



Studium možností manipulace s nanovláknennými substráty a jejich interakce s vodivými materiály

Bakalářská práce

Studijní program:

B3944 Biomedicínská technika

Studijní obor:

Biomedicínská technika

Autor práce:

Tomáš Krajdí

Vedoucí práce:

doc. Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





Zadání bakalářské práce

Studium možností manipulace s nanovláknými substráty a jejich interakce s vodivými materiály

Jméno a příjmení: **Tomáš Krajd**
Osobní číslo: D18000057
Studijní program: B3944 Biomedicínská technika
Studijní obor: Biomedicínská technika
Zadávací katedra: Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: **2021/2022**

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:

1. Student provede rešerši o dosud používaných způsobech výroby a manipulace s nanovláknennými materiály.
2. Student provede návrh a konstrukci zařízení nebo přípravku pro snazší manipulaci s vláknennými substráty v kultivačních miskách a navrhne metodiku práce.
3. Student provede základní experimenty se zkonstruovaným zařízením a ověří jeho funkčnost a vytvoří metodiku práce.
4. Student provede diskuzi a zhodnocení výsledků práce.

Teoretická východiska (včetně výstupu z kvalifikační práce):

Nanovláknenné materiály mají v současné době veliký význam, a to hlavně z důvodu široké škály možností aplikovatelnosti. Příkladem může být právě využití nanomateriálu jako nosiče v kultivačních miskách pro proliferaci buněk. Kvůli vlastnostem těchto materiálů nastávají určité komplikace ve vztahu šetrného zacházení právě ve zmíněných kultivačních miskách, které bychom vhodnou metodikou rádi eliminovali.

Výstupem bakalářské práce bude metodický návod a ideový návrh příslušného zařízení.

Výzkumné předpoklady/ výzkumné otázky:

Předpokládá se, že navržená metodika zpracování nanovláknenných substrátů umožní mnohem snazší a opakovatelnou práci s nimi. Metodika bude podpořena návrhem testovacího zařízení –přípravku.

Metoda:

Kvalitativní

Technika práce, vyhodnocení dat:

Výroba funkčního přípravku. Vyhodnocení funkčnosti.

Místo a čas realizace výzkumu:

Laboratoře Technické univerzity v Liberci 15.11.2021 –15.5.2022

Vzorek:

Není relevantní.

Rozsah práce:

Rozsah bakalářské práce činí 50-70 stran (tzn. 1/3 teoretická část, 2/3 výzkumná část).

Forma zpracování kvalifikační práce:

Tištěná a elektronická.

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

tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

- GRUJOVIĆ, Nenad et al. 2018. CUSTOMIZATION OF ELECTROSPINNING FOR TISSUE ENGINEERING. *Facta Universitatis, Series: Mechanical Engineering*. 16(3), 321-335. DOI 10.22190/FUME180823032G. Dostupné také z: <http://casopisi.junis.ni.ac.rs/index.php/FUMechEng/article/view/4342/2637>
- JENČOVÁ, Věra, Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, Petr MIKEŠ, Věra HEDVIČÁKOVÁ a David LUKÁŠ. Nanovlákná: teorie, technologie a použití. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2021, 187 s. ISBN 978-80-7494-539-7.
- NAGRATH, Malvika et al. Bioactive glass fiber fabrication via a combination of sol-gel process with electro-spinning technique. *Materials Science and Engineering: C*. 101, 521-538. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <http://doi:10.1016/j.msec.2019.04.003>
- HORÁKOVÁ, Jana, Julie SOUKUPOVÁ a Kateřina ROČKOVÁ. Cell adhesion and proliferation on modified nanofibrous layers. STRUTEX: structure and structural mechanics of textile fabrics: 19th international conference = struktura a strukturní mechanika textilií: 19. mezinárodní konference. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2012. ISBN 978-80-7372-913-4.
- Chen, C., Bai, X., Ding, Y. et al. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. *Biomater Res* 23, 25 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0176-8>
- Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):101-9. doi: 10.1089/ten.2005.11.101
- Ryan, C.N.M., Doulgkeroglou, M.N. & Zeugolis, D.I. Electric field stimulation for tissue engineering applications. *BMC biomed eng* 3, 1 (2021). <https://doi.org/10.1186/s42490-020-00046-0>
- Wenguo Cui, Yue Zhou & Jiang Chang (2010) Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery, *Science and Technology of Advanced Materials*, 11:1, DOI: 10.1088/1468-6996/11/1/014108
- ERBEN, Jakub. Vývoj a studium struktury objemných mikro-nanovláknenných kompozitů pro medicínské aplikace. Studentská vědecká a odborná činnost 2014. Textil. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2014, , 25-34. ISBN 978-80-7494-069-9.
- Ding, Bin et al. 2019. *Electrospinning: nanofabrication and applications*. Amsterdam: Elsevier Micro & nano technologies series. ISBN 978-0-323-51270-1.

Vedoucí práce:

doc. Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

30. listopadu 2021

Předpokládaný termín odevzdání:

29. července 2022

L.S.

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkan

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

3. května 2022

Tomáš Krajdl

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu práce doc. Ing. Pavlovi Pokornému, Ph.D., a konzultantce Ing. Sentě Müllerové za odborné rady a podnětné připomínky. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Martinu Lachmanovi, Ph.D., za vyřezání elektrod na vláknovém laseru. Poděkování taktéž patří Ing. Markétě Klíčové za přípravu nanovláknenného scaffoldu a nakonec bych chtěl poděkovat svým přátelům a rodině za jejich neutuchající podporu.

Anotace

Autor: Tomáš Krajdl

Instituce: Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií

Název práce: Studium možností manipulace s nanovláknými substráty a jejich interakce s vodivými materiály.

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.

Počet stran: - 60

Počet příloh: - 10

Rok obhajoby: 2022

Anotace: Bakalářská práce se zabývá procesem výroby elektricky stimulačního zařízení, sloužícího ke kultivaci buněk v 24jamkových titračních destičkách. V teoretické části jsou popsány hlavní principy tkáňového inženýrství pro kultivování buněk *in vitro* včetně popisu podobných metod již používaných pro stimulaci. Ve výzkumné části práce byl vypracován metodický návrh zařízení pro elektrickou stimulaci buněk a zároveň byla vypracována metodika práce s nanovláknými scaffoldy. V závěru práce byla vyhodnocena funkčnost zařízení a byl proveden test cytotoxicity použitého materiálu, který přichází do přímého kontaktu s kultivovanými buňkami. Výsledkem práce je vyrobené zařízení a metodika jeho zpracování.

Klíčová slova: titan, cytotoxicita, nanovlákný scaffold, tkáňové inženýrství, buněčné reaktory

Annotation

Author: Tomáš Krajdl

Institution: Technical University of Liberec, Faculty of Medical Studies

Title: Study of possibilities of manipulation with nanofiber substrates and their interaction with conductive materials.

Supervisor: doc. Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.

Pages: - 60

Apendix: - 10

Year: 2022

Annotation: The bachelor thesis deals with the production process of an electrical stimulation device used for culturing cells in 24-well titration plates. The theoretical part describes the main principles of tissue engineering for culturing cells in vitro, including a description of similar methods already used for stimulation. In the research part of the work, a methodical design of a device for electrical stimulation of cells was developed and at the same time, a methodology for working with nanofiber scaffolds was developed. At the end of the work, the functionality of the device was evaluated and a cytotoxicity test of the used material, which comes into direct contact with cultured cells, was performed. The result of the work is the manufactured device and the methodology of its processing.

Keywords: titanium, cytotoxicity, nanofiber scaffold, tissue engineering, cell reactors

Obsah

Seznam použitých zkratek	11
1 Úvod.....	13
2 Teoretická část	14
2.1 Tkáňové inženýrství	14
2.1.1 Scaffold	14
2.1.2 Nanovláknenné materiály	15
2.1.3 Elektrostatické zvlákňování	15
2.2 Buněčné reaktory v tkáňovém inženýrství	16
2.2.1 Stimulace elektrickým polem v tkáňovém inženýrství.....	16
2.2.2 Různé typy sestav pro stimulaci elektrickým polem	17
2.3 Materiály ve zdravotnictví	22
3 Výzkumná část.....	24
3.1 Cíle a výzkumné předpoklady.....	24
3.2 Metodika výzkumu.....	24
3.3 Vlastní návrh stimulačního zařízení pomocí titanových elektrod.....	25
3.4 Výběr materiálů na elektrody.....	26
3.5 Vytvoření dřevěné formy pro vylití silikonem.....	27
3.6 Vylití silikonem.....	31
3.7 Vylití epoxidovou pryskyřicí a usazení titanových elektrod.....	33
3.8 Příprava nanovláknenného scaffoldu do titrační destičky	37
3.8.1 Hodnocení morfologie nanovláknenného materiálu.....	37
3.8.2 Smáčivost vrstev	39
3.9 Metodika přípravy nanovláknenného materiálu do titrační destičky.....	40
3.10 Nastavení elektrické stimulace.....	41
3.11 Test cytotoxicity	43
3.11.1 První den testu	43
3.11.2 Druhý den testu.....	44

3.11.3	Třetí den testu	45
3.11.4	Vyhodnocení výsledků	46
4	Diskuze	48
5	Návrh doporučení pro praxi	50
6	Závěr	51
	Seznam použité literatury	52
	Seznam obrázků	56
	Seznam tabulek	58
	Seznam grafů	59
	Seznam příloh	60

Seznam použitých zkratek

μl – mikrolitr

μm – mikrometr

3D – trojdimenzionální

ABS – Akrylonitrilbutadienstyren

ASTM – American Society for Testing and Materials

atd. – a tak dále

$^{\circ}\text{C}$ – stupeň Celsia

cca – cirka

CCK-8 – Cell Counting Kit-8

CD – compact disc

CXI – Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace

DMEM – Doubellco's Modified Eagle's Medium

ECM – extra cellular matrix

FS – fakulta strojní

FZS – Fakulta zdravotních studií

g – gram

In vitro – v umělých podmínkách

KNT – Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

m^2 – metr čtvereční

mA – miliampér

mg – miligram

ml – mililitr

mm – milimetr

mol – látkové množství

mT – militesla

mS - milisiemens

NC – negative control

nm – nanometr

Obr. – obrázek

PBS – fosfátový pufr

PC – positive control

PCL – polycaprolactone

rpm – otáčky za minutu

SEM – skenovací elektronový mikroskop

STL – stereolitografie

TI – tkáňové inženýrství

TIT – titan

TIT-OO – titan – obroušený, očištěný

tj. – to jest

TUL – Technická univerzita v Liberci

tzv. – takzvaný

V – volt

1 Úvod

Ke studiu manipulace s nanovláknými substráty a jejich interakce s vodivými materiály lze přistupovat různými způsoby. Problematika je značně rozsáhlá, a pro účely bakalářské práce bylo proto nutné po konzultaci s vedoucím práce a konzultantkou vybrat určitou oblast k řešení, a to i s ohledem na řešené úkoly na Katedře netkaných textilií a nanovlákných materiálů Technické univerzity v Liberci. Katedra má poměrně silnou skupinu zabývající se tkáňovým inženýrstvím na nanovlákných substrátech. Při řešení těchto témat je problémem obtížná mechanická manipulace s nanovláknými materiály, protože používané vrstvy jsou z velmi jemných vláken. Dalším problémem je fakt, že v bioreaktoru nanovlákná vrstva snadno vyplave na hladinu kultivačního média a není snadné nanovlákný scaffold udržet u dna kultivační jamky. S ohledem na řešenou problematiku některých dizertačních prací na KNT byla bakalářská práce zaměřena na konstrukci a realizaci buněčného reaktoru, který by svým řešením usnadnil manipulaci s nanovláknými vrstvami a zároveň umožnil řízenou elektrickou stimulaci během kultivování buněk.

Obecně vzato se buněčné reaktory staly hlavním nástrojem pro kultivaci buněk in vitro ve tkáňovém inženýrství. Účelem těchto reaktorů je vytvořit pro buňky dostatečně příznivé prostředí, které umožňuje jejich následné dělení. V současné době jsou buněčné reaktory často tvořeny kultivačními destičkami, do nichž se vkládají stimulační elektrody, které se jeví jako velice efektivní pro získání podstatně většího množství buněk než v původní metodě bez elektrické stimulace. Tyto stimulace jsou zprostředkovány buďto stejnosměrným, nebo střídavým proudem, ale zároveň byly prokázány účinky magnetického pole. Další slibnou roli hrají právě nanovlákné scaffoldy, které dokážou imitovat nativní prostředí buňky a tím ještě více posílit proliferaci a adhezi buněk.

Vytváření reaktorů obsahujících kombinaci stimulačních elektrod a nanovlákných scaffoldů s sebou nese řadu funkčních problémů, které je potřeba vhodnou metodikou eliminovat. V teoretické části jsou nastíněny principy tkáňového inženýrství včetně popisu některých již zkonstruovaných řešení, která však v jistých ohledech nesplňují výchozí požadavky. Cílem výzkumné části bylo tedy vytvořit takové kombinované zařízení, které svým konstrukčním řešením splní nároky na jednoduchou manipulaci s možností opakované sterilizace při zachování rozumných cenových nákladů.

2 Teoretická část

2.1 Tkáňové inženýrství

Jednou z hlavních motivací pro vznik tkáňového inženýrství (TI) byly velice nízké počty darovaných tkání a orgánů, které ani zdaleka neměly šanci pokrýt velkou poptávku po potřebných transplantacích. Navíc je zde spousta kontraindikací při hledání shody mezi příjemcem a dárcem tkání, orgánů, která ještě více omezuje možnost úspěšné transplantace (Lanza, 2020).

Tkáňové inženýrství zahrnuje několik vyvíjejících se odvětví vědy, která svými poznatky zlepšují používané technologie, a to materiálové inženýrství, nanotechnologie, farmakologie, medicínu, molekulární biologii nebo také chemii (Lanza, 2020; Sharma et al., 2019).

Hlavním principem tkáňového inženýrství je získat z tkáně živé buňky, které jsou schopné regenerace a za pomoci růstových faktorů dokážou vytvářet nové tkáně, které následně můžeme implantovat na potřebná místa. Samotná kultivace buněk *in vitro* je zprostředkována na tkáňovém nosiči, tzv. scaffoldu (Sharma et al., 2019).

2.1.1 Scaffold

Scaffold v tkáňovém inženýrství plní roli extracelulární matrix (ECM), tj. podpůrné struktury, která by měla svojí funkcí a vlastnostmi co nejvíce simulovat původní nativní strukturu (Eltom et al. 2019). Vlastnosti scaffoldů, podporující efektivní adhezi a proliferaci buněk, jsou zejména jejich vlákenná struktura, pórovitost a také mezipórové dráhy, které umožňují tok živin a migraci buněk (Tamer Uyar, 2017). Dalšími vlastnostmi jsou smáčivost (Sun et al. 2021) a průměr vláken (Jenkins a Little, 2019) při zachování biokompatibility a biodegradability (Tamer Uyar, 2017).

2.1.1.1 Vlastnosti scaffoldu

Biokompatibilita posuzuje interakci mezi tělem a cizím materiálem. Za biokompatibilní materiály považujeme ty, které nemají žádné toxické účinky a vyvolávají minimální zánětlivou imunitní reakci v těle pacienta (Naahidi et al., 2017). Na druhou stranu

biodegradabilita materiálu je proces, při kterém se materiál odbourává vlivem biologických jevů, jako jsou buněčné a enzymatické procesy. Nutno dodat, že biodegradabilita není spjata pouze s degradací materiálu v lidském těle, ale projevuje se obecně v přirozeném vnějším prostředí (Venezuela a Dargusch, 2019).

Průměr vláken ovlivňuje mnoho parametrů a je možné, že má vliv na sekreci protizánětlivých cytokinů na daný scaffold, kdy menší průměry vláken zajišťují nižší sekreci, než na průměrech vláken o velikostech (1–50 μm) (Jenkins a Little, 2019).

Nedílnou roli v proliferaci a adhezi buněk hraje také smáčivost materiálu, kdy hydrofobní materiály vykazují neschopnost adheze buněk k danému materiálu. Naopak hydrofilní materiály mají o dost větší přilnavost a tím je zde i lepší adheze a proliferace (Sun et al., 2021).

Díky **nanovlákněným materiálům** jsme schopni vytvářet scaffoldy, které jsou strukturně velice podobné ECM buňky (Smith a Ma, 2004).

2.1.2 Nanovlákněné materiály

Obecně definováno se jedná o vlákna, která dosahují průměru menšího než 1 μm , avšak tato definice se mění v závislosti na vědním oboru, ve kterém mohou být nanovlákná definována až teprve s průměrem pod 100 nm (Williams et al. 2018). Výroba scaffoldů se provádí za pomoci několika metod, mezi něž patří elektrické zvlákňování (electrospinning), fázová separace (phase-separation) nebo samosestavování molekul (self-assembly), nicméně nejpoužívanější metodou pro výrobu nanovlákněných materiálů je právě elektrické zvlákňování (Smith a Ma, 2004).

2.1.3 Elektrické zvlákňování

Základním mechanismem elektrického zvlákňování je vytvoření vysokonapěťového pole mezi kladně nabitým roztokem polymeru dávkovaným pomocí dávkovací pumpy s injekční stříkačkou a záporně nabitým kolektorem při využití elektrických sil, kde vysoké napětí musí v polymerním roztoku překonat povrchové napětí (Rahmati et al., 2021). To způsobí hydrodynamickou nestabilitu mající podobu polymerních trysek, ze kterých se odpařením rozpouštědla vytváří nanovlákná (Jenčová et al., 2021). Polymer se formuje do Taylorova kužele a dopadá na záporně nabitý kolektor (viz Příloha A).

Výslednou podobu získaného materiálu určuje mnoho faktorů, jako jsou viskozita roztoku, polarita, elektrická vodivost nebo povrchové napětí rozpouštědla (Rahmati et al., 2021).

2.1.3.1 Zvláknování syntetických a přírodních polymerů

Elektrickým zvláknováním bylo možné zvláknit přírodní a syntetické polymery, které jsou následně používány ve TI. Přírodní polymery v zastoupení jako je kolagen, želatina, chitosan nebo alginát mají však nevýhodu v omezené dostupnosti a velice rychlé degradaci, proto jsou pro medicínské aplikace spíše používány syntetické polymery, kde výhoda těchto polymerů tkví v tom, že každá šarže je stejná, tudíž víme jaký bude mít výsledný materiál vlastnosti. V závislosti na aplikaci a požadovaných vlastnostech, lze využít bidegradabilní polymery, jako je například: polyuretan (PU), kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA) nebo polykaprolakton (PCL) (Jenčová et al., 2021).

2.2 Buněčné reaktory v tkáňovém inženýrství

Jednou z potřeb pro praktické fungování TI bylo vyvinout metodu, která bude schopna generovat tkáň *in vitro*. To dalo vzniknout buněčným reaktorům, jejichž hlavním cílem bylo zlepšit fungování a nahradit kultivaci tkání *in vivo* za použití materiálů schopných imitovat původní ECM a možnosti dynamické kultivace při použití stimulačních metod (Zhao et al. 2016).

Design buněčných reaktorů závisí na několika faktorech jako typ tkáň nebo buněk, kdy každé z nich vyhovují trochu jiné podmínky, přesto by měl každý buněčný reaktor co nejvíce připomínat nativní prostředí buňky a měl by se skládat z tkáňové struktury, buněčné kultury a buňky by zde měly být schopné přežít (Selden a Fuller, 2018) a zároveň by buněčné reaktory měly být snadno sestavitelné a sterilní (Zhao et al., 2016).

2.2.1 Stimulace elektrickým polem v tkáňovém inženýrství

Experimentální pokusy s elektrickou stimulací vykazují velký potenciál v aplikacích TI, zejména díky jejich schopnosti aktivovat vnitrobuněčné signální dráhy, mikroprostředí a zároveň stimulovat nativní prostředí některých tkání, např. nervové tkáň (Chen et al., 2019). Různé designy stimulace elektrickým polem prokázaly efekt na morfologii,

orientaci a migraci buněk v závislosti na určitém typu stimulovaných buněk. Buňky je možné stimulovat buďto střídavě elektrickou stimulací, nebo elektrickou stimulací stejnosměrnou. A právě stejnosměrná elektrická stimulace se objevuje v drtivé většině aplikací (Ryan et al., 2021). Můžeme vymezit tři nejčastější sestavy využívající stejnosměrnou stimulaci a těmi jsou přímé spojení, kdy elektrody jsou v kontaktu s médiem, kapacitní spojení a sestava využívající pro stimulaci elektromagnetické pole, kdy elektrody případně magnety nejsou v kontaktu s médiem (viz Příloha B). Velikost proudů závisí na konstrukci stimulačního zařízení a na typu buněk kultivovaných v těchto buněčných reaktorech. Obecně se jedná o μA až mA za vzniku elektrického pole v nižších jednotkách V/m (Ryan et al., 2021). Ovšem při nesprávné manipulaci s elektrickou stimulací nemusí mít ve výsledku stimulace buďto žádný efekt, nebo v horším případě může kultivované buňky usmrtit (Chen et al., 2019).

2.2.2 Různé typy sestav pro stimulaci elektrickým polem

Existuje hned několik sestav, které umožňují stimulaci buněk *in vitro* pomocí elektrického pole. Každá z těchto sestav má svá pro a proti. Sestavy jsou vždy uzpůsobeny tak, aby svými parametry vyhovovaly potřebám dané laboratoře (Chen et al., 2019). Nejdůležitějšími parametry jsou použité materiály, ať už pro elektrody vedoucí elektrický proud vodičem, který může být v přímém kontaktu s buňkami, nebo samotné materiály bioreaktorů. Pro elektrody jsou využívány zejména kovové vodiče, jako jsou nerezové oceli, oxidy iridia, nitridy titanu nebo platina. Právě zmíněná platina je i přes poměrně velkou pořizovací cenu velmi oblíbenou volbou, a to z důvodu menší náchylnosti ke korozi (Leppik et al., 2020) a zároveň výbornou měrnou vodivostí (Chen et al., 2019). Materiály pro výrobu bioreaktorů jsou nejčastěji z polymethylakrylátu (PMMA), polydimethylsiloxanu (PDMS), skla nebo plastu. Často se jedná o průhledné materiály, aby bylo u buněk možné pozorovat pomocí mikroskopu viditelné změny před stimulací a po ní (Ryan et al., 2021).

Sestava na základě přímého spojení je používána zejména díky své jednoduchosti. Jednou ze základních a nejjednodušších metod přímého spojení je vložení dvou elektrod na dno kultivační misky, kdy kultivované buňky jsou právě mezi těmito elektrodami. Konkrétním příkladem (viz Příloha C) může být sestava z publikace (Mobini et al., 2018) skládající se z platinových elektrod, které jsou součástí víčka 6jamkové titrační destičky

o velikosti ($128 \times 85 \times 22$ mm s vnitřním průměrem 33,78 mm a kultivační plochou 8,960 mm). Tyto rozměry by měly zabránit případnému odparu média. Elektrody jsou z 99,99 % z čisté platiny, kde každá elektroda má délku od 21 až do 29 mm a konce jsou ohnuty do tvaru písmene L. Tyto elektrody jsou od sebe vzdáleny přesně 25 mm. Napájení bylo vedeno postříbřeno-měděnými vodiči, které byly připájeny na čouhající konce elektrod z víčka titrační destičky a byly zapojeny do paralelního obvodu. Stejnosměrný proud byl dodáván třívýstupovým zdrojem. Zařízení bylo sterilizováno v 70% ethanolu po dobu 10 minut a omyto v Dulbecco's phosphate buffered saline (Mobini et al. 2018). Ovšem nevýhodami v těchto sestavách může být případné zahřívání elektrod a také uvolňování látek do média s buňkami a to může nepříznivě měnit pH, které může být pro buňky smrtelné (Leppik et al., 2020).

V další sestavě v publikaci (Li et al., 2018) jsou znovu využívány platinové elektrody, ale tentokrát jsou tvarovány do podoby obdélníků s rozměry ($18 \times 4 \times 1$ mm), které jsou zafixovány do víčka 24jamkové kultivační destičky, kdy elektrody byly od sebe vzdáleny 8 mm. Na rozdíl od předchozího případu se tentokrát na dno kultivační misky vkládají předpřipravené Fe₃O₄/PGLA a PEDOT/Fe₃O₄/PGLA vláknenné scaffoldy vyrobené elektrickým zvlákněním. V této konkrétní sestavě není použit stejnosměrný zdroj jako v předchozích případech, nýbrž zdrojem je zde dvoukanálový generátor, který generuje přes měděné vodiče obdélníkový pulzní signál o velikosti frekvence 20 Hz a amplitudou 500 mV. Pro získání kombinované stimulace elektrického a magnetického pole byla destička vložena mezi dva stejné magnety, které generovaly pole o velikosti 0,072 T při velikostech magnetu ($15 \times 88 \times 44$ mm) (Li et al., 2018).

V jedné ze starších publikací (Bodhak et al., 2012) bylo představeno zařízení pro stimulaci buněk osteoblastů ve 12jamkové destičce, kdy kryt destičky byl vyroben z polytermického plechu Ultem 1000 o tloušťce plechu 0,6 cm a pro soustavu přenášející elektrický proud bylo použito hned několik materiálů. Elektrody byly vyrobeny z nerezové oceli 316 s vnitřním průměrem 0,043 cm a vzdáleny od sebe 1,5 cm, na konci těchto elektrod byl vytvořen elektrodový kontakt spojující nerezové elektrody s titanovými disky na dně kultivační destičky. Tyto spojovací kontakty byly vyrobeny ze zlata, ve svém vnitřku obsahovaly pružiny vyrobené ze slitiny beryliové mědi a píсты vyrobené z měděné slitiny potažené niklem. Elektrody před vsazením do jamek byly zalisovány do polytermické fólie. Stimulace této sestavy byla řízena víceotáčkovým

potenciometrem s použitými rozsahy proudu 0 až 30 μA a napětím od 0 až 6 V. Zdrojem napětí byla 9V baterie (Bodhak et al., 2012).

Podobně jako v předchozích případech se stejným principem paralelních elektrod a tentokrát se vzájemnou vzdáleností elektrod 8 mm od sebe byla zrealizována sestava pro elektrickou stimulaci mezenchymálních kmenových buněk na PCL scaffoldu, kde byly použity uhlíkové elektrody umístěné na dno Petriho misky, kde byly připevněny silikonem. Proud do elektrod byl dodáván stejnosměrným zdrojem a veden pomocí vodičů vyrobených ze stříbra (Zhang et al., 2016).

Další provedení je používáno zejména pro jeho konstrukci elektrod, ve které nejsou použity kovové materiály jako v předchozím případě, nýbrž vedení stimulace je zprostředkováno přes tzv. agarové mosty (viz Příloha D). Tyto mosty tvořené z polyetylenových nebo skleněných trubiček obsahující nasycený roztok inertních solí, jako jsou chloristan sodný (NaClO_4), dusičnan draselný (KNO_3) nebo chlorid draselný (KCl), fungují jako baterie, které převádějí elektrický proud na iontový proud prostřednictvím redoxních reakcí (Leppik et al., 2020). Další možností sestavení agarových mostů je naplnění skleněných zkumavek 1% roztokem agarózy rozpuštěné v roztoku fosfátového pufru (PBS) (Snyder et al., 2017). Ovšem i přes značnou výhodu v necytotoxicitě elektrod a tím minimalizování důsledku změn pH je zde hned několik omezení, která snižují efektivitu této sestavy. Jedním z omezení je limitovaná expozice elektrickou stimulací z důvodu rozdílných koncentrací a teplotních rozdílů mezi agarovými mosty a médii. Další problém je s celkovou náročností sestavení výsledné sestavy, neschopnost zachování její sterility a opakovatelnosti. Poslední úskalí se nachází v dodání relativně velkého napětí okolo 70 V ze stejnosměrného zdroje z důvodu poměrně velkého odporu těchto mostů (Leppik et al., 2020).

Pro dosažení větší kompaktnosti při využití přímého spojení bylo vytvořeno hned několik mikrofluidních sestav s uzavřeným systémem, které nám díky svým malým rozměrům poskytují větší kontrolu nad jednotností elektrického pole stimulujícího buňky a zároveň zmírňují vznikající Joulovo teplo. Ovšem původní výhoda kompaktnosti zařízení se může považovat i za nevýhodu, protože v této sestavě lze pracovat pouze s malým vzorkem buněk (Ryan et al., 2021; Sun, 2017). Sestavy se skládají ze základní destičky vyrobené z materiálů, jako jsou polydimethylsiloxanu (PDMS) nebo polymethylmethakrylátu (PMMA) (Sun, 2017). Ve většině sestav zajišťují elektrické pole platinové elektrody,

kteře jsou prostřednictvím agarových mostů vsazeny do těla destičky a přicházejí do přímého styku s médiem. Ovšem způsob vedení se může lišit, příkladem může být sestava využívající vedení pomocí měděné vrstvy plošného spoje. Sestava zachycená v Příloze E je rovněž speciální v tom, že vedení pro stimulaci bylo vyrobeno lisováním PDMS kanálu se třemi šířkami (100, 150 a 350 μm) vytvářejícími tři elektrická pole (1,5 V/cm, 3 V/cm, 4,5 V/cm) (Li et al. 2017b). Zajímavé provedení lze vytvořit taktěž s destičkou z PMMA a dvěma kanály pro vodu a médium, kdy médiem je přes agarové mosty vedena stimulace a kanál pro vodu efektivně odvádí Joulovo teplo (Li et al., 2017a).

Sestavy využívající kapacitního spojení mají výhodu zejména v tom, že zde není problém s biokompatibilitou elektrod, protože elektrody jsou umístěny mimo médium s kultivovanými buňkami, a proto můžeme použít širší škálu materiálů, ze kterých jsou elektrody vyrobeny. Sestavy jsou tedy uzpůsobeny tak, že elektrody připojené na stejnosměrný zdroj napětí vytváří elektrické pole, ve kterém jsou uloženy destičky s buňkami. Nevýhodami těchto sestav jsou zejména potřeby většího napětí mezi elektrodami a delší expozicí elektrickou stimulací (Chen et al., 2019; Khaw et al., 2022).

Jedno z nejnověji realizovaných řešení je zobrazeno v Příloze F. Tato sestava je zrealizována tak, že v každé komoře je stejně velké elektrické pole, tím se zajistí stejná stimulace pro každou komoru. Rozměry buněčného reaktoru byly zvoleny na základě výsledků metody konečných prvků. Sestava je tvořena 8komorovou průhlednou destičkou z polytetrafluorethylenu (PTFE, Alfa Aesar, Spojené království), kde do každé komory byly společně s médiem vloženy kultivační disky z čistého 99,5% titanu grade 4 s průměrem 14 mm a tloušťkou 0,25 mm (Alfa Aesar, Spojené království). Titan byl před nasazením do komor sterilizován ultrafialovým zářením po dobu 45 min.

Vytvoření elektrického pole zajistily tři elektrody zhotovené z chirurgické oceli (Alfa Aesar, Spojené království), přičemž dvě kladné byly umístěny paralelně v krajích buněčného reaktoru a poslední, záporná elektroda byla vedena středem sestavy. Výsledné napětí mezi elektrodami bylo nastaveno na 30 V dodávaných zdrojem (Khaw et al., 2022).

Další možnou sestavu z publikace (Vaca-González et al., 2016) využívající kapacitní spojení lze vidět v Příloze G. Jako v předchozím případě jsou elektrody z nerezové oceli, avšak tentokrát ve formě desek, které jsou obalené v akrylových podporách, aby nedošlo

k přímému kontaktu s inkubátorem. Pro připojení elektrického obvodu byla k deskám přivařena kladná a záporná svorka. Elektrický obvod je pro stimulaci napájen pomocí duálního zdroje (Dual-Source, HM-20, Ceif, Národní univerzita), který napájí oscilátor generující 50 a 100 V při frekvenci 60 kHz sinusového tvaru. Pro sledování průběhu elektrické stimulace byl použit osciloskop (Vaca-González et al., 2016).

Poslední možností ke stimulování buněk v kultivačních sestavách je pomocí indukční vazby. Hlavním principem této metody je vytvoření pulsního elektromagnetického pole (PEMF) vodivou cívkou, která je umístěna okolo kultivační destičky. Stimulace je prováděna tak, aby napodobila přirozený přenos potenciálu lidskou tkání. PEMF poskytuje potenciál blízko buňky, nikoliv na přímo, jako je tomu u přímého spojení. Tato metoda stejně jako kapacitní spojení má výhodu v nepřímém kontaktu s buňkami a zároveň zajišťuje přirozený přenos potenciálu v lidském těle. Ovšem nevýhody se nachází zejména v potřebě velice dlouhé expozice, která může dosahovat až 10 hodin, a další úskalí spočívá ve značné složitosti přípravy s přílišnou spotřebou zdrojů (Chen et al., 2019; Sun, 2017).

Hlavní změna oproti ostatním sestavám je v generovaném napájecím obvodu, který obstarávají cívky umístěné okolo kultivační destičky s médiem v několika různých provedeních. Prvním provedením může být sestava z Helmholtzových cívek z (Varani et al., 2017). Jedná se o dvě cívky s průměrem 20 cm, vzdálených od sebe 10 cm, kde vinutí cívky je zhotoveno ze smaltovaného měděného drátu s průměrem 1 mm a výsledným počtem 80 závitů. Kultivační destička s nasazenými osteoblasty byla vsazena přesně do středu, aby se zaručila jednotnost magnetického pole. Generátor v tomto případě generoval pulzy při frekvenci 15,38 Hz se šířkami pulsu zobrazenými v grafu na obrázku v Příloze H a magnetickým polem o velikosti až 2 mT (Zhai et al., 2016). Druhá sestava je velice podobná, liší se ale v uspořádání cívek, které jsou tentokrát umístěny horizontálně, každá z nich byla vyrobena z 1400 závitů měděného drátu. Cívky byly napájeny generátorem s pulzy o frekvenci 75 Hz s dobou trvání pulsu 1,3 ms při dosažení magnetického pole až 1,5 mT (Varani et al., 2017).

2.3 Materiály ve zdravotnictví

Materiály vhodné pro použití ve zdravotnictví považujeme za biomateriály, jež se od klasických materiálů odlišují tím, že jsou biokompatibilní. Nachází uplatnění ve řadě odvětví medicíny, a to zejména ve formě protetik, a to díky jejich mechanickým vlastnostem. Odvětvími využívajícími tento materiál jsou ortopedie, stomatologie, chirurgie nebo také oftalmologie. Důležité je také dodat, že tyto materiály nemusejí sloužit pouze jako protetika, ale nachází široké uplatnění v biotechnologických aplikacích, jako je růst buněk nebo v rámci laboratorních testů krevních proteinů (Wagner et al. 2020). V současné době jsou díky technologickému vývoji keramika a polymery zajímavou volbou při výběru biokompatibilního materiálu, přesto podstatnou část, a to konkrétně 70 % používaných materiálů ve zdravotnictví, zastupují kovy. Hlavními nároky na kovové materiály jsou biokompatibilita, odolnost vůči korozi, zpracovatelnost a dostupnost (Hanawa, 2019).

Přehled nejběžnějších kovových materiálů používaných ve zdravotnictví a porovnání jejich vlastností (Hanawa, 2019; Chen et al., 2019; *Engineering ToolBox*, 2005; Elmenstine, 2019):

- **Nerezová ocel**

Nerezová ocel typu 316L má dobrou pevnost v tahu, je výborně tvárná a také má výbornou odolnost proti opotřebení a korozi. Mezi negativa řadíme nízkou biokompatibilitu a elektrickou vodivost $2,04 \cdot 10^6$ S/m.

- **Titan**

Titan oproti ostatním kovům má nejlepší mechanické a dobré korozní vlastnosti, jedná se o materiál s náročnou obrobiteľností a poměrně nízkou vodivostí $2,63 \cdot 10^6$ S/m, přesto je jeho výhodou vysoká biokompatibilita.

- **Platina**

Platina má velice dobrou pevnost, biokompatibilitu a korozní odolnost. Oproti ostatním kovům má vynikající elektrickou vodivost $9,43 \cdot 10^6$ S/m, negativem zde může být vysoká pořizovací cena.

- **Hořčík**

Hořčík patří mezi kovy s velice dobrou elektrickou vodivostí $2 \cdot 10^7$ S/m, vysokou mechanickou odolností a zároveň špatnou biokompatibilitou, u níž dochází k uvolňování iontů.

Mezi nekovové alternativy můžeme zařadit uhlíkové trubičky nebo také grafen. Uhlíkové trubičky se vyznačují dobrou mechanickou odolností a snadnou biofunkcionalizací při vyšší vodivosti $1,8 \cdot 10^7$ S/m. Na druhou stranu grafen je elastický, má vysokou mechanickou odolnost a chemickou stabilitu a poměrně dobrou vodivost mezi 10^6 až 10^8 S/m. Bohužel tyto materiály mohou být za určitých podmínek pro buňky mírně toxické (Chen et al., 2019).

3 Výzkumná část

3.1 Cíle a výzkumné předpoklady

Cílem této práce je vytvořit návrh funkčního zařízení pro elektrickou stimulaci buněk na tkáňovém nosiči v kultivačních miskách při dodržení sterilních a manipulačních požadavků a tím zajistit vyšší adhezi a proliferaci nových buněk. Výsledné zařízení se skládá ze samotných elektrod zhotovených z titanového plechu, dále z odlité silikonové formy, která slouží pro následné vylití epoxidovou pryskyřicí, a tím vytvoření pevného usazení pro titanové elektrody.

Nedílnou součástí je i zavedení metodiky pro práci s nanovláknými scaffoldy ve vyrobeném zařízení. Předpokládá se, že navržená metodika zpracování nanovlákných substrátů umožní mnohem snazší a opakovatelnou práci s nimi.

Dále v rámci splnění nároků na biokompatibilitu byl proveden test na cytotoxicitu materiálu ze zbylých odřezků kousků titanu, které vznikly při vyřezávání laserem ze zakoupeného titanového plechu.

3.2 Metodika výzkumu

Laboratorní úkony spjaté s prací byly zrealizovány na půdě Technické univerzity v Liberci, a to konkrétně v biologické laboratoři Fakulty textilní, Katedry netkaných textilií a nanovlákných materiálů v budově E a v Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace budovy CXI v časovém období od 15. 11. 2021 do 3. 5. 2022. Jedná se o metodu kvalitativní.

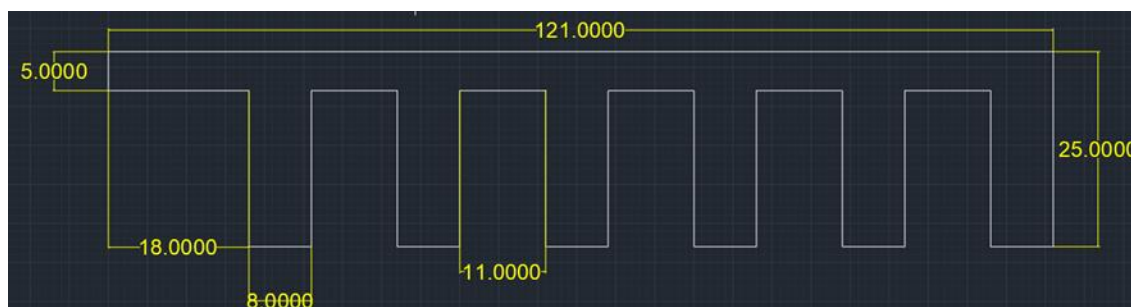
3.3 Vlastní návrh stimulačního zařízení pomocí titanových elektrod

Design elektrody byl navrhován podle 24jamkové titrační destičky, tak aby elektrody zatěžovaly materiály na dně kultivační destičky a zároveň aby šlo s jamkami pracovat (tedy nebyly zakryté a mohlo se pipetovat/odsávat). Elektrody, které budou přímo v jamkách, musí být rovné pro vytvoření homogenního elektrického pole.



Obr. 1 24jamková titrační destička (Zdroj: Anon, 2022)

Pro vytvoření návrhu výřezku z titanového plechu byl použit pro studenty volně dostupný 2D program. Na obrázku vidíte návrh elektrody připomínající hřeben a rozměrově uzpůsobený tak, aby se vešel do zmiňované kultivační misky. Velikosti jsou v jednotkách milimetrů.



Obr. 2 Návrh titanové elektrody (Zdroj: autor)

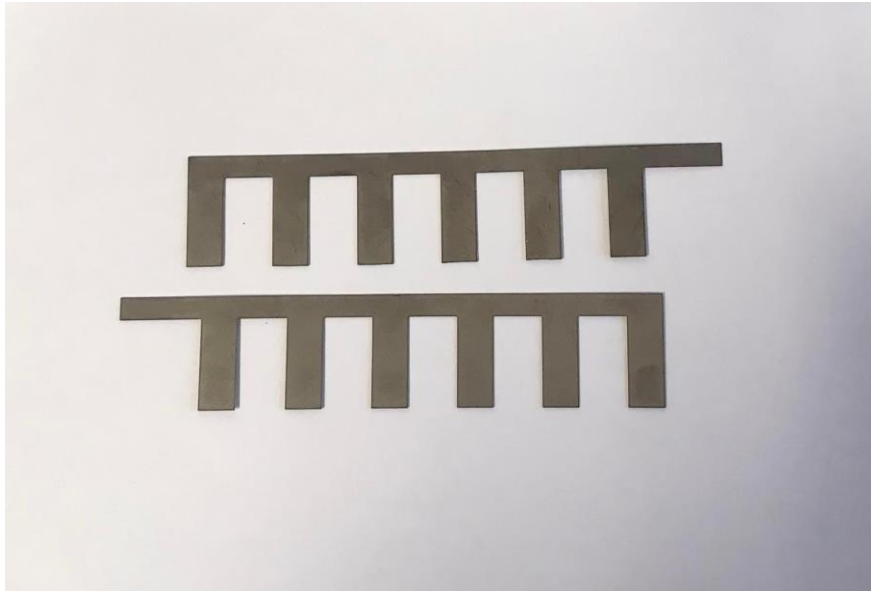
3.4 Výběr materiálů na elektrody

Pro výrobu hřebenových elektrod bylo nutné vybrat vhodný vodivý materiál, který je zároveň necytotoxický. Byl zvolen titan, který je biokompatibilní a již široce využívaný ve zdravotnictví, díky svým mechanickým vlastnostem nachází uplatnění v chirurgii při nahrazování kloubů nebo i v jiných oblastech, jako je stomatologie. Titan má sice nízkou elektrickou vodivost (resp. vysoký odpor) v porovnání s ostatními kovy, ale je cenově dostupnější a má dobré chemické vlastnosti. Lze ho sterilizovat ethylen oxidem i ethanolem. Čistý titanový plech grade 2 (dle standardu ASTM) byl zakoupen od firmy zabývající se zpracováním a výrobou titanových plechů. Rozměry pořízeného titanového plechu jsou tedy $200 \times 100 \times 0,4\text{mm}$. Hřebeny byly řezány do titanového plechu pomocí vláknového laseru JK Fiber Lasers JK400FL při výkonu 200 W, které vyřezal pan Ing. Martin Lachman, Ph.D. (FS Katedra výrobních systémů, na CXI).



Obr. 3 Proces řezání vláknovým laserem (Zdroj: autor)

Z titanového plechu bylo vyřezáno 8 elektrod, které byly začištěny pilníkem a odmaštěny za pomoci acetonu. Zbylé odřezky byly použity pro test cytotoxicity v další části této práce. Na obr. 4 vidíte výsledek řezání.



Obr. 4 Vyřezané elektrody (Zdroj: autor)

3.5 Vytvoření dřevěné formy pro vylití silikonem

Pro vytvoření silikonové formy je zapotřebí vyrobit samotnou formu na silikon. Z důvodu lehké opracovatelnosti a dostupnosti materiálu bylo zvoleno dřevo. Forma je vyrobena ze čtyř kusů zkrácených latí a spodek formy tvoří zbytek z podlahové krytiny (Obr. 5).



Obr. 5 Materiálová příprava formy (Zdroj: autor)

Zkrácené latě byly předvrtány a spojeny vruty do obdélníkového půdorysu. Výsledný půdorys má rozměry $152 \times 145 \times 35$ mm. Velice důležitým úkonem je také vyplnění veškerých mezer silikonem, a to z důvodu možného protékání tekuté směsi z formy ven.



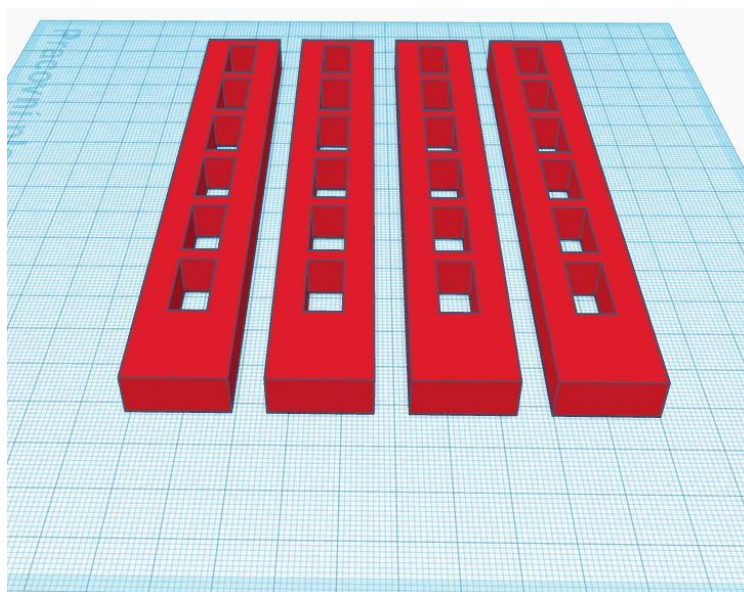
Obr. 6 Sešroubovaná dřevěná forma (Zdroj: autor)

Pro získání konečného tvaru formy je zapotřebí vložit dovnitř takové přípravky, které budou v konečném důsledku sloužit jako dutina pro usazení titanových elektrod, a následně ho zalít epoxidovou pryskyřicí. Pro návrh přípravků byl stejně jako v předchozím případě využit 2D program, avšak ten přímo nepodporuje formát pro 3D tisk, proto Obr. 7 slouží čistě pro prezentaci rozměrových potřeb přípravku.



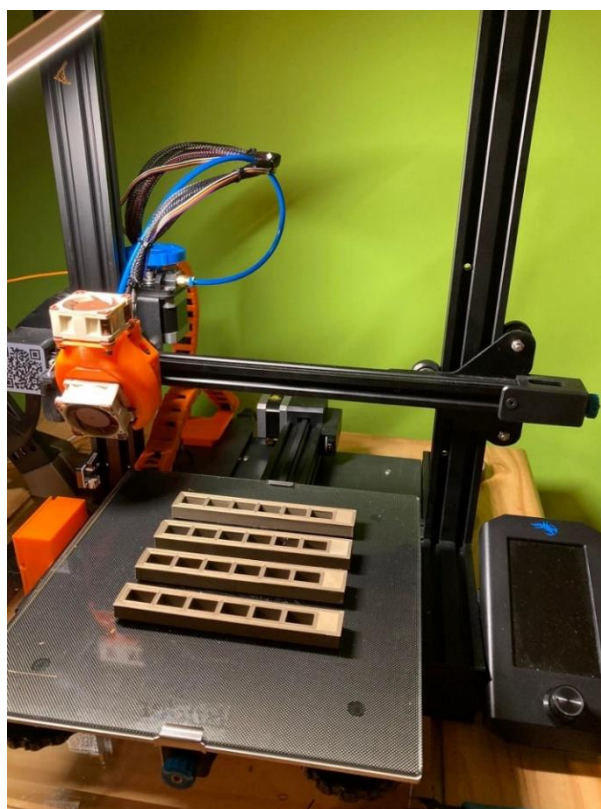
Obr. 7 Návrh zařízení pro finální tvar formy (Zdroj: autor)

Ke zhotovení tohoto návrhu byl tentokrát využit bezplatný 3D software, který poskytne potřebný formát STL pro 3D tisk (viz Obr. 8).



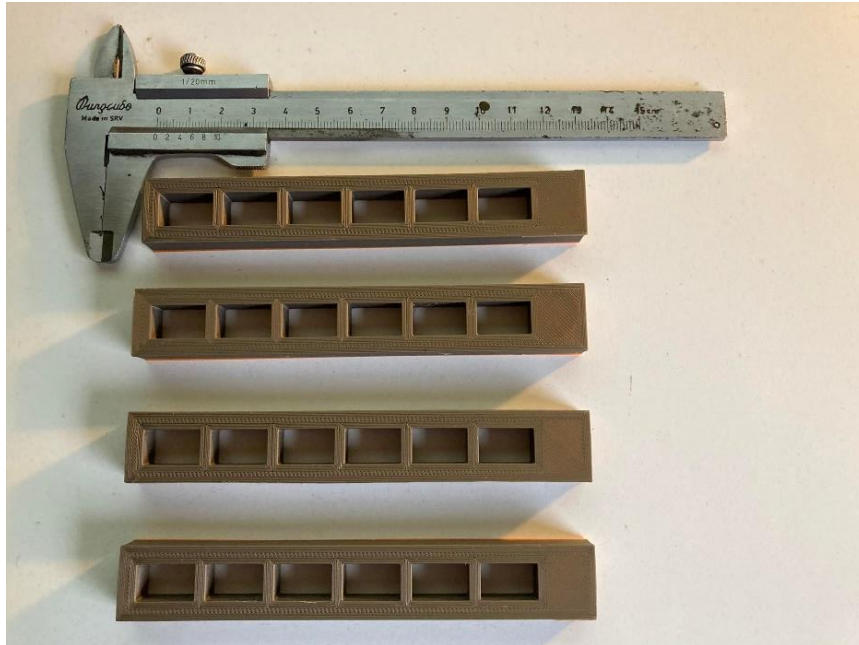
Obr. 8 Návrh zařízení v 3D programu (Zdroj: autor)

Tisk byl proveden na 3D tiskárně Creality ENDER 3 V2 (viz Obr. 9), kde byla nastavena doporučená teplota podložky na 100 °C při teplotě tisku 255 °C. Tyto teploty jsou doporučené u použitého filamentu niceABS bronze s průměrem 1,75 mm, kde ABS v názvu značí typ filamentu.



Obr. 9 Výroba na 3D tiskárně (Zdroj: autor)

Po dokončení tisku je nutné nechat vyhřátou podložku vychladnout, aby se zařízení a podložka při sloupávání zbytečně nepoškodily. Po vyjmutí byly spodní hrany lehce zbrouseny smirkovým papírem (viz Obr. 10).



Obr. 10 Vyjmutá a začištěná zařízení z 3D tiskárny (Zdroj: autor)

Zařízení bylo potřeno lepidlem a vsazeno do vnitřku formy. Poté bylo zatěžkáno závažími a přebytečné lepidlo bylo odstraněno vatovou tyčinkou. Lepidlo bylo ponecháno zaschnutí po dobu 24 hodin (Obr. 11).



Obr. 11 Přilepená a zatěžkaná zařízení v dřevěné formě (Zdroj: autor)

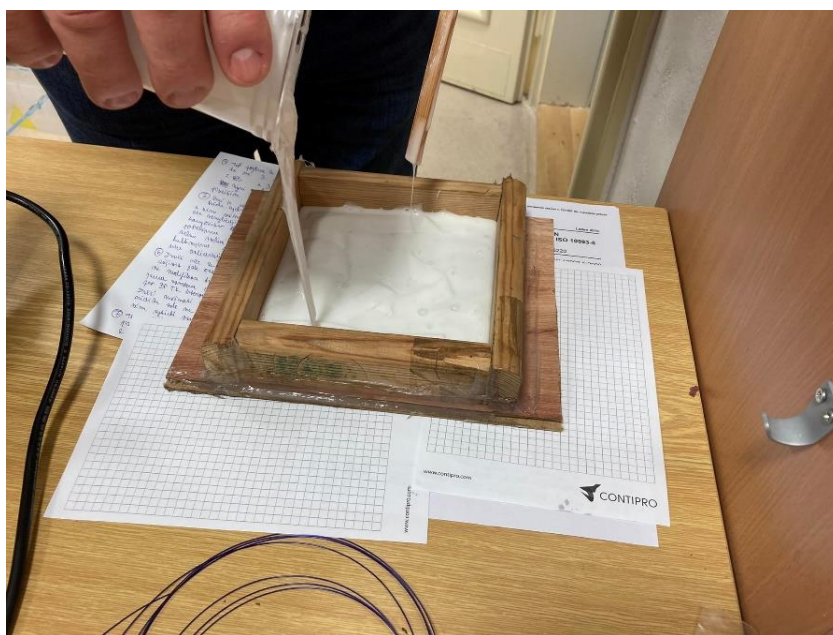
3.6 Vylití silikonem

K vylití formy byl použit kondenzační silikon s tvrdostí 25, který je dvojsložkový se složkou A a složkou B – tvrdidlo. Bylo postupováno dle návodu na obalu silikonu, tzn. složka A byla nalita do předem připravené čisté nádoby a trochu promíchána, zvážena na připravené váze k získání správného poměru. Návod udává poměr 100 : 2, proto při 555 g složky A (silikon) bylo přidáno cca 11,3 g složky B (tvrdidlo) a směs byla důkladně promíchána (viz Obr. 12).



Obr. 12 Navážení složek A a B (Zdroj: autor)

Takto rozmíchaným silikonem byly opatrně vylévány prostory formy (viz Obr. 13) a pro docílení jeho rozlití do všech mezer bylo s formou poklepáno.



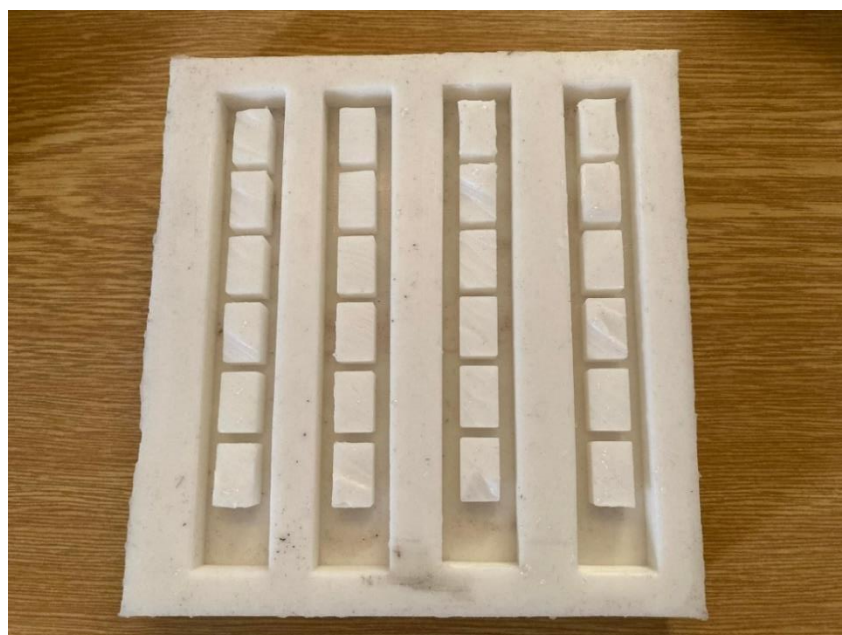
Obr. 13 Vylití formy silikonem (Zdroj: autor)

Z důvodu míchání a vylévání se do směsi vmísila spousta vzduchových bublin, proto je vhodné je špendlíkem nebo jehlou propíchnout, aby směs byla co nejvíce celistvá. Forma byla ponechána cca 24 hodin k vytvrdnutí (Obr. 14).



Obr. 14 Tuhnutí silikonu v dřevěné formě (Zdroj: autor)

Po zatuhnutí byla dřevěná forma rozšroubována a nožem byl odstraněn jisticí silikon, poté bylo formu možné jednoduše vyndat. Po vyndání byly nožem začištěny přesahující odlitky. Očištěný výsledek lze vidět na (Obr. 15).



Obr. 15 Silikon vyjmutý z dřevěné formy (Zdroj: autor)

3.7 Vylití epoxidovou pryskyřicí a usazení titanových elektrod

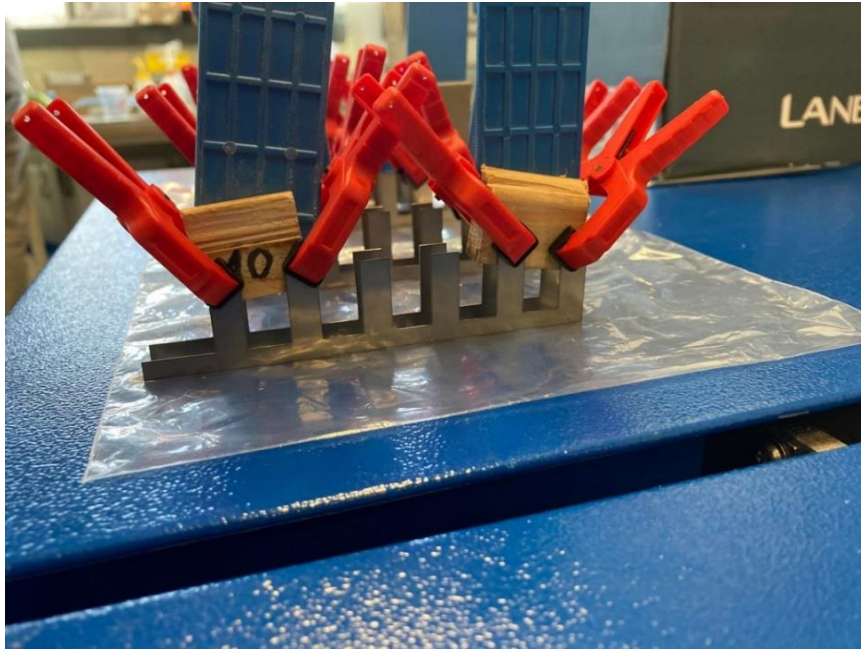
Vylití epoxidovou pryskyřicí bylo procesově velice podobné jako v případě vylévání formy silikonové. Znovu se jednalo o dvousložkovou směs, avšak potřebné množství pro vylití v tomto případě je pouhých 180 g, proto při poměru 100 : 23, který byl udán výrobcem na obalu láhve, bylo v čisté nádobce naváženo a smícháno 150 g složky A (pryskyřice) a 3 g složky B (tvrdidla).

Tentokrát bylo potřeba dostat nechtěné bubliny vzniklé při míchání jiným způsobem, než tomu bylo v předchozím případě. Byla zvolena vakuová pumpa, jejíž využití nám bylo poskytnuto v laboratořích CXI. V nádobce rozmíchaná epoxidová pryskyřice byla vložena do vakuové komory, kde byl odsát vzduch, což způsobilo vypraskání vzduchových bublin. Proces byl zopakován po vylití z nádobky do silikonové formy (viz Obr. 16). V mezičase byly připraveny titanové elektrody.



Obr. 16 Silikonová forma s epoxidem ve vakuové komoře (Zdroj: autor)

Na (Obr. 17) můžeme vidět titanové elektrody, které byly pomocí distančních špalíků a montážních podložek vzdáleny od sebe mezerou 12 mm a byly zajištěny plastovými svěrkami.



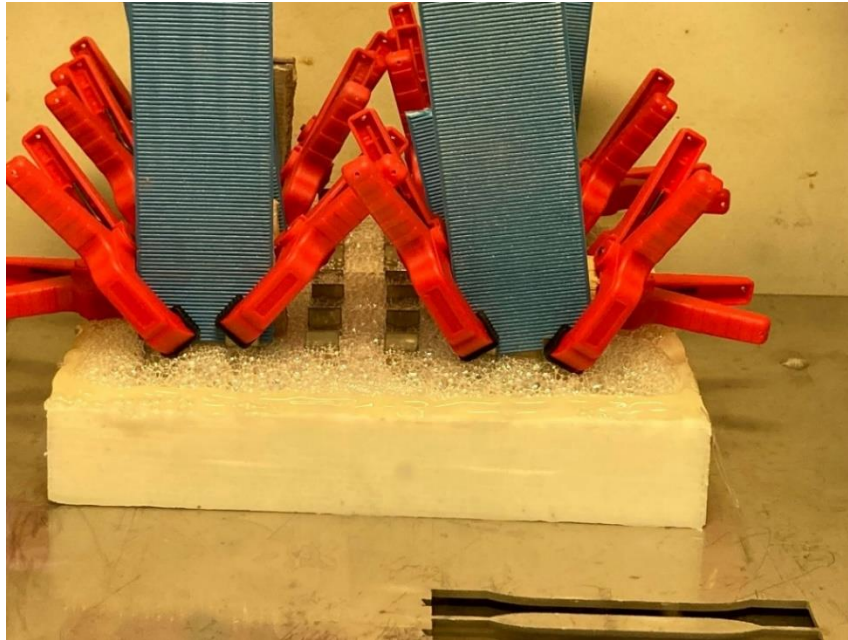
Obr. 17 Připravené elektrody (Zdroj: autor)

Takto připravené elektrody byly velice opatrně vloženy do vnitřku formy s tekutou epoxidovou pryskyřicí, jak lze vidět na (obr. 18), a znovu byly vloženy do vakuové komory.



Obr. 18 Titanové elektrody vsazené do tekuté pryskyřice v silikonové formě (Zdroj: autor)

Na (Obr. 19) lze na první pohled vidět vycházející vzduchové bubliny z formy ven. Tento proces trval cca 10 min, poté byla celá forma vyndána a ponechána k vytuhnutí v pokojové teplotě po dobu 24 hodin.



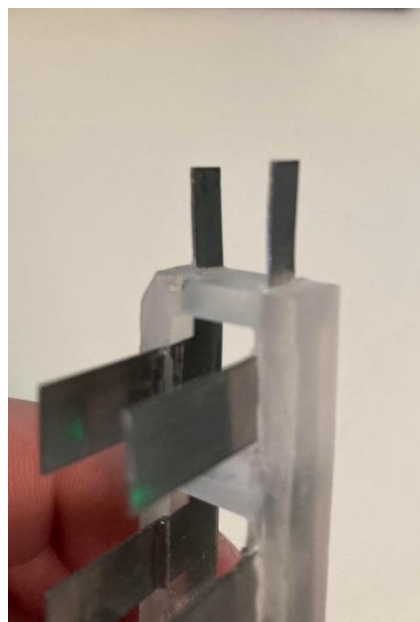
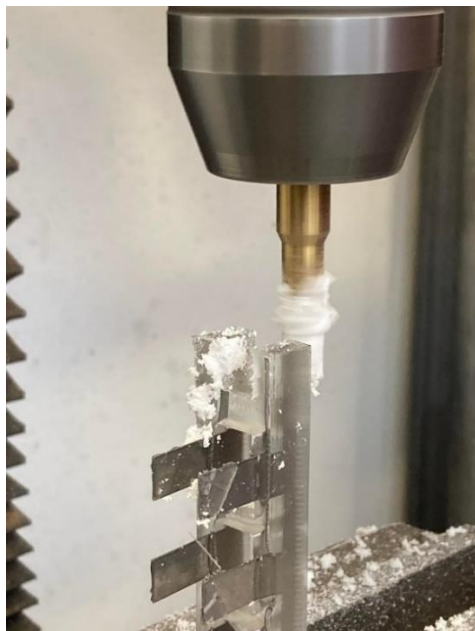
Obr. 19 Forma se zařízením vložená ve vakuové pumpě (Zdroj: autor)

Po uplynutí doby pro vytuhnutí pryskyřice byla zařízení velice jednoduše vyjmuta z formy ven. Jak lze vidět na (Obr. 20), bylo potřeba začistit nedokonalosti a hlavně uvolnit zalité konce napájecích ploch elektrod.



Obr. 20 Vyndaná zařízení po vytuhnutí pryskyřice (Zdroj: autor)

Pro uvolnění napájecích ploch elektrod byla použita frézka, kdy bylo postupně frézováno až k tenké vrstvě, která se dala odloupnout za pomoci nože. Na (Obr. 21) je zachycen průběh frézování a na (Obr. 22) vidíte výsledek po začištění.



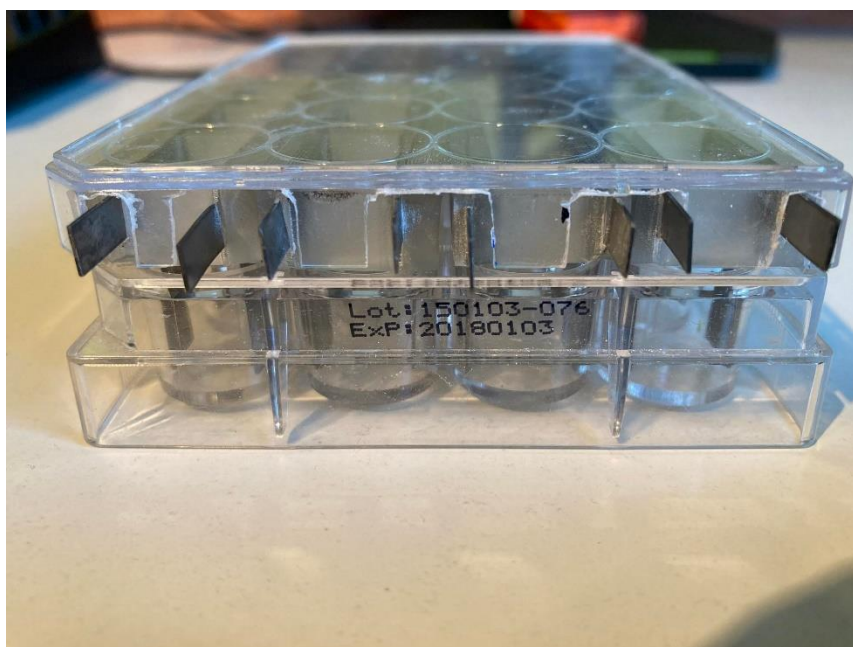
Obr. 21 Proces frézování (Zdroj: autor) Obr. 22 Výsledek frézování (Zdroj: autor)

Ofrézovaná zařízení byla uložena do titrační destičky, kde byla naposledy zkontrolována, zda dostatečně pasují, a případným broušením byla doupravena (viz Obr. 23)



Obr. 23 Usazení zařízení do titrační destičky (Zdroj: autor)

Poslední úpravou zbývá přizpůsobit původní zakrývací víčko, které na zařízení nesedí z důvodu přesahu napájecích ploch titanových elektrod z titrační destičky, proto bylo víčko doupraveno za pomoci ruční frézky, kterou byly vyřezány dostatečně velké otvory, ty byly očištěny a zapilovány jehlovým pilníkem (viz Obr. 24).



Obr. 24 Upravené zakrývací víčko titrační destičky (Zdroj: autor)

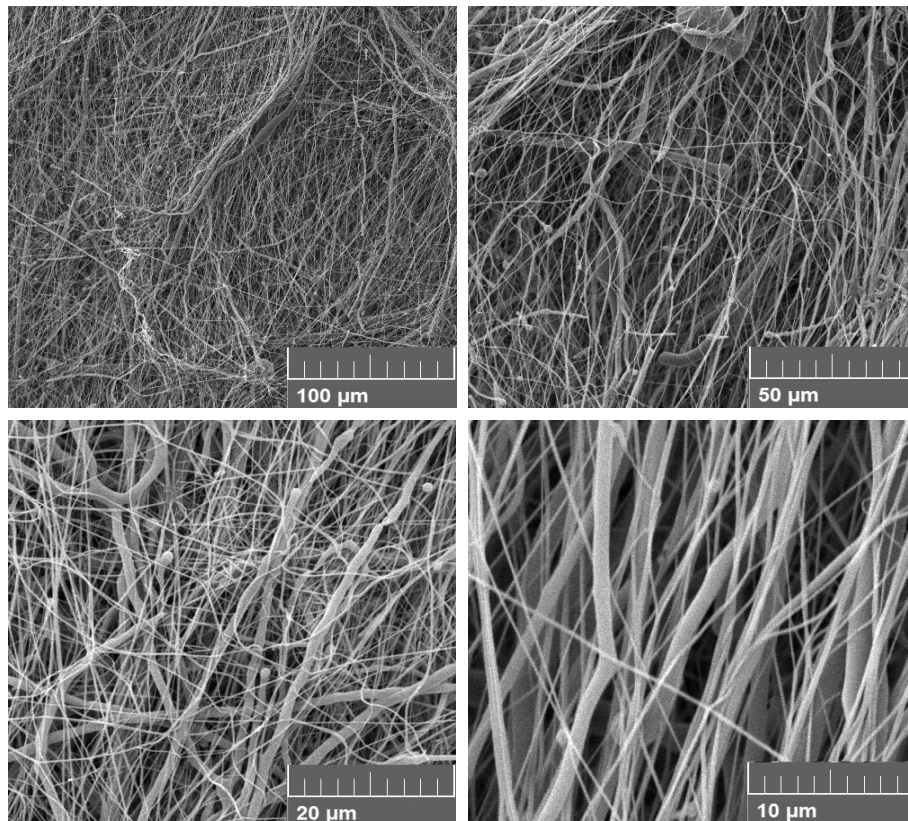
3.8 Příprava nanovláčenného scaffoldu do titrační destičky

Pro výrobu nanovláčenného materiálu byl použit roztok polykaprolaktonu (PCL) s molekulovou hmotností 45000 g/mol o koncentraci 16 hmotnostních %, který byl rozpuštěn v chloroformu, ethanolu a kyselině octové o poměru 8 : 1 : 1 a poté byl zvlákněn na zařízení Nanospider TM NS 1WS500U (Elmarco, Česká republika) inženýrkou Markétou Klíčovou z Fakulty textilní, Katedry netkaných textilií a nanovláčenných materiálů. Výrobní parametry byly nastaveny tak, aby výsledná vrstva měla plošnou hmotnost 20 g/m².

3.8.1 Hodnocení morfologie nanovláčenného materiálu

Vyrobený scaffold je potřeba zkontrolovat pod elektronovým mikroskopem TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe (Tescan, Česká republika) z toho důvodu, aby bylo zjištěno, zda při výrobě scaffoldu nedošlo k deformacím, které by mohly negativně ovlivnit proliferaci a adhezi buněk. Scaffold byl před vsazením do mikroskopu pozlacen 10nm vrstvou zlata

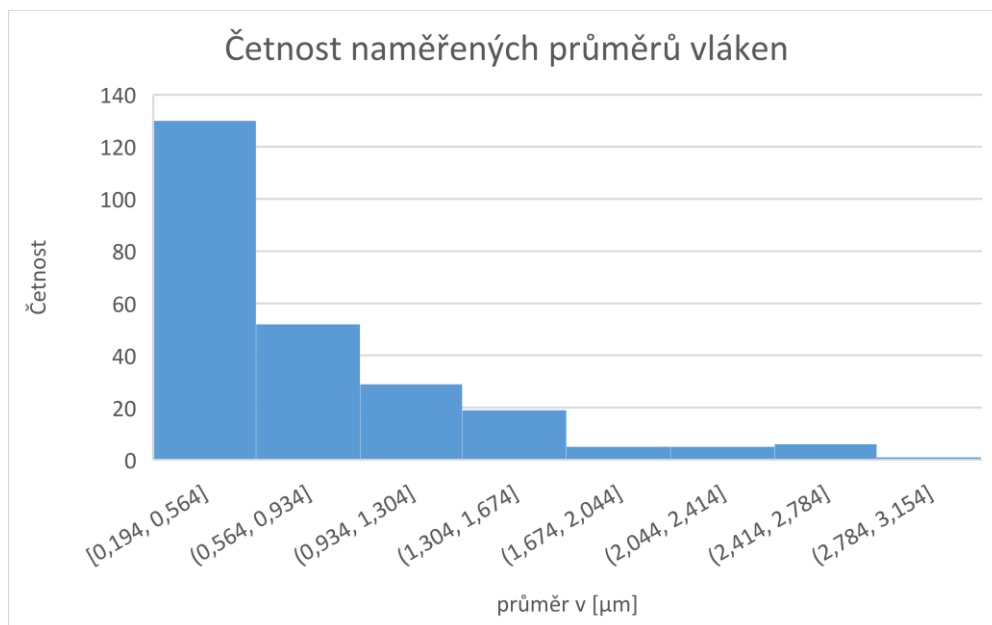
na zařízení Quorum Q150R ES (Quorum Technologiesú). Snímky na (Obr. 25) byly pořizeny se zvětšením 5000× a neobjevují se na nich výrazné deformace.



Obr. 25 Snímky vláken ze SEM s měřítky 100 μm, 50 μm, 20 μm a 10 μm (Zdroj: autor)

3.8.1.1 Průměr vláken

Průměr nanovláken byl vypočítán za pomoci softwaru ImageJ, kde bylo naměřeno 250 hodnot, ze kterých byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledný průměr vlákna je tedy (819 ± 657) nm. Na (Graf 1) byla vynesena četnost naměřených průměrů vláken.



Graf 1 Histogram průměrů vláken (Zdroj: autor)

3.8.2 Smáčivost vrstev

Smáčivost je hodnocena pomocí kontaktních úhlů kapek dopravených na materiál. Pokud má kapka mezní úhel pod 90° , je materiál považován za smáčivý, avšak pokud má kapka mezní úhel nad 90° , je materiál považován za nesmáčivý. Test smáčivosti byl proveden na vystřiženém kousku PCL, který byl přilepen oboustrannou páskou na podložní sklíčko (viz obr. 26). Sklíčko s materiálem bylo umístěno před snímací kameru a pipetou byly nanášeny kapičky destilované vody. Z uskutečněných měření byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka ($39,06 \pm 4,39^\circ$). Podle výsledku se testovaný materiál jeví jako smáčivý.



Obr. 26 Připravený materiál po provedení testu smáčivosti (Zdroj: autor)

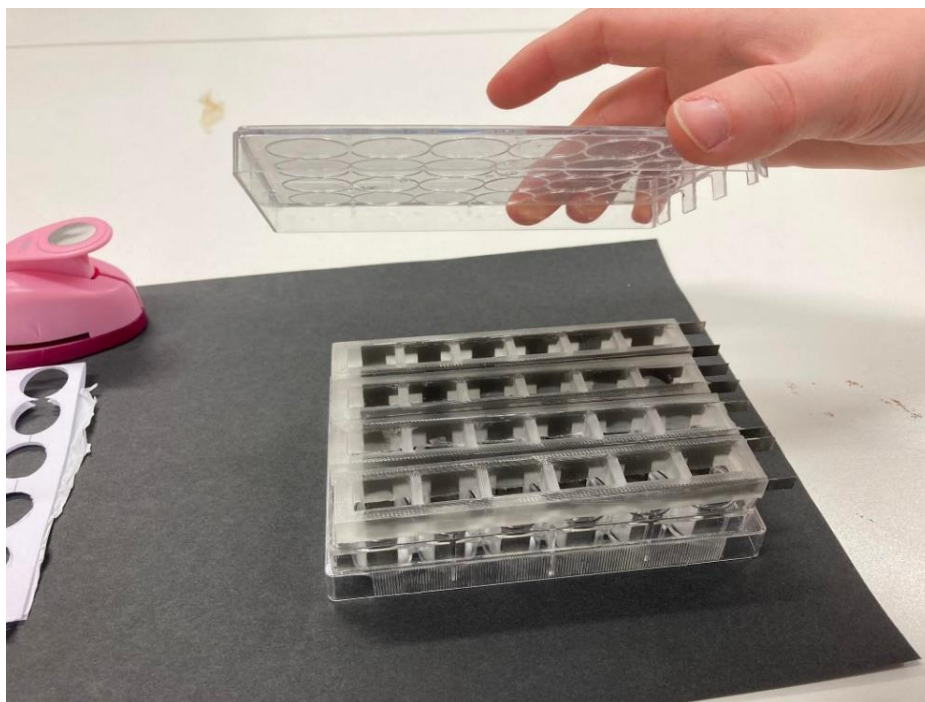
3.9 Metodika přípravy nanovláknenného materiálu do titrační destičky

Pro testování zařízení je třeba připravit nanovláknenný scaffold. Do jamek o průměru 16 mm je nutné scaffold nastříhat za pomoci vykrajovátko, které má právě zmíněný průměr. Protože je scaffold velice jemný, byl vložen mezi dva listy papíru, kde byla tužkou vyznačena jeho horní strana a vystřižena. Vystřižené scaffoldy byly vyndány z pomocných papírů a za pomoci pinzety opatrně vloženy na dno titrační destičky (viz Obr. 27).



Obr. 27 Vykrajovaný materiál usazený do titrační destičky (Zdroj: autor)

Destička s nanovláknennými materiály byla sterilizována ethylenoxidem po dobu 12 hodin při teplotě 37 °C (Aprolene, UK). Sterilizace byla provedena podle normy ČSN EN ISO 11135-1 Sterilizace výrobků pro zdravotní péči – Sterilizace ethylenoxidem – Část 1: Požadavky na vývoj, validaci a průběžnou kontrolu sterilizačního postupu pro zdravotnické prostředky. Vyroběné zařízení bylo sterilizováno 70% ethanolem po dobu 30 minut a uloženo do boxu s UV zářením na 20 minut. Po sterilizaci je možné usadit zařízení do destičky (viz Obr. 28).



Obr. 28 Usazení zařízení a zakrytí víčkem (Zdroj: autor)

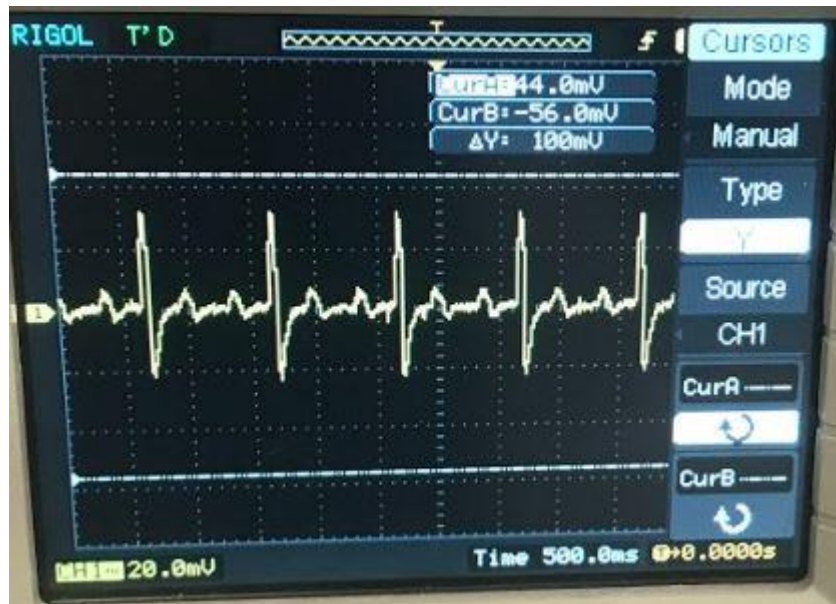
3.10 Nastavení elektrické stimulace

Pro laboratorní testy je potřeba nastavení vhodné elektrické stimulace při odporu titanových elektrod a média. Zařízení bylo zapojeno do jednoduchého obvodu za použití krokosvorek, přičemž červené vodiče byly kladné polarity a žluté vodiče polarity záporné. Jak lze vidět na Obr. 29, tři řady byly stimulovány a zaplněny běžně používaným médiem využívaným právě pro kultivaci buněk s vodivostí 15 mS/cm a jedna řada byla ponechána čistě bez stimulace a média.



Obr. 29 Testování vyrobeného zařízení elektrickou stimulací (Zdroj: autor)

Cílem testu bylo nastavit stimulaci tak, aby platilo, že výsledná amplituda peak to peak bude 100 mV. Na připojeném osciloskopu (viz Obr. 30) lze vidět průběh 100 mV bez zátěže.



Obr. 30 Průběh stimualce na osciloskopu bez zátěže (Zdroj: autor)

V případě napíjetování média do jamek poklesne napětí z původních 100 mV na 56 mV (viz Obr. 31), to je třeba jednoduchým přenastavením zdroje bez nutnosti zesilovače navýšit opět na chtěných 100 mV.



Obr. 31 Průběh stimulace na osciloskopu se zátěží (Zdroj: autor)

3.11 Test cytotoxicity

Test cytotoxicity poskytuje informaci, zda při řezání za pomoci vláknového laseru nedošlo ke vzniku toxických reziduí, která by mohla negativně ovlivnit proliferaci buněk v titrační destičce. Jedná se o třídní test, který se hodnotí pomocí metabolického testu CCK-8. Tento test je použit k určení viability, čímž je myšlena životaschopnost buněk. Test cytotoxicity probíhá dle normy ČSN EN ISO 1993 – 5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkouška na cytotoxicitu *in vitro*. Byla použita buněčná linie 3T3 myší fibroblasty a médiem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biosera, Francie) s 10% fetálně bovinním sérem (Biosera, Francie) a s 1% směsí antibiotik obsahujících penicilin, streptomycin, amfotericin B a glutamin (Biosera, Francie), pro odloučení buněk ze dna kultivační misky jsme použili trypsin-EDTA (Lonza, Švýcarsko) a pro pozitivní kontrolu byl použit cytotoxický Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA). Vyhodnocení bylo provedeno za pomoci spektrofotometru.

3.11.1 První den testu

V prvním dnu testu bylo tedy cílem si připravit buněčnou suspenzi s kultivačním médiem, které bylo poté nasazeno do 96ti jamkové titrační destičky, avšak před nasazením buněk do jamek je nutné buňky zpasážovat. Pasážování buněk je proces, při kterém buňky ředíme a měníme jejich vyčerpané médium. Veškeré procesy s buňkami se odehrávají v laminárním boxu, kde manipulujeme s prostředky, které byly důkladně vydezinfikované ethanolem a veškeré nástroje se opalují plamenem z kahanu k docílení co největší sterility.

Buňky uložené na dně kultivační lahvičky s médiem vyndáme z vyhřátého inkubátoru s teplotou 37 °C a zkontrolujeme pod mikroskopem. Z kultivační lahvičky odsajeme odsávačkou staré médium a přidáme 2 ml PBS (fosfátový pufr) pro propláchnutí buněk a znovu odsajeme. Pro uvolnění buněk ze dna lahvičky použijeme 2 ml trypsinu a poté kultivační lahvičku vložíme na 5 minut zpět do inkubátoru. Působením trypsinu dojde nejenom k odlepení ze dna, ale také ke změně morfologie buňky, a to ve formě zakulacení. Po uplynutí 5 minut znovu vyndáme z inkubátoru a zkontrolujeme pod mikroskopem. V další části přidáme pipetou 4 ml média obsahujícího mimo jiné i blokátor trypsinu. Pro docílení rozbití shluků buněk musíme médium pipetou několikrát nasát a vypustit, ideálně po dně kultivační lahvičky. Následně se odebere buněčná

suspenze z kultivační lahvičky, kde necháme 3 až 6 kapek a k tomuto zbytku přidáme 12 ml média.

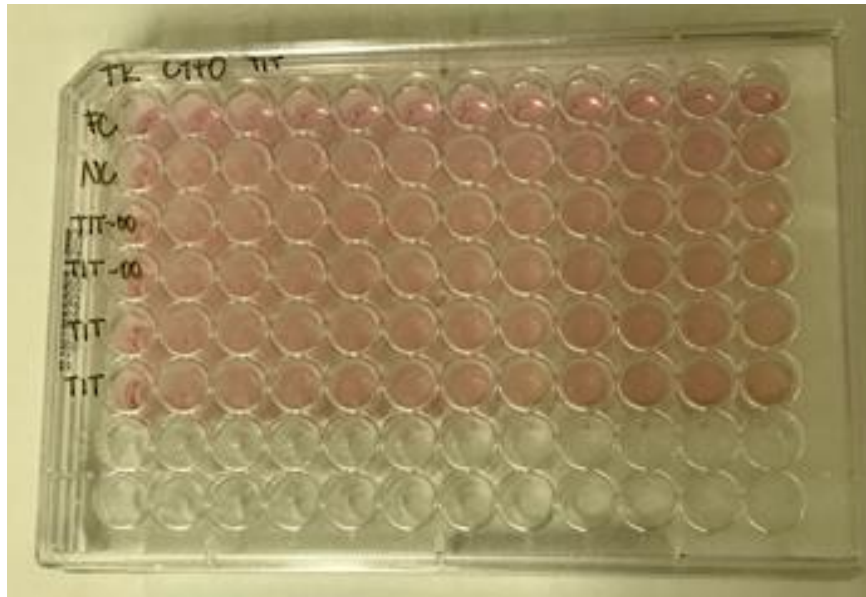
Dalším úkonem je spočítání buněk, aby byl zjištěn počet buněk nutný pro vložení do jedné jamky a aby bylo možné spočítat celkové množství média. Bylo odebráno 10 μ l buněčné suspenze a k tomu bylo přidáno 10 μ l trypanové modři. Byla provedena dvě měření. Obsah zkumavky pipetou opakovaně nasajeme a vypustíme, abychom docílili promíchání. Do připravené speciální destičky napipetujeme 10 μ l obarvené suspenze a destičku vložíme do automatického počítadla (Luna™ cell counter), které spočítá buňky a vyhodnotí jejich viabilitu. Do jedné jamky bylo přidáno takové množství buněčné suspenze, aby bylo v jamce 10^4 buněk. Po rozpočítání je celkové množství média DMEM 6536 μ l, které napipetujeme do jamek titrační misky.

V poslední části prvního dne testování byly připraveny materiály, které prošly řezáním za pomoci vláknového laseru, přičemž jeden kousek byl opilován a odmaštěn acetonem (TIT-OO) a druhý byl ponechán bez odmaštění a opilování (TIT). Oba materiály prošly 30ti minutovou sterilizací v 70% ethanolu a vysvícením pod UV světlem. Následně byly uloženy do sterilního boxu.

Na 10 mg materiálu je potřeba 1 ml média, proto při váze použitých materiálů, kde každý z nich má 100 mg, přidáme 10 ml média DMEM. Uložené materiály byly vyndány ze sterilního boxu a vloženy do připraveného média, kde byly louhovány po dobu 24 hodin na třepačce o otáčkách 60 rpm při teplotě 37 °C.

3.11.2 Druhý den testu

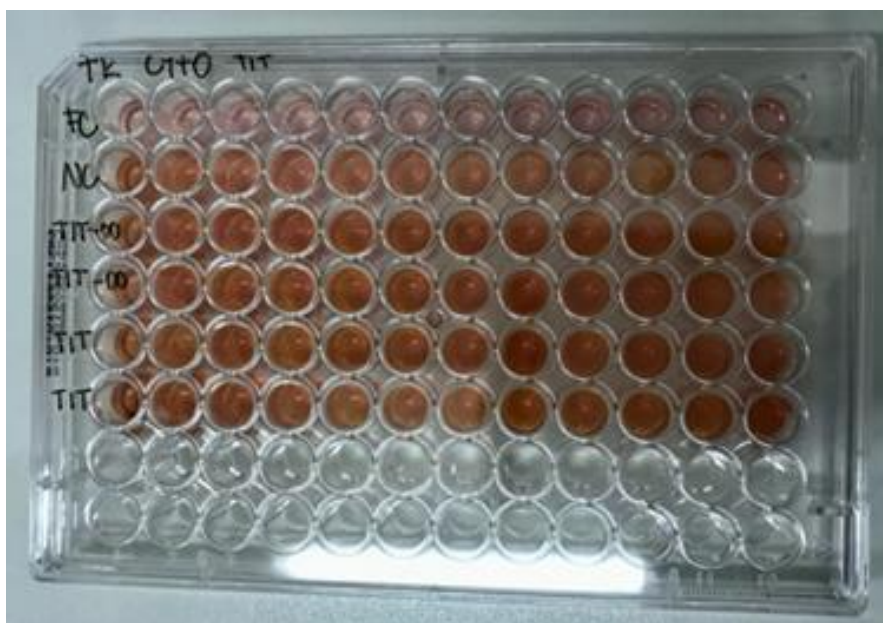
V druhý den testu byla destička s buňkami nejprve zkontrolována pod mikroskopem. Bylo odsáto staré médium a k buňkám bylo připipetováno 100 μ l výluhu z materiálu připraveného z předchozího dne. Dále byla připravena pozitivní (PC) a negativní kontrola (NC). Pozitivní kontrola byla aplikována z toho důvodu, aby byla vyvolána a potvrzena cytotoxická odezva, to je provedeno pomocí 13 μ l cytotoxického Tritonu-X 100 o koncentraci 0,1 % společně s médiem DMEM o objemu 1287 μ l do prvního řádku misky. Negativní kontrola je čisté médium přidané k buňkám a slouží jako reference buněčné viability (viz Obr. 29).



Obr. 32 Fotografie extraktů materiálů v 96jamkové destičce (Zdroj: autor)

3.11.3 Třetí den testu

V poslední den testu bylo připraveno 10% CCK-8 v médiu s celkovým objemem 760 μ l společně s 6840 μ l média DMEM. Destička byla vyndána z inkubátoru a zkontrolována pod mikroskopem. Extrakty byly odsáty a bylo napipetováno do jamek 100 μ l 10% CCK-8 s médiem DMEM. Následně byly buňky inkubovány 3 hodiny v inkubátoru. Po uplynutí 3 hodin byly vytaženy z inkubátoru a změřeny za pomoci spektrofotometru. Na (obr. 30) stojí za povšimnutí výrazný rozdíl v barvách řádku s pozitivní kontrolou a ostatními řádky. To je způsobeno tím, že v pozitivní kontrole byly buňky usmrceny cytotoxickým tritonem-X a v ostatních řádcích vzniká žlutě zbarvený formazan vyprodukovaný aktivitou buněk.



Obr. 33 Destička po 3hodinové inkubaci CCK-8 (Zdroj: autor)

3.11.4 Vyhodnocení výsledků

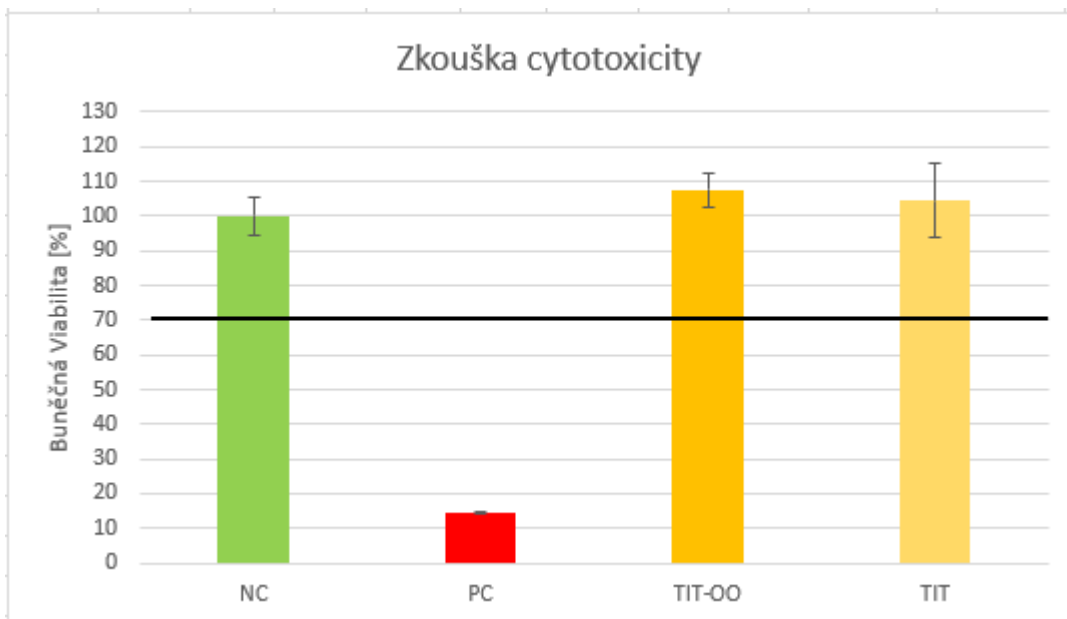
Data naměřená ze spektrofotometru při vlnové délce 450 nm jsou zaznamenána v tabulce v Příloze I. Červená barva v tabulce znamená odchýlenou hodnotu, která s největší pravděpodobností vznikla špatnou manipulací při pipetování, proto byla vyřazena.

Viabilita buněk byla posuzována podle negativní kontroly, jejíž průměr z naměřených hodnot byl stanoven na 100 %. V Tab. 1 jsou spočítané průměry absorbancí a jejich směrodatné odchylky, taktéž byla spočítána viabilita se směrodatnými odchylkami.

Tab. 1 Vypočítané průměry se směrodatnými odchylkami a vypočtená viabilita se směrodatnými odchylkami (Zdroj: autor)

	průměr	SD	viabilita [%]	SD viabilita
NC	4,465	0,239	100,000	5,345
PC	0,654	0,016	14,658	0,360
TIT-OO	4,798	0,214	107,467	4,785
TIT	4,664	0,479	104,470	10,730

Viabilita byla vynesena do (Graf 2). Vyznačená černá čára na 70 % určuje hranici, pod kterou byly materiály považovány jako cytotoxické. Z grafu lze vidět, že testované materiály nejsou pro buňky nijak cytotoxické. Dále byla pozorována mírně vyšší viabilita materiálu, který byl opilován a odmaštěn acetonem.



Graf 2 Vypočtená viabilita buněk po kontaktu s extrakty materiálů

4 Diskuze

Bakalářská práce byla zaměřena na úzkou část metod manipulací s buněčnými materiály, přihlíženo bylo též k aktuálním potřebám tkáňové laboratoře KNT. V teoretické části práce byly představeny různé realizace buněčných reaktorů, v rámci čehož byly dopodrobna analyzovány veškeré metodiky a použité materiály vhodné právě pro konstrukci těchto sestav. Sestavy sloužily jako odrazový můstek pro vytvoření vlastní konstrukce zařízení vyhovující účelům konkrétní biologické laboratoře.

Jedním z prvních úkolů bylo vybrat vhodný materiál pro stimulační elektrody. Záměrem bylo vybrat takový materiál, který svými vlastnostmi bude dostatečně mechanicky a chemicky odolný, zároveň bude co nejvíce biokompatibilní. Uvažováno bylo o několika materiálech, jež byly popsány v kapitole 2.3. Jedním z klíčových kandidátů byla platina, která se objevuje ve většině sestav, ale i přesto byl vybrán titan, který se sice nemůže rovnat s vodivostí platiny, avšak jeho vynikající biokompatibilní a mechanické vlastnosti jsou prověřeny mnoha léty uplatnění v medicíně. V neposlední řadě nelze opomenout to, že je cenově dostupnější.

Výsledný tvar elektrody nebyl ovlivněn pouze půdorysem a rozměry dané titrační destičky, ale zároveň okolnostmi, které elektrodě umožnily zatížení a udržení nanovlákněného scaffoldu na dně jamek. Za povšimnutí stojí, že veškeré dohledané sestavy z teoretické části pracují z větší části bez nanovlákněných scaffoldů – vyjma řešení z publikací (Li et al. 2018; Zhang et al. 2016), proto bylo nutné přijít s vlastním řešením.

V návaznosti na předchozí problém bylo taktéž nutno vymyslet, jakým způsobem bude do elektrod přiváděn proud a jak budou samotné elektrody držet v destičce. Nejlepším řešením se zdálo být zafixování elektrod do víčka titrační destičky – jak tomu je v publikacích (Mobini et al. 2018; Li et al. 2018). Ovšem to se nakonec prokázalo jako řešení nepraktické, jelikož při odkrytí víčka s elektrodami vyplave nanovlákněný scaffold na hladinu nebo přilne k elektrodám, což znepříjemňuje výměnu média a obecnou manipulaci ve sterilním prostředí. Proto bylo v této práci přistoupeno k uchycení elektrod pomocí epoxidové pryskyřice, která je pevná, chemicky odolná a snadno tvarovatelná. Vytvořením takového mezikusu se eliminoval problém vyplavání nanovlákněného scaffoldu – výsledkem byla snazší manipulace při výměně média. V neposlední řadě

můžeme benefit sledat ve výrobě silikonové formy pro zalití elektrod epoxidovou pryskyřicí (viz kapitola 3.6), která zaručuje opakovatelnost výroby těchto zařízení.

Metodika vytváření nanovlákných materiálů není ničím novým, přesto je důležité konkrétní nanovlákný materiál vždy zkontrolovat a určit, zda je vhodný pro použití v titračních jamkách. Posuzován byl zejména průměr vláken kontrolovaný v kapitole 3.8.1.1 a smáčivost v kapitole 3.8.2 – dle (Sun et al. 2021; Jenkins a Little 2019).

Závěrem bylo provedeno testování použitého titanového materiálu, přičemž biokompatibilita titanu je sice nepopiratelná, avšak vyvstaly odůvodněné obavy, že řezání vláknovým laserem by tuto schopnost materiálu mohlo negativně ovlivnit. Proto byl prvně proveden třídní test (vyhodnocení viz Graf 2), který prokázal, že i přes provedené řezání nedošlo k poklesu viability pod 70% hranici, čímž byla vyloučena cytotoxicita použitého materiálu.

5 Návrh doporučení pro praxi

Vytvořené zařízení umožňuje poměrně snadnou manipulaci a je vhodné k provádění opakovatelných testů v rámci kultivace buněk, ale přesto se stále jedná o základní zařízení, které lze mnoha dalšími úpravami vylepšit. Jednou z navrhovaných úprav může být vytvoření průtokové vodní lázně k odvádění Joulova tepla, a tím zabránění nárůstu teploty v médiu. Další zajímavou úpravou by mohla být kombinace stimulací elektrickým a magnetickým polem. Ovšem existuje i mnoho dalších úprav, které by mohly vytvořit vhodné podmínky pro hlubší výzkum této problematiky.

6 Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce bylo vytvoření funkčního zařízení a metodiky jeho použití. V teoretické části práce byly shrnuty hlavní principy tkáňového inženýrství – včetně vymezení konkrétní problematiky ve vytváření buněčných reaktorů s cílem zisku vyšší efektivity v oblasti kultivování buněk. Současně byla provedena rešerše zpracování využitelnosti nanovláknenných scaffoldů jako podpůrných struktur, které by měly zajistit větší proliferaci a adhezi buněk. Závěrem této části byly velice stručně nastíněny zejména kovové materiály využívané ve zdravotnictví a byly popsány bodovitě jejich zásadní rozdíly ve vlastnostech.

Výzkumná část se zabývá primárně vytvořením metodiky výroby funkčního zařízení, přičemž bylo použito hned několik odlišných technik k dopracování se ke kýženému výsledku. Jedním z dílčích výstupů bylo vytvoření silikonové formy, která může v budoucnu sloužit k opětovnému použití, čímž se zajistí dostatečné množství zařízení pro testování. V dalším výstupu byla vypracována metodika nanovláknenných scaffoldů, ve které bylo v kombinaci se stimulačními elektrodami dosaženo snazší manipulace s nanovláknenným materiálem. V rámci třetího výstupu došlo k ověření cytotoxicity titanového plechu po řezání na vláknovém laseru, u kterého bylo prokázáno, že titanové elektrody nejsou cytotoxické, tím pádem jsou vhodné pro použití k přímému kontaktu s médiem v titračních jamkách. Předposlední výstup s nastavením stimulace prokázal schopnost vytvořit elektrické pole mezi dvěma opačně nabitými elektrodami. Ověření funkčnosti a kultivace buněk při elektrické stimulaci s vyrobeným zařízením nebyla možná kvůli dlouhodobé odstavce inkubátoru, proto tento test může být proveden až v další závěrečné práci. To nabízí též prostor pro vylepšení zařízení či provedení rozsáhlejšího buněčného testování.

Seznam použité literatury

ANON. 2022. [24jamková tirační destička] [online obrázek]. In: Galleon - Homepage [online]. Makati City: Sterling Galleon, [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <https://www.galleon.ph/industrial-scientific-c882/glassware-labware-c2893/cell-culture-microplates-c24510/24-well-cell-and-tissue-culture-plates-non-p39190731>

BODHAK, Subhadip et al. 2012. Investigation of in vitro bone cell adhesion and proliferation on Ti using direct current stimulation. *Materials Science and Engineering: C*. **32**(8), 2163–2168. DOI 10.1016/j.msec.2012.05.032.

ELTOM, A., G. ZHONG a A. MUHAMMAD. 2019. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. 1–13. DOI 10.1155/2019/3429527.

Engineering ToolBox *Metals, Metallic Elements and Alloys - Thermal Conductivities* [online] [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: https://www.engineeringtoolbox.com/thermal-conductivity-metals-d_858.html

HANAWA, T. 2019. Overview of metals and applications. In: NIINOMI, Mitsuo, ed. *Metals for Biomedical Devices*. 2nd ed. Duxford: Woodhead Publishing, s. 3–29. DOI 10.1016/B978-0-08-102666-3.00001-8.

ELMENSTINE, Anne Marie. 2019. Table of Electrical Conductivity and Resistivity of Common Materials. ThoughtCo.com is the World's Largest Education Resource [online]. New York: ThoughtCo, [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/table-of-electrical-resistivity-conductivity-608499>

CHEN, Cen et al. 2019. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. *Biomaterials Research*. **23**(1). DOI 10.1186/s40824-019-0176-8.

JENČOVÁ, Věra et al. 2021 *Nanovlákná: teorie, technologie a použití*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, ISBN 978-80-7494-539-7.

JENKINS, Thomas Lee a Dianne LITTLE, 2019. Synthetic scaffolds for musculoskeletal tissue engineering: cellular responses to fiber parameters. *npj Regenerative Medicine*. **4**(1), 1–14. DOI 10.1038/s41536-019-0076-5.

- KHAW, Juan Shong, et al. 2022. Electrical stimulation of titanium to promote stem cell orientation, elongation and osteogenesis. *Acta Biomaterialia*. **139**, 204–217. DOI 10.1016/j.actbio.2021.08.010.
- LANZA, Robert et al. 2020 *Principles of tissue engineering*. 5. vyd. London: Academic Press, an imprint of Elsevier, ISBN 978-0-12-818422-6.
- LEPPIK, Liudmila et al. 2020. Electrical stimulation in bone tissue engineering treatments. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. **46**(2), 231–244. DOI 10.1007/s00068-020-01324-1.
- LI, Ping et al. 2018. The promoting effect on pre-osteoblast growth under electrical and magnetic double stimulation based on PEDOT/Fe₃O₄/PLGA magnetic-conductive bi-functional scaffolds. *Journal of Materials Chemistry B*. **6**(30), 4952–4962. DOI 10.1039/C8TB00985F
- LI, Yaping et al. 2017a. Effects of direct current electric fields on lung cancer cell electrotaxis in a PMMA-based microfluidic device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **409**(8), 2163–2178. DOI 10.1007/s00216-016-0162-0
- LI, Yaping et al. 2017b. Cell migration microfluidics for electrotaxis-based heterogeneity study of lung cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*. **89**, 837–845. DOI 10.1016/j.bios.2016.10.002.
- MOBINI, S., L. LEPPIK a J. H. BARKER. 2018. Direct current electrical stimulation chamber for treating cells in vitro. B.m.: Future Science Ltd London, UK. DOI 10.2144/000114382
- NAAHIDI, Sheva et al. 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*. **35**(5), 530–544. DOI 10.1016/j.biotechadv.2017.05.006.
- RAHMATI, Maryam et al. 2021. Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*. **117**. DOI 10.1016/j.pmatsci.2020.100721.

- RYAN, Ch. N. M., M. N. DOULGKEROGLOU a D. I. ZEUGOLIS, 2021. Electric field stimulation for tissue engineering applications. *BMC Biomedical Engineering*. **3**(1), 1. DOI 10.1186/s42490-020-00046-0.
- SELDEN, Clare a Barry FULLER. 2018. Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design. *Bioengineering*. **5**(2), 32. DOI 10.3390/bioengineering5020032.
- SHARMA, Preeti et al. 2019. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of Medicine and Life*. **12**(3), 225–229. DOI 10.25122/jml-2019-0032.
- SMITH, L.A. a P.X. MA, 2004. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **39**(3), 125–131. DOI 10.1016/j.colsurfb.2003.12.004.
- SNYDER, S., C. DEJULIUS a R. K. WILLITS, 2017. Electrical Stimulation Increases Random Migration of Human Dermal Fibroblasts. *Annals of Biomedical Engineering*. **45**(9), 2049–2060. DOI 10.1007/s10439-017-1849-x.
- SUN, Lingyu et al. 2021. Tailoring Materials with Specific Wettability in Biomedical Engineering. *Advanced Science*. **8**(19), DOI 10.1002/advs.202100126.
- SUN, Yung-Shin. 2017. Studying Electrotaxis in Microfluidic Devices. *Sensors*. **17**(9), 2048. DOI 10.3390/s17092048.
- VACA-GONZÁLEZ, Juan et al. 2016. An In Vitro Chondrocyte Electrical Stimulation Framework: A Methodology to Calculate Electric Fields and Modulate Proliferation, Cell Death and Glycosaminoglycan Synthesis. *Cellular and Molecular Bioengineering*. **9**(1), 116–126. DOI 10.1007/s12195-015-0419-2.
- VARANI, Katia et al. 2017. Adenosine Receptors as a Biological Pathway for the Anti-Inflammatory and Beneficial Effects of Low Frequency Low Energy Pulsed Electromagnetic Fields. *Mediators of Inflammation*. DOI 10.1155/2017/2740963.
- VENEZUELA, Jeffrey a Matthew S. DARGUSCH, 2019. The influence of alloying and fabrication techniques on the mechanical properties, biodegradability and biocompatibility of zinc: A comprehensive review. *Acta Biomaterialia*. **87**, 1–40. DOI 10.1016/j.actbio.2019.01.035.

WAGNER, William et al. 2020. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. B.m.: Academic Press. ISBN 978-0-12-816138-8.

ZHAI, Mingming et al. 2016. Pulsed electromagnetic fields promote in vitro osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics*. **37**(3), 152–162. DOI 10.1002/bem.21961.

ZHANG, Jieyu et al. 2016. Electrical stimulation of adipose-derived mesenchymal stem cells in conductive scaffolds and the roles of voltage-gated ion channels. *Acta Biomaterialia*. **32**, 46–56. DOI 10.1016/j.actbio.2015.12.024.

ZHAO, Junjie, Michelle GRIFFIN, Jun CAI, Shaoxue LI, Peter E. M. BULTER a Deepak M. KALASKAR, 2016. Bioreactors for tissue engineering: An update. *Biochemical Engineering Journal*. **109**, 268–281. DOI 10.1016/j.bej.2016.01.018.

Seznam obrázků

Obr. 1 24jamková titrační destička (Zdroj: Anon, 2022)	25
Obr. 2 Návrh titanové elektrody (Zdroj: autor)	25
Obr. 3 Proces řezání vláknovým laserem (Zdroj: autor)	26
Obr. 4 Vyřezané elektrody (Zdroj: autor).....	27
Obr. 5 Materiálová příprava formy (Zdroj: autor).....	27
Obr. 6 Sešroubovaná dřevěná forma (Zdroj: autor).....	28
Obr. 7 Návrh zařízení pro finální tvar formy (Zdroj: autor).....	28
Obr. 8 Návrh zařízení v 3D programu (Zdroj: autor)	29
Obr. 9 Výroba na 3D tiskárně (Zdroj: autor)	29
Obr. 10 Vyjmutá a začištěná zařízení z 3D tiskárny (Zdroj: autor).....	30
Obr. 11 Přilepená a zatěžkaná zařízení v dřevěné formě (Zdroj: autor).....	30
Obr. 12 Navážení složek A a B (Zdroj: autor).....	31
Obr. 13 Vylití formy silikonem (Zdroj: autor)	31
Obr. 14 Tuhnutí silikonu v dřevěné formě (Zdroj: autor).....	32
Obr. 15 Silikon vyjmutý z dřevěné formy (Zdroj: autor)	32
Obr. 16 Silikonová forma s epoxidem ve vakuové komoře (Zdroj: autor).....	33
Obr. 17 Připravené elektrody (Zdroj: autor).....	34
Obr. 18 Titanové elektrody vsazené do tekuté pryskyřice v silikonové formě (Zdroj: autor).....	34
Obr. 19 Forma se zařízením vložená ve vakuové pumpě (Zdroj: autor)	35
Obr. 20 Vyndaná zařízení po vytuhnutí pryskyřice (Zdroj: autor)	35
Obr. 21 Proces frézování (Zdroj: autor) Obr. 22 Výsledek frézování (Zdroj: autor)	36
Obr. 23 Usazení zařízení do titrační destičky (Zdroj: autor)	36
Obr. 24 Upravené zakrývací víčko titrační destičky (Zdroj: autor).....	37
Obr. 25 Snímky vláken ze SEM s měřítky 100 μm , 50 μm , 20 μm a 10 μm (Zdroj: autor)	38
Obr. 26 Připravený materiál po provedení testu smáčlivosti (Zdroj: autor).....	39
Obr. 27 Vykrájený materiál usazený do titrační destičky (Zdroj: autor).....	40
Obr. 28 Usazení zařízení a zakrytí víčkem (Zdroj: autor)	41
Obr. 29 Testování vyrobeného zařízení elektrickou stimulací (Zdroj: autor)	41
Obr. 30 Průběh stimualce na osciloskopu bez zátěže (Zdroj: autor)	42
Obr. 31 Průběh stimulace na osciloskopu se zátěží (Zdroj: autor)	42

Obr. 32 Fotografie extraktů materiálů v 96jamkové destičce (Zdroj: autor).....	45
Obr. 33 Destička po 3hodinové inkubaci CCK-8 (Zdroj: autor)	46

Seznam tabulek

Tab. 1 Vypočítané průměry se směrodatnými odchylkami a vypočtená viabilita se směrodatnými odchylkami (Zdroj: autor).....	46
---	----

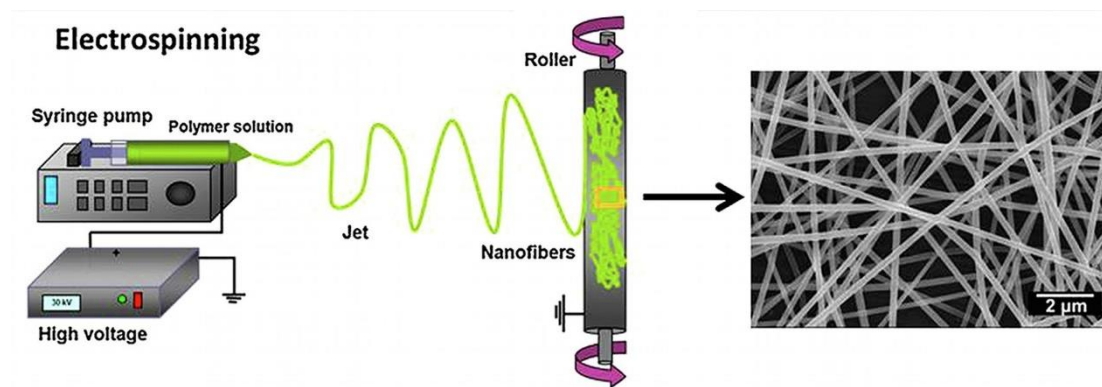
Seznam grafů

Graf 1 Histogram průměrů vláken (Zdroj: autor)	39
Graf 2 Vypočtená viabilita buněk po kontaktu s extrakty materiálů	47

Seznam příloh

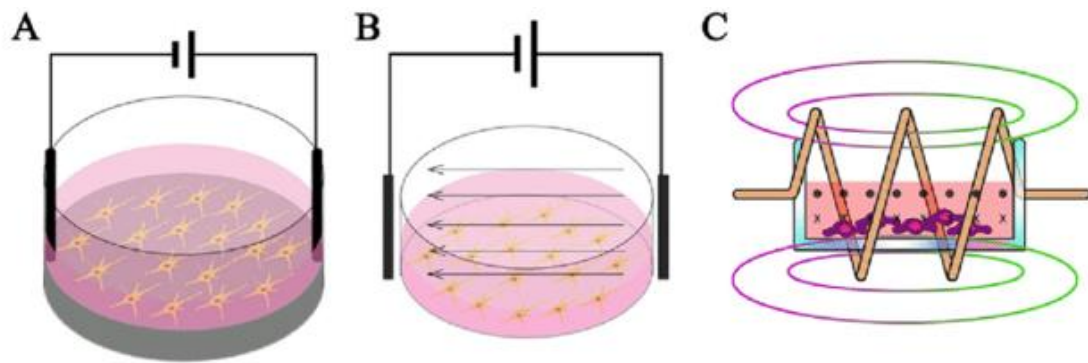
Příloha A	Proces elektrického zvlákňování
Příloha B	Různé typy stimulací
Příloha C	Stimulace 6komorové stimulační kultivační destičky
Příloha D	Sestava s Agarovými mosty
Příloha E	Mikrofluidní zařízení se třemi kanály
Příloha F	Stimulace s titanovými kultivačními disky
Příloha G	Sestava kapacitní vazby s 6komorovou kultivační destičkou
Příloha H	Sestava indukční vazby s Helmholtzovými cívkami
Příloha I	Naměřená data ze spektrofotometru
Příloha J	Obsah přiloženého CD

Příloha A Proces elektrického zvlákňování



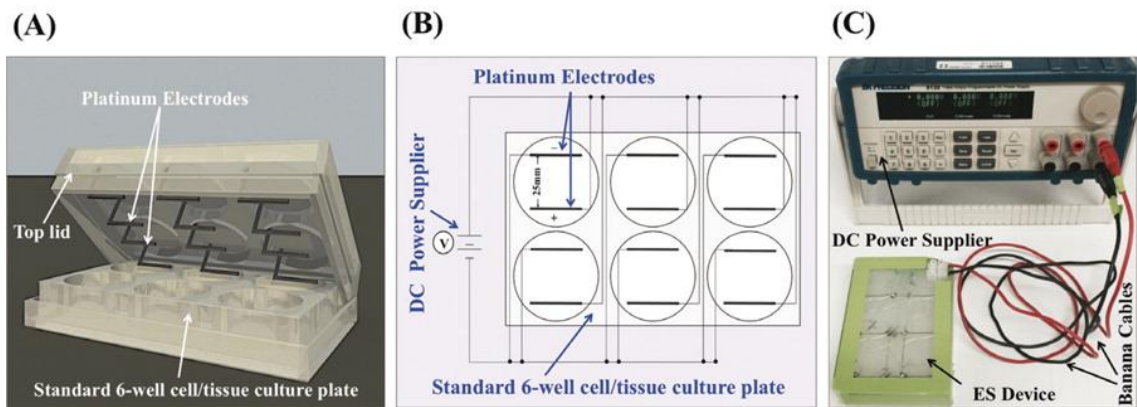
Příloha 1 Proces elektrického zvlákňování (Rahmati et al. 2021)

Příloha B Různé typy stimulací



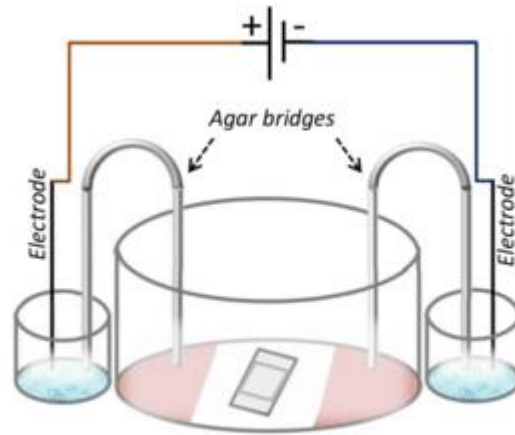
Příloha 2 A – přímé spojení, B – kapacitní spojení, C – indukční vazba (Ryan et al. 2021)

Příloha C Stimulace 6komorové stimulační kultivační destičky



Příloha 3 Stimulace 6komorové kultivační destičky stejnosměrným zdrojem (Mobini et al. 2018)

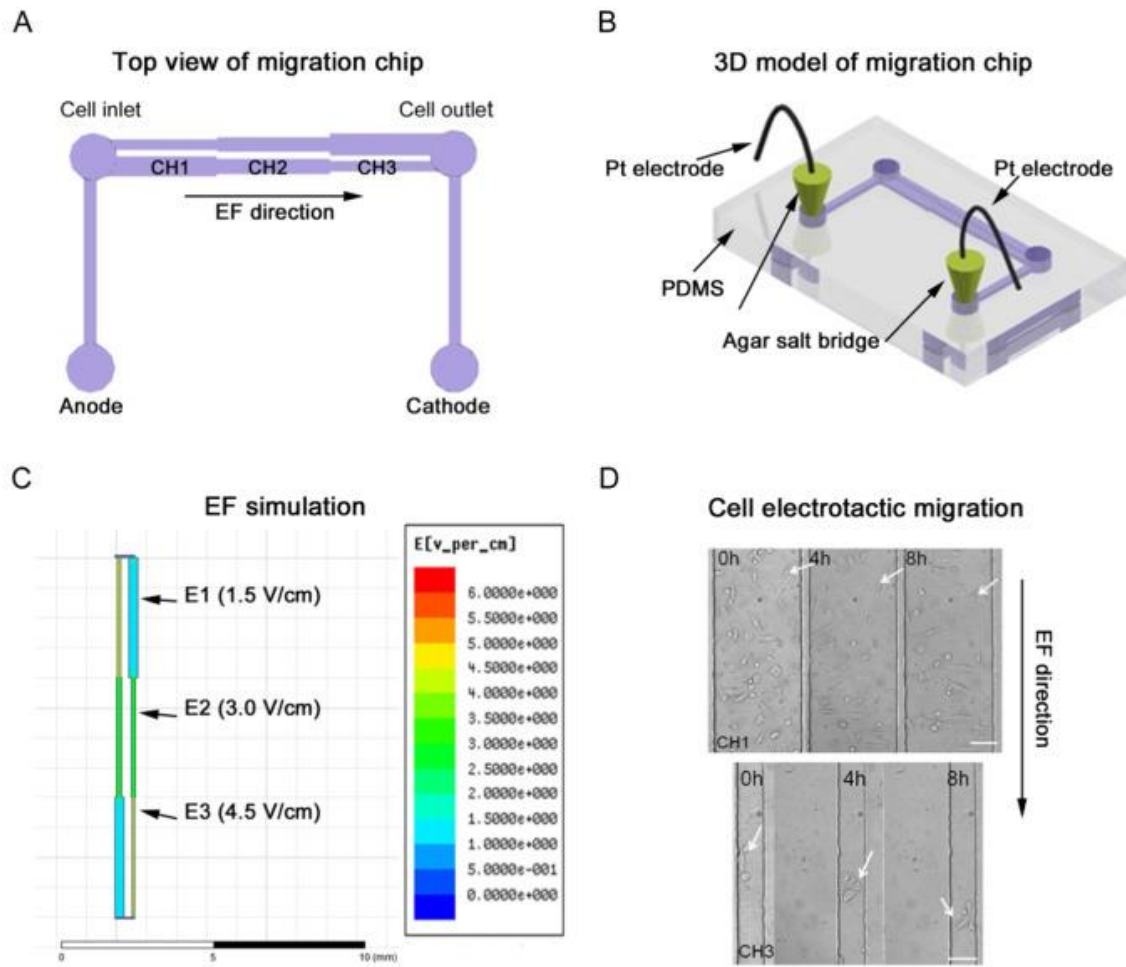
Příloha D Sestava s Agarovými mosty



B Salt Bridge ESTim Chamber

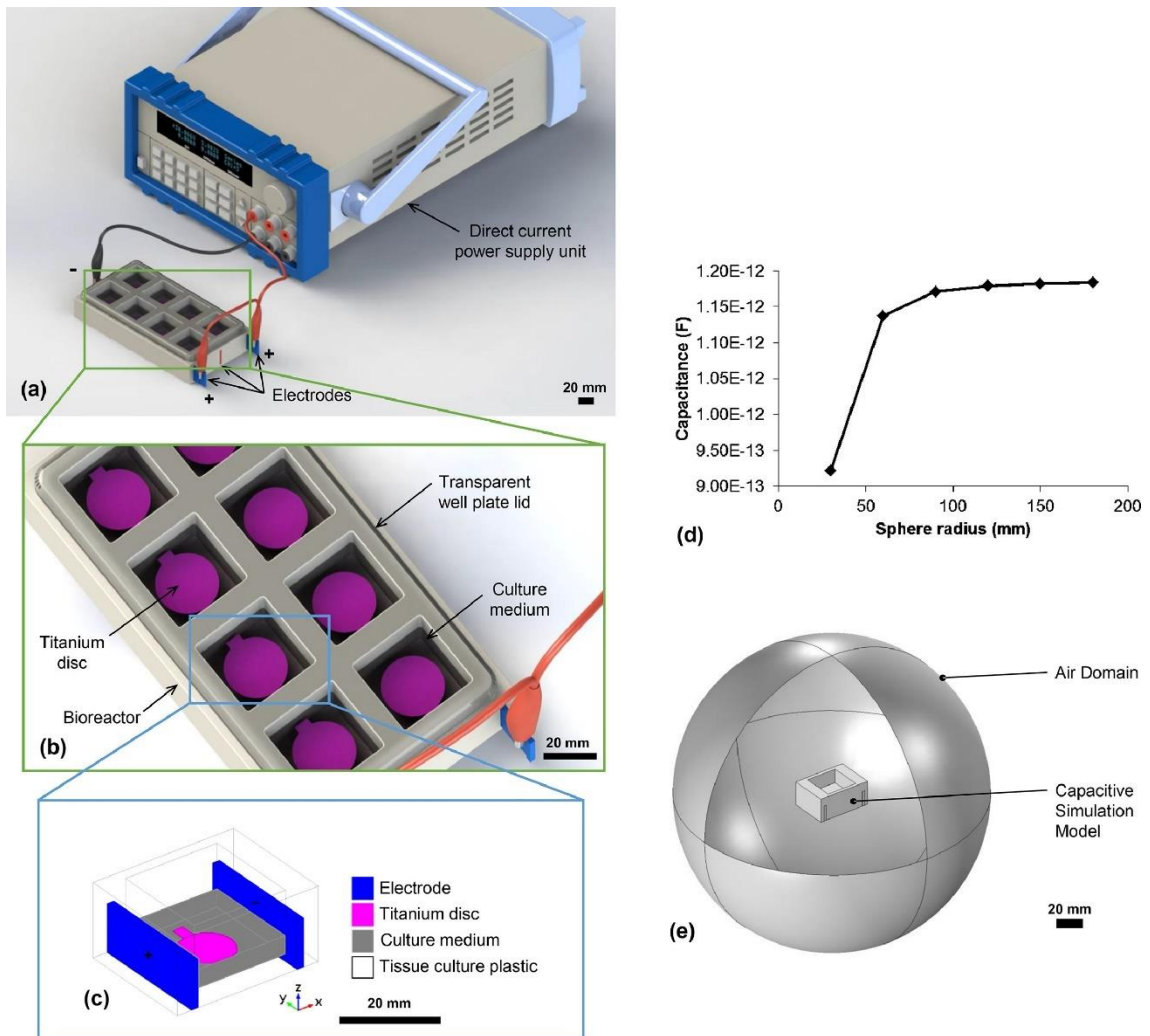
Příloha 4 Sestava s Agarovými mosty (Leppik et al. 2020)

Příloha E Mikrofluidní zařízení se třemi kanály



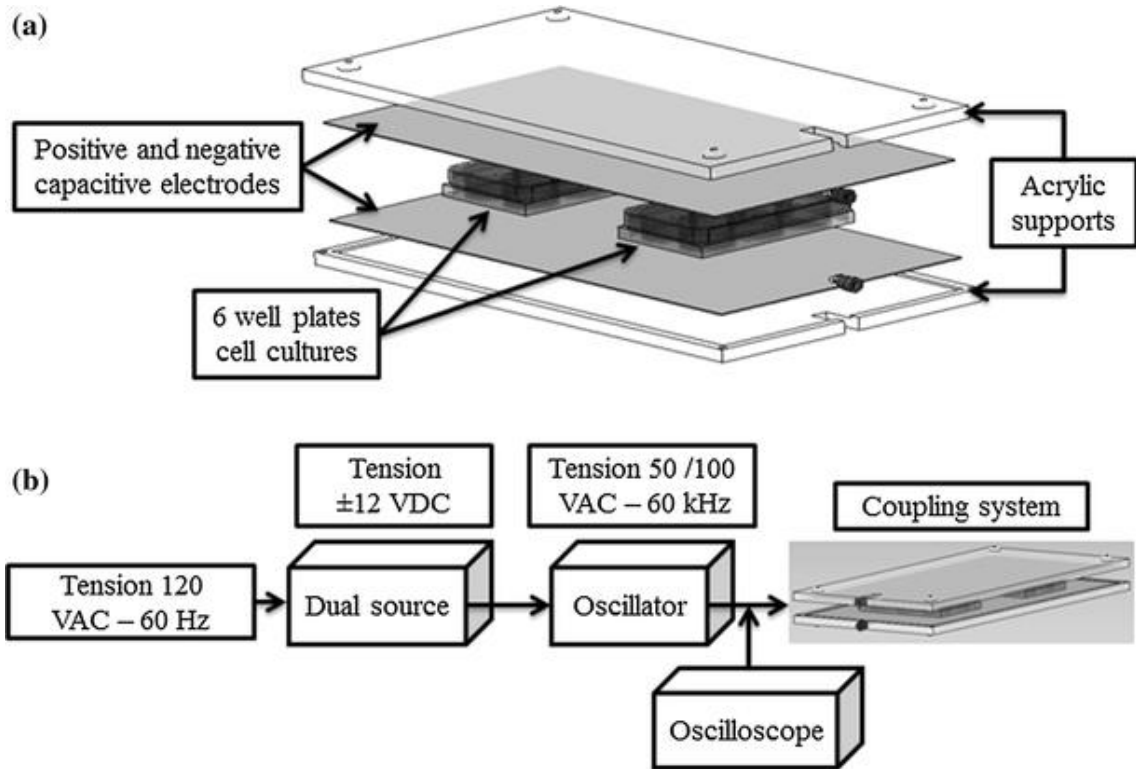
Příloha 5 Mikrofluidní zařízení se třemi kanály (Li et al. 2017a)

Příloha F Stimulace s titanovými kultivačními disky



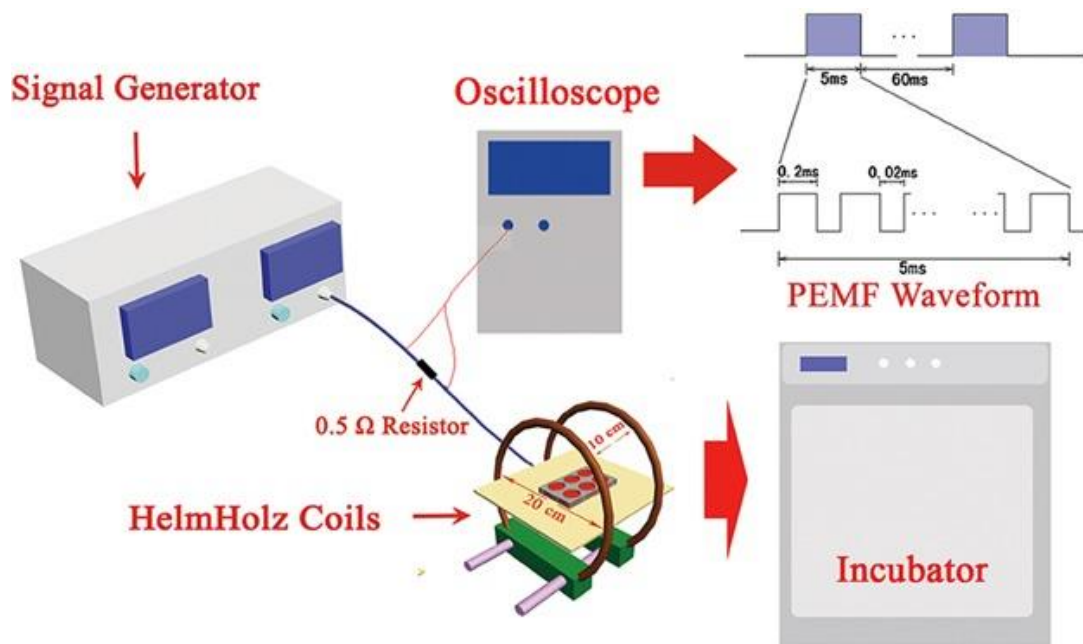
Příloha 6 Stimulace s titanovými kultivačními disky (Khaw et al. 2022)

Příloha G Sestava kapacitní vazby s 6komorovou kultivační destičkou



Příloha 7 Sestava kapacitní vazby s 6komorovou kultivační destičkou (Vaca-González et al. 2016)

Příloha H Sestava indukční vazby s Helmholtzovými cívkami



Příloha 8 Sestava indukční vazby s Helmholtzovými cívkami (Zhai et al. 2016)

Příloha I Naměřená data ze spektrofotometru

PC	0,672	0,656	0,65	0,645	0,641	0,644	0,646	0,653	0,648	0,647	0,654	0,701
NC	4,555	4,878	4,75	4,793	4,293	4,473	4,148	4,317	4,323	2,782	4,174	4,408
TiI – OO	4,931	4,642	4,95	4,644	4,63	5,012	4,619	4,345	4,323	4,646	4,777	4,887
TiI – OO	4,958	4,916	5,03	4,818	4,711	4,997	5,207	4,699	5,044	4,588	4,901	4,878
TiI	5,002	5,163	5,5	5,087	5,02	4,876	4,678	4,991	4,229	4,891	4,607	4,305
TiI	5,137	5,014	5,08	4,824	4,826	4,095	3,755	3,631	4,243	3,942	4,737	4,307

Příloha 9 Naměřená data ze spektrofotometru (Zdroj: autor)

Příloha J Obsah přiloženého CD

Text bakalářské práce

- bakalarska_prace_2022_Tomas_Krajdl.pdf