TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta textilní

Vývoj planárních nanovlákenných vrstev pro nové aplikace v gastrointestinální chirurgii

Diplomová práce

Studijní program:	N3106 Textilní inženýrství
Studijní obor:	Netkané a nanovlákenné materiály
Autor:	**Bc. Zuzana Oulehlová**
Vedoucí práce:	Ing. Markéta Klíčová
	Katedra netkaných textilií a nanovlákenných materiálů

Liberec 2020

TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering

Development of planar nanofibrous layers for novel applications in gastrointestinal surgery

Master thesis

Study programme:	N3106 Textile Engineering
Study branch:	Nonwoven and Nanomaterials

Author	**Bc. Zuzana Oulehlová**
Supervisor	Ing. Markéta Klíčová
	Department of Nonwoven textiles and Nanofibrous Materials

Liberec 2020

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta textilní

Zadání diplomové práce

Vývoj planárních nanovlákenných vrstev pro nové aplikace v gastrointestinální chirurgii

Jméno a příjmení:	**Bc. Zuzana Oulehlová**
Osobní číslo:	T18000024
Studijní program:	N3106 Textilní inženýrství
Studijní obor:	Netkané a nanovlákenné materiály
Zadávající katedra:	Katedra netkaných textilií a nanovlákenných materiálů
Akademický rok:	**2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na zadané téma: biokompatibilní a biodegradabilní polymery; vícevrstvé a kompozitní materiály pro tkáňové inženýrství; biokompatibilní úpravy vlákenných scaffoldů pro snížení/zvýšení adheze; pooperační komplikace v gastrointestinální chirurgii typu peritoneální adheze a anastomotický leak, včetně současné prevence komplikací dle aktuální odborné literatury.
2. Experimentální část: vývoj a výroba nových kompozitních vlákenných scaffoldů pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování, nalezení vhodné povrchové modifikace, analýza vlákenných scaffoldů z hlediska morfologie, smáčivosti, chemického složení, buněčné adheze a přilnavosti povrchu k modelu lidské tkáně.
3. Zpracování výsledků a porovnání se současnou literaturou.

Rozsah grafických prací:	dle potřeby dokumentace
Rozsah pracovní zprávy:	40-60 dle potřeby
Forma zpracování práce:	tištěná/elektronická
Jazyk práce:	Čeština

Seznam odborné literatury:

1. BACAKOVA Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. Biotechnology Advances [online]. 29(6), 739767. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
2. GERARDO TERRONE, Donato, Luigi LEPANTO, Jean-Sebastien BILLIARD, Damien OLIVIE, Jessica MURPHY-LAVALLÉE, Franck VANDENBROUCKE-MENU a An TANG, 2011. A primer to common major gastrointestinal post-surgical anatomy on CTA pictorial review. Insights into imaging [online]. 2, 631-638. Dostupné z: doi:10.1007/s13244-011-0121-4.
3. RATNER, B. D. Bimaterials science: an introduction to materials in medicine. 3rd ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
4. SHEIN, Moshe a Paul N. ROGERS, 2011. Urgentní břišní chirurgie. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-2357-0.

Vedoucí práce:	Ing. Markéta Klíčová Katedra netkaných textilií a nanovlákenných materiálů
Datum zadání práce:	20. února 2019
Předpokládaný termín odevzdání:	15. května 2020

L.S.

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 20. února 2019

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

25. května 2020 Bc. Zuzana Oulehlová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala především vedoucí mé diplomové práce Ing. Markétě Klíčové za odborné vedení, významné připomínky, velkou ochotu a trpělivost, pomoc při vypracovávání práce a také za možnost podílet se na velmi zajímavém tématu.

Mé velké poděkování patří i RNDr. Janě Horákové, Ph.D., za cenné rady, odborné konzultace a motivaci v průběhu celého studia.

Děkuji Ing. Andree Klápšťové za ochotu, pomoc a čas věnovaný při výrobě materiálů. Za plazmatickou úpravu nanovlákenných materiálů děkuji RNDr. Michalovi Krejčíkovi. Dále mé poděkování patří Ing. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za pomoc při mechanickém testování adhezí materiálů.

Za spolupráci na experimentální části této práce děkuji i Ing. Janě Müllerové, Ph.D. Dále děkuji za podporu poskytnutou v rámci projektu Výzkumné infrastruktury NanoEnviCz vedeného pod číslem LM2018124, který je podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

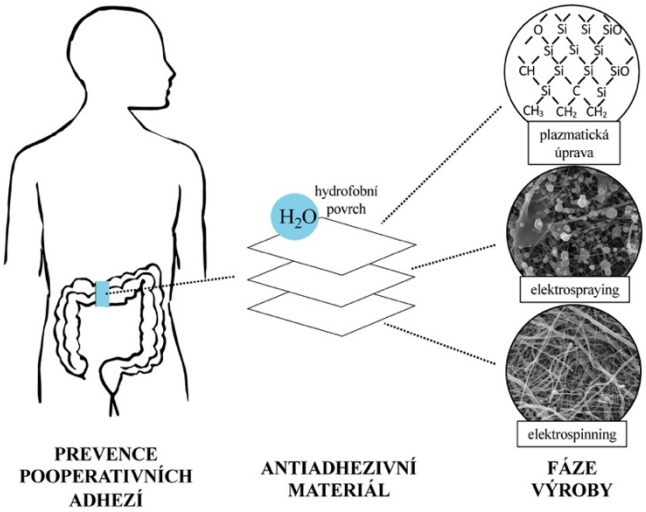
Poděkování patří také projektu Studentská grantová soutěž (SGS) reg. č. 21311 poskytnutého Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v roce 2019, kterým byl výzkum této problematiky podpořen.

V neposlední řadě bych chtěla poděkování směřovat i Katedře netkaných textilií a nanovlákenných materiálů na Technické univerzitě v Liberci.

Abstrakt

Použití mechanické bariéry ve formě nanovlákenné vrstvy s antiadhezivním povrchem je slibnou metodou pro prevenci vzniku nežádoucích pooperativních adhezí v gastrointestinální chirurgii. Adheze jsou závažnou komplikací, která nastává v 55–66% operací, mohou mít doživotní následky, a dokonce být i příčinou smrti pacienta. Morfologie vyvinutého materiálu byla inspirována lotosovým efektem, který se podařilo napodobit kombinací bezjehlového elektrospinningu a elektrosprayingu poly-ε-kaprolaktonu. Hydrofobicita povrchu byla dále podpořena modifikací studeným plazmatem metodou chemické depozice z plynné fáze pomocí hexamethyldisiloxanu, kdy došlo k úspěšnému snížení smáčivosti povrchu. Vytvořený materiál byl charakterizován z hlediska morfologie skenovací elektronovou mikroskopií, smáčivosti metodou přisedlé kapky a chemického složení FTIR analýzou. Tyto vlastnosti byly pozorovány po dobu šesti měsíců za účelem sledování případných změn, čímž byla ověřena stabilita úpravy. Dále byla zjištěna absorpce vrstev s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Cytokompatibilita byla ověřena *in vitro* na 3T3 myších fibroblastech dle normy ČSN EN ISO 10993-5. *In vitro* byla také zjišťována buněčná adheze a proliferace po 4, 7 a 14dnech pomocí MTT testu a fluorescenční mikroskopie. Adheze byla hodnocena pomocí peel testu 90° s modelem tkáně, u kterého modifikovaný materiál s hydrofobním povrchem vykazoval nižší adhezi oproti neupravenému.

Grafický abstrakt

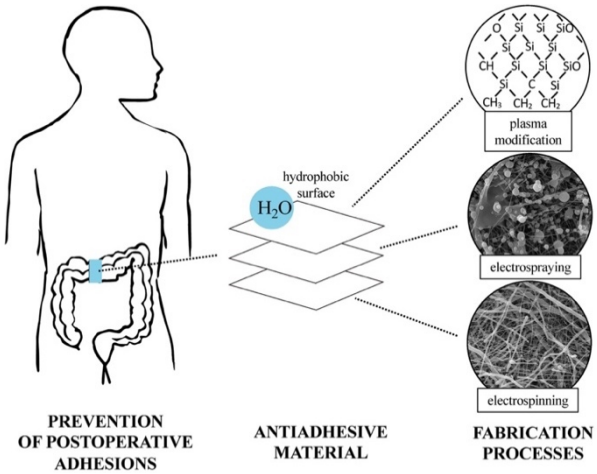


Klíčová slova: hydrofobní povrch, antiadhezivní úprava, pooperativní adheze, střevní anastomóza, elektrospraying, lotosový efekt, tkáňové inženýrství

Abstract

Mechanical barrier as nanofibrous patch with antiadhesive surface is a promising method for preventing formation of undesirable postoperative adhesions in gastrointestinal surgery. The adhesions are a severe complication which occurs in 55–66% operations, they can cause lifelong consequences and they can potentially be the cause of patient's death. Morphology of the developed material was inspired by the lotus effect which was mimicked by combination of needless electrospinning and electrospraying technology of poly-ε-caprolactone. Surface hydrophobicity was enhanced by cold plasma modification using the chemical vapour deposition method with hexamethyldisiloxane, which led to successful decrease of surface wettability. Morphology of the fabricated material was characterised by scanning electron microscopy, wettability was obtained using the sessile drop method and chemical composition was determined by FTIR analysis. Mentioned properties were observed for a period of six months in order to track possible changes, the obtained results verified stability of the modification. Furthermore, the uptake of water and simulated intestine liquid was measured. Cytocompatibility was verified *in vitro* with 3T3 mouse fibroblasts according to Czech norm ČSN EN ISO 10993-5. Cell adhesion and proliferation were assessed *in vitro* by MTT assay and fluorescence microscope after 4, 7 and 14 days. Adhesion was evaluated by peel test 90°with model tissue, modified material with hydrophobic surface had lower adhesion in comparison with untreated one.

Graphical abstract



Keywords: hydrophobic surface, antiadhesive treatment, postoperative adhesion, intestinal anastomoses, electrospraying, lotus effect, tissue engineering

Obsah

Poděkování 6
Abstrakt 7
Abstract 8
Obsah 9
Seznam použitých zkratek 11
Úvod 13
Teoretická část 15
1 Tkáňové inženýrství 15
1.1 Tkáňový nosič 16
1.2 Biokompatibilní a biodegradabilní polymery 20
2 Střevní anastomóza 25
2.1 Metody vytvoření střevní anastomózy 25
2.2 Pooperační komplikace anastomóz 28
2.3 Požadavky na ideální materiál pro střevní anastomózu 33
3 Antiadhezivní modifikace materiálů 34
3.1 Plazmatická úprava 34
3.2 Lotosový efekt 36
3.3 Kompozitní materiály 37
Experimentální část 39
4 Metody 39
4.1 Příprava polymerních roztoků 39
4.2 Viskozita polymerních roztoků 40
4.3 Výroba materiálů 40
4.4 Plazmatická úprava 43
4.5 Charakterizace materiálů 44
4.6 Biologické testování *in vitro* 46
4.7 Testování adheze 49
4.8 Zpracování dat 51
Výsledky 52

5 Prvotní materiály 53
5.1 Výběr vhodného polymeru 53
5.2 Optimalizace vlastností PCL roztoku 55
5.3 Charakterizace hierarchické vrstvy 59
6 Plazmatická úprava 62
6.1 Charakterizace materiálů 63
6.2 Stabilita plazmatické úpravy 68
7 Testování vrstev 71
7.1 Absorpce 71
7.2 Biologické testování *in vitro* 73
7.3 Testování adheze k modelu tkáně 78
Diskuse 79
8 Vytvoření materiálu pro prevenci peritoneálních adhezí 79
8.1 Vytvoření lotosového efektu 79
8.2 Plazmatická úprava 82
8.3 Testování výsledné vrstvy 83
Závěr 85
Seznam použité literatury 88
Seznam obrázků 101
Seznam tabulek 105
Příloha 106

Seznam použitých zkratek

ANOVA	Analýza rozdílnosti (Analysis of Variance)
A_S	Absorpce simulované střevní tekutiny
ATR-FTIR	Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací s technikou zeslabeného úplného odrazu
A_V	Absorpce destilované vody
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dH_2O	Destilovaná voda
DMEM	Dubellccovo modifikované eagle medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ECM	Extracelulární matrix
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FLM	Fluorescenční mikroskopie
HMDSO	Hexamethyldisiloxan
MSO	Methylsilikonový olej
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NC	Negativní kontrola
PBS	Fosfátový pufr
PC	Pozitivní kontrola
PCL	Poly-ε-kaprolakton

PDX	Poly-*p*-dioxanon
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Kyselina polyglykolová
PHB	Poly-*4*-hydroxybutyrát
PLA	Kyselina polymléčná
PLCL	Kopolymer kyseliny polymléčné a poly-ε-kaprolaktonu
PLGA	Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
RF PACVD	Radiofrekvenční plazmaticky asistovaná depozice z plynné fáze (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition)
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
T_g	Teplota skelného přechodu
T_m	Teplota tání

Úvod

Vývoj za posledních sto let v gastrointestinálních chirurgii přispěl k významnému snížení mortality, ale i přesto stále dochází k závažným, život ohrožujícím pooperačním komplikacím. Mezi nejvýznamnější obtíže vznikající po chirurgickém odstranění nádoru tlustého střeva patří peritoneální adheze. K tvorbě nežádoucího spojení s okolními tkáněmi dutiny břišní dochází v 55–66% operací. Adheze mohou být příčinou pacientovi chronické bolesti břicha, střevní neprůchodnosti, neplodnosti u žen a mohou být příčinou pooperativní mortality.

Momentálně nejsou komerčně dostupné materiály, které by efektivně a bezpečně řešily pooperační adheze. Tato závažná komplikace se nevyskytuje pouze u abdominálních operací, ale také například u zákroků gynekologických a v oblasti pánve. Proto je vývoj antiadhezivního materiálu velmi žádoucí.

Použití mechanické bariéry ve formě nanovlákenné vrstvy s antiadhezivním povrchem je velmi slibnou metodou pro prevenci tvorby pooperativních adhezí. Hlavní myšlenkou vývoje nového materiálu bylo vytvoření scaffoldu, jehož strany budou mít odlišné vlastnosti. Rubní strana přilne ke střevní tkáni a zajistí zpevnění střevní anastomózy. Lícní strana materiálu naopak má antiadhezivní vlastnosti, aby zabránila adhezi buněk, proteinů, formaci fibrinu, a tím i vzniku abdominálních adhezí.

Na základě výsledků z předchozí *in vivo* studie na prasečím modelu byla zvolena výchozím materiálem nanovlákenná vrstva z poly-ε-kaprolaktonu. Pro zvýšení antiadhezivních vlastností lícní strany materiálu byl inspirací lotosový efekt. Lotosový list má díky své hierarchické struktuře superhydrofóbní povrch, tento efekt byl napodoben kombinací elektrostatického zvlákňování a elektrosprayingu. Pro zvýšení hydrofobicity povrchu byla vrstva dále modifikována studeným plazmatem pomocí hexamethyldisiloxanu. Úpravou byly vytvořeny tři vrstvy s odlišnou dobou expozice plazmatu, 1, 2 a 3 minuty. Smáčivost vytvořených vrstev byla hodnocena změřením kontaktního úhlu, dále byla zjišťována absorpce materiálů s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Pomocí *in vitro* testů byla ověřena cytokompatibilita

a schopnost adheze a proliferace myších fibroblastů na vlákenných vrstvách. Pro zjištění chování materiálů se střevní tkání bylo zvoleno testování adhezí mechanickou zkouškou, peel testem 90°. Jako model tkáně byla použita tenká střeva z prasete. Díky tomuto experimentu bylo možné získat rychlý odhad efektivity vytvořené antiadhezivní vrstvy v laboratorních podmínkách, bez nutnosti implantace materiálů *in vivo* do modelových zvířat.

Teoretická část

První kapitola teoretické části obsahuje náhled do oboru tkáňového inženýrství. Druhá kapitola nastiňuje problematiku střevní anastomózy a pooperativních komplikací s ní spojených. Poslední část literárního přehledu se věnuje možnostem výroby antiadhezivních materiálů.

1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, ve kterém se uplatňují znalosti především z inženýrství, přírodních věd a medicíny. Klade si za cíl vývoj materiálů, které mohou nahradit, opravit či regenerovat funkci poškozené tkáně nebo orgánu. Tkáňové inženýrství pracuje s 3D porézními biomateriály, scaffoldy neboli tkáňové nosiče, které fungují jako lešení pro podporu regenerace a tvorby nové tkáně. Tkáňové nosiče mohou být osazeny buňkami, popřípadě do nich mohou být přidány růstové faktory nebo biochemické látky. Růstové faktory jsou signalizační molekuly, které například ovlivňují buněčnou proliferaci (opakované množení buněk), zhojování implantátu a mohou optimalizovat regeneraci rány. Uvolnění aktivních látek ze scaffoldu může být řízené, například na základě teploty nebo pH prostředí. Právě scaffoldy, buňky a růstové faktory jsou základními pilíři tkáňového inženýrství. *(Lanza et al. 2020; O'Brien 2011; Lee et al. 2011)*

Aby tkáňový nosič mohl být používán v klinické praxi, je nutné, aby byl materiál charakterizován, otestován a schválen. Standardně je zdravotnický prostředek nejprve testován v laboratorních podmínkách s buněčnými kulturami (*in vitro)*, kde je zjišťována odezva buněk na materiál, například je sledována aktivace, adheze k materiálu, proliferace a diferenciace buněk. Poté se provádí testování na modelových zvířatech (*in vivo)*, u kterého je pozorována reakce organismu jako celku, tvorba a organizace extracelulární hmoty (ECM), adaptace a regenerace opravované tkáně a popřípadě degradace scaffoldu. Po úspěšném testování *in vitro* a *in vivo* následuje klinické testování (*in situ*). *(Lanza et al. 2020; Rather et al. 2013)*

Experimenty na zvířatech jsou již dlouho předmětem diskuze. Nejedná se pouze o otázku etiky, testování na zvířatech má i mnoho nevýhod. Celý proces je časově i finančně náročný. V souvislostí s minimalizací experimentů na zvířatech dochází k vývoji alternativních metod testování. *(Doke a Dhawale 2015; Wilson-Sanders 2011)*

Mezi alternativní metody například patří počítačové modely neboli testování *in silico (Lang et al. 2018; Goh et al. 2015).* Dále mikrofluidní systémy organs-on-a-chip, které simulují lidské orgány *in vitro (Kimura et al. 2018; Bein et al. 2018; Huh et al. 2012).* Zkoumají se i možnosti experimentů na jiných organismech, které nemohou testování na savcích nahradit, ale mají potenciál snížit jejich kvantitu při použití v prvotních experimentech. Vhodné se zdají být ryby dánio pruhované (zebrafish), které jsou malé a mají téměř transparentní tělo, tudíž je jejich pozorování snazší. Dále byli pro testování využiti i bezobratlí živočichové, například octomilka obecná. Zkoumány jsou i experimenty na prokaryotech, například na *Escherichia coli*. *(Doke a Dhawale 2015)*

Uplatnění scaffoldů tkáňového inženýrství je široké a studované aplikace pokrývají téměř celý lidský organismus. Například byly vyvinuty scaffoldy pro nervový a kardiovaskulární systém, kosterní soustavu kostí i chrupavek, svaly a pokožku. *(Lanza et al. 2020; Rather et al. 2013; Vasita a Katti 2006)*

1.1 Tkáňový nosič

1.1.1 Vlastnosti scaffoldu

Vlastnosti výsledného tkáňového nosiče jsou určeny použitým materiálem, technologií výroby a dalšími úpravami. Scaffoldy se liší z hlediska svých mechanických vlastností, vstřebatelnosti, topografie povrchu a dalších fyzikálních a chemických charakteristik. Požadavky na scaffoldy jsou specifické pro konkrétní aplikaci. *(O'Brien 2011; Bacakova et al. 2011; Dhandayuthapani et al. 2011)*

Materiály určené pro klinickou praxi musí být sterilizovatelné, dále je nezbytné, aby byly biokompatibilní. Pokud se jedná o biodegradabilní materiál, je nutné, aby i produkty jeho

degradace byly netoxické. Tkáňové nosiče by měly být snadno reprodukovatelné. *(O'Brien 2011; Dhandayuthapani et al. 2011)*

Vlastnosti tkáňových nosičů lze rozdělit na povrchový charakter materiálu a tzv. bulk (objemové) vlastnosti. Mezi objemové charakteristiky patří vnitřní architektura scaffoldů, které bývají navrhovány tak, aby svou strukturou připomínali ECM. Porozita a velikost pórů jsou důležitými parametry, které ovlivňují interakci materiálu s buňkami. Především prorůstání tkáňových nosičů buňkami, jejich adhezi k materiálu, proliferaci, tvorbu ECM a regeneraci tkáně. Ideální velikost pórů scaffoldu, pro jeho úspěšnou kultivaci buňkami, byla zjištěna experimentálně a odpovídá 20 μm. *(Rather et al. 2013)*

Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu scaffoldu jsou důležitými faktory pro buněčnou adhezi. Chemické složení povrchu materiálu ovlivňuje jeho povrchovou energii, polaritu a smáčivost, které mají vliv na interakci s buňkami. Například kyslíkové funkční skupiny zvyšují smáčivost (snižují kontaktní úhel), energii, polaritu a podporují adhezi buněk na povrchu. Experimentálně byla prokázána větší adhezivita buněk a proteinů ke smáčivým materiálům, které mají kontaktní úhel pod 90°. Dále má na interakci s buňkami vliv morfologie povrchu nebo také hrubost, drsnost povrchu. Reakce buněk je odlišná podle měřítka hrubosti, může být rozlišována na makrohrubost, mikrohrubost a nanohrubost. Hrubost v makro a nano měřítku neomezuje růst a adhezi buněk. Povrchová mikrohrubost ovlivňuje chování buněk (adhezi, míru rozprostření atd.) negativně, stejné výsledky byly pozorovány u hladkých povrchů. *(Bacakova et al. 2011)*

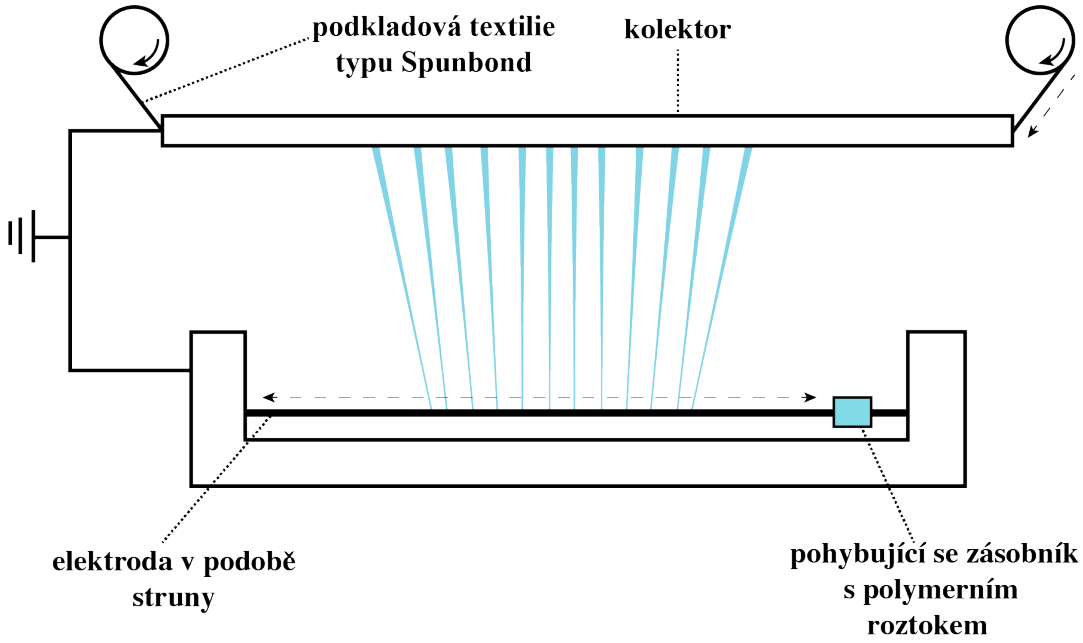
1.1.2 Výroba scaffoldu elektrostatickým zvlákňováním

Tkáňový nosič je možné vyrobit vícero technologiemi, které mohou být děleny například podle struktury výsledné scaffoldu na vlákenné a nevlákenné (netextilní). Mezi technologie pro výrobu nevlákenných nosičů patří například vymývání částic, odpařování rozpouštědla, výroba hydrogelů, zpěňování, fázová separace, lyofizace a výroba pomocí 3D tisku nebo biotisku. Vláknité struktury lze docílit textilními technologiemi, tkaním, pletením a technologiemi pro výrobu netkaných textilií, mezi které patří i elektrostatické zvlákňování neboli elektrospinning. *(Rather et al. 2013; Ma 2004; Hutmacher 2001)*

Pomocí elektrospinningu je možné vytvořit 3D nanovlákennou strukturu, která mimikuje EMC. Výhodou nanovlákenných vrstev je vysoká porozita a velký měrný povrch. Mezi nevýhody patří minimální možnost kontroly mikrostruktury materiálu a u zvlákňování z polymerních roztoků přítomnost rozpouštědel. Pomocí elektrospinningu je možné zvlákňovat široké spektrum přírodních i syntetických materiálů. Popřípadě je možná i inkorporace léčiv pro drug delivery systém (cílené dodávání léčiv) nebo jiných aktivních látek. Volbou kolektoru lze ovlivnit tvar výsledného implantátu, mimo planárních vrstev je například možné vyrobit tubulární scaffoldy, které mohou být použity jako cévní implantáty nebo pro regeneraci nervové tkáně. *(Ding et al. 2019; Chen et al. 2017; Seunarine et al. 2006)*

Nanovlákenné scaffoldy nacházejí uplatnění v mnoha biomedicínských aplikacích, především v tkáňovém inženýrství, drug delivery systémech a pro léčbu rakoviny. Nanovlákenné vrstvy jsou v tkáňovém inženýrství aplikovány pro regeneraci srdeční, nervové, svalové tkáně, kůže a hojení ran. Dále se nanovlákenné implantáty používají k vytvoření cévních implantátů nebo jako scaffoldy pro obnovu kostí a chrupavky. *(Ding et al. 2019)*

Nanovlákenné tkáňové nosiče je možné vyrobit pomocí elektrostatického zvlákňování z jehly, které ale umožňuje výrobu pouze v laboratorním měřítku. Pro průmyslovou výrobu nanovlákenných vrstev byl vyvinut stroj *Nanospider*^{TM}, na němž je možné zvlákňovat bezjehlovým způsobem. Zvlákňovací elektrodou může být například válec nebo struna. Schéma stroje *Nanospider*^{TM} se zvlákňovací elektrodou v podobě struny zobrazuje Obrázek 1. Elektroda a kolektor jsou opačného náboje a mezi nimi vzniká elektrické pole. Polymerní roztok je nanášen na strunu pomocí pohybujícího se zásobníku. Ve chvíli, kdy dojde k překonání povrchového napětí elektrostatickými silami, začne se polymerní roztok zvlákňovat a rozpouštědlo se odpařovat. Vytvořená vlákna se ukládají na podkladovou textilii a vytvářejí nanovlákennou vrstvu. *(Mosinger et al. 2016; Zhou et al. 2009; Sell et al. 2006)*



Obrázek 1: Schéma elektrospinningu na stroji Nanospider™ s elektrodou v podobě struny.

Morfologie výsledné nanovlákenné vrstvy je ovlivněna parametry (1) polymerního roztoku, (2) procesu zvlákňování a (3) okolními podmínkami. U zvlákňovacího roztoku má vliv výběr polymeru a jeho molekulová hmotnost. Dále je důležitá volba rozpouštědla a viskozita polymerního roztoku, která je ovlivněna zvolenou koncentrací. Roli hraje i povrchové napětí a vodivost polymerního roztoku. Mezi procesní podmínky patří velikost elektrického napětí, typ zvlákňovací elektrody a kolektoru a jejich vzdálenost. Dále druh podkladové textilie a rychlost jejího pohybu. Okolní podmínky, které ovlivňují zvlákňovací proces jsou vlhkost a teplota vzduchu. *(Mosinger et al. 2016; Pham et al. 2006)*

1.1.3 Elektrospraying v tkáňovém inženýrství

Při elektrostatickém sprejování neboli elektrosprayingu dochází ke tvorbě polymerní sfér. Pro jejich výrobu je využívána stejná technologie jako pro elektrostatické zvlákňování. Zda budou vznikat vlákna nebo kapky je možné ovlivnit změnou parametrů, především volbou molekulové hmotnosti polymeru a koncentrace polymerního roztoku, a tedy viskozity. Pomocí elektrosprayingu lze vytvořit kapky v mikro- až nanoměřítku.

Pro vytvoření homogenních kapek je důležité najít vhodné podmínky; velikost napětí, vzdálenost mezi elektrodami, rychlost dávkování polymerního roztoku a typ kolektoru. *(Bošković a Bugarski 2019; Gómez-Mascaraque et al. 2016; Zhou et al. 2016; Bock et al. 2011; Pham et al. 2006) Zhou et al. (2016)* zkoumali mimo jiné i vliv velikosti napětí na vytvořené kapky, kdy zjistili, že pomocí intenzity zvoleného napětí lze kontrolovat velikost vytvořený částic, se vzrůstajícím napětím docházelo k produkci sfér s nižším průměrem.

Elektrospraying může být v tkáňovém inženýrství vhodný například pro drug delivery systémy *(Zamani et al. 2013)* nebo pro získání členitého povrchu s hydrofobními vlastnostmi *(Zhang et al. 2019)*.

1.2 Biokompatibilní a biodegradabilní polymery

Díky svým univerzálním vlastnostem nahrazují polymerní materiály biomateriály z kovu a keramiky. Biodegradabilní polymery jsou dominantní skupinou polymerů používaných pro výrobu scaffoldů v tkáňovém inženýrství. U biostabilních (nedegradabilních) materiálů, bývají problémy s dlouhodobou biokompatibilitou, které pak vyžadují reoperace. To je jeden z hlavních důvodů popularity biodegradabilních polymerů v aplikacích, kde není nutná dlouhodobá podpora tkáně. *(Nair a Laurencin 2007)*

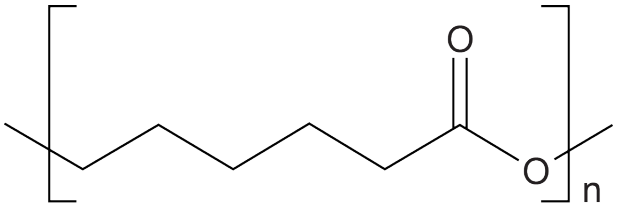
Polymery se obvykle rozdělují dle původu na přírodní a syntetické. Biodegradabilní polymery mohou být děleny podle způsobu vstřebávání, zda degradují enzymaticky nebo hydrolyticky. Mezi přírodní biodegradabilní polymery patří například kolagen, elastin, chitosan a kyselina hyaluronová, které degradují enzymaticky. Významnou skupinou syntetických rozložitelných polymerů jsou polyestery, mezi které například patří kyselina polyglykolová (PGA), polylaktidová kyselina, poly-ε-kaprolakton (PLC), poly-*p*-dioxanon (PDX) a jejich kopolymery. Polyestery jsou termoplastické polymery, které degradují hydrolytickým způsobem. *(Asghari et al. 2017; Nair a Laurencin 2007)*

V této kapitole jsou popsány polymery, používané v rámci experimentální části, z hlediska jejich výroby, vlastností, možnosti sterilizace, biokompatibility, biodegradability a použití v medicíně a tkáňovém inženýrství. Doba degradace

je orientační, protože je ovlivněna molekulovou hmotností polymeru a strukturou implantátu.

1.2.1 Poly-ε-kaprolakton

Poly-ε-kaprolakton je syntetizován polymerizací za otevření cyklického ε-kaprolaktonu, strukturní vzorec polymeru zobrazuje Obrázek 2. Jedná se o semikrystalický polymer, podíl krystalické fáze PCL se pohybuje mezi 40–60 % *(He a Inoue 2000)*, jeho krystalinita roste se zvyšující se molekulovou hmotností. Patří mezi hydrofobní polymery, má nízký bod tání (T_m), který se pohybuje mezi 59–64°C, jeho teplota skelného přechodu (T_g) je -60 °C. *(Pan et al. 2017; Woodruff a Hutmacher 2010; Rather et al. 2013)*



Obrázek 2: Strukturní vzorec poly-ε-kaprolaktonu.

Certifikací zdravotních prostředků se mimo jiné zabývá úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (FDA). Mezi FDA schválené polymery vhodné pro použití v lidském organismu patří i PCL. *(Cao et al. 2010)*

Nanovlákenné PCL vrstvy je možné sterilizovat etylenoxidem, gamma zářením a dezinfikovat etanolem a UV zářením bez změny morfologie materiálu. U sterilizace etylenoxidem byla pozorována snížená proliferace fibroblastů v porovnání s ostatními metodami. Sterilizace etylenoxidem ale není cytotoxická, patří ke standardním sterilizačním metodám a je vhodná i pro použití s nanovlákennými scaffoldy. *(Horakova et al. 2020)*

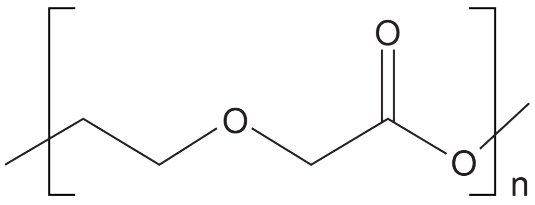
Byla studována biokompatibilita PCL nanovlákenných scaffoldů *in vitro* i *in vivo*. Byl pozorován průnik buněk do vláken a osazení uvnitř struktury scaffoldu. Reakce organismu na cizí materiál byla minimální. *(Cao et al. 2010)*

Vstřebávání PCL probíhá mechanismem dvoufázové degradace, dochází k postupnému rozrušování povrchu scaffoldu. Nejprve se hydrolyticky štěpí esterové vazby, poté dochází k intracelulární degradaci. PCL patří k dlouhodobě degradujícím polymerům, vstřebávání obvykle trvá 2–4 roky. *(Abedalwafa et al. 2013; Woodruff a Hutmacher 2010)* Degradace PCL (Mw = 66 000 g/mol) byla sledována *in vivo* v myších po dobu tří let. Po dvou letech se materiál začal vstřebávat, byl pozorován postupný pokles molekulové hmotnosti polymeru. *(Sun et al. 2006)*

Komerčně dostupný a v klinické praxi používaný je ve formě šicí nitě, která má dobrou pevnost a velmi dobrou elasticitu. V oblasti tkáňového inženýrství se PCL například používá v drug delivery systémech, dále pro regeneraci kostí a chrupavky. *(Woodruff a Hutmacher 2010)* Také pro kardiovaskulární aplikace je PCL používán například ve formě cévních *(Sankaran et al. 2014)* a žilních implantátů. Tkáňové nosiče z PCL jsou testovány i za účelem regenerace neuronové tkáně. *(Woodruff a Hutmacher 2010)* Dále byly vyvinuty materiály pro regeneraci kůže, hojení ran *(Chen et al. 2017)*. Nanovlákenný kožní kryt z PCL byl vyvinut i na Technické univerzitě v Liberci, který je momentálně testován klinicky *(Krchová et al. 2014)*.

1.2.2 Poly-*p*-dioxanon

Polydioxanon je bezbarvý krystalický biodegradabilní hydrofilní polymer. Vzniká polymerizací *p*-dioxanonu za zvýšené teploty, kdy dojde k otevření kruhu. Strukturní vzorec PDX zobrazuje Obrázek 3. Podíl krystalické fáze PDX je 55 %. Teplota tání PDX je v rozmezí 110–115 °C, T_g se pohybuje mezi -10 °C a 0 °C, tudíž je nutné ho zpracovávat při co nejnižších teplotách, aby nedošlo k jeho depolymerizaci. *(Boland et al. 2005; Nair a Laurencin 2007; Martins et al. 2020)*



Obrázek 3: Strukturní vzorec poly-p-dioxanonu.

Polymer PDX rovněž patří mezi FDA certifikované materiály. U šicích nití z PDX byla potvrzena možnost sterilizace pomocí ethylenoxidu a gamma záření bez významné změny mechanických vlastností. *(Goonoo et al. 2015; Trostle et al. 2002)* Implantáty z PDX jsou bezpečné pro klinickou praxi, ani produkty jeho degradace nezpůsobují toxicitu. V organismu se PDX rozkládá mechanismem hydrolytické degradace. Po třech týdnech od aplikace PDX nití dojde ke ztrátě 50 % pevnosti, ke kompletnímu vstřebání materiálu dojde do šesti měsíců od aplikace. *(Boland et al. 2005; Goonoo et al. 2015; Martins et al. 2020)*

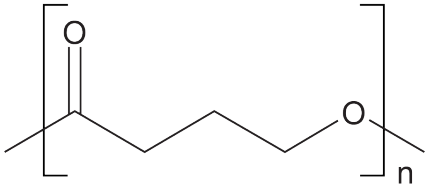
Komerčně dostupné jsou šicí nitě a ortopedické pomůcky z PDX. *(Martins et al. 2020)* Monofilamentní nitě z PDX jsou flexibilní, bez ohledu na poloměr nitě a mají velmi dobrou tvarovou paměť. Mechanické vlastnosti (modul pružnosti, maximální napětí, napětí do přetrhu) nanovlákenných PDX scaffoldů jsou srovnatelné s vlastnostmi kolagenu a elastinu, které se přirozeně vyskytují v ECM tkání, i po namočení materiál vykazuje srovnatelné výsledky. V porovnaní se šicími nitěmi z PGA a kopolymeru kyseliny glykolové a mléčné (PLGA) způsobují PDX nitě nižší zánětlivou odezvu organismu. *(Pan et al. 2017; Boland et al. 2005)*

Pole aplikací v tkáňovém inženýrství je pro PDX široké, častá je kombinace PDX s jinými polymery, například za účelem zlepšení ovlivnění doby degradace implantátu. Konkrétně se PDX používá pro drug delivery (cílené dodávání léčiv) *(Goonoo et al. 2015),* náhrady chrupavky *(Boenisch a Trenité 2010; Caughlin et al. 2015),* regenerace kostí *(Madurantakam et al. 2009)* a kardiovaskulární aplikace, například ve formě žilních náhrad *(Boland et al. 2005)* nebo maloprůměrových cévních náhrad *(Pan et al. 2017; Sell et al. 2006).*

1.2.3 Poly-*4*-hydroxybutyrát

Poly-*4*-hydroxybutyrát (PHB) je termoplastický biodegradabilní polymer, který patří do skupiny polyesterů. Jedná se o polymer, který je vyráběn mikroorganismy, jednou z výhod PHB je, že díky biologickému způsobu výroby neobsahuje katalyzátory. Biologickou cestou vzniká polymer s vysokou molekulovou hmotností. Je možné PHB vyrobit i polymerizací za otevření kruhu *γ*-butyrolactonu, ale touto cestu lze získat pouze

polymery s nízkou molekulovou hmotností. Obrázek 4 zobrazuje strukturní vzorec PHB. Jedná se o semikrystalický polymer s T_m okolo 60°C. Oproti PCL má PHB větší pevnost. *(Martin a Williams 2003; Williams et al. 2013)*



Obrázek 4: Strukturní vzorec poly-4-hydroxybutyrátu.

Při sterilizaci ethylenoxidem nedochází ke změně jeho vlastností. Serilizace gama zářením může způsobit úbytek molekulové hmotnosti. *(Martin a Williams 2003)* Oproti zmíněnému PCL a PDX, je PHB na trhu krátce. Pro použití v medicíně byl schválen FDA v roce 2007. *(Williams et al. 2013)*

Byla ověřena jeho biokompatibilita a hemokompatibilita. Při hydrolytické degradaci se uvolňuje hydroxybutyrát, který se přirozeně vyskytuje v lidském těle, například v mozku, srdci, plicích a svalech, poté je z těla vyloučen. Ke kompletnímu vstřebání materiálu dojde za dobu 12–18měsíců. *(Williams et al. 2013; Martin et al. 2013; Deeken a Matthews 2013)*

Komerčně dostupné a klinicky používané jsou PHB šicí nitě, které mají vysokou pevnost a pružnost, je možné je prodloužit až do desetinásobku jejich původní délky. V tkáňovém inženýrství je PHB využívaný například pro kardiovaskulární aplikace, ve formě stentů *(Bünger et al. 2007; Hoerstrup et al. 2001)* nebo srdečních přepážek *(Martin a Williams 2003; Hoerstrup et al. 2000)*. Bylo zkoumáno i použití PHB při operaci kýli *(Deeken a Matthews 2013; Martin et al. 2013)*. Dále má potenciál pro ortopedické aplikace, drug delivery a hojení ran. *(Williams et al. 2013; Martin et al. 2013; Martin a Williams 2003)*

2 Střevní anastomóza

Anastomóza je uměle vytvořené spojení dvou konců dutého orgánu, například cév, nervů nebo střev. *(Rigutti 2006)* Střevní anastomóza patří k nejčastějším operacím abdominální (břišní) chirurgie, největší počet anastomóz je vytvořen při operaci kolorektální karcinomu (rakoviny tlustého střeva a konečníku). *(Blažej et al. 2015)*

Z celosvětových dat z roku 2018 je ve světě rakovina tlustého střeva a konečníků třetím nejčastějším typem rakoviny. V České republice je to druhá nejčastější onkologická diagnostika, ročně je u nás evidováno přibližně 8 000 nových případů. *(Bray et al. 2018; Dušek et al. 2012)*

Kolorektální karcinom je zhoubný nádor, u kterých dochází k nekontrolovanému nadměrnému množení buněk. Nádor je schopen se šířit a poškozovat další části těla, u rakoviny tlustého střeva a konečníku dochází k šíření nádoru nejčastěji do plic a jater. Konkrétní příčina vzniku zhoubného nádoru není dosud známa, ale jsou prokázané rizikové faktory, které vzniku tohoto onemocnění napomáhají. Mezi ně například patří neodstraněné polypy a chronické choroby jako je Crohnova nemoc. Na vznik onemocnění má vliv i věk a životní styl jedince. *(Dušek et al. 2012)*

Existuje několik možností léčby rakoviny tlustého střeva; chirurgická léčba, chemoterapie, ozařování nebo biologická léčba. Možností je i kombinace zmíněných metod. U chirurgické léčby dochází k odstranění části střeva s nádorem a přilehlých uzlin, následuje spojení zdravých konců střeva. *(Blažej et al. 2015; Gerardo Terrone et al. 2011)*

2.1 Metody vytvoření střevní anastomózy

V klinické praxi běžně využívanými technikami opětovného spojení střev jsou šití a stapler. Dále existuje metoda kompresní anastomózy, ale tato technologie se v současné době nepoužívá. Ke kompresi se používaly kovové klipy nebo prstence, později i biodegradabilní prstence z PGA. *(Boersema et al. 2017; Blažej et al. 2015; Nordentoft 2015)*

Potřeba zlepšení metody střevních anastomóz je stále aktuální z důvodu výskytu závažných pooperačních komplikací, které mohou vést i ke smrti pacienta. Stále jsou vyvíjeny nové technologie, které by mohly tradiční metody nahradit nebo zvýšit jejich efektivitu. *(Blažej et al. 2015; Nordentoft 2015)*

Z alternativních metod bylo zkoumáno například spojení konců střev svářením, pomocí vysokého proudu nebo laseru. *(Ho a Ashour 2010; Talmor et al. 2001)* Slibné výsledky mají tkáňová lepidla *(Nordentoft 2015)*, která jsou popsána podrobněji níže. Dále jsou vyvíjeny polymerní materiály, z nich vybrané jsou uvedeny ve třetí kapitole literárního přehledu, viz 3 Antiadhezivní materiály.

2.1.1 Šití

Technikou nejstarší je spojování konců střev šitím. U této metody je více technologických parametrů, kterými se jednotlivé anastomózy liší. Záleží na (a) způsobu spojení střev, (b) počtu vrstev, ve kterých je anastomóza šitá, (c) typu stehů, které mohou být přerušované či spojené. Důležitý je samozřejmě i (d) výběr šicího materiálu. *(Blažej et al. 2015; Schein Moshe, Rogers Paul 2011)*

Prvním šicím materiálem používaným se střevy bylo ovčí střevo, které přirozeně degradovalo. Dále bylo používané i hedvábí, u kterého se později potvrdila větší zánětlivá reakce organismu. Současně používané šicí nitě jsou syntetického původu, bývají pletené nebo monofilní. Pletené nitě mají větší odpor vůči tkáni a konkrétně u PLGA, z kterého jsou dané nitě vyráběny, byla zaznamenána zvýšená zánětlivá reakce organismu. Při práci s monofilními nitěmi nedochází k destrukci tkáně, konkrétně se používají monofilní nitě z PDX. *(Blažej et al. 2015; Chen 2012; Ho a Ashour 2010)*

Existuje vícero možností, jak vytvořit anastomotický spoj, mezi doporučované patří *end to end*, tedy konci k sobě. Pro sešití konců střev jsou aktuálně preferovány monofilní nitě při použití techniky jednovrstvé anastomózy. *(Schein Moshe, Rogers Paul 2011)*

2.1.2 Stapler

Metoda používající stapler využívá ke spojení konců střeva svorky. Stapler funguje obdobně jako kancelářská sešívačka. Svorky simulují šití, ale oproti němu bývají aplikovány ve více řadách a větším počtu. Existují staplery lineární a cirkulární. *(Blažej et al. 2015)*

Současně se používají jednorázové sterilizované staplery s titanovými svorkami. Svorky jsou různého typu, liší se podle tloušťky tkáně, na kterou jsou aplikovány. *(Blažej et al. 2015)* Dalším materiálem, ze kterého se svorky vyrábí je nevstřebatelný polymer polytetrafluoretylen. Oproti kovovým svorkám vykazují větší biokompatibilní. Pro výrobu svorek jsou zkoumané i biodegradabilní materiály na bázi PGA, celulózy a kalcium alginátu. *(Mohamed et al. 2018; Chen 2012; Ho a Ashour 2010)*

2.1.3 Porovnání metody šití a stapleru

Pro vytvoření střevní anastomózy jsou obě metody, šití i stapler, efektivní a odborníci se nemohou jednoznačně shodnout, která z nich je vhodnější. Výběr technologie spojení konců střev je volbou chirurga a dále bývá ovlivněn zvyklostmi pracoviště. *(Ho a Ashour 2010)*

Metody se příliš neliší v těsnosti vytvořené spoje, počtu výskytu pooperačních komplikací a mortality. Šití je standartní osvědčenou metodou používanou v chirurgii po mnoho let a oproti staplerům je to výrazně levnější metoda. Další nevýhodou staplerů je častější technická porucha. Naopak jejich výhodou oproti šití je rychlost operace. *(Boersema et al. 2017; Schein Moshe, Rogers Paul 2011; Ho a Ashour 2010)*

2.1.4 Tkáňová lepidla

Tkáňová lepidla mohou být nanášena přímo na střevní spojení, pomocí nich dochází k vytvoření způsobu spojení střev je *end to end*. *(Vakalopoulos et al. 2013)* Obecně jsou preferována vstřebatelná lepidla, oproti částečně degradabilním a nevstřebatelným lepidlům na ně má organismus lepší reakci. *(Nordentoft 2015; Ho a Ashour 2010)*

Vytváření střevních anastomóz pomocí tkáňových lepidel není momentálně běžné v klinické praxi. Komerčně dostupná jsou chirurgická lepidla fibrinová, glutaraldehydová, kyanoakrylátová a polyethylen glykolová na bázi hydrogelů. *(Behrens et al. 2015)* Byly testovány i další materiály, například tkáňová lepidla z amniotické membrány (živočišný zárodečný obal), z kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy, PGA a polypropylenu. Tato tkáňová lepidla nebyla testována klinicky, pouze *in vivo* na zvířecím modelu. *(Nordentoft 2015)*

Kyanoakrylátová lepidla jsou nedegradabilní. Vykazují vhodné mechanické vlastnosti, především vysokou pevnost a zároveň ohebnost vytvořeného spoje, dále také dobrou adhezi ke střevu. Ale byla u nich zaznamenána zvýšená zánětlivá reakce organismu. *(Boersema et al. 2017; Behrens et al. 2015)*

Fibrinová lepidla mají více pozitivních výsledků oproti kyanoakrylátovým. *(Vakalopoulos et al. 2013)* Jsou vstřebatelná, degradují přirozeně enzymaticky v řádu několika týdnů. Fibrinové lepidlo by bylo možné vyrábět i z lidské či zvířecí krve, ale většina testovaných tkáňových lepidel je syntetické výroby. *(Nordentoft 2015)* Nevýhodou fibrinových tkáňových lepidel je cena. Cenově dostupnější jsou například lepidla glutaraldehydová, ale u nich jsou problémy s toxicitou. *(Behrens et al. 2015)*

Dle provedených testů *in vivo* a *in situ* jsou tkáňová lepidla bezpečná pro použití pro střevní anastomózy. Vykazují dobrou adhezi ke stěně střeva, zlepšují mechanické vlastnosti anastomózy, ale vliv na její hojení a snížení pooperačních komplikací nebyl přímo prokázán. *(Boersema et al. 2017; Blažej et al. 2015)* Nevýhodou tkáňových lepidel je nutnost několika krokové přípravy před jejich použitím. *(Behrens et al. 2015)*

2.2 Pooperační komplikace anastomóz

Hojení anastomózy prochází stejnými fázemi jako hojení ran. Nejprve dochází k zánětu, poté k proliferaci, a nakonec k remodelaci tkáně. *(Chen 2012)* Důležitou roli při hojení rány má kolagen, který zajišťuje pevnost vzniklé jizvy. Během prvních pooperačních dní je pevnost anastomózy omezená a riziko poruchy spojení je největší. Právě první dny je pevnost anastomózy nejvíce závislá především na kvalitě uměle vytvořeného

spojení. Dochází k přirozenému zvýšení produkce kolagenu fibroblasty a hladkosvalovými buňkami. *(Ho a Ashour 2010)*

Pravděpodobnost pooperačních komplikací je ovlivněna mnoha faktory, například místem anastomózy, typem operace, zda šlo o plánovanou či nouzovou operaci. Dále má vliv i stav pacienta, jeho předchozí nemoci a zásahy, například chemoterapie, ozařování a Crohnova nemoc. Také bylo prokázáno, že kouření a konzumace alkoholu ve velkém množství zhoršuje proces hojení rány a zvyšuje riziko vzniku komplikací. *(Guyton et al. 2016; Nordentoft 2015; Chen 2012; Liakakos et al. 2001)*

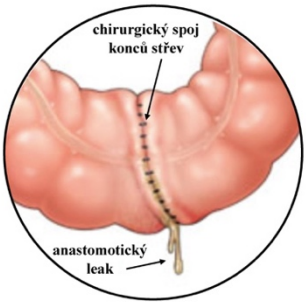
Pooperační komplikace mohou být děleny na časné a pozdní. Mezi nejzávažnější časné pooperační komplikace patří porucha hojení rány, se kterou souvisí anastomotický leak. Velmi závažnou časnou poruchou jsou i peritoneální adheze. Dále může dojít ke krvácení, mezi pozdní komplikace patří vznik kýly v jizvě. *(Capella-Monsonís et al. 2019; Schein Moshe, Rogers Paul 2011)*

Je důležité, aby byly pooperační komplikace co nejdříve odhaleny, k diagnostice se používá RTG (rentgen) a CT (výpočetní tomografie). U pacienta se výskyt komplikací projevuje například bolestí břicha, nechutí k jídlu, vysokými horečkami a zvýšenou tepovou frekvencí. Například přítomnost leaku je těžké diagnostikovat, ne u všech pacientů se projevují typické příznaky. *(Schein Moshe, Rogers Paul 2011; Hyman et al. 2007)*

2.2.1 Anastomotický leak

Jedním z obávaných a potenciálně smrtelně nebezpečných pooperačních problémů je únik střevního obsahu, tzv. leak, do okolí střeva. *(Boersema et al. 2017; Schein Moshe, Rogers Paul 2011)* Nejčastější příčinami anastomotického leaku jsou netěsnost spoje a odumření konců střeva. *(Hyman et al. 2007)*

Pooperační komplikace ve formě anastomotického leaku se vyskytuje u 3–19 % operací. Mortalita při výskytu těchto komplikací je 10–15 %. *(Schein Moshe, Rogers Paul 2011; Hyman 2009)* Obrázek 5 je zobrazuje ilustraci podoby anastomotického leaku.



Obrázek 5:Chirurgický spoj end to end tlustého střeva s anastomotickým leakem, převzato z (Medical Exhibits, Demonstartive Aids, Illustrations and Models, 2020).

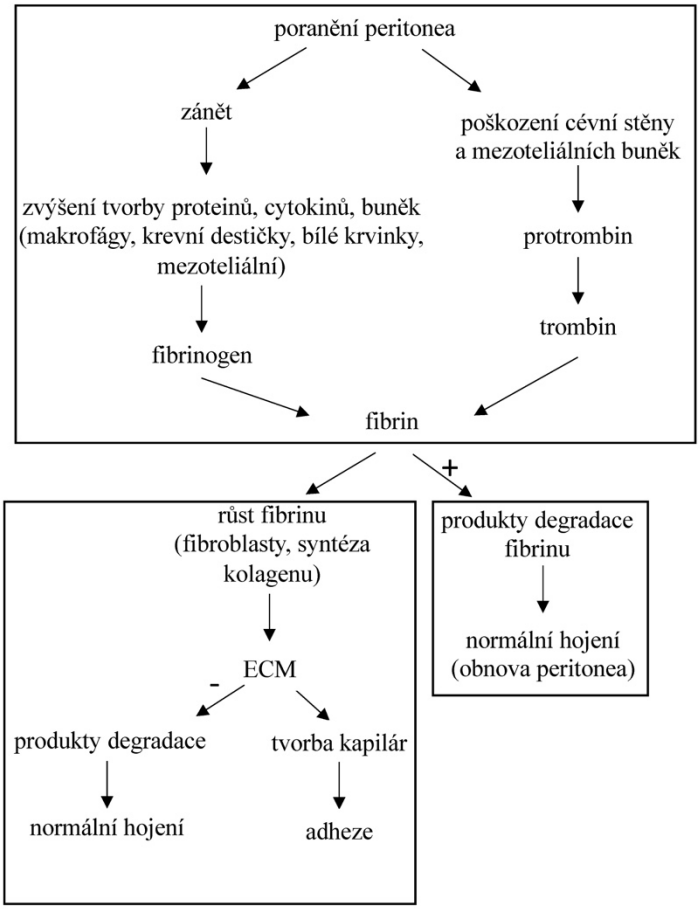
2.2.2 Peritoneální adheze

Ke vzniku peritoneálních adhezí dochází v časné pooperativní době, nejkritičtějším obdobím je 3–5dní od operace. Pooperativní adheze jsou výsledkem reakce organismu na ránu, která vznikla chirurgickým zákrokem. Během něhož došlo k narušení epiteliální vrstvy tkáně, což může vést k vytvoření těsného fibrinolytického spojení, adhezi. Tyto komplikace mohou být důvodem bolesti, ucpání tenkého střeva, u žen neplodnosti, reoperace a mohou výrazně ovlivnit kvalitu života a být i život ohrožující. Jedná se o velmi častou pooperativní komplikaci, četnost výskytu srůstů v abdominální chirurgii je 55–66 %. *(Capella-Monsonís et al. 2019; Liakakos et al. 2001)* U pacientů, kteří již před gastrointestinální operací prodělali chirurgický zákrok je 90%. *(Ko et al. 2017)*

Pooperativní adheze jsou závažnou komplikací nejen v gastrointestinální chirurgii, dochází k nim i při jiných chirurgických zákrocích. Problémovými oblastmi jsou například děloha a pericard (vnější obal srdce). V gastrointestinální chirurgii dochází k adhezi s podbřišnicí (peritoneum), která vystýlá dutinu břišní. *(Capella-Monsonís et al. 2019)* Obrázek 6 zobrazuje ilustrace postupného vytváření pevnějších abdominálních adhezí na střevě.

Obrázek 6: Ilustrace postupného zpevňování abdominálních adhezí na střevě, převzato z (Medical Exhibits, Demonstartive Aids, Illustrations and Models, 2020).

Adheze vznikají aktivitou fibroblastů a jejich proliferací, koagulací a ukládáním fibrinu, k čemuž dochází především v místech, kde nastalo krvácení či zánět. Dochází pak ke zvýšení proliferace buněk a tvorbě fibrinogenu. To je součást i k obvyklého procesu hojení, ale při něm na konci procesu dochází k degradaci fibrinu. Ale pokud se tvoří kapiláry, vzniká adheze a tvorba tzv. fibrinových mostů mezi povrchy tkání. Aby nedošlo k tvorbě nežádoucím adhezím, je důležité, aby byla rovnováha mezi degradací fibrinu a jeho usazováním. Obrázek 7 ukazuje zjednodušené schéma procesu tvorby adhezí a rovnováhy mezi ukládáním a degradací fibrinu, který je ovlivněný aktivací a inhibicí plasminogenu. *(Ko et al. 2017; Arung et al. 2011; Liakakos et al. 2001)*



Obrázek 7: Zjednodušené schéma rovnováhy ukládání a degradace fibrinu, která je ovlivněna aktivací (+) a inhibicí plasminogenu (-). Převzato z (Arung et al. 2011).

Momentálně je prevence vzniku srůstů závislá především na chirurgických technikách, které spočívají v jemném zacházení s tkání, atraumatickém přístupu (nezpůsobující poranění) a operaci bez nezbytného krvácení. *(Arung et al. 2011)*

Komerčně dostupné antiadhezivní materiály pro klinickou praxi jsou ve formě mechanických bariér, v podobě pevných látek, gelů, filmů a roztoků. Z klinicky ověřených materiálů byly nejvíce studovány *Seprafilm*© (Sanofi, Francie) a *Interceed*© (Johnson&Johnson, USA). *(Ko et al. 2017)* *Seprafilm*© je materiál z kyseliny hyaluronové a karboxymetyl celulózy, pro použití je bezpečný, ale jeho účinnost je průměrná. *Interceed*© je bariéra z oxidované celulózy, 24 hodin po aplikaci se z ní stane gel, který zabraňuje transportu fibrinu po dobu 7–10dní. *(Naito et al. 2017)* Dalšími fyzikálními bariérami předcházející adhezi jsou například *Adept*© (Baxter, USA), což je 4% antiadhezivní roztok icodextrinu, bariéra ve formě gelu z kyseliny hyaluronové *Hyalobarrier*© (Anika Terapeutics, USA). Dále *REPEL-CV*® (Pathfinder, USA) je polymerní film z etylenoxidu a kyseliny mléčné. *(Broek et al. 2014; Capella-Monsonís et al. 2019; Ko et al. 2017)*

Komerčně dostupné bariérové materiály neposkytují účinnou ochranu proti peritoneálním adhezím, žádný z nich není schopný zabránit komplikacím u všech případů. Je zapotřebí vyvinout produkt, který bude finančně dostupný a bude efektivní pro mnohé chirurgické aplikace a velký počet pacientů. *(Ko et al. 2017)*

Možností pro antiadhezivní prevenci je aplikace farmakologických látek. Tyto látky zabraňují vzniku adhezí a zánětů především v nejkritičtější době, 3–5 dní po operaci. Většina z nich nebyla testována klinicky, ale především *in vivo*. Farmakologické látky jsou ve formě antiadhezivních látek, protizánětlivých látek, hormonů nebo vitaminů. *(Capella-Monsonís et al. 2019; Li et al. 2017a)* Mezi ně například patří progesteron, jehož účinky na snížení výskytu adhezí byly potvrzeny *in vivo*. Dále antikoagulanty, například heparin, které snižují koagulaci fibrinu, ale nebyl u nich potvrzen účinek na vznik srůstů a při jejich použití docházelo k pomalejšímu hojení rány. *(Ko et al. 2017; Liakakos et al. 2001)* Růstový faktor hepatocytů má schopnost inhibovat ukládání kolagenu. Testy na krysách potvrdily schopnost snížit výskyt peritoneálních adhezí. *(Arung et al. 2011)* Pro zabránění buněčné proliferace působí mitomycin-C *(Urkan et al. 2017)*, jeho antiadhezivní účinky byly sledovány například *in vivo* na krysách. Formaci fibrinu snižuje i aprotinin a decorin. Nejvíce studovaným vitaminem pro prevenci adhezí je vitamin E, jedná se o antioxidant, který má protizánětlivé, antikoagulantní

a antifibroblastické účinky a snižuje produkci kolagenu, jeho účinky byly potvrzeny *in vitro*. Některé z antibiotik se běžně používají preventivně, aby se předešlo infekci a tvorbě adheze, *in vivo* se potvrdily účinky Linezolidu. *(Arung et al. 2011)*

2.3 Požadavky na ideální materiál pro střevní anastomózu

Především v prvních dnech, 5–7 dní po operaci, je riziko poruchy anastomózy závislé především na kvalitě jejího provedení. Zároveň je tato doba kritická k formování peritoneálních adhezí. Vhodný biomateriál pro střevní anastomózu by měl být biokompatibilní, nezánětlivý a inertní vůči imunogenní reakci. Odborníci spatřují výhodu v biodegradabilitě materiálu, který by umožnil efektivní hojení a prevenci pooperativních komplikací v kritické době. Ale poté nebránil v přirozeném hojení, funkci gastrointestinálního traktu a nepředstavoval překážku pro střevní průchodnost. Materiál musí umožňovat určitou pružnost anastomózy, aby nevznikalo napětí a nedošlo k porušení spojení. Podstatná je i určitá pevnost pro fortifikaci (zpevnění) anastomózy a aby manipulace s materiálem během chirurgického zákroku byla snadná, technika aplikace byla rychlá a jednoduchá. Materiál by měl zůstat po celou dobu účinnost na daném místě bez potřeby připevnění šitím a být stabilní během operace i po ní. V neposlední řadě je důležitá i cena materiálu. *(Rosendorf et al. 2020; Vakalopoulos et al. 2013; Goulder 2012; Schein Moshe, Rogers Paul 2011)*

Pro prevenci anastomotického leaku je důležité, aby materiál po operaci zajistil potřebné mechanické vlastnosti anastomózy a zvyšoval pevnost spojení konců střev. Ale zároveň nebránil tkáni ve vytvoření přirozeného spojení. Materiál musí zabránit úniku leaku při případném porušení chirurgicky vytvořené anastomózy. *(Vakalopoulos et al. 2013; Schein Moshe, Rogers Paul 2011)*

Mimo podpory hojení a prevence anastomotického leaku je podstatné, aby materiál zamezil i peritoneálním adhezím. Mechanické bariéry izolují chirurgické místo od okolních tkání. Měly by snižovat syntézu kolagenu, proliferaci a adhezi fibroblastů, bez negativního ovlivnění průběhu hojení. *(Capella-Monsonís et al. 2019; Li et al. 2017; Liakakos et al. 2001)*

3 Antiadhezivní modifikace materiálů

Adhezivita materiálu ovlivňuje například biokompatibilitu, adhezi proteinů, buněčný růst a proliferaci. Při úpravě vlákenných scaffoldů je většinou žádoucí zachovat bulkové vlastnosti a upravit především povrch materiálu. *(Woodruff a Hutmacher 2010)* Na adhezivitu či antiadhezivitu povrchu materiálu, má především vliv chemické složení a morfologie povrchu scaffoldu. *(Falde et al. 2016; Wang et al. 2011)* Dalším parametrem je smáčivost, kterou je například možné určit zjištěním kontaktního úhlu mezi materiálem a kapkou vody. Bylo prokázáno, že buňky lépe adherují k hydrofilním materiálům, kterými jsou označovány ty, svírající kontaktní úhel mezi materiálem a kapkou vody menší než 90°. Naopak jako hydrofobní materiály jsou definovány ty, které mají kontaktní úhel nad 90°. *(Bacakova et al. 2011)*

Jednou z možností kontroly adsorpce proteinů a buněk je vytvoření struktury povrchu s hrubostí v mikro a nanoměřítku. Další možností je například plazmatická modifikace povrchu. *(Falde et al. 2016)* Zvýšením mikrohrubosti povrchu a plazmatickou modifikací je možné radikálně změnit kontaktní úhel materiálu, například *Dowling et al. (2011)* z hydrofilního polyesteru s původním kontaktním úhlem 12° změnil hydrofilní povrch na superhydrofóbní (155°). Dále je možné použití antimikrobiálních materiálů, které sníží riziko infekcí a adhezivitu bakterií, mezi takové materiály například patří stříbro a chitosan. *(Campoccia et al. 2013)*

3.1 Plazmatická úprava

Fyzikální metody jako je iontová radiace, plazma nebo ultrafialové záření patří mezi vhodné povrchové úpravy pro biomateriály. V porovnání s chemickým způsobem modifikace je bezpečnější, neboť se u nich nepoužívají potenciálně cytotoxické chemikálie. *(Siow 2018; Bacakova et al. 2011)*

Plazmatická modifikace je efektivní metodou pro úpravu povrchových vlastností scaffoldu, pro změnu morfologie povrchu nebo zavedení požadovaných funkčních skupin bez ovlivnění bulkových vlastností materiálu. Úpravu plazmatem je možné použít i pro modifikaci polymerních materiálů s ohledem na jejich teplotu tání, u některých

materiálů je vhodnější použít studené plazma. Úprava plazmatem je komplexní proces, který je ovlivněn mnoha faktory, například výběrem aktivní látky, dobou působení, vlastnostmi původního materiálu, jak jeho povrchovou morfologií, tak i jeho chemickým složením. *(Siow 2018; Wang et al. 2011)*

Dle výběru aktivní látky je možné navázat funkční skupinu, která zvýší nebo sníží hydrofobicitu povrchu scaffoldu. Hydrofóbní vlastnosti vykazují materiály upravené například siloxany *(Recek et al. 2016; Hsiao et al. 2015)*, fluoropolymery *(Hsiao et al. 2015; Tanaka et al. 2006)* nebo uhlovodíky *(Klicova et al. 2019)*. Naopak například plazmatickou úpravou PCL nanovláken kyslíkem (O_2) může dojít ke snížení hrubosti a smáčivosti povrchu. *(Wang et al. 2011)*

Při plazmatické modifikaci siloxany dochází k vytvoření tenkého filmu na povrchu materiálu a typicky se objevují například vazby C-O, C-Si a Si-O. Ze siloxanů patří mezi nejpoužívanější monomery hexamethyldisiloxan (HMDSO), jedná se o cenově nenáročnou biokompatibilní hydrofobní úpravu. *(Petlin et al. 2017; Siow 2018)*

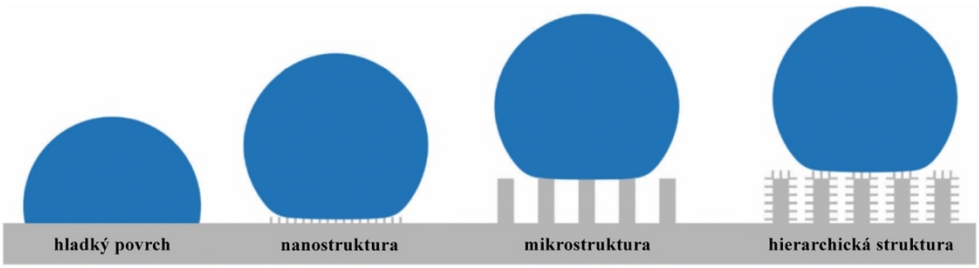
Petlin et al. (2017) aplikovali HMDSO plazmatickou úpravu na nanovlákenné scaffoldy, včetně tkáňového nosiče z PCL. Potenciální použití materiálů je pro drug delivery systém, modifikace byla provedena za účelem zpomalení degradace materiálu a uvolnění aktivní látky. Z neupraveného materiálu bylo 85% látky uvolněno do 15minut, oproti tomu u plazmaticky upravených scaffoldů došlo díky HMDSO k vytvoření hydrofóbní bariéry a látka se uvolnila po 30hodinách.

Hsiao et al. (2015) modifikovali polyuretanové folie pomocí HMDSO a tetrafluormethanu (CF_4). Úpravou došlo ke zvýšení kontaktního úhlu z 96° na 151° a ke změně morfologie povrchu. Pomocí *in vitro* testů potvrdili necytotoxicitu úpravy.

Hegemann et al. (2003) siloxanem plazmaticky modifikovaly polykarbonátový film. Úpravou došlo ke zvýšení kontaktního úhlu na 110° z původních 70°. Smáčivost materiálu sledovali po dobu 12měsíců. Nebylo potvrzeno stárnutí úpravy a změny povrchových vlastností, během 12měsíců od úpravy nedošlo k významné změně kontaktního úhlu.

3.2 Lotosový efekt

V přírodě se přirozeně vyskytují povrchy, které mají superhydrofóbní vlastnosti. Superhrydrofóbními se označují materiály, jejichž povrch má kontaktní úhel vyšší než 150°, kapka vody na takovém povrchu má téměř sférický tvar. Superhydrofóbní povrch mají například listy některých rostlin nebo části těla hmyzu, například nohy, křídla, oči či těla brouků. Hydrofobicita těchto povrchů je způsobena jejich specifickou členitou strukturou. *(Falde et al. 2016; Wang et al. 2011)* Chování kapky vody na rozdílně strukturovaném povrchu je ilustrováno na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schématická ilustrace čtyř nesmáčivých povrchů, převzato z (Hensel et al. 2016).

Konkrétně u lotosového listu se kontaktní úhel pohybuje okolo 161°, jeho superhydrofobicita je dána hierarchickou strukturou papil. Velikost papil je v řádech mikrometrů, většinou o velikosti 3–10 μm, které jsou pokryty výčnělky v nanoměřítku, v rozmezí 70–100 nm. *(Wang et al. 2011)*

Hierarchickou strukturu lotosového povrchu je možné vytvořit například litografií, kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu nebo začleněním částic oxidu zinečnatého (ZnO) nebo titaničitého (TiO_2). *(Falde et al. 2016; Hensel et al. 2016; Ke et al. 2014)*

Zhang et al. (2019) se inspirovali lotosovým efektem a vytvořili superhydrofóbní povrch PCL membrán s hierarchickou strukturou kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu z jehly. Elektrospraying byl aplikován na vrstvu z 20% PCL a materiál z 20%PCL a methylsilikonovým olejem (PCL/MSO). Kontaktní úhel samotné PCL nanovlákenné vrstvy byl 120°, už u modifikovaného materiálu PCL/MSO došlo ke snížení

povrchové energie, kontaktní úhel byl 142°. Pro elektrospraying byly použity koncentrace 4–6% PCL, kontaktní úhel klesal se zvyšující se koncentrací. U samotné 4% PCL sprayingem vytvořené vrstvy byl 146°. V kombinaci s PCL/MSO byl kontaktní úhel 150°. Membrána má potenciální aplikaci v oblasti separačních membrán a v tkáňovém inženýrství.

Yoon et al. (2010) se věnovali vytvoření superhydrofóbního povrchu kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu PCL, který byl vytvořen v jednom kroku. PCL vlákna ze 17% roztoku a kapky z 1% polymerního roztoku. Byl použit PCL o molekulové hmotnosti 80 000 g/mol a rozpouštědlový systém chlormethan/dimetylformamid v poměru 20/80. Jako kolektor použili vodní lázeň, vrstva byla sprejována po dobu 2 hodin. Kontaktní úhel výsledné vrstvy byl 172°.

3.3 Kompozitní materiály

Multikomponentní elektrostaticky zvlákněné vrstvy jsou žádané nejen pro použití pro změnu smáčivosti povrchu, dále pro drug delivery systémy nebo vytvoření senzorů. *(Wang et al. 2019)* Pro výrobu mechanických bariér byly použity materiály přírodní, například kyselina hyaluronová, želatina, kolagen a celulóza. Ze syntetických materiálů byly použity například kyselina polymléčná (PLA), polyethlyenglykolu (PEG), PCL nebo polyvinylalkohol (PVA). ve formě hydrogelů, elektrostaticky zvlákněných vrstev, filmu nebo mikrosfér byly zkoumány *in vivo* a v klinických testech *(Capella-Monsonís et al. 2019)*

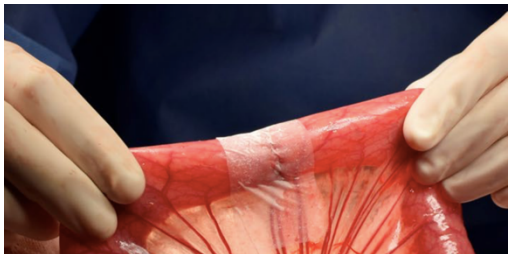
Kyselina hyaluronová je používaná jako mechanická bariéra i v komerčně dostupných produktech, například pod názvem *Sepracoat®*. *(Li et al. 2017b) Chen et al. (2015)* testovali použití kyseliny hyaluronové v kombinaci s PCL ve formě vláken typu jádro plášť a přidání nanočástic stříbra. *In vitro* i *in vivo* studie na králících potvrdili efekt materiálu na snížení tvorby adhezí.

Li et al. (2017) vytvořili biodegradabilní materiál pro prevenci adhezí ve formě kompozitní nanovlákenné vrstvy polyethylenglykol/kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PEG/PLGA). Vrstva byla vytvořena současným elektrosprayingem ze dvou

jehel. Nejvhodnější výsledky měla vrstva, která obsahovala 5% PEG, u které byl kontaktní úhel 86°, *in vivo* prokázali schopnost snížit výskyt abdominálních adhezí.

Ko et al. (2017) vyvinuli nanovlákenný barierový materiál skládající z chitosanu, PLGA a PEG. Materiály byly testovány *in vivo* na krysách a jejich účinnost byla hodnocena po čtyřech týdnech od aplikace. Kopolymerní materiál byl značně efektivnější v prevenci adhezí než bariéra pouze z PLGA. Bylo pozorováno i snížení míry zánětu díky antimikrobiálním účinkům chitosanu.

Rosendorf et al. (2020) v Biomedicínkém centru v Plzni ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci testovali možnost zpevnění střevní anastomózy pomocí nanovláken *in vivo* na selatech. Tato studie je zde popsána podrobněji, protože experimentální část této diplomové práce navazuje ve vývoji daného materiálu. *Rosendorf et al.* testovali dva druhy nanovlákenných materiálů. První z nich byla samotná PCL vrstva, druhým byla vrstva z kopolymeru kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu (PLCL). Materiály byly testovány na tenkých střevech selat. Ve velikosti 2 × 5 cm byly aplikovány přes místo chirurgicky sešité anastomózy, viz Obrázek 9. Doba experimentu byla stanovena na tři týdny, protože u většiny pacientů se komplikace ve formě anastomického leaku objeví do dvou týdnů od operace. Během experimentu nedošlo k žádným komplikacím, oba materiály podporovaly hojení tkáně. Nedošlo k relokaci nanovlákenných vrstev z místa aplikace, ale ani nebyla známka degradace materiálu. U žádného zvířete s PCL vrstvou nedošlo k infekci, u skupiny selat s PLCL se objevila. *Rosendorf et al.* vyzdvihují snadnost práce a aplikace materiálů bez nutnosti další fixace. Materiály k místu snadno přilnuly, ale zároveň s nimi bylo možné bez poškození, v případě potřeby dále manipulovat. Nevýhodou PCL i PLCL materiálů byl zvýšený výskyt adhezí k okolním tkáním.



Obrázek 9: Nanovlákenná PCL vrstva aplikovaná přes chirurgicky sešitou střevní anastomózu selete, převzato z (Rosendorf et al. 2020).

Experimentální část

4 Metody

4.1 Příprava polymerních roztoků

Polymerní roztoky byly připraveny celkem ze třech polymerů; poly-ε-kaprolaktonu, poly-*p*-dioxanonu a poly-*4*-hydroxybutyrátu. Všechny koncentrace jsou uváděny w/w. Polymerní roztoky byly připraveny pro technologii elektrosprayingu z jehly (2, 5% PDX; 0,1, 0,25, 0,5% PHB; 3, 5, 10%PCL) o objemu 10g. Dále pro bezjehlový elektrospinning (16% PCL) o objemu 100 g a elektrospraying (2, 3, 5, 7% PCL) o objemu 200 g. Všechny roztoky byly za stálého míchání rozpouštěny po dobu 24hodin a poté ihned zpracovány.

Pro přípravu PDX polymerních roztoků o koncentracích 2 a 5% w/w byl PDX rozpuštěn ve formě monofilamentního šicího materiálu (*Monosorb*®, Samyang Biopharm, Jižní Korea) v 2,2,2-trifluoroethanolu (TFE, >99,0% GC, TCI Chemicals, Německo).

Příprava PHB roztoků probíhala rozpuštěním monofilamentního šicího materiálu (*MonoMax*® - B.Braun, TEPHA, Velká Británie). PHB bylo připraveno o koncentracích 0,1, 0,25 a 0,5% w/w v 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolu (HFP, >99,0% GC, TCI Chemicals, Německo).

Polymerní roztoky PCL byly připraveny z granulátu o molekulové hmotnosti 45 000 g/mol (Sigma Aldrich, USA) v rozpouštědlovém systému chloroform (Penta Chemicals, Česká republika)/kyselina octová (Penta Chemicals, Česká republika)/ethanol (Penta Chemicals, Česká republika) v poměru 8/1/1 (v/v/v) o koncentracích 2, 3, 5, 7, 10 a 16% w/w.

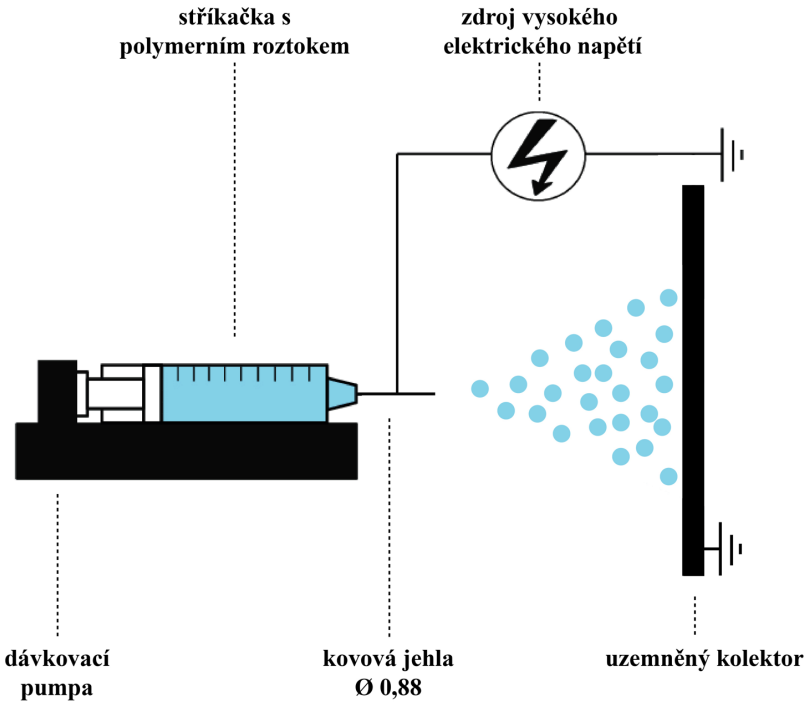
4.2 Viskozita polymerních roztoků

Viskozita polymerních roztoků byla měřena pomocí přístroje HAAKE™ RotoVisco™ 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Měření všech roztoků probíhalo za konstantních otáček 1000 s^{-1} a konstantní rychlosti 400 s^{-1}. Pro měření bylo použito 300 µl polymerního roztoku, pro každý roztok bylo provedeno deset měření, výsledná hodnota je jejich průměrem. Viskozita byla měřena při teplotě 22,15 ± 0,24 °C.

4.3 Výroba materiálů

4.3.1 Elektrospraying z jehly

Polymerní kapky byly sprejovány pomocí laboratorního zařízení, elektrostatickým sprejováním z jehly, schéma zařízení je zobrazeno níže, viz Obrázek 10. Podkladovým materiálem byl černý papír. Parametry procesu sprejování jednotlivých polymerních roztoků jsou uvedeny níže, viz Tabulka 1.



Obrázek 10: Schéma zařízení pro elektrospraying z jehly s průměrem 0,88 mm.

Tabulka 1: Podmínky zvlákňování různých koncentrací polymerních roztoků PCL, PDX a PHB.

Polymerní roztok	Dávkování [ml/h]	Napětí [kV]	Vzdálenost od kolektoru [cm]	Okolní podmínky
3% PCL	4,5	22,0	12,5	teplota 22,4 °C vlhkost 29,1 %
5% PCL	7,5	22,0	12,5	
			16,5	
10% PCL	3,5	18,0	18,0	
			20,0	
2% PDX	5,5	20,0	11,0	
5% PDX	3,5	17,3	12,5	
0,25% PHB	3,0	20,0	13,0	teplota 21,8 °C vlhkost 19,9 %
0,5% PHB	3,0	18,0	13,0	

4.3.2 Bezjehlové elektrostatické zvlákňování

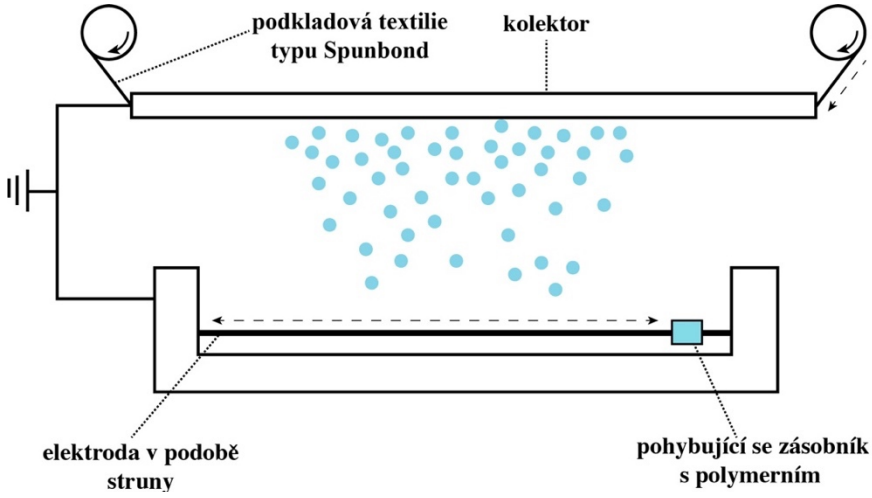
Bezjehlový elektrospinning byl proveden na stroji Nanospider^{TM} typu NS 1WS500U (Elmarco, Česká republika se zvlákňováním ze struny, schéma zařízení zobrazuje Obrázek 1, viz teoretická část diplomové práce, kapitola 1.1.2 Výroba scaffoldu elektrostatickým zvlákňováním. Klimatické podmínky byly během procesu přesně regulovány klimatizačním systémem NS AC150/1000/2000 (Elmarco, Česká republika). Polymerní roztok 16% PCL byl dávkován pomocí pohyblivé zásobníku (cartridge). Parametry procesu zvlákňování jsou uvedeny níže, viz Tabulka 2. Vytvořená vlána byla ukládána na podkladovou textilii typu Spunbond z polypropylenu.

Tabulka 2: Podmínky elektrostatického zvlákňování 16% PCL.

Typ polymeru	16% PCL	
Rozpouštědlový systém	Chloroform/ethanol/kyselina octová 8/1/1	
Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	175	
Napětí [kV]	**Elektroda 1**	**Elektroda 2**
	-10	40
Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]	450–500	
Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min]	80	
Rychlost odtahu struny [mm/min]	15	
Velikost průvlaku [mm]	0,6	
Teplota [°C]	22	
Relativní vlhkost vzduchu [%]	50	

4.3.3 Bezjehlové elektrostatické sprejování

Proces bezjehlového elektrosprayingu je analogický k bezjehlovému elektrostatickému zvlákňování. Taktéž byl proveden na zařízení Nanospider^{TM} typ NS 1WS500U (Elmarco, Česká republika) a klimatické podmínky během elektrosprayingu byly řízeny klimatizačním systémem NS AC150/1000/2000 (Elmarco, Česká republika). Schéma elektrostatického sprejování ze struny ukazuje Obrázek 11. Rozdíl oproti elektrospinningu je v koncentraci zpracovávaného polymerního roztoku a parametrech procesu.



Obrázek 11: Schéma elektrosprayingu na stroji Nanospider^{TM}.

Tabulka 3 zobrazuje podmínky elektrostatického sprejování na Nanospider^{TM} pro polymerní roztoky PCL o koncentraci 2–7 %. Poté, co byla vybraná koncentrace, u které docházelo k nejhomogennějšímu vzniku polymerních kapek, bylo nutné zjistit vhodné podmínky pro elektrostatické rozprašování, tyto podmínky jsou uvedeny dále v kapitole 5.2.1 Hledání koncentrace pro elektrostatické sprejování.

Tabulka 3: Podmínky elektrostatického sprejování roztoků PCL.

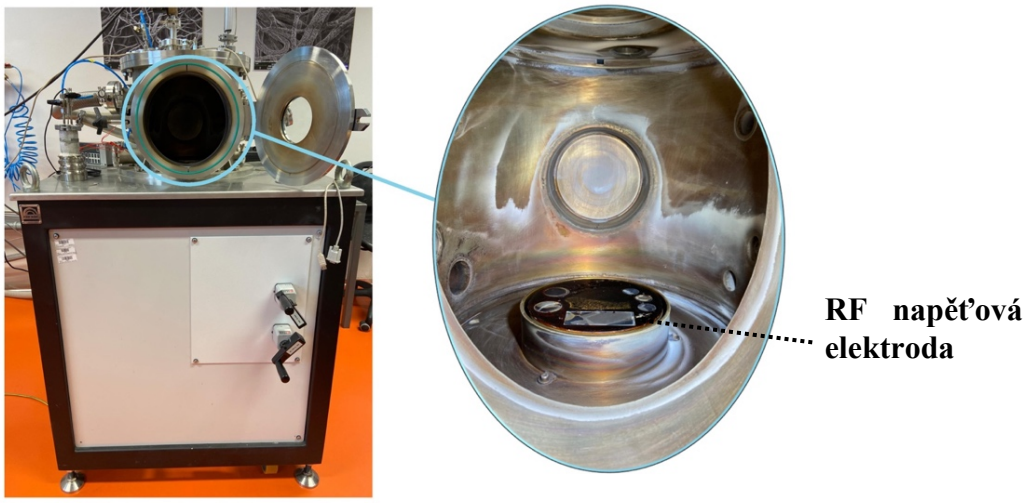
<table>
<tr><td>Koncentrace polymerních roztoků PCL [%]</td><td colspan="3">2, 3, 5, 7</td></tr>
<tr><td>Vzdálenost mezi elektrodami [mm]</td><td colspan="3">129</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Napětí [kV]</td><td>Elektroda 1</td><td colspan="2">Elektroda 2</td></tr>
<tr><td rowspan="2">-5</td><td>Pro roztoky s konc. 3–7 %</td><td>Pro roztok s konc. 2 %</td></tr>
<tr><td>30</td><td>23</td></tr>
<tr><td>Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]</td><td colspan="3">400–420</td></tr>
<tr><td>Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min]</td><td colspan="3">0</td></tr>
<tr><td>Rychlost odtahu struny [mm/min]</td><td colspan="3">15</td></tr>
<tr><td>Velikost průvlaku [mm]</td><td colspan="3">0,5</td></tr>
<tr><td>Teplota [°C]</td><td colspan="3">22</td></tr>
<tr><td>Relativní vlhkost vzduchu [%]</td><td colspan="3">50</td></tr>
</table>

4.4 Plazmatická úprava

Modifikace povrchů materiálů byla provedena metodou depozice pomocí studeného plazmatu RF PACVD (Radiofrekvenční plazmaticky asistovaná depozice z plynné fáze). Jednotlivé parametry jsou uvedeny níže, viz Tabulka 4, a byly po celou dobu úpravy konstantní. Jako aktivní látka byl použit hexamethyldisiloxan. Modifikace povrchu materiálu plazmatem probíhala v plazmatické komoře, zařízení je zobrazeno níže, viz Obrázek 12.

Tabulka 4: Parametry plazmatické úpravy.

Tlak vakua p [Pa]	30
Frekvence RF generátotu [MHz]	13,5
Napětí U [V]	340
Průtok plynu argon Ar [sccm]	10
Průtok plynu dusík N_2 [sccm]	7
Čas t [min]	1, 2, 3



Obrázek 12: Fotografie vakuové plazmatické komory.

4.5 Charakterizace materiálů

4.5.1 Morfologie vrstev

Mikroskopické hodnocení morfologie vrstev bylo posuzováno pomocí snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM, TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe, Česká republika). Vzorky byly před analýzou nejprve umístěny na terčíky a pozlaceny 7 nm vrstou zlata na zlatícím přístroji (QUORUM Q50ES, Quorum technologies, Velká Británie).

Ze SEM snímků byly měřeny průměry vláken a kapek v programu IMAGE J (U.S. National Institute of Health, NIH Image, USA). Pro každé měření byly

použity minimálně dva SEM snímky se zvětšením 2500×, z každého snímku bylo uděláno 100 měření.

4.5.2 Plošná hmotnost

Plošná hmotnost byla zjištěna zvážením vzorků materiálů o velikosti 20 × 20 mm, od každého materiálu bylo připraveno šest vzorků náhodně vybraných z celé plochy materiálu.

4.5.3 Měření kontaktního úhlu

Kontaktní úhel byl zjišťován pomocí metody přisedlé kapky na přístroji See System 6.2 (Advex Instruments, Česká republika). U všech testovaných materiálů byl kontaktní úhel měřen z rubní i lícní strany. Pro měření byl použit vzorek materiálu o velikosti 1 × 8 cm, který byl po okrajích připevněn pomocí oboustranné pásky na podložní sklíčko. Na vzorek bylo pomocí mikropipety naneseno 3,5 µl destilované vody (dH_2O). Kapka byla na materiálu zaznamenána CCD kamerou. Poté byly na fotografii kapky vyznačeny tři body, díky nimž byla vytvořena kružnice, která kopírovala tvar kapky. Velikost kontaktního úhlu odpovídá tangentě vzniklé kružnice.

4.5.4 Zjišťování absorpce materiálu

Metodika testování absorpce (water uptake) byla vytvořena na základě publikace *Choi et al. (2011)*. Nasákavost neboli absorpce byla u materiálů zjišťována se dvěma tekutinami, s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Simulovaná střevní tekutina byla připravena dle postupu Českého lékopisu *(Ministerstvo zdravotnictví ČR 2017).* Přidáním 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4, Lachema, Česká republika) do 250 ml dH_2O, poté bylo přidáno 77 ml hydroxidu draselného (NaOH, Penta Chemicals, Česká republika) o koncentraci 0,2 mol/l, 50 ml dH_2O a 10 g práškového pankreatinu (TCI Chemicals, Japonsko). Po promíchání bylo upraveno pH roztoku na 6,8 a nakonec byl objem roztoku doplněn dH_2O na 1 000 ml.

Z testovaných materiálů byly připraveny vzorky o velikosti 20 × 20 mm, vždy ve třech opakováních pro každou tekutinu. Vzorky byly nejprve zváženy (m_A), poté umístěny

do zkumavek, zality 50 ml tekutiny a ponechány ponořené po dobu 24hodin při pokojové teplotě. Po uplynutí doby byly vzorky zváženy (m_B) a nechány vyschnout, po vysušení byla opět zjištěna jejich hmotnost (m_C).

Ze získaných dat byla spočítána absorpce (A) pomocí rovnice (1), kde m_A je hmotnost suchého vzorku před testováním a m_B hmotnost po 24 hodinách adsorpce.

$$A\,[\%] = \frac{m_B - m_A}{m_A} \cdot 100 \qquad (1)$$

Dále byl vypočítán procentuální úbytek hmotnosti (U) po testování adsorpce, viz rovnice (2), kde m_A je hmotnost vzorku před testováním, m_C je hmotnost po testování a úplném vysušení.

$$U\,[\%] = \frac{m_A - m_C}{m_A} \cdot 100 \qquad (2)$$

4.5.5 Chemické složení

Chemické složení vzorků bylo hodnoceno analýzou infračervené spektrometrie, technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR-FTIR) na krystalu z diamantu pomocí přístroje Nicolet iZ10 (Thermo Fisher, Spojené státy americké). Vzorky byly před měřením pouze sejmuty z podkladové textilie typu Spunbond, nebyly dále pro měření upravovány.

4.6 Biologické testování *in vitro*

Při testování *in vitro* bylo používáno kompletní médium, které se skládalo z Dulbeccova modifikovaného eagle media (DMEM, Biosera, Francie), 10% fetálního bovinního séra (FBS, Biosera, Francie), 1% glutaminu (Biosera, Francie) a 1% antibiotik – Pen/Strep Amphotericin B (ATB, Lonza, Švýcarsko).

Materiály a jejich extrakty byly testovány s 3T3-SA myšími fibroblasty (ATCC, USA), které byly kultivovány v kompletním médiu a uchovávány v inkubátoru (Sanyo Electric Co., Ltd., Japonsko) při 37 °C a v atmosféře obsahující 5 % CO_2. Buňky byly po dosažení požadované konfluence zpasážovány. Při pasážování byly buňky nejprve opláchnuty

PBS (fosfátový pufr), poté k nim byl přidán trypsin (Lonza, Švýcarsko) a byly ponechány v inkubátoru při 37°C po dobu 5minut, následně byly resuspendovány. Na vzorky byly buňky nasazeny v hustotě $7 \cdot 10^3$ na jamku.

4.6.1 Příprava a sterilizace vzorků

Samotnému biologickému testování předcházela příprava materiálů. Z testovaných materiálů byly připraveny vzorky ve velikosti 24jamkové destičky (průměr 16 mm), zatíženy skleněnými kroužky a vysterilizovány ethylenoxidem ve sterilizátoru Anprolene. Sterilizace postupovala dle normy ČSN EN ISO 11135-1 Sterilizace výrobků pro zdravotní péči – Sterilizace ethylenoxidem – Část 1: Požadavky na vývoj, validaci a průběžnou kontrolu sterilizačního postupu pro zdravotnické prostředky. Sterilizace probíhala po dobu 12hodin při 37 °C, následně byly materiály odvětrány při pokojové teplotě minimálně po dobu jednoho týdne.

4.6.2 Cytotoxicita extraktů

Metodika testování cytotoxicity extraktů materiálů a testování s myšími fibroblasty byla stanovena dle normy ČSN EN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro.*

Vzorky materiálů byly připraveny ve velikosti dna 24jamkové destičky. Vzorky byly umístěny ve 24jamkové destičce spolu s kompletním médiem po dobu 24hodin na třepačce (N-Biotek, Jižní Korea) o 100 rpm a teplotě 37 °C.

Extrakty materiálů byly přendány do 96jamkové destičky, k již vytvořené subkonfluentní vrstvě fibroblastů. Kompletní médium DMEM s buňkami bylo použito jako negativní kontrola (NC) experimentu. Pozitivní kontrolou (PC) byly buňky s kompletním médiem a 0,1% cytotoxickým činidlem Tritonem X-100. Obě kontroly byly vystaveny stejným podmínkám spolu s extrakty materiálů po dobu 24hodin. Pro každý materiál bylo testováno osm extraktů.

Pro stanovení viability (životaschopnosti) buněk byl použit kolorimetrický metabolický test MTT. Tento test je založen na reakci na mitochondriální membráně živých buněk,

kde dochází k redukci žlutého 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan ve formě fialových krystalků. Krystalky formazanu jsou rozpuštěny přidáním okyseleného isopropanolu. Od každého vzorku bylo odebráno 300 µl do 96jamkové destičky. Zabarvení bylo vyhodnocováno spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Pro každou skupinu bylo testováno osm opakování. Hodnota viability negativní kontroly odpovídala 100% viabilitě, hranice cytotoxicity byla stanovena dle normy na 70% viabilitu.

4.6.3 Testování *in vitro* s buněčnou linií

Buněčná životaschopnost buněk nasazených na vzorcích byla testována ve třech časových intervalech, po 4, 7 a 14dnech kultivace od nasazení kolorimetrického metabolického testu MTT. Pro testování byla použita 16. pasáž 3T3-SA myších fibroblastů (ATCC, USA). Vzorky byly po dobu testování inkubovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2. Pro každou skupinu materiálů bylo testováno pět opakování a jedna negativní kontrola. Absorbance vzorků byla měřena při vlnové délce 570 a 650 nm. Hodnoty negativních kontrol byly od testovaných vzorků odečítány.

4.6.4 Analýza pomocí fluorescenční mikroskopie

Analýza fluorescenční mikroskopií (FLM) byla rovněž provedena po 4, 7 a 14 dnech. Po odsátí kultivačního média byly vzorky nejprve dvakrát propláchnuty PBS, a poté fixovány po dobu 10minut pomocí 2,5% glutaraldehydu (Sigma Aldrich, USA). Následně byl jako blokovací pufr přidán 0,1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) v 0,1% hovězím sérovém albuminu (BSA) v PBS, blokovací pufr působil po dobu 10minut.

Dále následovalo přidání zabarvovacích roztoků. Ke vzorkům byl přidán roztok phalloidinu-FITC a ponechán po dobu 30minut, který způsobuje obarvení aktinových filamentů v zeleném spektru. Vzorky byly inkubovány i s roztokem DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) po dobu 10minut, který zabarvuje buněčná jádra v oblasti modrého spektra.

Vzorky s obarvenými buňkami byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon. Z deseti snímků (zvětšení 100x) byl stanoven počet buněk na 1 mm^2 vzorku pomocí softwaru MATLAB (MathWorks, USA).

4.6.5 Analýza rastrovací elektronovou mikroskopií

Pozorování morfologie buněk po 4, 7 a 14dnech od nasazení bylo provedeno pomocí SEM. Poté, co bylo od vzorků odsáto kultivační médium byly vzorky dvakrát opláchnuty PBS (Sigma Aldrich, USA) a fixovány pomocí 2,5% glutaraldehydu v PBS po dobu 10minut. Pro úplné vysušení vzorků pro SEM byly vzorky ošetřeny dehydrogenační etanolovou řadou (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) a vysušeny na parafinu. Po úplném vysušení byly materiály pozlaceny a zanalyzovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (Vega 3, TESCAN, Česká republika), stejně jako v kapitole 4.5.1 (Morfologie vrstev).

4.7 Testování adheze

Metodika testování adheze materiálů byla založena na principu testování adhezí ke kůži 90° peel testem (odlupovací zkouška), jehož metodika byla převzata z *(Wokovich et al. 2008)*. Stejně jako u testování předchozích materiálů *in vivo* na selatech *(Rosendorf et al. 2020)* bylo jako model tkáně zvoleno tenké střevo z prasete.

Oproti uvedené metodice byl použitý jiný rozměr vzorků a vzorky po aplikaci nebyly zatíženy válcem (2041 g). Rozměr byl zvolen na základě nadcházejících testů *in vivo* na prasatech. Na model tkáně (tenké střevo) byly materiály aplikovány a poté přitlačeny rukou, stejně jako tomu je při operacích *in vivo*, což více odpovídá reálným podmínkám.

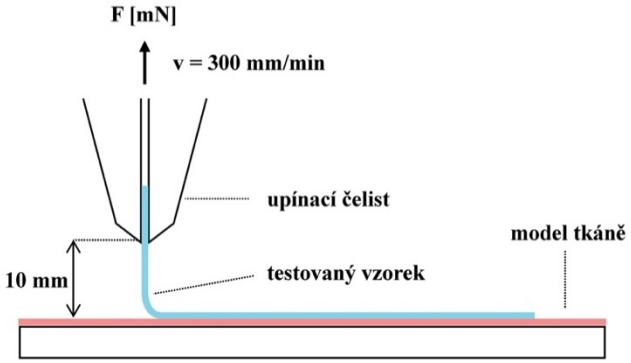
Experiment byl proveden na trhacím přístroji LabTest 4.050 (LaborTech, Česká republika). Trhacímu přístroji přísluší počítač se softwarem pro mechanické zkoušky LabTest 3.2.1.2138 (LaborTech, Česká republika), který poskytuje i analytické a grafické vyhodnocení výsledků. Pro upnutí vzorku byl použit siloměrný tenzometrický snímač s nejvyšší zatížitelností 5 N a kolíčková čelist pro upnutí vzorku.

Nejprve byly připraveny čtyři vzorky od každého materiálu o velikosti 50 × 150 mm, vzorky byly ponechány na podkladové textilii typu Spunbond. Dále byl připraven podklad ve formě tenkého střeva z prasete, které bylo po vybalení promyto vodou a následně namotáno okolo desky o velikosti 220 × 60 mm, která byla poté z jedné strany překryta druhou deskou o stejné velikosti. Deska byla připevněna do spodní čelisti trhacího stroje. Testovaný vzorek byl upevněn do horní čelisti, jejíž poloha byla 10 mm od povrchu střev a aplikován na jeho povrch za pomoci rukou. Po 3minutách od aplikace byla spuštěna tahová zkouška, kdy byl vzorek rychlostí 300 mm/min odlupován od povrchu střev. Střeva byla po každé zkoušce vlhčena destilovanou vodou, aby byly podmínky experimentu pro všechny materiály stejné. Testování probíhalo za teploty 18,1°C a vlhkosti vzduchu 46,0 %. Parametry zkoušky jsou shrnuty v Tabulce 5. Schéma testování je zobrazeno na Obrázku 13. Fotografie z realizace testování je na Obrázku 14.

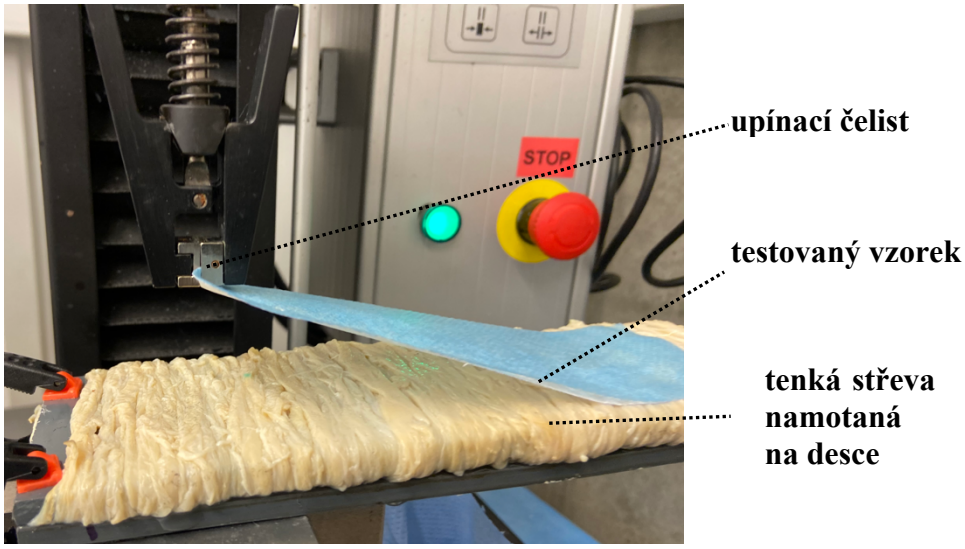
Tabulka 5:Parametry mechanické zkoušky.

Rozměr vzorku (šířka × délka) [mm]	50 × 150
Rozměr desky (podklad pro střeva) (šířka × délka) [mm]	220 × 60
Klidová doba [min]	3
Rychlost pohybu čelisti [mm/min]	300
Doba trvání zkoušky [s]	20
Teplota vzduchu [°C]	18,1
Vlhkost vzduchu [%]	46,0

Měřením byla získána závislost síly na vzdálenosti. Míra adheze byla hodnocena maximální silou *F* [N] potřebnou k odloupnutí materiálu od povrchu střev. Ze získaných hodnot byla zjištěna průměrná hodnota a směrodatná odchylka.



Obrázek 13: Schéma mechanické zkoušky adheze nanovlákenných materiálů k modelu tkáně (tenké střevo).



Obrázek 14: Fotografie z průběhu testování adheze peel testem 90°.

4.8 Zpracování dat

Vstupní data byla zpracována pomocí programu Excel Microsof Office 2019 (Microsoft Corporation, USA). Pro statistickou analýzu a grafické zobrazení dat byl použit software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA).

Před parametrickým porovnáním bylo nejprve ověřeno normální rozložení dat. Porovnávání skupin vzorků bylo provedeno parametrickým testem *ANOVA* (Analýza variability). Byl použit test *Bonferroni* s hladinou významnosti $p \leq 0{,}001$. Pokud se jednalo o data, která neodpovídala normálnímu rozdělením, byl použit neparametrický test *ANOVA Kruskal-Wallis*. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami dat jsou v grafech vyznačeny hvězdičkami podle hodnoty p (* $p<0{,}0332$, ** $p<0{,}0021$,*** $p<0{,}0002$, **** $p<0{,}0001$). Pokud mezi skupinami není porovnání znázorněno, rozdíl nebyl statisticky významný ($p<0{,}1234$).

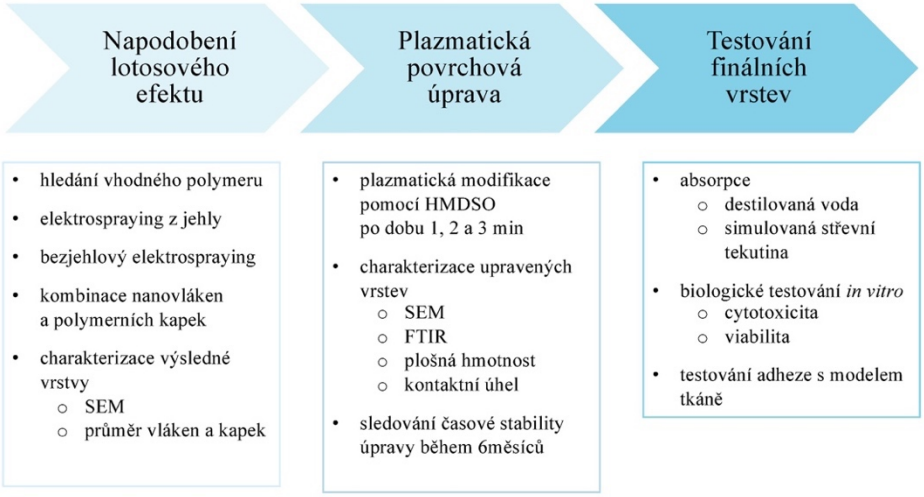
Některá data jsou zobrazena formou krabicových grafů (boxplot), kde fousy zobrazují minimum a maximum, okraje boxplotu odpovídají prvnímu a třetímu kvartilu a uvnitř je znázorněný medián dat.

Výsledky

Diplomová práce vychází a navazuje na předchozí studie materiálů, které byly testovány *in vivo* na selatech, viz *(Rosendorf et al. 2020)* a byly popsány výše, viz teoretická část kapitola 3.3 Kompozitní materiály. Z *in vivo* testů bylo zjištěno, že nanovlákenná vrstva z PCL má vhodné vlastnosti pro efektivní zpevnění střevní anastomózy a vykazovala dobrou adhezi ke střevní tkáni. Během testování ale došlo ke zvýšenému výskytu peritoneálních adhezí, které jsou častou a život ohrožující pooperační komplikací.

Tato diplomová práce se zabývá vývojem vhodného materiálu s antiadhezivními vlastnostmi pro prevenci pooperačních komplikací v gastrointestinální chirurgii. Z důvodu pozitivních výsledků, které byly zmíněny výše, byla výchozím materiálem PCL nanovlákenná vrstva, která byla dále modifikována, aby její lícní strana vykazovala menší adhezivitu vůči okolní tkáni.

Experimentální část je rozdělena do tří částí. (1) Inspirací pro vytvoření hydrofobního povrchu byla hierarchická struktura lotosového listu, jehož napodobení se věnuje první kapitola praktické části. (2) Pro zvýšení hydrofobního efektu materiálu byla zvolena plazmatická úprava. (3) Poslední kapitola experimentální části se věnuje testování finálních vrstev. Pro zpřehlednění zobrazuje Obrázek 15 schéma praktické části diplomové práce.



Obrázek 15: Schéma experimentální části diplomové práce.

5 Prvotní materiály

Inspirací pro vytvoření antiadhezivního povrchu byl lotosový list, který má přirozeně superhydrofóbní vlastnosti. Pro napodobení hierarchické struktury lotosového listu byla zvolena technologie elektrosprayingu, která byla aplikována na nanovlákennou PCL vrstvu.

Nejprve bylo potřeba zvolit vhodný polymer a najít koncentraci polymerního roztoku, při které dochází ke tvorbě kapek. Prvotní experimenty byly provedeny na laboratorním zařízení pro zvlákňování z jehly. Po vybrání polymerního roztoku a přibližné koncentrace probíhalo finální hledání koncentrace a podmínek pro elektrospraying na stroji Nanospider^{TM}. Pomocí tohoto přístroje se zvlákňuje bezjehlovým způsobem a je takto možné vyrábět materiál v průmyslovém měřítku.

5.1 Výběr vhodného polymeru

Vybranými polymery pro jehlový elektrospraying byl PCL, PDX a PHB. Všechny zmíněné polymery jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Patří mezi běžně používané materiály v klinické praxi ve formě šicích nití a jsou certifikované FDA. *(Goonoo et al. 2015; Williams et al. 2013; Cao et al. 2010)*

V Tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty viskozit jednotlivých polymerních roztoků. Obrázek 16 zobrazuje vzniklé struktury na SEM snímcích, včetně samotného černého papíru, který sloužil jako podkladový materiál pro elektrospraying.

Tabulka 6: Viskozita polymerních roztoků PCL, PDX, PHB.

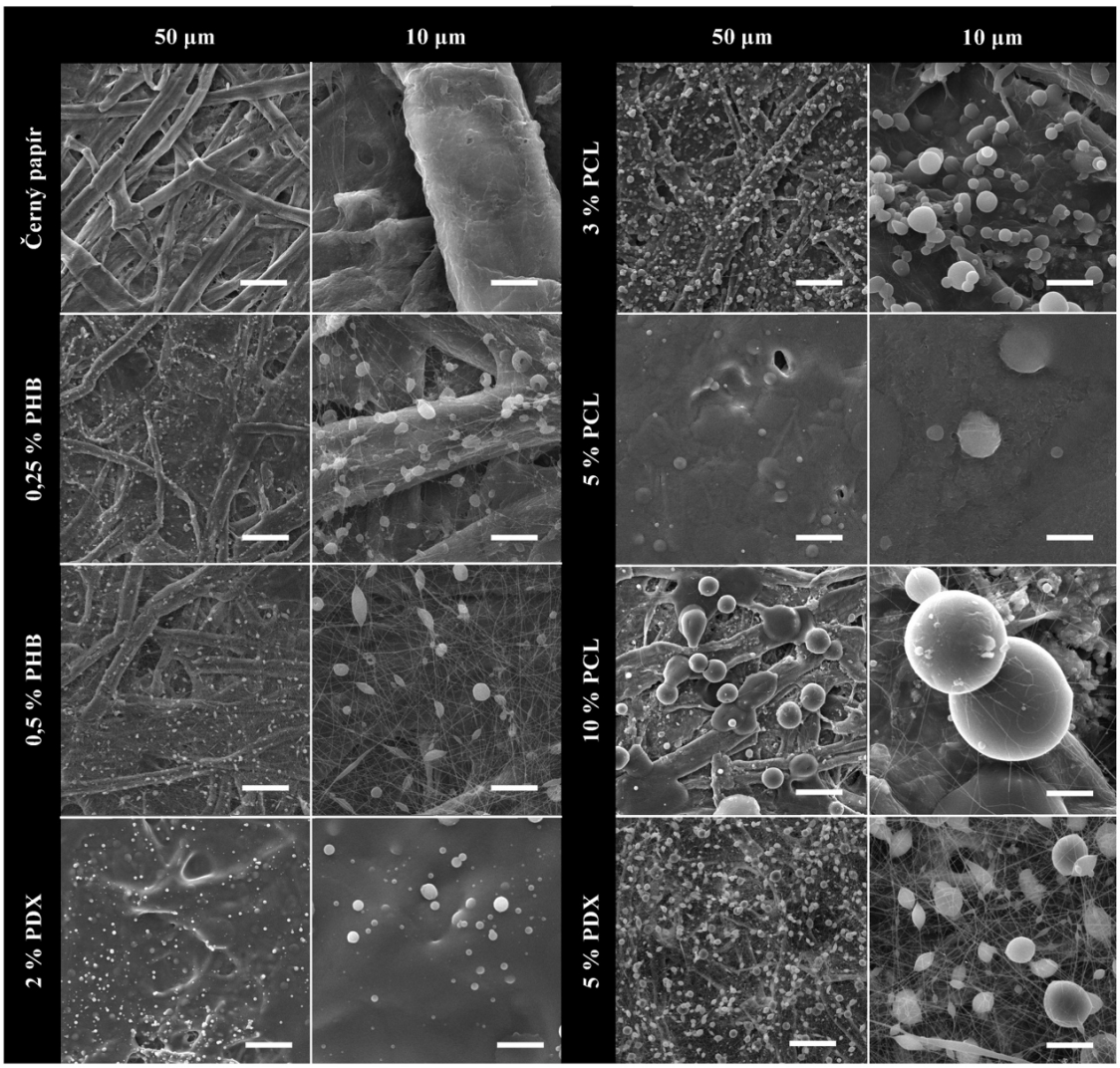
Polymerní roztok	Viskozita [mPa·s]
3% PCL	5,6 ± 0,9
5% PCL	14,5 ± 1,3
10% PCL	28,3 ± 2,0
2% PDX	33,9 ± 1,5
5% PDX	227,8 ± 30,8
0,25% PHB	6,5 ± 1,5
0,5% PHB	9,2 ± 1,1

U roztoků PCL nastal elektrospraying u 3% koncentraci, kde je pod kapkami je zřetelná struktura podkladového papíru a došlo k minimálnímu vzniku vláken. U 5% a 10% PCL vznikla folie, kapky se u těchto koncentrací objevovaly ojediněle, u 10% PCL vzniklo oproti 5% PCL, více kapek, ale také došlo již k vytvoření vláken.

Výše uvedené koncentrace PCL byly rozpuštěny v rozpouštědlovém systému chloroform/ethanol/kyselina octová v poměru 8/1/1. Byly testovány různé koncentrace polymerních roztoků s PCL rozpuštěném pouze v chloroformu, ale u těchto roztoků nedošlo k elektrosprayingu, na podkladovém papíru vznikla pouze folie, tudíž nejsou v práci zmíněny.

Elektrospraying 2% PDX vytvořil polymerní fólii s malým množstvím kapek, u 5% PDX došlo k perličkovému efektu, kde se ve velkém množství vyskytují kapky, ale zároveň jsou přítomna i tenká vlákna. Pro vytvoření elektrosprayingu by pravděpodobně byla nutná nižší viskozita polymerního roztoku PDX.

Polymerní roztok PHB o koncentraci 0,1% vytvořil pouze polymerní fólii, nedošlo ke vzniku kapek. U 0,25% PHB vznikl perličkový efekt stejně, jako u 0,5% koncentrace, kde se vyskytovalo i velké množství vláken.



Obrázek 16: SEM snímky elektrostaticky nasprejovaných polymerních roztoků PHB, PDX a PCL o různých koncentrací, měřítko 50 a 10 µm.

5.2 Optimalizace vlastností PCL roztoku

Na základě experimentů na jehlové aparatuře byl vybrán polymerní roztok PCL v rozpouštědlovém systému chloroform/kyselina octová/ethanol v poměru 8/1/1. Na rozdíl od PDX a PHB se u něj podařilo najít vhodné podmínky jehlového elektrosprayingu, kdy došlo k formaci kapek s minimálním výskytem vláken. Další výhodou PCL je cenová dostupnost, polymery PHB, PDX i jejich rozpouštědla jsou drahá. PCL je často používaným polymerem pro výrobu tkáňových nosičů na KNT TUL. Mimo jiné byl zde použitý pro výrobu kožního krytu, který byl taktéž vyroben na stroji

NanospiderTM a momentálně je klinicky testován, tudíž musel projít testováním Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL), viz *(Krchová et al. 2014)*.

Dále byla ověřena možnost elektrostatického spreyingu polymerních roztoků s nízkou koncentrací na bezjehlovém zvlákňovacím stroji Nanospider^{TM} a nalezena nejvhodnější koncentrace. Poté byla daná koncentrace elektrosprayingem nanesena na nanovlákennou vrstvu. Výsledný materiál je kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu.

5.2.1 Hledání koncentrace pro elektrostatické sprejování

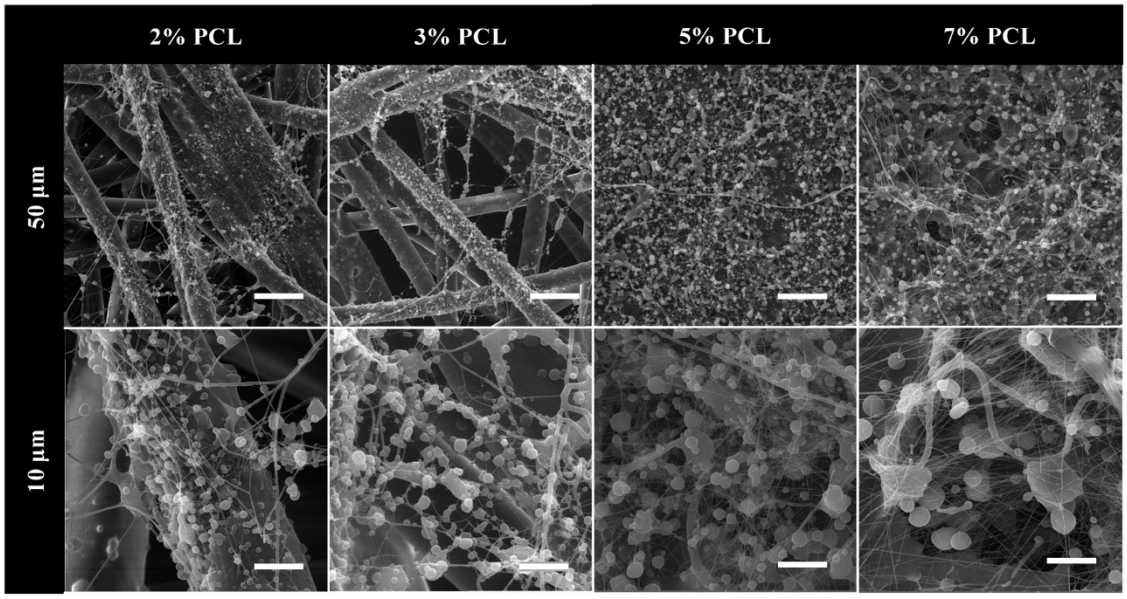
Byl testován PCL o koncentraci 2, 3, 5 a 7% v rozpouštědlovém systému chloroform/ethanol/kyselina octová v poměru 8/1/1. Podmínky výroby elektrostaticky nasprejovaných kapek roztoků, které jsou uvedené v Tabulce 2 v kapitole 4. 3. 3 Bezjehlové elektrostatické sprejování, byly pro všechny polymerní roztoky stejné, kromě 2% PCL, u kterého bylo sníženo elektrické napětí, při kterém byl proces sprejování stabilizován.

Tabulka 7 zobrazuje hodnoty viskozity polymerních roztoků 2–7% PCL, které se zvětšují se vzrůstající koncentrací polymeru v roztoku.

Tabulka 7: Hodnoty viskozity PCL polymerních roztoků o koncentraci 2–7 %.

Koncentrace polymerního roztoku PCL [%]	**Viskozita [mPa·s]**
2	3,9 ± 0,6
3	5,9 ± 0,9
5	14,5 ± 1,3
7	28,3 ± 2,0

Morfologie vytvořených struktur jsou zobrazeny na SEM snímcích, viz Obrázek 17. U všech koncentrací došlo ke vzniku kapek i vláken, u vyšších koncentrací (5 a 7%) byl pozorován výskyt vláken ve větší míře. Pro další experimenty byl vyhodnocen jako nejvhodnější roztok o 3% koncentraci, kde byla oproti dalším koncentracím produkce kapek nejhomogennější.



Obrázek 17: SEM snímky různých koncentrací polymerních roztoků PCL zpracovaných bezjehlovým elektrostatickým sprejováním na textilii typu Spunbond na zařízení Nanospider^{TM}, měřítko 50 a 10 µm.

5.2.2 Kombinace elektrostatického zvlákňování a sprejování

Kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu byla vytvořena struktura mimikující lotosový efekt. Na zařízení Nanospider^{TM} byla elektrostaticky zvlákněna vrstva, skládající se ze zvlákněného a rozprašovaného polymerního roztoku PCL o rozdílné koncentraci.

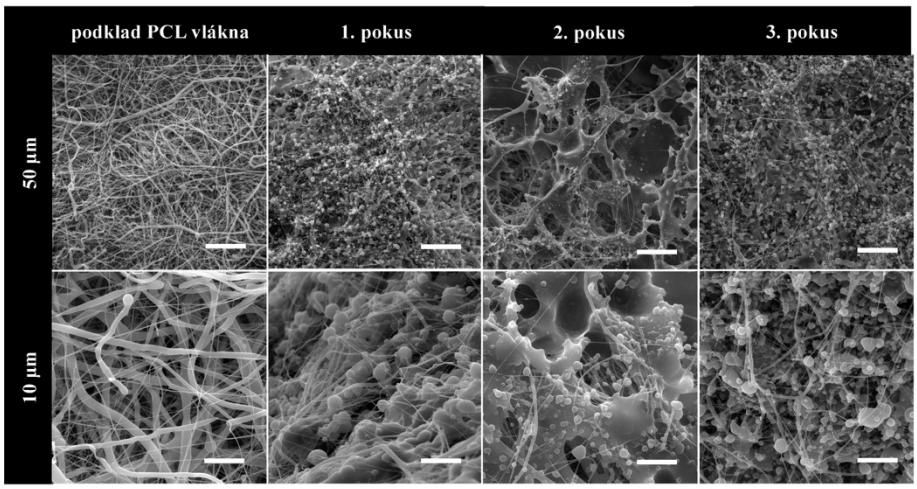
Podkladová vrstva byla připravena z 16% roztoku PCL o plošné hmotnosti přibližně 10 g/m^2. Tato gramáž byla zvolena pro urychlení degradace materiálu v organismu. Na základě *in vivo* experimentu na prasatech bylo potvrzeno, že je vhodnější oproti původní vrstvě (20 g/m^2).

Podkladová nanovlákenná vrstva byla ponechána po dobu 60minut k odvětrání. Následně na ni pomocí elektrosprayingu byly naneseny částice 3% polymerního roztoku PCL. Částice 3% PCL byly postupně rozprašovány na tři různá místa podkladové vlákenné vrstvy za různých podmínek, které jsou uvedeny níže, viz Tabulka 8. Jednotlivé pokusy elektrosprayingu se od sebe lišily vzdáleností elektrod.

Tabulka 8: Podmínky elektrostatického sprejování 3% PCL, pokusy 1. – 3.

Typ polymeru	3% PCL		
Viskozita [mPa·s]	5,9 ± 0,9		
Rozpouštědlový systém	Chloroform/ethanol/kyselina octová (8/1/1)		
Pokus	**1.**	**2.**	**3.**
Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	175	150	185
Napětí [kV]	**Elektroda 1**	**Elektroda 2**	
	-5	35	
Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]	450–500		
Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min]	5		
Rychlost odtahu struny [mm/min]	15		
Velikost průvlaku [mm]	0,5		
Teplota [°C]	22		
Relativní vlhkost vzduchu [%]	50		
Počet cyklů nanášení	5		

Výsledná morfologie jednotlivých pokusů je zobrazena na SEM snímcích, viz Obrázek 18, včetně snímků morfologie podkladové vrstvy samotných vláken z 16% PCL. Ze snímků z druhého pokusu je vidět, že nedošlo k dostatečnému odpaření rozpouštědla. U prvního i třetího pokusu došlo ke vzniku kapek, ale také vláken, která byla u třetího pokusu většího průměru v porovnání s prvním pokusem, kdy vznikla pouze jemná vlákna. Na základě tohoto experimentu byl pro výrobu materiálů 3% PCL zpracováván za podmínek, které jsou uvedeny pro první pokus, tudíž s elektrodami od sebe vzdálenými 175 mm.



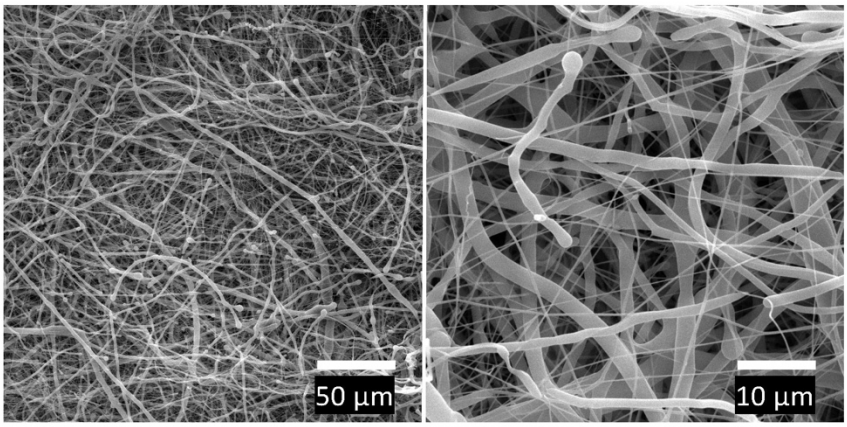
Obrázek 18: SEM snímky elektrostaticky sprejovaného 3% polymerního roztoku PCL na stroji Nanospider^{TM} na elektrostaticky zvlákněnnou vrstu 16% PCL, pokus 1. – 3., měřítko 50 a 10 µm.

5.3 Charakterizace hierarchické vrstvy

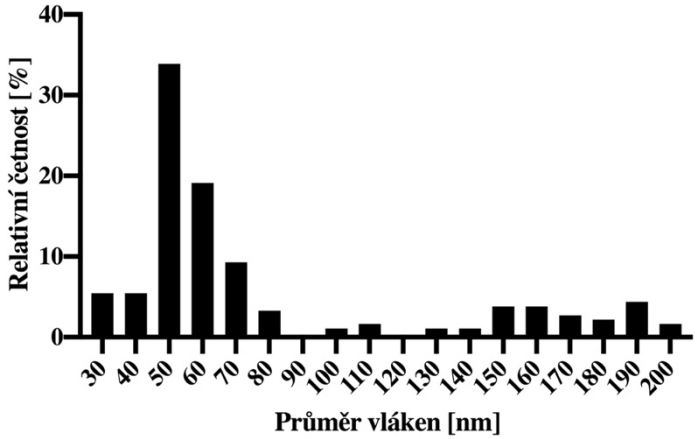
Výsledná vrstva s hierarchickou strukturou se skládala z podkladového PCL nanovlákenného materiálu, na které byly elektrosprayingem aplikovány PCL mikro/nanočástice. Materiály byly charakterizovány a hodnoceny z hlediska jejich morfologie z makroskopického a mikroskopického hlediska.

5.3.1 Morfologie

Základní nanovlákenná PCL vrstva byla nízké plošné hmotnosti, od podkladové textilie typu Spunbond se oddělovala snadno. Z makroskopického pohledu byla vrstva homogenní, bez viditelných defektů. Ze snímku ze SEM, viz Obrázek 19, je patrný minimální výskyt defektů, vlákna jsou nehomogenní, neorientovaná a neuspořádaná. Histogram relativní četnosti průměrů vláken zobrazuje Obrázek 20. Nejčetnější naměřenou hodnotou (medián) byla vlákna o průměru 58 nm, průměrná hodnota byla (77,9 ± 49,3) nm. Hodnoty průměrů vláken měly širokou variabilitu, která je u PCL nanovlákenných materiálů obvyklá, při elektrostatickém zvlákňování dochází k tvorbě vláken s menším i větším průměrem.

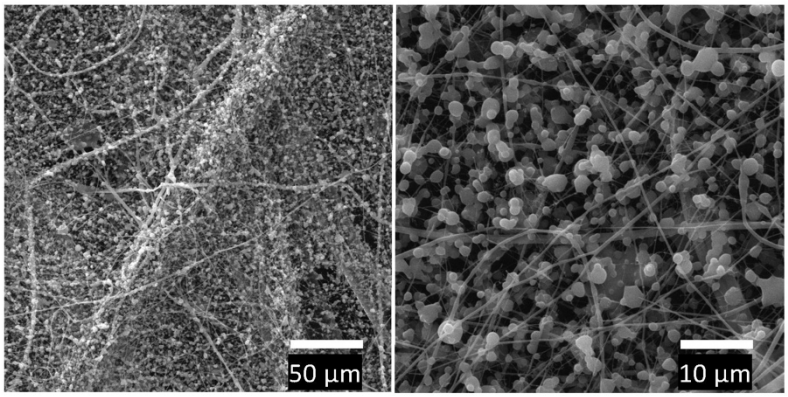


Obrázek 19: SEM snímky 16% PCL elektrostaticky zvlákněné nanovlákenné vrstvy, měřítko 50 a 10 µm.

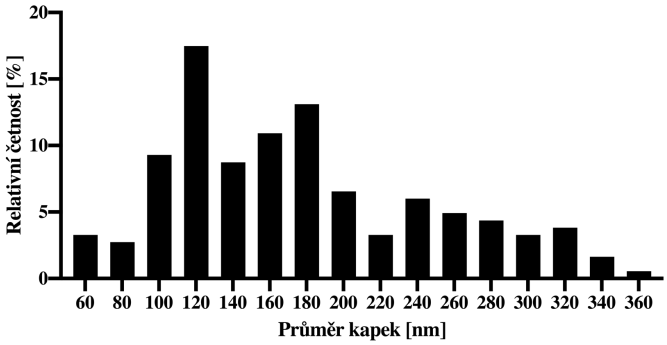


Obrázek 20: Histogram relativní četnosti průměrů vláken 16% nanovlákenné vrstvy, n = 200.

Aplikace elektrosprayingu 3% PCL na nanovlákenný materiál byla patrná i při makroskopickém pohledu v podobě malých teček na povrchu, viz fotografie níže na Obrázku 23. Rozprostření kapek po vrstvě bylo neorganizované. Snímky ze SEM jsou zobrazeny na Obrázku 21. Z mikroskopického pohledu byly kapky nehomogenní, na vrstvě se vyskytovaly kapky různých velikostí. Histogram relativní četnosti průměrů kapek zobrazuje Obrázek 22. Medián z naměřených průměrů kapek byl 173 nm, průměrná hodnota byla (176,9 ± 70,6) nm.



Obrázek 21: SEM snímky mikro/nanočástic 3% PCL aplikovaných pomocí elektrosprayingu na 16% PCL nanovlákennou vrstvu, měřítko 50 a 10 µm..



Obrázek 22: Histogram relativní četnosti průměrů kapek elektrosprayingu, n = 200.

Charakterizace z hlediska plošné hmotnosti a kontaktního úhly nanovlákenné vrstvy i materiálu s elektrosprayingem jsou popsány níže, viz kapitola 6. 1. 3 Plošná hmotnost a 6. 1. 4 Smáčivost.

6 Plazmatická úprava

Na základě předchozích experimentů byla zvolena finální vrstva, kterou byl elektrostaticky zvlákněný nanovlákenný materiál z 16% PCL o plošné hmotnosti přibližně 10 g/m^2, jehož povrch byl pokryt kapkami pomocí elektrosprayingu 3% PCL.

Pro zvýšení hydrofobicity povrchu byla vrstva upravena studeným plazmatem metodou RF PACVD. Aktivní látkou byl vybrán HMDSO. Dále bylo nutné optimalizovat dobu úpravy materiálu s ohledem na zachování bulkových a povrchových vlastností. Byly zvoleny tři doby expozice, konkrétně 1, 2 a 3 minuty.

Pro zpřehlednění a zjednodušení je pro jednotlivé materiály, které jsou dále charakterizovány a testovány, používáno označení uvedené v Tabulce 9.

Tabulka 9: Přehled označení testovaných materiálů.

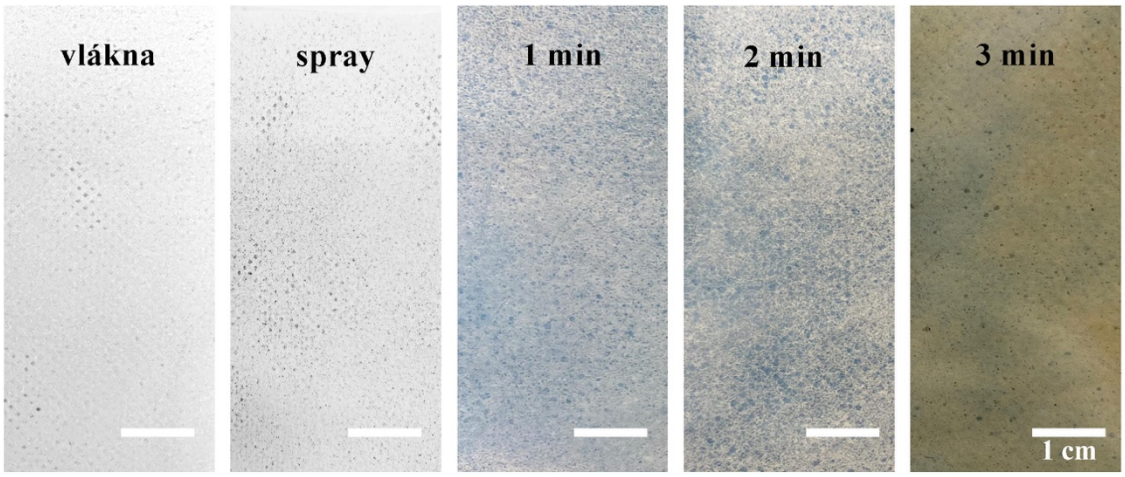
Číslo	**Označení**	**Technologie výroby materiálu**
I	vlákna	nanovlákenná vrstva vyrobena elektrostatickým zvlákňováním 16% PCL (chloroform/ethanol/kyselina octová; 8/1/1)
II	spray	na materiál I „vlákna“ byly naneseny částice elektrostatickým sprayingem 3% PCL (chloroform/ethanol/kyselina octová; 8/1/1)
III	1 min	plazmaticky upravený materiál II „spray“ po dobu 1 min
IV	2 min	plazmaticky upravený materiál II „spray“ po dobu 2 min
V	3 min	plazmaticky upravený materiál II „spray“ po dobu 3 min

6.1 Charakterizace materiálů

Vrstvy byly charakterizovány z makroskopického pohledu a mikroskopického hlediska pomocí SEM. Dále byla zjištěna jejich plošná hmotnost, smáčivost změřením kontaktního úhlu a chemické složení analýzou FTIR.

6.1.1 Makroskopické zhodnocení

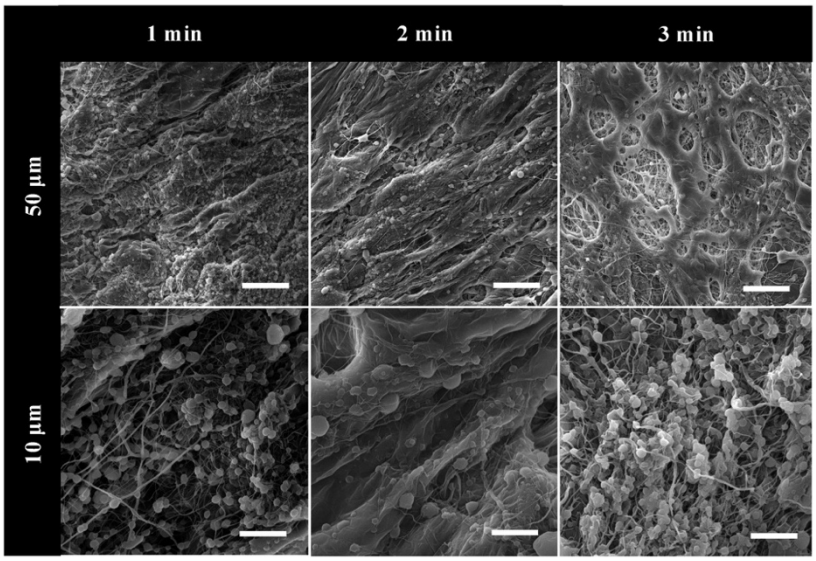
U všech materiálů byla plazmatická úprava patrná makroskopicky, úprava způsobila zabarvení vrstev do žluta, viz fotografie na Obrázku 23. Protože původní vrstva (vlákna) byla udělána s nízkou gramáží, je u materiálů zřetelná struktura podkladové textilie typu Spunbond. Změna zbarvení vlivem plazmatické modifikace byla nejvíce patrná u materiálu s 3minutovou úpravou, došlo k výraznému zažloutnutí materiálu. Z makroskopického pohledu bylo vidět nerovnoměrné rozprostření plazmatické modifikace po povrchu materiálu. U vrstvy s 1minutovou úpravou byla místa, kde nebyla úprava okem patrná. Úprava povrchu materiálu s 2 a 3minutovou modifikací byla zřejmá po celé ploše. V některých místech u materiálu s 3minutovou modifikací nastalo až vytvoření povrchu připomínající fólii, tato místa se vyskytovala nepravidelně.



Obrázek 23: Fotografie jednotlivých materiálů, zleva: vlákna, spray, 1 min, 2 min, 3 min; měřítko 1 cm.

6.1.2 Mikroskopické zhodnocení

Mikroskopický pohled na materiály s plazmatickou modifikací zobrazují SEM snímky na Obrázku 24. Ze snímku je znatelná změna povrchové morfologie. Plazmatickou modifikací došlo k pokrytí materiálu tenkou vrstvou, tudíž v porovnání s neupravenou vrstvou (spray) jsou polymerní kapky méně patrné. Překrytí tenkou vrstvou je nejvíce patrné u materiálu s nejdelší expozicí (3 min). Na vzorcích se vyskytovala i místa bez fóliového překrytí, ta pak vypadala obdobně jako snímky vrstvy s 2minutovou úpravou.

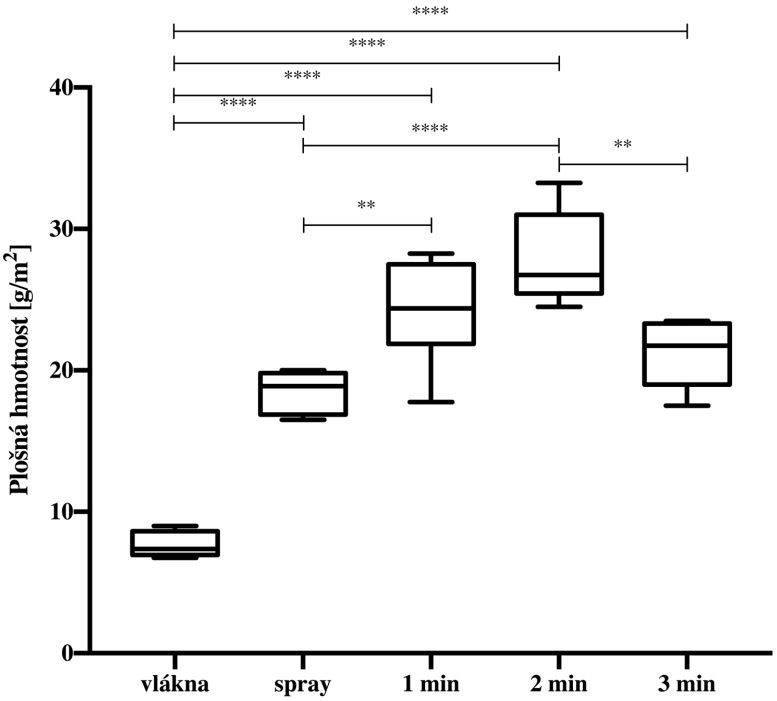


Obrázek 24: SEM snímky plazmaticky upravené PCL nanovlákenné vrstvy s PCL mikro/nanočásticemi po dobu 1, 2 a 3 minut, měřítko 50 a 10 µm.

6.1.3 Plošná hmotnost

Obrázek 25 zobrazuje graf s výsledky plošných hmotností testovaných materiálů. Všechny upravené materiály se statisticky významně lišily od původního nemodifikovaného nanovlákenného PCL materiálu (7,4 ± 0,4) g/m^2. Aplikací částic elektrosprayingem vzrostla plošná hmotnost přibližně 2,5×, na (18,5 ± 1,3) g/m^2. Mezi vzorky s 1minutovou a 2minutovou plazmatickou modifikací nebyly statisticky významné rozdíly. Nejnižší plošná hmotnost z plazmaticky upravených materiálů byla zjištěna u PCL s 3minutovou úpravou (21,2 ± 2,2) g/m^2. Nejvyšší hmotnost byla u PCL s 2minutovou úpravou (27,9 ± 3,0) g/m^2.

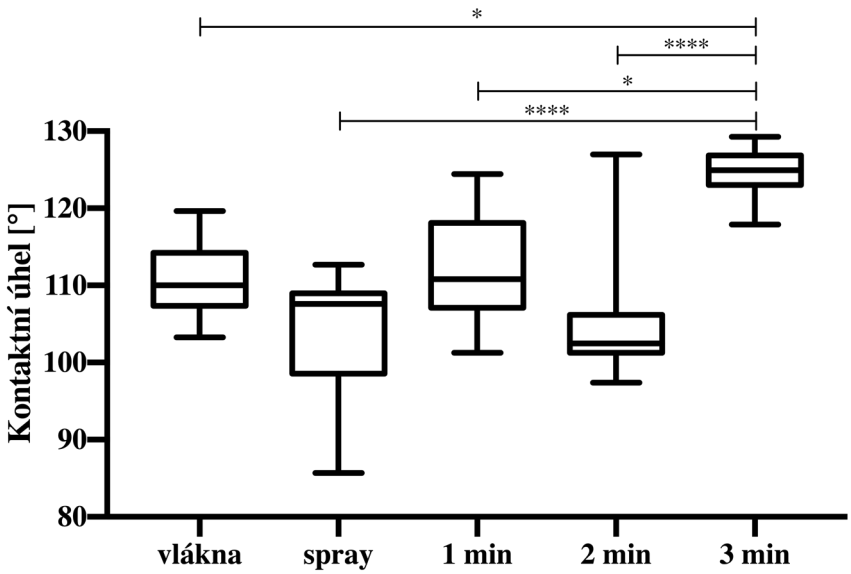
Z grafu je patrné, že od neupraveného nanovlákenného materiálu k vrstvě s 2minutovou plazmatickou modifikací plošná hmotnost postupně stoupá, docházelo k přídavku materiálu jednotlivými procesy. U 3minutové úpravy naopak plošná hmotnost poklesla, pravděpodobně při plazmatické modifikaci povrchu materiálu došlo k částečné destrukci vrstvy.



*Obrázek 25: Krabicový graf plošných hmotností testovaných materiálů a jejich porovnání s původním materiálem (vlákna).; ** p <0,0021, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 6.*

6.1.4 Smáčivost

Smáčivost byla hodnocena změřením kontaktního úhlu, Obrázek 26 graficky znázorňuje změřené hodnoty. Všechny testované materiály měly kontaktní úhel větší než 90°, tudíž je můžeme označit za hydrofobní, což bylo vzhledem k použití hydrofobního polymeru PCL očekávané. Kontaktní úhel původní vrstvy byl (110,9 ± 5,2)°. Po aplikaci sprayingu nedošlo k výrazné změně kontaktního úhlu (103,9 ± 8,8)° oproti původní vrstvě. Po 1 a 2minutové modifikaci plazmatem došlo k mírnému zvýšení hydrofobicity materiálu (112,4 ± 7,4)°, mezi těmito materiály nebyl statisticky významný rozdíl. Materiálem, který vykazoval nejhydrofóbnější vlastnosti byla vrstva s 3minutovou plazmatickou úpravou (124,8 ± 2,8)°.

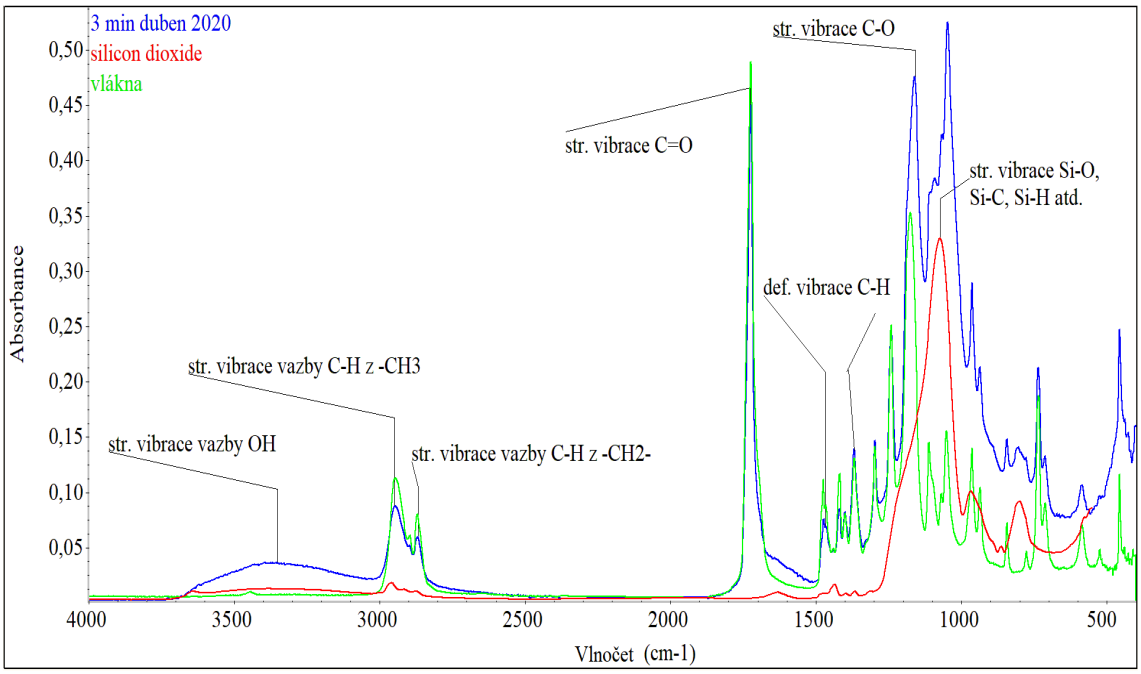


*Obrázek 26: Krabicový graf kontaktních úhlů testovaných materiálů se vzájemným porovnání; * p<0,0332, **** p<0,0001 (ANOVA, Kruskal-Wallis); n = 10.*

Kontaktní úhel byl u všech vrstev změřen i z rubní strany, která bude při aplikaci v kontaktu se střevní tkání. U původní nanovlákenné vrstvy se kontaktní úhel shodoval s lícní stranou. U vrstvy s mikro/nanočásticemi byl kontaktní úhel z rubní strany vyšší (119,2 ± 1,9)° než z lícní strany. U plazmaticky upravených materiálů (1 min, 2 min, 3 min) byl kontaktní úhel nižší v porovnání s lícní stranou (plazmaticky upravenou) a původním materiálem, pohyboval se okolo (94,8 ± 4,3)°.

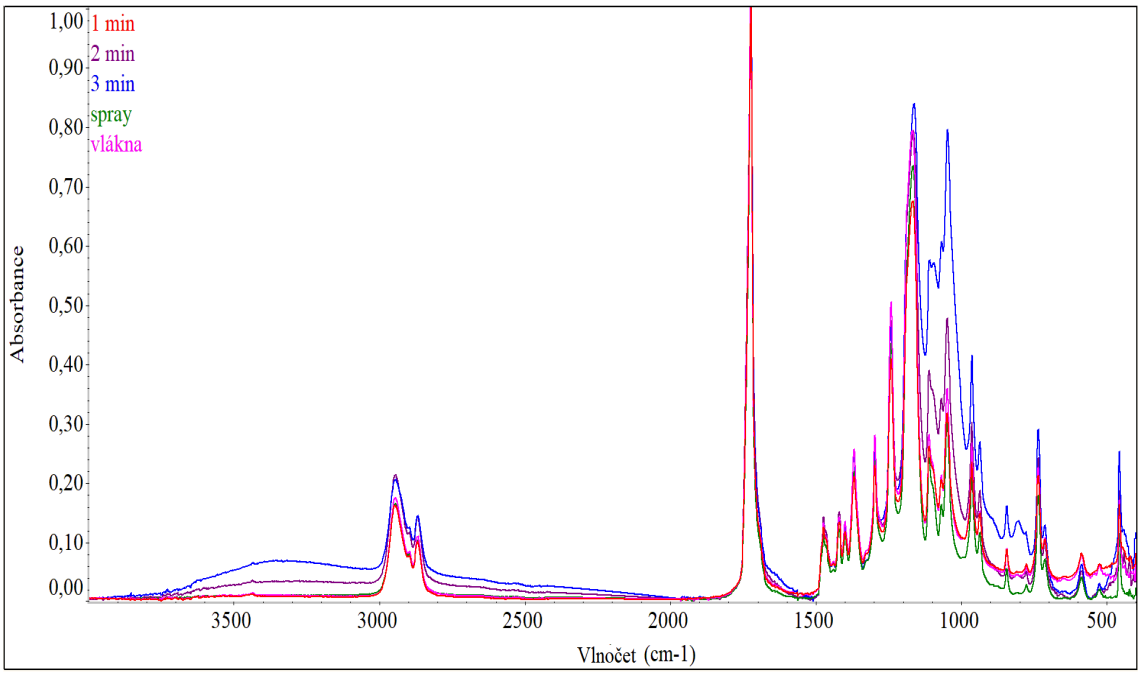
6.1.5 Chemické složení

Plazmatickou modifikací PCL pomocí HMDSO došlo ke vzniku vazeb C-O, Si-O, Si-C a Si-H. Obrázek 27 zobrazuje spektra PCL, vzorku s 3minutovou plazmatickou úpravou a oxidu křemičitého (silicon dioxide). Použití spektra oxidu křemičitého je pouze ilustrativní, protože v rámci knihoven není k dispozici látka, která by přesně reprezentovala obsažené vazby, které vychází z úpravy HMDSO. I na oxidu křemičitém je vidět jakým způsobem je přizdviženo spektrum PCL, pokud tyto vazby obsahuje. V oblasti pod cca 1500 cm^{-1} je mnoho pásů, které nelze přesně přiřadit konkrétním vazbám, protože se jedná o vibrace zpřažené, kombinační a vibrace celého skeletu molekuly.



Obrázek 27: FTIR spektrum PCL vláken, vzorku s 3min úpravou HMDSO a oxidu křemičitého (silicon dioxide).

Obrázek 28 zobrazuje spektra všech materiálů. U vzorku vlákna a spray jsou spektra totožná, což odpovídá jejich složení. U vzorků plazmaticky modifikovaných je vidět, že s délkou expozice stoupá intenzita pásů v oblasti vazeb vycházejících z křemíku.



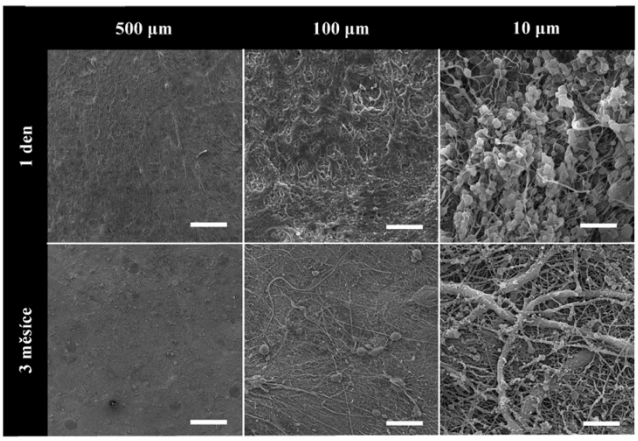
Obrázek 28: FTIR spektra jednotlivých vzorků: vlákna, spray, vrstvy s 1–3minutovou plazmatickou úpravou.

6.2 Stabilita plazmatické úpravy

Časová stabilita plazmaticky modifikovaných materiálů byla sledována po dobu šesti měsíců od plazmatické úpravy za účelem zjištění případných změn materiálu a stability plazmatické modifikace. Intervaly byly zvoleny na základě doby působení při aplikaci. Kritické období, kdy je největší pravděpodobnost počátku formací peritoneálních adhezí je prvních 14dní po operaci. Při *in vivo* experimentech prvotních materiálu byla doba experimentu 21 dní, viz *(Rosendorf et al. 2020).* Dalším důvodem studia časové stability bylo případné skladování materiálu před jeho aplikací. Stabilita byla posuzována z makroskopického a mikroskopického pohledu, z hlediska smáčivosti povrchu a chemického složení.

6.2.1 Morfologie

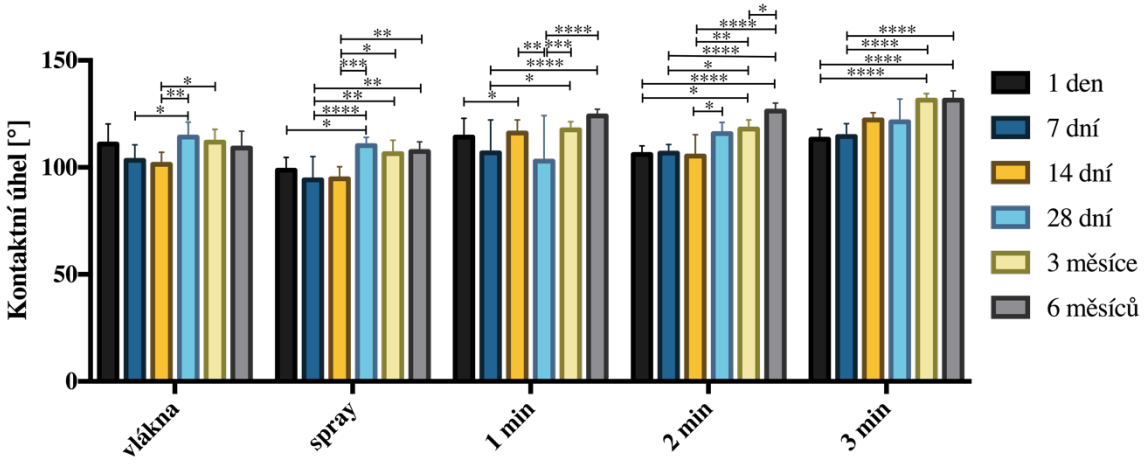
Z makroskopického pohledu nebyla pozorována žádná změna během šesti měsíců. Z mikroskopického měřítka byla morfologie hodnocena pomocí SEM po 1dni, 28dnech, 3 a 6 měsících od plazmatické úpravy materiálů. U základní nanovlákenné vrstvy a vrstvy s elektrosprayingem nebyla pozorována změna morfologie. Povrch materiálů s plazmatickou modifikací se během šesti měsíců proměnil, SEM snímky všech materiálů jsou na Obrázku 41 v Příloze 1. Změna je nejvíce patrná u vrstvy s 3minutovou úpravou, viz Obrázek 29. Od třech měsíců od plazmatické úpravy je pozorovatelný rozpad vrstvy vzniklé plazmatickou modifikací na malé částice. Šest měsíců od úpravy byla morfologie obdobná jako po třech měsících.



Obrázek 29: SEM snímky vrstvy s 3minutovou plazmatickou úpravou 1 den a 3 měsíce po modifikaci; měřítko 500, 100 a 10 µm.

6.2.2 Smáčivost

Kontaktní úhel byl měřen 1 den, 7, 14 a 28 dní, 3 a 6 měsíců od plazmatické modifikace, získané hodnoty graficky zobrazuje Obrázek 30. U nanovlákenné vrstvy a materiálu s mikro/nanočásticemi (spray) nedošlo k významné změně smáčivosti během zkoumané doby, rozdíly mezi jednotlivými měřeními byly způsobeny nehomogenitou materiálu. U plazmaticky modifikovaných vrstev došlo ke zvýšení kontaktního úhlu oproti prvnímu dni. U vrstvy s 1minutovou úpravou jsou rozdíly mezi jednotlivými měřeními a velký rozptyl dat, který byl u tohoto materiálu pozorován i z makroskopického pohledu, po šesti měsících byl naměřen kontaktní úhel (124,0 ± 3,2)°. U materiálu s 2minutovou úpravou byl po šesti měsících naměřen kontaktní úhel (126,3 ± 3,8)°, u 3minové úpravy (131,4 ± 4,4)°. Ke zvýšení kontaktního úhlu došlo pravděpodobně z důvodu změny morfologie povrchu plazmaticky modifikovaných vrstev.

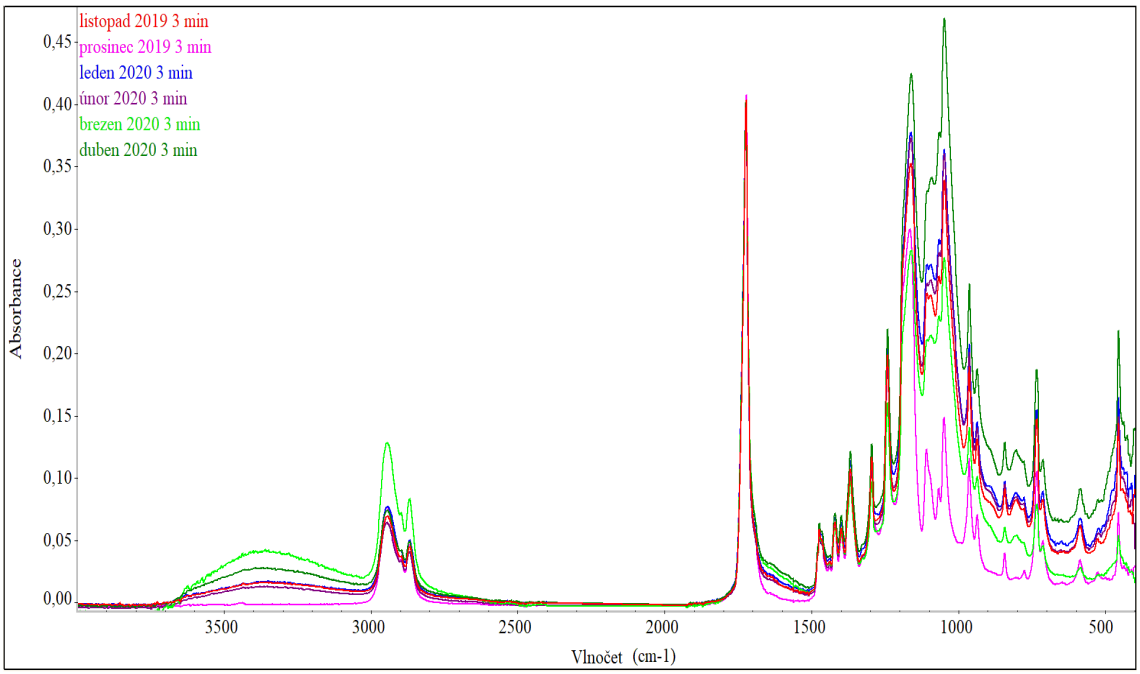


*Obrázek 30: Graf zobrazující změnu kontaktního úhlu testovaných materiálů v intervalu od 1dne do 6měsíců od plazmatické úpravy (1–3 min) a nemodifikovaných materiálů (vlákna, spray); * p<0,0332, ** p<0,0021, *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 10.*

6.2.3 Chemické složení

Infračervená spektrometrie potvrdila nehomogenitu plazmatické úpravy. Pro demonstraci vývoje úpravy byl vybrán materiál s 3minutovou expozicí, u vrstev s 1 a 2minutovou úpravou bylo pozorování během šesti měsíců obdobné.

Obrázek 31 ukazuje intenzity pásem ze vzorku s 3minutovou úpravou po dobu šesti měsíců (listopad 2019–duben 2020). Pokles a vzrůst intenzity pásů v oblasti cca 1200–1000 cm^{-1}, kde se vyskytují vibrace vazeb vycházejících z křemíku je náhodný, a nevykazuje žádný trend. Intenzita těchto pásů je posuzována v poměru ke stejné intenzitě pásu stretching (valenční) vibrace vazby C=O z PCL (cca 1720 cm^{-1}). Tato variabilita je způsobena primárně nehomogenitou materiálu. Z toho důvodu nelze jednoznačně říct, zda je úprava PCL nanovláken časově zcela stabilní. Vazby vzniklé úpravou HMDSO se ve vrstvě vyskytovaly i po šesti měsících (duben 2020), kdy byla naměřena nejvyšší intenzita v porovnání s ostatními vzorky.



Obrázek 31: FTIR spektra vrstvy s 3minutovou plazmatickou úpravou v průběhu šesti měsíců (listopad 2019–duben 2020).

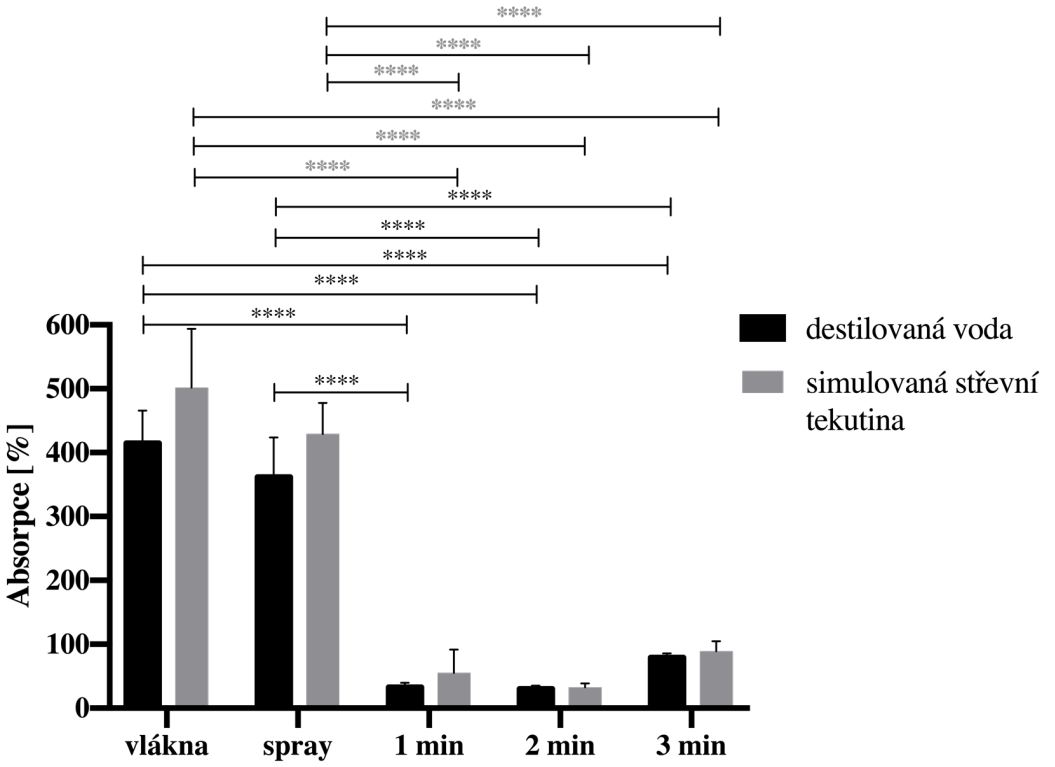
7 Testování vrstev

Materiály (vlákna, spray, 1 min, 2 min, 3 min) byly testovány z hlediska absorpce s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Dále bylo provedeno biologické testování *in vitro*, kde byla zjišťování cytokompatibilita vrstev, adhezivita a proliferace myších fibroblastů. Posledním testováním bylo zjišťování adheze materiálů vůči modelu střevní tkáně v podobě střeva z prasete.

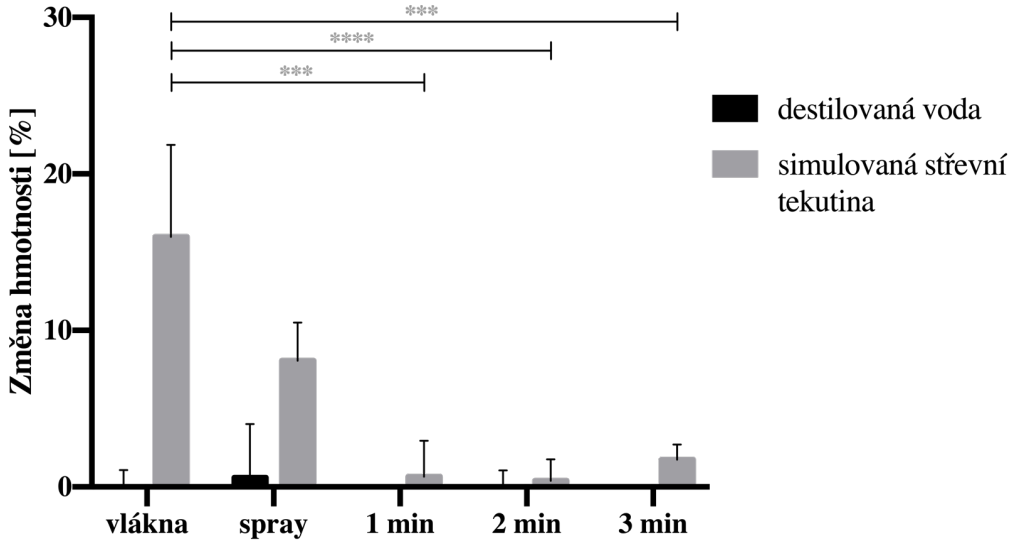
7.1 Absorpce

Obrázek 32 zobrazuje graf s výsledky absorpce destilované vody (A_V [%]) a simulované střevní tekutiny (A_S [%]) s testovanými materiály. Statisticky nejvýznamnější rozdíly jsou při porovnání nanovlákenné vrstvy a materiálů plazmaticky modifikovaných. U obou tekutin došlo k největší absorpci u neupravené PCL vrstvy (A_S = 501,7 ± 75,0 %; A_V = 414,0 ± 41,3 %). Naopak výrazně nižší množství tekutiny nasákly materiály, jejichž povrch byl plazmaticky upraven. Mezi materiály upravených plazmatem po dobu 1 a 2 minuty nebyly výrazné rozdíly, hodnoty absorpce se u obou tekutin pohybovaly okolo 30%. K vyšší absorpci došlo u vrstvy s 3minutovou úpravou (A_S = 89,4 ± 12,4%, A_V = 79,4 ± 5,0 %).

Obrázek 33 zobrazuje výsledky změny hmotnosti vzorků po 24hodinách v destilované vodě a simulované střevní tekutině a následném vysušením. U plazmaticky upravených materiálů po dobu 1 a 2minut nedošlo ke změnám hmotnosti po testovaní. U vrstvy s 3minutovou úpravou bylo naměřeno zvýšení hmotnosti u vzorků se simulovanou střevní tekutinou, vzhledem ke směrodatné odchylce byla změna minimální, s destilovanou vodou ke změně hmotnosti nedošlo. U PCL nanovlákenné vrstvy a PCL vrstvy s elektrosprayingem byla pozorována výraznější změna se simulovanou střevní tekutinou než u PCL s 3minutovou plazmatickou úpravou. U nanovlákenného materiálu vzrostla hmotnost o (16,0 ± 5,9) %, u vrstvy s elektrosprayingem o (8,1 ± 2,4) %, s destilovanou vodou byla jejich změna hmotnosti minimální. Odlišné chovaní materiálů s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou mohlo být způsobeno rozdílným povrchovým napětím kapalin.



*Obrázek 32: Absorpce simulované střevní tekutiny a destilované vody s testovanými materiály; **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 3.*



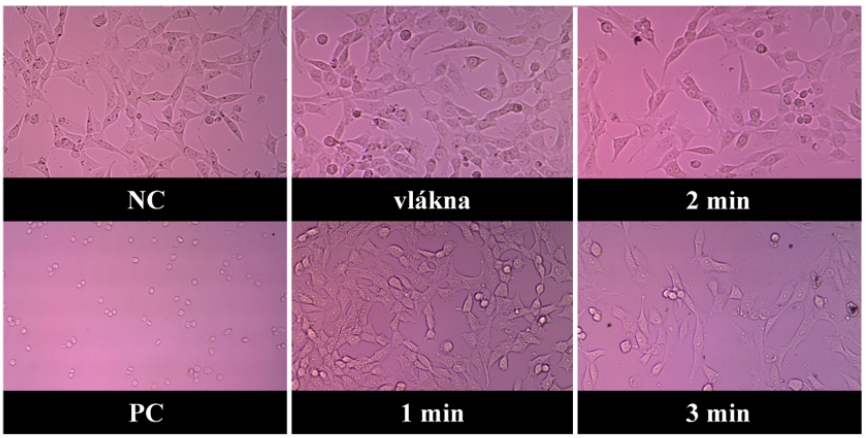
*Obrázek 33: Změna hmotnosti vzorků po 24hodinové absorpci destilované vody a simulované střevní tekutiny; *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n=3.*

7.2 Biologické testování *in vitro*

Cílem *in vitro* testování bylo zjistit cytokompatibilitu testovaných materiálů, především plazmatické úpravy při inkubaci s buňkami. Rovněž byla testována cytotoxicita extraktů materiálů. Dále bylo zkoumáno chování buněk vůči materiálu, byla zjišťování adheze, rozprostřenost (spreading) a s tím související proliferace buněk. Materiály byly testovány *in vitro* s buněčnou linií 3T3 myších fibroblastů.

7.2.1 Cytotoxicita extraktů

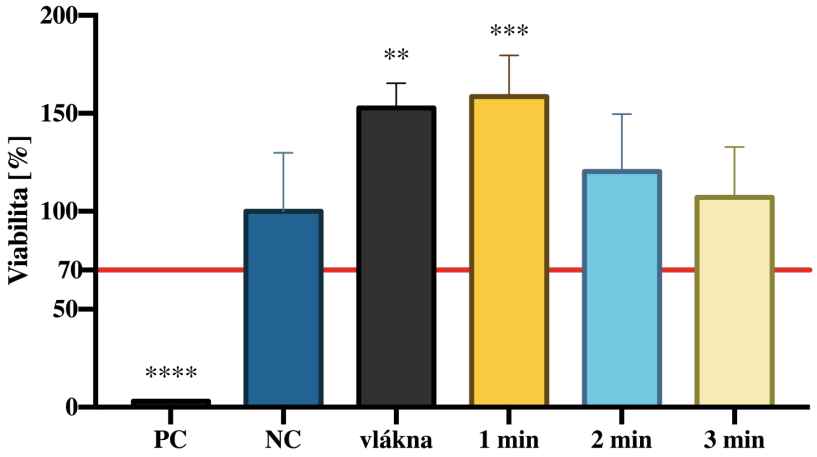
Cytotoxicita byla hodnocena pomocí MTT testu, před jeho provedením byly buňky nejprve nafoceny pomocí optického invertovaného mikroskopu, viz Obrázek 34. Negativní kontrolou byly buňky kultivované v samotném médiu, které byly konfluentně rozmístěny. Pozitivní kontrolou byly buňky, ke kterým byl přidán cytotoxický Triton X-100, tyto buňky měly zakulacený tvar, což potvrzuje jejich usmrcení.



Obrázek 34: Snímky 3T3 myších fibroblastů z optického mikroskopu po inkubaci s testovanými materiály. NC – negativní kontrola (normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (usmrcené buňky).

Výsledky z kolorimetrického MTT testu, které zobrazují viabilitu buněk po inkubaci s extrakty materiálu, jsou zobrazeny graficky, viz Obrázek 35. Červeně je znázorněna hranice cytotoxicity, která byla stanovena na základě normy ČSN EN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. a odpovídá 70% viabilitě kontrolních buněk (NC – negativní kontrola). Z výsledků je patrné, že k poklesu pod cytotoxickou hranici nedošlo u žádného

z testovaných materiálů. Odchylky mohly být způsobené manipulací při testování, například mohlo dojít k odsátí části konfluentní vrstvy buněk. Všechny testované materiály, jsou necytotoxické, plazmatická úprava nezpůsobuje toxicitu materiálů.



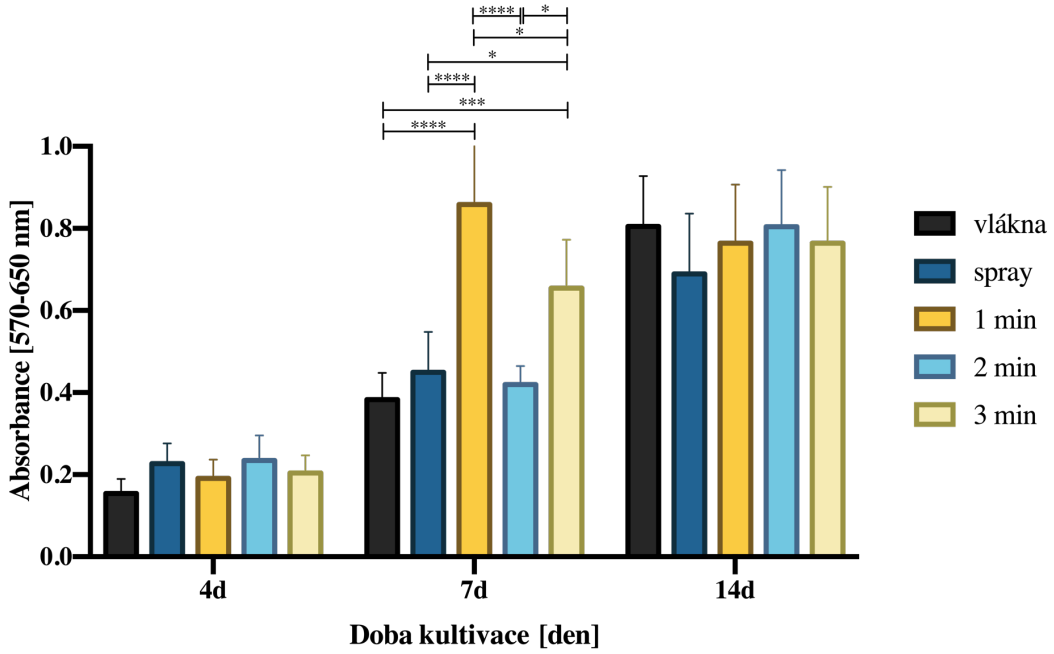
*Obrázek 35: Graf metabolické aktivity 3T3 myších fibroblastů po 24hodinové inkubaci s extrakty testovaných materiálů, hranice cytotoxicity (70%) je vyznačena červenou linkou. NC – negativní kontrola (normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (usmrcené buňky); ** p<0,0021, *** p<0,0002 (ANOVA, Bonferroni); n = 8.*

7.2.2 Buněčné *in vitro* testy

Všechny testované materiály byly testovány *in vitro*, za účelem pozorování chování buněk s jednotlivými vrstvami a zhodnocení jejich cytokompatibility. Materiály byly inkubovány s buněčnou linií 3T3 myších fibroblastů. Životaschopnost buněk nasazených na vzorcích byla testována ve třech časových intervalech, po 4, 7 a 14dnech kultivace, byla hodnocena pomocí metabolického testu MTT, rastrovací mikroskopie a fluorescenční mikroskopie.

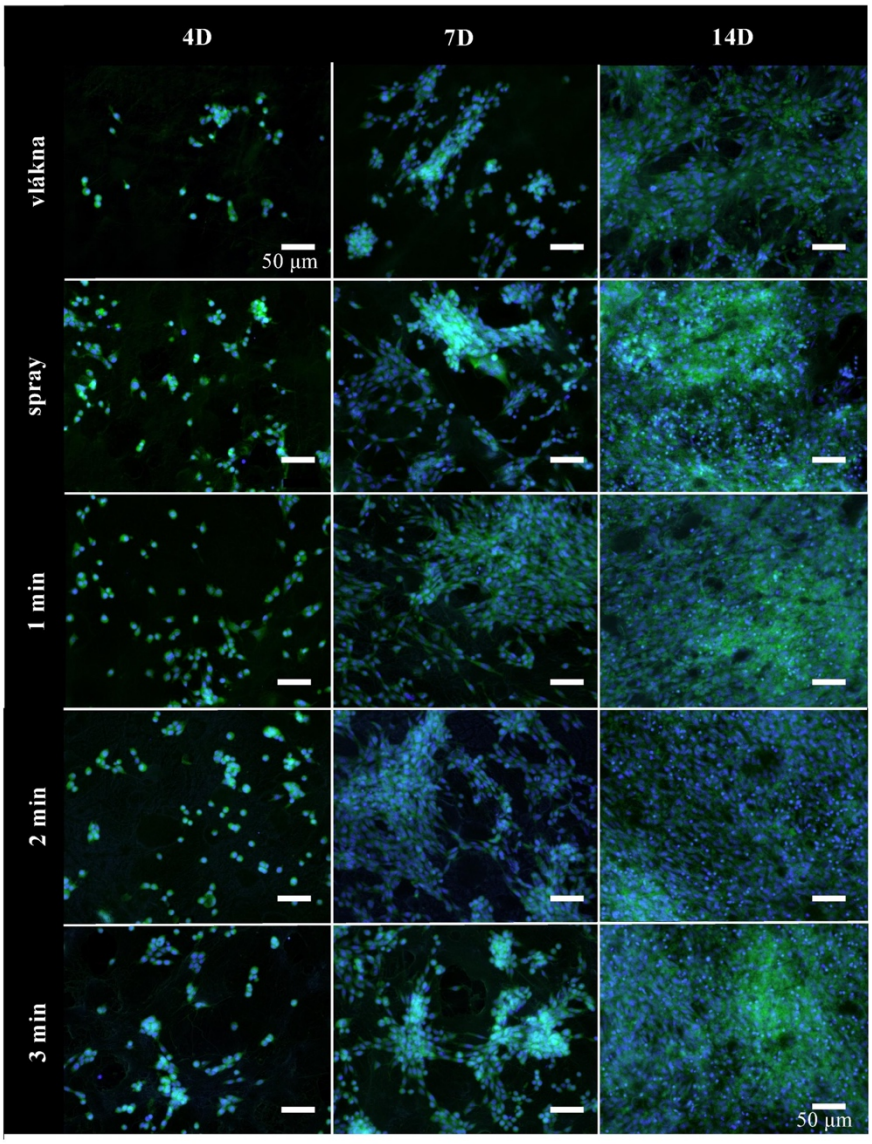
Obrázek 36 zobrazuje graf absorbance materiálů v průběhu kultivace, což odpovídá viabilitě buněk. Čtvrtý den od kultivace nejsou vzhledem ke směrodatným odchylkám statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými materiály. Sedmý den došlo k nárůstu, především u materiálu s 1minutovou plazmatickou úpravou. Po 14dnech došlo k dalšímu nárůstu, kromě materiálu 1 min, kde došlo k poklesu, pravděpodobně byly materiály

porostlé buňkami z více jak 80 %. Po 14denní kultivaci nebyly mezi jednotlivými materiály statisticky významné rozdíly vzhledem ke směrodatným odchylkám.



*Obrázek 36: Výsledky metabolického testu MTT po 4, 7 a 14dnech kultivace buněk (3T3 myší fibroblasty) na testovaných materiálech; * p<0,0332, *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 5.*

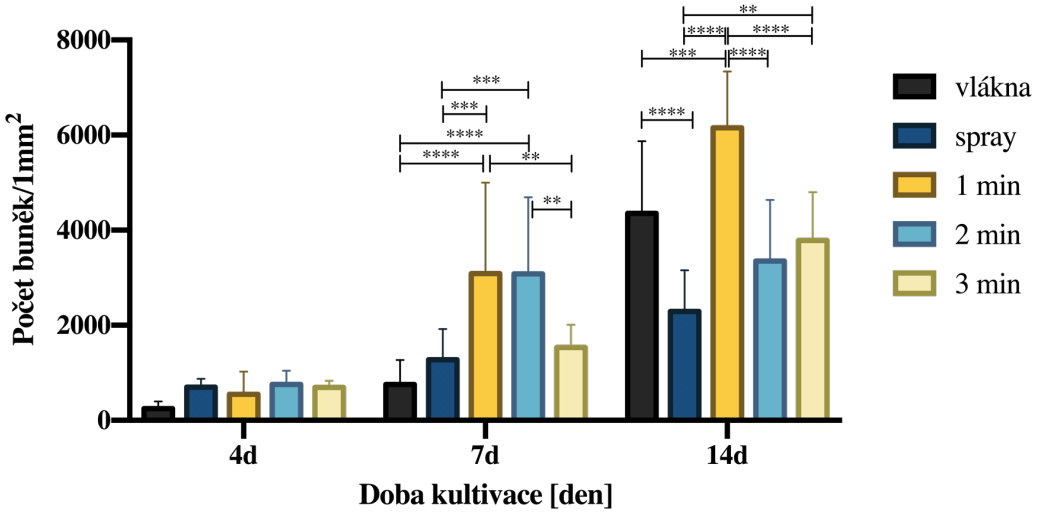
Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu, viz Obrázek 37, buněčná linie 3T3 myších fibroblastů po 4, 7 a 14dnech od kultivace se vzorky vlákenných materiálů. Po čtvrtém dnu kultivace nejsou buňky na materiálech příliš rozprostřené. Sedmý den je viditelný nárůst počtu buněk a tvorba buněčných ostrůvků. Nejvýraznější nárůst je pozorovatelný u materiálu s 1minutovou plazmatickou úpravou. Po 14dnech kultivace došlo k dalšímu nárůstu počtu buněk oproti sedmému dni. U vzorků s plazmatickou úpravou je patrný souvislý buněčný film, vzorky bez povrchové modifikace také vykazují téměř souvislé pokrytí buňkami.



Obrázek 37: Snímky z fluorescenčního mikroskopu testovaných materiálů s nasazenou buněčnou linií 3T3 myších fibroblastů s obarvenými jádry (DAPI, modrá) a cytoplasmou (phaloidin-FITC, zelená; měřítko 50 µm.

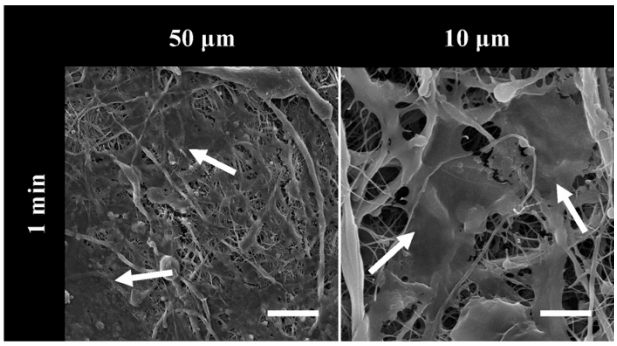
Automatickým propočtem bylo stanoveno množství buněk na plochu 1 mm^2 vzorků materiálů, výsledné hodnoty přepočtu jsou vyobrazeny v grafu, viz Obrázek 38. Výsledky korespondují s výsledky MTT testu. Čtvrtý den od kultivace byl počet buněk napříč testovanými materiály obdobný, pohyboval se okolo 600 buněk/1mm^2, kromě PCL nanovlákenné vrstvy, kde byl počet buněk nižší, (248 ± 149) buněk/1mm^2. Sedmý den došlo k nárůstu počtu buněk a jsou patrné výraznější rozdíly mezi jednotlivými materiály. U materiálu s 1minutovou plazmatickou úpravou nebyl rozdíl mezi čtvrtým a sedmým dnem takový, jako u absorbance, ale data ze sedmého dne mají široký rozptyl

směrodatných odchylek, (3090 ± 1614) buněk/1mm^2. Den 14. měla tato vrstva nejvyšší počet buněk oproti ostatním materiálům (6155 ± 1186) buněk/1mm^2. Vrstvy modifikované plazmatem po dobu 2 a 3 minut byly po 14dnech srovnatelné přibližně 3500 buněk/1mm^2. Nejnižší hodnotu měl PCL vlákenný materiál s PCL mikro/nanočásticemi, (2288 ± 867) buněk/1mm^2.



*Obrázek 38: Počet buněk na plochu 1 mm2 u testovaných materiálů po 4, 7 a 14dnech kultivace s 3T3 myšími fibroblasty; ** p<0,0021, *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni), n = 10.*

Další z použitých metodik hodnocení adheze a spreadingu buněk na testovaných materiálech byla na základě snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu. Obrázek 39 zobrazuje pohled na způsob adheze myších fibroblastů na vlákenném materiálu, u tohoto snímku jde konkrétně o materiál s 1minutovou plazmatickou úpravou, ale způsob adheze buněk byl u všech materiálů stejný. Buňky vyskytovaly především na povrchu vzorků, nepronikaly do struktury materiálů.

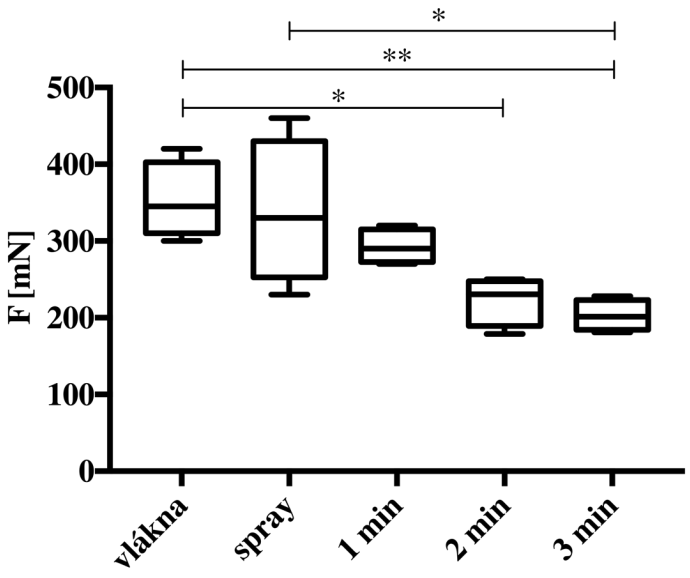


Obrázek 39: SEM snímek vrstvy s plazmatickou modifikací po dobu 1 min s adherovanými buňkami (3T3 myší fibroblasty) po 14dnech kultivace. Šipky ukazují na adherované buňky. Měřítko 50 a 10 µm.

7.3 Testování adheze k modelu tkáně

Pro prvotní otestování adhezivních vlastností vyvinutých materiálů byla zvolena metoda mechanickou zkouškou tahem, tzv. peel test 90°. Jako model tkáně bylo zvoleno tenké střevo z prasete, stejně jako při *in vivo* testování na selatech předchozích materiálů, viz *(Rosendorf et al. 2020)*. Míra adheze vzorků byla hodnocena maximální silou potřebnou k odtržení vzorku od povrchu střev.

Obrázek 40 zobrazuje maximální síly testovaných materiálů potřebné k jejich odtržení od povrchu střev. Největší adhezi vykazoval vlákenný materiál, jehož maximální síla byla (352,5 ± 50,0) mN. Adheze vzorků se sprayingem se od nanovlákenné vrstvy příliš nelišila, maximální síla pro materiál spray byla (337,5 ± 94,7) mN. Materiály s plazmatickou úpravou vykazovaly nižší adhezi oproti nemodifikovaným vrstvám. Maximální naměřená síla vrstvy s 1minutovou úpravou byla (292,5 ± 22,2) mN a materiálu s 2minutovou modifikací (222,5 ± 31,6) mN. Statisticky nejvýznamnější rozdíl byl mezi nanovlákennou vrstvou a materiálem, u kterého byla naměřena nejnižší adheze, vrstvou s 3minutovou úpravou, jejíž maximální síla potřebná k odtržení byla (203,0 ± 20,0) mN.



*Obrázek 40: Boxplot maximální síly potřebné k odtržení testovaných materiálů od povrchu střev; * p<0,0332, ** p<0,0021 (ANOVA, Bonferroni); n = 4.*

Diskuse

8 Vytvoření materiálu pro prevenci peritoneálních adhezí

V rámci diplomové práce byl vytvořen nanovlákenný materiál s antiadhezivním povrchem pro překrytí střevní anastomózy. Ačkoli jsou komerčně dostupné materiály pro prevenci vzniku pooperačních adhezí, žádný z nich není běžně používaný v klinické praxi. Dostupné produkty nejsou dostatečně efektivní a variabilní pro další chirurgické aplikace a co největší počet pacientů. Bylo vyvinuto mnoho materiálů různými metodami za účelem prevence pooperativních adhezí, jejich přehled je zpracován v publikacích *(Capella-Monsonís et al. 2019; Bürgisser a Buschmann 2015; Broek et al. 2014).* U vytvořených materiálů bylo prokázáno minimum pozitivních výsledků. Proto je bezesporu potřeba, aby byl vyvinut materiál zabraňující vzniku život ohrožujících pooperačních adhezí, materiál, který efektivně splní požadavky pro tuto aplikaci. Tato tvrzení potvrzuje přehledová studie *Ko et al. (2017)* a další.

Potenciál antiadhezivního biodegradabilního materiálu není pouze pro použití v gastrointestinální chirurgii, ale také v jiných oblastech. Komplikace pooperativních adhezích se objevují například i v gynekologických operacích. *(Capella-Monsonís et al. 2019; Liakakos et al. 2001)*

8.1 Vytvoření lotosového efektu

Vytvoření hydrofobního povrchu bylo inspirováno lotosovým efektem, který je známý superhydrofóním povrchem, který vytváří hierarchická struktura papil, což je podrobněji popsáno například v následujících publikacích *(Hensel et al. 2016; Falde et al. 2016)*. Morfologie byla napodobena kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu, kterou taktéž použili například *Zhang et al. (2019)* a *Yoon et al. (2010)*. V obou případech byly materiály vyráběny na laboratorním zařízení pro elektrostatické zvlákňování z jehly. Kdežto pomocí Nanospideru™ je možné vrstvy vyrábět v průmyslovém měřítku.

Pro prvotní experimenty elektrostatického sprejování z jehly byly vybrány polymerní roztoky z PHB, PDX a PCL, všechny zmíněné polymery jsou certifikované FDA a používané v klinické praxi ve formě šicích nití. Charakterizaci PHB šicí nitě se věnuje například *Dekeen a Matthews (2013)*. Kompatibilitu použití PHB v bioinženýrství potvrzuje například studie *Williams et al. (2013)*. Popularita PDX v posledních letech stále stoupá a PDX je hojně používaný, což potvrzuje shrnutí od *Goonoo et al. (2015)* a novější od *Martins et al. (2020).* PDX šicí nitě jsou mimo jiné používané i v gastrointestinální chirurgii a patří k nejpoužívanějším materiálům pro chirurgicky vytvořené střevní anastomózy, což je zmíněno například v publikacích *Blažej et al. (2015)* a *Chen (2012).* PCL je dlouhodobě hojně používaný polymer pro výrobu scaffoldů v tkáňovém inženýrství, jeho použití shrnuli například *Abedalwafa et al.(2013)*, dále to dokládají studie *(Klicova et al. 2020; Sankaran et al. 2014; Woodruff a Hutmacher 2010; Sun et al. 2006).* PCL nanovlákenná vrstva byla úspěšně použita při prvotních *in vivo* testech na prasečím modelu *(Rosendorf et al. 2020)*.

Pro bezjehlový elektrospraying byl na základě experimentů elektrostatického zvlákňování z jehly zvolen PCL. Podařilo se pro něj najít vyhovující koncentraci a vhodné podmínky jehlového elektrosprayingu, kdy docházelo k formaci kapek s minimálním výskytem vláken. Další výhodou PCL oproti zkoušeným polymerům je cenová dostupnost. Polymery PHB, PDX i jejich rozpouštědla jsou oproti PCL drahá. Se zpracováváním PCL má KNT TUL hodně zkušeností, patří k nejpoužívanějším polymerům pro výrobu tkáňových nosičů. Mimo jiné byl zde použit i pro výrobu kožního krytu, který byl taktéž zhotoven na stroji Nanospider^{TM}, který prošel testováním SÚKL a je momentálně testován klinicky *(Krchová et al. 2014)*.

Pomocí elektrosprayingu je možné vytvořit strukturu, která je ovlivněna mnoha parametry, například molekulovou hmotností polymeru, koncentrací nebo zvoleným napětím. Jejich vlivu na elektrospraying PCL se například věnovali *Zhou et al. (2016).* Koncentrace, při které docházelo k tvorbě nejhomogennějších částic a minimální produkci vláken byla pro elektrospraying na jehle i bezjehlový 3% w/w PCL (Mn = 45 000 g/mol).

Elektrospraying byl aplikován na podkladovou vrstvu, pro jejíž výrobu byla použita technologie bezjehlového elektrostatického zvlákňování. Elektrospinning je populární technologie pro výrobu scaffoldů v tkáňovém inženýrství, což dokládají následující studie *(Ding et al. 2019; Chen et al. 2017)*. Výroba základní nanovlákenné vrstvy vycházela z výsledků prvotních *in vivo* testů *(Rosendorf et al. 2020),* na jejichž základě byla vyrobena vrstva o gramáži 10 g/m^2 (původní materiál měl 20 g/m^2). Nižší plošná hmotnost byla zvolena z důvodu snížení doby degradace materiálu. Dále tím dojde ke zvýšení prodyšnosti vrstvy, která má pozitivní vliv na hojení ran, protože dojde k osazení buněk i uvnitř struktury scaffoldu. Tyto materiály byly již ozkoušeny *in vivo* experimentem na modelu prasat, který potvrdil lepší výsledky v porovnání s původním materiálem. Při histologickém rozboru byla patrná vyšší četnost cév i mnohojaderných makrofágů než u předchozích materiálů. Vstřebávání materiálu je pravděpodobně intenzivnější a rychlejší. V oblasti anastomózy nebyly nalezeny žádné nekrózy ani rozsáhlý zánět, který se vyskytoval u původních dvouvrstvých materiálů. V případě rozestupu svalové vrstvy materiál defekt přemostil.

Nanovlákenná vrstva obsahovala velmi jemná vlákna, medián z naměřených průměrů vláken byl 58 nm, jemnost vzniklých vláken dokazuje například publikace *Horakova et al. (2020),* kteří použili PCL o stejné molekulové hmotnosti (45 000 g/mol), koncentraci a rozpouštědlového systému, získali vlákna s minimálním průměrem 73 nm.

Po aplikaci mikro/nanočástic pomocí elektrosprayingu na nanovlákennou vrstvu vznikla hierarchická struktura, která je zobrazena na Obrázku 21 na SEM snímcích. Změnou morfologie povrchu nedošlo ke zvýšení kontaktního úhlu. *Zhang et al. (2019)* se podařilo kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu zvýšit kontaktní úhel na (146 ± 2,8)° z původních (120 ± 1,3)°. Ačkoli se také jednalo o PCL, použili odlišný rozpouštědlový systém (chloroform/N-dimethylformamid 4:1 v/v) a elektrospinning i elektrospraying prováděli jehlovým zvlákňováním. Průměr kapek, který získali elektrosprayingem 4%PCL (6,711 ± 1,492 μm) byl větší než námi získaný (198,2 ± 98,4 nm).

8.2 Plazmatická úprava

Vrstva kombinující elektrospinning a elektrospraying byla dále modifikována studeným plazmatem RF PACVD metodou pomocí HMDSO. Tato úprava byla zvolena z důvodu biokompatibility, hydrofobního efektu HMDSO, které jsou zmíněny například ve studii *(Petlin et al. 2017)* nebo v novější publikaci *(Siow 2018)*. Výhodou plazmatické modifikace je i nízká cena a zachování bukových vlastností nanovlákenného scaffoldu, toto tvrzení potvrzuje studie *(Martins et al. 2009).*

Po plazmatické modifikaci došlo k nanesení tenké fólie, která pokrývala povrch nanovláken, mikro/nanočástic a je patrná ze SEM snímků (Obrázek 24). Zda plazmatickou úpravou dochází ke snížení mikrohrubosti, která byla vytvořena elektrosprayingem, by bylo možné ověřit například pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM).

Plazmatická úprava byla dále hodnocena změřením kontaktního úhlu s destilovanou vodou. Oproti základní vrstvě (110,0 ± 5,2)° došlo ke zvýšení hydrofobicity povrchu, u vrstvy s 3minutovou modifikací byl naměřen kontaktní úhel (124,8 ± 2,8)°. Chemická struktura upravených materiálů byla analyzována pomocí FTIR, která potvrdila přítomnost vazeb Si-, které jsou pro úpravy siloxany typické, viz *(Siow 2018)*.

Časová stabilita modifikované vrstvy byla pozorována po dobu šesti měsíců. Změny byly pozorovány po 3měsících, nejpatrnější byly u materiálu s 3minutovou plazmatickou úpravou, kdy došlo ke změně morfologie a ke zvýšení kontaktního úhlu (131,4 ± 4,4)°. Na snímcích SEM (Obrázek 29) je vidět, že došlo k rozpadu původní tenké vrstvy, která byla vytvořena plazmatickou modifikací. Rozpadem se pravděpodobně zvýšila mikrohrubost povrchu a taktéž mohlo dojít k odkrytí mikro/nanostrur vytvořených elektrosprayingem. Díky čemuž byl pak naměřen i větší kontaktní úhel. Časovou stabilitu smáčivosti siloxany plazmaticky upravených polykarbonátových vrstev pozorovali i *Hegemann et al. (2003)*, kteří během 12měsíců nezaznamenali významnou změnu kontaktního úhlu.

Po dobu 6měsíců bylo sledováno i chemické složení FTIR analýzou. Nelze jednoznačně potvrdit stabilitu úpravy, protože se vyskytovaly vzorky, u kterých byly rozdílné intenzity pásem bez viditelného trendu mezi vzorky (Obrázek 31). Ale u vzorku z šestého měsíce (duben 2020) bylo zastoupení Si- vazeb dokonce nejsilnější, tudíž absence těchto vazeb v jiných vzorcích (prosinec 2019) byla pravděpodobně způsobena nehomogenitou úpravy. Pro budoucí modifikace vzorků by bylo vhodné zvýšit homogenitu plazmatické úpravy, která byla pravděpodobně způsobena nerovnoměrností plazmatického výboje, v některých místech byla plazma (ionizované částice) hustší a v některých méně hustá. Vyšší homogenity úpravy by mohlo být dosaženo použitím jiného geometrického uspořádání buzení plazmy.

Hydrofóbní úpravou materiálu došlo ke zvýšení plošné hmotnosti, která je po modifikaci přibližně stejná (u materiálu 3 min) jako u původního materiálu z prvotních experimentů na selatech (20 g/m^2). Navíc zavedením hydrofobních skupin působením HMDSO se zpomalí proces degradace materiálu. Mimo *in vivo* testování na zvířecím modelu by bylo možné otestovat degradaci materiálu *in vitro.* Změřením kontaktního úhlu rubní strany materiálu bylo potvrzeno, že nedošlo ke zvýšení hydrofobicity povrchu rubní strany. Tudíž by úprava proces hojení a spreading buněk z rubní strany nemusela ovlivnit.

8.3 Testování výsledné vrstvy

U plazmaticky modifikovaných materiálu došlo k minimální absorpci u vzorků s destilovanou vodou i simulovanou střevní tekutinou oproti nanovlákenné vrstvě a vrstvě pokryté elektrosprayingem, mezi vzorky s odlišnou dobou úpravy nebyly statisticky významné rozdíly. U testování absorpce se projevilo odlišné chování vůči destilované vodě a simulované střevní tekutině, které bylo pravděpodobně způsobeno rozdílným povrchovým napětím. Povrchové napětí destilované vody je 73 mN/m, u střevní tekutiny se pohybuje mezi 28–46 mN/m *(Vraníková et al. 2016)*. Úpravou HMDSO materiálů došlo ke snížení povrchové energie, tudíž oproti nemodifikovaným vrstvám nedošlo k absorpci ani jedné tekutiny. Rozdíly byly patrné i mezi nanovlákennou vrstvou a materiálem s elektrosprayingem, kde došlo k nižší změně hmotnosti u simulované

střevní tekutiny. Tudíž i aplikací mikro/nanočástic pravděpodobně došlo ke snížení povrchové energie.

Plazmatická modifikace HMDSO je netoxická úprava vhodná pro biomateriály *(Siow 2018; Bacakova et al. 2011),* cytokompatibilitu materiálů potvrdily i provedené testy *in vitro*. Výsledky MTT testu po 14denní inkubaci myších fibroblastů s materiály se nelišily oproti nemodifikované vrstvě (PCL vlákna). Výsledky z fluorescenční mikroskopie se mírně lišily, u vrstvy s 1minutovou úpravou došlo po 14dnech k výraznému nárůstu počtu buněk v porovnání s ostatními materiály. Naopak u vrstvy s mikro/nanočásticemi byl výskyt buněk nižší, pravděpodobně způsobený morfologií povrch materiálu.

V dostupných zdrojích nebylo nalezeno testování adhezí vyvíjených materiálů na střevní tkáni. Podobné přístupy jsou známe pro testování adhezí ke kůži, jimiž byl experiment inspirován, konkrétně *(Wokovich et al. 2008).* Tento experiment byl zvolen pro získání prvotních výsledků efektivity modifikací povrchu vrstev bez nutnosti implantace materiálu do zvířat. Protože testování na zvířecích modelech je finančně i časově velmi náročné a je žádoucí, aby počet zvířat pro vědecké experimenty byl snížen. Výsledky prvotních mechanických testů adhezí k prasečímu střevu odpovídaly předpokladům. Velikost síly potřené k odloupnutí od střevní tkáně u plazmaticky modifikovaných materiálů klesala se zvyšující se dobou expozice plazmatické úpravy. Naopak nejvyšší adhezivitu vykazovala PCL nanovlákenná vrstva.

Z dosavadních výsledků by nejvhodnější dobou expozice plazmatické úpravy povrchu nanovlákenné vrstvy byly pravděpodobně 2 nebo 3minuty. 1minutová úprava byla málo homogenní a hydrofobní efekt byl oproti 2 a 3minutové expozici minimální. U 3minutového materiálu došlo k výrazné změně z makroskopického hlediska, kdy v některých místech modifikace způsobila vznik fólie. Čímž by mohla být snížena porozita materiálu, která byla potvrzena *in vivo* jako vhodná pro celkové hojení anastomózy. Ale tento jev se objevoval z důvodu nerovnoměrnosti plazmatického výboje, tudíž po homogenizaci úpravy by tato doba expozice mohla být vhodná. Oproti 2minutové úpravě vykazovala větší hydrofobní vlastnosti.

Závěr

Cílem diplomové práce byl vývoj antiadhezivního materiálu určeného pro použití v gastrointestinální chirurgii, konkrétně pro překrytí chirurgicky vytvořené střevní anastomózy. Materiál by měl být efektivní ve zpevnění vytvořeného spoje střev a prevenci pooperativních komplikací ve formě anastomotického leaku a peritoneálních adhezí. Lícní a rubní strana výsledného materiálu má odlišné vlastnosti, na rubní straně jsou jemná PCL nanovlákna. Na povrch lícní strany byly naneseny polymerní mikro/nanočástice pomocí elektrosprayingu a dále byl povrch modifikován studeným plazmatem, čímž byla úspěšně snížena smáčivosti povrchu.

Výchozím materiálem byla nanovlákenná PCL vrstva, která se v prvotních *in vivo* testech na prasatech prokázala jako vhodný materiál pro tuto aplikaci. Nanovlákenná PCL vrstva s nízkou gramáží (10g/m^2) byla vyrobena technologií bezjehlovým elektrostatickým zvlákňováním 16% w/w PCL na stroji Nanospider^{TM}, který umožňuje výrobu v průmyslovém měřítku. Vyrobená vrstva měla velmi jemná vlákna, medián z naměřených průměrů vláken byl 58 nm.

Lícní strana nanovlákenné vrstvy byla modifikována, aby došlo ke snížení její smáčivosti, povrchové energie a adheze buněk. Vytvoření hydrofobního povrchu bylo inspirováno hierarchickou strukturou lotosového listu. Pro vytvoření dané morfologie byla zvolena technologie elektrosprayingu, pomocí níž byly na povrch naneseny polymerní mikro/nanočástice. V rámci této diplomové práce byla nalezena vhodná koncentrace (viskozita) polymerního roztoku a podmínky bezjehlového elektrostatického rozprašování na stroji Nanospider^{TM}. Povrch nanovlákenné vrstvy byl pokryt mikro/částicemi 3%PCL, jejichž medián naměřených průměrů vláken byl 173 nm. Elektrosprayingem došlo ke změně morfologie materiálu, která byla patrná ze SEM snímků, nebyla zjištěna statisticky významná změna smáčivosti povrchu oproti původní nanovlákenné vrstvě.

Pro zvýšení hydrofobicity povrchu byl materiál dále modifikován studeným plazmatem s použitím hydrofobního hexamethyldisiloxanu, zvolená doba expozice byla

1, 2 a 3 minuty. Modifikací došlo k nanesení tenké vrstvy na povrchu materiálu, která byla patrná i z makroskopického pohledu změnou zbarvení povrchu materiálů. Úpravou došlo k úspěšnému zvýšení kontaktního úhlu na (124,8 ± 2,8)°, který byl naměřen u vrstvy s 3minutovou úpravou. Plazmatickou úpravou nebyly výrazně ovlivněny vlastnosti rubní strany, která bude při aplikaci v kontaktu se střevní anastomózou. Modifikace výchozího materiálu se projevily zvýšením plošné hmotnosti, po aplikaci elektrosprayingu došlo k jejímu zvýšení 2,5×. Nejvyšší plošná hmotnost byla zjištěna u vzorku s 2minutovou úpravou (27,9 g/m^2), u 3minutové úpravy došlo k částečné destrukci materiálu (21,2 g/m^2). Biologické testování *in vitro* potvrdilo cytokompatibilitu materiálů, nebyly pozorovány významné rozdíly viability buněk mezi jednotlivými materiály po 14dnech inkubace. Účinek plazmatické úpravy se potvrdil i při testování absorpce, kdy došlo k minimálnímu nasáknutí, jak u vzorků s destilovanou vodou, tak se simulovanou střevní tekutinou v porovnání s materiály bez plazmatické modifikace. Experiment adheze k tenkému střevu prasete potvrdil úspěšné vytvoření hydrofóbního povrchu u nanovlákenné PCL vrstvy, nejméně adhezivním materiálem byla vrstva s 3minutovou plazmatickou úpravou.

Časová stabilita materiálů byla sledována po dobu šesti měsíců. FTIR analýzou byla i po šesti měsících úprava HMDSO patrná v chemickém složení vzorku. Z morfologického pohledu došlo po 3měsících k rozpadu původního souvislého tenkého filmu, který vznikl plazmatickou modifikací, na malé částice. Toto pravděpodobně způsobilo mírné zvýšení kontaktního úhlu materiálů, konkrétně u vrstvy s 3minutovou úpravou byl naměřen kontaktní úhel (131,4 ± 4,4)° Celkově sledování potvrdilo nehomogenitu plazmatické úpravy v ploše, ale bylo zjištěno, že u plazmatické úpravy nedochází během 6měsíců k její degradaci.

Pro další experimenty by bylo vhodné homogenizovat plazmatickou úpravu a zaměřit se na 2 a 3minutovou dobu expozice, protože u 1minutové úpravy nedošlo k výrazné změně vlastností oproti původní vrstvě. Dalším benefitem materiálu pro anastomotické krytí by mohlo být, když by obsahoval aktivní látku. Tudíž by mohl být využit jako drug delivery systém. Aktivní látka může být přidána do základní nanovlákenné vrstvy pro zlepšení hojení rány, například ve formě růstových faktorů. Při začlenění růstových

faktorů do struktury materiálu by pravděpodobně nemohla být aplikována plazmatická úprava a musela by se hydrofobní úprava řešit jiným způsobem. Například smícháním polymerního roztoku pro elektrospraying s kapalinou, obsahující hydrofobní funkční skupiny. Aktivní látkou by například mohl být i mitomycin-C enkapsulovaný pomocí elektrosprayingu na povrchu lícní strany, čímž by podpořil antiadhezivní efekt a posílil prevenci vzniku abdominálních adhezí.

Seznam použité literatury

ABEDALWAFA, Mohammed, Fujun WANG, Lu WANG a Chaojing LI, 2013. BIODEGRADABLE POLY-EPSILON-CAPROLACTONE (PCL) FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS: A REVIEW. *Review Advanced Materials Science* [online] [vid. 2020-04-25]. **34**(2), 18. Dostupné z: http://wwwproxy.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_23413/02_23413_abedalwafa.pdf

ARUNG, Willy, Michel MEURISSE a Olivier DETRY, 2011. Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [online] [vid. 2020-05-06]. **17**(41), 4545–4553. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v17.i41.4545

ASGHARI, Fatemeh, Mohammad SAMIEI, Khosro ADIBKIA, Abolfazl AKBARZADEH a Soodabeh DAVARAN, 2017. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online] [vid. 2020-04-22]. B.m.: Taylor & Francis, **45**(2), 185–192. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2016.1146731

BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online] [vid. 2020-03-22]. **29**(6), 739–767. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004

BEHRENS, Adam M., Nora G. LEE, Brendan J. CASEY, Priya SRINIVASAN, Michael J. SIKORSKI, John L. DARISTOTLE, Anthony D. SANDLER a Peter KOFINAS, 2015. Biodegradable-Polymer-Blend-Based Surgical Sealant with Body-Temperature-Mediated Adhesion. *Advanced Materials* [online] [vid. 2020-05-04]. **27**(48), 8056–8061. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201503691

BEIN, Amir, Woojung SHIN, Sasan JALILI-FIROOZINEZHAD, Min Hee PARK, Alexandra SONTHEIMER-PHELPS, Alessio TOVAGLIERI, Angeliki CHALKIADAKI, Hyun Jung KIM a Donald E. INGBER, 2018. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* [online] [vid. 2020-05-04]. **5**(4), 659–668. ISSN 2352-345X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmgh.2017.12.010

BLAŽEJ, S, J PÁRAL a M KAŠKA, 2015. Vývoj konstrukcí střevních anastomóz a současný stav jejich možností. *Rozhledy v chirurgii*. **94**(8), 6.

BOCK, Nathalie, Maria A. WOODRUFF, Dietmar W. HUTMACHER a Tim R. DARGAVILLE, 2011. Electrospraying, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications. *Polymers* [online] [vid. 2020-04-03]. B.m.: Molecular Diversity Preservation International, **3**(1), 131–149. Dostupné z: doi:10.3390/polym3010131

BOENISCH, Miriam a Gilbert J. Nolst TRENITÉ, 2010. Reconstruction of the Nasal Septum Using Polydioxanone Plate. *Archives of Facial Plastic Surgery* [online] [vid. 2020-04-23]. B.m.: American Medical Association, **12**(1), 4–10. ISSN 1521-2491. Dostupné z: doi:10.1001/archfacial.2009.103

BOERSEMA, Geesien, Sandra VENNIX, Zhouqiao WU, Maaike TE LINTEL HEKKERT, Dirk DUNCKER, King H LAM, Anand G MENON, Gert-Jan KLEINRENSINK a Johan F LANGE, 2017. Reinforcement of the colon anastomosis with cyanoacrylate glue: A porcine model. *Journal of Surgical Research* [online] [vid. 2020-04-14]. **217**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2017.05.001

BOLAND, Eugene D., Branch D. COLEMAN, Catherine P. BARNES, David G. SIMPSON, Gary E. WNEK a Gary L. BOWLIN, 2005. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* [online] [vid. 2020-03-24]. **1**(1), 115–123. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2004.09.003

BOŠKOVIĆ, Stefan a Branko BUGARSKI, 2019. Review of electrospray observations and theory. *JOURNAL OF ENGINEERING & PROCESSING MANAGEMENT* [online]. **10**(2) [vid. 2019-05-09]. ISSN 1840-4774. Dostupné z: doi:10.7251/JEPM181002041B

BRAY, Freddie, Jacques FERLAY, Isabelle SOERJOMATARAM, Rebecca L. SIEGEL, Lindsey A. TORRE a Ahmedin JEMAL, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online] [vid. 2020-04-14]. **68**(6), 394–424. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21492

BROEK, Richard P G, Martijn W J STOMMEL, Chema STRIK, Cornelis J H M VAN LAARHOVEN, Frederik KEUS a Harry VAN GOOR, 2014. Benefits and harms of adhesion barriers for abdominal surgery: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* [online] [vid. 2020-05-10]. **383**(9911), 48–59. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(13)61687-6

BÜNGER, Carsten Michael, Niels GRABOW, Katrin STERNBERG, Martin GOOSMANN, Klaus-Peter SCHMITZ, Hans J. KREUTZER, Hüseyin INCE, Stefan KISCHE, Christoph A. NIENABER, David P. MARTIN, Simon F. WILLIAMS, Ernst KLAR a Wolfgang SCHARECK, 2007. A Biodegradable Stent Based on Poly(L-Lactide) and Poly(4-Hydroxybutyrate) for Peripheral Vascular Application: Preliminary Experience in the Pig. *Journal of Endovascular Therapy* [online] [vid. 2020-05-05]. B.m.: SAGE Publications Inc, **14**(5), 725–733. ISSN 1526-6028. Dostupné z: doi:10.1177/152660280701400518

BÜRGISSER, Gabriella Meier a Johanna BUSCHMANN, 2015. History and performance of implant materials applied as peritendinous antiadhesives. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online] [vid. 2020-04-18]. **103**(1), 212–228. ISSN 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33182

CAMPOCCIA, Davide, Lucio MONTANARO a Carla Renata ARCIOLA, 2013. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* [online] [vid. 2020-05-18]. **34**(34), 8533–8554. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089

CAO, Haoqing, Kevin MCHUGH, Sing Yian CHEW a James M. ANDERSON, 2010. The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online] [vid. 2020-04-25]. **93A**(3), 1151–1159. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.32609

CAPELLA-MONSONÍS, Héctor, Stephen KEARNS, Jack KELLY a Dimitrios I. ZEUGOLIS, 2019. Battling adhesions: from understanding to prevention. *BMC Biomedical Engineering* [online] [vid. 2020-03-18]. **1**(1), 5. ISSN 2524-4426. Dostupné z: doi:10.1186/s42490-019-0005-0

CAUGHLIN, Benjamin P., Mark J. BEEN, Ali Raad RASHAN a Dean M. TORIUMI, 2015. The Effect of Polydioxanone Absorbable Plates in Septorhinoplasty for Stabilizing Caudal Septal Extension Grafts. *JAMA Facial Plastic Surgery* [online] [vid. 2020-03-23]. B.m.: American Medical Association, **17**(2), 120–125. ISSN 2168-6076. Dostupné z: doi:10.1001/jamafacial.2014.1370

DEEKEN, Corey R. a Brent D. MATTHEWS, 2013. Characterization of the Mechanical Strength, Resorption Properties, and Histologic Characteristics of a Fully Absorbable Material (Poly-4-hydroxybutyrate—PHASIX Mesh) in a Porcine Model of Hernia Repair. *ISRN Surgery* [online]. **2013** [vid. 2020-05-05]. ISSN 2090-5785. Dostupné z: doi:10.1155/2013/238067

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA a D. Sakthi KUMAR, 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online] [vid. 2020-04-27]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1155/2011/290602

DING, Yaping, Wei LI, Feng ZHANG, Zehua LIU, Nazanin Zanjanizadeh EZAZI, Dongfei LIU a Hélder A. SANTOS, 2019. Electrospun Fibrous Architectures for Drug Delivery, Tissue Engineering and Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials* [online] [vid. 2020-05-08]. **29**(2), 1802852. ISSN 1616-3028. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201802852

DOKE, Sonali K. a Shashikant C. DHAWALE, 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online] [vid. 2020-04-26]. **23**(3), 223–229. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002

DOWLING, Denis P., Ian S. MILLER, Malika ARDHAOUI a William M. GALLAGHER, 2011. Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma-modified polystyrene. *Journal of Biomaterials Applications* [online] [vid. 2020-05-18]. **26**(3), 327–347. ISSN 1530-8022. Dostupné z: doi:10.1177/0885328210372148

DUŠEK, Ladislav, J. ABRAHÁMOVÁ, Zbyněk BORTLÍČEK, Petr BRABEC, J. FÍNEK, Jakub GREGOR, J. HOCH, Daniel KLIMEŠ, Jana KOPTÍKOVÁ, P. KOŽENÝ, Ondřej MÁJEK, Denisa MALÚŠKOVÁ, Jan MUŽÍK, Tomáš PAVLÍK, P. POC, M. RYSKA, B. SEIFERT, Lubomír SLAVÍČEK, Š SUCHÁNEK, Jiří TOMÁŠEK, Jiří VORLÍČEK a Rostislav VYZULA, 2012. *Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat* [online]. B.m.: Fakultní nemocnice v Motole [vid. 2020-05-02]. ISBN 978-80-87347-07-2. Dostupné z: https://is.muni.cz/publication/992773/cs/Epidemiologie-prevence-a-lecba-kolorektalniho-karcinomu-dle-dostupnych-ceskych-a-mezinarodnich-dat/Dusek-Abrahamova-Bortlicek-Brabec

FALDE, Eric J., Stefan T. YOHE, Yolonda L. COLSON a Mark W. GRINSTAFF, 2016. Superhydrophobic materials for biomedical applications. *Biomaterials* [online] [vid. 2019-12-06]. **104**, 87–103. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.06.050

GERARDO TERRONE, Donato, Luigi LEPANTO, Jean-Sebastien BILLIARD, Damien OLIVIE, Jessica MURPHY-LAVALLÉE, Franck VANDENBROUCKE-MENU a An TANG, 2011. A primer to common major gastrointestinal post-surgical anatomy on CT-A pictorial review. *Insights into imaging* [online] [vid. 2020-04-04]. **2**, 631–638. Dostupné z: doi:10.1007/s13244-011-0121-4

GOH, Jen-Yin, Richard J. WEAVER, Libby DIXON, Nicola J. PLATT a Ruth A. ROBERTS, 2015. Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013. *Toxicology Research* [online] [vid. 2020-04-28]. B.m.: Oxford Academic, **4**(5), 1297–1307. Dostupné z: doi:10.1039/c5tx00123d

GÓMEZ-MASCARAQUE, Laura G., Gloria SANCHEZ a Amparo LÓPEZ-RUBIO, 2016. Impact of molecular weight on the formation of electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers* [online] [vid. 2019-11-05]. **150**, 121–130. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.012

GOONOO, Nowsheen, Roubeena JEETAH, Archana BHAW-LUXIMON a Dhanjay JHURRY, 2015. Polydioxanone-based bio-materials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* [online] [vid. 2020-04-23]. **97**(Pt B), 371–391. ISSN 1873-3441. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.024

GOULDER, Frances, 2012. Bowel anastomoses: The theory, the practice and the evidence base. *World Journal of Gastrointestinal Surgery* [online] [vid. 2019-04-14]. **4**(9), 208–213. ISSN 1948-9366. Dostupné z: doi:10.4240/wjgs.v4.i9.208

GUYTON, Kristina L., Neil H. HYMAN a John C. ALVERDY, 2016. Prevention of Perioperative Anastomotic Healing Complications: Anastomotic Stricture and Anastomotic Leak. *Advances in surgery* [online] [vid. 2019-04-10]. **50**(1), 129–141. ISSN 0065-3411. Dostupné z: doi:10.1016/j.yasu.2016.03.011

HEGEMANN, Dirk, Herwig BRUNNER a Christian OEHR, 2003. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online] [vid. 2020-01-05]. B.m.: North-Holland, **208**, 281–286. ISSN 0168-583X. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-583X(03)00644-X

HENSEL, René, Christoph NEINHUIS a Carsten WERNER, 2016. The springtail cuticle as a blueprint for omniphobic surfaces. *Chemical Society Reviews* [online] [vid. 2020-04-23]. **45**(2), 323–341. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/C5CS00438A

HO, Yik-Hong a Mohamed Ahmed Tawfik ASHOUR, 2010. Techniques for colorectal anastomosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [online] [vid. 2019-04-22]. **16**(13), 1610–1621. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v16.i13.1610

HOERSTRUP, S. P., R. SODIAN, S. DAEBRITZ, J. WANG, E. A. BACHA, D. P. MARTIN, A. M. MORAN, K. J. GULESERIAN, J. S. SPERLING, S. KAUSHAL, J. P. VACANTI, F. J. SCHOEN a J. E. MAYER, 2000. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* [online] [vid. 2020-05-01]. **102**(19 Suppl 3), III44-49. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/01.cir.102.suppl_3.iii-44

HOERSTRUP, S. P., G. ZÜND, R. SODIAN, A. M. SCHNELL, J. GRÜNENFELDER a M. I. TURINA, 2001. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* [online] [vid. 2020-04-28]. **20**(1), 164–169. ISSN 1010-7940. Dostupné z: doi:10.1016/s1010-7940(01)00706-0

HORAKOVA, Jana, Marketa KLICOVA, Jakub ERBEN, Andrea KLAPSTOVA, Vit NOVOTNY, Lubos BEHALEK a Jiri CHVOJKA, 2020. Impact of Various Sterilization and Disinfection Techniques on Electrospun Poly-ε-caprolactone. *ACS Omega* [online] [vid. 2020-04-25]. B.m.: American Chemical Society, **5**(15), 8885–8892. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c00503

HSIAO, Chaio-Ru, Cheng-Wei LIN, Chia-Man CHOU, Chi-Jen CHUNG a Ju-Liang HE, 2015. Surface modification of blood-contacting biomaterials by plasma-polymerized superhydrophobic films using hexamethyldisiloxane and tetrafluoromethane as precursors. *Applied Surface Science* [online] [vid. 2020-01-05]. **346**, 50–56. ISSN 0169-4332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2015.03.208

HUH, Dongeun, Yu-suke TORISAWA, Geraldine A. HAMILTON, Hyun Jung KIM a Donald E. INGBER, 2012. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips. *Lab on a Chip* [online] [vid. 2020-04-28]. B.m.: The Royal Society of Chemistry, **12**(12), 2156–2164. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C2LC40089H

HUTMACHER, Dietmar W., 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online] [vid. 2020-05-01]. B.m.: Taylor & Francis, **12**(1), 107–124. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856201744489

HYMAN, N. H., 2009. Managing anastomotic leaks from intestinal anastomoses. *The Surgeon* [online] [vid. 2019-04-01]. **7**(1), 31–35. ISSN 1479-666X. Dostupné z: doi:10.1016/S1479-666X(09)80064-4

HYMAN, Neil, Thomas L. MANCHESTER, Turner OSLER, Betsy BURNS a Peter A. CATALDO, 2007. Anastomotic Leaks After Intestinal Anastomosis. *Annals of Surgery* [online] [vid. 2019-04-10]. **245**(2), 254–258. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/01.sla.0000225083.27182.85

CHEN, C., 2012. The Art of Bowel Anastomosis. *Scandinavian Journal of Surgery* [online] [vid. 2019-04-05]. **101**(4), 238–240. ISSN 1457-4969. Dostupné z: doi:10.1177/145749691210100403

CHEN, Chih-Hao, Shih-Hsien CHEN, K. T. SHALUMON a Jyh-Ping CHEN, 2015. Dual functional core–sheath electrospun hyaluronic acid/polycaprolactone nanofibrous membranes embedded with silver nanoparticles for prevention of peritendinous adhesion. *Acta Biomaterialia* [online] [vid. 2020-04-14]. **26**, 225–235. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2015.07.041

CHEN, Shixuan, Bing LIU, Mark A CARLSON, Adrian F GOMBART, Debra A REILLY a Jingwei XIE, 2017. Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine* [online] [vid. 2019-04-14]. **12**(11), 1335–1352. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/nnm-2017-0017

CHOI, Eun Jung, Bokgi SON, Taek Sung HWANG a Eui-Hwan HWANG, 2011. Increase of degradation and water uptake rate using electrospun star-shaped poly(d,l-lactide) nanofiber. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online] [vid. 2020-05-21]. **17**(4), 691–695. ISSN 1226-086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2010.10.024

KE, Peng, Xiao-Ning JIAO, Xiao-Hui GE, Wei-Min XIAO a Bin YU, 2014. From macro to micro: structural biomimetic materials by electrospinning. *RSC Advances* [online] [vid. 2020-05-18]. B.m.: The Royal Society of Chemistry, **4**(75), 39704–39724. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA05098C

KIMURA, Hiroshi, Yasuyuki SAKAI a Teruo FUJII, 2018. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* [online] [vid. 2020-04-28]. **33**(1), State-of-the-art technologies: In vitro and in vivo models mimicking the human drug metabolism and pharmacokinetics, 43–48. ISSN 1347-4367. Dostupné z: doi:10.1016/j.dmpk.2017.11.003

KLICOVA, Marketa, Andrea KLAPSTOVA, Jiri CHVOJKA, Barbora KOPRIVOVA, Vera JENCOVA a Jana HORAKOVA, 2020. Novel double-layered planar scaffold combining electrospun PCL fibers and PVA hydrogels with high shape integrity and water stability. *Materials Letters* [online] [vid. 2020-04-28]. **263**, 127281. ISSN 0167-577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2019.127281

KLICOVA, Marketa, Andrea KLAPSTOVA, Lukas VOLESKY, Vaclav Liska Jachym ROSENDORF, Richard PALEK a Jana HORAKOVA, 2019. Hydrophobic Ultrafine Hyaluronic Acid Nanofibers. In: *The 5th World Congress on New Technologies* [online]. [vid. 2020-05-04]. Dostupné z: doi:10.11159/icnfa19.151

KO, Jae Eok, Young-Gwang KO, Won Il KIM, Oh Kyoung KWON a Oh Hyeong KWON, 2017. Nanofiber mats composed of a chitosan-poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene oxide) blend as a postoperative anti-adhesion agent. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online] [vid. 2020-03-20]. **105**(7), 1906–1915. ISSN 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33726

KRCHOVÁ, Silvie, Ladislav DZAN, David LUKAS, P. MIKEŠ, Vera JENCOVA, Jana HORAKOVA a Kateřina STRNADOVÁ, 2014. Nanofibers for the wound healing Nanovlákna v hojení kožních ran. *česká dermatovenerologie* [online] [vid. 2020-04-25]. **4**, 234–240. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/274248115_Nanofibers_for_the_wound_healing_Nanovlakna_v_hojeni_koznich_ran

LANG, Annemarie, Andrea VOLKAMER, Laura BEHM, Susanna RÖBLITZ, Rainald EHRIG, Marlon SCHNEIDER, Liesbet GERIS, Joerg WICHARD a Frank BUTTGEREIT, 2018. In silico methods – Computational alternatives to animal testing. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* [online] [vid. 2020-04-28]. **35**(1), 126–128. ISSN 1868-8551. Dostupné z: doi:10.14573/altex.1712031

LANZA, Robert, Robert LANGER, Joseph P. VACANTI a Anthony ATALA, 2020. *Principles of Tissue Engineering*. B.m.: Academic Press. ISBN 978-0-12-821401-5.

LEE, Kangwon, Eduardo A. SILVA a David J. MOONEY, 2011. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface* [online] [vid. 2020-05-05]. B.m.: Royal Society, **8**(55), 153–170. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2010.0223

LI, Jian, Jinhui ZHU, Ting HE, Weida LI, Yue ZHAO, Zaomei CHEN, Junhui ZHANG, Huaying WAN a Rubing LI, 2017a. Prevention of intra-abdominal adhesion using electrospun PEG/PLGA nanofibrous membranes. *Materials Science and Engineering: C* [online] [vid. 2020-05-09]. **78**, 988–997. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.04.017

LI, Jiannan, Xiangru FENG, Baichun LIU, Yingjie YU, Leming SUN, Tongjun LIU, Yongheng WANG, Jianxun DING a Xuesi CHEN, 2017b. Polymer materials for prevention of postoperative adhesion. *Acta Biomaterialia* [online] [vid. 2020-05-09]. **61**, 21–40. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2017.08.002

LIAKAKOS, Theodoros, Nikolaos THOMAKOS, Paul M. FINE, Christos DERVENIS a Ronald L. YOUNG, 2001. Peritoneal Adhesions: Etiology, Pathophysiology, and Clinical Significance. *Digestive Surgery* [online] [vid. 2020-05-]. B.m.: Karger Publishers, **18**(4), 260–273. ISSN 0253-4886, 1421-9883. Dostupné z: doi:10.1159/000050149

MA, Peter X, 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today* [online] [vid. 2020-05-01]. **7**(5), 30–40. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(04)00233-0

MADURANTAKAM, Parthasarathy A., Isaac A. RODRIGUEZ, Christopher P. COST, Ramakrishnan VISWANATHAN, David G. SIMPSON, Matthew J. BECKMAN, Peter C. MOON a Gary L. BOWLIN, 2009. Multiple factor interactions in biomimetic mineralization of electrospun scaffolds. *Biomaterials* [online] [vid. 2020-04-23]. **30**(29), 5456–5464. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.043

MARTIN, David P., Amit BADHWAR, Devang V. SHAH, Said RIZK, Stephen N. ELDRIDGE, Darcy H. GAGNE, Amit GANATRA, Roger E. DAROIS, Simon F. WILLIAMS, Hsin-Chien TAI a Jeffrey R. SCOTT, 2013. Characterization of poly-4-hydroxybutyrate mesh for hernia repair applications. *Journal of Surgical Research* [online] [vid. 2020-04-23]. B.m.: Elsevier, **184**(2), 766–773. ISSN 0022-4804, 1095-8673. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2013.03.044

MARTIN, David P. a Simon F. WILLIAMS, 2003. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* [online] [vid. 2020-04-23]. **16**(2), Biopolymers, 97–105. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-703X(03)00040-8

MARTINS, Albino, Elisabete D. PINHO, Susana FARIA, Iva PASHKULEVA, Alexandra P. MARQUES, Rui L. REIS a Nuno M. NEVES, 2009. Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance. *Small* [online] [vid. 2020-04-23]. **5**(10), 1195–1206. ISSN 1613-6829. Dostupné z: doi:10.1002/smll.200801648

MARTINS, Joana A, Antonina A LACH, Hayley L MORRIS, Andrew J CARR a Pierre-Alexis MOUTHUY, 2020. Polydioxanone implants: A systematic review on safety and performance in patients. *Journal of Biomaterials Applications* [online] [vid. 2020-04-23]. B.m.: SAGE Publications Ltd STM, **34**(7), 902–916. ISSN 0885-3282. Dostupné z: doi:10.1177/0885328219888841

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR, 2017. *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl)*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-271-0500-7.

MOHAMED, Mohamed Abdelhady, Mohamed Leithy AHMED, Mahmoud Gamal Eldin HAGAG a Mohammed Nazeeh Shaker NASSAR, 2018. Stapler versus handswen in small intestinal anastomosis. *International Surgery Journal* [online] [vid. 2020-05-05]. **5**(6), 2054–2058. ISSN 2349-2902. Dostupné z: doi:10.18203/2349-2902.isj20182054

MOSINGER, Jiří, Kamil LANG a Pavel KUBÁT, 2016. Photoactivatable Nanostructured Surfaces for Biomedical Applications. *Topics in Current Chemistry* [online] [vid. 2020-04-27]. **370**, 135–168. ISSN 0340-1022. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-22942-3_5

NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN, 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online] [vid. 2020-04-22]. **32**(8), Polymers in Biomedical Applications, 762–798. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017

NAITO, Masanori, Naoto OGURA, Takahiro YAMANASHI, Takeo SATO, Takatoshi NAKAMURA, Hirohisa MIURA, Atsuko TSUTSUI, Yasutoshi SAKAMOTO, Rieko TANAKA, Yuji KUMAGAI a Masahiko WATANABE, 2017. Prospective randomized controlled study on the validity and safety of an absorbable adhesion barrier (Interceed®) made of oxidized regenerated cellulose for laparoscopic colorectal surgery. *Asian Journal of Endoscopic Surgery* [online] [vid. 2020-05-10]. **10**(1), 7–11. ISSN 1758-5910. Dostupné z: doi:10.1111/ases.12334

NORDENTOFT, Tyge, 2015. Sealing of gastrointestinal anastomoses with fibrin glue coated collagen patch. *Danish Medical Journal* [online] [vid. 2019-04-23]. **62**(5). ISSN 2245-1919. Dostupné z: doi: 10.1080/08941930701772173

O'BRIEN, Fergal J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online] [vid. 2020-04-27]. **14**(3), 88–95. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X

PAN, Yiwa, Xin ZHOU, Yongzhen WEI, Qiuying ZHANG, Ting WANG, Meifeng ZHU, Wen LI, Rui HUANG, Ruming LIU, Jingrui CHEN, Guanwei FAN, Kai WANG, Deling KONG a Qiang ZHAO, 2017. Small-diameter hybrid vascular grafts composed of polycaprolactone and polydioxanone fibers. *Scientific Reports* [online] [vid. 2020-04-23]. B.m.: Nature Publishing Group, **7**(1), 1–11. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-03851-1

PETLIN, D. G., S. I. TVERDOKHLEBOV a Y. G. ANISSIMOV, 2017. Plasma treatment as an efficient tool for controlled drug release from polymeric materials: A review. *Journal of Controlled Release* [online] [vid. 2020-01-12]. **266**, 57–74. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.023

PHAM, Quynh P., Upma SHARMA a Dr Antonios G. MIKOS, 2006. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *https://home.liebertpub.com/ten* [online] [vid. 2020-04-27]. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2006.12.1197

RATHER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS, 2013. *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2020-03-22]. ISBN 978-0-12-374626-9. Dostupné z: doi:10.1016/C2009-0-02433-7

RECEK, Nina, Matic RESNIK, Helena MOTALN, Tamara LAH-TURNŠEK, Robin AUGUSTINE, Nandakumar KALARIKKAL, Sabu THOMAS a Miran MOZETIČ, 2016. Cell Adhesion on Polycaprolactone Modified by Plasma Treatment. *International Journal of Polymer Science* [online] [vid. 2020-01-12]. Dostupné z: doi:10.1155/2016/7354396

REN, Xiangkui, Yakai FENG, Jintang GUO, Haixia WANG, Qian LI, Jing YANG, Xuefang HAO, Juan LV, Nan MA a Wenzhong LI, 2015. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chemical Society Reviews* [online] [vid. 2020-04-25]. B.m.: The Royal Society of Chemistry, **44**(15), 5680–5742. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/C4CS00483C

RIGUTTI, Adriana, 2006. *Ilustrovany Atlas Anatomie*. B.m.: Nakladatelství Sun. ISBN 978-80-7371-142-9.

ROSENDORF, Jachym, Jana HORAKOVA, Marketa KLICOVA, Richard PALEK, Lenka CERVENKOVA, Tomas KURAL, Petr HOSEK, Tomas KRIZ, Vaclav TEGL, Vladimira MOULISOVA, Zbynek TONAR, Vladislav TRESKA, David LUKAS a Vaclav LISKA, 2020. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific Reports* [online] [vid. 2020-04-22]. B.m.: Nature Publishing Group, **10**(1), 1–12. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-58113-4

SANKARAN, Krishna Kumar, Uma Maheswari KRISHNAN a Swaminathan SETHURAMAN, 2014. Axially aligned 3D nanofibrous grafts of PLA–PCL for small diameter cardiovascular applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online] [vid. 2020-04-25]. B.m.: Taylor & Francis, **25**(16), 1791–1812. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2014.950505

SELL, S. A., M. J. MCCLURE, C. P. BARNES, D. C. KNAPP, B. H. WALPOTH, D. G. SIMPSON a G. L. BOWLIN, 2006. Electrospun polydioxanone–elastin blends: potential for bioresorbable vascular grafts. *Biomedical Materials* [online] [vid. 2020-04-23]. B.m.: IOP Publishing, **1**(2), 72–80. ISSN 1748-605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/1/2/004

SEUNARINE, K., N. GADEGAARD, M. TORMEN, D. O. MEREDITH, M. O. RIEHLE a C. D. W. WILKINSON, 2006. 3D polymer scaffolds for tissue engineering. *Nanomedicine (London, England)* [online] [vid. 2020-04-27]. **1**(3), 281–296. ISSN 1748-6963. Dostupné z: doi:10.2217/17435889.1.3.281

SCHEIN MOSHE, ROGERS PAUL, 2011. *Urgentní břišní chirurgie*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-2357-0.

SIOW, Kim S., 2018. Low pressure plasma modifications for the generation of hydrophobic coatings for biomaterials applications. *Plasma Processes and Polymers* [online] [vid. 2020-05-04]. **15**(9), 1800059. ISSN 1612-8869. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.201800059

SUN, Hongfan, Lin MEI, Cunxian SONG, Xiumin CUI a Pengyan WANG, 2006. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* [online] [vid. 2020-04-25]. **27**(9), 1735–1740. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.019

TALMOR, Mia, Clifford B. BLEUSTEIN a Dix P. POPPAS, 2001. Laser Tissue Welding: A Biotechnological Advance for the Future. *Archives of Facial Plastic Surgery* [online] [vid. 2019-04-22]. **3**(3), 207–213. ISSN 1521-2491. Dostupné z: doi: 10.1001/archfaci.3.3.207

TANAKA, K., M. KOGOMA a Y. OGAWA, 2006. Fluorinated polymer coatings on PLGA microcapsules for drug delivery system using atmospheric pressure glow plasma. *Thin Solid Films* [online] [vid. 2020-05-04]. **506–507**, The Joint Meeting of 7th APCPST (Asia Pacific Conference on Plasma Science and Technology) and 17th SPSM (Symposium on Plasma Science for Materials), 159–162. ISSN 0040-6090. Dostupné z: doi:10.1016/j.tsf.2005.08.194

TROSTLE, Steven S., Dean A. HENDRICKSON a Chad FRANKE, 2002. The Effects of Ethylene Oxide and Gas-Plasma Sterilization on Failure Strength and Failure Mode of Pre-Tied Monofilament Ligature Loops. *Veterinary Surgery* [online] [vid. 2020-05-02]. **31**(3), 281–284. ISSN 1532-950X. Dostupné z: doi:10.1053/jvet.2002.32401

URKAN, Murat, İsmail Hakkı ÖZERHAN, Aytekin ÜNLÜ, Mehmet Fatih CAN, Erkan ÖZTÜRK, Armağan GÜNAL a Gökhan YAĞCI, 2017. Prevention of Intraabdominal Adhesions: An Experimental Study Using Mitomycin-C and 4% Icodextrin. *Balkan Medical Journal* [online] [vid. 2020-05-18]. **34**(1), 35–40. ISSN 2146-3123. Dostupné z: doi:10.4274/balkanmedj.2015.1359

VAKALOPOULOS, Konstantinos A., Freek DAAMS, Zhouqiao WU, Lucas TIMMERMANS, Johannes J. JEEKEL, Gert-Jan KLEINRENSINK, Arie VAN DER HAM a Johan F. LANGE, 2013. Tissue adhesives in gastrointestinal anastomosis: a systematic review. *Journal of Surgical Research* [online] [vid. 2019-04-21]. **180**(2), 290–300. ISSN 00224804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2012.12.043

VASITA, Rajesh a Dhirendra S KATTI, 2006. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online] [vid. 2020-05-01]. **1**(1), 15–30. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi: 10.2147/nano.2006.1.1.15

VRANÍKOVÁ, B., A. FRANC, J. GAJDZIOK a D. VETCHÝ, 2016. Biorelevantní disoluční media simulující podmínky trávicího traktu. *Chemické listy* [online] [vid. 2020-05-20]. **110**(2), 126–132. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/233

WANG, Chenyu, Jun WANG, Liangdan ZENG, Ziwen QIAO, Xiaochen LIU, He LIU, Jin ZHANG a Jianxun DING, 2019. Fabrication of Electrospun Polymer Nanofibers with Diverse Morphologies. *Molecules* [online] [vid. 2020-05-14]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **24**(5), 834. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24050834

WANG, Xianfeng, Bin DING, Jianyong YU a Moran WANG, 2011. Engineering biomimetic superhydrophobic surfaces of electrospun nanomaterials. *Nano Today* [online] [vid. 2020-05-14]. **6**(5), 510–530. ISSN 1748-0132. Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2011.08.004

WILLIAMS, Simon F., Said RIZK a David P. MARTIN, 2013. Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering* [online] [vid. 2020-05-02]. **58**(5), 439–452. ISSN 1862-278X. Dostupné z: doi:10.1515/bmt-2013-0009

WILSON-SANDERS, Susan E., 2011. Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education. *ILAR Journal* [online] [vid. 2020-04-27]. B.m.: Oxford Academic, **52**(2), 126–152. ISSN 1084-2020. Dostupné z: doi:10.1093/ilar.52.2.126

WOKOVICH, Anna M., Stanley A. BROWN, Fraser J. MCMASTER, William H. DOUB, Bing CAI, Nakissa SADRIEH, Mei Ling CHEN, Stella MACHADO, Meiyu SHEN a Lucinda F. BUHSE, 2008. Evaluation of substrates for 90° peel adhesion—A collaborative study. I. Medical tapes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online] [vid. 2020-01-06]. **87B**(1), 105–113. ISSN 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31075

WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER, 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online] [vid. 2020-04-25]. **35**(10), 1217–1256. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

YOON, Hyeon, Jong Ha PARK a Geun Hyung KIM, 2010. A superhydrophobic surface fabricated by an electrostatic process. *Macromolecular Rapid Communications* [online] [vid. 2020-05-18]. **31**(16), 1435–1439. ISSN 1521-3927. Dostupné z: doi:10.1002/marc.201000131

ZAMANI, Maedeh, Molamma P PRABHAKARAN a Seeram RAMAKRISHNA, 2013. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine* [online] [vid. 2020-04-28]. **8**, 2997–3017. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S43575

ZHANG, Guohui, Panpan WANG, Xiaoxiao ZHANG, Chunhui XIANG a Lili LI, 2019. Preparation of hierarchically structured PCL superhydrophobic membrane via alternate electrospinning/electrospraying techniques. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online] [vid. 2020-04-24]. **57**(8), 421–430. ISSN 1099-0488. Dostupné z: doi:10.1002/polb.24795

ZHOU, Feng-Lei, Penny L. Hubbard CRISTINACCE, Stephen J. EICHHORN a Geoff J. M. PARKER, 2016. Preparation and characterization of polycaprolactone microspheres by electrospraying. *Aerosol Science and Technology* [online] [vid. 2020-04-27]. B.m.: Taylor & Francis, **50**(11), 1201–1215. ISSN 0278-6826. Dostupné z: doi:10.1080/02786826.2016.1234707

ZHOU, Feng-Lei, Rong-Hua GONG a Isaac PORAT, 2009. Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning. *Polymer International* [online] [vid. 2020-04-27]. **58**(4), 331–342. ISSN 1097-0126. Dostupné z: doi:10.1002/pi.2521

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma elektrospinningu na stroji Nanospider™ s elektrodou v podobě struny. 19

Obrázek 2: Strukturní vzorec poly-ε-kaprolaktonu. 21

Obrázek 3: Strukturní vzorec poly-p-dioxanonu. 22

Obrázek 4: Strukturní vzorec poly-4-hydroxybutyrátu. 24

Obrázek 5:Chirurgický spoj end to end tlustého střeva s anastomotickým leakem, převzato z (Medical Exhibits, Demonstartive Aids, Illustrations and Models, 2020). .. 30

Obrázek 6: Ilustrace postupného zpevňování abdominálních adhezí na střevě, převzato z (Medical Exhibits, Demonstartive Aids, Illustrations and Models, 2020). .. 30

Obrázek 7: Zjednodušené schéma rovnováhy ukládání a degradace fibrinu, která je ovlivněna aktivací (+) a inhibicí plasminogenu (-). Převzato z (Arung et al. 2011). 31

Obrázek 8: Schématická ilustrace čtyř nesmáčivých povrchů, převzato z (Hensel et al. 2016). 36

Obrázek 9: Nanovlákenná PCL vrstva aplikovaná přes chirurgicky sešitou střevní anastomózu selete, převzato z (Rosendorf et al. 2020). 38

Obrázek 10: Schéma zařízení pro elektrospraying z jehly s průměrem 0,88 mm. 40

Obrázek 11: Schéma elektrosprayingu na stroji Nanospider™. 42

Obrázek 12: Fotografie vakuové plazmatické komory. 44

Obrázek 13: Schéma mechanické zkoušky adheze nanovlákenných materiálů k modelu tkáně (tenké střevo). 50

Obrázek 14: Fotografie z průběhu testování adheze peel testem 90° 51

Obrázek 15: Schéma experimentální části diplomové práce. 52

Obrázek 16: SEM snímky elektrostaticky nasprejovaných polymerních roztoků PHB, PDX a PCL o různých koncentrací, měřítko 50 a 10 μm. 55

Obrázek 17: SEM snímky různých koncentrací polymerních roztoků PCL zpracovaných bezjehlovým elektrostatickým sprejováním na textilii typu Spunbond na zařízení Nanospider^{TM}, měřítko 50 a 10 μm. 57

Obrázek 18: SEM snímky elektrostaticky sprejovaného 3% polymerního roztoku PCL na stroji Nanospider^{TM} na elektrostaticky zvlákněnnou vrstu 16% PCL, pokus 1. – 3., měřítko 50 a 10 μm..... 59

Obrázek 19: SEM snímky 16% PCL elektrostaticky zvlákněné nanovlákenné vrstvy, měřítko 50 a 10 μm..... 60

Obrázek 20: Histogram relativní četnosti průměrů vláken 16% nanovlákenné vrstvy, n = 200. 60

Obrázek 21: SEM snímky mikro/nanočástic 3% PCL aplikovaných pomocí elektrosprayingu na 16% PCL nanovlákennou vrstvu, měřítko 50 a 10 μm.. 61

Obrázek 22: Histogram relativní četnosti průměrů kapek elektrosprayingu, n = 200. .. 61

Obrázek 23: Fotografie jednotlivých materiálů, zleva: vlákna, spray, 1 min, 2 min, 3 min; měřítko 1 cm..... 63

Obrázek 24: SEM snímky plazmaticky upravené PCL nanovlákenné vrstvy s PCL mikro/nanočásticemi po dobu 1, 2 a 3 minut, měřítko 50 a 10 μm. 64

Obrázek 25: Krabicový graf plošných hmotností testovaných materiálů a jejich porovnání s původním materiálem (vlákna).; ** p <0,0021, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 6..... 65

Obrázek 26: Krabicový graf kontaktních úhlů testovaných materiálů se vzájemným porovnání; * p<0,0332, **** p<0,0001 (ANOVA, Kruskal-Wallis); n = 10. 66

Obrázek 27: FTIR spektrum PCL vláken, vzorku s 3min úpravou HMDSO a oxidu křemičitého (silicon dioxide). 67

Obrázek 28: FTIR spektra jednotlivých vzorků: vlákna, spray, vrstvy s 1–3minutovou plazmatickou úpravou. 67

Obrázek 29: SEM snímky vrstvy s 3minutovou plazmatickou úpravou 1 den a 3 měsíce po modifikaci; měřítko 500, 100 a 10 μm. 68

Obrázek 30: Graf zobrazující změnu kontaktního úhlu testovaných materiálů v intervalu od 1dne do 6měsíců od plazmatické úpravy (1–3 min) a nemodifikovaných materiálů (vlákna, spray); * p<0,0332, ** p<0,0021, *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 10. 69

Obrázek 31: FTIR spektra vrstvy s 3minutovou plazmatickou úpravou v průběhu šesti měsíců (listopad 2019–duben 2020). 70

Obrázek 32: Absorpce simulované střevní tekutiny a destilované vody s testovanými materiály; **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 3. 72

Obrázek 33: Změna hmotnosti vzorků po 24hodinové absorpci destilované vody a simulované střevní tekutiny; *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n=3. 72

Obrázek 34: Snímky 3T3 myších fibroblastů z optického mikroskopu po inkubaci s testovanými materiály. NC – negativní kontrola (normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (usmrcené buňky). 73

Obrázek 35: Graf metabolické aktivity 3T3 myších fibroblastů po 24hodinové inkubaci s extrakty testovaných materiálů, hranice cytotoxicity (70%) je vyznačena červenou linkou. NC – negativní kontrola (normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (usmrcené buňky); ** p<0,0021, *** p<0,0002 (ANOVA, Bonferroni); n = 8. 74

Obrázek 36: Výsledky metabolického testu MTT po 4, 7 a 14dnech kultivace buněk (3T3 myší fibroblasty) na testovaných materiálech; * p<0,0332, *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni); n = 5. 75

Obrázek 37: Snímky z fluorescenčního mikroskopu testovaných materiálů s nasazenou buněčnou linií 3T3 myších fibroblastů s obarvenými jádry (DAPI, modrá) a cytoplasmou (phaloidin-FITC, zelená; měřítko 50 μm. 76

Obrázek 38: Počet buněk na plochu 1 mm2 u testovaných materiálů po 4, 7 a 14dnech kultivace s 3T3 myšími fibroblasty; ** p<0,0021, *** p<0,0002, **** p<0,0001 (ANOVA, Bonferroni), n = 10. 77

Obrázek 39: SEM snímek vrstvy s plazmatickou modifikací po dobu 1 min s adherovanými buňkami (3T3 myší fibroblasty) po 14dnech kultivace. Šipky ukazují na adherované buňky. Měřítko 50 a 10 μm. 77

Obrázek 40: Boxplot maximální síly potřebné k odtržení testovaných materiálů od povrchu střev; * p<0,0332, ** p<0,0021 (ANOVA, Bonferroni); n = 4. 78

Obrázek 41: SEM snímky testovaných materiálu v období od 1 dne po 6měsíců do plazmatické úpravy; měřítko 10 μm. 106

Seznam tabulek

Tabulka 1: Podmínky zvlákňování různých koncentrací polymerních roztoků PCL, PDX a PHB. 41

Tabulka 2: Podmínky elektrostatického zvlákňování 16% PCL. 42

Tabulka 3: Podmínky elektrostatického sprejování roztoků PCL. 43

Tabulka 4: Parametry plazmatické úpravy. 44

Tabulka 5:Parametry mechanické zkoušky. 50

Tabulka 6: Viskozita polymerních roztoků PCL, PDX, PHB. 54

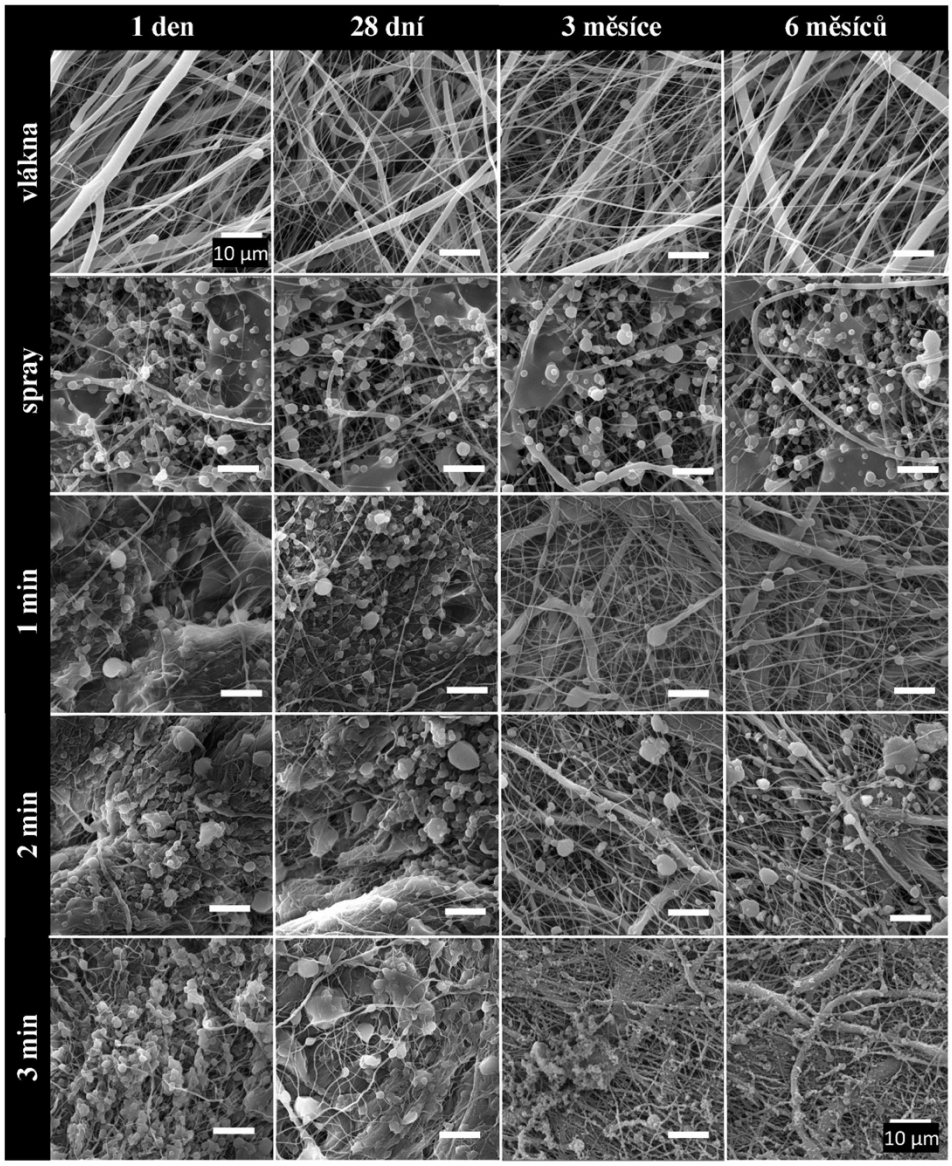
Tabulka 7: Hodnoty viskozity PCL polymerních roztoků o koncentraci 2–7 %. 56

Tabulka 8: Podmínky elektrostatického sprejování 3% PCL, pokusy 1. – 3. 58

Tabulka 9: Přehled označení testovaných materiálů. 62

Příloha

Příloha 1: Doplnění kapitoly 6. 2. 1 Morfologie



Obrázek 41: SEM snímky testovaných materiálu v období od 1 dne po 6měsíců do plazmatické úpravy; měřítko 10 µm.