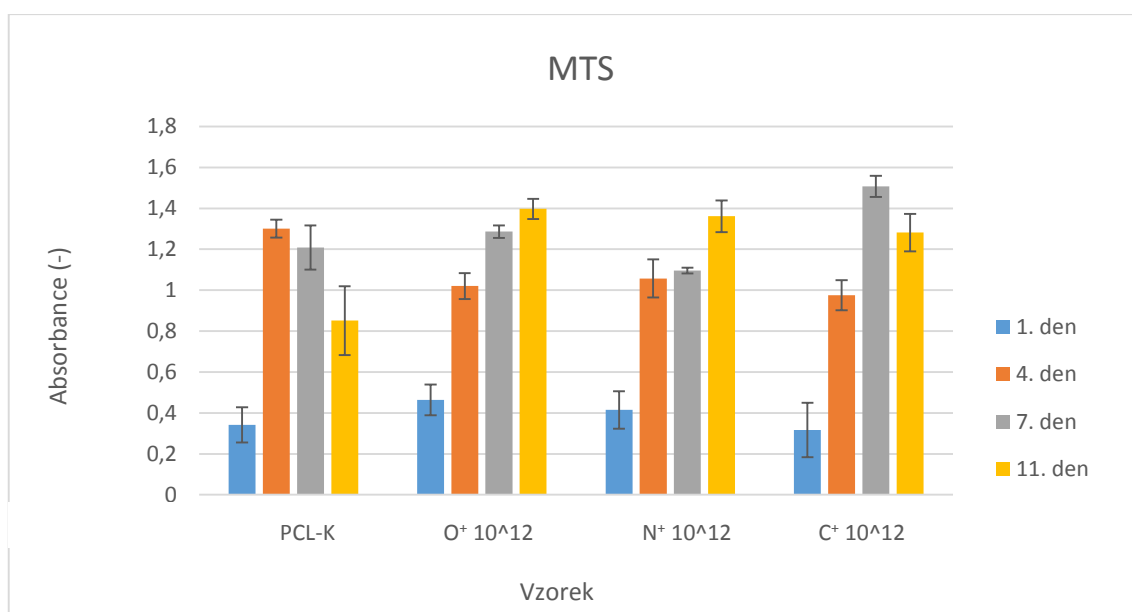
#### 4.2.2 Biologická charakterizace růstu 3T3 fibroblastů

Biologická analýza metabolické aktivity a proliferace 3T3 fibroblastů na poly  $\epsilon$ -kaprolaktonových nanovláčenných buněčných nosičích (PCL-NBN) implantovaných svazkem urychlených iontů (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>) byla vyhodnocena na základě výsledků MTS testu a dsDNA kvantifikací. Hodnoty absorbance a fluorescence byly měřeny 1., 4., 7.,

a 11. experimentální den. Buňky byly osazeny na PCL-NBN v počtu 4000 buněk na jamku. K vyhodnocení statistické významnosti naměřených dat byl použit software one-way ANOVA. Signifikantní odchylky ( $p \leq 0,05$ ) mezi jednotlivými měřeními byly vyhodnoceny metodou Student-Newman-Keuls.

d) MTS test metabolické aktivity

Výsledné hodnoty MTS testu metabolické aktivity 3T3 fibroblastů osazených na PCL-NBN implantovaných iontovým svazkem (viz graf 5) byly vyhodnoceny na základě naměřené absorbance tří navzájem nezávislých měření.



Graf 5\_ MTS test metabolické aktivity 3T3 fibroblastů PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>).

Z výsledků 1. testovacího dne vyplývá, že hodnoty absorbance MTS testu v tomto dnu nejsou signifikantně ( $p \leq 0,05$ ) rozdílné. Tento výsledek ukazuje na rovnoměrnou metabolickou aktivitu 3T3 fibroblastů mezi testovanými jamkami.

V průběhu 4. testovacího dne byly naměřeny signifikantně nejvyšší hodnoty absorbance u PCL-K ( $1,30 \pm 0,04$ ). U PCL nanovláčených vzorků modifikovaných iontovým svazkem nebyly naměřeny signifikantní rozdíly.

Výsledky ze 7. testovacího dne ukazují signifikantně nejvyšší hodnotu metabolické aktivity u vzorků implantovaných C<sup>+</sup> ( $1,51 \pm 0,05$ ). Vzorky implantované O<sup>+</sup> ( $1,29 \pm 0,03$ ) vykazují signifikantně vyšší metabolickou aktivitu 3T3 fibroblastů než PCL-K ( $1,21 \pm$



0,11) a vzorky s implantované N<sup>+</sup> (1,10 ± 0,02). Absorbance PCL-K je signifikantně vyšší než u vzorků implantovaných N<sup>+</sup> (1,10 ± 0,02).

Hodnoty absorbance v 11. dni vykazují signifikantně nejnižší metabolickou aktivitu u vzorku PCL-K (0,85 ± 0,17). Porovnání absorbance u vzorků implantovaných iontovým svazkem není signifikantně rozdílná.

Naměřené hodnoty absorbance u vzorku PCL-K prudce vzrostly v průběhu 4. dne, ale 7. a 11. den docházelo k postupnému poklesu. Metabolická aktivita 3T3 fibroblastů proliferujících na vzorku implantovaném O<sup>+</sup> dosáhla svého maxima při hodnotě absorbance (1,40 ± 0,05) v 11. dnu. Buňky na tomto nosiči vykazovaly postupný nárůst metabolické aktivity v průběhu celého období kultivace. Na vzorku implantovaném N<sup>+</sup> docházelo k postupnému zvyšování metabolické aktivity v průběhu celého kultivačního cyklu. Maximální hodnota absorbance byla naměřena v 11. dni (1,36 ± 0,09). Nanovlákněný vzorek implantovaný C<sup>+</sup> vykázal nejvyšší hodnotu absorbance (1,51 ± 0,05) v 7. dni, v 11. dni začala metabolická aktivita klesat.

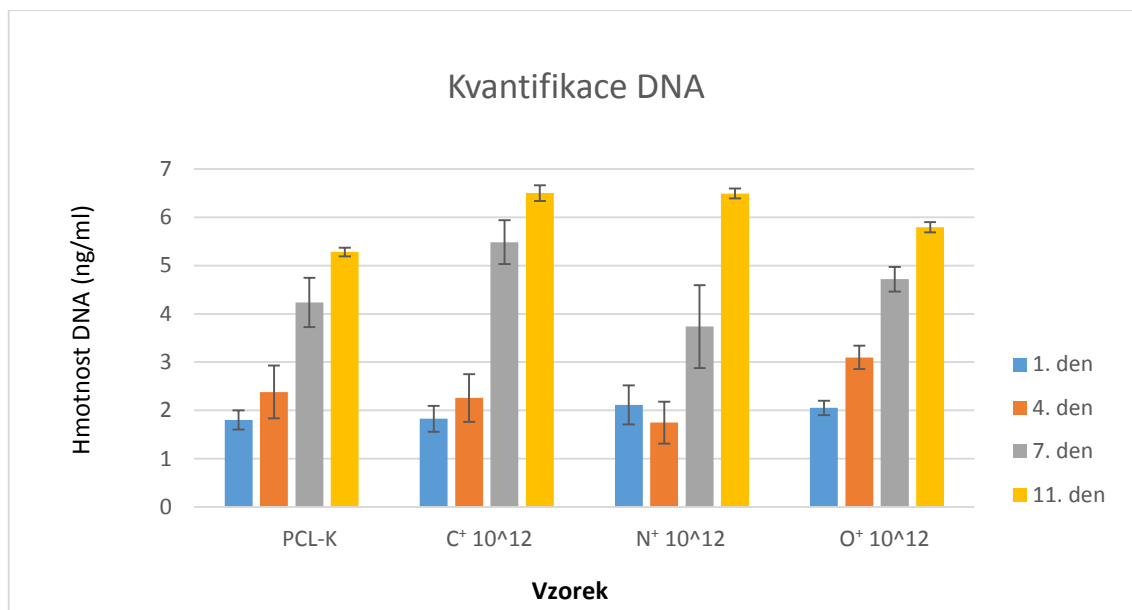
#### a) dsDNA kvantifikace

Hmotnost dsDNA 3T3 fibroblastů na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>) byla měřena (viz graf 6) detekcí signálu fluorescenční sondy PicoGreen (PG) interkalované do dsDNA. Kvantifikace dsDNA (ng/ml) byla vypočítána na základě kalibrační křivky stanovené z hodnot dsDNA standardů, jejíž koncentrace je známa z hodnot ředící řady. Použitím PG sondy však nelze při kvantifikaci rozlišit dsDNA živých a mrtvých buněk, výslednou hodnotou je tedy součet celkové dsDNA.

V průběhu 1. dne buněčné kultivace 3T3 fibroblastů na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem nebyly patrné signifikantní ( $p \leq 0,05$ ) rozdíly v hmotnosti dsDNA. Tento výsledek ukazuje na homogenní nasazení buněk 3T3 fibroblastů v počtu přibližně 4000 buněk na jamku.

Ve 4. testovacím dnu byla naměřena signifikantně nejnižší hodnota hmotnosti dsDNA u vzorku modifikovaného N<sup>+</sup> (1,75 ± 0,43 ng/ml).

Naměřené hodnoty fluorescence PG sondy ukázaly 7. den kultivace opakovaně signifikantně nejnižší hodnotu obsahu dsDNA u vzorku modifikovaného N<sup>+</sup> (3,74 ± 0,86 ng/ml). Naopak signifikantně nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku implantovaného C<sup>+</sup> (5,48 ± 0,46 ng/ml). Vzorek implantovaný O<sup>+</sup> (4,72 ± 0,26 ng/ml) byl signifikantně vyšší než PCL-K (4,23 ± 0,51 ng/ml).



**Graf 6\_Kvantifikace DNA 3T3 fibroblastů na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>).**

11. den mají signifikantně nejvyšší hodnotu metabolické aktivity 3T3 fibroblasty proliferující na vzorcích implantovaných C<sup>+</sup> ( $6,50 \pm 0,2$  ng/ml) a N<sup>+</sup> ( $6,49 \pm 0,10$  ng/ml). Mezi těmito dvěma vzorky není signifikantní rozdíl. Vzorek PCL-K ( $5,28 \pm 0,09$  ng/ml) má v 11. dni signifikantně nejnižší hmotnost DNA.

U všech vzorků, kromě vzorku modifikovaného svazkem N<sup>+</sup> iontů, docházelo po celou dobu jedenácti denní kultivace k plynulému nárůstu buněčné dsDNA. Maximální hodnoty fluorescence byla naměřena 11. den na vzorcích modifikovaných implantací C<sup>+</sup> a N<sup>+</sup>.

#### a) Buněčná viabilita

Přímou závislostí mezi metabolickou aktivitou buněk a hmotností dsDNA (viz graf 7) je určena buněčná viabilita neboli aktivita buněk.

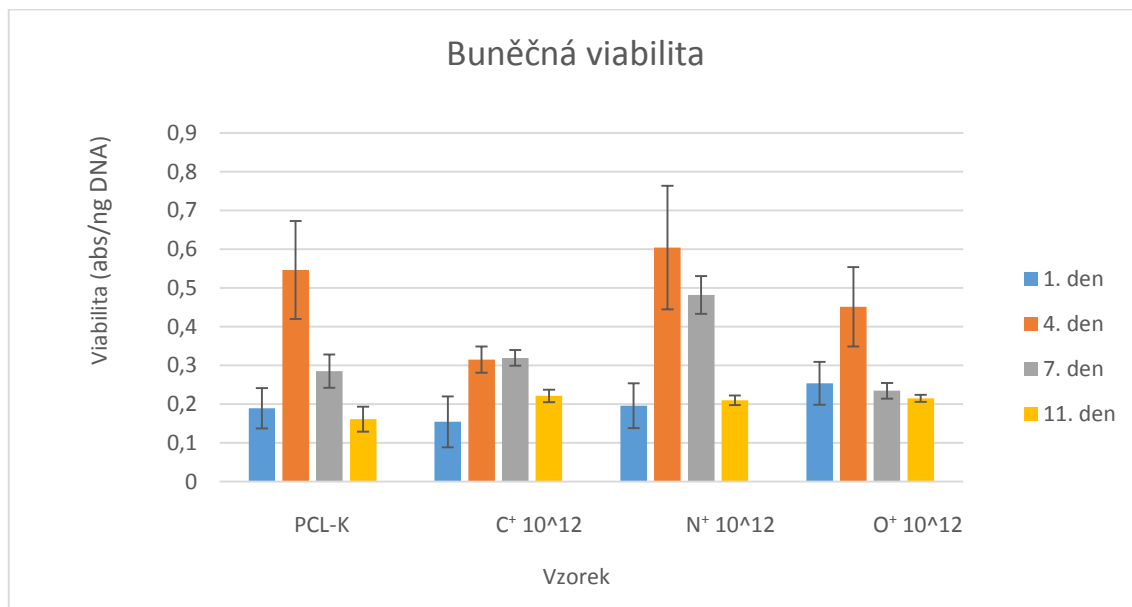
V 1. testovacím dnu nebyly naměřeny signifikantně významné rozdíly.

Ve 4. testovacím dnu byla stanovena signifikantně vyšší hodnota viability u vzorku implantovaném N<sup>+</sup> ( $0,60 \pm 0,16$  abs/ng dsDNA) a PCL-K ( $0,55 \pm 0,13$  abs/ng dsDNA) oproti vzorku s modifikací O<sup>+</sup> ( $0,45 \pm 0,10$  abs/ng dsDNA).

V 7. testovacím dni byla signifikantně nejvyšší hodnota buněčné viability u vzorku s implantovanými N<sup>+</sup> ionty. Buněčná viabilita vzorků PCL-K ( $0,29 \pm 0,04$  abs/ng dsDNA) a vzorku s implantovanými O<sup>+</sup> ( $0,23 \pm 0,02$  abs/ng dsDNA) je signifikantně vyšší než u vzorku s implantovanými C<sup>+</sup> ( $0,32 \pm 0,02$  abs/ng dsDNA).

V průběhu 11. testovacího dne dochází k signifikantně nejnižší buněčné viabilitě u vzorku PCL-K ( $0,16 \pm 0,03$  abs/ng dsDNA). Mezi ostatními vzorky není signifikantní rozdíl.

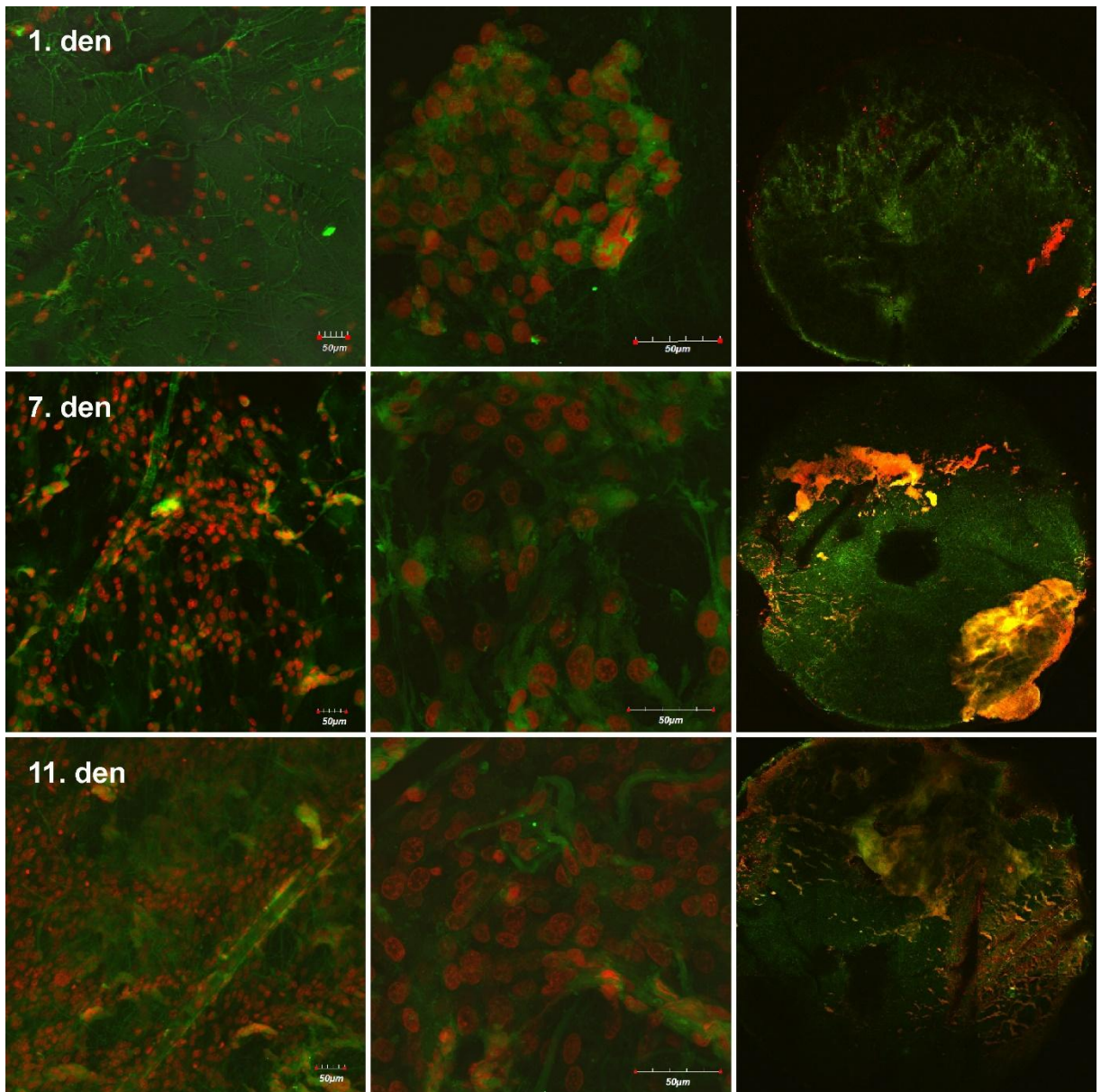
Buněčná viabilita 3T3 fibroblastů osazených na PCL-NBN modifikovaných svazkem urychlených iontů ukazuje výrazný nárůst metabolické aktivity oproti buněčné proliferaci. V 7. a 11. testovacím dnu dochází naopak ke zvýšení buněčné proliferace.



Graf 7\_Buněčná viabilita 3T3 fibroblastů na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>).

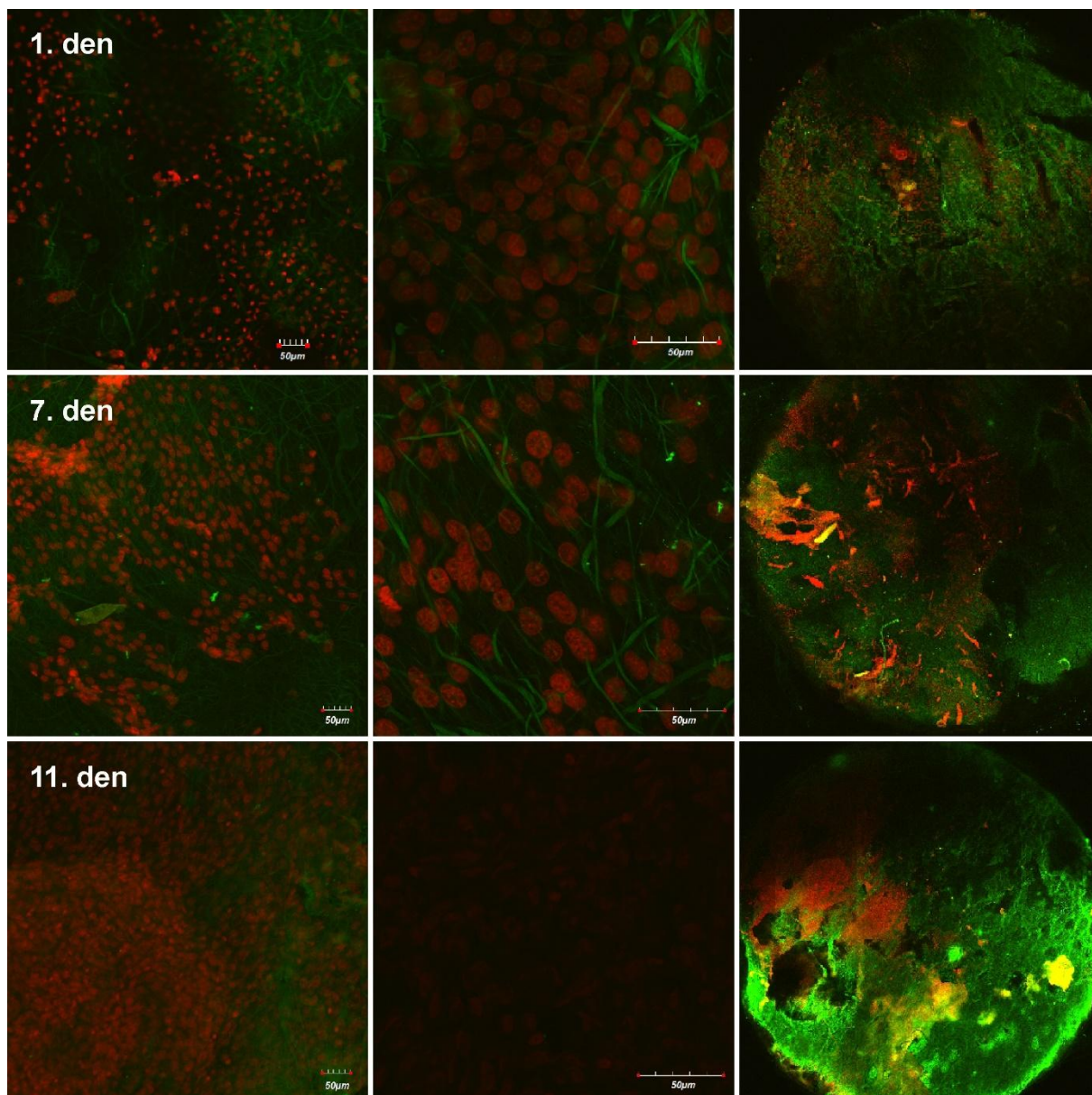
#### 4.2.3 Konfokální mikroskop

Vizualizace průběhu kultivace 3T3 fibroblastů (viz obrázek 12-15) na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem byla realizována konfokálním mikroskopem (FV10i, Olympus). 3T3 fibroblasty byly barveny fluorescenčními barvivy DiOC 6 (3) a Propidium Iodid.



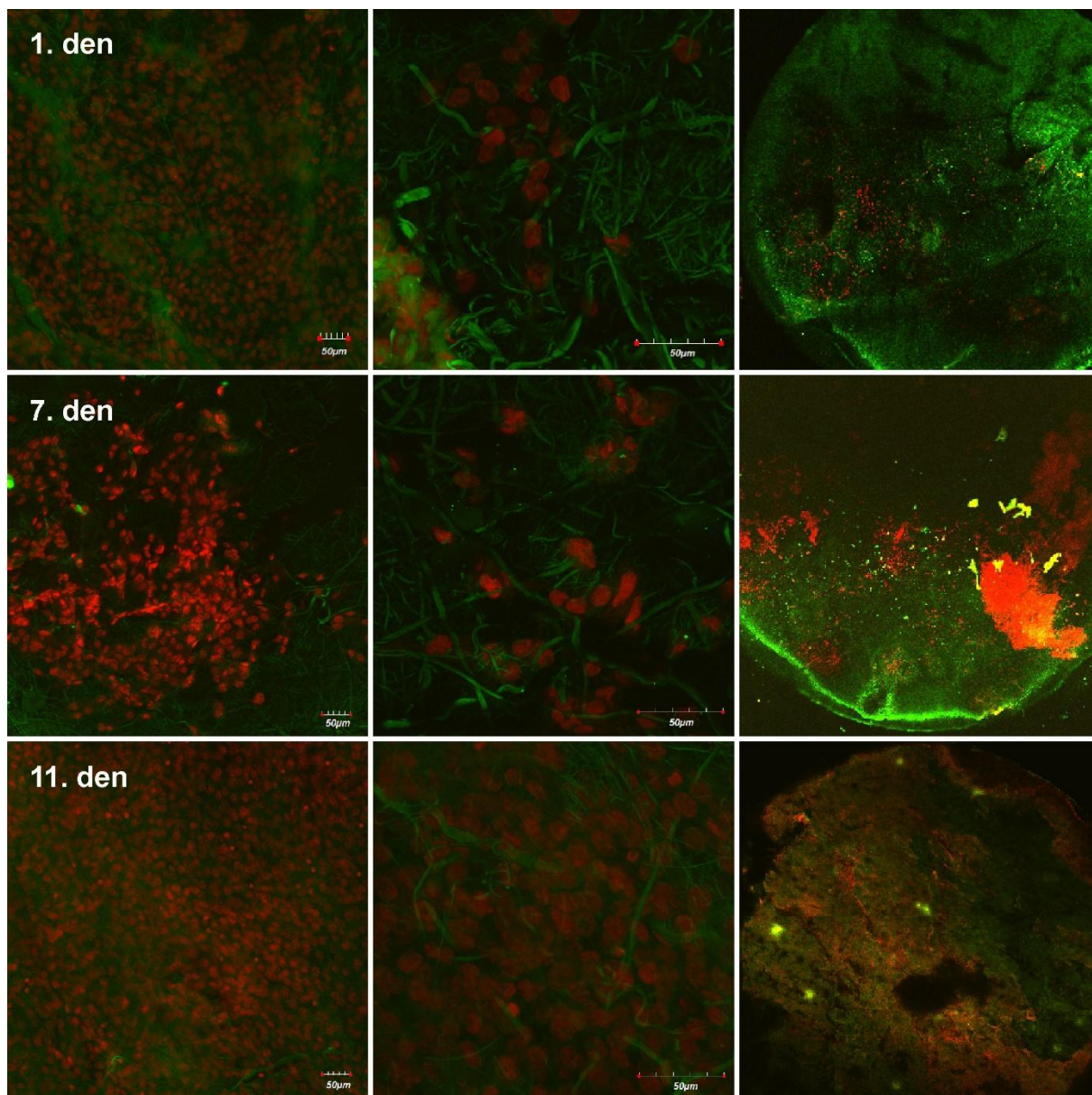
Obrázek 12\_PCL – kontrolní vzorek: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)

Snímky 3T3 fibroblastů adherujících na PCL-NBN (PCL-K) v 1. dni prokazují úspěšné nasazení a zároveň ukazují tendenci k tvorbě buněčných shluků na povrchu vláknenného nosiče. Tato tendence se dále projevuje i ve 4. dni, ale za zvýšené hmotnosti dsDNA. 11. den kultivace buňky proliferují na polovině PCL-NBN. V průběhu celého kultivačního období dochází u vzorku PCL-K k rovnoměrnému nárůstu hmotnosti dsDNA.



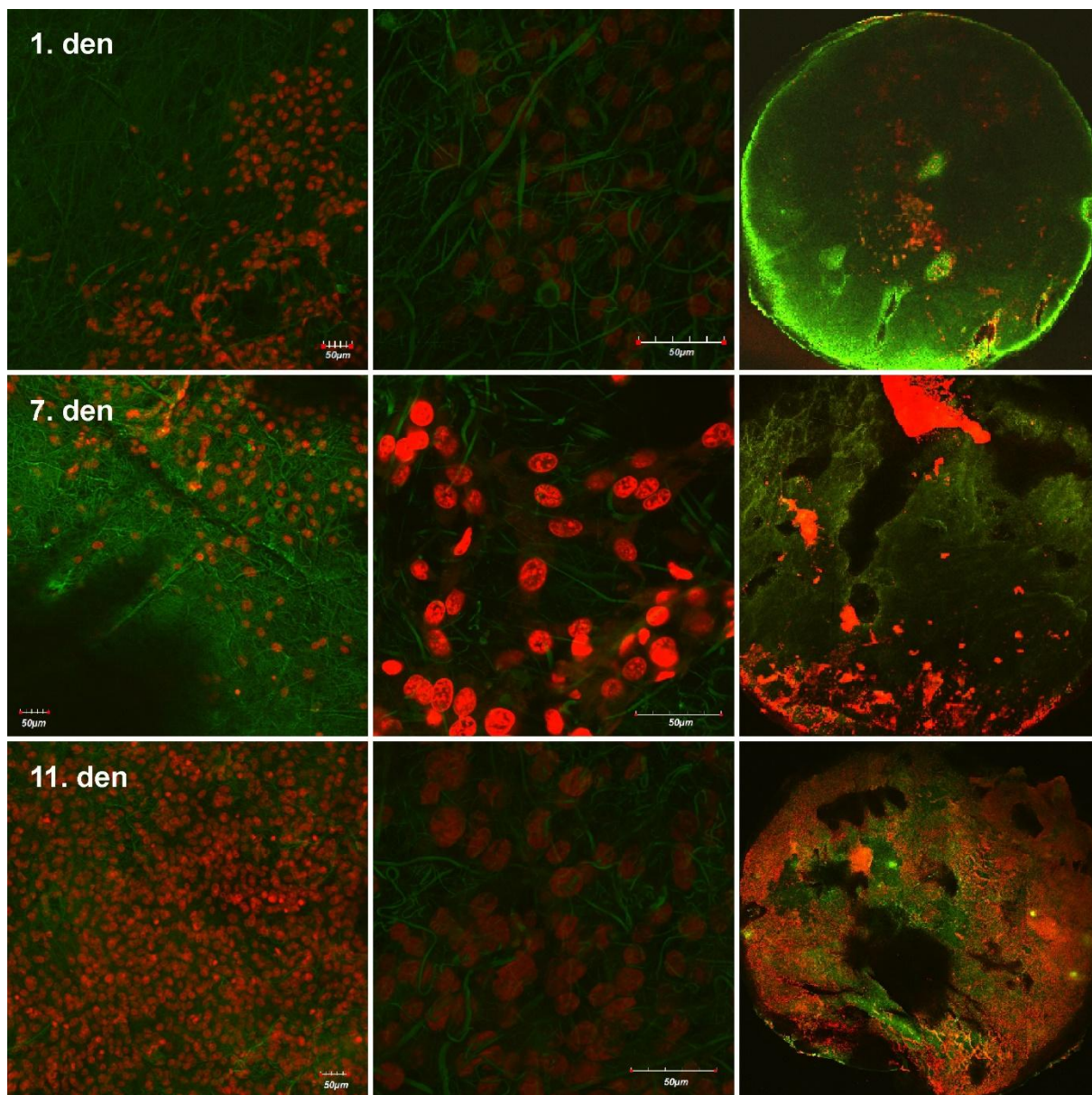
Obrázek 13\_C<sup>+</sup> 10<sup>12</sup>: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)

V 1. dni bylo u tohoto vzorku PCL-NBN s implantovanými C<sup>+</sup> potvrzeno úspěšné nasazení 3T3 fibroblastů. Buňky mají již v prvním dni dobře viditelná jádra. 7. den kultivace dochází k výraznému nárůstu hmotnosti dsDNA (viz graf 6), buňky pokrývají přibližně polovinu buněčného nosiče. V průběhu 11. dne byl na PCL-NBN vytvořen buněčný shluk pokrývající téměř čtvrtinu buněčného nosiče.



Obrázek 14\_N<sup>+</sup> 10<sup>12</sup>: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)

PCL-NBN modifikovaný implantací N<sup>+</sup> vykazuje na snímku z 1. dne poměrně nízký počet nepřilíživě rovnoměrně rozmístěných buněk. V 7. dni dochází k nárůstu hmotnosti buněčné dsDNA, buněčná jádra mají deformovaný tvar. Na povrchu PCL-NBN jsou tvořeny koncentrované buněčné shluky. V 11. dnu dochází k tvorbě konfluentní vrstvy na povrchu téměř celého buněčného nosiče. V tomto dni bylo dosaženo výrazného navýšení hmotnosti dsDNA 3T3 fibroblastů.



Obrázek 15\_O<sup>+</sup> 10<sup>12</sup>: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)

PCL-NBN modifikovaný implantací O<sup>+</sup> na snímku z 1. dne potvrzuje nasazení 3T3 fibroblastů. Již první den dochází k poměrně zřetelné vizualizaci buněčných jader. V 7. kultivačním dni dochází k výraznému navýšení hmotnosti dsDNA. Buňky tvoří na nanovlákněném nosiči několik větších agregátů, tvoří tedy rovnoměrnou konfluentní vrstvu. 11. den dochází k poměrně rovnoměrné proliferaci 3T3 fibroblastů po celém povrchu PCL-NBN. Hmotnost dsDNA vykazuje v průběhu celého kultivačního období rovnoměrný nárůst.

## 5 Diskuse výsledků

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat vliv modifikace netermálním plazmatem (RF doutnavým výbojem v  $N_2$  a  $O_2$ ) a implantací iontovým svazkem ( $C^+$ ,  $N^+$ ,  $O^+$ ) na povrch poly- $\epsilon$ -kaprolaktonových (PCL) nanovláčkových vrstev. PCL je biodegradabilní, hydrofobní polyester vyznačující se vynikající biokompatibilitou, dlouhodobou degradací (v řádu několika měsíců až let) a velmi dobrými mechanickými vlastnostmi [98,99,100]. Hydrofobní vlastnosti polyesterů a jejich nízká povrchová energie vedou ke špatné buněčné adhezi, rozvinutí a proliferaci. Proto je obvykle nutné modifikovat povrch těchto materiálů a přiblížit se tak vlastnostem přírodní extracelulární matrix, abychom dosáhli zvýšení buněčné adheze [101].

Povrchová modifikace biomateriálů může být provedena několika fyzikálními technologiemi zahrnujícími například netermální plazmatickou modifikaci, elektronový svazek, iontový svazek, UV-, X-,  $\gamma$ - záření. Účinkem těchto fyzikálních modifikačních technologií je aktivace povrchovou za účelem zvýšení obsahu polárních chemických skupin, modifikace povrchového náboje a zvýšení volné povrchové energie [101,51].

Netermální plazmatická modifikace je jednou z efektivních metod modifikace povrchových vlastností PCL neovlivňující celý objem materiálu [51,52,102]. Výsledek funkcionalizace polymerního povrchu plazmatem je ovlivněn volbou plynného prostředí ( $Ar$ ,  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ) [103]. Například modifikace plazmatickým výbojem v atmosféře kyslíku, uhlíku nebo oxidu uhličitým způsobuje zvýšení karboxylových a hydroxylových chemických skupin na povrchu PCL [104]. Plynné prostředí plazmatického výboje obsahující amoniak nebo dusík zvyšuje obsah aminových skupin [105].

V diplomové práci byl k plazmatické modifikaci využíván RF doutnavý výboj buzený v prostředí  $O_2$  a  $N_2$ . XPS analýza prvkového složení povrchu PCL nanovláčkových vrstev prokazuje zvýšení obsahu daného prvku v závislosti na plynu, kterým byl povrch modifikován [52,102]. Prvkové složení PCL-K (C 1s 66,04%, N 1s 0,85%, O 1s 33,11%) ukazuje nejvyšší procentuální zastoupení C 1s oproti plazmaticky modifikovaným vzorkům což odpovídá výsledkům práce Martins, et al. [52], Valence et al. [83]. Nedochozí tedy ke karbonizaci povrchu. Plazmatická modifikace v  $N_2$  a  $O_2$  atmosféře ukazuje výrazné zvýšení těchto prvků a zároveň závislost na použitém napětí. Se zvyšujícím se záporným napětím dochází ke snížení obsahu daného prvku, který je obsažen v plynné fázi v komoře se zapáleným RF doutnavým výbojem.

Z výsledků (viz tabulka 6) vyplývá, že vlivem modifikace RF doutnavým výbojem dochází ke zvýšení plošné hmotnosti, způsobenému zvýšením hydrofilních chemických skupin na povrchu materiálu a tím i zvýšené sorpci vzdušné vlhkosti materiálu. Se



zvýšením záporného napětí zároveň dochází ke snížení tloušťky nanovláknenného materiálu. Vlivem plazmatické modifikace dochází ke snížení velikosti průměrů vláken, které je patrnější u N<sub>2</sub> plazmatické modifikace. Výsledky vlivu plazmatické modifikace na průměr vláken vychází z porovnání snímků ze SEM. Naměřené hodnoty průměrů vláken jsou uvedeny v tabulce 6, potvrzení těchto hodnot je patrné z grafů distribuce vláken (viz příloha A, graf 8-12).

Zvýšením obsahu polárních chemických skupin na povrchu polymeru dochází ke zvýšení hydrofility, které může být charakterizováno kontaktním úhlem H<sub>2</sub>O nebo hodnotou  $\zeta$ -potenciálu. Kontaktní úhel u PCL-K nanovláknenných buněčných nosičů (bez modifikace) testovaných v této diplomové práci byl charakterizován průměrnou hodnotou  $(65 \pm 5)^\circ$  (viz tabulka 7). Naopak povrchy plazmaticky modifikovaných nosičů v O<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> atmosféře se stávají výrazně hydrofilnějšími podobně, jako tomu bylo u výsledků Bak, et al. [106] a de Valence et al. [83]. Jokinen et al. [82] dále potvrdili, že plazmatický výboj působící v O<sub>2</sub> atmosféře způsobuje intenzivnější nárůst polárních skupin na povrchu materiálu, než je tomu u N<sub>2</sub>. Edlund, et al. [107] potvrzuje, že nízký kontaktní úhel vede ke snížení proteinové adsorpce. Naopak velmi vysoký kontaktní úhel povrchu s nízkou povrchovou energií se projevuje méně četnými mezibuněčnými spoji a vlivem dominantních hydrofobních interakcí s povrchem nosiče může docházet až k denaturaci proteinů [107]. Podle výsledků dsDNA kvantifikace na PCL buněčných nosičích (viz graf 3) dochází ke snížené proliferaci u vzorků s nejnižšími a nejvyššími kontaktními úhly.

Plazmatická modifikace za účelem zvýšení obsahu polárních, resp. hydrofilních chemických skupin na povrchu materiálu má za následek zvýšení hodnoty  $\zeta$ -potenciálu, který je závislý na několika faktorech jako je např. povrchová morfologie, chemické složení a polarita polymerního povrchu [101]. Byl potvrzen předpoklad výrazného snížení záporné hodnoty, resp. zvýšení,  $\zeta$ -potenciálu vlivem plazmatické modifikace (viz tabulka 7). U nemodifikovaného vzorku PCL-K byla naměřena nejnižší hodnota, resp. nejvyšší záporná hodnota  $\zeta$ -potenciálu  $(-51,4 \pm 1,5 \text{ mV})$  a zároveň nejvyšší kontaktní úhel. Některé výsledky kontaktního úhlu a  $\zeta$ -potenciálu nejsou v přímé korelaci, což ukazuje na výraznější vliv povrchové drsnosti materiálu oproti chemickému složení.

Zvýšení biokompatibility a buněčné proliferace na plazmaticky modifikovaných PCL nanovláknenných buněčných nosičích bylo prokázáno testy metabolické aktivity a dsDNA kvantifikace (viz graf 2 a 3) liniových buněk 3T3 fibroblastů 1., 4., 7., a 11. den kultivace. V obou případech je uveden signifikantní ( $p \leq 0,05$ ) nárůst biokompatibility u plazmaticky modifikovaných vzorků, tyto výsledky potvrzuje i de Valence et al. [83]. Nejvyšší hodnoty hmotnosti dsDNA jsou uvedeny u buněčných nosičů O<sub>2</sub> (-100V). Biokompatibilita byla dále prokázána na snímcích z konfokálního mikroskopu, kdy docházelo v průběhu 7. až 11. ke tvorbě konfluentní buněčné vrstvy na povrchu buněčného nosiče. Výsledky tedy dokazují, že plazmatická modifikace v prostředí O<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> je vhodnou modifikační metodou pro zvýšení buněčné proliferace PCL-NBN.

Ke zlepšení buněčné adheze a biokompatibility nanovláknenného nosiče se kromě plazmatické modifikace a jiných fyzikálních metod používá také implantace energetickými iontovými svazky. Pro biologické aplikace se používají ionty  $O^+$ ,  $N^+$ , halogenů a netoxických ušlechtilých kovů (např. Ti, Au). V závislosti na molekulové hmotnosti a energii zůstávají implantované ionty v polymerní vrstvě nebo ji opouští ihned po implantaci. Iontová implantace vede ke štěpení C-C a C-H vazeb, čímž dochází k odštěpení makromolekul a dehydrogenaci. V průběhu polymerní dehydrogenace dochází k navýšení obsahu uhlíku, neboli karbonizaci [48,108]. Implantace iontovým svazkem lze použít k modifikaci silných vrstev, nejedná se tedy pouze o povrchovou modifikaci. Hlavními výhodami této modifikační metody je velmi dobrá regulovatelnost procesu a vysoká reprodukovatelnost ve srovnání s ostatními fyzikálními modifikacemi jako např. UV záření, elektronový svazek a plazmatická modifikace [109]. Naopak nevýhodou je poměrně vysoká ekonomická náročnost.

Chemické složení povrchu vzorků modifikovaných iontovou implantací se vyznačuje absencí dusíku. Podobně jako v práci Marlett et al. 2005 [110] došlo k rozdělení prvkového složení povrchu PCL do dvou výrazných skupin obsahujících O 1s a C 1s, přičemž po implantaci iontovým svazkem dochází ke zvýšení obsahu C 1s oproti O 1s. Modifikací svazkem urychlených iontů dochází k výrazné karbonizaci povrchu polymeru [48,108,110]. Výsledky dsDNA kvantifikace (viz graf 6) ukazují v 11. dni výrazně vyšší proliferaci 3T3 fibroblastů u PCL nanovláknenných vzorků modifikovaných iontovým svazkem. Z porovnání výsledků v jednotlivých dnech lze usoudit, že zvýšení buněčné proliferace závisí na procentuálním zastoupení C 1s na povrchu materiálu. Iontová implantace byla provedena při energii 800 keV, důsledkem této vysoké energie nelze analyzovat atomární složení implantovaného prvku na povrchu materiálu detekovatelném XPS. Implantované ionty se nachází ve větších hloubkách než 10 nm. Lze však velmi dobře analyzovat karbonizaci povrchu, která se u iontově implantovaných vzorků výrazně projevila. Plošná hmotnost PCL nanovláknenného materiálu modifikovaného iontovým svazkem neprochází tak výraznými změnami, jako u plazmaticky modifikovaných vzorků. Vzorky modifikované svazkem urychlených iontů prokázaly odpovídající závislosti mezi tloušťkou materiálu a plošnou hmotností (viz tabulka 9). Průměr vláken vzhledem k vysokým směrodatným odchylkám neprochází výraznými změnami, kromě PCL nanovláknenného vzorku implantovaného  $N^+$ , kde je nárůst průměrů vláken potvrzen i z grafu distribuce průměrů vláken (viz příloha A, graf 14). Rozdíl mezi morfologickými vlastnostmi nanovláknenné vrstvy je dále patrný ze snímků SEM (obrázek 11).

Hodnoty naměřených kontaktních úhlů a doba absorpce kapky u nanovláknenných vzorků implantovaných iontovým svazkem, měly výrazně zvyšující se tendenci ( $80 - 90^\circ$ ) oproti kontaktnímu úhlu naměřenému na nemodifikovaných vzorcích PCL-K ( $65 \pm 5^\circ$ ) (viz tabulka 10). Zvýšení kontaktního úhlu vlivem iontové implantace a výrazné prodloužení doby absorpce kapky (viz tabulka 10) je pravděpodobně způsobeno snížením povrchové

drsnosti způsobené iontovou implantací podobně jako v práci Marletta et al. 2005 [110]. Jistý vliv má zároveň snížení prvkového zastoupení O 1s a celková absence dusíku, což ukazuje na snížení polárních skupin na povrchu materiálu.  $\zeta$ -potenciál PCL nanovláčného materiálu modifikovaného implantací iontovým svazkem dosáhl výrazného zvýšení, resp. snížení záporných hodnot u modifikovaných vzorků. Z porovnáním výsledků povrchového  $\zeta$  – potenciálu a chemického složení povrchu PCL nanovláčného materiálu vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem C 1s na povrchu materiálu dochází ke snížení záporné hodnoty povrchového  $\zeta$  – potenciálu. Tento výsledek může potvrdit závislost povrchového  $\zeta$  – potenciálu na výskytu  $\text{COO}^-$  skupin (Manso, et al.) [91]. Na povrchu polymerního materiálu nemůžeme z důvodu dehydrogenace vlivem iontového svazku očekávat významné množství např.  $\text{CH}_2$  skupin ani jiných chemických skupin obsahující vodík.

PCL nanovláčenné vzorky modifikované iontovým svazkem prokázaly signifikantní ( $p \leq 0,05$ ) zvýšení biokompatibility zvýšením hmotnosti dsDNA i metabolické aktivity 3T3 fibroblastů (viz graf 6 a 7) v průběhu 11. dne. Výsledky zvýšení biokompatibility polymerních vzorků modifikovaných iontovým svazkem byly potvrzeny skupinami Marletta et al. [110], Manso, et al.[91], Yotoryiyama, et al. [94], Tanaka, et al. [109,111], Ročková-Hlaváčová, et al. [112], Švorčík et al. [108]. Nejvyšší nárůst dsDNA byl prokázán v 11. dni u vzorků modifikovaných  $\text{C}^+$  a  $\text{N}^+$ . Postupné zvýšení počtu buněk v průběhu kultivace je patrné i na snímcích z konfokálního mikroskopu. U iontově implantovaných PCL nanovláčenných buněčných nosičů došlo k tvorbě konfluentní vrstvy na povrchu celého nosiče v průběhu 11. den jen u vzorků implantovaných  $\text{N}^+$  a  $\text{O}^+$ .

Výsledky experimentální části diplomové práce prokazují příznivý vliv obou testovaných fyzikálních modifikací na metabolickou aktivitu a proliferaci myších 3T3 fibroblastů. Výsledky plazmaticky modifikovaných vzorků (RF doutnavý výboje v prostředí  $\text{N}_2$  a  $\text{O}_2$ ) prokázaly výrazné zvýšení polárních chemických skupin na povrchu materiálu. Vlivem této modifikace došlo k prokazatelnému zvýšení buněčné proliferace oproti nemodifikovanému kontrolnímu vzorku PCL-K. Implantací svazkem urychlených iontů ( $\text{C}^+$ ,  $\text{N}^+$ ,  $\text{O}^+$ ) byly zvýšeny naopak hydrofobní vlastnosti povrchu, ale zůstal zachován trend zvýšené buněčné proliferace a metabolické aktivity oproti PCL-K. Výsledky XPS analýzy ukázaly u iontově implantovaných vzorků snížený obsah chemických polárních skupin a částečnou karbonizaci povrchu. K největšímu zvýšení buněčné proliferace 3T3 fibroblastů došlo u obou typů modifikovaných vzorků v průběhu 7. a 11. dne kultivace.

## 6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověření biokompatibility a analýza materiálových změn fyzikálně modifikovaných poly-ε-kaprolaktonových nanovláknenných buněčných nosičů (PCL-NBN). Tyto nosiče byly modifikovány netermálním plazmatem (RF doutnavým výbojem v O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) a implantačí iontovým svazkem (O<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, C<sup>+</sup>).

Obě fyzikální metody byly úspěšně použity pro modifikaci PCL vzorků. Z výsledků provedených experimentů došlo k potvrzení základních předpokladů vlivu na změnu materiálových vlastností. Plazmatickou modifikací PCL nanovláknenných vrstev byl významně snížen kontaktní úhel (H<sub>2</sub>O), oproti kontrolnímu vzorku (PCL-K). Iontovou implantačí došlo naopak ke zvýšení hydrofobních vlastností oproti PCL-K. Testy biokompatibility neprokázaly velmi výrazné zvýšení proliferace 3T3 fibroblastů, ale průměrné výsledky u modifikovaných vzorků dokazují vždy signifikantní ( $p \leq 0,05$ ) nárůst buněčné proliferace a metabolické aktivity 3T3 fibroblastů u fyzikálně modifikovaných vzorků.

Závěrem této diplomové práce může být doporučení pro ověření vlivu implantace iontovým svazkem o různé škále energií a různými druhy implantovaných iontů. Tato modifikace nanovláknenných materiálů v současné době teprve začíná procházet vědeckým výzkumem. Jedná se proto o poměrně neznámou oblast, která může v budoucnu nabídnout velmi zajímavé výsledky. Implantačními metodami lze ovlivnit některé vlastnosti, jako je například: degradace, síťování polymerů, zvýšení elektrické vodivosti a jiné.

Obě použité fyzikální modifikace umožňují tzv. vzorování, neboli modifikaci povrchu ve specifickém tvaru, ve kterém je požadována zvýšená buněčná adheze. Tuto možnost je možné použít u buněk (např. neurony) vyžadujících růst orientovaný do velmi úzkých linií.

Dobré mechanické vlastnosti PCL, které nebyly použitými fyzikálními modifikacemi nijak výrazně narušeny, nabízejí potenciální praktické využití takto modifikovaných PCL-NBN v oblasti krytů ran, kde je možné výhodně využít jednostranné modifikace nanovláknenného materiálu [113,114]. Dále mohou být tyto buněčné nosiče použity k léčbě hernie [115]. Pro tento případ biomedicínské aplikace je možné vyrobit nanovláknenný materiál s odlišným druhem modifikace na obou stranách nanovláknenné vrstvy.

## Seznam termínů a zkratek

3T3 fibroblasty	Transferovaná buněčná linie embrionálních myších fibroblastů dosahujících po 3 denní kultivaci počtu $3 \cdot 10^5$ buněk na $20 \text{ cm}^2$ .
abs	Absorbance
ATB	Antibiotika
DiOC 6 (3)	3,3'-dihexyloxacarboocyanin jodid
DMEM	Dulbecco's modified eagle' medium
DNA	Deoxyribonukleonová kyselina
dsDNA	Dvou řetězcová deoxyribonukleonová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Etylendiamid tetraoctová kyselina
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration
MTS	Mitochondrial targeting sequence
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Poly- $\epsilon$ -kaprolakton
PLA	Kyselina polymléčná
PMMA	Polymethylmethakrylát
PGA	Kyselina polyglykolová
PCL-NBN	Poly( $\epsilon$ -kaprolaktonové) nanovláčenné buněčné nosiče
PG	Pico Green
PI	Propidium Iodid
RF	Radiofrekvenční
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
ssDNA	Jedno řetězcová deoxyribonukleonová kyselina
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminometan
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie

## Seznam obrázků

- Obrázek 1: Schematické znázornění povrchového  $\zeta$ -potenciálu
- Obrázek 2: Schéma aparatury RF reaktoru
- Obrázek 3: Schéma interakcí mezi buněčným nosičem a kyslíkovým plazmatem
- Obrázek 4: Snímky kontrolního vzorku PCL nanovláčenného materiálu (PCL-K) pořízené na SEM při zvětšení 500x, 3000x a 30 000x
- Obrázek 5: Plazmaticky modifikované vzorky PCL nanovláčenného materiálu. Snímky byly pořízeny na SEM při zvětšení 500x, 3000x a 30 000x
- Obrázek 6: Kontrolní vzorek PCL – K: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 7: O<sub>2</sub> (-100V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 8: O<sub>2</sub> (-200V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 9: N<sub>2</sub> (-100V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 10: N<sub>2</sub> (-200V): Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 4., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 11: PCL nanovláčenné vrstvy modifikované iontovou implantací. Snímky byly pořízeny na SEM při zvětšení 500x, 3000x a 30 000x.
- Obrázek 12: kontrolní vzorek: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 13: C<sup>+</sup> 10<sup>12</sup>: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 14: N<sup>+</sup> 10<sup>12</sup>: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)
- Obrázek 15: O<sup>+</sup> 10<sup>12</sup>: Snímky z konfokálního mikroskopu 1., 7. a 11. den kultivace. Barvení: Propidium Iodid a Dioc 6 (3)

## Seznam tabulek

- Tabulka 1: Vliv parametrů přípravy na morfologii nanovláčků
- Tabulka 2: Vliv povrchových skupin materiálu na buňky
- Tabulka 3: Seznam použitých chemikálií
- Tabulka 4: Seznam použitých přístrojů
- Tabulka 5: Základní parametry plazmatické modifikace
- Tabulka 6: Materiálová charakterizace PCL nanovláčenné vrstvy
- Tabulka 7: Charakterizace změny povrchových chemických skupin v závislosti na modifikaci RF doutnavým výbojem
- Tabulka 8: Základní parametry iontové implantace
- Tabulka 9: Materiálová charakterizace PCL nanovláčenné vrstvy
- Tabulka 10: Charakterizace změny povrchových chemických skupin v závislosti na iontové implantaci (C<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>)

## Seznam grafů

Graf 1: Viskozita 24% PCL v závislosti na teplotě  $t = 20 - 50$  °C

Graf 2: MTS test metabolické aktivity 3T3 fibroblastů na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN

Graf 3: Kvantifikace dsDNA 3T3 fibroblastů na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN

Graf 4: Buněčná viabilita 3T3 fibroblastů na plazmaticky modifikovaných PCL-NBN

Graf 5: MTS test metabolické aktivity 3T3 fibroblastů PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem ( $C^+$ ,  $N^+$ ,  $O^+$ )

Graf 6: Kvantifikace DNA 3T3 fibroblastů na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem ( $C^+$ ,  $N^+$ ,  $O^+$ )

Graf 7: Buněčná viabilita 3T3 fibroblastů na PCL-NBN modifikovaných iontovým svazkem ( $C^+$ ,  $N^+$ ,  $O^+$ )

## Seznam příloh

Příloha A: Distribuce průměrů vláken

Příloha B: Atomární koncentrace prvků (XPS)

## Seznam literatury

- [1] LANZA, R, Robert S LANGER a Joseph VACANTI. 2000. *Principles of tissue engineering*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, xli, 995 p. ISBN 01-243-6630-9.
- [2] DAHLIN, Rebecca L., F. Kurtis KASPER a Antonios G. MIKOS. Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2011, vol. 17, issue 5, s. 349-364 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0238.
- [3] WOO, Kyung Mi, Victor J. CHEN a Peter X. MA. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2003, 67A, issue 2, s. 531-537 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1002/jbm.a.10098.
- [4] 2005. RAMAKRISHNA, Seeram, Kazutoshi FUJIHARA, Wee-Eong TEO, Teik-Cheng LIM a Zuwei MA. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific Publishing, s. 7-15. ISBN 9812564543
- [5] AHN, Y.C., S.K. PARK, G.T. KIM, Y.J. HWANG, C.G. LEE, H.S. SHIN a J.K. LEE. Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. *Current Applied Physics* [online]. 2006, vol. 6, issue 6, s. 1030-1035 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.cap.2005.07.013.
- [6] LANNUTTI, J., D. RENEKER, T. MA, D. TOMASKO a D. FARSON. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2007, vol. 27, issue 3, s. 504-509 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.msec.2006.05.019.
- [7] RENEKER, Darrell H. a Alexander L. YARIN. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* [online]. 2008, vol. 49, issue 10, s. 2387-2425 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.
- [8] COOLEY, J.F. Apparatus for electrically dispersing fluids. 1902. US 692631 A, USA
- [9] RENEKER, Darrell H a Hao FONG. 2006. *Polymeric nanofibers*. Washington, DC: Oxford University Press, xii, 430 p. ISBN 978-084-1239-197.
- [10] BUGARSKI, B., B. AMSDEN, M. F. A. GOOSEN, R. J. NEUFELD a D. PONCELET. 1994. Effect of electrode geometry and charge on the production of polymer microbeads by electrostatics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* [online]. 72(3): 517-521 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1002/cjce.5450720318. ISSN 00084034.
- [11] RAYLEIGH, Lord. 1882. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine Series 5* [online]. 14(87): 184-186 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1080/14786448208628425. ISSN 1941-5982.
- [12] LUKÁŠ, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, K. VODSEĎÁLKOVÁ, D. LUBASOVÁ, J. CHALOUPEK, P. POKORNÝ, P. MIKEŠ, J. CHVOJKA, et al. 2009. Physical principles of electrospinning: (electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). Abingdon, Oxon: Taylor. *Textile Progress*. ISBN 978-041-5558-235.
- [13] TAYLOR, G. Electrically Driven Jets. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 1969, vol. 313, issue 1515, s. 453-475 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1098/rspa.1969.0205.



- [14] BURGER, Christian, Benjamin S. HSIAO a Benjamin CHU. NANOFIBROUS MATERIALS AND THEIR APPLICATIONS. *Annual Review of Materials Research* [online]. 2006, vol. 36, issue 1, s. 333-368 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1146/annurev.matsci.36.011205.123537.
- [15] BUER, A., S. C. UGBOLUE a S. B. WARNER. Electrospinning and Properties of Some Nanofibers. *Textile Research Journal* [online]. 2001, vol. 71, issue 4, s. 323-328 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1177/004051750107100408.
- [16] HOHMAN, Moses M., Michael SHIN, Gregory RUTLEDGE a Michael P. BRENNER. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids* [online]. 2001, vol. 13, issue 8 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1063/1.1384013.
- [17] RENEKER, Darrell H., Alexander L. YARIN, Hao FONG a Sureeporn KOOMBHONGSE. 2000. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics* [online]. 87(9) [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1063/1.373532.
- [18] ANDRADY, A. *Science and technology of polymer nanofibers*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2008, 403 p. ISBN 0471790591.
- [19] LEE, K.H., H.Y. KIM, M.S. KHIL, Y.M. RA a D.R. LEE. Characterization of nano-structured poly( $\epsilon$ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer* [online]. 2003, vol. 44, issue 4, s. 1287-1294 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/s0032-3861(02)00820-0.
- [20] SILL, Travis J. a Horst A. von RECUM. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2008, vol. 29, issue 13, s. 1989-2006 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [21] BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. 2010, vol. 28, issue 3, s. 325-347 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [22] GUPTA, Pankaj, Casey ELKINS, Timothy E. LONG a Garth L. WILKES. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* [online]. 2005, vol. 46, issue 13, s. 4799-4810 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.04.021.
- [23] PHAM, Quynh P., Upma SHARMA a Antonios G. MIKOS. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering* [online]. 2006, vol. 12, issue 5, s. 1197-1211 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1089/ten.2006.12.1197.
- [24] LADD, Mitchell R., Tanner K. HILL, James J. YOO a Sang Jin LEE. 2011. Electrospun Nanofibers in Tissue Engineering. LIN, Tong. (ed.) *Nanofibers – Production, Properties and Functional Applications* [online]. Rijeka: InTech, s. 347-372 [cit. 2015-05-08]. ISBN 978-953-307-420-7.
- [25] WAN, Ying, Hua WU, Xiaoying CAO a Siqin DALAI. Compressive mechanical properties and biodegradability of porous poly(caprolactone)/chitosan scaffolds. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2008, vol. 93, issue 10, s. 1736-1741 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.08.001.
- [26] EDWARDS, S.L., W. MITCHELL, J.B. MATTHEWS, E. INGHAM a S.J. RUSSELL. 2004. Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *AUTEX Research Journal* [online]. 4(2): 86-94 [cit. 2015-05-08].
- [27] VON DER MARK, Klaus a Jung PARK. 2013. Engineering biocompatible implant surfaces Part II: Cellular recognition of biomaterial surfaces: Lessons from cell–matrix interactions. *Progress in Materials Science* [online]. 58(3): 327-381 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.002. ISSN 00796425.

- [28] BASU, Bikramjit, Dharendra KATTI a Ashok KUMAR. Advanced biomaterials: fundamentals, processing, and applications. Westerville, Ohio: The American Ceramic Society, 2009, 746 p., ISBN 0470193409.
- [29] GOONOO, Nowsheen, Archana BHAW-LUXIMON, Gary L BOWLIN a Dhanjay JHURRY. 2013. An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. *Polymer International* [online]. 62(4): 523-533 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1002/pi.4474. ISSN 09598103.
- [30] CHEN, Feng, Xiaoqiang LI, Xiumei MO, Chuanglong HE, Hongsheng WANG a Yoshito IKADA. Electrospun chitosan-P(LLA-CL) nanofibers for biomimetic extracellular matrix. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2008, vol. 19, issue 5, s. 677-691 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1163/156856208784089661.
- [31] JEONG, Sung In, Ai-Young LEE, Young Moo LEE a Heungsoo SHIN. Electrospun gelatin/poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers for mechanically functional tissue-engineering scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2008, vol. 19, issue 3, s. 339-357 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1163/156856208783721029.
- [32] VASITA, Rajesh a Dharendra S KATTI. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2006, vol. 1, issue 1, s. 15-30 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.2147/nano.2006.1.1.15.
- [33] PITT, Colin G. 1990. Poly- $\epsilon$ -Caprolactone and Its Copolymers. CHASIN, Mark (ed.) a Robert S. LANGER (ed.). *Biodegradable polymers as drug delivery systems* [online]. New York: M. Dekker, s. 71-120 [cit. 2015-05-10]. ISBN 0824783441.
- [34] OKADA, Masahiko. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* [online]. 2002, vol. 27, issue 1, s. 87-133 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/s0079-6700(01)00039-9.
- [35] HAYASHI, Toshio. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science* [online]. 1994, vol. 19, issue 4, s. 663-702 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/0079-6700(94)90030-2.
- [36] COULEMBIER, Olivier, Philippe DEGÉE, James L. HEDRICK a Philippe DUBOIS. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly( $\beta$ -malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science* [online]. 2006, vol. 31, issue 8, s. 723-747 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.08.004.
- [37] VERT, M., S. M. LI, G. SPENLEHAUER a P. GUERIN. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1992, vol. 3, issue 6, s. 432-446 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1007/bf00701240.
- [38] VERT, Michel. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2008, vol. 20, issue 2, s. 437-446 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1007/s10856-008-3581-4.
- [39] GINDE, Rajiv M. a Rakesh K. GUPTA. In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 1987, vol. 33, issue 7, s. 2411-2429 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1002/app.1987.070330712.
- [40] WOODWARD, S. C., P. S. BREWER, F. MOATAMED, A. SCHINDLER a C. G. PITT. The intracellular degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1985, vol. 19, issue 4, s. 437-444 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1002/jbm.820190408.

- [41] VERT, Michel. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, vol. 32, 8-9, s. 755-761 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.006.
- [42] BÖSTMAN, O., E. HIRVENSALO, J. MÄKINEN a P. ROKKANEN. 1990. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *The Bone & Joint Journal* [online]. 72(4): 592-596 [cit. 2015-05-10].
- [43] GABELNICK, HL. 1983. Advances in Human Fertility and Reproductive Endocrinology. MISHELL, Daniel R. *Long acting steroid contraception* [online]. New York: Raven Press, s. 65-88 [cit. 2015-05-10]. ISBN 0890049327.
- [44] EICHHORN, Stephen J. a William W. SAMPSON. Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2005, vol. 2, issue 4, s. 309-318 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1098/rsif.2005.0039.
- [45] MIKOS, Antonios G. a Johnna S. TEMENOFF. 2000. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 3(2): - [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.2225/vol3-issue2-fulltext-5. ISSN 0717-3458.
- [46] VAQUETTE, Cedryck a Justin John COOPER-WHITE. Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, vol. 7, issue 6, s. 2544-2557 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.02.036.
- [47] SZENTIVANYI, Andreas, Tanmay CHAKRADEO, Holger ZERNETSCH a Birgit GLASMACHER. Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2011, vol. 63, 4-5, s. 209-220 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/j.addr.2010.12.002.
- [48] BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, vol. 29, issue 6, s. 739-767 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
- [49] RAMAKRISHNA, S., J. MAYER, E. WINTERMANTEL a Kam W. LEONG. 2001. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology* [online]. 61(9): 1189-1224 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.1016/S0266-3538(00)00241-4. ISSN 02663538.
- [50] BAUER, Sebastian, Patrik SCHMUKI, Klaus von der MARK a Jung PARK. Engineering biocompatible implant surfaces. *Progress in Materials Science* [online]. 2013, vol. 58, issue 3, s. 261-326 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.001.
- [51] GODDARD, J.M. a J.H. HOTCHKISS. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, vol. 32, issue 7, s. 698-725 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002.
- [52] MARTINS, Albino, Elisabete D. PINHO, Susana FARIA, Iva PASHKULEVA, Alexandra P. MARQUES, Rui L. REIS a Nuno M. NEVES. Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance. *Small* [online]. 2009, 1195-1206, [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1002/sml.200801648.
- [53] CHO, Daehwan, SangGap LEE a Margaret W. FREY. Characterizing zeta potential of functional nanofibers in a microfluidic device. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2012, vol. 372, issue 1, s. 252-260 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.01.007.

- [54] VAQUETTE, Cedryck, Valery G. BABAK, Francis BAROS, Omar BOULANOUAR, Dominique DUMAS, Patrick FIEVET, Natalia R. KILDEEVA, Philippe MAINCENT a Xiong WANG. Zeta-potential and morphology of electrospun nano- and microfibers from biopolymers and their blends used as scaffolds in tissue engineering. *Mendeleev Communications* [online]. 2008, vol. 18, issue 1, s. 38-41 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.mencom.2008.01.015.
- [55] HONARY, S. a F. ZAHIR. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2013, vol. 12, issue 2 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.4314/tjpr.v12i2.19.
- [56] KESELOWSKY, B. G., D. M. COLLARD a A. J. GARCIA. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, vol. 102, issue 17, s. 5953-5957 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1073/pnas.0407356102.
- [57] LUTOLF, M.P. a J.A. HUBBELL. 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology* [online]. 23(1): 47-55 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1038/nbt1055.
- [58] JACOBS, Tinneke, Rino MORENT, Nathalie De GEYTER, Peter DUBRUEL a Christophe LEYS. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* [online]. 2012, vol. 32, issue 5, s. 1039-1073 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1007/s11090-012-9394-8.
- [59] CHANG, Hsin-I a Yiwei WANG. 2011. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. EBERLI, Daniel (ed.). *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* [online]. InTech, s. 569-588 [cit. 2015-05-13]. ISBN 978-953-307-663-8.
- [60] MURPHY, Ciara M., Fergal J. O'BRIEN, David G. LITTLE a Aaron SCHINDELER. 2013. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European Cells and Materials* [online]. 26: 120-132 [cit. 2015-05-14].
- [61] SHEETS, Kevin, Ji WANG, Sean MEEHAN, Puja SHARMA, Colin NG, Mohammad KHAN, Brian KOONS, Bahareh BEHKAM a Amrinder S. NAIN. Cell-Fiber Interactions on Aligned and Suspended Nanofiber Scaffolds. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* [online]. 2013, vol. 3, issue 4, s. 355-368 [cit. 2015-05-14]. DOI: 10.1166/jbt.2013.1105
- [62] MANN, Brenda K. a Jennifer L. WEST. Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2002, vol. 60, issue 1, s. 86-93 [cit. 2015-05-14]. DOI: 10.1002/jbm.10042.
- [63] ROACH, Paul, David EGLIN, Kirsty ROHDE a Carole C. PERRY. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2007, vol. 18, issue 7, s. 1263-1277 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1007/s10856-006-0064-3.
- [64] JIAO, Yan-Peng a Fu-Zhai CUI. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical Materials* [online]. 2007, vol. 2, issue 4, R24-R37 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1088/1748-6041/2/4/r02
- [65] JAGIELSKI, J., A. TUROS, D. BIELINSKI, A.M. ABDUL-KADER a A. PIATKOWSKA. Ion-beam modified polymers for biomedical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2007, vol. 261, 1-2, s. 690-693 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.nimb.2007.03.021.

- [66] YOSHIDA, S., K. HAGIWARA, T. HASEBE a A. HOTTA. Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2013, vol. 233, s. 99-107 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2013.02.042.
- [67] PRAKASH, Shaurya, M.B. KARACOR a S. BANERJEE. Surface modification in microsystems and nanosystems. *Surface Science Reports* [online]. 2009, vol. 64, issue 7, s. 233-254 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.surfrep.2009.05.001.
- [68] LĂZĂROAIE, C., E. RUSEN, B. MĂRCULESCU, T. ZECHERU a G. HUBCĂ. 2010. Chemical modification of PVC for polymer matrices with special properties. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science* [online]. 72(2): 127-140 [cit. 2015-05-08]. ISSN 1454-2331.
- [69] SHAHIDI, Sheila, Jakub WIENER a Mahmood GHORANNEVISS. 2013. Surface Modification Methods for Improving the Dyeability of Textile Fabrics. GÜNAY, Meliah (ed.). *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing* [online]. InTech, s. 33-52 [cit. 2015-05-10]. DOI: 10.5772/53911. ISBN 978-953-51-0892-4.
- [70] CHEN, Francis F. 1974. *Introduction to Plasma Physics*. Boston, MA: Springer Verlag. ISBN 978-147-5704-617.
- [71] LANGMUIR, I. Oscillations in Ionized Gases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1928, vol. 14, issue 8, s. 627-637 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1073/pnas.14.8.627.
- [72] KRACÍK, Jiří, Jaromír TOBIÁŠ a Josef Bartoloměj SLAVÍK. *Elektrické výboje: určeno vývojovým pracovníkům, výpočtářům, konstruktérům a posluchačům elektrotechnických škol*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964, 220 s. Malá elektrotechnická knihovna.
- [73] MEICHSNER, Jürgen, SCHMIDT, Ralf SCHNEIDER a Hans-Erich WAGNER. 2012. *Nonthermal plasma chemistry and physics*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, xiv, 548 p. ISBN 14-200-5916-5.
- [74] JIANG, Bo, Jingtang ZHENG, Shi QIU, Mingbo WU, Qinhui ZHANG, Zifeng YAN a Qingzhong XUE. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2014, vol. 236, s. 348-368 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.cej.2013.09.090.
- [75] LIEBERMAN, Michael A. a Allan J. LICHTENBERG. 2005. *Principles of plasma discharges and materials processing*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 757 s. ISBN 04-717-2001-1.
- [76] CHU, P.K., J.Y. CHEN, L.P. WANG a N. HUANG. 2002. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 36(5-6): 143-206 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/S0927-796X(02)00004-9. ISSN 0927796x.
- [77] WINCHESTER, Michael R. a Richard PAYLING. Radio-frequency glow discharge spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2004, vol. 59, issue 5, s. 607-666 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.sab.2004.02.013.
- [78] ZANDÉN, Carl, Marina VOINOVA, Julie GOLD, Daniel MÖRSDORF, Ingolf BERNHARDT a Johan LIU. Surface characterisation of oxygen plasma treated electrospun polyurethane fibres and their interaction with red blood cells. *European Polymer Journal* [online]. 2012, vol. 48, issue 3, s. 472-482 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.01.004.
- [79] ÖKTEM, T., N. SEVENTEKIN, H. AYHAN a E. PIŞKIN. 2000. Modication of Polyester and Polyamide Fabrics by Different in Situ Plasma Polymerization Methods. *Turkish Journal of Chemistry* [online]. 24(3): 275-285 [cit. 2015-05-08]. ISSN 1303-6130.

- [80] OH, Se Heang a Jin Ho LEE. Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility. *Biomedical Materials* [online]. 2013, vol. 8, issue 1 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1088/1748-6041/8/1/014101.
- [81] GOPAL, Renuga, Ma ZUWEI, Satinderpal KAUR a Seeram RAMAKRISHNA. 2007. Surface Modification and Application of Functionalized Polymer Nanofibers. MANSOORI, Ali G. (ed.), Thomas F. GEORGE (ed.), Lahsen ASSOUFID (ed.) a Guoping ZHANG (ed.). *Molecular building blocks for nanotechnology: from diamondoids to nanoscale materials and applications* [online]. New York: Springer, s. 72-91 [cit. 2015-05-08]. ISBN 9780387399379.
- [82] JOKINEN, Ville, Pia SUVANTO a Sami FRANSSILA. Oxygen and nitrogen plasma hydrophilization and hydrophobic recovery of polymers. *Biomicrofluidics* [online]. 2012, vol. 6, issue 1 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1063/1.3673251.
- [83] VALENCE, Sarra de, Jean-Christophe TILLE, Chiraz CHAABANE, Robert GURNY, Marie-Luce BOCHATON-PIALLAT, Beat H. WALPOTH a Michael MÖLLER. Plasma treatment for improving cell biocompatibility of a biodegradable polymer scaffold for vascular graft applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2013, vol. 85, issue 1, s. 78-86 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.06.012.
- [84] JACOBS, Tinneke, Heidi DECLERCQ, Nathalie De GEYTER, Ria CORNELISSEN, Peter DUBRUEL, Christophe LEYS a Rino MORENT. Improved cell adhesion to flat and porous plasma-treated poly- $\epsilon$ -caprolactone samples. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2013, vol. 232, s. 447-455 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2013.06.001.
- [85] JAIN, I.P. a Garima AGARWAL. Ion beam induced surface and interface engineering. *Surface Science Reports* [online]. 2011, vol. 66, 3-4, s. 77-172 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.surfrep.2010.11.001.
- [86] ENSINGER, W. Modification of materials by irradiation of heavy ions with energies from keV to GeV. *Radiation Measurements* [online]. 2005, vol. 40, 2-6, s. 712-721 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.radmeas.2005.06.026.
- [87] ZIEGLER, James F. Interactions of ions with matter. *James Ziegler - SRIM & TRIM* [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://www.srim.org/>
- [88] CUI, F.Z a Z.S LUO. Biomaterials modification by ion-beam processing. *Surface and Coatings Technology* [online]. 1999, vol. 112, 1-3, s. 278-285 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/s0257-8972(98)00763-4.
- [89] POPOK, Vladimir N. 2012. Ion Implantation of Polymers: Formation of Nanoparticulate Materials. *Reviews on Advanced Materials Science* [online]. 30(1): 1-26 [cit. 2015-05-11].
- [90] SATRIANO, C., N. SPINELLA, M. MANSO, A. LICCIARDELLO, F. ROSSI a G. MARLETTA. Ion beam induced nanometric structure and oligopeptide adsorption on patterned polymer surfaces. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2003, vol. 23, 6-8, s. 779-786 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.msec.2003.09.095.
- [91] MANSO, M., A. VALSESIA, M. LEJEUNE, D. GILLILAND, G. CECcone a F. ROSSI. Tailoring surface properties of biomedical polymers by implantation of Ar and He ions. *Acta Biomaterialia* [online]. 2005, vol. 1, issue 4, s. 431-440 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.actbio.2005.03.003.
- [92] MARLETTA, G., G. CIAPETTI, C. SATRIANO, F. PERUT, M. SALERNO a N. BALDINI. Improved osteogenic differentiation of human marrow stromal cells cultured on ion-induced chemically

structured poly- $\epsilon$ -caprolactone. *Biomaterials* [online]. 2007, vol. 28, issue 6, s. 1132-1140 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.027.

[93] BAČÁKOVÁ, Lucie, Václav ŠVORČÍK, Vladimír RYBKA, Ivan MIČEK, Vladimír HNATOWICZ, Věra LISÁ a František KOCOUREK. Adhesion and proliferation of cultured human aortic smooth muscle cells on polystyrene implanted with N+, F+ and Ar+ ions: correlation with polymer surface polarity and carbonization. *Biomaterials* [online]. 1996, vol. 17, issue 11, s. 1121-1126 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/0142-9612(96)85914-x.

[94] YOTORIYAMA, Tasuku, Aiko NAKAO, Yoshiaki SUZUKI, Takeyo TSUKAMOTO a Masaya IWAKI. Analysis of cell-adhesion surface induced by ion-beam irradiation into biodegradable polymer. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2006, vol. 242, 1-2, s. 51-54 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.nimb.2005.08.201.

[95] SHANTHINI, G.M., Catherine Ann MARTIN, N. SAKTHIVEL, Sarath Chandra VEERLA, K. ELAYARAJA, B.S. LAKSHMI, K. ASOKAN, D. KANJILAL a S. Narayana KALKURA. Physical and biological properties of the ion beam irradiated PMMA-based composite films. *Applied Surface Science* [online]. 2015, vol. 329, s. 116-126 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.12.129.

[96] DRAGAN, A.I., J.R. CASAS-FINET, E.S. BISHOP, R.J. STROUSE, M.A. SCHENERMAN a C.D. GEDDES. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophysical Journal* [online]. 2010, vol. 99, issue 9, s. 3010-3019 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.09.012.

[97] NGOKA, Lambert C. M. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Science* [online]. 2008, vol. 6, issue 1 [cit. 2015-05-11]. DOI: 10.1186/1477-5956-6-30.

[98] WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, vol. 35, issue 10, s. 1217-1256 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.

[99] NEPPALLI, Ramesh, Carla MAREGA, Antonio MARIGO, Madhab Prasad BAJGAI, Hak Yong KIM a Valerio CAUSIN. Improvement of tensile properties and tuning of the biodegradation behavior of polycaprolactone by addition of electrospun fibers. *Polymer* [online]. 2011, vol. 52, issue 18, s. 4054-4060 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.06.039.

[100] DASH, Tapan K. a V. Badireenath KONKIMALLA. Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, vol. 158, issue 1, s. 15-33 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.064.

[101] ABEDALWAFI, Mohammed, Fujun WANG, Lu WANG a Chaojing LI. 2013. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Rev. Adv. Mater. Sci.* [online]. 34: 123-140 [cit. 2015-05-09].

[102] DE GEYTER, N. a R. MORENT. 2011. Non-Thermal Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymers. GHISTA, Dhanjoo N. (ed.). *Biomedical science, engineering and technology* [online]. Rijeka: InTech, s. 225-246 [cit. 2015-05-11]. ISBN 9789533074719.

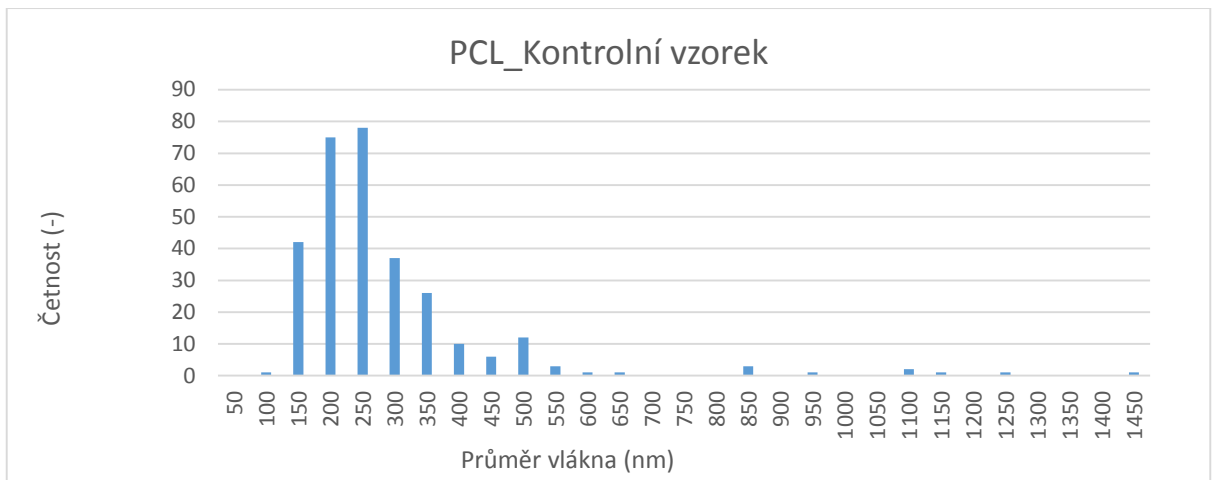
[103] LANE, J.M. a D.J. HOURSTON. Surface treatments of polyolefins. *Progress in Organic Coatings* [online]. 1993, vol. 21, issue 4, s. 269-284 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/0033-0655(93)80044-b.

- [104] OYANE, Ayako, Masaki UCHIDA, Yoshiro YOKOYAMA, Cleo CHOONG, James TRIFFITT a Atsuo ITO. Simple surface modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone) to induce its apatite-forming ability. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2005, 75A, issue 1, s. 138-145 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1002/jbm.a.30397.
- [105] SIOW, Kim Shyong, Leanne BRITCHER, Sunil KUMAR a Hans J. GRIESSER. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. *Plasma Processes and Polymers* [online]. 2006, vol. 3, 6-7, s. 392-418 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1002/ppap.200600021.
- [106] BAK, Tae-Yeong, Min-Suk KOOK, Sang-Chul JUNG a Byung-Hoon KIM. Biological Effect of Gas Plasma Treatment on CO<sub>2</sub> Gas Foaming/Salt Leaching Fabricated Porous Polycaprolactone Scaffolds in Bone Tissue Engineering. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2014, vol. 2014, s. 1-6 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1155/2014/657542.
- [107] EDLUND, U., T. SAUTER a A.-C. ALBERTSSON. 2011. Covalent VEGF protein immobilization on resorbable polymeric surfaces. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 22(1): 166-171 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1002/pat.1811. ISSN 10427147.
- [108] ŠVORČÍK, Václav, Vladimír RYBKA, Vladimír HNATOWICZ, Lucie BAČÁKOVÁ, Věra LISÁ a František KOCOUREK. Surface properties and biocompatibility of ion-implanted polymers. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 1995, vol. 5, issue 1 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1039/jm9950500027.
- [109] TANAKA, Toshiyuki, Rena UJIIE, Hirofumi YAJIMA, Kyoichiro MIZUTANI, Yoshiaki SUZUKI a Hitoshi SAKURAGI. Ion-beam irradiation into biodegradable nanofibers for tissue engineering scaffolds. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2011, vol. 206, issue 5, s. 889-892 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2011.04.049.
- [110] MARLETTA, Giovanni, Gabriela CIAPETTI, Cristina SATRIANO, Stefania PAGANI a Nicola BALDINI. The effect of irradiation modification and RGD sequence adsorption on the response of human osteoblasts to polycaprolactone. *Biomaterials* [online]. 2005, vol. 26, issue 23, s. 4793-4804 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.047.
- [111] TANAKA, Toshiyuki a Yoshiaki SUZUKI. Spatial control of cell attachment, proliferation, and differentiation using ion-beam induced thin films. *Applied Surface Science* [online]. 2014, vol. 310, s. 31-35 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.04.004.
- [112] ROČKOVÁ-HLAVÁČKOVÁ, K., V. ŠVORČÍK, L. BAČÁKOVÁ, B. DVOŘÁNKOVÁ, J. HEITZ a V. HNATOWICZ. Bio-compatibility of ion beam-modified and RGD-grafted polyethylene. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2004, vol. 225, issue 3, s. 275-282 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.nimb.2004.05.004.
- [113] CHEN, Honglin, Jin HUANG, Jiahui YU, Shiyuan LIU a Ping GU. Electrospun chitosan-graft-poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) cationic nanofibrous mats as potential scaffolds for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2011, vol. 48, issue 1, s. 13-19 [cit. 2015-05-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.019.
- [114] SHALUMON, K.T., K.H. ANULEKHA, K.P. CHENNAZHI, H. TAMURA, S.V. NAIR a R. JAYAKUMAR. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2011, vol. 48, issue 4, s. 571-576 [cit. 2015-05-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.01.020.

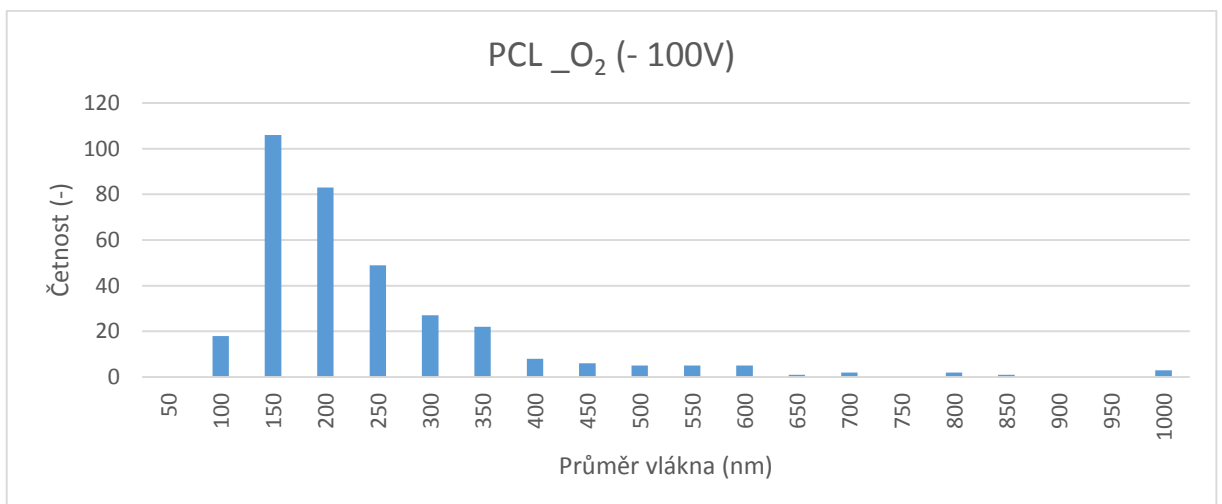


[115] PLENCNER, Martin, Barbora EAST, Andrej LITVINEC, Matej BUZGO, Zbynek TONAR, Martin OTAHAL, Eva PROSECKA, Michala RAMPICHOVA, Tomas KREJCI, Andrea MICKOVA, Alois NECAS, Jiri HOCH a Evzen AMLER. Abdominal closure reinforcement by using polypropylene mesh functionalized with poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers and growth factors for prevention of incisional hernia formation. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2014 [cit. 2015-05-14]. DOI: 10.2147/ijn.s63095.

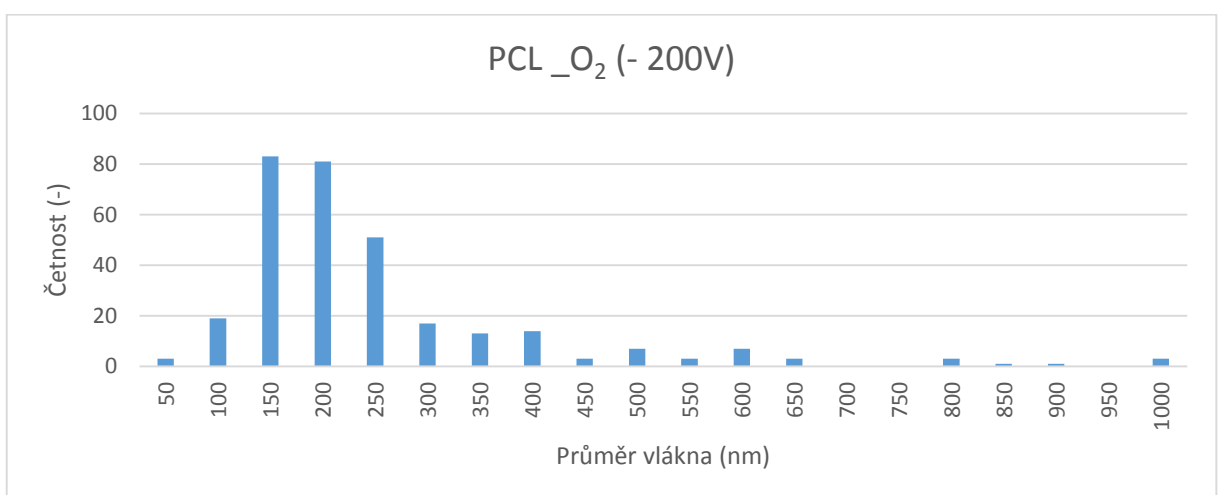
## Příloha A: Distribuce průměrů vláken



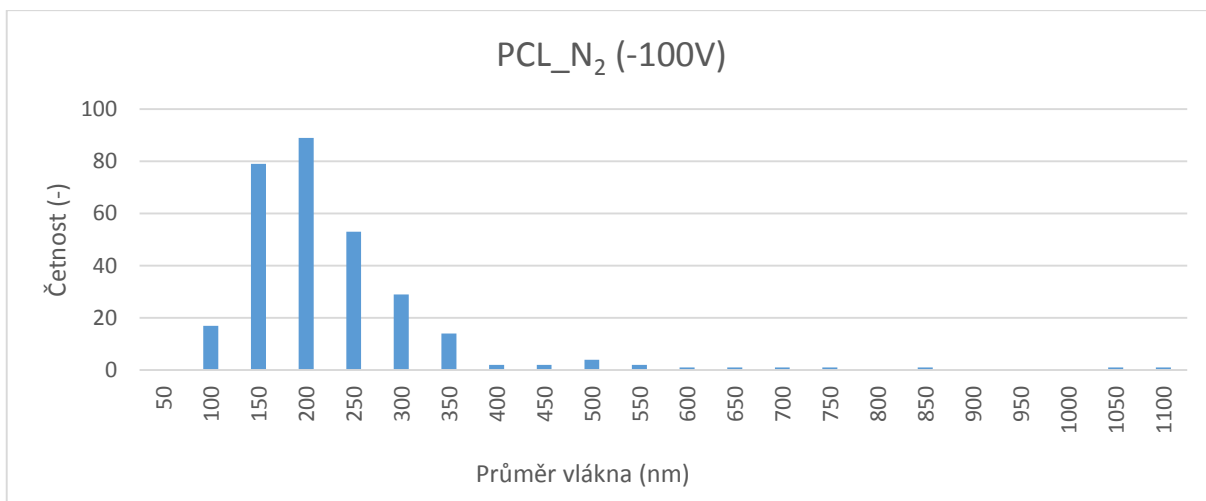
Graf 8\_Distribuce četností průměrů vláken vzorku PCL-K.



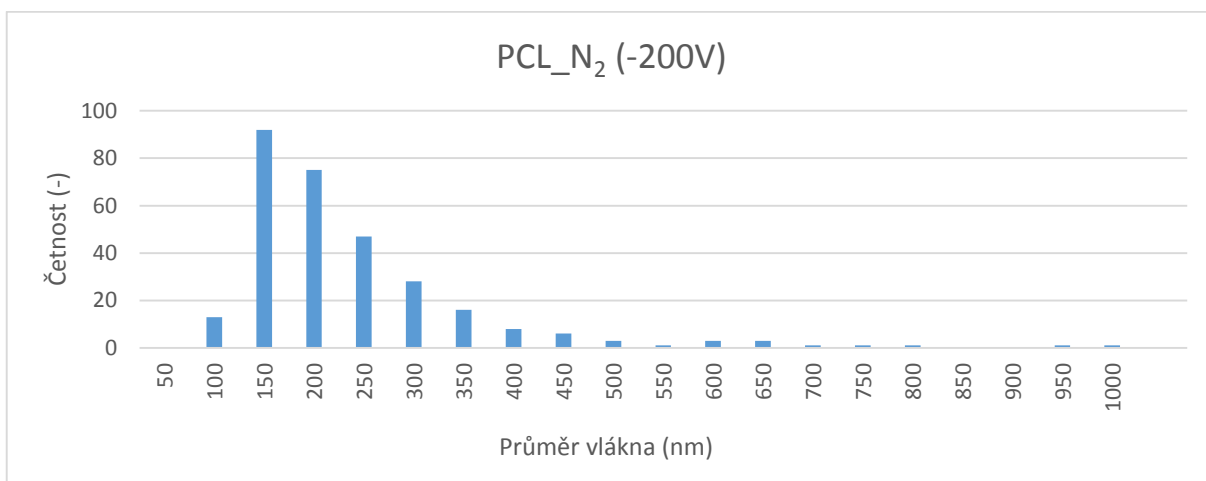
Graf 9\_Distribuce četností průměrů vláken vzorku O<sub>2</sub> (-100V).



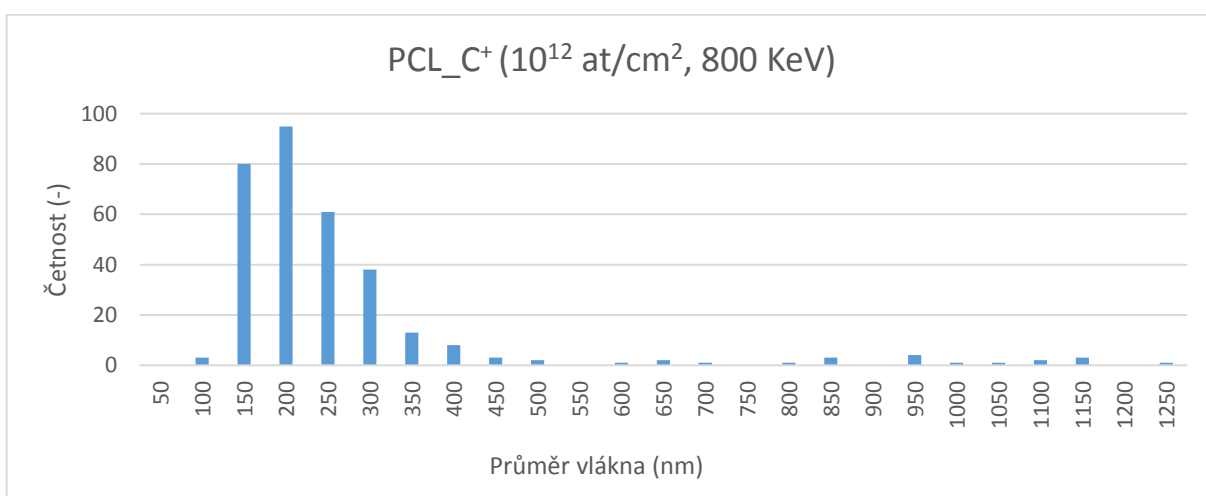
Graf 10\_Distribuce četností průměrů vláken vzorku O<sub>2</sub> (-200V).



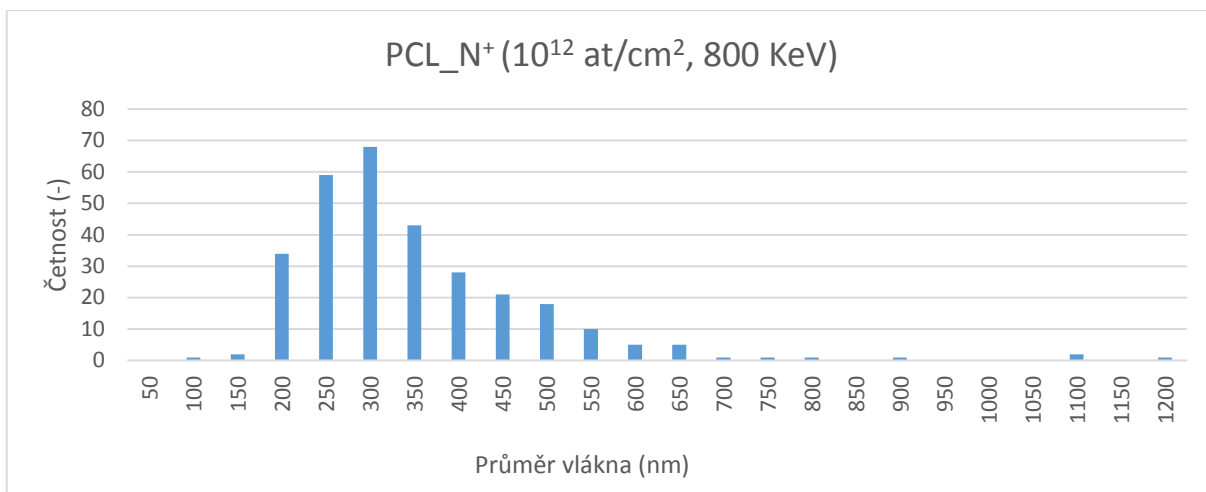
Graf 11\_Distribuce četností průměrů vláken vzorku N<sub>2</sub> (-100V).



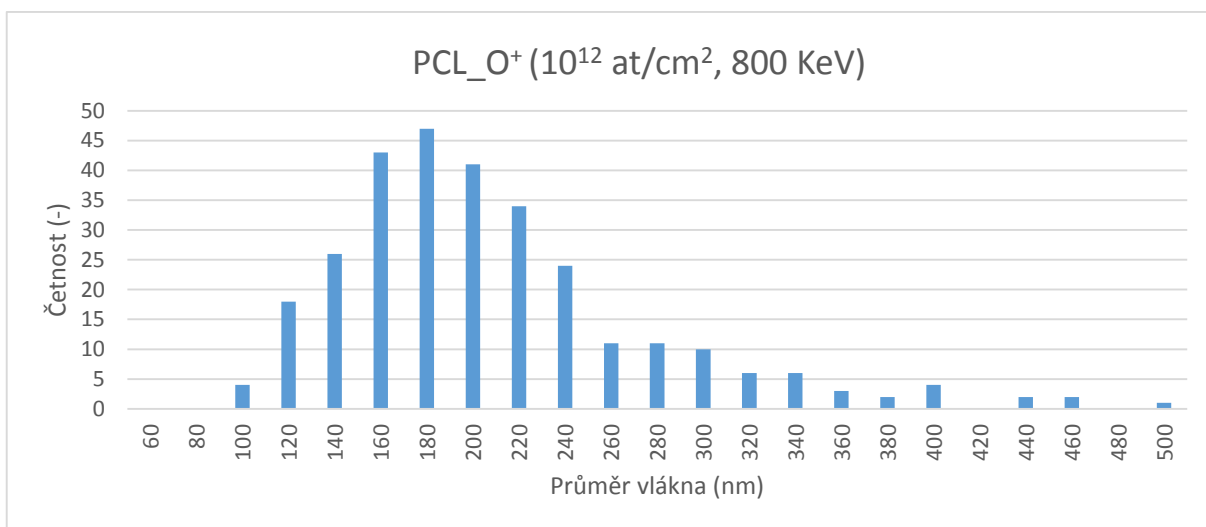
Graf 12\_Distribuce četností průměrů vláken vzorku N<sub>2</sub> (-200V).



Graf 13\_Distribuce četností průměrů vláken vzorku implantovaného C<sup>+</sup>.



**Graf 14\_ Distribuce četností průměrů vláken vzorku implantovaného N<sup>+</sup>.**



**Graf 15\_ Distribuce četností průměrů vláken vzorku implantovaného O<sup>+</sup>.**

## Příloha B: Atomární koncentrace prvků (XPS)

**Tabulka 11**\_Tabulka atomární koncentrace prvkového složení povrchu PCL nanovláknenného materiálu po plazmatické modifikaci ve srovnání s nemodifikovaným materiálem.

<b>XPS – atomární koncentrace prvků (%)</b>					
	<b>C 1s</b>	<b>K 2p</b>	<b>N 1s</b>	<b>O 1s</b>	<b>P 2p</b>
<b>PCL kontrola</b>	63,99	1,21	0,82	32,08	1,89
<b>O<sub>2</sub> (-100V)</b>	53,01	3,75	0,23	39,03	3,97
<b>O<sub>2</sub> (-200V)</b>	57,91	0,87	1,11	37,79	2,31
<b>N<sub>2</sub> (-100V)</b>	58,12	2,08	2,81	34,14	2,83
<b>N<sub>2</sub> (-200V)</b>	63,25	0,85	4,49	29,28	2,13

**Tabulka 12**\_Tabulka atomární koncentrace prvkového složení povrchu PCL nanovláknenného materiálu po iontové implantaci ve srovnání s nemodifikovaným materiálem.

<b>XPS – atomární koncentrace prvků (%)</b>						
	<b>C 1s</b>	<b>K 2p</b>	<b>N 1s</b>	<b>O 1s</b>	<b>P 2p</b>	<b>Na 1s</b>
<b>PCL kontrola</b>	63,99	1,21	0,82	32,08	1,89	0
<b>C<sup>+</sup> 10<sup>12</sup> at/cm<sup>2</sup> 800 keV</b>	72.9	0.3	0	26.1	0.7	0,5
<b>N<sup>+</sup> 10<sup>12</sup> at/cm<sup>2</sup> 800 keV</b>	73.8	0.2	0	25.7	0.3	0,1
<b>O<sup>+</sup> 10<sup>12</sup> at/cm<sup>2</sup> 800 keV</b>	70.1	0.1	0	28.4	0.9	0