



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**POROVNÁNÍ RŮZNÝCH METOD AMINACE
POLYKAPROLAKTONU Z HLEDISKA JEJICH
EFEKTIVNOSTI PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ**

COMPARISON OF VARIOUS AMINATION METHODS OF POLYCAPROLACTONE CONCERNING THEIR
EFFECTIVITY IN TISSUE ENGINEERING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ján Kováč

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1395/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Ján Kováč**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Porovnání různých metod aminace polykaprolaktonu z hlediska jejich efektivnosti pro tkáňové inženýrství

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je aminace membrán z polykaprolaktonových (PCL) nanovláken vhodnými dostupnými metodami (chemickými, plazmochemickými či hybridními). Připravené vzorky budou charakterizovány z hlediska chemické struktury, morfologie, smáčivosti a stability. Vybrané membrány budou následně použity pro kultivaci buněk za účelem vyhodnocení jejich biokompatibility a možnosti využití v tkáňovém inženýrství.

1. Připravte polykaprolaktonová nanovlákná metodou elektrostatického zvlákňování.
2. Udělejte literární rešerši metod aminace polymerů s důrazem na popsání různých typů (chemické, plazmochemické, hybridní), vyberte vhodné metody s ohledem na použití nanovláken v tkáňovém inženýrství a tyto metody aplikujte.
3. Charakterizujte vlastnosti a stabilitu upravených povrchů vhodnými fyzikálními metodami z hlediska chemické struktury, morfologie a smáčivosti.
4. Seznamte se s postupem kultivace buněk a tyto znalosti aplikujte pro vybrané upravené membrány polykaprolaktonových nanovláken.
5. Testované metody aminace zhodnoťte z hlediska jejich možného využití pro přípravu nanovláčenného scaffoldu v tkáňovém inženýrství.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Ján Kováč
student(ka)

doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberala porovnaním rôznych metód aminácie polykaprolaktónu z hľadiska ich efektívnosti pre tkanivové inžinierstvo. Pripravená bola polykaprolaktónová membrána, pomocou metódy elektrostatického zvlákňovania, ktorá bola následne modifikovaná tromi rôznymi metódami aminácie. Vybranými typmi aminácie bola plazmová polymerizácia s monomérom cyklopropylamínom, hybridná modifikácia využívajúca plazmu a monomér N-allylmethylamín a chemická aminácia využívajúca aminolýzu za pomoci diaminohexánu. Aminácie povrchu boli následne charakterizované pomocou elektrónovej skenovacej mikroskopie (SEM), röntgenovej fotoelektrónovej spektroskopie (XPS), infračervenej spektroskopie s technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR-FTIR) a meraním kontaktného uhlu. Na takto modifikovaných membránach bola kultivovaná bunková kultúra s označením A375 (Human malignant melanoma cell lines A375® CRL-1619™), ktorá bola analyzovaná pomocou optickej mikroskopie a previedol sa proliferáčny test, ktorý bol realizovaný pomocou stanovenia relatívneho množstva ATP. Na základe experimentálnych výsledkov môžeme potvrdiť úspešnosť pre všetky typy aminácie. Z hľadiska efektivity pre tkanivové inžinierstvo má najuspokojivejšie výsledky metóda aminácie pomocou plazmovej polymerizácie s monomérom cyklopropylamínom.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Tkanivové inžinierstvo, polykaprolaktón, aminácia, plazmová polymerizácia, aminolýza, bunky malígneho melanómu A375

ABSTRACT

This diploma thesis dealt with the comparison of different methods of amination of polycaprolactone in terms of their effectiveness for tissue engineering. A polycaprolactone membrane was prepared by an electrospinning method, which was subsequently modified by three different amination methods. Selected types of amination were plasma polymerization with cyclopropylamine monomer, hybrid modification using plasma and N-allylmethylamine monomer, and chemical amination using aminolysis with diaminohexane. Surface amines were subsequently characterized by electron scanning microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and contact angle measurement. A cell culture designated A375 (Human malignant melanoma cell lines A375® CRL-1619®) was cultured on the thus modified membranes, which was analyzed by optical microscopy, and a proliferation assay was performed by determining the relative amount of ATP. Based on the experimental results, we can confirm the success for all types of amination. In terms of efficiency for tissue engineering, the amination method by plasma polymerization with the monomer cyclopropylamine has the most satisfactory results.

KEY WORDS

Tissue engineering, polycaprolactone, amination, plasma polymerization, aminolysis, human malignant melanoma A375 cells

KOVÁČ, Ján. *Porovnání různých metod aminace polykaprolaktonu z hlediska jejich efektivnosti pro tkáňové inženýrství*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123836>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Zajíčková.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne, a že všetky použité literárne zdroje sú riadne uvedené v zozname použitých zdrojov a správne odcitované. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len s povolením vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Najväčšie poďakovanie patrí predovšetkým vedúcej mojej diplomovej práce, doc. Mgr. Lenke Zajíčkovej, Ph.D. za ochotu, prístup a trpezlivosť pri vypracovaní práce. Ďalej by som rád poďakoval Ing. Lucii Blahovej, Ph.D. za rady a pomoc pri vypracovaní diplomovej práce. Taktiež ďakujem za to, že mohla byť časť tejto práce prevedená za podpory výskumnej infraštruktúry CzechNanoLab (ID LM2018110, MŠMT, 2020-2022), CIETEC Vysoké učení technické v Brně. Nakoniec by som rád poďakoval svojej rodine a priateľom, ktorí prejavili veľkú podporu počas celej doby môjho štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Biokompatibilita.....	9
2.1.1	Vlastnosti ovplyvňujúce biokompatibilitu materiálu	9
2.2	Biomateriál	13
2.2.1	Polykaprolaktón	15
2.3	Plazma a jej aplikácie pre modifikáciu povrchov	16
2.3.1	Kritéria plazmy.....	16
2.3.2	Generácia plazmy pomocou elektrického výboja	17
2.3.3	Procesy v plazme.....	20
2.4	Aminácia povrchov	22
2.5	Metódy charakteristiky povrchov a tenkých vrstiev	26
2.5.1	Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM).....	26
2.5.2	Infračervená spektroskopia (IČ).....	28
2.5.3	Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia (XPS).....	30
2.5.4	Kontaktný uhol.....	31
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	33
3.1	Príprava nanovlákien.....	33
3.2	Modifikácia pripravených nanovlákien.....	37
3.2.1	Modifikácia pomocou plazmovej polymerizácie	37
3.2.2	Modifikácia hybridnou stratégiou využívajúcou plazmu.....	38
3.2.3	Modifikácia chemickou cestou.....	42
3.3	Analýza modifikovaných nanovlákien.....	43
3.4	Kultivácia a následná analýza viability a proliferácie buniek.....	45
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	51
5	ZÁVER	65
6	ZOZNAM POUŽÍTEJ LITERATÚRY	66
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	73

1 ÚVOD

S evolúciou ľudskej civilizácie sa postupne vyvinula i oblasť biomateriálov, ktorá dnes zahŕňa rôzne materiály v celom spektre rozmerov od nano až po makro, s jednoduchým zameraním na predĺženie a zlepšenie ľudskeho života. Už viac ako pred tisíc rokmi sa používalo striebro v rôznych formách, ako antibakteriálny prostriedok, avšak najvýznamnejší vývoj v oblasti biomateriálov nastal v posledných sto rokoch. Za posledných šesťdesiat rokov umelé kĺby zlepšili kvalitu života mnohých ľudí, resorbovateľné stehy zjednodušili chirurgické zákroky a rôzne kardiovaskulárne prípravky zachránili milióny životov. [1].

Esenciálnou vlastnosťou biomateriálu je biokompatibilita, a tá je podmienená topografiou, mechanickými a chemickými vlastnosťami povrchu materiálu. Pre dosiahnutie lepšej biokompatibility sa povrch biomateriálu modifikuje. Jednou z ciest, ako modifikovať povrch je uviesť naň funkčné skupiny, ako napríklad aminové.

Táto práca sa venuje porovnaniu metód aminácii nanovlákennej membrány z alifatického biopolyméru polykaprolaktónu. Ten je vďaka svojim vlastnostiam čoraz populárnejší pre medicínske aplikácie, napríklad ako potenciálny materiál v tkanivovom inžinierstve [2]. Po biofunkcionalizácii aminovými skupinami je schopný zlepšiť adhéziu, proliferáciu a diferenciáciu buniek na svojom povrchu. Takto modifikovaný má potenciál, napríklad v boji s neurodegeneratívnymi ochoreniami, kedy môže slúžiť, ako nosič kmeňových buniek, ktoré sa na ňom môžu diferencovať a nahradiť poškodené časti mozgu [3].

V rámci práce bola najprv optimalizovaná príprava polykaprolaktónovej nanovlákennej membrány pomocou metódy bezhlového elektrostatického zvlákňovania. Pripravené nanovlákná boli následne modifikované

Z dostupných metód aminácie sú v práci využité tri odlišné reprezentatívne metódy. Plazmatický prístup využívajúci plazmovú polymerizáciu cyklopropylamínu, ako nástroj k úspešnej aminácii polykaprolaktónových nanovláken [4]. Hybridný fyzikálno-chemický prístup, využívajúci výboj v atmosfére vzduchu, ako zložku pre aktiváciu povrchu v kombinácii s chemickým prístupom. Po aktivácii sú na povrchu prítomné radikály schopné reagovať s parami N-allylmethylamínu, čo vedie k modifikácii povrchu [5]. Tretia je chemická metóda aminácie povrchov využívajúca aminolýzu polykaprolaktónu pomocou diaminohexánu za účelom biofunkcionalizácie nanovlákennej membrány [6].

Následne mohla byť analyzovaná efektívnosť modifikácie jednotlivých metód. Využité k tomu boli spektrálne aj nespektrálne metódy. Modifikované vlákna boli analyzované röntgenovou fotoelektrónovou spektroskopiou (XPS), infračervenou spektroskopiou s technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR-FTIR), skenovacíou elektrónovou mikroskopiou (SEM), meraný bol tiež kontaktný uhol a zrnitosť.

V poslednej časti práce bola na vláknach kultivovaná bunková kultúra A375 (Human malignant melanoma cell lines A375® CRL-1619™). Bunková kultúra bola analyzovaná pomocou optickej mikroskopie a previedol sa proliferačný test, ktorý bol realizovaný pomocou stanovenia relatívneho množstva ATP. Konkrétnym cieľom práce je porovnanie efektivity rôznych metód aminácie polykaprolaktónovej membrány s potenciálom pre tkanivové inžinierstvo.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

V súčasnosti je jedným z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich odvetví medicíny tkanivové inžinierstvo. Jedná sa o veľmi zaujímavý interdisciplinárny obor, ktorý sa zaoberá prípravou funkčnej náhrady orgánu, alebo tkaniva. K svojej realizácii využíva biomateriálne nosiče (z angl. scaffold), ktoré determinujú jeho funkčnosť. Cieľom tkanivového inžinierstva je vývoj funkčného biomateriálneho nosiča, konštruktu, ktorý bude podporovať proliferáciu a diferenciaciu, buď sa účelom náhrady, alebo regenerácie tkaniva, a to *ex vivo* (mimo živého – skúmanie tkaniva, alebo časti organizmu oddeleného od celku), *in vivo* (v prirodzenom prostredí), alebo *in vitro* („v skúmavke“ – skúmanie tkaniva, alebo časti organizmu v umelých lab. podmienkach). Pre optimálny vývoj tkaniva by mal takýto nosič interagovať s bunkou, poskytnúť jej podmienky pre adhéziu, proliferáciu a rast bez nežiadúcich vedľajších reakcií. Popri esenciálnom by mal poskytnúť aj štruktúrnu oporu a dizajn podobný prírodnej extracelulárnej matici [7], [8].

Jednoduchý syntetický biomateriál môže poskytnúť potrebné mechanické a fyzikálne vlastnosti, avšak nedostatok biomimetických vlastností a absencia interakcie s bunkami zostávajú problematické, pre podporu funkčnej tvorby tkanív. Preto je povrchová funkcionalizácia a vhodná morfológia použitého biomateriálu kritická. Jedným z najdôležitejších faktorov pre aplikáciu materiálu v tkanivovom inžinierstve je jeho biokompatibilita [8].

2.1 Biokompatibilita

V tkanivovom inžinierstve je biokompatibilita esenciálna vlastnosť biomateriálu neindukovať nadmernú imunitnú zápalovú, fibrogénnu, alebo trombogénnu odpoveď, neuvoľňovať fragmenty častíc, alebo toxické chemikálie do organizmu a nenarušovať susediacu anatomickú štruktúru [9].

Podľa slovníku je definovaná, ako relatívna schopnosť neorganického materiálu interagovať pozitívne s biologickým systémom. Stupeň biokompatibility je závislý od chemickej stability materiálu v čase, tendencie podnecovať chorobu, spôsobovať zápal, alebo stať sa karcinogénnym.

Biokompatibilita materiálu podmieňuje jeho biofunkčnosť, ktorú môžeme popísať, ako schopnosť implantátu vykonávať okamžite a dobre konkrétnu funkciu v časti tela, ktorá ním bola nahradená [9].

Ak budeme uvažovať biologickú kompatibilitu medicínskych pomôcok, musíme brať do úvahy základné mediátory klinického výkonu. Sú tri, v nasledujúcom poradí.

- Kvalita prevedenia operačného zákroku.
- Charakteristika samotného pacienta.
- Inherentná biokompatibilita materiálu samotného.

Biokompatibilita má rôzne úrovne a celkovo je jej riešenie komplexné .

2.1.1 Vlastnosti ovplyvňujúce biokompatibilitu materiálu

Biokompatibilitu ovplyvňujú najmä vlastnosti jej vrchnej vrstvy, tam kde nie sú všetky väzby uzavreté, kde rôzne funkčné skupiny vystupujú z vrstvy. Vzhľadom na toto všetko má často povrchová vrstva značne odlišné vlastnosti od vnútorných, objemových vlastností materiálu. Všetky tieto vlastnosti sa prepájajú v chémii, v štruktúre a spracovaní materiálu. Príkladom

môže byť uhlík, ktorý je známi tým, že má veľmi odlišné vlastnosti v závislosti od jeho prepojenia do rôznych štruktúr [10].

Vlastnosti povrchu biomateriálu hrajú esenciálnu úlohu v reakcii cudzieho telesa v tele v prvých dvoch až štyroch týždňoch nasledujúcich po implantácii. Cudzí materiál implantovaný do živého organizmu s ním nie je vždy kompatibilný. Skutočne kompatibilné sú len látky, ktoré živý organizmus sám „vyprodukuje“, alebo vylúči, sú teda telu vlastné - autogénne. Snahou je vytvoriť, alebo zvoliť materiál len s minimálnou negatívnou biologickou odpoveďou [11].

Implantovaný materiál spôsobí fyzikálnu, chemickú, alebo biologickú zmenu v tkanive, alebo fyziologickom roztoku, následkom ktorej môže byť negatívna odozva v podobe alergickej reakcie, bolesti, zlyhania, či straty orgánu, končatiny, alebo až pacientova smrť. Preto je vždy veľmi dôležité brať do úvahy dve roviny týkajúce sa implantovaného materiálu.

- Vplyv biologického prostredia na materiál.
- Vplyv materiálu na biologické prostredie [11].

Niektoré reakcie tela na biomateriál môžu mať len dočasné trvanie, alebo len makroskopickú povahu. Medzi najčastejšie odpovede organizmu patrí imunologická odpoveď, fagocytóza, absces, alebo zápal[11].

Zmäčavosť povrchu materiálu

Zmäčavosť je to problematika, ktorou sa často zaoberajú v technických a prírodných vedách, ale známa je už z histórie. Zmäčavosť je vlastne mierou priľahovania/odpuďzovania dvoch rôznych látok. Definuje sa pomocou kontaktného uhlu, ktorý vzniká pri kontakte povrchu s kvapkou kvapaliny, kontaktný uhol je bližšie vysvetlený v sekcii 2.5.4. Pre kontaktný uhol menší, ako 90° platí, že povrch je hydrofilný, a teda sa zmáča. Ak je kontaktný uhol väčší ako 90° , tak je povrch hydrofóbny a teda nezmáčavý.

Pre kultiváciu buniek je najvhodnejšie, aby bol povrch, hydrofóbny, ale len v určitej miere, ak je povrch príliš hydrofilný, tak nedochádza k adsorpcii, alebo len veľmi slabo [10]. Pri povrchoch, ktoré sa zmáčajú, je vyššia adhérenca buniek, dochádza k lepšiemu rastu buniek [12]. Keď príde nosičový systém do kontaktu s bunkovou kultúrou, alebo telesnými tekutinami, tak sa najprv absorbujú molekuly vody nasledované adsorpciou proteínov a bunkovou adhéziou. Prítomnosť molekúl vody môže hrať pilotnú úlohu v sprostredkovaní biochemických reakcii medzi bunkou a materiálom. [13]

Zloženie materiálu

Biokompatibilita materiálu, a s ňou spojená vitalita buniek je ovplyvňovaná zložením materiálu, a s tým súvisia funkčné skupiny na povrchu. Pre bunkovú adhéziu sú vhodné kladne nabité funkčné skupiny, napríklad amíny. Adhéziu môžu obmedziť záporne nabité skupiny, ako sú napríklad sulfonáty. Náboj funkčných skupín na povrchu materiálu ovplyvňuje zmáčanlivosť.

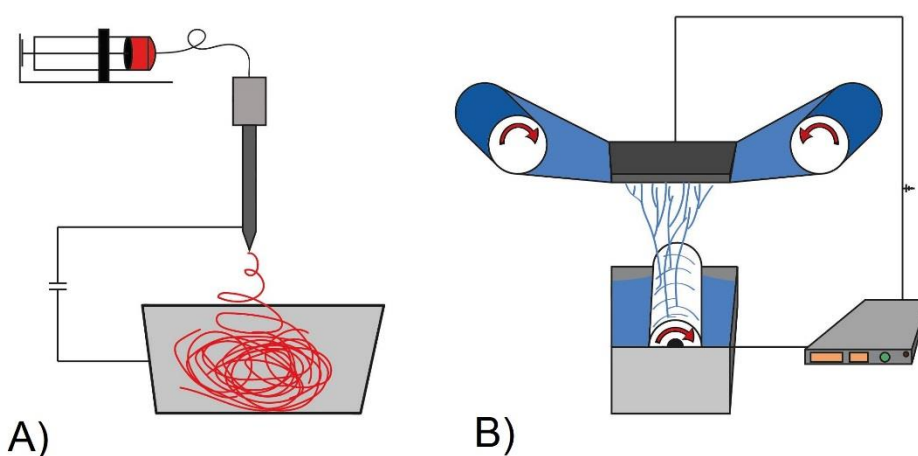
Pre prácu s bunkami a tkanivami, vyberáme také materiály, ktoré pri dlhodobom vystavení vodnému prostrediu neuvolňujú cytotoxické látky do roztoku. Príkladom môžu byť biopolymérne látky, u ktorých dochádza k uvoľneniu oxidu dusnatého.

Morfológia materiálu

Vlákná extracelulárnej matrice (ECM, z angl. extracellular matrix), ako napríklad kolagén elastín a keratín poskytujú biologickú a fyzickú podporu pri adhézii, proliferácii a diferenciácii buniek. Vlákna extracelulárnej matrice sú preto dôležitou súčasťou pri regenerácii tkanív a orgánov. Stratégie v tkanivovom inžinierstve využívajúce vláknité štruktúry sa pokúšajú naplniť úlohu vlákien v prírodnom tkanive. Vlákna pripravené v tkanivovom inžinierstve môžu dodávať mechanickú a štruktúrnú oporu na prichytenie buniek rovnako, ako extracelulárna matrica, avšak musia mať potrebné povrchové vlastnosti, aby túto úlohu mohli plniť. Vláknité štruktúry môžu byť vyrobené z rôznych materiálov a rôznym spôsobom, obrovský potenciál v tomto smere, v regeneratívnej medicíne, majú polymérne vlákna. Polymérny nanovláknenný skafold môže byť navrhnutý tak, aby predvídateľne moduloval bunkové správanie k požadovanej celkovej funkcii. Táto univerzálnosť polymérnych vlákien na funkcionalizáciu, im dáva obrovské možnosti pri navrhovaní skafoldov a inkorporácii buniek [14]. Potom môžu slúžiť v tkanivovom inžinierstve k regenerovaniu kostí chrupaviek, cievneho, nervového tkaniva, alebo iných [15].

Elektrostatické zvlákňovanie

Elektrostatické zvlákňovanie (z angl. electrospinning) je spôsob prípravy polymérnych nanovláknien. Nanovlákná sú tvorené z roztoku, alebo taveniny tekutého polyméru, ktorá sa privádza kapilárou do oblasti, kde je elektrické pole s vysokým napätím. Zdroj vysokého napätia v rozsahu kilovoltov sa pripojí ku kapilárnemu hrotu. Keď elektrostatické sily prekonajú povrchové napätie kvapaliny, v našom prípade roztok polyméru, vytvorí sa Taylorov kužeľ a tenký prúd kvapaliny, polymérneho roztoku sa urýchľuje na opačne nabitý, alebo uzemnený kolektor. Nestability v tomto prúde spôsobujú pohyby podobné biču, ktoré predlžujú a riedia prúd, čo umožní odparenie časti rozpúšťadla, alebo ochladenie taveniny za vzniku pevných nanovláknien (Obrázok 1 A). Hrúbka a štruktúra nanovláknien sa dajú riadiť procesnými parametrami, ako je viskozita a koncentrácia roztoku, vkladané napätie a vzdialenosť kapiláry a kolektora. Takto pripravené nanovlákná sa zbierajú ako náhodné, alebo jednoosovo zarovnané listy, prípadne polia [14].



Obrázok 1: A)-Elektrostatické zvlákňovanie s využitím ihly, B)-Bezihlové elektrostatické zvlákňovanie.

Okrem vyššie uvedeného elektrostatického ihlového zvlákňovania, existuje aj bezihlové elektrostatické zvlákňovanie, ako je ukazuje Obrázok 1 B). Pri bezihlovom, alebo aj valcovom elektrostatickom zvlákňovaní je roztok polyméru, prípadne taveniny elektrostaticky odstredenej z povrchu rotujúceho valca. Valec je čiastočne ponorený do nádrže obsahujúcej materiál na elektrostatické zvlákňovanie a rotuje, takto je na povrchu valca vrstva stále čerstvého materiálu. Medzi valec a kolektor je vložné elektrické pole s vysokým napätím. Na povrchu valca sa identickým princípom, ako pri ihlovom elektrostatickom zvlákňovaní vytvorí veľa Taylorových kuželov, čo tento proces robí vysoko produktívnym. Technika je mechanicky jednoduchšia oproti ihlovému prístupu, no proces ako taký je komplexnejší. Takto pripravené vlákna sú nanášané na povrch pohyblivého, rotujúceho, alebo statického materiálu [16], [17].

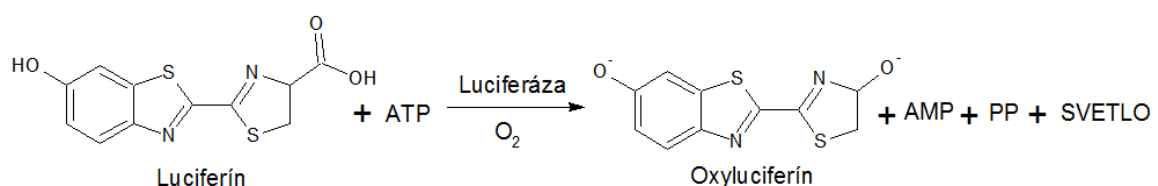
V tejto práci je použitá táto technológia Nanospider™, ktorú vyvinula Technická univerzita v liberci v spolupráci so spoločnosťou Elmarco, vychádzalo sa z literatúry [18], [19], [20].

Testovanie biokompatibility materiálov

Testovanie biokompatibilných materiálov je pomerne komplexná problematika, a hodnotí sa prípad od prípadu, za pomoci laboratórnych testov. Zaujímá nás hlavne odpoveď buniek, alebo tkaniva na biomateriál, testuje sa buď *in vitro*, alebo *in vivo*.

Pre identifikáciu a testy biokompatibilných materiálov sa všeobecne používajú ISO a FDA normy. Testovanie bunkovej toxicity *in vitro* je napríklad zahrnuté v ISO norme 10993-5:2009 „Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity“ [21]. Norma ISO 10993-6: 2016 „Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation“ [22], slúži k špecifikácii testovacích metód na hodnotenie lokálnych účinkov po implantácii biomateriálov určených na použitie v zdravotníckych pomôckach. Akreditácia na testovanie biokompatibility pre laboratória je obsiahnuté v norme ISO/IEC 17025: 2017 „General requirements for the competence of testing and calibration laboratories“ [23]

Okrem vyššie spomenutých noriem sa v laboratórnych podmienkach bežne využíva testovanie proliferácie pomocou bioluminiscencie. Tento proces, ktorý je vlastne prírodnou formou chemiluminiscencie využíva prítomnosť adenosín trifosfátu (ATP). Nukleotid ATP má centrálnu úlohu vo výmene energie v biologických systémoch. Slúži, ako okamžitý zdroj energie pre všetky metabolické aktivity bunky, všetky bunky potrebujú ATP, aby ostali na živé a mohli vykonávať svoje funkcie. Meranie ATP je preto fundamentálne ak chceme študovať živé procesy, resp proliferáciu buniek. Prítomnosť ATP sa dá merať pomocou bioluminiscencie, ktorej schému zobrazuje Obrázok 2. Množstvo ATP je potom nepriamym indikátorom miery proliferácie buniek.



Obrázok 2: Schéma bioluminiscencie

MgATP²⁻ konvertuje substrát, luciferín do formy ktorá je schopná byť katalyticky oxidovaná enzýmom, luciferázou pri chemiluminiscenčnej reakcii s vysokým výťažkom svetla. Za ideálnych podmienok je intenzita svetla úmerná koncentrácii ATP [24], [25].

2.2 Biomateriál

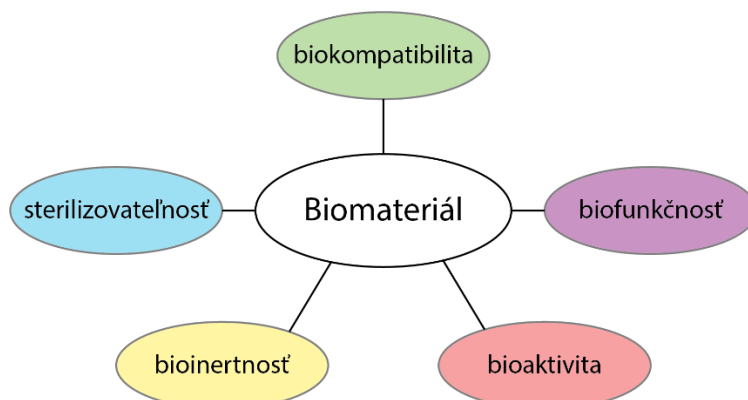
Syntetický, alebo prírodný materiál, ktorý interaguje s biologickým systémom sa nazýva biomateriál. Slovník tento materiál definuje:

- 1) Ako akýkoľvek syntetický materiál, alebo zariadenie, napríklad implantát, alebo protézu, navrhnuté na liečenie, posilnenie, alebo nahradenie za starnúci, nefunkčný, kozmeticky neakceptovateľný orgán, tkanivo, alebo funkciu v tele.
- 2) Ako prirodzený materiál používaný kvôli svojim štruktúrnym, nie biologickým, vlastnostiam, napríklad kolagén v kozmetike, uhl'ohydráty modifikované pre biomedicínske aplikácie, alebo ako objemové činidlá pri výrobe potravín.

Popri všetkých rôznych vlastnostiach materiálov, sú pre biomateriály najdôležitejšie chemické, fyzikálne, mechanické a biologické vlastnosti vo vzťahu k ich povrchovej, ale aj k vnútornej štruktúre.

- Chemické vlastnosti sa zaoberajú zložením väzieb, atómovou štruktúrou.
- Fyzikálne vlastnosti sa zaoberajú mikroštruktúrou, fázami, hustotou a rôznymi typmi pórovitosti.
- Mechanické sa zaoberajú silou a húževnatosťou materiálov spolu s ich tvrdosťou, riešia rôzne mechanizmy poškodenia a opotrebenia materiálu.
- Biologické vlastnosti sa zase zaoberajú tým, ako sa materiály správajú v biologickom prostredí, ak je biologické prostredie vytvorené na Petriho miske, tak hovoríme o *in vitro* vlastnostiach, ak biologické vlastnosti sledujeme priamo v živom organizme, v tele živočicha, alebo človeka, hovoríme o *in vivo* biologických vlastnostiach.

Biomateriál musí spĺňať viacero kritérií (viď Obrázok 3), okrem iného musí byť biokompatibilný a bioadaptabilný, teda správa sa prijateľne na všetkých úrovniach, tak ako na bunkovej úrovni, tak aj na úrovni systému. Ďalej by mal vyvolávať zodpovedajúcu reakciu u hostiteľa, a byť schopný vykonávať zmysľanú funkciu, špecifickú aplikáciu bez prítomnosti nežiadúcich reakcií. K porozumeniu problematiky biomateriálov vedie jedinečné multidisciplinárne riešenie na hranici medzi chémiou, biochémiou, biológiou, medicínou, fyzikou, materiálovými vedami, mechanickými vedami, ale aj elektrotechnickými vedami [26].



Obrázok 3: Vlastnosti biomateriálu

Biomateriály možno v jednoduchosti rozdeliť do štyroch základných skupín, ktoré samostatne, alebo svojím prekrytím, popisujú všetky známe biomateriály.

Kovové biomateriály

Najčastejšie sú kovy využívané v dentálnych a ortopedických aplikáciách, najmä vďaka ich trvanlivosti, pevnosti, vysokej mechanickej odolnosti voči opotrebeniu a nárazom. Hojne sa využívajú v konštrukcii medicínskych nástrojov a zariadení. Ich nedostatkom je však vysoká hodnota Youngovho modulu pružnosti voči ľudskej kosti, ale hlavne by mohli podľahnúť korózii pri kontakte s fyziologickým prostredím. Preto sú najčastejšie využívané kovy titán a jeho zliatiny, nehrdzavejúce ocele a zliatiny Co-Cr [12].

Keramické biomateriály

Keramické biomateriály sa často využívajú v dentálnych aplikáciách, v tvrdých tkanivách k opravám, rozširovaniu a regenerácii tkaniva. Využitie nájdú tiež obdobne, ako kovové biomateriály, pri výrobe medicínskych nástrojov a zariadení. K týmto aplikáciám ich predurčuje ich vysoká stálosť, a veľmi dobrá biokompatibilita. Ich nevýhodou je však veľmi nízka elasticita, pevnosť a pružnosť a vysoká krehkosť. Medzi najznámejšie patrí fosforečnan vápenatý ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), oxid zirkoničitý (ZrO_2), alebo alumina (Al_2O_3) [11].

Kompozitné biomateriály

Kompozitné materiály sa získavajú kombináciou minimálne dvoch zložiek. Ide o materiály kombinujúce najvhodnejšie vlastnosti polymérnych, kovových, keramických a iných biomateriálov. Pri kompozitných biomateriáloch je charakteristický synregizmus, čiže súčin vlastností materiálov obsiahnutých v kompozite. Navrhujú sa pre konkrétnu aplikáciu, väčšinou nemajú univerzálne využitie. Existuje ich celé spektrum, odlišujú sa charakterom matrice, ale aj typom výstuže. Hlavnou výhodou je kombinácia vlastností materiálov obsiahnutých v kompozite, vysoká miera biokompatibility, pevnosť a značná odolnosť voči korózii v kontakte s fyziologickým prostredím. Uplatňujú sa skoro vo všetkých odvetviach medicíny [12].

Polymérne biomateriály

Polyméry sú umelé, ako napríklad silikónová guma, nylon, polyester (PES), polytetrafluoroetylen (PTFE), polyvinylchlorid (PVC), alebo prírodné, ako kolagén, celulóza. Vyznačujú sa pružnosťou a húževnatosťou, avšak majú nízku pevnosť, deformujú a degradujú sa v čase. Sú často využívané, ako súčasť implantátov, v aplikáciách pre mäkké a tvrdé tkanivá, v doručovacích systémov pre aplikáciu liekov. Sú schopné biointegrácie, teda k previazaniu prírodného a umelého tkaniva. V medicíne nachádzajú využitie ako katétry, srdcečné chlopne, chirurgické nite, kĺbne jamky a náhrady chrupaviek, väzov a šliach, ale aj ako súčasť niektorých nástrojov [12]. V tejto práci je venovaná pozornosť polymérnemu biomateriálu polykaprolaktónu.

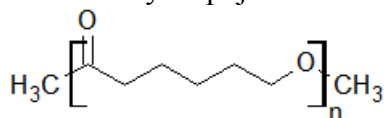
2.2.1 Polykaprolaktón

Biodegradovateľný, semikryštalický polyester s nízkou teplotou skleneného prechodu $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotou topenia v rozmedzí od 59 po $64\text{ }^{\circ}\text{C}$. S molekulárnou hmotnosťou pohybujúcou sa od 3000 po 80000 g mol^{-1} [27]. Jeho vzorec môžeme vidieť na Obrázok 4.

Stratégie pre syntéza alifatických polyesterov, ako PCL, polyglykolidov a polylaktidov môžu byť v podstate dve, polyadícia za otvorenia kruhu cyklického monoméru a polykondenzácia, ako zobrazuje schéma Obrázok 5 [28]. Najčastejšia príprava polykaprolaktónu je koordinačne-inzerčnou prípadne kationovou, či aniónovou polymeráciou za otvorenia kruhu ϵ -kaprolaktónu (ROP) [29]. Monomér ϵ -kaprolaktón sa pripravuje katalytickou dehydratáciou hexán-1-6-diolu [30]. Koordinačne-inzerčná polymerácia sa uskutočňuje najmä v prítomnosti organo-kovových zlúčenín hliníku a cínu, oxidov niektorých kovov, organických katalyzátorov, ale aj enzýmov [30].

PCL sa využíva, ako zmäkčovač pre polyvinylchlorid (PVC), ale aj ako mäkkčiaca matrica v prípade poťahovania polyesterových vlákien, ako udáva postup použitý 1986 Leiningereom a Biggom [31]. PCL je degradovateľný spolu s inými alifatickými polyesterami, používa sa so syntetickými polymermi, v zmesiach pre modifikáciu vlastností materiálu.

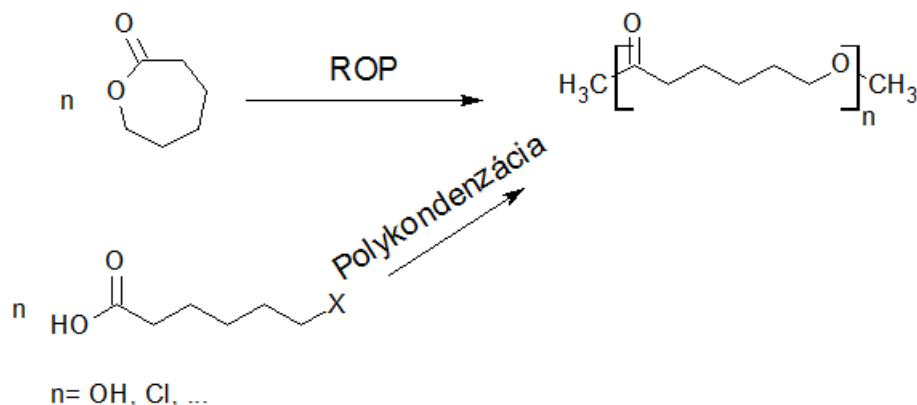
Bol rozsiahle využívaný počas boomu resorbovateľných polymérov v 70. a 80. rokoch, najmä v oblasti biomateriálov, ale aj v iných. Popularitu tohto polyesteru prekonal rýchlo resorbovateľné polyméry, ktoré mali menej nevýhod s dlhodobou degradáciou (tri až štyri roky), následkom čoho bol PCL nejakú dobu v ústraní. Avšak rastúci záujem o bioadaptabilný, biodegradovateľný biomateriál znovu ukázal výhody PCL. Oproti iným alifatickým polyesterom veľmi dobré elastické a reologické vlastnosti, taktiež sa s ním veľmi dobre manipuluje, či po stránke chemickej, fyzikálnej, alebo biologickej. Toto ho robí schopným prispôbiť svoju degradačnú kinetiku, ktorá potom vyhovuje značnému rozsahu implantátov a iných zariadení, v rámci daného anatomického určenia. Tieto jeho vlastnosti a nízke výrobné náklady, spolu s certifikátmi FDA (Food and Drug Administration, USA) a CE (European Community) z neho robia nádejnú platformu pre aplikácie v tkanivovom inžinierstve, pre design implantátov s dlhou dobou rozkladu. Jeho negatívnou vlastnosťou je nízka povrchová energia a hydrofobicita a s tým spojená nízka miera zmáčavosti [32], [33].



Obrázok 4: Polycaprolaktón (PCL)

Pre medicínu ho ďalej robí vhodným jeho biokompatibilita s tvrdými aj mäkkými tkanivami, schopnosť rozkladu na netoxické produkty a ich následné prirodzené odbúranie metabolickými cestami. Vďaka tomuto všetkému a minimálnym imunologickým odozvám v ľudskom organizme je jeho homopolymér, ale aj jeho kopolyméry veľmi dobrou voľbou materiálu, pre tvorbu biokompatibilných implantátov s dlhou dobou rozkladu, nosičových systémov pre liečivá s postupným uvoľňovaním a pre šitie vnútorných tkanív [34], [35]. V tkanivovom inžinierstve dokáže reprodukovať naturálny extracelulárny matrix a teda podporovať trojdimenzionálnu bunkovú kultúru [32]. Pre dodatočné vylepšenie vlastností, ako je hydrofilita, biokompatibilita a celkovo priaznivá bunková odpoveď, môžu byť

polymérne reťazce PCL modifikované funkčnou skupinou napr. úpravou v plazme [36], [37], [4], [38], alebo inou chemickou úpravou napr. aminolýzou [39].



Obrázok 5: Schéma syntézy PCL, iónovo alebo kovovo katalyzovaným, radikálovým otváraním kruhu a polykondenzácia

2.3 Plazma a jej aplikácie pre modifikáciu povrchov

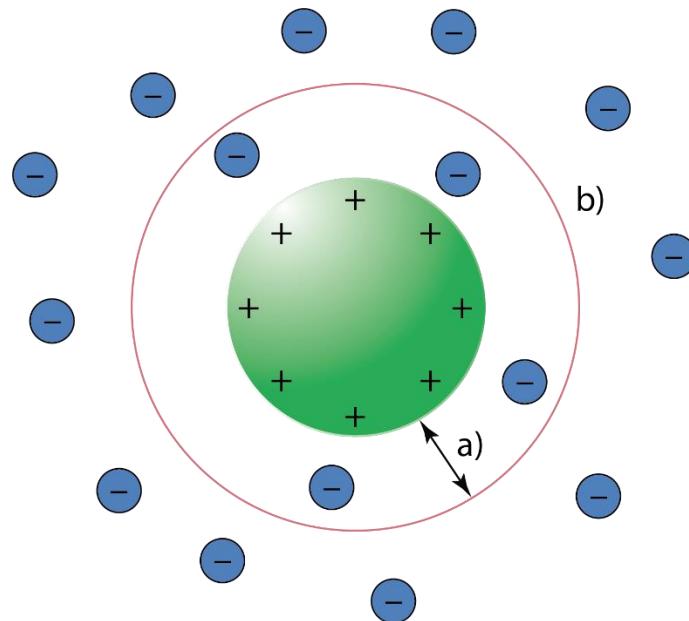
Pojmom plazma popisujeme štvrté skupenstvo hmoty, ide o ionizovaný plyn. Aby sme mohli skupinu nabitých častíc označiť za plazmu, musia splňovať určité podmienky, takzvané kritéria plazmy.

2.3.1 Kritéria plazmy

Debyeho dĺžka

Debyeho dĺžka je miera vzdialenosti na ktorú nabitá častica zaznamená vplyv inej nabitkej častice, alebo plochy s nenulovým potenciálom. Rozmiestnenie nabitých častíc vytvára efektívny štít akémukoľvek elektrostatickému poľu vo vzdialenosti rádovo odpovedajúcej Debyeho vzdialenosti vid' Obrázok 6. Tienenie elektrostatického poľa je následkom kolektívneho správania sa častíc v plazme. Debyeho vzdialenosť možno vypočítať pomocou vzorca vid' rovnica (1), kde ϵ_0 je permitivita vákuua, k Boltzmanova konštanta, T teplota elektrónov, n_e elektrónová hustota a e náboj elektrónov [40], [41].

$$\lambda_D = \left(\frac{\epsilon_0 k T}{n_e e^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (1)$$



Obrázok 6: a) Debyeho dĺžka, b) Debyeho sféra

Kvazineutralita

Plazma je makroskopicky neutrálna, čiže za rovnovážnych podmienok bez pôsobenia vonkajších síl je výsledný elektrický náboj rovný nule, pretože je v nej približne rovnako kladného aj záporného náboja. Plazma musí byť dostatočne veľká, aby v nej bol dosiahnutý veľký počet častíc a zároveň dostatočne malá, aby sa dala porovnať charakteristická dĺžka s makroskopickými parametrami, ktorými sú hustota a teplota. Túto vlastnosť označujeme, ako kvazineutralita a môžeme ju vyjadriť pomocou vzťahu rovnica (2). Kvazineutralitu sa musí posudzovať na vzdialenostiach väčších, ako Debyeho dĺžka. [40].

$$n_e = \sum_i n_i, \quad (2)$$

Plazmová frekvencia

V dôsledku kolektívneho chovania sa častíc v plazme dochádza k hromadnému pohybu častíc objavujú sa prirodzené oscilácie a tieto sú nazývané plazmovou frekvenciou (rovnica (3)).

$$\omega_p = \sqrt{\frac{e^2 n_0}{\epsilon_0 m_-}}, \quad (3)$$

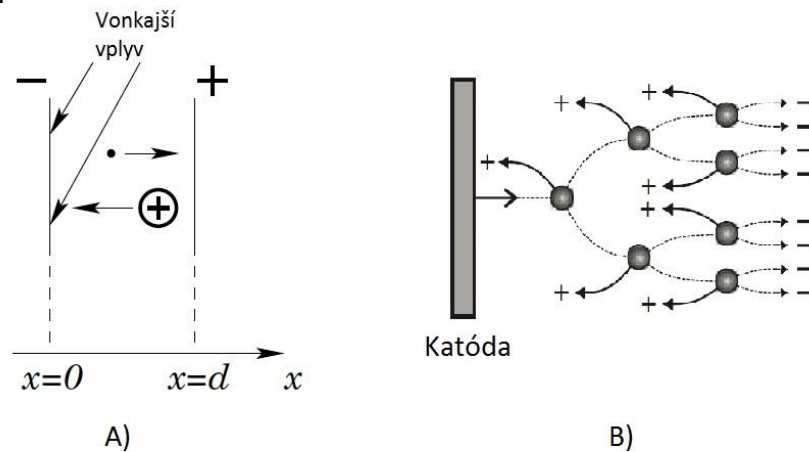
Kde m_- je hmotnosť buď elektrónu, alebo iónu a $n_0 = n_e = n_i$ je koncentrácia častíc. Plazmová frekvencia iónov je výrazne menšia, ako plazmová frekvencia elektrónov, pretože hmotnosť iónov je podstatne väčšia než hmotnosť elektrónov [40].

2.3.2 Generácia plazmy pomocou elektrického výboja

Rozlišujeme niekoľko spôsobov generácie plazmy. Jeden spočíva v ohriatí plynu na veľmi vysokú teplotu, niekoľko tisíc K, kde nastáva termická ionizácia, druhým spôsobom je napríklad fotoionizácia. Ďalším spôsobom je generácia plazmy založená na využití elektrických výbojov.

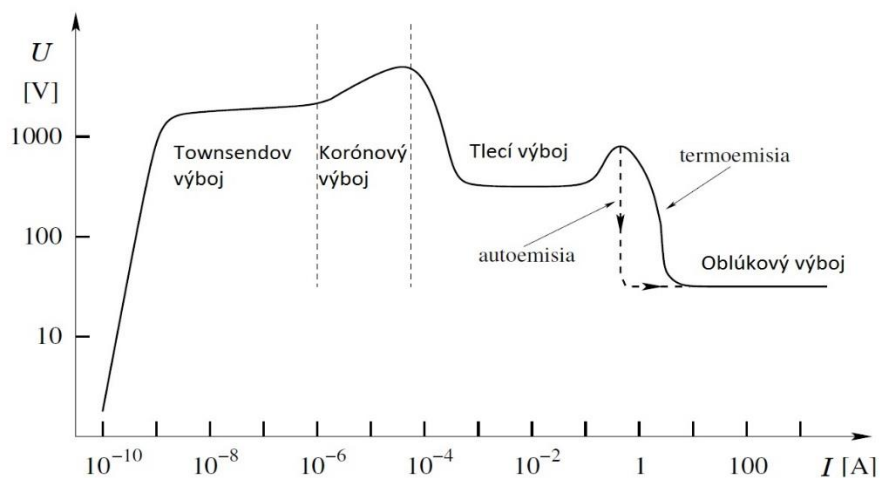
Plazma generovaná pomocou el. výboja využíva vznik el. poľa v plazme pri napätí. Elektróny získajú v el. poli kinetickú energiu, vďaka ktorej sú schopné ionizovať molekuly

plynu. Priebek generácie plazmy začína prierazom, deji pri ktorom sa zvyšovaním napätia medzi elektródami po prekročení určitej prahovej hodnoty plyn stáva vodivým. Tento dej je spôsobený urýchlením primárnych elektrónov v elektrickom poli. Za vznik primárnych elektrónov je zodpovedný vonkajší vplyv, napr. kozmické žiarenie, alebo radiácia. Primárny elektrón akcelerovaný v el. poli môže ionizovať atómy plynu a vytvoriť takto pár elektrón-ión, teraz sú dva elektróny zrýchlené a generujú štyri elektróny atď., čím sa vytvorí lavína elektrónov [41].

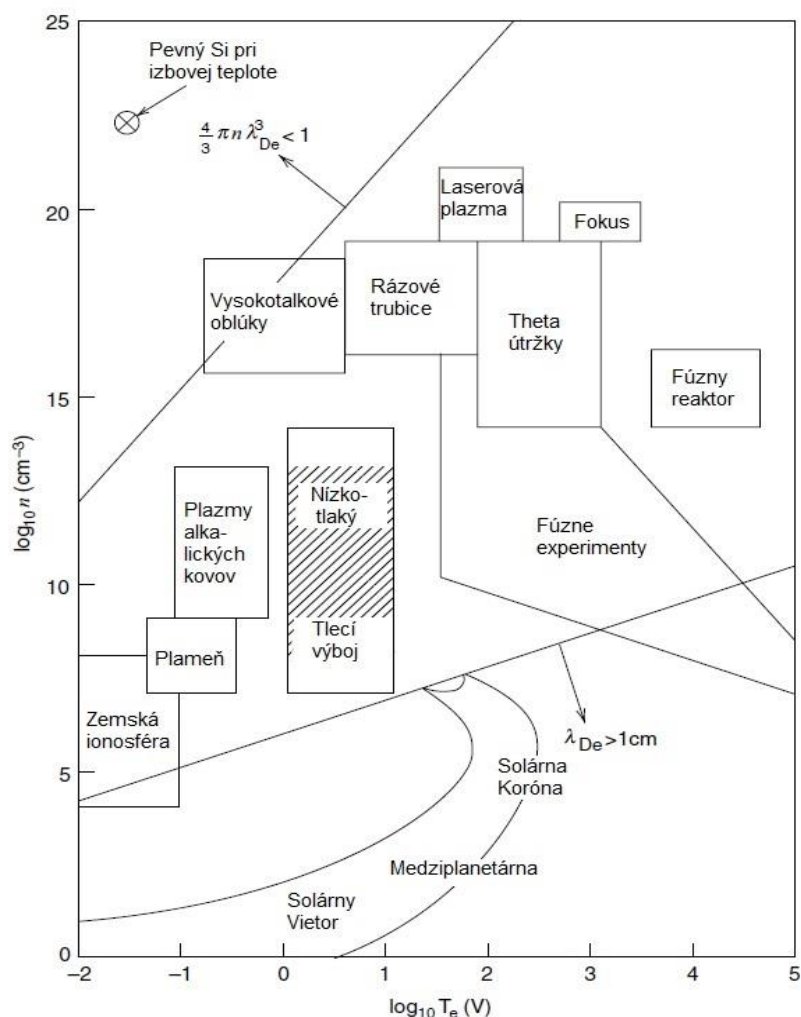


Obrázok 7: A)-Vznik primárneho elektrónu. B)-Elektrónová lavína

Po prieraze sa vytvorí výboj a preskupí do charakteristických oblastí, aby sa optimalizovali straty častíc a energie na vstupe. Pre existenciu výboja v ustálenom stave je potrebné, aby prostredím výboja prechádzal prúd. Evolúciu vývoja výboja vidíme na Obrázok 7, kde na začiatku sa vyskytuje nesamostatný Townsendov výboj, ten predchádza vyššie spomenutú elektrónovú lavínu, ktorá znamená úplný prieraz. Ďalšie zvýšenie napätia spôsobí prechod k samostatnému výboju, ak sú splnené podmienky pre korónový výboj zapáli sa ten, ak nie zapáli sa tlecí výboj. Ak sa však výkon ďalej zvýši, katóda sa začne zahrievať. Nakoniec dôjde k termionickej emisii a tá sa stáva dominantným procesom tvorby elektrónov. V tomto bode, ako vidíme na Obrázok 8, sa vybíjacie napätie zníži a tlecí výboj sa vyvinie do oblúka [43].



Obrázok 8: Evolúcia výboja [41]

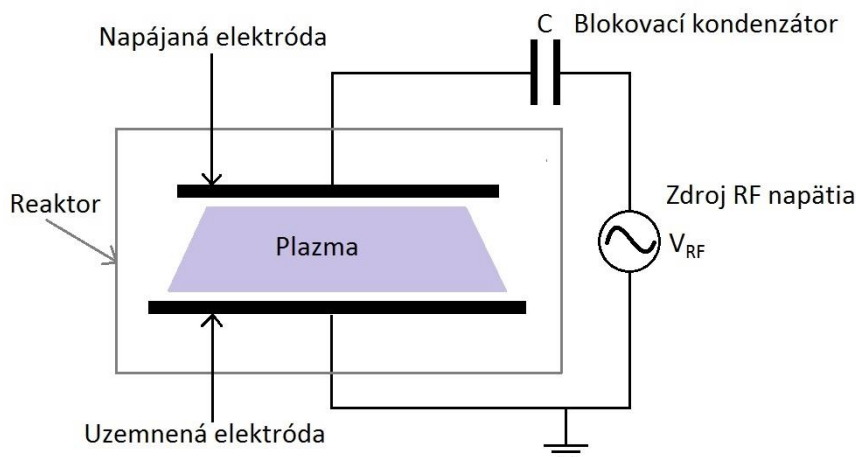


Obrázok 9: Identifikácia rôznych typov plazmy, diagram logaritmu hustoty častíc a teploty [44]

V tejto práci bol využitý tlecí výboj, pre simplicitu zaradenia vzhľadom na to, že existuje veľa typov plazmy, je uvedený Obrázok 9. Hlavnými charakteristikami tlecieho výboja je to, že elektróny sa vytvárajú ionizáciou a generáciou sekundárnych elektrónov z nárazu iónov na povrch.

Kapacitne viazaný rádio-frekvenčný výboj

Výboj medzi paralelnými doskami elektród pracujúci pri frekvencii desiatok MHz je jeden z najpoužívanejších nízkotlakých rádiokvencných (RF) výbojov napr. pre plazmové leptanie, alebo plazmové nanášanie rozkladom pár (PECVD). Dva najpoužívanejšie typy sú induktívne viazaný (z angl. inductively coupled) a kapacitne viazaný (z angl. capacitively coupled) výboj. Ak je jedna elektróda pripojená na zdroj RF napätí, pričom je ešte medzi ňou a zdrojom umiestnená vyrovnávacia jednotka (blokovací kondenzátor), a druhá je uzemnená, a táto konfigurácia je podobná kondenzátoru v el. obvode, potom plazma formovaná v tejto konfigurácii sa nazýva kapacitne viazaná (Obrázok 10). Potom v závislosti na tom, či sú obe elektródy rovnako veľké, alebo nie, môžeme hovoriť o symetrickom, alebo nesymetrickom výboji. Bližšie vysvetlenie poskytuje literatúra [42]



Obrázok 10: Schéma kapacitne viazaného RF výboja

Elektróny v plyne akcelerované RF poľom môžu ionizovať plyn priamo, alebo nepriamo kolíziami s neutrálnymi časticami, produkujú pri tom sekundárne elektróny. Ak je elektrické pole dost' silné, môže dôjsť k vyššie spomínanej elektrónovej lavíne. Po priraze tejto lavíny sa stáva plyn elektricky vodivým, kvôli veľkému množstvu voľných elektrónov. Vďaka nízkej hustote elektrónov je tepelný obsah stále malý, a to umožňuje uviesť plazmu do kontaktu s citlivými povrchmi [42].

2.3.3 Procesy v plazme

Reakcii, ktoré prebiehajú na povrchu pevného substrátu exponovaného reaktívnymi časticami v plazme, je niekoľko:

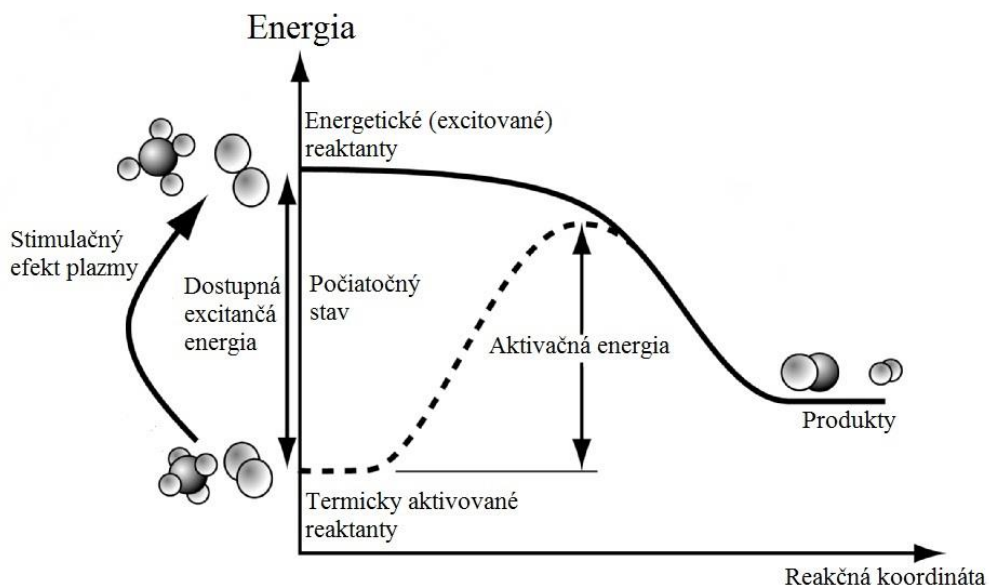
- Emisia sekundárnych elektrónov, kedy primárne častice, ako ióny, elektróny, fotóny, ale aj neutrálne častice vyrazia elektrón z povrchu pevného substrátu.
- Naprašovanie, dej kedy energetický ión, alebo neutrálna častica vyrazí atóm z povrchu pevného substrátu.
- Odraz
- Adsorpcia, iniciovaná častica priľne k povrchu pevného substrátu, existujú dva typy a to :
 - o Chemická sorpcia, dopadajúca častica si vytvorí chemickú silnú väzbu s pevným substrátom.
 - o Fyzikálna sorpcia, dopadajúci atóm, alebo molekula je slabo viazaná k povrchu pomocou Van der Waalsovej sily. Naviazané molekuly môžu podliehať difúzii pozdĺž povrchu pevného substrátu a následne môžu dôjsť aj k ich desorpcii.
- Absorpcia, dej kedy dopadajúca častica, ión, atóm, alebo molekula penetruje do objemu pevného materiálu.
- Desorpcia, čo je reverzný dej voči adsorpcii.

Heterogénna chémia povrchu, častice (elektróny, ióny, radikály, excitované neutrálne častice) a žiarenie z plazmy pôsobia pri tomto deji, ako promótori [47].

Plazmové nanášanie rozkladom pár (PECVD)

Chemická depozícia z plynnej fázy CVD (z angl. Chemical vapor deposition) je termodynamický proces nanášania tenkých filmov, počas ktorého sa plynné látky v rámci chemickej reakcie menia na pevnú, tenkú vrstvu na substráte. Syntetizujú sa z plynov obsahujúcich uhlík pri nízkych tlakoch [45].

Aby mohlo dôjsť k rozkladu molekúl, je nutné dodať aktivačnú energiu. Podľa typu dodanej aktivačnej energie teda môžeme mať zajedno termickú aktivačnú energiu, kedy je k rozkladu molekúl plynu použitá tepelná energia, ktorá je prenášaná prostredníctvom napr. horúceho vlákna, alebo môžeme využiť plazmu, alebo iný zdroj aktivačnej energie napr. laser. Plazmové nanášanie rozkladom pár (PECVD, z angl. Plasma-enhanced chemical vapor deposition) využíva energetické elektróny prítomné vo výboji na disociáciu a ionizáciu molekúl plynu, za vzniku reaktívnych radikálov a iónov, ktoré majú synergickú úlohu pri depozícii. Vďaka týmto energetickým elektrónom môže byť použitá plynná látka menej reaktívna, ktorá by inak pri klasickej CVD nemohla byť použitá, tak ako ukazuje Obrázok 11 [46].



Obrázok 11: Porovnanie reakčnej energie pre konvenčnú CVD a pre plazmou stimulovanú [46].

PECVD je proces vyvinutý v 60. rokoch a má svoju výhodu hlavne v nízkej teplote depozície a dobrej adhézii takto deponovaného povrchu. Ako je uvedené vyššie v tejto časti, PECVD využíva energetické elektróny. V CVD môžu prebiehať tak nehomogénne, ako aj homogénne chemické reakcie. Pri PECVD však plazma uvádza do reakcie elementárne procesy, ako excitácia, ionizácia, disociácia, rekombinácia, elektróny tu majú teplotu väčšiu, ako pri teplote štandardnej chemickej reakcie. Príklady niektorých častých procesov:

- Excitácia: $A + e^- \rightarrow A^* + e^-$
- Ionizácia: $A + e^- \rightarrow A^+ + 2e^-$
- Disociácia: $A_2 + e^- \rightarrow 2A^+ + 2e^-$

- Rekombinácia: $A_2^+ + e^- \rightarrow 2A$
- Fotoemiszia: $A^* \rightarrow A + h\nu$
- Prenos náboja: $A + B^+ \rightarrow A^+ + B$
- Elektrónové prichytenie: $A_2 + e^- \rightarrow A_2^-$
- Disociačné prichytenie: $AB + e^- \rightarrow A + B^-$

Kvôli všetkým vyššie uvedeným procesom je veľmi ťažké priebeh reakcie v PECVD popísať jednoduchou reakčnou schémou [47].

Aplikácie plazmy pre modifikáciu povrchu

V medicíne nachádza plazma využitie, ako terapeutický prostriedok na liečenie rán. Veľmi dobre sa dá použiť aj na sterilizáciu, vďaka procesom, ako deštrukcia genetického materiálu a rozpad mikroorganizmov pôsobením UV žiarenia a reaktívnych častíc v plazme. Dá sa tiež využiť na implantátov, plazmovou implantáciou imerzných iónov ošetrovaný polydimethylsiloxán vykázal zníženie genotoxicity, zlepšenie cytotoxicity a biokompatibilit [48].

Ďalšie aplikácie nachádza, ako nástroj na modifikáciu polymérov použitých v medicíne a tkanivovom inžinierstve. Plazma o vysokom obsahu kyslíku ma schopnosť preniknúť poróznou štruktúrou PCL bez straty modifikačných schopností, zvyšuje bunkovú adhéziu a proliferáciu na plochom, aj na poréznom substráte. [49]. Za týmto účelom je využívaných viacero typov výbojov, no ako je uvedené vyššie jeden z častých je kapacitne viazaný RF výboj.[50] Plazma sa dá využiť vo viackrokových modifikáciách, kde môže slúžiť len ako prvý krok, kedy po nej nasleduje imobilizácia proteínov, napríklad kolagénu za účelom zlepšenia bunkovej proliferácie [51]. Počas tohto kroku môže plazma pomôcť s naviazaným funkčnej skupiny, ktorá sa môže priamo podieľať na proliferácii, alebo môže naviazať inú molekulu výrazne zlepšujúcu adhéziu a proliferáciu buniek.

2.4 Aminácia povrchov

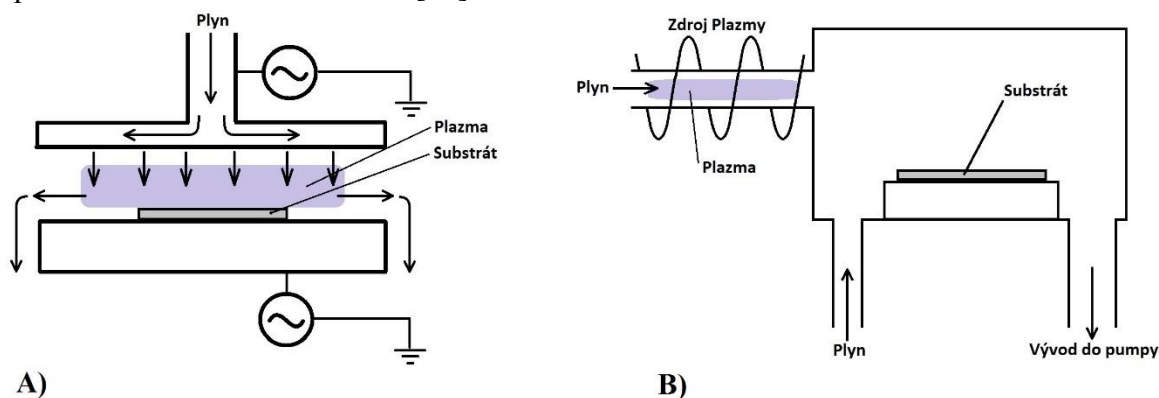
Ako je uvedené v kapitole 2.1, tak biokompatibilita a s ňou aj spojená vitalita buniek je ovplyvnená zložením materiálu, a s tým súvisia funkčné skupiny na povrchu. Pre bunkovú adhéziu a následnú prácu s tkanivami sú vhodné kladne nabité funkčné skupiny, ako napríklad amíny. O syntetických polyméroch, ako je vyššie uvedený polykaprolaktón vieme, že v ich natívnej forme nie sú pre adhéziu buniek vhodné kvôli nízkej zmáčavosti – vysokej hydrofóbnosti. U polykaprolaktónu, ako je vidieť na obrázku Obrázok 4, je absencia vhodnej funkčnej skupiny. Tento problém môže byť vyriešený práve zabudovaním aminových skupín [52]

Zavedenie aminoskupiny do organickej zlúčeniny je zhrnuté pod pojmom aminácia. K aminácii možno pristupovať viacerými stratégiami. Z hľadiska efektivity, teda nízkej náročnosti a vychádzajúc z predbežných výsledkov boli vybrané tri stratégie spĺňajúce tieto atribúty: plazmová polymerizácia, chemická metóda a hybridná metóda .

Stratégia využívajúca plazmovú polymerizáciu.

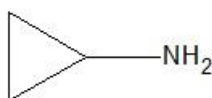
Plazmová polymerizácia využíva k aminácii povrchu metódu PECVD, ktorá je približená v 2.3.3. Je to dej, kedy vzniká tenká polymérna organická vrstva na povrchu substrátu. Takto tvorená vrstva sa môže líšiť od konvenčných polymérov fyzikálne aj chemicky. Plazmové polyméry nie sú tvorené opakujúcimi sa reťazcami, ich vlastnosti závisia od parametrov výboja a použitých monomérov. Východiskové látky pre plazmovú polymerizáciu nemusia pozostávať z viacerých väzieb, ako je to v prípade bežného polymerizačného procesu. Proces je obvykle založený na zmesi plynov, pozostávajúcej z monoméru a napr. vzácneho plynu, môže byť použitý argón, alebo hélium. Vzácne plyny znižujú prierazové napätie a zlepšujú priebeh výboja. Tento typ polymerizácie môže byť realizovaný viacerými typmi výbojov, avšak v tejto práci je použitý kapacitne viazaný RF výboj, popísaný vyššie, v kapitole 2.3.2.

Reaktor existuje v podstate v dvoch základných usporiadaniach, v ktorých môžu byť fyzikálne účinky odlišné, schematicky je ich vidieť na Obrázok 12. V downstreamovom usporiadaní je generácia plazmy vzdialená od substrátu, takže fyzikálne efekty sú minimálne a plynné reaktanty sa môžu zavádzať priamo do plazmovej oblasti, alebo do oblasti blízkej substrátu. V reaktore s paralelným usporiadaním doskových elektród, ktoré bolo využité aj v tejto práci, je substrát ponorený do plazmy, a preto podlieha fyzikálnym efektom, ako je napríklad iónové bombardovanie [43].



Obrázok 12: Schematické zobrazenie usporiadania reaktorov. A)-S paralelnými doskovými elektródami. B)-Downstreamové usporiadanie [43]

Medzi najjednoduchšie spôsoby aminácie, teda uvedenie amínovej skupiny je plazmové opracovanie za prítomnosti amoniaku, alebo dusíku. [53]. Plazmová polymerizácia monomérov na amínovej báze, vykazuje zvýšenie stability. Takýto monomér je napríklad cyklopropylamín, ktorého použitie vykazuje zlepšenie bunkovej adhézie a proliferácie [54], [4].

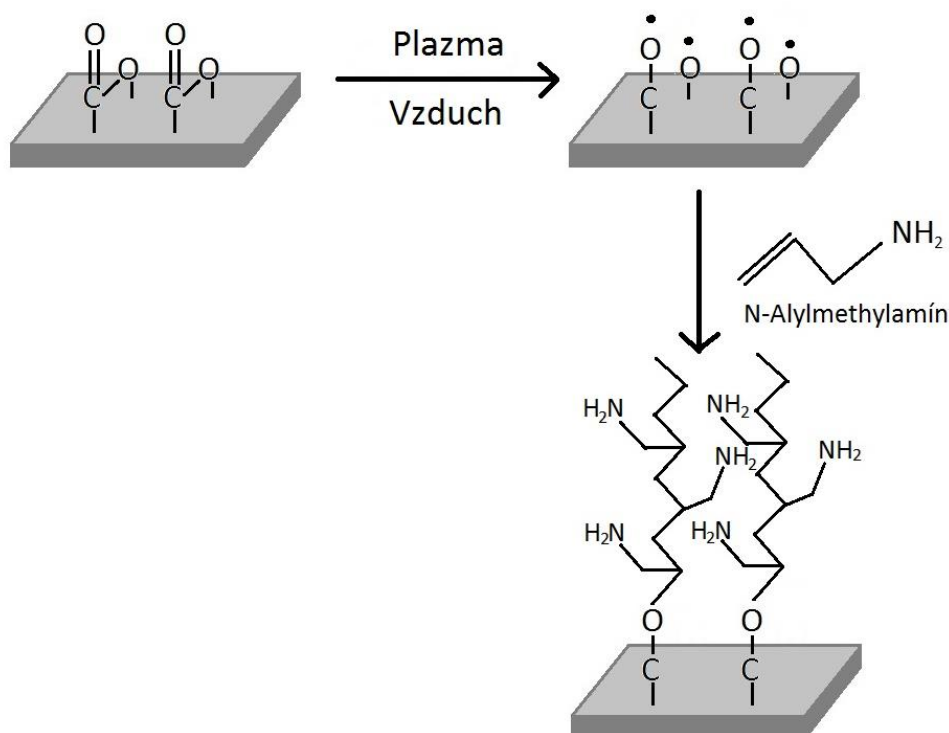


Obrázok 13: Cyklopropylamín

Cyklpropylamín (Obrázok 13) použitý v tejto sekcii práce má výhodu nakoľko nie je toxický [54].

Hybridná stratégia, využívajúca plazmu

Plazmové spracovanie polymérnych materiálov vo vzduchu, ako nosnom plyne, je účinným nástrojom na modifikáciu povrchu. Ako bolo už uvedené vyššie v kapitole 2.3.3 plazma uvádza elementárne procesy, ako, excitácia, ionizácia, disociácia a iné, čo vedie systém k reakcii, ktorá vytvára aktívne radikály na substráte. Radikály na takto aktivovanom povrchu polyméru, sú schopné reagovať s vhodným monomérom za vzniku polymérnej štruktúry. Tieto štruktúry majú potenciál pre modifikáciu za účelom zlepšenia bunkovej adhézie a proliferácie, ale aj pre antibakteriálnu úpravu povrchu [5].



Obrázok 14: Schéma hybridnej stratégie využívajúcej plazmu.

Po povrchovej modifikácii sú na povrchu vhodného substrátu vytvorené kyslíkové radikály, ktorých zdrojom je v tomto prípade nie len uvedená atmosféra obsahujúca kyslík, ale aj samotný polymér PCL. PCL, ako je vidieť na Obrázok 4, má kyslík viazaný, tak dvojnou väzbou, ako aj jednoduchými väzbami, ktoré sú schopné radikálovo reagovať s monomérom alylamínu, a vytvoriť kopolymerizačne štruktúru pripomínajúcu „kefku“. Takto vzniknutý kopolymér ma dve monoméry skladajúce sa z polykaprolaktónu a N-allylmethylamínu Obrázok 15.



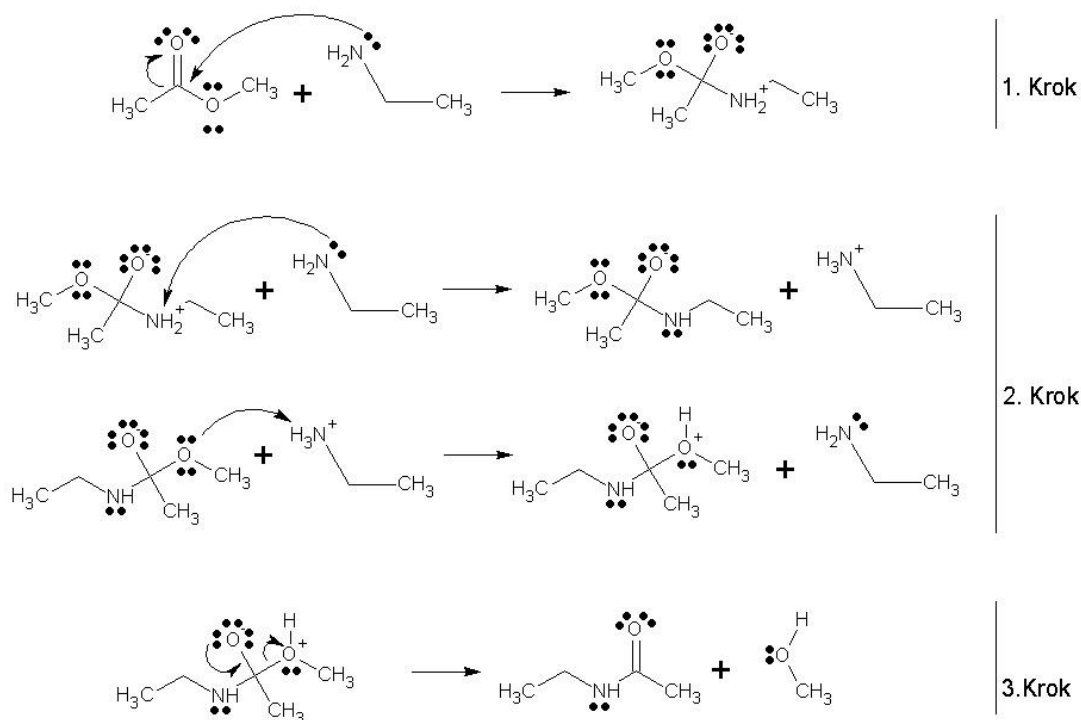
Obrázok 15: N-Alylmethylamín

Pri tejto stratégii bol pre aktiváciu povrchu polymérnej nanovláčkenej štruktúry použitý nízko-frekvenčný tleci výboj pri frekvencii 40 kHz. Tento typ výboja bol tiež použitý v prípade modifikácie zlepšenie proliferácie buniek [51]. Po aktivácii bol povrch exponovaný

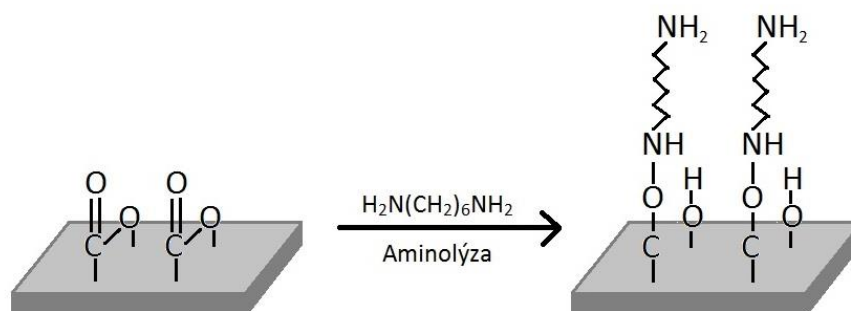
alylamínu, ktorý je vhodným monomérom pre túto aplikáciu, nakoľko už bol za týmto účelom využitý [51]. Nevýhodou alylamínu je ale jeho toxicita.

Stratégia založená na chemickom prístupe.

Chemická metóda využíva chemickú reakciu, aminolýzu. Aminolýza je reakcia primárneho, alebo sekundárneho amínu napr. s karboxylovou kyselinou, alebo derivátom karboxylovej kyseliny za vzniku primárneho, sekundárneho, alebo aj terciárneho amidu. Ak by reagoval amoniak reakciu by šlo nazývať amonolýza, príkladom je amonolýza halogénderivátov, ako jedna zo stratégií pre syntézu amínov. Takisto môžu reagovať aj alkyhalogenidy, alebo estery. V tejto práci je pre aminolýzu využitý alifatický amín diaminohexán. Schéma aminácie PCL nanovlákién pomocou aminolýzy je uvedená na Obrázok 17. Mechanizmus tejto reakcie je totožný s mechanizmom uvedeným na Obrázok 16. Takto modifikované polyméry, mohli na svojom povrchu imobilizovať napr. kolagén a tým zlepšiť bunkovú proliferáciu [56], [57], [6].



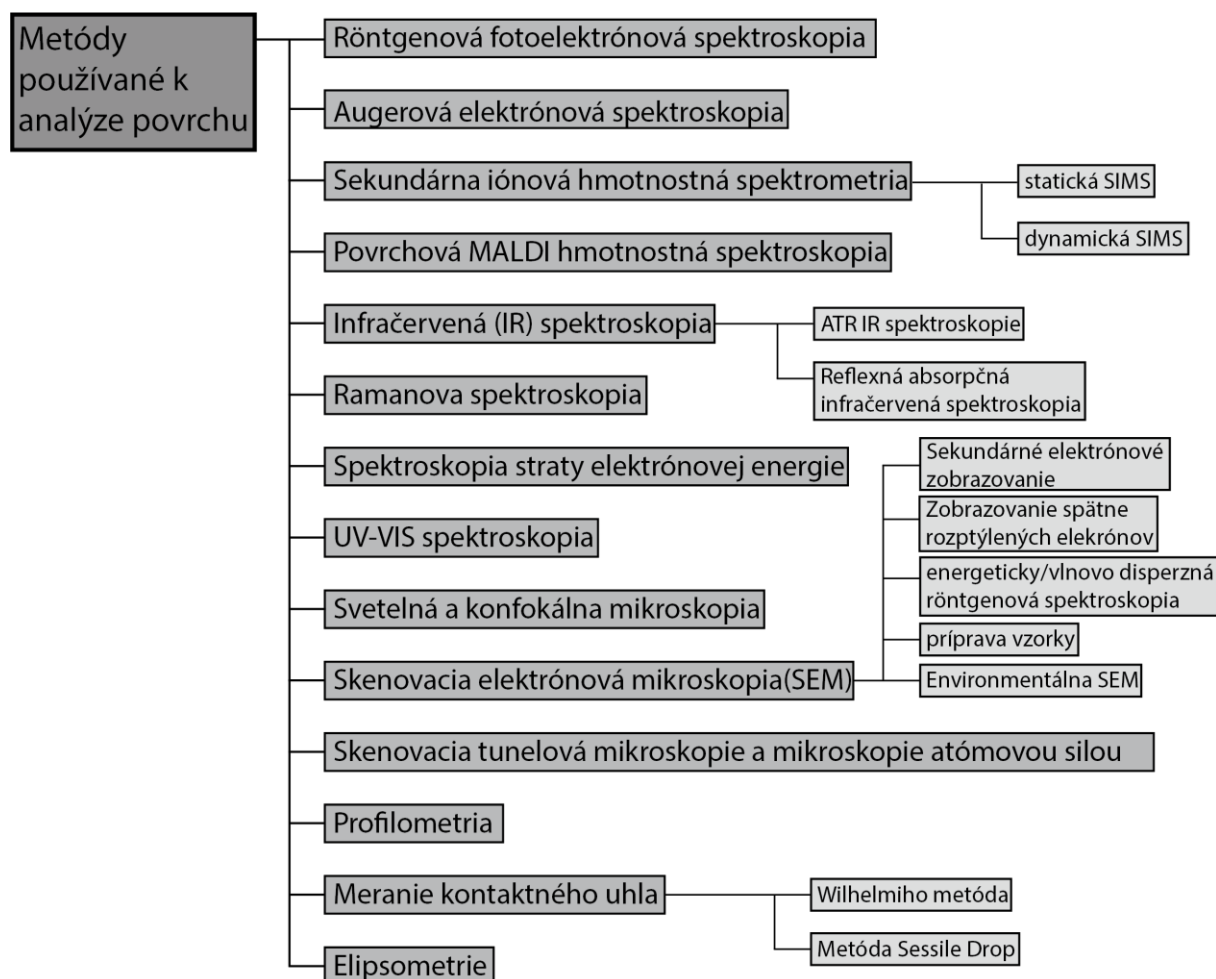
Obrázok 16: Príklad aminolýzy esterov



Obrázok 17: Schéma Aminolýzy PCL diaminohexánom

2.5 Metódy charakteristiky povrchov a tenkých vrstiev

Metód charakteristiky povrchov je celá paleta. V princípe ich môžeme rozdeliť na spektrálne a nespektrálne, prehľad najčastejšie používaných metód zobrazuje Obrázok 18. Táto práca využíva tak spektrálne, ako aj nespektrálne metódy k analýze modifikovaného povrchu.

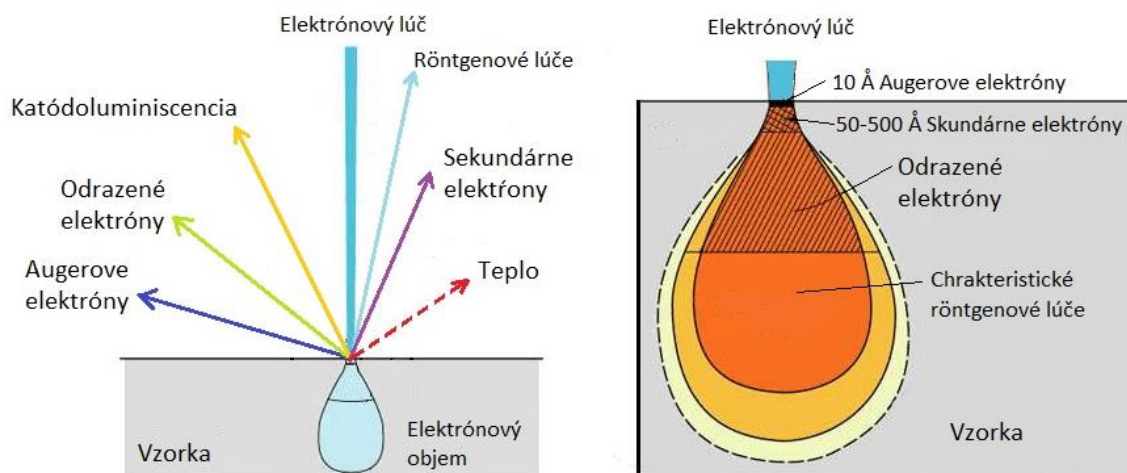


Obrázok 18: Metódy používané k analýze povrchu [26]

2.5.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM)

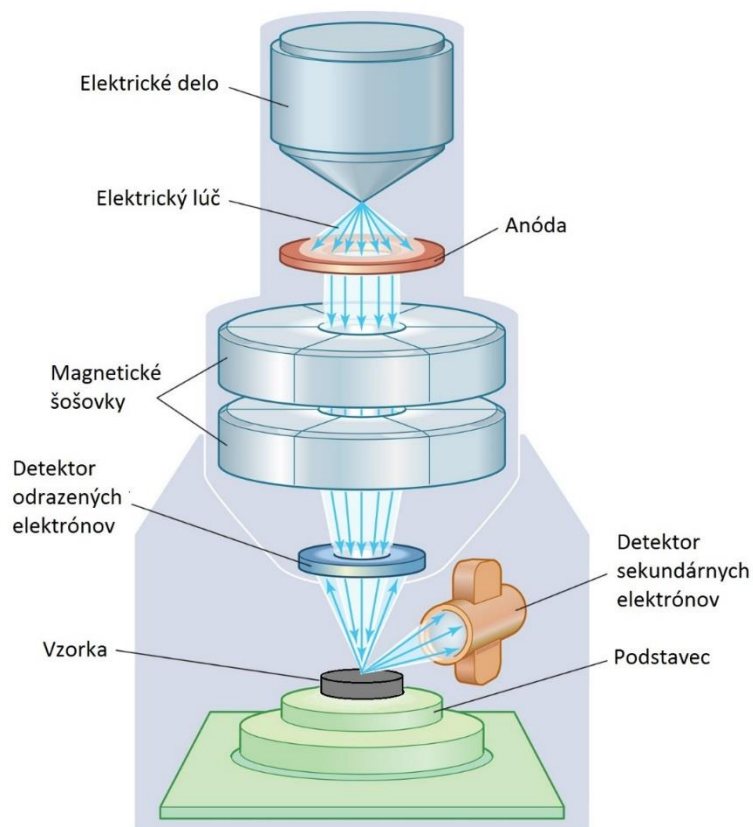
Skenovacia mikroskopia je analytická metóda schopná poskytnúť topografickú analýzu vzorku. SEM sa všeobecne používa na analýzu tak anorganických, ako organických materiálov na stupnici od nanometrov po mikrometre. Táto technika pracuje vo vysokom zväčšení, až stotisíc násobné priblíženie.

Elektrónový mikroskop využíva miesto svetla zväzok urýchlených elektrónov a sústavu elektromagnetických šošoviek. Vlnová dĺžka urýchlených elektrónov je až 6 pm, čo umožňuje veľké zväčšenie, energia týchto elektrónov je v rozsahu jednotiek až desiatok keV. Obráz pozorovaný pri elektrónovom mikroskope nie je priame pozorovanie, ale je realizovaný detektorom a monitorom. Pri interakcii urýchlených elektrónov so vzorkou vzniká celá rada žiarení, ktoré môžu byť využité pre ďalšiu charakteristiku vzorky. Dochádza k dvom dejom, za prvé k elastickým zrážkam, ktoré menia dráhu, ale takmer nemenia energiu a rýchlosť, tu vznikajú spätne odrazené elektróny BSE a transmisné elektróny TE. Za druhé k neelastickým zrážkam, kde elektrón stráca energiu pri interakcii s elektrónmi v elektrónových obaloch atómov vzorky. Pri tomto type zrážok vznikajú sekundárne elektróny SE, fotóny z oblasti viditeľného svetla tzv. katódová luminiscencia CL, Augerove elektróny, charakteristické a spojité RTG žiarenie a teplo, ako ukazuje Obrázok 19. Elektróny prenikajú vzorkou do slzovitého objemu, ktorého celkové rozmery sú určené energiou elektrónového lúča, atómovou hmotnosťou prvkov a uhlom pod ktorým elektrónový lúč dopadá na vzorku [58].



Obrázok 19: Dopadajúci lúč elektrónov a vzniknutý elektrónový objem

Celkový náčrt elektrónového mikroskopu môžeme vidieť Obrázok 20. Elektrónový mikroskop je možné v podstate rozdeliť na päť častí, a to vákuový systém, elektrónové delo, elektrónovú optiku, komoru pre vzorky a detektor.



Obrázok 20: Schematický náčrt elektrónového mikroskopu

Nutná je príprava vzoriek, je nevyhnutné naniesť vrstvu vodivého materiálu, pre kvalitnú mikroanalýzu a je potrebný leštený povrch, kolmý na lúč elektrónov, iba v prípade polovodičov, nie je za potreby špeciálna príprava.

2.5.2 Infračervená spektroskopia (IČ)

Infračervená spektroskopia je nedeštruktívna analytická metóda, založená na interakcii infračerveného žiarenia s hmotnou. Táto technika má okrem kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy svoju úlohu pri výskume molekulovej dynamiky, chemických vlastností molekúl, vplyvu prostredia na študované molekuly a v iných ďalších aplikáciách.

Infračervené žiarenie je elektromagnetické žiarenie, ktorého rozsah vlnočtov je od 12500 až po 10 cm^{-1} . Delíme ho podľa vlnových dĺžok na blízke (NIR, z angl. near infrared), stredné (MIR, z angl. middle infrared) a vzdialené (FIR, z angl. far infrared). Fotóny infračerveného žiarenia nemajú dostatočnú energiu na excitáciu elektrónov v molekulových orbitáloch, ale dostatočnú na zmenu vibračného stavu, teda k zväčšeniu amplitúdy, alebo rotačného stavu, teda k zrýchleniu molekuly a s tým súvisia aj získané informácie. Tento pohyb si predstavujeme, ako periodickú zmenu vzdialeností medzi atómami v molekule. Celková vibračná energia molekuly má dva príspevky, kinetickú energiu spojenú s pohybom atómov a potenciálnu spojenú s deformáciou väzby. Vibračný pohyb sa potom môže označovať ako harmonický oscilátor, kde sa celková energia rovná súčtu kinetickej a potenciálnej energie. Avšak pre reálne molekuly platí, že sa chovajú, ako anharmonický oscilátor [60].

Pri interakcii infračerveného žiarenia s molekulou môže byť absorbované, alebo emitované len také žiarenie, ktorého energia je rovná rozdielu medzi jednotlivými vibračnými

hladinami príslušného oscilátoru. Čiže, ak bude frekvencia zdroja odpovedať určitému energetickému rozdielu hladín, dôjde k absorpcii a objaví sa absorpčný pás. Infračervené spektrum látky je závislosť absorbancie A (rovnic (5)), transmitancie T (rovnic (4)), prípadne reflektancie R (rovnic (6)) na vlnočte (cm^{-1}), alebo na vlnovej dĺžke (λ , nm).

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad (4)$$

$$A = \log T = \log \frac{I_0}{I}, \quad (5)$$

$$R = \frac{I_{\text{reflect}}}{I_0}, \quad (6)$$

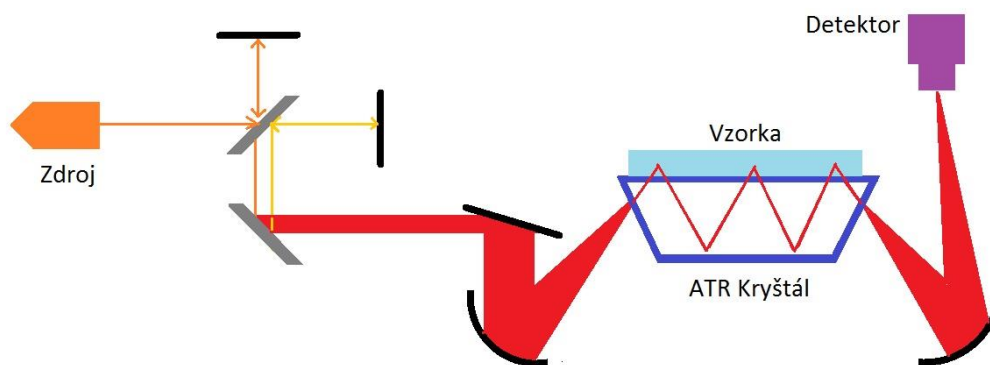
Kde, I a I_0 predstavujú toky žiarenia, pred a za vzorkou a I_{reflect} tok odrazený vzorkou. Absorpčné pásy, oblasti absorpcie obvykle charakterizujeme polohou, teda vlnočtom a relatívnou intenzitou. Potom pre identifikáciu jednotlivých skupín sú potrebné tabuľky.

FTIR

Fourierova transformačná infračervené spektrometria využíva miesto monochromátoru michelsonov interferometer. Tento delí infračervený lúč pomocou polopriepustného zrkadla na dva, v ideálnom prípade s rovnakou intenzitou, výsledné odrazené a transmisné žiarenie je potom presmerované pomocou zrkadiel, z nich jedno sa hýbe a tým determinuje dĺžku optickej dráhy medzi lúčmi. Lúče sú odrazené späť do polopriepustného zrkadla, anglicky označovaného, ako beamsplitter, kde sú zrekombinované a výsledné zrekombinované žiarenie prechádza vzorkou do detektora. Interferenčný signál v detektore, ako funkcia rozdielu dĺžky optickej dráhy sa nazýva interferogram. Konečné infračervené spektrum sa vypočítava z interferogramu pomocou Fourierovej transformácie. Aby mohla byť molekula detekovateľná FTIR musí u nej vplyvom IR dochádzať k zmene dipólového momentu [59].

ATR-FTIR

Infračervená spektroskopia s technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR, z angl. Attenuated total reflection). Je založená na jednom, či viacnásobnom úplnom odraze žiarenia na fázovom rozhraní vzorky a meracieho kryštálu, ktorý musí mať dostatočne vysoký index lomu. Kryštál, na ktorý sa nanáša vzorka, je väčšinou lichobežníkového tvaru. Doňho sa privádza sústavou zrkadiel zväzok lúčov, pod takým uhlom dopadu voči fázovému rozhraniu, aby bola splnená podmienka totálneho odrazu. Ak sa nejaká časť žiarenia o danej frekvencii absorbuje, tak táto zložka bude v totálnom odraze zoslabená. Schéma je zobrazená na Obrázok 21.



Obrázok 21: Schéma ATR-FTIR

Technika charakterizuje povrchové tenké vrstvy materiálov, nakoľko penetračná hĺbka je v rádoch μm , ale odraz na fázovom rozhraní je viacnásobný, takže získané spektrum je veľmi kvalitné, porovnateľné s transmisným spektrom. Spektrum je ovplyvnené indexom lomu medzi vzorkou a kryštálom, uhlom dopadu na fázové rozhranie a vlnovou dĺžkou infračerveného žiarenia. Hĺbka penetrácie infračerveného žiarenia závisí od vlnovej dĺžky, s nárastom vlnovej dĺžky, teda s poklesom vlnočtu, sa prehĺbuje penetrácia do vzorky.

2.5.3 Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia (XPS)

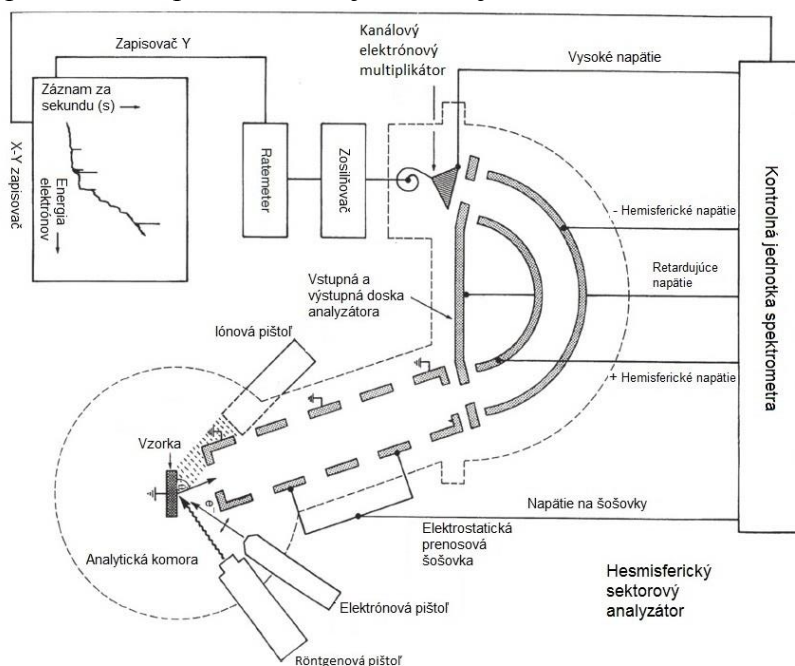
Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia (XPS, z angl. X-ray photoelectron spectroscopy) je analytická technika založená na meraniach fotoelektrónov emitovaných zo vzorky následkom interakcie zväzku mäkkých monochromatických röntgenových lúčov so vzorkou. To vedie k excitácii a následnému vypudeniu elektrónov, s nízkou energiou, vyplývajúcich z fotoionizácie molekúl, atómov, alebo iónov vzorky. Prichádzajúci fotón energie $h\eta$ bude v tomto konkrétnom prípade foto-excitovať 1s elektrón väzobnej energie E_B vzhľadom na Fermiho hladinu. Röntgenové foto-elektrónové spektrum sa zaznamenáva buď, ako funkcia energie väzby elektrónov E_B , alebo priamo, ako kinetická energia E_K nameraných fotónov excitovaných elektrónov. Oba sú ekvivalentné a sú spojené cez rovnica (7), $h\eta$ je energia röntgenového fotónu a Φ je výstupná práca spektrometru.

$$E_B = h\eta - E_K - \Phi, \quad (7)$$

Namerané rozloženie energie vo valenčnom pásme XPS preto priamo odráža hustotu okupovaných stavov, čo vedie k tomu, že z týchto spektier môžu byť extrahované informácie o chemickej väzbe. Pozorované vrcholy v XPS energetickom spektre emitovaných elektrónov sú v podstate jedinečne spojené s väzbovými energiami špecifických prvkov. Potom sa ľahko určí priradením hlavných pík v spektre, ktoré prvky sú prítomné. Pretože stredná voľná dráha elektrónov pre excitované fotoelektróny je len v rádu nanometrov, pozorované prvky sa nachádzajú teda len v prvých pár maximálne desiatkach atómových vrstvách analyzovanej vzorky, to je dôvod vysokej povrchovej citlivosti XPS. Dodatočné zvýšenie povrchovej citlivosti je možné dosiahnuť naklonením vzorky v spektrometri. Redukcia uhlu vzletu elektrónov týmto spôsobom, za účelom zníženia hĺbky analýzy sa označuje ako uhlové rozlíšená XPS (AR-XPS, z angl. angle resolved X-ray photoelectron spectroscopy).

Priradenie píkov, sa uskutočňuje pomocou príručky, alebo počítačovej databázy pozícií píkov. Je možno detekovať všetky prvky periodickej tabuľky s výnimkou vodíka, XPS je schopná ľahko analyzovať ľahké prvky, čo je zvlášť atraktívne pre analýzu organických polymérov.

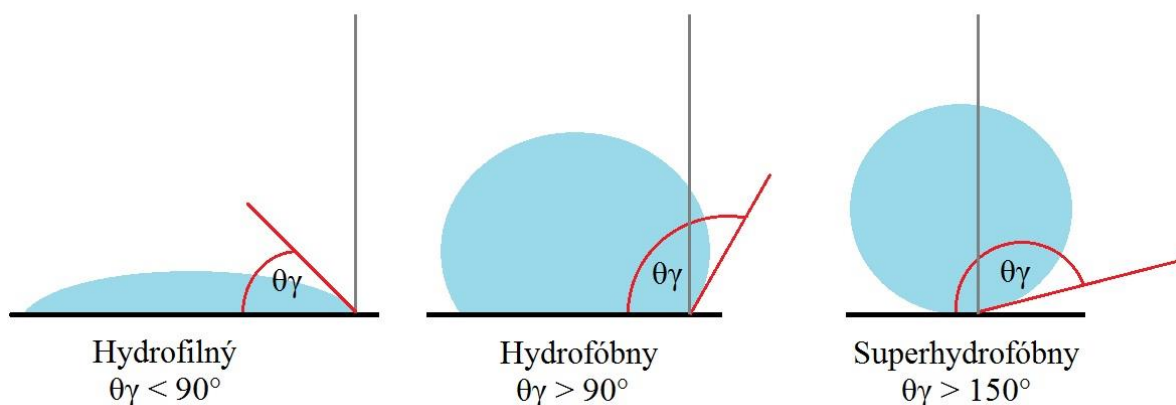
Schematický diagram komerčného röntgenového fotoelektrónového spektrometra môžeme vidieť na Obrázok 22. Základnými súčasťami sú: röntgenový zdroj, vzorka (ktorá je počas merania umiestnená v manipulátore), elektrónová prenosová šošovka, analyzátor elektrónovej energie a elektrónový detektor (kanálový elektrónový multiplikátor, alebo kanálová doska), všetko obsiahnuté v komore s vysokým vákuom (UHV, z angl, ultrahigh vacuum). Limit veľkosti vzorky závisí od spôsobu manipulácie so vzorkou, ale optimálna veľkosť vzorky pre väčšinu spektrometrov je zhruba jeden centimeter štvorcový.



Obrázok 22: Schematický diagram konvenčného röntgenového fotoelektrónového spektroskopu

2.5.4 Kontaktný uhol

Kontaktný uhol vznikajúci pri kontakte povrchu s kvapkou, je kvantitatívnou mierou zmáčania povrchu pevnej látky kvapalinou, a je definovateľný, ako uhol vytvárajúci sa na trojfázovom rozhraní. Goniometricky je tento bod možné určiť dotyčnicou pozdĺž hranice z bodu kontaktu. Povrch po ktorom sa kvapka roztiahne označujeme, ako hydrofilný, kontaktný uhol je tu menší, ako 90° . Pri uhloch väčších, ako 90° si kvapka udržuje tvar a povrch nezmáča, takýto povrch je označovaný ako hydrofóbny. V prípade, kedy by bol kontaktný uhol väčší, ako 150° , kvapka by sa takmer vôbec nedotýkala povrchu, a povrch by bol označovaný, ako superhydrofóbny, v tomto prípade nastáva takzvaný lotosový efekt Obrázok 23.



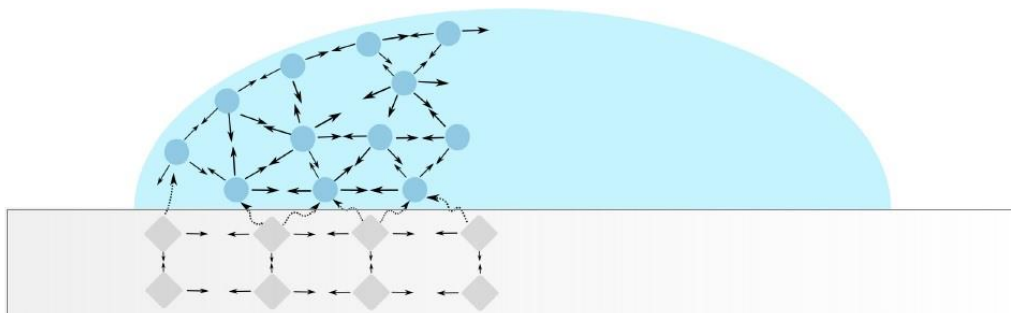
Obrázok 23: Správanie sa kvapky vzhľadom na povrch, ak je povrch hydrofilný, hydrofóbny, alebo superhydrofóbny

Kontaktný uhol je možné merať viacerými spôsobmi. Často sa kontaktný uhol meria pomocou Wilhelmovej metódy, spočívajúcej v počítaní kontaktného uhlu na základe silového pôsobenia kvapaliny na tenký substrát. Ďalšou častou metódou je Washburnova metóda, ktorá počíta nasakovanie kvapaliny do porézneho materiálu, zo závislosti výšky hladiny na čase sa potom vypočítava kontaktný uhol. [61]. Jedna z najrozšírenejších metód merania kontaktného uhlu je goniometrická. Pri tejto metóde sa meria priamo dotyčnica na trojfázovom rozhraní.

Voľná povrchová energia

Medzi najdôležitejšie aplikácie kontaktného uhlu patrí určenie voľnej povrchovej energie. Jednotkou povrchovej energie je $[\text{Nm}^{-1}]$, rovnako ako pri povrchovom napätí kvapaliny γ , sú si teda ekvivalentné. Definovateľná, je ako práca W potrebná na vytvorenie nového povrchu o jednotkovej ploche ΔA . V ideálnom prípade je tvar kvapky na analyzovanom povrchu určený povrchovým napätím kvapaliny, záleží aj na použitej kvapaline.

Povrchové napätie je medzi-molekulová interakcia, pri ktorej molekuly v objeme kvapaliny na seba vzájomne pôsobia rovnomerne vo všetkých smeroch, výsledná sila je v tom prípade nulová. Avšak molekuly na rozhraní nemajú všade okolo seba susediace molekuly, dochádza tu k tomu, že vnútorné molekuly sú ťahané smerom nahor a vzniká tak vnútorný tlak Obrázok 24.



Obrázok 24: Vzájomné pôsobenie molekúl [citácia 24]

Výsledkom dejov je, že kvapka má tendenciu držať čo najmenší povrch, aby mala čo najmenšiu povrchovú energiu, preto majú malinké kvapky a bublinky sférický tvar.

Povrchové napätie je popísané Youngovou rovnicou, kedy kontaktný uhol kvapky na ideálnom povrchu je definovaný mechanickou rovnováhou danej kvapky pod vplyvom trojfázového rozhrania. Youngovu rovnicu popisuje rovnica (8), kde γ_{pv} , γ_{kv} , γ_{pk} sú rozhrania pevná látka-vzduch, kvapalina-vzduch a pevná látka-kvapalina.

$$\gamma_{pv} = \gamma_{pk} + \gamma_{kv} \cos \theta_Y, \quad (8)$$

Z nameraných kontaktných uhlov je potom stanovená povrchová energia pevnej látky pomocou modelu medzi-molekulovej interakcie. Interakcii pre povrchovú energiu, tak ako výpočtových modelov je viacero druhov, v závislosti na používanú kvapalinu a materiál. Acidobázický výpočtový model (rovnica (9)), umožňuje stanoviť elektrón-donornú a elektrón-akceptornú zložku voľnej povrchovej energie, potom celkovú povrchovú energiu tvorí súčet dvoch zložiek, acidobázickej (AB) a disperznej (LW). AB označuje elektrón-akceptornú/elektrón-donornú interakciu podľa Lewisa a LW celkovú disperznú Lifshitz-Vander Waalsovú interakciu.

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB}, \quad (9)$$

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

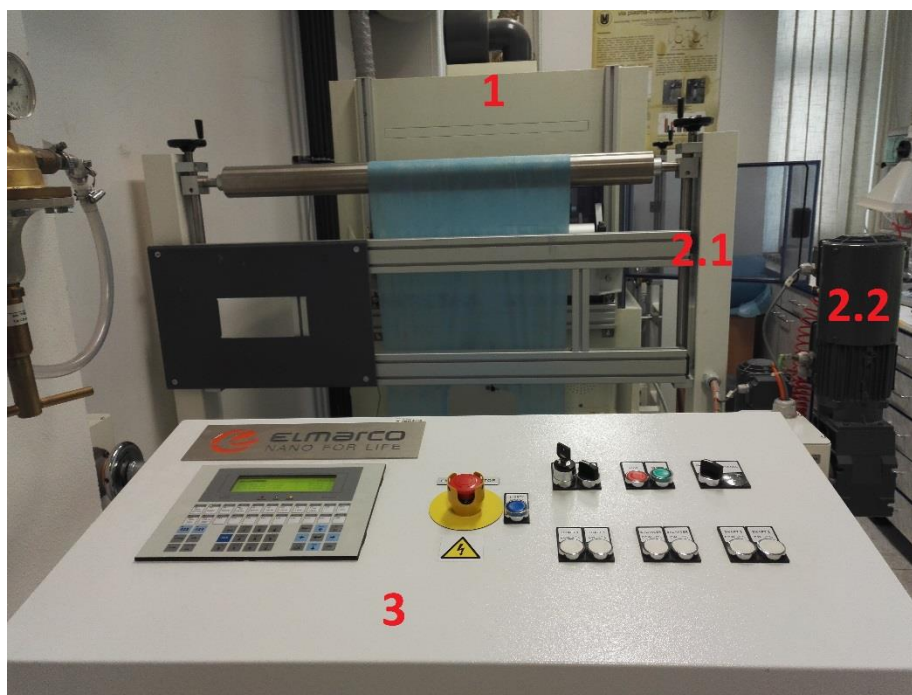
Túto diplomovú prácu je možné rozdeliť z experimentálneho hľadiska na tri hlavné etapy. Prvou etapou je príprava nanovláknien z polykapolaktónu ($Mn = 8000$, Sigma Aldrich), dodávaného vo forme peletiek, ktorú nasleduje etapa aminácie vybranými metódami približenými v kapitole 2.4. Finálnou etapou bola analýza, následne vyhodnotenie výsledkov z hľadiska efektivity aminácie pripravených nanovláknien a kultivácia buniek na týchto vybraných nanovláknach.

3.1 Príprava nanovláknien

Polymérne nanovlákná boli pripravené pomocou takzvaného bezihlového elektrospiningu, technika, ktorá je bližšie približená v kapitole 2.1. Šlo o prístrojové vybavenie situované na Masarykovej univerzite, Prírodovedeckej fakulte. Nanovlákná boli pripravované za pomoci prístroja, Nanospider (Elamarco). Samotnej polymerizácii predchádzala príprava roztoku, z ktorého sa nanovlákná pripravovali. Šlo o zmes koncentrovaných organických kyselín (octovej a mravčej) s rozpustenými peletkami PCL. Vychádzajúc z optimalizácie Mgr. Evy Dvořákovéj, Ph.D., a po dodatočnej konzultácii s Mgr. Zbyňkom Voráčom, Ph.D. bol pripravovaný roztok o koncentrácii PCL 7% a následne 9%.

Aparatúra pre prípravu nanovláknien

Roztok na zvlákňovanie sa pripravoval do 100 ml uzatvárateľnej fľaštičky (Fisher Scientific). Ďalej aparatúru tvorilo samotné vyššie spomínané zariadenie na elektrospinning (Nanospider™, Elmarco), skladajúce sa z riadiaceho modulu, pre posuv netkanej textílie, mechanizmu pre uloženie a posun netkanej textílie, a samotného modulu pre zvlákňovanie (Obrázok 25).

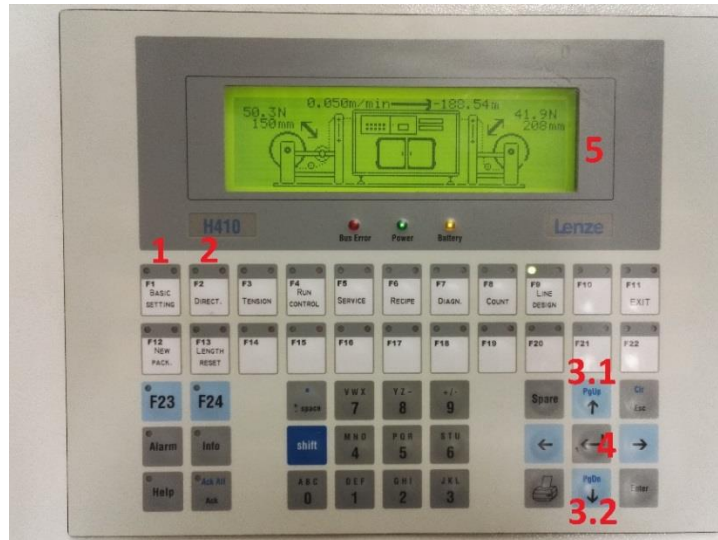


Obrázok 25: Nanospider (Elmarco), 1-Samotný nanospider, 2.1-Mechanizmus pre posun netkanej textilie, 2.2-Motor navijacieho mechanizmu, 3-Riadiaci modul pre smer a rýchlosť navijania.

Postup práce

V prvom kroku bol pripravený roztok zmesi koncentrovaných kyselín, a to koncentrovanej mravčej a octovej v pomere 1:2. S kyselinami bolo pracované v zapnutom digestore. Kyseliny boli zmiešané v pripravenej 250 ml kadičke. Z kadičky bol následne roztok kyselín opatrne preliaty do 100 ml uzatvárateľnej fľašky, do fľašky bolo ešte pred tým vložené miešadlo. Roztok bol umiestnený na miešačku s ohrevom, kde bol miešaný a súčasne prihrievaný na približne 30°C. Po cca hodine bolo za stáleho miešania pridané navážené množstvo tuhých peletiek PCL (Sigma Aldrich). Pre 90 g roztoku bolo treba 25 ml konc. kys. mravčej, 57,1 ml konc. kys. octovej a 8,9 g PCL vo forme peletiek.

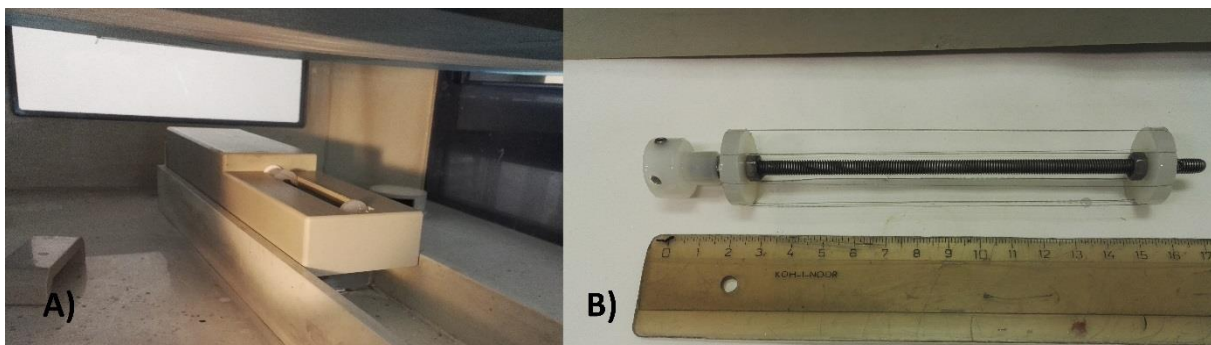
Roztok bol miešaný minimálne 12 h, pracovné okno pre použiteľnosť roztoku na zvlákňovanie je od 12 po 24 h, potom už hrozí degradácia PCL.



Obrázok 26: Ovládací panel riadiaceho modulu pre posuvný mechanizmus. 1-Základné nastavenia, 2-smer nastavenia, 3.1-Zmena smeru, 3.2-Zmena smeru, 4-Potvrdenie

Druhým krokom bolo nastavenie prístrojovej techniky a príprava na zvlákňovanie Obrázok 26. Najprv bol nastavený riadiaci modul pre posun netkanej textílie. Nastavený bol smer a rýchlosť posunu na integrovanej klávesnici v ľavej časti modulu, samotný posun bol potom aktivovaný a deaktivovaný pomocou červeného a zeleného tlačidla v pravej strane modulu. Rýchlosť posunu bola nastavená v rozmedzí 0,02-0,05 m/min, v závislosti na vlhkosti, čím vyššia vlhkosť, tým nižšia rýchlosť posunu.

Následne bola vanička na zvlákňovanie vložená drôtová elektróda, ktorej konštrukciu je možné vidieť na Obrázok 27. Do vaničky s elektródou bol naliaty 9 % roztok PCL, 25 až 30 ml, hladina roztoku nedosahovala vyššie, ako centrálny závit elektródy. Vanička s elektródou a roztokom bola umiestnená do priestoru pre zvlákňovanie, tak aby dosadla na svoje miesto a uzavrel sa elektrický kontakt zo spodnej strany vaničky.



Obrázok 27: A)-Vanička s elektródou umiestnená v nanospideri. B)-Zvlákňovacia elektróda

Ďalej bol zapnutý samotný Nanospider pomocou tlačidla Obrázok 28. Nastavená bola vzdialenosť medzi elektródami na 100 mm, pomocou tlačidla Obrázok 28 a priestor pre zvlákňovanie bol následne uzavretý. Parametre zvlákňovania boli nastavené na ovládacom paneli, ktorý bol súčasťou zvlákňovacieho modulu. Nastavená bola rýchlosť otáčania elektródy na 60 Hz, napätie bolo nastavené na 55 kV. Nakoniec bola pomocou čierneho fixu naznačená celková dĺžka posunu, ktorá bola 250 až 300 mm, pre ľahšiu orientáciu a vstupné dvierka bolo možné uzavrieť.



Obrázok 28: 1-Vanička s roztokom a vloženou elektródou, 2-Uzemnená elektróda, 3-výškovo nastaviteľný záves uzemnenej elektródy so vzdialenosťou, 4-Tlačidlo nastavujúce vzdialenosť elektród, 5-štart, 6-safety lock, 7-Nastavenie rýchlosti otáčania elektródy, 8-Zapnutie napájania zdroja, 9-Nastavenie napätia, 10-Displej, 11-Tlačidlo vkladajúce napätie na elektródy

Tretím krokom bolo samotné zvlákňovanie. Stlačenie zeleného tlačidla štart zaplo odsávania pár a po následnej kontrole elektródy vo vaničke sa mohli zavrieť vstupné dvierka a stlačiť tlačidlo Safety lock. Po tomto sa začala elektróda podľa nastavenia otáčať v roztoku, a bolo možné zapnúť zdroj a dodať napätie na elektródu. Vlákna boli potom ťahané k uzemnenej elektróde, pod ktorou bola posúvaná netkaná textília na zachytenie pripravených nanovlákien. Posun bol sledovaný a po dosiahnutí požadovanej dĺžky sa na riadiacom module pomocou ovládacieho panelu, ktorý je spomenutý vyššie na Obrázok 26, zmenil smer. Takto bol menený smer štyrikrát a bolo nutné vymeniť roztok. Zastavil sa posun a aj dodávané napätie a bolo možné vaničku vytiahnuť a odsáť zostatkový roztok. Následne sa umyla

vanička aj elektróda v koncentrovanej kyseline octovej a celý proces sa mohol zopakovať ešte raz. Takže vytvorenú vrstvu nanovlákien tvorili celkovo osem posunov. Po vypnutí napájacieho zdroja a posunu mohli byť pripravené nanovlákná vystrihnuté aj s podkladovou netkanou textíliou a uložené na 24 h do digestora k osušeniu, nakoľko reziduá rozpúšťadiel v nanovlákennej štruktúre bolo nutné odvetrať. Takto pripravené nanovlákná bolo možné použiť k modifikácii.

3.2 Modifikácia pripravených nanovlákien

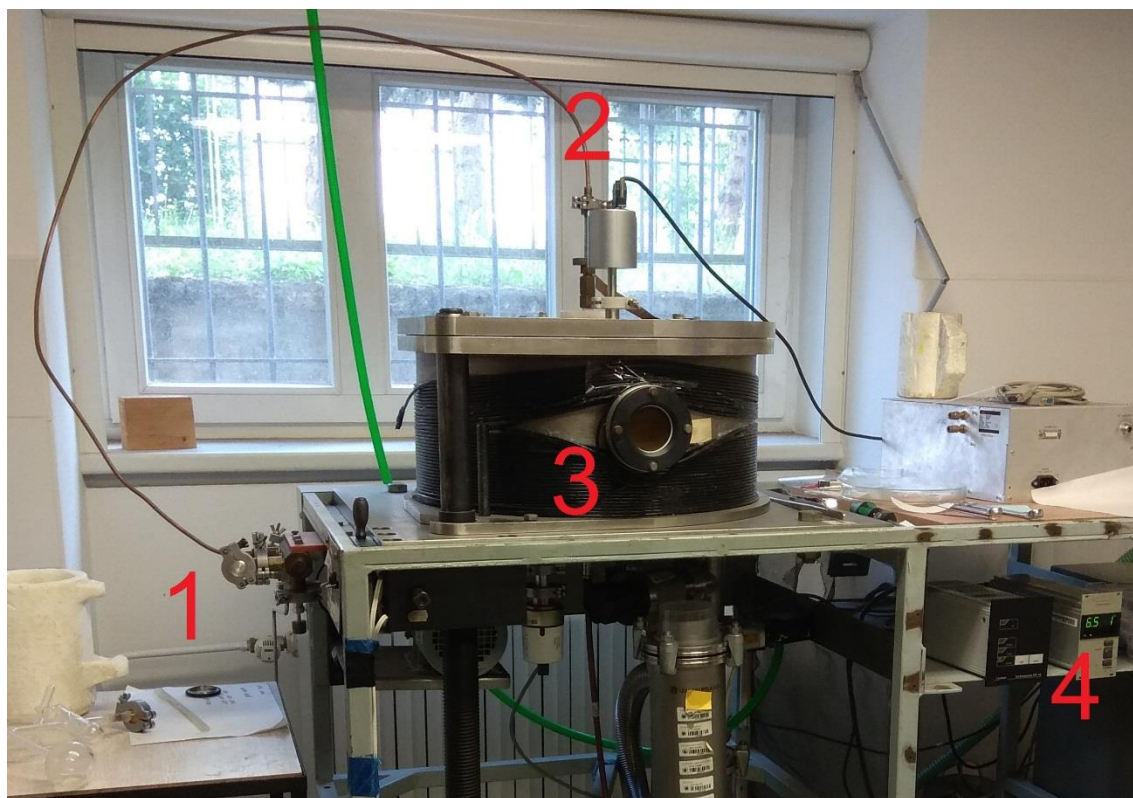
Druhým etapou experimentálnej časti práce bola aminácia pripravených vzoriek na teoretickom základe uvedenom v kapitole 2.4.

3.2.1 Modifikácia pomocou plazmovej polymerizácie

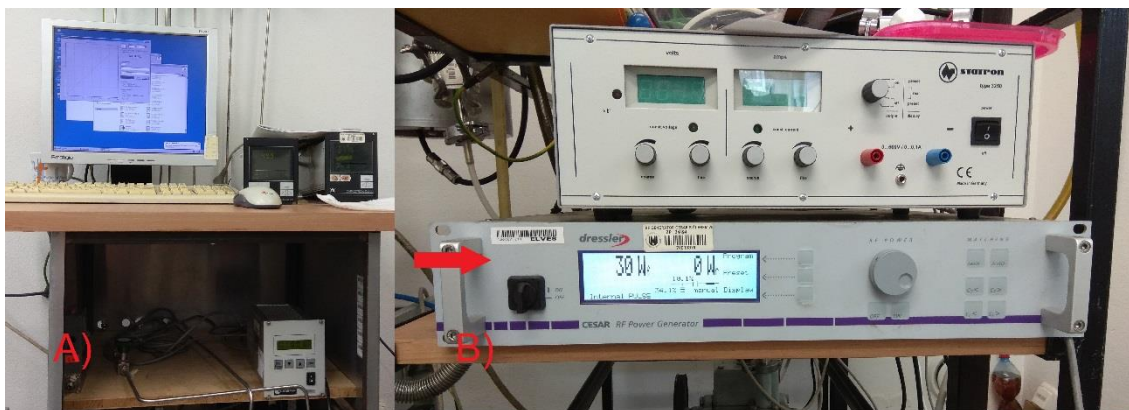
Teoretický princíp tejto metódy je priblížený v odseku 2.4. Metóda využíva kapacitne viazanú RF plazmu.

Aparatúra použitá k aminácii nanovlákien pomocou plazmovej polymerizácie.

Pre tento typ metódy bola využitá infraštruktúra Masarykovej univerzity, Prírodovedeckej fakulty. Metóda vychádza z práce doc. Mgr. Lenky Zajíčkovéj Ph.D, s ktorou a vďaka ktorej bolo toto meranie realizované. Aparatúra pozostáva z reaktora pre plazmovú polymerizáciu, ďalej z riadiaceho PC a zo zdroja (Obrázok 29, Obrázok 30).



Obrázok 29: Použitá aparatúra na plazmovú polymerizáciu, 1-Ihlový ventil, 2-Prívod plynov do reaktoru, 3-Reaktor, 4-Regulátor prietoku



Obrázok 30: A)-PC pre meranie prietoku plynov, B)-Gnerátor RF (CESAR, Dressler)

Postup práce

Reaktor z nerezovej ocele, bol tvorený spodnou elektródou kruhového tvaru o priemere 420 mm, bola kapacitne viazaná k RF generátoru o frekvencii 13,56 MHz, na ktorej boli umiestnené substráty. Pracovné plyny boli privádzané do komory reaktoru cez hornú, sprchovú hlavicu pripomínajúcu elektródu, ktorá mala v priemere 380 mm. Vzďalenosť medzi elektródami bola na 55 mm. V reaktore muselo byť najskôr dosiahnuté nízkeho tlaku. Turbomolekulárna pumpa s podpornou rotačnou pumpou upravila tlak v reaktore na 10^{-4} Pa, samotná depozícia potom prebiehala pri tlaku 50 Pa. Pri všetkých pokusoch bola miera úniku vrátane desorpcie na stenu pod $0,00005 \text{ lmin}^{-1}$. Pred samotnou depozíciou boli vyčistené 10 min pulznou Ar plazmou.

Následne pre depozíciu bol prietok argónu nastavený elektronickým prietokometrom na $0,028 \text{ lmin}^{-1}$, pri čom prietok pár cyklopropylamínu bol regulovaný pomocou ihlového ventilu na $0,002 \text{ lmin}^{-1}$. Parametre výboja boli: 100 W pulzne, 30 % DC, 500 Hz. Čas depozície bol upravovaný, tak aby hrúbka filmu dosahovala 50 nm.

3.2.2 Modifikácia hybridnou stratégiou využívajúcou plazmu

Hybridná metóda využíva aktiváciu povrchu pomocou radikálov v plazme, a následné vystavenie parám N-alylmethylamínu. Metóda vychádza z práce doc. Ing. Mariana Lehockého Ph.D., vďaka ktorému bolo toto meranie aj umožnené.

Aparatúra použitá k aminácii nanovlákien hybridnou cestou.

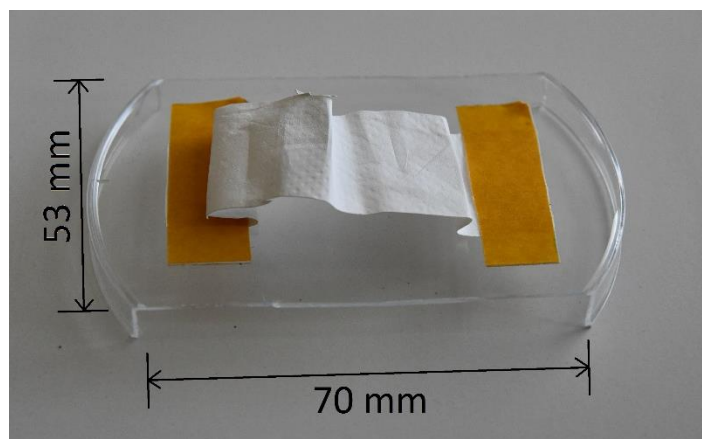
Pri tejto modifikácii bola využitá jednak infraštruktúra Centra Polymérnych Systémů v Zlíne, tak aj plazmochemické laboratórium na Vysokom učení technickom, Fakulte chemickej. Aparatúru tvoril primárne modul plazmového reaktora Femto (Deiner) Obrázok 31



Obrázok 31: Plazmový reaktor Femto (Deiner), 1-Hlavný vypínač, 2-Štart, 3-Časovač, 4-Stop, 5-vstup do reaktoru

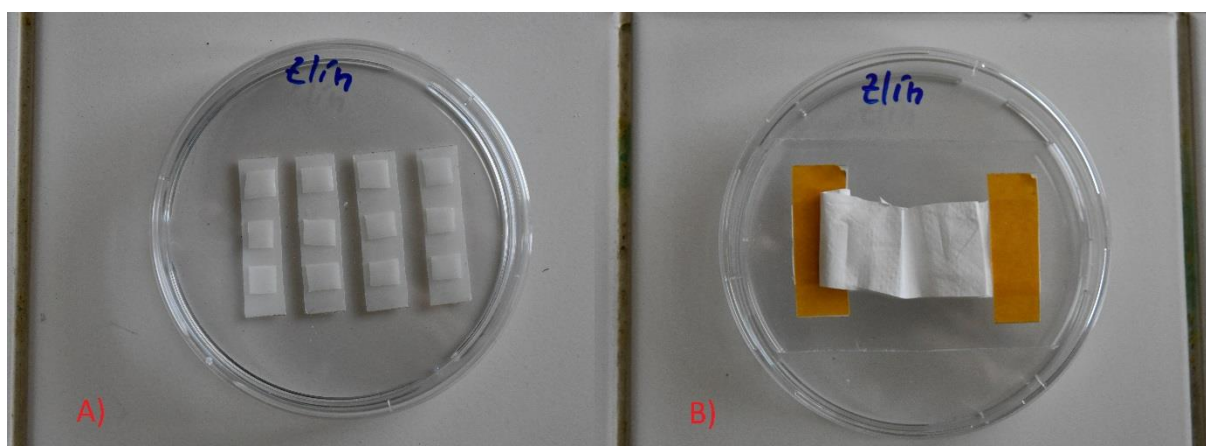
Postup práce

Prvým krokom bolo pripravenie vzoriek pre modifikáciu. Testovacia sada ukázala nutnosť prichytenia nanovlákien PCL, nakoľko by ich plyn prúdiaci do reaktora zhodil z podložného skla. Pre tento účel boli z krycej časti Petriho misiek zhotovené provizórne „stolčeky“ na uchytenie vzoriek. Pred uchyteným boli nastrihané na obdĺžniky, pričom exponovaný povrch nanovlákien zaberá plochu o hranách 38 mm a 40 mm. Vzorky boli prichytené k stolčeku pomocou obojstrannej pásky. Toto uchytenie výrazne uľahčilo manipuláciu a transport vzoriek. Takisto sa pri testovacej sade ukázalo, že pri modifikácii dochádza ku kontrakcii nanovlákien, táto skutočnosť bude bližšie spomenutá v kapitole Výsledky a diskusia. Aby bola kontrakcia vykompenzovaná, tak boli vlákna prichytené so značnou rezervou v dĺžke.



Obrázok 32: Nanovlákná upevnené na podložnom „stolčeku“

Okrem nanovlákní boli pomocou obojstrannej pásky prichytené aj fólie PCL pre kontrolu Obrázok 33, tie však neboli umiestnené na stolčeku, ale len v odkrytej Petriho miske. Štvorčeka fólie PCL o hrane 7 mm boli uchytené po troch na štyri pružky obojstrannej pásky. Vzorky sa pripravené na modifikáciu zabalili, kvôli transportu do Centra polymérnych systémov v Zlíne.



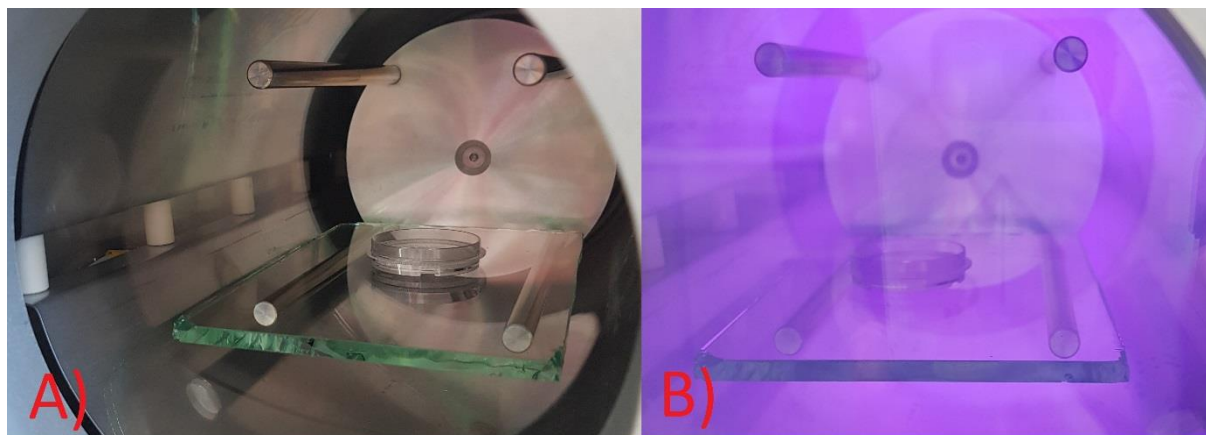
Obrázok 33: Pripravené vzorky, A)-Kontrolné fólie PCl upevnené na obojstrannej fólie, B)- Nanovlákná upevnené na podložnom „stolčeku“

Druhým krokom bolo samotné opracovanie pripravených vzoriek. Najprv však bolo nutné aparáturu aktivovať, pomocou tlačidla main power Obrázok 31, a nastaviť potrebné parametre. Nastavenie týchto parametrov vychádza z práce a konzultácie s doc.Ing. Marianom Lehockým Ph.D. Pre prehľadnosť sú nastavenia uvedené v tabuľke Tabuľka 1. Po nastavení aparátury bola vložená vzorka do reaktora, uzavreli sa vzduchotesné vstupné dverka, a stlačilo sa zelené tlačidlo s označením štart.

Tabuľka 1: Nastavenie aparátury

Výkon [W]	Čas [s]	Frekvencia [kHz]	Prietok plynu [sccm]	Tlak [Pa]	Zloženie atmosféry
100	120	40	20	50	vzduch
50	120	40	20	50	vzduch

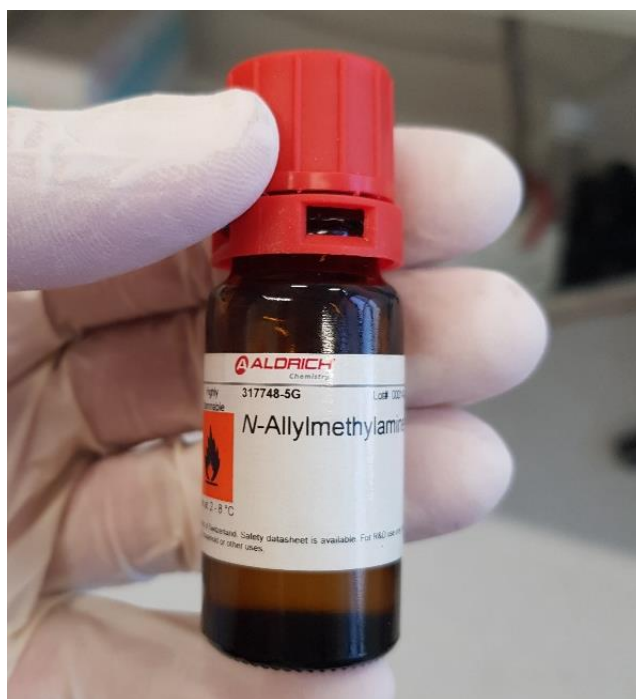
Po spustení aparátúry sa automaticky zapla pumpa na upravenie vnútornej atmosféry reaktora. Nasledovalo zapálenie výboja a modifikácia vzorky pri výkone 100 W, avšak ako testovacia sada ukázala, dochádzalo ku kontrakcii nanovlákiem. Preto bolo otestované ešte to isté nastavenie aparátúry pri polovičnom výkone, teda 50 W pre opracovanie nanovlákiem.



Obrázok 34: A)-Vzorka umiestnená v reaktore, B)-Opracovanie vzorky plazmou

Doba opracovania bola nastavená na 120 s a po uplynutí sa výboj automaticky vypol. Pumpa však bežala ešte krátku dobu po vypnutí výboja, kvôli stabilizácii atmosféry.

Následne bola takto opracovaná, resp. môžeme povedať aktivovaná vzorka vybraná z reaktora a vystavená po dobu 10 s parám N-allylmethylamínu (Sigma Aldrich) Obrázok 35. Táto operácia musela byť prevedená v digestore, nakoľko výpary sú zdraviu škodlivé. Týmto krokom sa modifikácia skončila a vzorky mohli byť zabalené pre spätný transport do Brna, na analýzu a ďalšie využitie v pokusoch.



Obrázok 35: N-Allylmethylamín (Sigma Aldrich)

3.2.3 Modifikácia chemickou cestou

Aparatúra použitá k aminácii nanovlákiem chemickou cestou.

Aparatúra bola situovaná na Vysokom učení technickom, Fakulte chemickej v plazmochemickom laboratóriu. Tvorila ju pec na ohrev chemického skla, teplovzdušná pištoľ, chemické sklo a digestor. Toto všetko je súčasťou vybavenia laboratória.



Obrázok 36: Pec (Binder), 1-Štart/stop, 2-Nastavenie, 3-displej

Postup práce

V prvom kroku boli vypočítané a pripravené vodné aj alkoholové roztoky o určených koncentráciách.

Tabuľka 2: Vypočítané množstvá rozpúšťadla a diaminohexánu pre 50 ml roztoku.

Alkoholový roztok	2 %	5 %	10 %
Isopropanol [ml]	48,97	47,45	44,1
Diaminohexán [ml]	1,02	2,55	5,1
Vodný roztok			
	10 %	30 %	50 %
Dest. voda [ml]	44,9	34,69	24,5
Diaminohexán [ml]	5,1	15,3	25,5



Obrázok 37: A)-Diaminohexán a chemické sklo, uložené na roztopenie a predhriatie, B)- Telpovzdušná pištoľ (HL 500, Steinel)

Bolo nutné 24 h pred prípravou roztokov roztopiť vykryštalizovaný diaminohexánu (Sigma Aldrich), nakoľko teplota topenia, ako uvádza výrobca je 42-45 °C. Topenie diaminohexánu bolo realizované v peci (Binder) Obrázok 37, teplota bola nastavená na 50 °C a doba topenia bola 24 h. Po roztopení bolo zo zásobnej fľaše odliate cca 100 ml do menšej fľaše, pre ľahšiu a bezpečnejšiu manipuláciu. Pred prípravou roztokov bolo tiež nutné ohriať všetko chemické sklo na prípravu roztokov, nakoľko by inak došlo k spätnému vykryštalizovaniu diaminohexánu pri manipulácii, napríklad v pipete, alebo odmernom valci. Tento problém však pretrvával aj pri práci v digestore, preto bolo nutné, stále prihrievanie chemického skla pomocou telpovzdušnej pištole (HL 500, Steinel) Obrázok 37. Nutné bolo aj prihrievanie rozpúšťadiel. Na transport a dočasné uloženie diaminohexánu v digestore bola zhotovená izolačná nádoba z polystyrénu v tvare kocky, o hrúbke steny 40 mm a dĺžke hrany 120 mm. Pre každý roztok bola pripravená a predhriata samostatná 50 ml uzatvárateľná fľaštička Obrázok 37, do ktorej sa daný roztok pipetoval.

Druhým krokom bola modifikácia nanovlákien a kontrolných fólii PCL. Nanovlákná a fólie PCL boli nastrihané na štvorčeky o hrane 7 mm. Najprv sa vzorky ponorili do etanolu po dobu 3 h, potom sa opláchli destilovanou vodou a boli ponorené do pripraveného roztoku na 24 h, toto všetko bolo realizované v sklenených Petriho miskách. Po vyťahnutí z roztokov boli vzorky ešte raz opláchnuté destilovanou vodou a uložené na osušenie v digestore na 24 h. Takto pripravené vzorky boli umiestnené do malých Petriho misiek.

3.3 Analýza modifikovaných nanovlákien.

Súčasťou analýzy bolo aj vystavenie modifikovaných vzoriek živnému médiu DMEM, bližšie je zloženie média objasnené v Kapitole 3.4.

Skenovacia elektrónová mikroskopia

Skenovacia elektrónová mikroskopia je analytická metóda využívaná k analýze povrchu, jej princíp je približený 2.5.1.. K analýze bol použitý skenovací elektrónový mikroskop Tescan LYRA3 (LYRA) v sekundárnom emisnom móde. Akceleračné napätie bolo nastavené na 10 kV, pracovná vzdialenosť bola približne 9 mm. Pred zobrazením sa vzorky potiahli 10 nm

hrubým zlatým filmom naneseným pomocou RF magnetronového naprašovača (Leica ACE 600), aby sa zabránilo nabíjaniu vzorky povrchu vzorky. Analýza samotná prebiehala v spolupráci s Ing. Luciou Blahovou, Ph.D.

Infračervená spektroskopia

Infračervená spektroskopia s technikou zoslabeného úplného odrazu je rýchla a spoľahlivá analytická metóda, ktorej princíp je priblížený v kapitole 2.5.2. Aparatúra, k analýze bola situovaná na Vysokom učení technickom, Fakulte Chemickej. Analýza bola realizovaná na prístroji Nicolet™ iS50 FTIR Spectrometer (Thermo Fisher Scientific), ktorý využíva diamantový kryštál. Samotná analýza prebiehala vďaka Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. Výsledné analyzované spektrá boli bez korekcie.

Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia (XPS)

Jednou z použitých metód k analýze chemickej kompozície povrchu vzoriek bola röntgenová fotoelektrónová spektroskopia, ktorá bola realizovaná na spektrometri Axis Supra (Kratos Analytical). Maximálny laterálny rozmer analyzovanej plochy bol 7 mm. Aby sa zabránilo diferenciálnemu nabíjaniu vzoriek, spektrá boli získané s neutralizáciou v nadmerne kompenzovanom móde. Spektrá sa následne normalizovali posunutím uhlovodíkovej zložky CH_x k 285 eV. Prehľadové spektrá boli získané pri 80 eV, vysoko rozlíšené spektrá jednotlivých prvkov pri 20 eV. Takto boli premerané všetky vzorky. K fitovaniu XPS spektier C1s, N1s a O1s bol použitý softvér CasaXPS, po odčítaní pozadia typu Shirley s použitím Gaussovsko-Lorentziínskych (G-L) píkav s pevným percentuálnym podielom G-L 30 %. Váznové energie E_B skupín obsahujúcich C, N a O boli potom prevzaté a stanovené na základe literatúry.

Kontaktný uhol a povrchová energia

Kontaktný uhol bol analyzovaný pomocou kontúr kvapky na povrchu vzorky systémom vyhodnotenia povrchovej energie, zariadenia See System (Advex Instruments). Následne sa povrchová energia stanovila metódou sediacej kvapky (sessile drop), z kontaktných uhlov troch kvapalín, vody, ethylénglykolu a dijudomethánu. Princíp tejto techniky je priblížený v odseku 2.5.4.

Aparatúra, spolu s lab. vybavením k analýze bola situovaná na Vysokom učení technickom, Fakulte chemickej v plazmochemickom laboratóriu. Aparatúra pozostáva z Riadiaceho PC s potrebným softvérom (See Software), ktorý umožňuje výpočet povrchovej energie na základe najpoužívanejších modelov (Owens-Wendt-Rable-Kaeble, Wu, Neumann, Liftshitz-van der Waals/acido-bázický, a ďalšie). Ďalej z meracieho zariadenia, ktoré je realizované 1D nastaviteľnou farebnou UVC kamerou a 2D nastaviteľného, podložného stolčeka pre uloženie vzorky.

Analyzovaná vzorka vo forme nanovlákien, alebo kontrolnej fólie, sa pomocou pinzety presunula na podložný, pohyblivý stolček. Následne bola na vzorku pipetou nanosená kvapka o objeme 2 μl ., a v tom okamihu bola spravená fotografia kvapky, najneskôr do 5 s, tým sa zamedzilo deformácii kvapky vplyvom gravitačnej, alebo inej vonkajšej sily pôsobiacej na kvapku. Kvapiek bolo na povrch nanosených 11, aby bola možná eliminácia nehomogenity

a prípadnej chyby experimentátora. Takto boli z meranej sady vylúčené kontaktné uhly, ktoré sa značne odlišovali od ostatných.

Povrchová energia sa stanovila acidobázickým modelom, ktorý umožňoval výpočet povrchovej energie pri oddelení polárnej a nepolárnej zložky, pričom polárna zložka môže byť ďalej rozdelená na bázickú (Sg+) a acidickú (Sg-). Výsledky merania boli exportované v textovom formáte a následne spracované programom Microsoft Excel 2013.

3.4 Kultivácia a následná analýza viability a proliferácie buniek.

Bunky boli kultivované v spolupráci infraštruktúry Oddělení fyziologie a imunologie živočichů Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, pod odborným vedením Mgr. Jiřiny Medalovej Ph.D. a Mgr. Petry Černochovej, ktoré sa aj aktívne zúčastnili na tomto bloku experimentálnej časti diplomovej práce. Po konzultácii, boli pre kultiváciu zvolené bunky s označením A375 (Human malignant melanoma cell lines A375® CRL-1619™), vybrané boli hlavne z dôvodu, že obsahujú zelený fluoreskujúci proteín GFP (green fluorescent protein), teda fluoreskujú, čo je výhodou pri ich pozorovaní a potvrdení, že na danom povrchu proliferovali.

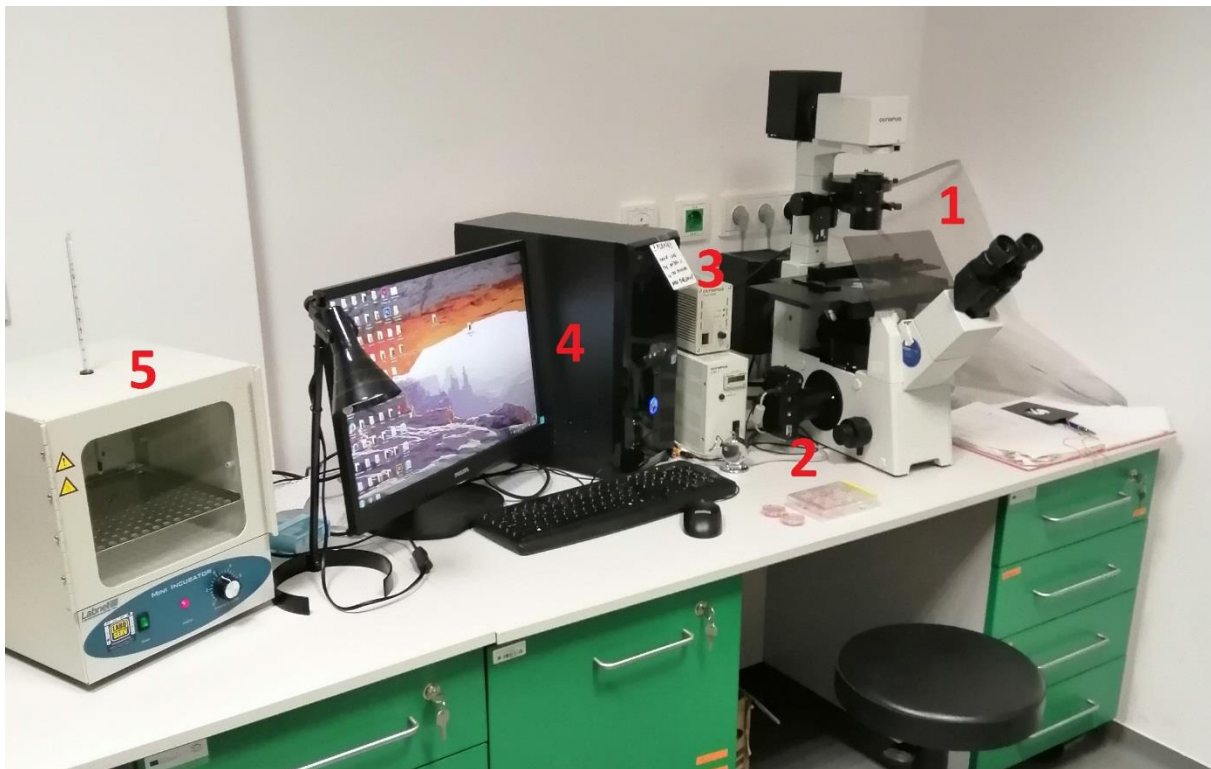
Aparatúra použitá k analýze buniek

Všetka použitá aparatura a vybavenie boli situované na Ústave experimentální biologie MU, konkrétne na Oddělení fyziologie a imunologie živočichů. Súčasťou použitej aparatury počítajúc vybavením laboratória bol flowbox (MSC ADVANTAGE, Thermo Scientific) v ktorom sa pracovalo s bunkovou kultúrou A375 a inkubátor na kultiváciu buniek (Hera Cell, Heraeus). Pre počítanie vysiatych buniek bol použitý optický mikroskop (CKX 41, Olympus) Obrázok 38.



Obrázok 38: Zostava pre kultiváciu, prácu a spočítanie buniek, 1-Flowbox MSC ADVANTAGE, Thermo Scientific), 2-Inkubátor (Hera Cell, Heraeus), 3-Mikroskop (CKX 41, Olympus)

Pre analýzu bunkovej kultúry bola použitá aparatúra: mikroskop (Olympus IX 51), fotoaparát (Olympus) pripojený k mikroskopu, spolu so zdrojom svetla (Olympus) s meniteľnou vlnovou dĺžkou a PC pre spracovanie získaných fotografií. Súčasťou tejto zostavy bol aj mini inkubátor (Labnet), určený na dočasné uchovanie bunkových kultúr Obrázok 39. Ďalej bol k proliferačnému testu použitý prístroj Luminometer Sense (HIDEX), spolu so softvérom, taktiež dodávaným spoločnosťou HIDEX Obrázok 40.



Obrázok 39: Zostava pre analýzu buniek, 1-Mikroskop (IX 51, Olympus), 2-fotoaparát (Olympus) propojený k PC, 3-Laditeľný zdroj svetla, 4-PC s monitorom slúžiaci k spracovaniu získaných fotografií z mikroskopu, 5-Mini-Inkubátor (Labnet)

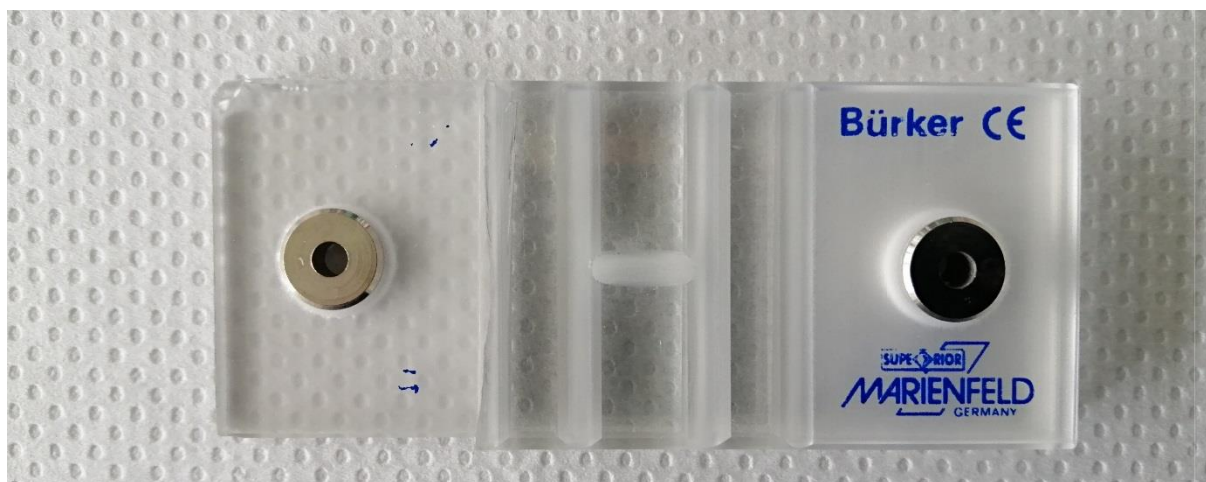


Obrázok 40: Zostava pre príliferčný test, 1-Luminometer (Multimodal Microplate Reader, HIDE X Senese), 2-riadiaci PC s programom (HIDE X), 3-Automatizovaná digitálna pipeta (Research pro, Eppendorf)

Postup práce

Ako je uvedené vyššie, vybraná bunková kultúra A375 bola poskytnutá ústavom experimentálnej biologie MU, konkrétne na Oddelením fyziologie a imunologie živočíchů. Prvým krokom pred samotnou prácou s bunkovou kultúrou bolo nutné sterilizovať flowbox pomocou ethanolu.

Kultúra buniek A375 bola na 5 ml polystyrénových miskách firmy TPP. Najprv bolo bunkovej kultúre odsaté živné médium DMEM (Dulbecovo modifikované Eaglovo médium, High glucose, Gibco, Thermo Fisher Scientific), s prídavkom 20 % FBS (fetálne hovädzie sérum, Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1,2 mM L-glutaminu (Gibco, Thermo Fisher Scientific), a 100 U/ml Penicilinu/Sreptomycinu (HyClone, Thermo Fisher Scientific), opatrne sa opláchli 5 ml PBS (fosfátový tlmivý roztok, phosphate buffered saline, pH 7,4). Pre enzymatické uvoľnenie z povrchu misky, bolo použité 1 ml trypsin-EDTA (kyselina ethyléndiamintetraoctová, Biotech, LM-T1706/100). Po približne 5 minútach inkubácie buniek s trypsin-EDTA došlo k uvoľneniu buniek, vizuálnou kontrolou, bolo možné vidieť zaguľatenie buniek a ich voľný pohyb v roztoku.. Následne bol trypsin zneutralizovaný kultivačným médiom DMEM. Ďalej v práci bude používané a označované toto médium DMEM, ak nebude špecifikované inak. Takto boli pripravené 4 ml zásobného roztoku s bunkami, ktorý bol umiestnený do skúmavky. Z tejto skúmavky bolo odobrané 0,5 ml suspenzie buniek. Táto suspenzia bola následne kvapnutá na hranu Bürkerovej komôrky (Marienfeld-Superior) Obrázok 41, a tá bola umiestnená pod mikroskop (CKX 41, Olympus) Obrázok 38. V 30 políčkach boli pod mikroskopom, pomocou počítadla spočítané bunky, vždy v ploche vyznačeného políčka, prípadne na dvoch zvolených hraniciach daného políčka. Výpočtom bolo zistené, že vysiatych bolo 6033000 buniek.



Obrázok 41: Bürkerova komôrka (Marienfeld-Superior)

Vo flowboxe som si prichystal tiež sterilné dvojdielne plastové korunky (CellCrown™, Inserts, Sigma Aldrich) Obrázok 42, ktoré slúžia k uchytieniu nanovláknien a kultiváciu buniek na takto uchytенých nanovláknach. Nanovláknna bolo nutné najskôr nastrihať na štvorčeky o hrane 10 až 12 mm. Na modifikovanú, alebo aj vrchnú stranu nanovláknien sa nasadil masívnejší diel a celé sa to spolu s nanovláknami napevno uchytilo nasadením krúžkového dielu zo spodnej strany. Táto operácia bola veľmi citlivá na presnosť a manipuláciu, tak s nanovláknami, aby nedošlo k ich poškodeniu či kontaminácii a boli tesne nasadené, ako aj

s plastovými korunkami, nakoľko diely sú to veľmi malé, v priemere má väčší diel korunky len 1 cm. Pripravených bolo 9 koruniek s nanovláknami, a to 3 pre plazmovú polymerizáciu a 6 pre hybridnú metódu aplikovanú v Zlíne, plus dve kontrolné misky o objeme 2 ml Obrázok 42. Takto uchytené nanovlákná v korunkách boli pomocou pinzety vložené do plastových misiek. Dôvodom bolo, že po prepipetovaní suspenzie buniek dochádza k priesaku média cez nanovláknennú štruktúru, následkom čoho by bunky zostali bez média exponované atmosfére a uhynuli by.



Obrázok 42: A) Kultúra buniek A375 vysiatá na korunky s uchytenými nanovláknami, umiestnená do plastových kultivačných misiek. B) Dvojdielna korunka (CellCrown™, Insets, Sigma Aldrich), väčší masívny diel sa umiestňoval výrezmi na modifikovanú stranu nanovláknien a menší krúžkový diel sa nasádzal z druhej strany, tak aby napevno uchytil nanovlákná.

Do takto pripravenej zostavy korunky s nanovláknami uloženej do kultivačnej misky sa pomocou pipety potom vysievali bunky, cca 50 000 buniek na korunku a 100 000 na kontrolnú misku, čo spolu dávalo 650 000 buniek. Zo zásobného roztoku bolo vypočítaných a odobraných 430 μ l, a to bolo doplnené pre ľahšiu prácu na 13 ml. Takže každý ml v tomto roztoku obsahoval 50 000 buniek. Takto bol pipetovaný 1 ml pre každú korunku s uchyteným nanovláknom a 2 ml pre obe kontrolné misky. Pripravené bunky boli uložené ku kultivácii na 48 h v inkubátore Heraeus, teplota bola nastavená na 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti. Po 48 hodinách boli bunky pripravené na analýzu

Najprv boli bunkové kultúry na nanovláknach analyzované pomocou mikroskopu, aparátúra Obrázok 39. Bunky sa preniesli do mini inkubátoru, keď sa s nimi nepracovalo boli tam umiestnené, aby neutrpeli poškodenie. Po zapnutí PC a celej zostavy bolo nutné ešte vybrať zväčšenie, vybrané bolo 20000 a 40000 násobné zväčšenie a zaostriť obraz. Taktiež bol ešte nastavený laditeľný filter na mikroskope na ktorom bola vybraná modrá farba svetla. Po zaostrení sa uzavrela uzávere z pravej strany mikroskopu a boli snímané fotky. Ak neboli bunky fotené, tak sa uzavrel uzáver, takzvaný shooter, aby sa chránili bunky pred vysvietením. K práci s obrazom bol použitý softvér QuickPhoto Micro 3.0 (Promicro). Počas fotenia musela byť v miestnosti tma, kvôli svetelnému znečisteniu.

Druhým krokom bol proliferačný test, ktorý bol realizovaný pomocou stanovenia relatívneho množstva ATP na aparátúre zobrazenej na Obrázok 40. Metóda bližšie priblížená ku koncu kapitoly 9, je založená na chemiluminiscencii sprostredkovanej ATP z lyzátu buniek kultivovaných na modifikovaných nanovláknach. Prvým krokom bolo odsatie média a oplach s PBS, bolo však treba pristupovať opatrne, aby sa nepretrhli nanovlákná uchytené

v korunkách. Tento krok odstránil mŕtve bunky a zvyšné médium, ktoré by mohlo neutralizovať lyzačný roztok. Druhým krokom bolo pridanie 200 μ l lyzačného roztoku FLSAR-1VL Somatic cell ATP releasing reagent for ATP determination (Sigma Aldrich). Celá zmes bola následne umiestnená 10 min na trepačke. Ďalším krokom bolo pipetovanie 20 μ l lyzátu do pripravených mištičiek umiestnených na pracovnej plastovej doštičke Obrázok 43.

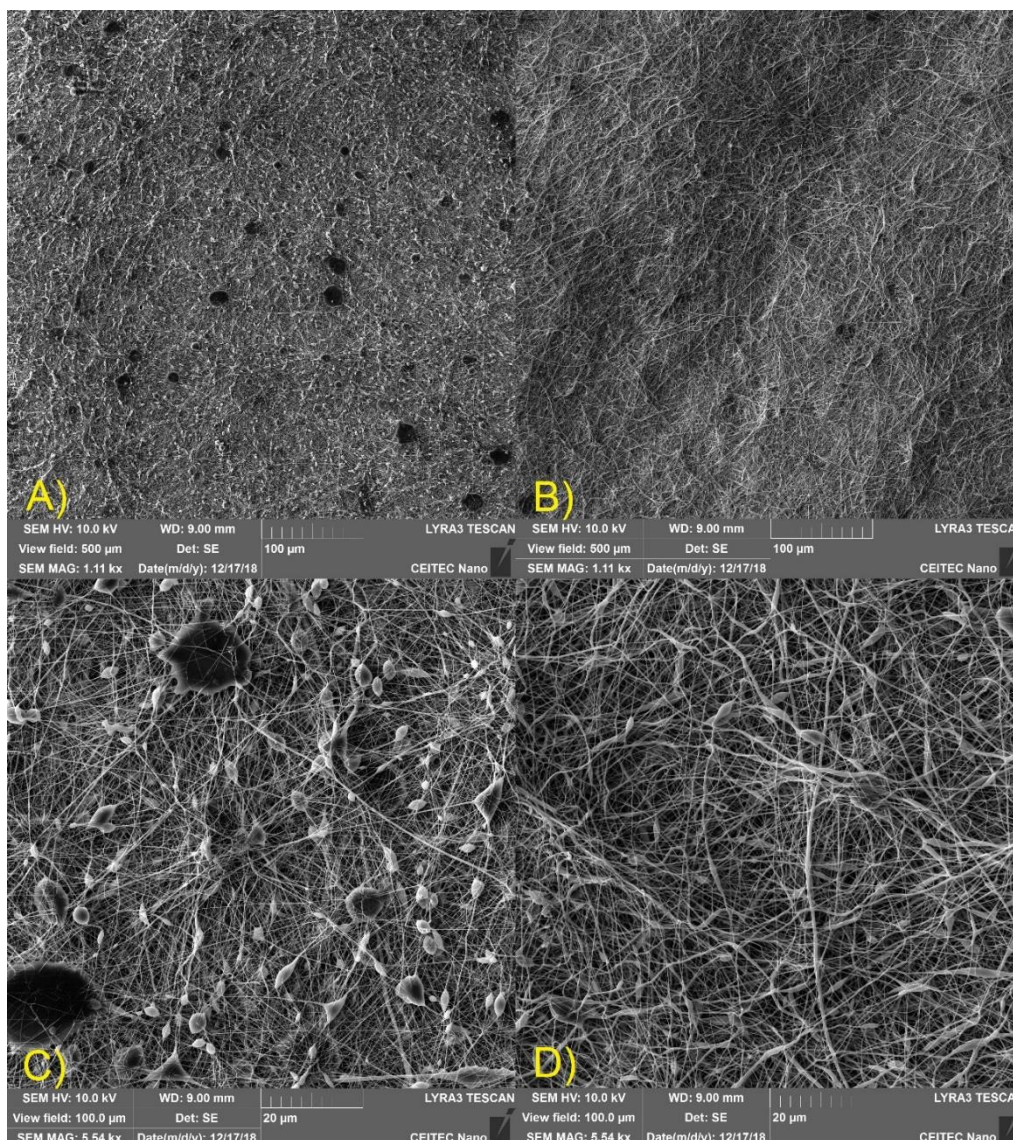


Obrázok 43: Pracovná doštička (Microtiter) s umiestnenými mištičkami, uložená na automatiky výsuvnej podložke z Luminometru (Multimodal Micropalte Reader, HIDEX Senese)

Meranie bolo robené duplikátne. Posledným krokom bolo pridanie reagentu luciferínu s luciferázou do každej mištičky v pomere 1:1 s lyzátom. Tento krok musel prebiehať rýchlo, preto bola použitá automatická digitálna pipeta (Research Pro, Eppendorf) Obrázok 40. Na jeden raz bol do pipety natiagnutý väčší objem a potom pomocou tlačidla bolo možné vždy napipetovať rýchlo rovnaký objem. Pracovná doska (Microtiter) s mištičkami bola umiestnená bodom A1 k označeniu A1, ako je vidieť na Obrázok 43, následne bola automaticky vťahnutá do prístroja, kde bola pretrepaná po dobu 1 s, aby došlo k dôkladnému premiešaniu reagentu s lyzátom. Meraná bola chemiluminiscencia pomocou prístroja Luminometru (Multimodal Micropalte Reader, MIDES Sense) a dodaného programu (Hidex), výstupom bola intenzita luminiscencie, ktorá bola spracovaná pomocou programu Microsoft Excel 2013.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

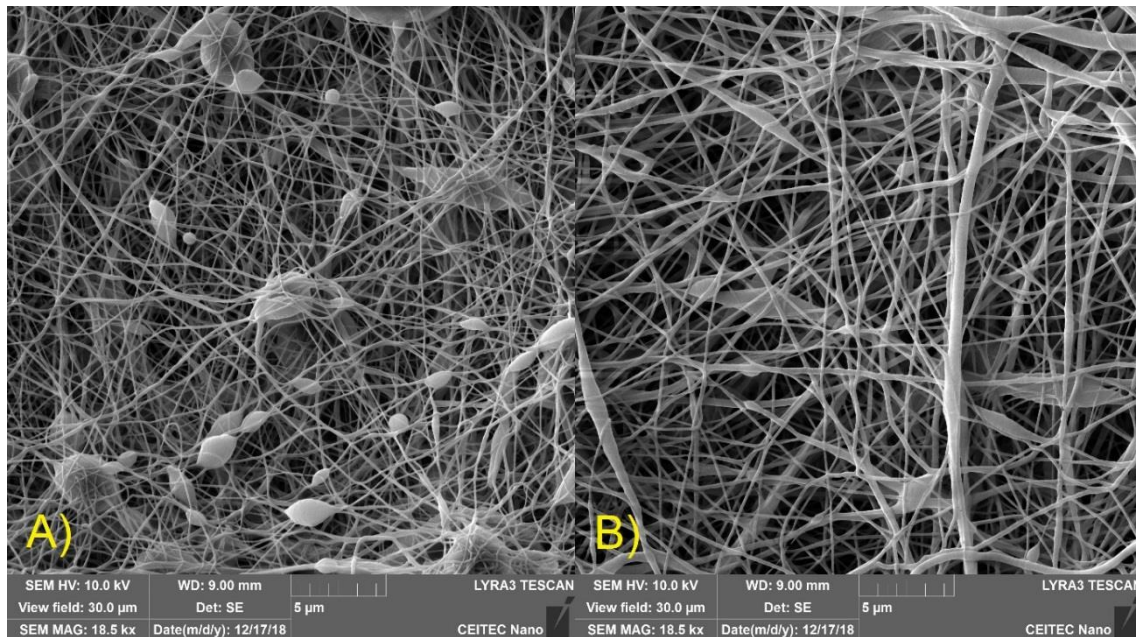
Získané výsledky sú prezentované v grafoch obrázkoch, alebo tabuľkách. Ako prvé boli získane snímky pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM), pre potvrdenie úspešnosti zvlákňovanie. Najskôr boli analyzované dve koncentrácie roztoku polykaprolaktónu. Cieľom bolo získať homogénne vlákna, ktoré mohli byť použité pre modifikáciu.



Obrázok 44: Snímka nanovláčien zo skenovacej elektrónovej mikroskopie, A)-Nanovláčna zo 7 % roztoku PCL pri zväčšení 1,11-tisíckrát, B)-Nanovláčna z 9 % roztoku PCL pri zväčšení 1,11-tisíckrát, C)-Nanovláčna zo 7 % roztoku pri zväčšení 5,54-tisíckrát, D)-Nanovláčna z 9 % roztoku PCL pri zväčšení 5,54-tisíckrát.

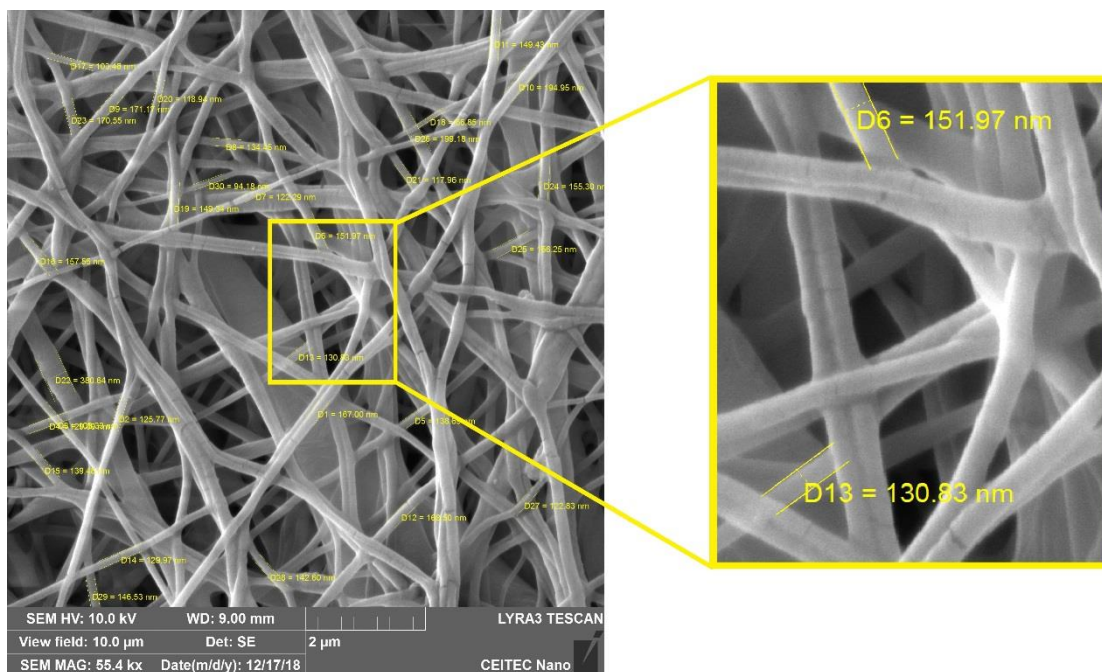
Pri zväčšení 1,11 kx, ktorému odpovedá Obrázok 44 A), ešte nie je pri 7% roztoku vidieť dobre vlákna, no možné na vláknach pozorovať útvary, akési „perličky“. Tmavé fľaky, ktoré boli dobre pozorovateľné pri zväčšení 5,54 kx boli spôsobené reziduom rozpúšťadla, teda roztokom koncentrovaných organických kyselín, ktoré zrejme leptali polymérne nanovláčna a vytvárali väčšie kusy polyméru. Potom pri 5,54-tisíc násobnom zväčšení je vidieť rozdiely v

hrúbke vlákien, ako je zobrazené na Obrázok 44 C) a D). Ukázalo sa, že aj 9% roztok spôsobil tiež nehomogenitu, ale v menšej miere.



Obrázok 45: Snímka nanovlákien zo skenovacej elektrónovej mikroskopie. A)-Nanovlákná zo 7 % roztoku PCL, pri 18,5-tisíc násobnom zväčšení, B)-Nanovlákná z 9 % roztoku PCL, pri 18,5-tisíc násobnom zväčšení.

Pri väčšom priblížení, ktoré ukazuje Obrázok 45, boli rozdiely medzi vláknami pripravenými roztokmi značné. Tu sa ukazujú aj „perličkové“ útvary na vláknach pripravených zo 7 % roztoku. Tieto boli spôsobené zrejme so zmenou koncentrácie počas procesu zvlákňovania. Pri zvlákňovaní sa neustále odparovalo rozpúšťadlo plus samotné zvlákňovanie mali za následok zmenu koncentrácie, preto musel byť počet posunov a dĺžka posunu limitovaná. Po následných konzultáciách bol stanovený počet posunov na 4, dĺžka posunu v rozmedzí od 250 mm do 300 mm a nutnosťou bola výmena roztoku, spolu s umytím vaničky aj elektródy v konc. kyseliny octovej.



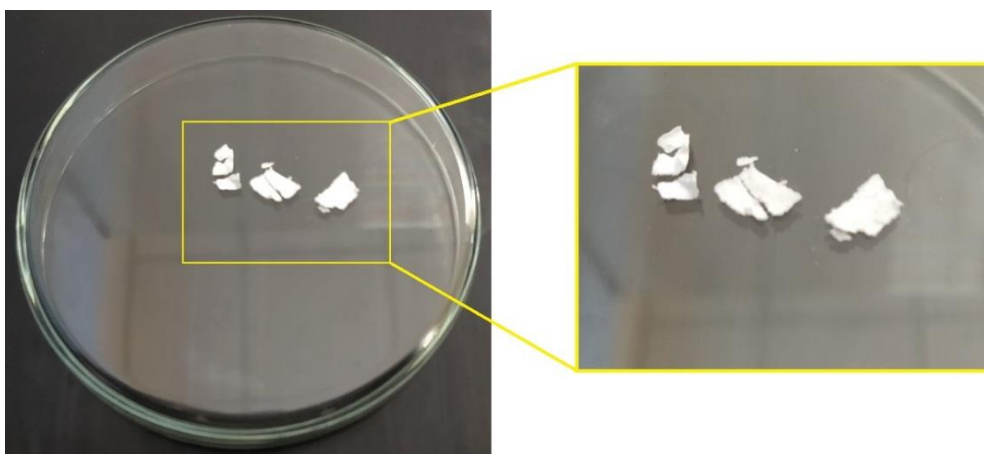
Obrázok 46: Snímka nanovlákein z elektrónovej skenovacej mikroskopie, pripravených z 9% roztoku PCL

Následne boli na snímkach s najväčším 55,4-tisíc násobným priblížením merané priemery nanovlákein, ako ukazuje Obrázok 46, a zapísané do textového dokumentu, ten bol spracovaný za pomoci programu Excel 2013 (Microsoft). Výsledok porovnania hrúbky priemerov vlákien je zobrazený v Tabuľka 3. Z výsledkov bolo vidieť, že hrúbka vlákien pri použití 9 % roztoku je lepšia, no odchýlka tiež poukazuje na nehomogenitu v hrúbke. Cieľom bolo pripraviť, čo možno najhomogénnejšie vlákna bez defektov, a hoci nehomogenita pri 9 % roztoku pretrvávala ostatné defekty, ako „perličky“ a väčšie kusy polyméru sa podarilo eliminovať.

Tabuľka 3: Priemerná hrúbka pripravených nanovlákein

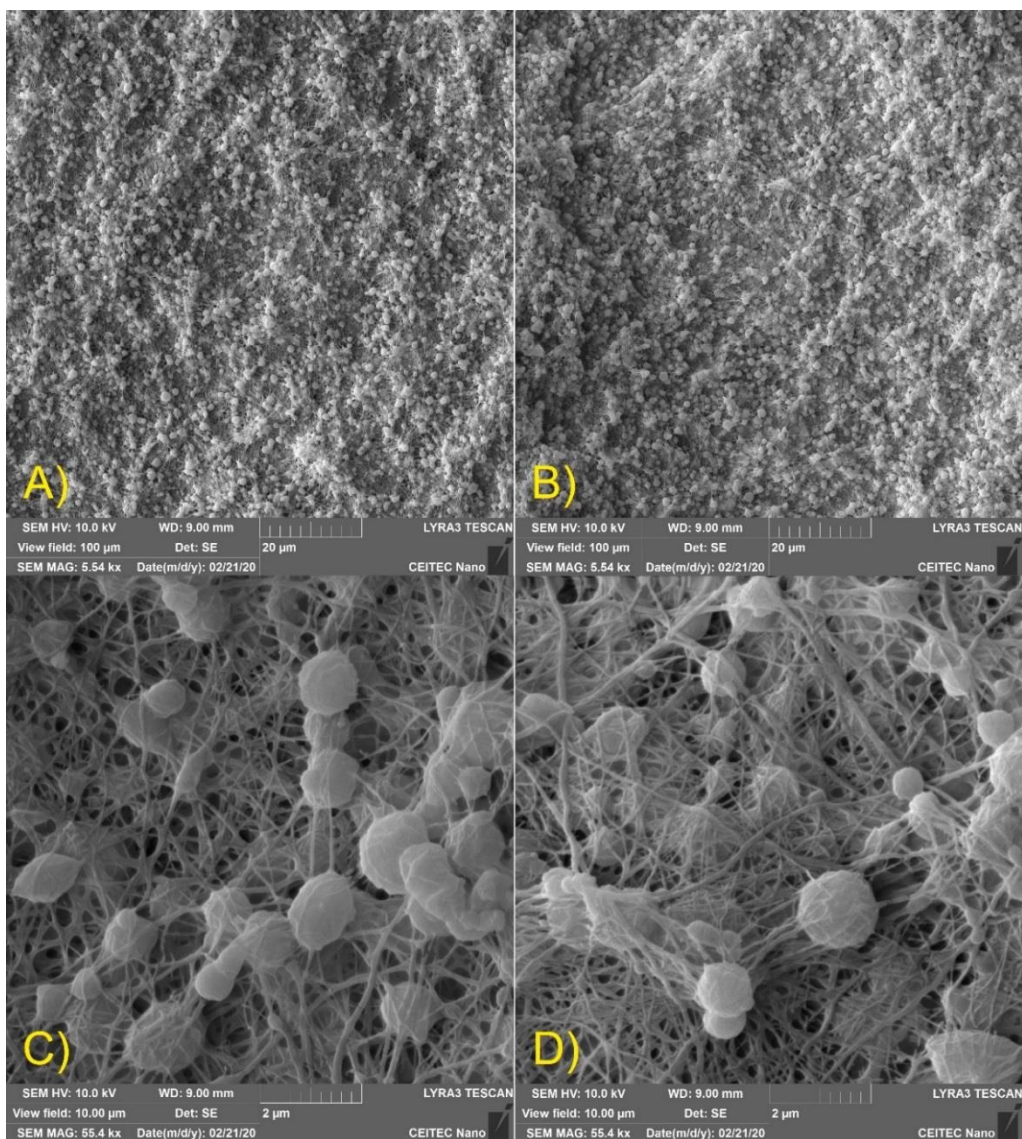
Roztok	Priemer hrúbok nanovlákein [nm]	Odchýlka [nm]
7%	100,1	±25,13
9%	148,14	±52,17

Počas modifikácii došlo k dvom pozorovaniam. Pri stratégii založenej na chemickom prístupe dochádzalo u vzoriek k tuhnutiu nanovlákein po aminácii. Vodné aj alkoholové roztoky pri všetkých koncentráciách, zanechávali nanovlákná tuhé a krehké. Na ich povrchu ostávala tuhá kryštalická vrstva, ktorá pôvodne pružné vzorky nanovlákein obalila a spôsobila, že ostávali krehké a nebolo možné s nimi uspokojivo pracovať.



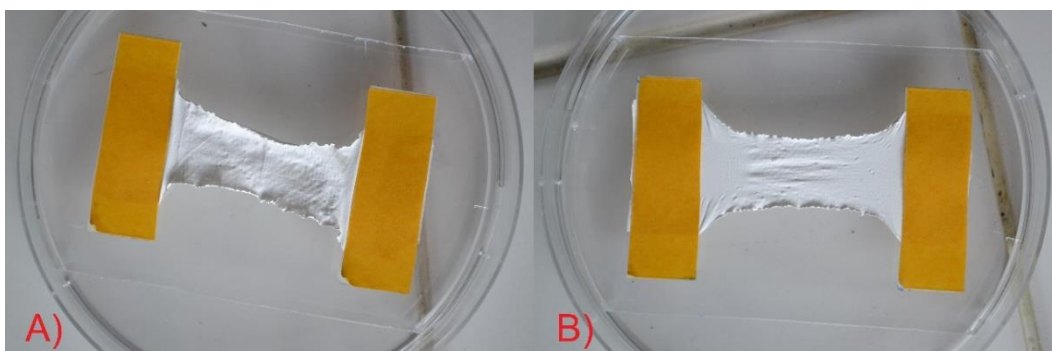
Obrázok 47: Nanovlákná modifikované 2% roztokom izopropylalkoholu

Na Obrázok 47 je vidieť, že vzorka stratila mechanické vlastnosti, nanovlákná sú natoľko krehké, že pri manipulácii s nimi došlo k ich lámaniu. V tomto prípade šlo o vlákna modifikované chemickou cestou 2 % izopropylalkoholovým roztokom diaminohexánu. Tieto boli podrobené analýze pomocou SEM, snímky pri rôznych zväčšeniach sú na obrázku Obrázok 48. Rozdiely medzi vzorkou, ktorá nebola (Obrázok 48 A, D) a bola po modifikácii finálne opláchnutá destilovanou vodou sú takmer zanedbateľné. Štruktúra nanovláknien je v oboch prípadoch obalená kryštálkami diaminohexánu. Guličky, ktoré sa objavili na štruktúre sú zrejme tvorené vykryštalizovaným diaminohexánom.

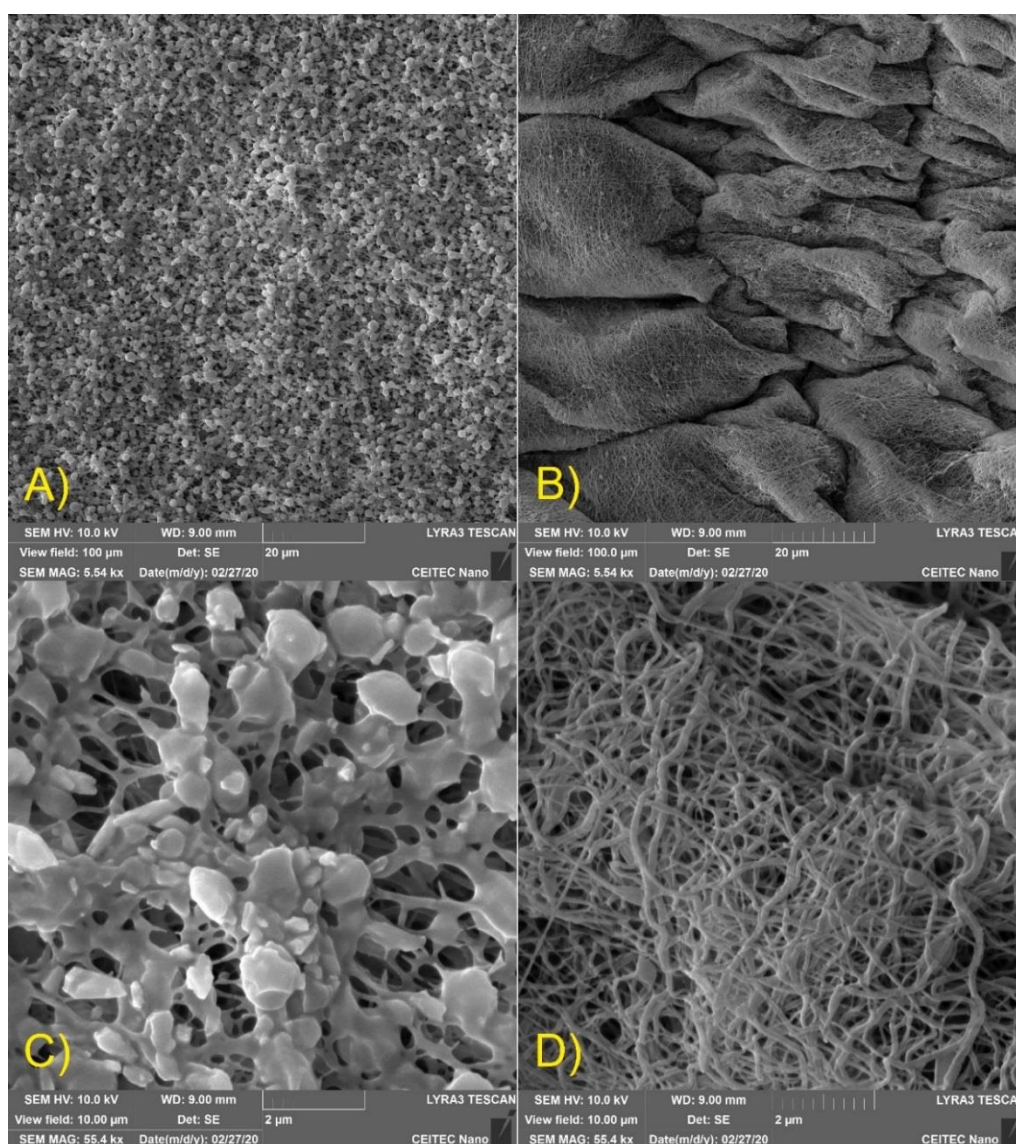


Obrázok 48: Snímky z elektrónového mikroskopu. A)-Nanovlákná po modifikácii 2% roztokom izopropylalkoholu, bez finálneho oplachu, pri 5,54-tisíc násobnom zväčšení, B)-Nanovlákná po modifikácii 2% roztokom izopropylalkoholu s finálnym oplachom, pri 5,54-tisíc násobnom zväčšení, C)-Nanovlákná po modifikácii 2% roztokom izopropylalkoholu, bez finálneho oplachu, pri 55,4-tisíc násobnom zväčšení, D)-Nanovlákná po modifikácii 2% roztokom izopropylalkoholu, s finálnym oplachom, pri 55,4-tisíc násobnom zväčšení.

Pri hybridnej modifikácii využívajúcej plazmu dochádzalo pri vystavení nanovlákien plazme k ich stiahnutiu. Preto bol výkon výboja znížený na polovicu, teda na 50 W. K stiahnutiu nanovlákien však dochádzalo stále, ako ukazuje porovnanie Obrázok 49, avšak s menšou mierou, ako ukazuje Obrázok 49 A). Nanovlákná boli následne analyzované pomocou SEM, ako ukazuje Obrázok 50. Rozdiely v nanovláknach sú jednoznačné, na Obrázok 50 B), je vidieť morfológiu, výsledok zvráštenia a sťahovania sa nanovlákien. K tomuto javu došlo, ale len pri aplikácii výkonu 100 W, keď bol výkon znížený na polovicu, tak morfológia modifikovaných vlákien, zobrazená na Obrázok 50 A), je porovnateľná s nemodifikovanými.



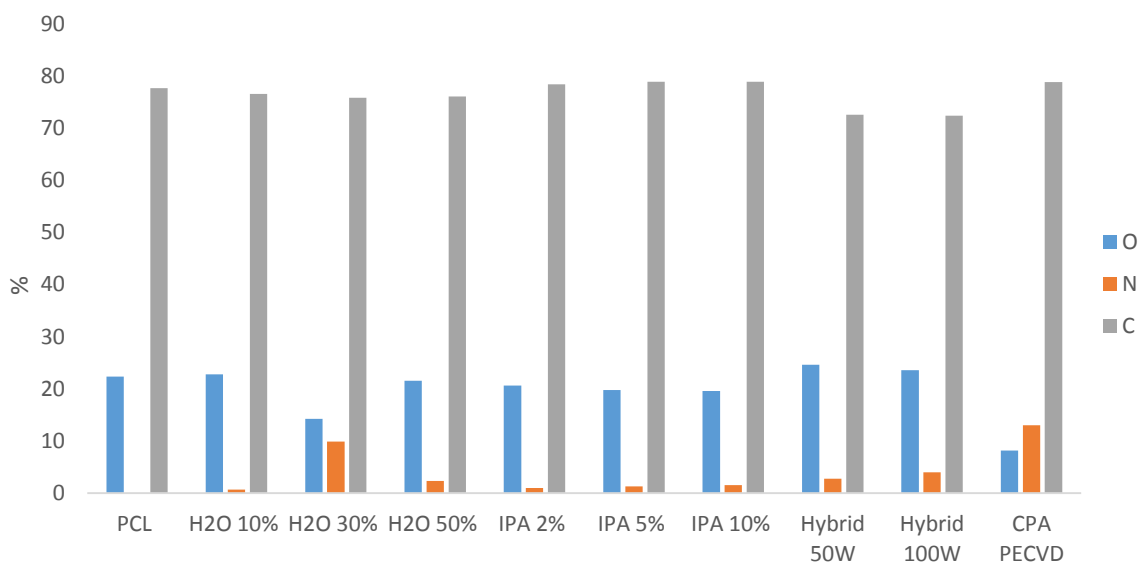
Obrázok 49: Vlákna modifikované hybridnou metódou využívajúcou plazmu. A)-Stiahnuté nanovlákná po aplikácii plazmy s výkonom 50W, B)-Stiahnuté nanovlákná po aplikácii plazmy s výkonom 100W



Obrázok 50: Snímky z elektrónového mikroskopu. A)-Vzorka po modifikácii hybridnou metódou pri výkone 50W, pri zväčšení 5,54-tisícnásobnom zväčšení, B)-Vzorka po modifikácii hybridnou metódou pri výkone 100W, pri zväčšení 5,54-tisícnásobnom zväčšení, C)-Vzorka po modifikácii hybridnou metódou pri výkone 50W, pri 55,4-tisícnásobnom zväčšení, D)-Vzorka po modifikácii hybridnou metódou pri výkone 100W, pri 55,4-tisícnásobnom zväčšení.

Porovnanie úspešnosti metód aminácie

Ďalej boli analyzované jednotlivé metódy aminácie pomocou röntgenovej fotoelektrónovej spektroskopie (XPS).

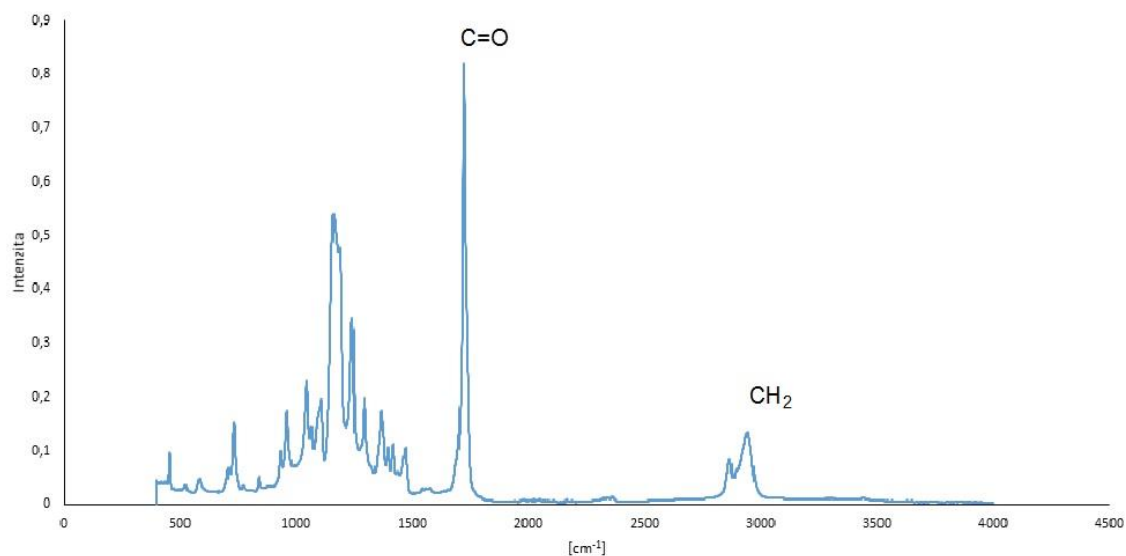


Obrázok 51: Graf percentuálneho zastúpenia prvkov vo všetkých použitých metódach aminácie, analyzovaných pomocou XPS

Na Obrázok 51 môžeme vidieť celkové porovnanie metód. Aminácia prebehla pri všetkých metódach úspešne, avšak nie v rovnakej miere. Plazmová polymerizácia sa spolu s hybridnou metódou sa javí, ako najúspešnejšia. Vodné roztoky diaminohexánu mali menej uspokojivé výsledky, až na 30 % roztok. Najmenej uspokojivé výsledky sa ukazovali pri stratégii využívajúcej chemický prístup, zvlášť potom izopropylalkoholové roztoky.

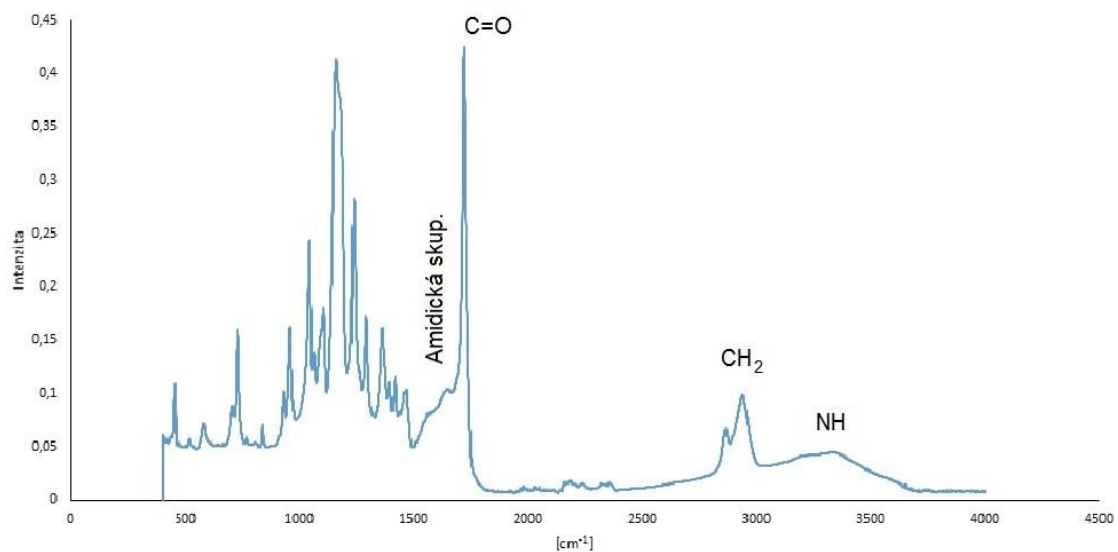
ATR-FTIR

Ďalším typom analýzy bola Infračervená spektroskopia s technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR, z angl. Attenuated total reflection).



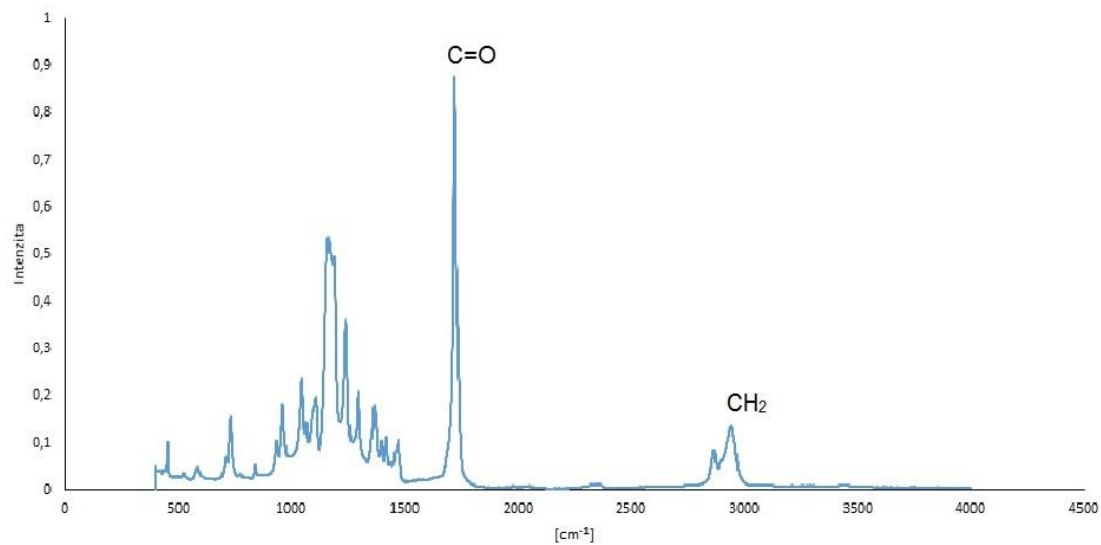
Obrázok 52: Spektrum nemodifikovaných nanovlákien.

Toto spektrum (Obrázok 52) je referenčné, odpovedá použitému polykaprolaktónu, ukazuje sa veľmi pekne pík pri 1700 cm^{-1} , patriaci karbonylovej funkčnej skupine. Náznaky píku v rozsahu $1900\text{ až }2200\text{ cm}^{-1}$ sú spôsobené šumom, pri použití diamantového kryštálu.



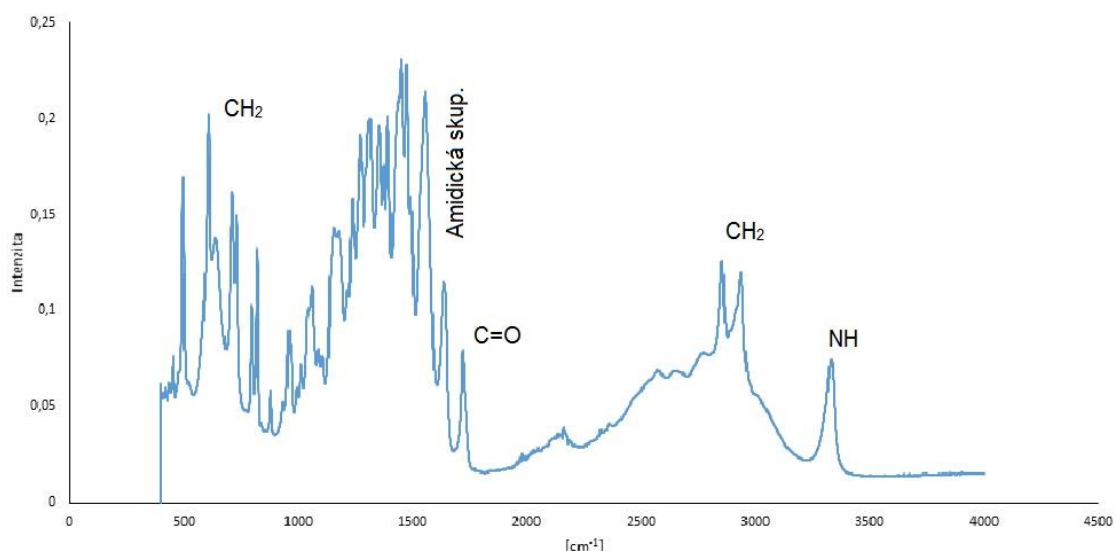
Obrázok 53: Spektrum nanovlákien modifikovaných stratégiou plazmovej polymerizácie

Na tomto spektre (Obrázok 53) je vidieť, že modifikácia uviedla ako aminovú skupinu, pre ktorú odpovedá pík v okolí 3300 cm^{-1} , tak aj amidickú skupinu, pre ktorú je charakteristický pík v okolí v rozmedzí $1500\text{ až }1600\text{ cm}^{-1}$. Stále je prítomný pík pre karbonylovú skupinu .



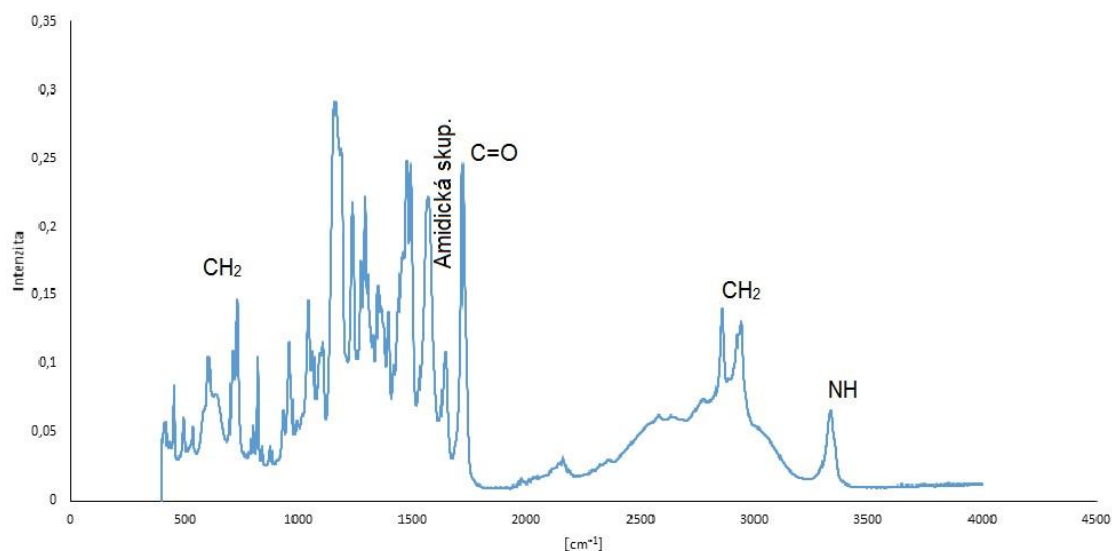
Obrázok 54: Spektrum nanovlákien modifikovaných hybridnou stratégiou využívajúcou plazmu.

Na spektre (Obrázok 54) je vidieť stabilný, intenzívny pík odpovedajúci karbonylovej skupine.



Obrázok 55: Spektrum nanovlákien modifikovaných chemickou cestou. Vybrané spektrum pre 50 % vodný roztok diaminohexánu.

Spektrum (Obrázok 55) ukazuje značný pokles intenzity píku pre karbonylovú skupinu, zato je tu nárast intenzity ostatných píkov. Zvlášť intenzívny je pík v okolí 720 cm^{-1} , kombinačný deformačný pás viacerých skupín, ktorý je charakteristický pre štyri a viac za sebou idúce uhličky v reťazci. Intenzívny je aj pík v okolí 3300 cm^{-1} , pre aminovú skupinu a aj v rozmedzí 1500 až 1600 cm^{-1} , ktorý odpovedá amidickej skupine. Pozorovateľné je tu ešte jasné zaoblenie v rozsahu 2500 až 3000 cm^{-1} , to odpovedá hydroxylovej skupine.

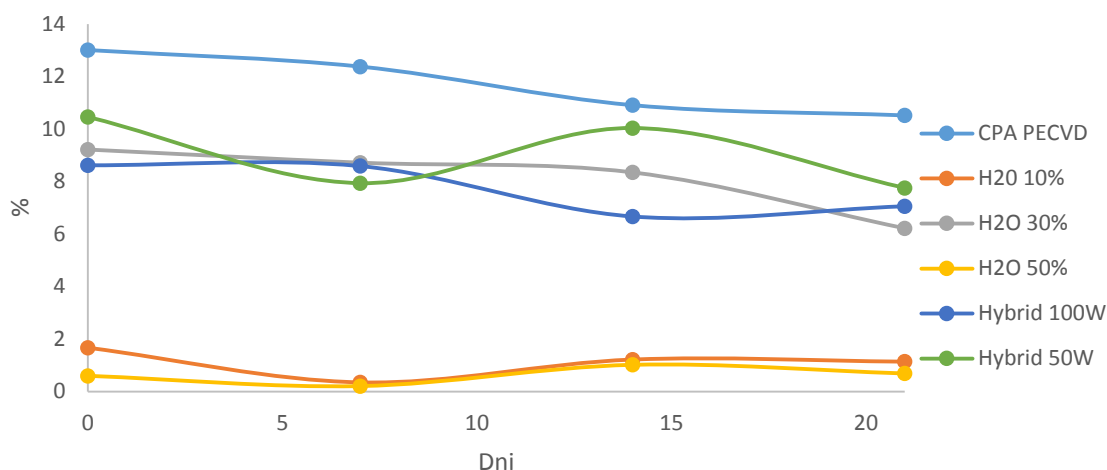


Obrázok 56: Spektrum nanovlákien modifikovaných chemickou cestou. Vybrané spektrum pre 2 % izopropylalkoholový roztok diaminohexánu

Na tomto spektre (Obrázok 56) môžeme vidieť pík pre aminovú skupinu v okolí 3300 cm^{-1} a pre amidickú skupinu v rozsahu 1500 až 1600 cm^{-1} . Objavuje sa tu tiež pík v okolí 720 cm^{-1} , kombinačný deformačný pás viacerých skupín, charakteristický pre štyri a viac za sebou nasledujúcich uhličov v reťazci. Taktiež je viditeľné zaoblenie v rozsahu od 2500 po 3000 cm^{-1} , odpovedajúce hydroxylovej skupine.

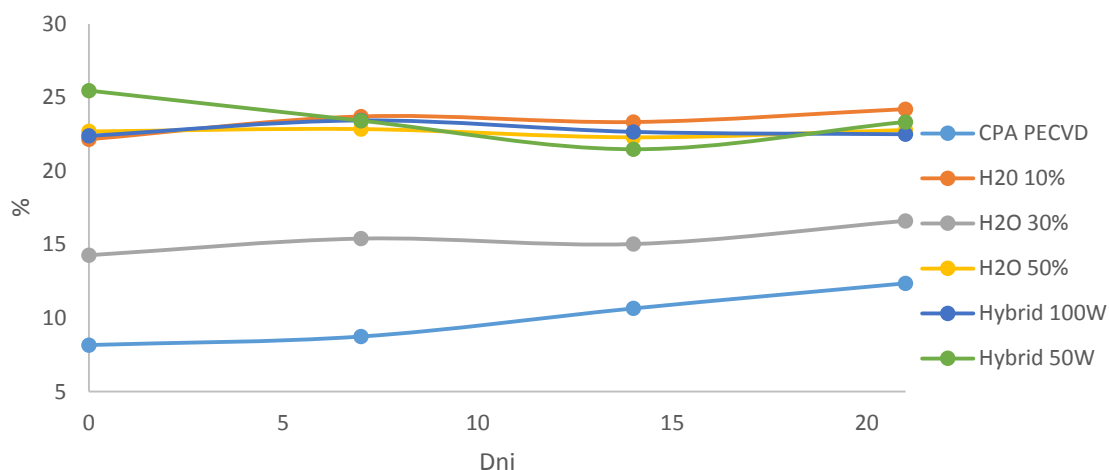
Stabilita modifikácie v čase

Časová stabilita modifikácii sa následne stanovovala pomocou XPS analýzy vzoriek po dobu 3 týždňov na vybraných vzorkách.



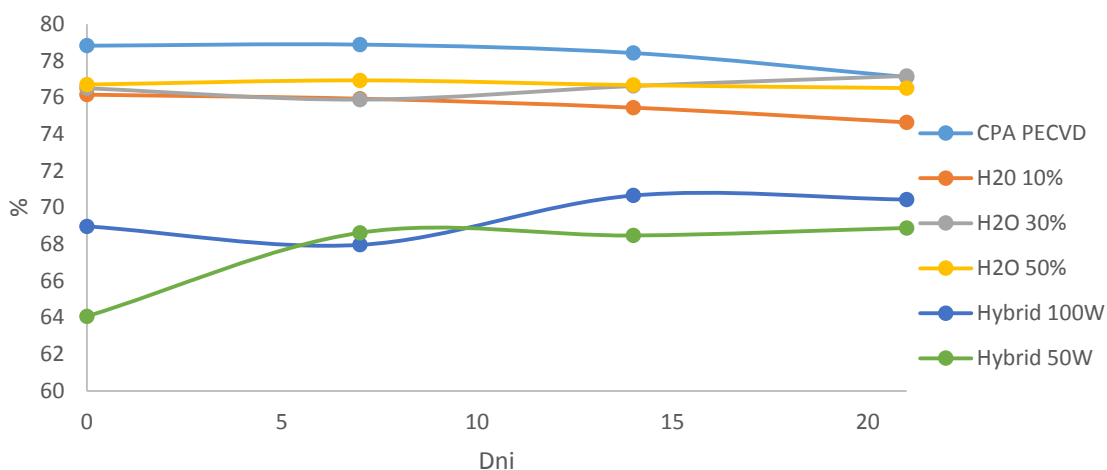
Obrázok 57: Zmena percentuálneho podielu dusíku na vybraných modifikovaných nanovláknach po dobu 21 dní

S časom sa menilo percentuálny podiel dusíku na vzorkách (Obrázok 57), s podobným pomaly klesajúcim trendom. Výkyv, ktorý vidíme pri hybridnej metóde, mohol byť spôsobený nehomogenitou vzorky, vzorka sa totiž merala vždy na inom mieste. Stabilný trend si však zachovali vzorky nanovláknien modifikované 10 a 50 % vodnými roztokmi diaminohexánu.



Obrázok 58: Zmena percentuálneho podielu kyslíka na vybraných modifikovaných nanovláknach po dobu 21 dní

Percentuálny podiel kyslíka s časom, ktorý je zobrazený na Obrázok 58 rástol podobne pri všetkých vodných roztokoch diaminohexánu, tento trend sledovala aj vzorka nanovláknien modifikovaných pomocou plazmovej polymerizácie. Jedine pri hybridných metódach bol trend opačný, mierne klesajúci.

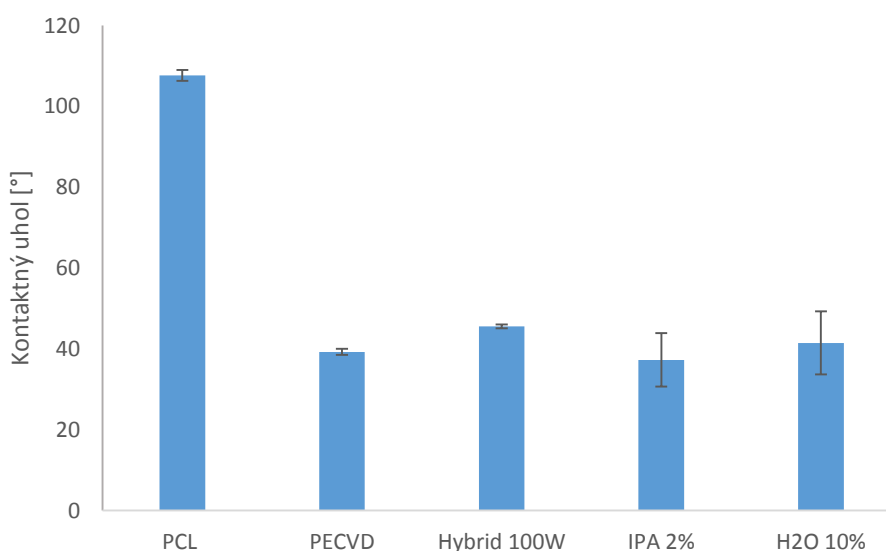


Obrázok 59: Zmena percentuálneho podielu uhlíka na vybraných modifikovaných nanovláknach po dobu 21 dní.

Na je vidieť na Obrázok 59 trend klesajúceho percentuálneho podielu uhlíka sledovali vzorky modifikované chemickou cestou, 10 a 30 % vodný roztok diaminohexánu a vzorka modifikovaná plazmovou polymerizáciou. Stúpajúci trend bol pri vzorkách využívajúcich na modifikáciu hybridnú metódu.

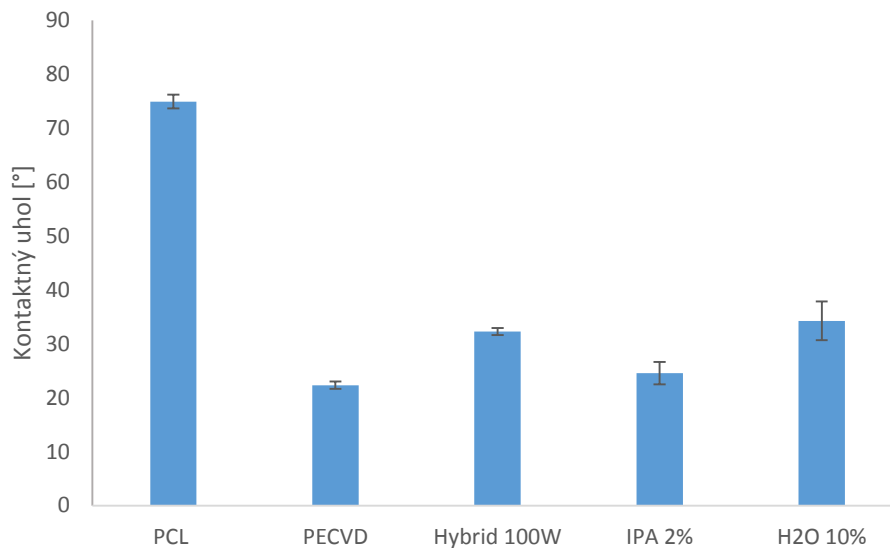
Zmäčavosť

Alternatívny prístup podobne modifikovaných tenkých fólii PCL bol zvolený v tomto bode preto, aby mohli byť porovnané vplyvy jednotlivých modifikácií na zmáčavosť PCL. Nakoľko nanovlákná modifikované hybridnou metódou sa sťahovali a nanovlákná modifikované chemickou cestou ostali krehké, a pre túto analýzu nevhodné. Fólie pre túto analýzu boli pripravené lisovaním peletiek PCL za horúca.



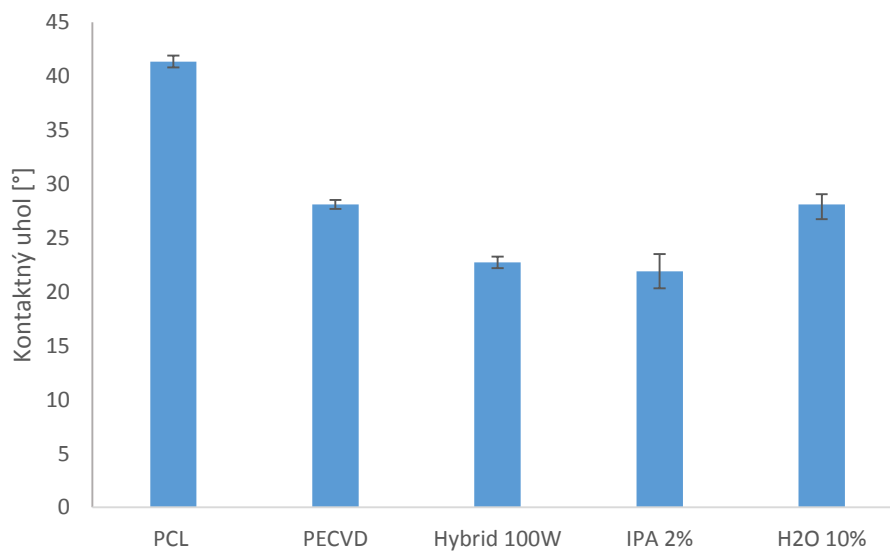
Obrázok 60: Porovnanie kontaktného uhlu čistého PCL voči vybraným vzorkám fólii pre vodu

Všetky stratégie modifikácie sa ukázali, ako úspešné, kontaktný uhol klesol pod 90° a modifikované vlákna sa stali hydrofilné. Ako najlepšou sa javí metóda plazmovej polymerizácie, nakoľko má malú odchýlku a nízky kontaktný uhol.



Obrázok 61: Porovnanie kontaktného uhlu čistého PCL voči vybraným vzorkám fólii pre diiodomethán

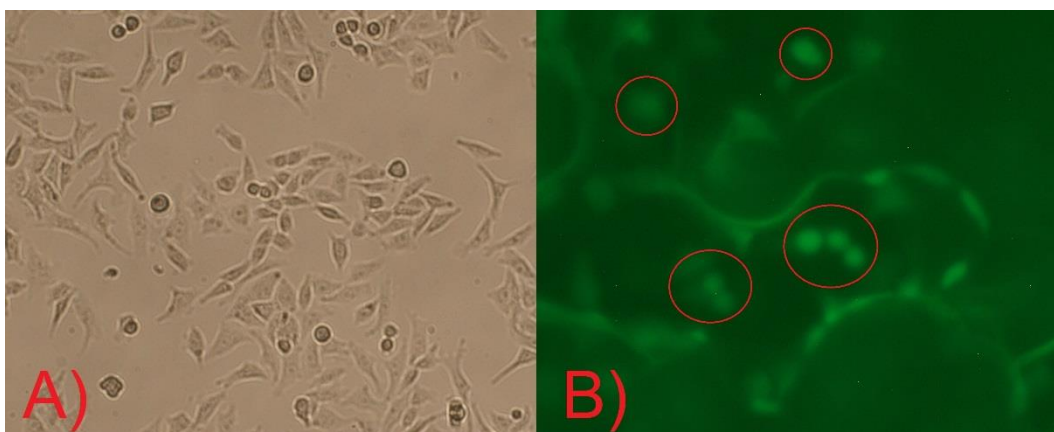
V prípade diiodometánu nastala najväčšia zmena kontaktného uhlu pri modifikácii pomocou plazmovej polymerizácie.



Obrázok 62: Porovnanie kontaktného uhlu pre ethylénglykol čistého PCL voči vybraným vzorkám fólii

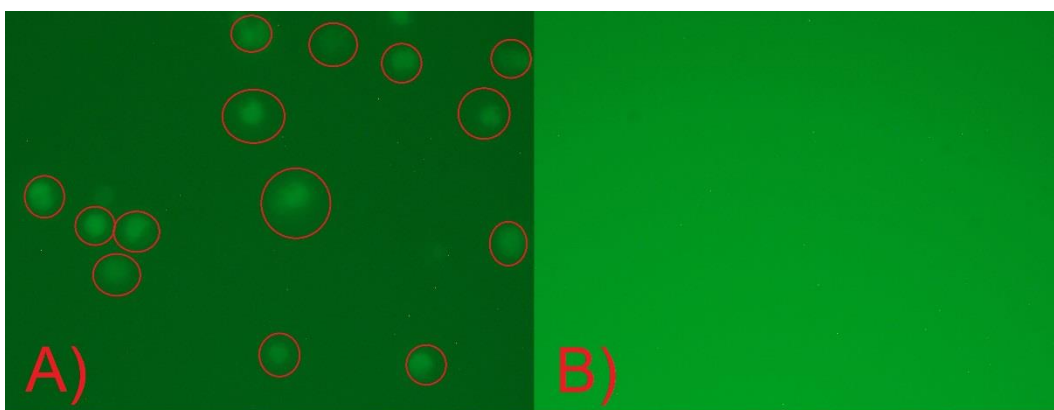
Najväčšia zmena kontaktného uhlu pri použití ethylénglykolu nastala u vzorky modifikovanej hybridnou stratégiou.

Kultivácia a proliferácia buniek



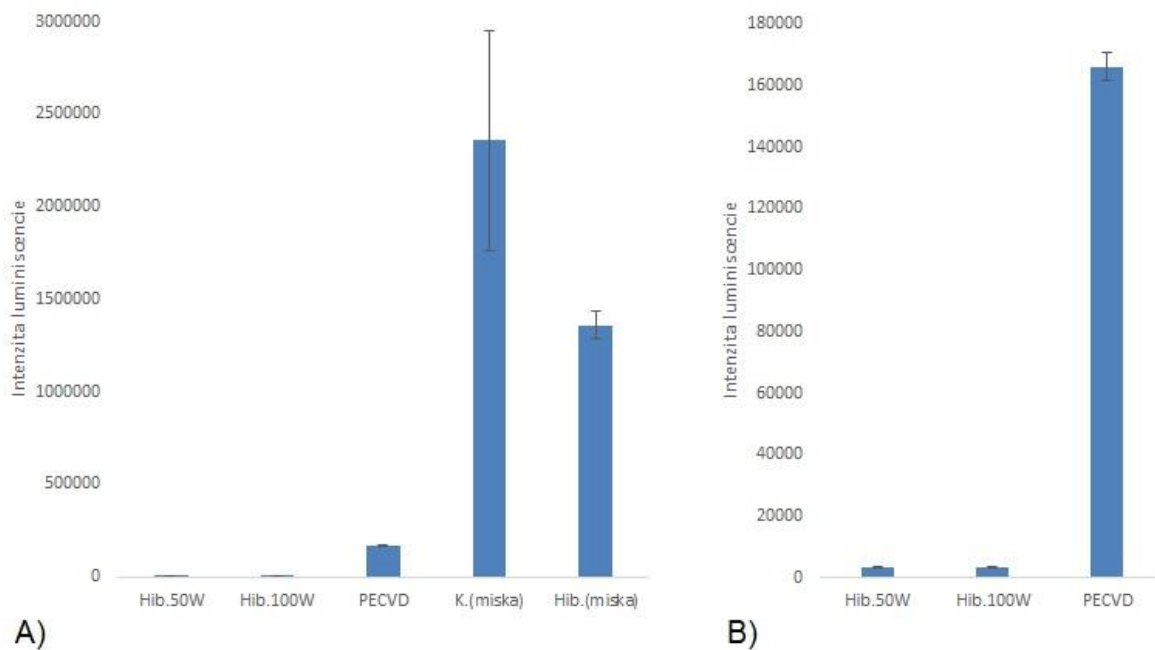
Obrázok 63: Snímka z optického mikroskopu, vybrané zväčšenie 20×10^3 , A)-Kontrola so svetlom, B)-Kontrola bez svetla

Kontrolná sada buniek proliferovaných na miskách s PCL. Na Obrázok 63 B) je vidieť bunky, ako malé zelené svetielkujúce body, ktoré bolo ťažko rozoznať od okolia, naproti tomu na Obrázok 63 A) je bunky vidieť veľmi zreteľne.



Obrázok 64: Snímka z optického mikroskopu, vybrané zväčšenie 20×10^3 , A)-Priestor mimo korunku s nanovláknami, spomínanú v kapitole 3.4, B)-Nanovlákná s kultivovanými bunkami

Na Obrázok 64 A) sú bunky snímané v kultivačnej miske vedľa korunky, ktorá bola spomínaná vyššie v kap. 3.4. Ich počítanie zo snímky je v tomto prípade limitované, hoci vidieť sú, nie je to dostačujúce. V prípade snímky priamo z nanovlákien, ktorú vidíme na Obrázok 64 B), je nemožné rozlíšiť bunky od pozadia.



Obrázok 65: A)-Graf intenzity luminiscencie na modifikovaných nanovláknach (hibridnou stratégiou využívajúcou plazmu pri výkone 50W a 100W, stratégiou plazmovej polymerizácie), a na kontrolných miskách. B)-Graf intenzity luminiscencie na modifikovaných nanovláknach hibridnou stratégiou využívajúcou plazmu pri výkone 50W a 100W a stratégiou plazmovej polymerizácie (PECVD)

Na Obrázok 65 je vidieť mieru intenzity luminiscencie, ktorá je ukazovateľom proliferácie buniek na povrchu. Môžeme vidieť, že po 48 h sa bunkám najviac darilo na kontrolných miskách. Keď si však porovnáme len vybrané metódy medzi sebou, tak na Obrázok 65 B) vidíme, že najúspešnejšie bunky proliferovali na nanovláknach modifikovaných metódou plazmovej polymerizácie.

5 ZÁVER

Diplomová práca sa zaoberala problematikou porovnávania metód aminácie polykaprolaktónových nanovlákiem z hľadiska ich efektívnosti pre tkanivové inžinierstvo.

Teoretická časť práce bližšie priblížia problematiku biokompatibility, biomateriálov a elektrostatického zvlákňovania polykaprolaktónu (PCL), ako materiál vhodný pre tkanivové inžinierstvo. Následne uviedla teoretické základy metód aminácie, ktoré sa dajú využiť k zlepšeniu biokompatibility PCL. Konkrétne šlo o plazmovú polymerizáciu, využívajúcu metódu plazmového nanášaním rozkladom pár (PECVD), hybridnú metódu využívajúcu plazmu a chemickú metódu využívajúcu aminolýzu

Metóda elektrostatického zvlákňovania viedla k príprave homogénnej PCL membrány o požadovanej hrúbke a bez defektov. Hybridná metóda využívajúca plazmu spôsobovala sťahovanie vzoriek, čo by bolo námetom na ďalšie skúmanie. Chemická metóda viedla k defektom na membráne vedúcim k zmene morfológie vlákien a strate mechanických vlastností membrány.

Charakterizácia modifikovaných membrán bola realizovaná röntgenovou fotoelektrónovou spektroskopiou (XPS), infračervenou spektroskopiou s technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR, z angl. Attenuated total reflection), elektrónovou skenovaciou mikroskopiou a meraním kontaktného uhlu. Výsledky z analýzy spektier XPS a ATR-FTIR potvrdili úspešnosť modifikácie nanovlákiem. Najlepších výsledkov bolo dosiahnutých metódou plazmovej polymerizácie, potom nasledovala hybridná metóda a nakoniec chemická metóda. Všetky typy modifikácie vykazovali uspokojivú stabilitu, nedošlo k významným zmenám v zastúpení prvkov na povrchu membrán. Metódy aminácie úspešne menili zmäčavosť membrány, kontaktný uhol povrchu sa zmenil z hydrofóbného na hydrofilný. Charakterizované membrány modifikované chemickou metódou nemohli byť kvôli zmene svojách mechanických vlastností použité pre kultiváciu buniek

Výsledky proliferácie potvrdili úspešnosť kultivácie buniek na membráne modifikovanej pomocou metódy plazmovej polymerizácie. Bunky kultivované na PCL membráne upravené plazmovým polymérom proliferovali najlepšie, čo potvrdilo plazmovú polymerizáciu ako najlepšiu zo študovaných metód.

Všetky ciele práce sa podarilo splniť, výsledky analýz hovoria v prospech aminácie pomocou plazmovej polymerizácie, uspokojivá bola aj hybridná metóda. Čo sa efektivity v tkanivovom inžinierstve týka, tak metódy využívajúce plazmu boli rýchlejšie realizovateľné a výsledky boli lepšie a homogénnejšie, než pri chemickej metóde. Metóda plazmovej polymerizácie vykazuje úspešne najväčší potenciál pre využitie na nanovláčnom skafolde v tkanivovom inžinierstve. Ďalším veľkým plusom tejto metódy je minimálne zaťaženie životného prostredia, pretože na rozdiel od ostatných skúmaných metód nepoužíva toxické prekurzory.

6 ZOZNAM POUŽÍTEJ LITERATÚRY

- [1] BOSE, Susmita a Amit BANDYOPADHYAY. Introduction to Biomaterials. Characterization of Biomaterials [online]. Elsevier, 2013, 2013, , 1-9 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415800-9.00001-2. ISBN 9780124158009. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158009000012>
- [2] WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. Progress in Polymer Science [online]. 2010, 35(10), 1217-1256 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670010000419>
- [3] OMRANI, Maryam Mehdizadeh, Nasim KIAIE, Mojtaba ANSARI a Soheila Salahshour KORDESTANI. Enhanced Protein Adsorption, Cell Attachment, and Neural Differentiation with the Help of Amine Functionalized Polycaprolactone Scaffolds. Journal of Macromolecular Science, Part B [online]. 2016, 55(6), 617-626 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1080/00222348.2016.1179245. ISSN 0022-2348. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00222348.2016.1179245>
- [4] MANAKHOV, Anton, David NEČAS, Jan ČECHAL, David PAVLIŇÁK, Marek ELIÁŠ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Deposition of stable amine coating onto polycaprolactone nanofibers by low pressure cyclopropylamine plasma polymerization. Thin Solid Films [online]. 2015, 2014(vol. 581), 7-13 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.tsf.2014.09.015. ISSN 00406090. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609014008931>
- [5] BÍLEK, František, Kateřina SULOVSÁ, Marián LEHOCKÝ, Petr SÁHA, Petr HUMPOLÍČEK, Miran MOZETIČ a Ita JUNKAR. Preparation of active antibacterial LDPE surface through multistep physicochemical approach II: Graft type effect on antibacterial properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2013, 2013(vol. 102), 842-848 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.026. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512004742>
- [6] ZHU, Yang, ZhengWei MAO, HuaYu SHI a ChangYou GAO. In-depth study on aminolysis of poly(ϵ -caprolactone): Back to the fundamentals. Science China Chemistry [online]. 2012, 55(11), 2419-2427 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1007/s11426-012-4540-y. ISSN 1674-7291. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11426-012-4540-y>
- [7] BERTHIAUME, François, Timothy J. MAGUIRE a Martin L. YARMUSH. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering [online]. 2011, 2(1), 403-430 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257. ISSN 1947-5438. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- [8] GODBEY, W. T. a A. ATALA. In Vitro Systems for Tissue Engineering. Annals of the New York Academy of Sciences [online]. 2002, 961(1), 10-26 [cit. 2020-07-31].

- DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb03041.x. ISSN 00778923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03041.x>
- [9] WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 2008, 29(20), 2941-2953 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002676>
- [10] BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUMML a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, 29(6), 739-767 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000802>
- [11] RAVAGLIOLI, Antonio. a A. KRAJEWSKI. *Bioceramics: materials, properties, applications*. New York: Chapman & Hall, c1992. ISBN 0412349604.
- [12] RATNER, Buddy D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN isbn0-12-582463-7.
- [13] KHAN, Ferdous a Masaru TANAKA. Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(1), 1-14 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.3390/ijms19010017. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/17>
- [14] BEACHLEY, Vince a Xuejun WEN. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, 35(7), 868-892 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.03.003. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670010000328>
- [15] DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA a D. Sakthi KUMAR. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2011, 2011(9), 1-19 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1155/2011/290602. ISSN 1687-9422. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>
- [16] JIRSAK, Oldrich a Stanislav PETRIK. Recent advances in nanofibre technology: needleless electrospinning. *International Journal of Nanotechnology* [online]. 2012, 9(8-9), 1-11 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1504/IJNT.2012.046756. ISSN 1475-7435. Dostupné z: <http://www.inderscience.com/link.php?id=46756>
- [17] PETRIK, Stanislav a Miroslav MALÝ. Production Nozzle-Less Electrospinning Nanofiber Technology. *Materials Research Society* [online]. 2010, 2010(Vol. 1240), 1-12 [cit. 2020-07-31]. Dostupné z: https://kazelfacorp.com/wordpress/wp-content/uploads/2019/09/Production-Nozzle-less-Electrospinning-Nanofiber-Technology_Elmarco.pdf
- [18] MIROSHNICHENKO, Svetlana, Valeriia TIMOFEEVA, Elizaveta PERMYAKOVA, et al. Plasma-Coated Polycaprolactone Nanofibers with Covalently Bonded Platelet-Rich Plasma Enhance Adhesion and Growth of Human Fibroblasts. *Nanomaterials* [online]. 2019, 9(4), 1-19 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.3390/nano9040637. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-4991/9/4/637>

- [19] SOLOVIEVA, Anastasiya, Svetlana MIROSHNICHENKO, Andrey KOVALSKII, et al. Immobilization of Platelet-Rich Plasma onto COOH Plasma-Coated PCL Nanofibers Boost Viability and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Polymers* [online]. 2017, 9(12), 1-14 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.3390/polym9120736. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/9/12/736>
- [20] YALCINKAYA, Fatma, Anna SIEKIERKA a Marek BRYJAK. Surface modification of electrospun nanofibrous membranes for oily wastewater separation. *RSC Advances* [online]. 2017, 7(89), 56704-56712 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1039/C7RA11904F. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7RA11904F>
- [21] ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization [online]. Switzerland (Geneva): International Organization for Standardization, 2009 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- [22] ISO 10993-6:2016 Biological evaluation of medical devices -- Part 6: Tests for local effects after implantation. International Organization for Standardization [online]. Switzerland (Geneva): International Organization for Standardization, 2016 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: <https://www.iso.org/standard/61089.html>
- [23] ISO 10993-6:2016 Biological evaluation of medical devices -- Part 6: Tests for local effects after implantation. International Organization for Standardization [online]. Switzerland (Geneva): International Organization for Standardization, 2016 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: <https://www.iso.org/standard/61089.html>
- [24] SEMINARIO-VIDAL, Lucia, Eduardo R. LAZAROWSKI a Seiko F. OKADA. Assessment of Extracellular ATP Concentrations. RICH, Preston B. a Christelle DOUILLET, ed. *Bioluminescence* [online]. 574. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 2009-7-13, s. 25-36 [cit. 2020-07-31]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-60327-321-3_3. ISBN 978-1-60327-320-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-321-3_3
- [25] CROUCH, S.P.M., R. KOZLOWSKI, K.J. SLATER a J. FLETCHER. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1993, 160(1), 81-88 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90011-U. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002217599390011U>
- [26] BANDYOPADHYAY, Amit a Susmita BOSE, ed. *Characterization of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, c2013. ISBN 9780124158009.
- [27] OERTEL, Günter a L. ABELE. *Polyurethane handbook: chemistry, raw materials, processing, application, properties*. 2nd ed. Cincinnati: Hanser/Gardner [distributor], c1994. ISBN 1-56990-157-0.
- [28] SMRČKOVÁ, Markéta. *Polymerace a kopolymerace e-kaprolaktonu pomocí organických a organokovových katalyzátorů*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [29] JEROME, C a P LECOMTE. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, 60(9), 1056-1076 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.02.008. ISSN

- 0169409X. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08000562>
- [30] ALBERTSSON, Ann-Christine. Degradable aliphatic polyesters. Volume 157. New York: Springer, c2002. ISBN 978-3-540-42249-5.
- [31] PARK, Joon Bu a Joseph D. BRONZINO. Biomaterials: principles and applications. Boca Raton: CRC Press, c2002. ISBN 0849314917.
- [32] WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. Progress in Polymer Science [online]. 2010, 35(10), 1217-1256 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002. ISSN 00796700. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670010000419>
- [33] Encyclopedia of Polymer Science and Technology [online]. 4th. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2002 [cit. 2020-07-31]. ISBN 9780471440260. Dostupné z:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471440264.pst658>
- [34] HUSCROFT, Richard. Ruling England, 1042-1217. New York: Pearson/Longman, 2005. ISBN 978-0-582-84882-5.
- [35] KING HONG LAM. Biocompatibility of degradable biomaterials a study on the factors determining the inflammatory response against degradable polymers. [S.l.: s.n.], 1992. ISBN 9090050221.
- [36] SUNTORNOND, Ratima, Jia AN a Chee Kai CHUA. Effect of gas plasma on polycaprolactone (PCL) membrane wettability and collagen type I immobilized for enhancing cell proliferation. Materials Letters [online]. 2016, 2016(vol. 171), 293-296 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.matlet.2016.02.059. ISSN 0167577X. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X16302233>
- [37] MORACZEWSKI, Krzysztof, Magdalena STEPCZYŃSKA, Rafał MALINOWSKI, Piotr RYTLEWSKI, Bartłomiej JAGODZIŃSKI a Marian ŻENKIEWICZ. Stability studies of plasma modification effects of polylactide and polycaprolactone surface layers. Applied Surface Science [online]. 2016, 2016(vol. 377), 228-237 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.03.171. ISSN 01694332. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433216306444>
- [38] MANAKHOV, Anton, Eva KEDROŇOVÁ, Jiřina MEDALOVÁ, Petra ČERNOCHOVÁ, Adam OBRUSNÍK, Miroslav MICHLÍČEK, Dmitry V. SHTANSKY a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Carboxyl-anhydride and amine plasma coating of PCL nanofibers to improve their bioactivity. Materials & Design [online]. 2017, 2017(vol. 132), 257-265 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.matdes.2017.06.057. ISSN 02641275. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264127517306469>
- [39] ZHU, Yabin, Changyou GAO, Xingyu LIU a Jiacong SHEN. Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. Biomacromolecules [online]. 2002, 3(6), 1312-1319 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1021/bm020074y. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm020074y>

- [40] BITTENCOURT, J.A. Fundamentals of plasma physics. 3. ed. São José dos Campos: INPE, 2003. ISBN 8590010031.
- [41] MARTIŠOVITŠ, Viktor. Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-x.
- [42] PIEL, Alexander. Plasma physics: an introduction to laboratory, space, and fusion plasmas. New York: Springer, 2010. ISBN 978-3-642-10490-9.
- [43] ROSSNAGEL, Stephen M., William D. WESTWOOD a Jerome J. CUOMO. Handbook of Plasma Processing Technology: Fundamental, Etching, Deposition, and Surface Interactions. Norwich, New York, U.S.A.: NOYES PUBLICATIONS, 1991. ISBN 9780815512202.
- [44] LIEBERMAN, Michael A. a Allan J. LICHTENBERG. Principles of plasma discharges and materials processing. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, c2005. ISBN 0-471-72001-1.
- [45] PIERSON, Hugh O. Handbook of chemical vapor deposition (CVD): principles, technology, and applications. 2nd ed. Norwich: Noyes Publications, 1999. ISBN 0-8155-1432-8
- [46] Chemical Vapor Deposition. ROCKETT, Angus. The Materials Science of Semiconductors [online]. Boston, MA: Springer US, 2008, 2008, s. 573-609 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1007/978-0-387-68650-9_12. ISBN 978-0-387-25653-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-68650-9_12
- [47] BITNEROVÁ, Štěpánka. Studium plazmových polymerů cyklopropylaminu a jejich stability během sterilizace a dezinfekce. Brno, 2016. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav fyzikální elektroniky.
- [48] TONG, Liping, Wenhua ZHOU, Yuetao ZHAO, Xuefeng YU, Huaiyu WANG a Paul K. CHU. Enhanced cytocompatibility and reduced genotoxicity of polydimethylsiloxane modified by plasma immersion ion implantation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2016, 2016(vol. 148), 139-146 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.057. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776516306348>
- [49] INTRANUOVO, Francesca, Roberto GRISTINA, Francesco BRUN, et al. Plasma Modification of PCL Porous Scaffolds Fabricated by Solvent-Casting/Particulate-Leaching for Tissue Engineering. Plasma Processes and Polymers [online]. 2014, 11(2), 184-195 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1002/ppap.201300149. ISSN 16128850. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppap.201300149>
- [50] KO, Yeong-Mu, Do-Young CHOI, Sang-Chul JUNG a Byung-Hoon KIM. Characteristics of Plasma Treated Electrospun Polycaprolactone (PCL) Nanofiber Scaffold for Bone Tissue Engineering. Journal of Nanoscience and Nanotechnology [online]. 2015, 15(1), 192-195 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1166/jnn.2015.8372. ISSN 15334880. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1533-4880&volume=15&issue=1&spage=192>
- [51] GARCÍA, Jorge López, Ahmad ASADINEZHAD, Jiří PACHERNÍK, Marián LEHOČKÝ, Ita JUNKAR, Petr HUMPOLÍČEK, Petr SÁHA a Pavel VALÁŠEK. Cell

- Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment. *Molecules* [online]. 2010, 15(4), 2845-2856 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.3390/molecules15042845. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/4/2845>
- [52] PARIZEK, Martin, Nikola KASALKOVA, Lucie BACAKOVA, Petr SLEPICKA, Vera LISA, Martina BLAZKOVA a Vaclav SVORCIK. Improved Adhesion, Growth and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells on Polyethylene Grafted with Bioactive Molecules and Carbon Particles. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, 10(10), 4352-4374 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.3390/ijms10104352. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/10/4352>
- [53] SURMENEV, R.A., R.V. CHERNOZEM, D.S. SYROMOTINA, et al. Low-temperature argon and ammonia plasma treatment of poly-3-hydroxybutyrate films: Surface topography and chemistry changes affect fibroblast cells in vitro. *European Polymer Journal* [online]. 2019, 2018(vol. 112), 137-145 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2018.12.040. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001430571831958X>
- [54] MANAKHOV, Anton, Marie LANDOVÁ, Jiřina MEDALOVÁ, Miroslav MICHlíČEK, Josef POLČÁK, David NEČAS a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Cyclopropylamine plasma polymers for increased cell adhesion and growth. *Plasma Processes and Polymers* [online]. 2017, 14(7), 1-12 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1002/ppap.201600123. ISSN 16128850. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppap.201600123>
- [55] BÍLEK, František, Táňa KRÍŽOVÁ a Marián LEHOCKÝ. Preparation of active antibacterial LDPE surface through multistep physicochemical approach: I. Allylamine grafting, attachment of antibacterial agent and antibacterial activity assessment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, 88(1), 440-447 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.07.027. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511004309>
- [56] ZHU, Yabin, Changyou GAO, Xingyu LIU a Jiacong SHEN. Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. *Biomacromolecules* [online]. 2002, 3(6), 1312-1319 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1021/bm020074y. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm020074y>
- [57] CROLL, Tristan I., Andrea J. O'CONNOR, Geoffrey W. STEVENS a Justin J. COOPER-WHITE. Controllable Surface Modification of Poly(lactic- c o -glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects. *Biomacromolecules* [online]. 2004, 5(2), 463-473 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1021/bm0343040. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm0343040>
- [58] ERNON-PARRY, K.D. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review* [online]. 2000, 13(4), 40-44 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/S0961-1290(00)80006-

X. ISSN 09611290. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096112900080006X>

- [59] KHAN, Shahid Ali, Sher Bahadar KHAN, Latif Ullah KHAN, Aliya FAROOQ, Kalsoom AKHTAR a Abdullah M. ASIRI. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. SHARMA, Surender Kumar, ed. Handbook of Materials Characterization [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, 2018-09-19, s. 317-344 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1007/978-3-319-92955-2_9. ISBN 978-3-319-92954-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-92955-2_9
- [60] JAGGI, Neena a D.R. VIJ. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. VIJ, D. R., ed. Handbook of Applied Solid State Spectroscopy [online]. Boston, MA: Springer US, 2006, s. 411-450 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1007/0-387-37590-2_9. ISBN 978-0-387-32497-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/0-387-37590-2_9
- [61] YUAN, Yuehua a T. Randall LEE. Contact Angle and Wetting Properties. BRACCO, Gianangelo a Bodil HOLST, ed. Surface Science Techniques [online]. Volume 51. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 2013, s. 3-34 [cit. 2020-07-31]. Springer Series in Surface Sciences. DOI: 10.1007/978-3-642-34243-1_1. ISBN 978-3-642-34242-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34243-1_1

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PCL	polykaprolaktón
CPA	cyklopropylamín
XPS	röntgenová fotoelektrónová spektroskopia
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia
IČ	infračervená spektroskopia
FTIR	Fourierova transformačná spektroskopia
FITR-ATR	infračervená spektroskopia s technikou zoslabeného úplného odrazu
ATP	adenozín trifosfát
PES	polyester
PTFE	polytetrafluoroethylén
PVC	polyvinylchlorid
ROP	polymerizácia otvorením kruhu
λ_D	Debyeho vzdialenosť
k	Boltzamnova konštanta
T	teplota elektrónov
n_e	elektrónová hustota
e	náboj elektrónov
ϵ_0	permitivita vákua
ω_p	plazmová frekvencia
$n_0 = n_e = n_i$	koncentrácia častíc
m	hmotnosť
RF	rádio-frekvenčný
PECVD	plazmové nanášanie rozkladom pár
CVD	chemická depozícia z plynnej fázy
BSE	spätne odrazené elektróny
TE	transmisné elektróny
SE	sekundárne elektróny
CL	katódová luminiscencia
RTG	röntgenové žiarenie
A	absorbancia
R	reflektancia
I a I_0	toky žiarenia
E_B	energia väzby elektrónov
Φ	výstupná práca spektrometru
hn	energia röntgenového fotónu
γ_{pv} , γ_{kv} , γ_{pk} γ^{LW} a γ^{AB}	rozhrania skupenstiev medzi pevnou látkou, kvapalinou a plynom disperzná (LW) a acidobázická (AB) zložka povrchovej energie
Mn	molárna hmotnosť
DC	jednosmerný prúd
DMEM	Dulbecovo modifikované Eaglovo médium
PBS	fosfátový tlmivý roztok