

Studium interakce polyesterových vláknenných materiálů s proteiny a buňkami

Diplomová práce

Studijní program:

N3106 Textilní inženýrství

Studijní obor:

Netkané a nanovláknenné materiály

Autor práce:

Bc. Veronika Voláková

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra chemie



Zadání diplomové práce

Studium interakce polyesterových vláknenných materiálů s proteiny a buňkami

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Voláková**
Osobní číslo: T17000266
Studijní program: N3106 Textilní inženýrství
Studijní obor: Netkané a nanovláknenné materiály
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Analýza fyzikálně-chemických vlastností vybraných polyesterových nanovláknenných materiálů
3. Testování adsorpce modelového proteinu na vybraných nanovláknenných materiálech
4. In vitro testování buněčné adheze a proliferace na vybraných nanovláknenných materiálech
5. Zpracování získaných výsledků a jejich vyhodnocení

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

dle potřeby dokumentace
40-60 dle potřeby
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. Asadian, M., Dhaenens, M., Onyshchenko, I., De Waele, S., Declercq, H., Cools, P., Devreese, B., Deforce, D., Morent, R., De Geyter, N., 2018. Plasma Functionalization of Polycaprolactone Nanofibers Changes Protein Interactions with Cells, Resulting in Increased Cell Viability. *ACS Applied Materials & Interfaces* 10, 41962-41977. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14995>
2. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., 2012. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press.
3. Walkey, C.D., Chan, W.C.W., 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2780-2799. <https://doi.org/10.1039/C1CS15233E>
4. Wei, Q., Becherer, T., Angioletti-Uberti, S., Dzubiella, J., Wischke, C., Neffe, A.T., Lendlein, A., Ballauff, M., Haag, R., 2014. Protein Interactions with Polymer Coatings and Biomaterials. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 8004-8031. <https://doi.org/10.1002/anie.201400546>
5. Wilson, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I., Pearcy, M.J., 2005. Mediation of Biomaterial-Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue Engineering* 11, 1-18. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1>

Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce: 20. února 2019
Předpokládaný termín odevzdání: 15. května 2020

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.

1. června 2020

Bc. Veronika Voláková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Věře Jenčové Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a neustálou ochotu, kterou vynakládala po celou dobu psaní této diplomové práce. Dále děkuji své konzultantce Ing. Šárce Hauzerové za pomoc s uskutečněním a průběhem veškerého testování, odborné rady a rovněž konzultace, které mi poskytla, doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové, Ph.D. za umožnění měření smáčivosti a konzultaci získaných výsledků a Ing. Kristýně Havlíčkové za výrobu materiálů použitých pro experimentální část této práce.

Velké poděkování patří také mé rodině, která mě podporovala a doprovázela po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Mikro/nanovláknenné biodegradabilní materiály jsou v poslední době hojně diskutovány v oblasti tkáňového inženýrství. Uplatnění nacházejí jak z pohledu řízené dopravy léčiv, tak v podobě tkáňového nosiče, který je vložen do těla pacienta, a poskytuje potřebné podmínky pro obnovu poškozené tkáně (např. cév, kostí, chrupavek).

Nedílnou součástí správné odezvy organismu na tkáňový nosič je interakce mezi buňkami a scaffoldem, jejíž součástí je interakce materiálu s proteiny. Tato práce se zabývá studiem vlivu morfologie a chemického složení polyesterových vláknenných materiálů na adsorpci proteinů a následnou buněčnou adhezi a proliferaci.

Elektrostaticky zvlákněné materiály byly charakterizovány z hlediska morfologie (průměrů vláken) a smáčivosti. Dále byla hodnocena adsorpce slabě a silně vázaných proteinů na materiálech. Buněčná adheze a proliferace byla zkoumána pomocí 3T3 myších fibroblastů testem viability, skenovací elektronovou mikroskopií a fluorescenční mikroskopií.

Ze získaných výsledků je patrný určitý trend mezi adsorpcí proteinů a interakcí materiálu s buňkami. Pozorujeme lepší buněčnou proliferaci na materiály s vyšší adsorpcí proteinů (zejména silně vázaných). Nejvyšších hodnot adsorpce proteinů a buněčné proliferace nabýval materiál PLA. Materiály s nižší adsorpcí proteinů (zejména PCL) podporují růst buněk znatelně méně.

Klíčová slova:

Tkáňové inženýrství, elektrostatické zvláknění, polyestery, adsorpce proteinů, *in-vitro* testování

Abstract

Micro/nanofiber biodegradable materials are widely discussed in the field of tissue engineering. They could be applied in controlled transport of medicines and in the form of a scaffold which would be inserted into the patient's body and provide the necessary conditions for recovery of damaged tissue (e.g. blood vessels, bones, cartilage).

An integral part of the organism's correct response to a scaffold is its interaction with cells which includes the interaction of material with proteins. This thesis deals with the study of the influence of morphology and chemical composition of polyester fibrous materials on protein adsorption and consecutive cell adhesion and proliferation.

Electrospun materials were characterized in terms of morphology (fibers diameter) and wettability. Furthermore, the adsorption of weakly and strongly bound proteins on materials was evaluated. Cell adhesion and proliferation were examined using 3T3 mouse fibroblasts by viability assay, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy.

The obtained results show a certain trend between protein adsorption and the interaction of material with cells. We observe better cell proliferation on materials with higher protein adsorption (especially strongly bound). Material PLA acquires the highest values of protein adsorption and cell proliferation. Materials with lower protein adsorption (especially PCL) support cell growth significantly less.

Key words:

Tissue engineering, electrospinning, polyesters, protein adsorption, *in-vitro* testing

Obsah

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	12
2 SCAFFOLDY	14
2.1 Metody přípravy vláknenných materiálů	16
3 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	23
4 VLVIV PROTEINŮ NA BUNĚČNOU INTERAKCI S MATERIÁLEM	26
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
5 MATERIÁLY A METODY	30
5.1 Morfologie materiálů.....	32
5.2 Smáčivost materiálů	33
5.3 Adsorpce proteinů	34
5.3.1 Příprava roztoků slabě a silně vázaných proteinů pro analýzu jejich adsorpce na materiálech	35
5.3.2 Metoda podle Bradforda.....	35
5.3.3 SDS-PAGE	36
5.3.4 Quant-iT Protein Assay Kit.....	37
5.4 <i>In Vitro</i> testování	38
5.4.1 Příprava materiálů pro kultivaci buněk	38
5.4.2 Příprava buněčné suspenze a nasazení buněk na materiály.....	38
5.4.3 Testování buněčné viability pomocí CCK-8 testu	39
5.4.4 Fluorescenční mikroskopie.....	40
5.4.5 Skenovací elektronová mikroskopie	40
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	42
6.1 Morfologie materiálů.....	43

6.2	Charakteristika smáčivosti materiálů	47
6.3	Analýza adsorpce proteinů	50
6.3.1	Analýza slabě vázaných proteinů (soft corona)	50
6.3.2	Analýza silně vázaných proteinů (hard corona)	51
6.4	<i>In vitro</i> testování s myšimi fibroblasty 3T3	55
ZÁVĚR		62
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		64
SEZNAM OBRÁZKŮ		69
SEZNAM TABULEK		71
SEZNAM PŘÍLOH		72

Seznam použitých zkratek

BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol (fluorescenční barvivo)
dH ₂ O	destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's (kultivační médium)
Mw	hmotnostně střední molekulová hmotnost
NC	negativní kontrola
PA	polyamid
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
PC	pozitivní kontrola
PCL45	polykaprolakton s Mw 45 000
PCL80	polykaprolakton s Mw 80 000
PE	polyethylen
PES	polyester
PLA	polylactid acid (kyselina polymléčná)
PLCL	poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) (kopolymer PCL a PLA)
PMMA	polymethylmethakrylát
polyHEMA	polyhydroxyethylmethakrylát
PP	polypropylen
PTFE	polytetrafluorethylen
PU	polyuretan
PVC	polyvinylchlorid
RT	room temperature (pokojová teplota)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SDS	sódium dodecyl sulfát (dodecylsírán sodný)
3T3	myší fibroblasty

Úvod

V posledních desetiletích se v oblasti zdravotnictví rozmáhá velký zájem o nové postupy a možnosti léčby poškozených tkání. Jsou hledány vhodné náhrady kloubů, chrupavek, kostí, cév, šlach či orgánů. Pro jejich vytvoření lze využít široké spektrum materiálů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které je možné formovat do rozmanitých struktur a tvarů dle požadavků. Velké úsilí je vynakládáno na vytvoření uměle získané tkáně nebo vytvoření vhodného implantátu, který poskytne potřebnou fyzikálně-chemickou oporu pro vytvoření tělu vlastní nové tkáně s následným rozkladem (vstřebáním) podpůrného materiálu bez negativní odezvy organismu. Zkoumání v oblasti regenerativní medicíny a kontrolovaném uvolňování léčiv vyžaduje od materiálů nové či lepší vlastnosti. Ve stávajících výzkumech jsou hojně zkoumány syntetické biodegradabilní polymery, které nabízejí dobrou biokompatibilitu a široké možnosti modifikace polymeru při jeho výrobě dle požadovaných vlastností. Dále také lze docílit lepších vlastností funkcionalizací materiálu. Důležitými vlastnostmi pro požadovanou interakci buněk s materiálem jsou vhodná morfologie materiálů, chemická struktura či hydrofobicita. Dalším důležitým parametrem pro buněčnou adhezi je adsorpce proteinů na materiál. Z výše zmíněných informací vyplývá, že je žádoucí zabývat se zkoumáním vlivu parametrů materiálu na adsorpci proteinů a následnou buněčnou adhezi a proliferaci.

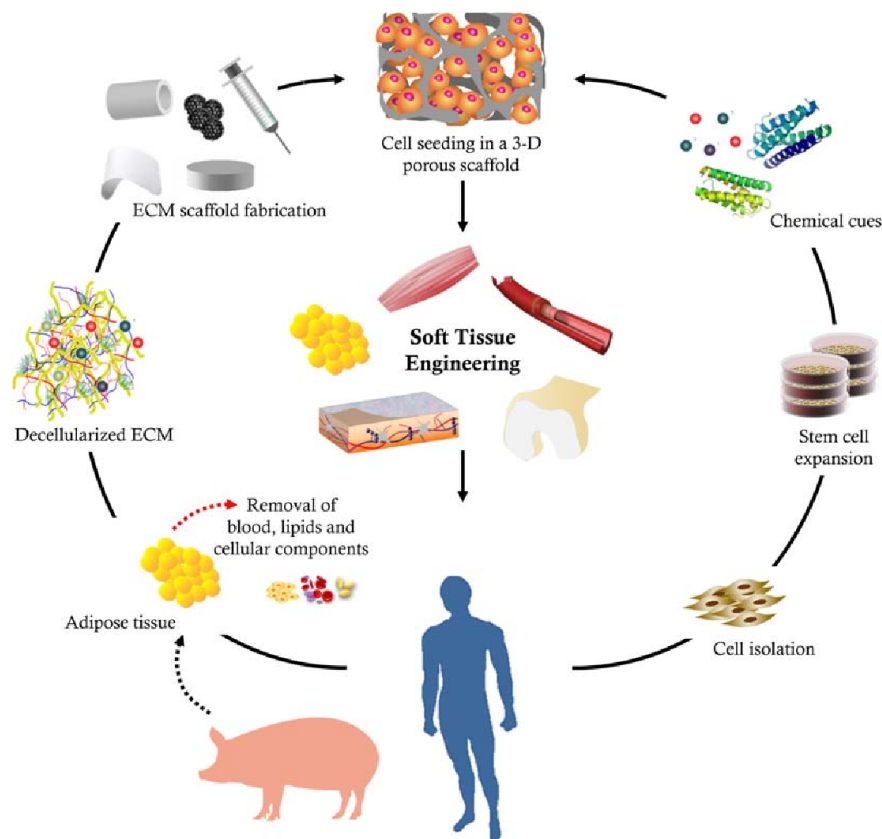
Teoretická část práce je zaměřena na tkáňové inženýrství a materiály, které jsou v této oblasti používány, s bližším zaměřením na vláknenné syntetické materiály. Další kapitola se zabývá biodegradabilními polymery, které jsou pro přípravu těchto materiálů vhodné či používané a technologie, kterými je možné připravit vhodnou náhradu vláknenného charakteru. Nedílnou součástí je také kapitola o vlivu proteinů na buněčnou adhezi, kde je popsán mechanismus interakce mezi materiálem, proteiny a buňkami. Experimentální část práce zkoumá souvislosti mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi polyesterových vláknenných materiálů, adsorpcí proteinů a buněčnou adhezí a proliferací.

Teoretická část

1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární pole, které aplikuje principy inženýrství a přírodních věd pro vývoj biokompatibilních náhrad vhodných k nápravě, udržení nebo vylepšení poškozené tkáně v těle. Jedním z důvodů vývoje této alternativní léčby je nedostatek dárců pro transplantaci. Dochází zde k imunitní odpovědi mezi dárcem a příjemcem, která je individuální, nepředvídatelná a může být negativní na základě nevhodnosti dárce, čemuž může volba vhodné náhrady zamezit. Toto nové odvětví medicíny by mělo umožnit univerzálnost náhrad a vyřešit problém hledání vhodného dárce (Tian et al., 2012). Pro přípravu scaffoldů (tkáňových nosičů) jsou používány biokompatibilní materiály, které mohou být zpracovány s různou morfologií dle cíleného použití např. v podobě třírozměrného neporézního materiálu (kloubní náhrady), vláken, filmů, membrán či porézního třírozměrného scaffoldu (Ratner, 2013). Biomateriály (biokompatibilní materiály) jsou zkoumány od 50. a 60. let minulého století (první generace biomateriálů), kdy byla zjišťována netoxičita a bioinertita (schopnost materiálu neinteragovat s vnitřním prostředím těla pacienta) materiálů (elastomery, silikonové pryže) (Pleváková, 2019). Druhá generace biomateriálů, v 80. a 90. letech, se zabývala vyvoláním kontrolované reakce mezi organismem a materiálem, který byl implantován do těla pacienta s cílem terapeutického efektu v oblasti ortopedie a dentální chirurgie (bioaktivní sklo a keramika). Druhá generace přinesla vynálezy jako jsou kardiostimulátor (povrchová úprava polyuretanem), rozpustné materiály (kyselina polyglykolová), biodegradabilní polymery pro řízené uvolňování léčiv a genovou terapii (vlození sekvence DNA do genomu pacienta). Současná třetí generace materiálů (od roku 2000 dál) se zabývá tvorbou nové, tělu vlastní tkáně a regenerací tkáně za použití scaffoldu (tkáňového nosiče) jako prozatímního podpůrného materiálu. Zkonstruovaný tkáňový nosič musí splňovat biokompatibilitu, vhodné chemické složení, mechanické vlastnosti (pevnost, ohyb, ...), vhodnou porozitu pro buněčnou proliferaci dovnitř scaffoldu, případně degradabilitu o dostatečné době potřebné k vytvoření nové tkáně s celkovou degradací (vstřebatelností) a rovněž možnost sterilizace pro zamezení zanesení infekce do těla. Dále tkáňový nosič nesmí vyvolat přílišnou zánětlivou reakci

a nesmí být cytotoxický (Ratner, 2013; Tian et al., 2012). V současné době jsou materiály používané pro přípravu scaffoldů např. kovy, keramika, sklo, polymery, uhlíkové materiály a kompozity (kombinace různých materiálů) (Ratner, 2013). Uplatnění vybraných materiálů v oblastech zdravotnictví je v tabulce 1. Jednou z možností přípravy implantátu je kultivace vlastních buněk pacienta na připraveném scaffoldu zhotoveném vhodnou technologií. Buňky svou následnou proliferací (rozmnožováním) utváří tělu vlastní tkáň mimo tělo pacienta. Takto vytvořená tělu vlastní tkáň je poté implantována do těla pacienta na poškozené místo. Další možností je vložení scaffoldu do těla s tím, že až zde na něj buňky adheřují, následně proliferují a je utvářena tělu vlastní nová tkáň (Tian et al., 2012) (viz obrázek 1).



Obrázek 1: Princip tkáňového inženýrství znázorňující získání a separaci buněk ze zvířete, výrobu scaffoldu, nasazení buněk na scaffold a implantaci do těla pacienta (Choi et al., 2014).

2 Scaffoldy

Pro vhodnou interakci organismu pacienta se scaffoldem musí mít tkáňový nosič vhodné a požadované vlastnosti (viz kapitola 1) v závislosti na místě aplikace v těle. Druhy používaných materiálů se dělí do tří hlavních skupin – kovy, keramika a polymery. Kovové materiály vynikají vysokou pevností, a proto bývají hojně používány pro náhrady tvrdých tkání (kompletní kloubní a kostní náhrady, zubní implantáty) a pro fixaci zlomenin. Často používanými jsou materiály titan a ocel (viz tabulka 1) a další. Tyto implantáty většinou zůstávají v těle pacienta po celý život, a proto jsou na ně kladeny vysoké nároky s důrazem na pevnost a důležitou vlastností je také vlastnost materiálu nekorodovat. Keramické materiály jsou velmi tvrdé, ale zároveň křehké a rovněž více odolávají procesu degradace oproti kovům. Tyto materiály nachází uplatnění v oblasti ortopedie a dentálních aplikacích. Polymery mohou být získány z přírodních nebo syntetických zdrojů. Aktuálně jsou více diskutované pro medicínské aplikace polymery syntetické (např. polyestery – PCL, PLA, PGA, které jsou schváleny FDA (United State Food and Drug Administration) (Tian et al., 2012)), které lze používat čisté nebo jejich blendy (směsi) a kopolymery. Oproti keramice a kovům jsou měkké, mají menší pevnost, vyšší ohyb a flexibilitu. Před vpravením scaffoldu do těla je důležitým krokem jeho sterilizace pro zamezení zanesení infekce. Velké množství polymerů má tendenci absorbovat vodu a je obtížnější jejich sterilizace, která závisí na chemické povaze a mechanických vlastnostech konkrétního polymeru. Scaffoldy nacházejí uplatnění v kardiovaskulárních aplikacích, cévních náhradách, kýlních sítkách, nitroočních čočkách a v mnoha dalších aplikacích (Bauer et al., 2013).

Tabulka 1: Materiály používané ve tkáňovém inženýrství, jejich vlastnosti a aplikace (Ratner, 2012; Scott Lamber, 2018, Michálek, 2018)

Materiál	Biodegradabilita	Tažnost [%]	Pevnost [MPa]	Krystalinita [%]	Další vlastnosti	Aplikace
Titan	ne	nízká	950-1050	velmi vysoká		kloubní náhrady, dentální implantáty, kardiostimulátor, implantovaný defibrilátor
Ocel	ne	nízká	450-750	80-90		kloubní náhrady, svorkové stehy
PTFE	ne	>150	12-36	až 95	vysoká tepelná odolnost	kýlová síťka, ušní trubice, povrchový materiál stentů
PE	ne	>150	8-35	50-85	vysoká abrazi-vzdor-nost	kloubní náhrady
PP	ne	400	15-40	až 60-75	vysoká únavová odolnost	kýlová síťka, šicí nitě, jednorázová materiály a obaly
PVC	ne		10-75	vysoká		krevní vaky
PMMA	ne	4	50-77	30		kostní cement
Poly-HEMA	ne	150	0,5			kontaktní čočky, nitrooční čočky
PA	ne	90-300	60-85	35-45		
PU	ne	vysoká	18			kardiostimulátor, implantovaný defibrilátor
Silikony	ne	350-600	6	nízká		náhrada kůže, kontaktní čočky, léčba glaukomu
PES, Dacron	ne	20-50, 15	55-100			umělé šlachy a vazy, srdeční chlopeň, cévy
PCL	ano	vysoká	0,4	50-55	hydrofobní	cévy
PLA	ano	30-40	2,7	37	hydrofobní	pro fixaci kloubů, stenty
Kolagen	ano	10-12	50		tělu vlastní	náhrada kůže

Polymerní vláknenné scaffoldy

Pro implantáty je využíváno mnoha různých struktur v závislosti na typu aplikace dle umístění v těle pacienta. Materiál může být ve formě neporézního třírozměrného útvaru, filmu, hydrogelu nebo pěny či ve vláknenné podobě, která disponuje porézní strukturou (Bauer et al., 2013).

Použití porézního scaffoldu o vhodné velikosti a distribuci pórů umožňuje stimulaci růstu buněk a jejich proliferaci do vnitřní struktury tkáňového nosiče. U vláknenných materiálů není univerzální velikost pórů, která by byla vhodná pro aplikaci v libovolné části těla (Ratner, 2013). Různé druhy buněk mohou mít odlišnou velikost a tomu je zapotřebí přizpůsobit velikost pórů. Pro kultivaci druhů buněk menších rozměrů se ukázaly jako vhodné materiály takové, které jsou připraveny elektrostatickým zvlákněním

o plošné velikosti pórů v řádu jednotek mikrometrů (Veverková, 2013). Pro proliferaci buněk do vnitřní struktury tkáňového nosiče a umožnění tvorby kompaktní tkáně je nutná dostatečná velikost a interkonektivita pórů ve vnitřní struktuře materiálu (Ratner, 2013).

2.1 Metody přípravy vláknenných materiálů

Materiálů s porézní strukturou lze docílit velkým množstvím způsobů výroby. Pro přípravu mohou být použity přírodní i syntetické polymery různého chemického složení, které je zvoleno v závislosti na typu následného použití např. kolagen, PLA, PGA, fibrinogen, elastin, PS, PMMA, PC, PEO a další (Ratner, 2013). Výhodami jsou široké možnosti modifikací a funkcionalizací povrchu např. pomocí růstových faktorů (proteiny), trombocyty, plazmou či tvorbou kompozitu (Vojtěch Hanzl, 2018). Pro některé druhy aplikací (např. náhrady kostí) je nevýhodou poměrně nízká pevnost polymerů viz tabulka 1. Při výrobě materiálu je možné ovlivňovat parametry jako jsou velikost a orientace vláken, velikost a interkonektivita pórů či tloušťka získaných vrstev, čímž lze docílit požadované vhodné struktury. V oblasti zdravotnictví může být nanovláknenný materiál použit ve formě tkáňového nosiče, na ochranné oděvy, roušky, ale uplatnění nachází i v oblasti vzduchové a vodní filtrace, kosmetiky či zemědělství (Lukáš et al., 2009).

Melt-blown

Technologie melt-blown je založena na principu zahřátí polymeru nad jeho T_m (teploty tání) a jeho následnou extruzí deskou s tryskami za přítomnosti horkého vzduchu (Thomas et al., 2015). Rozfoukáním taveniny vznikají vlákna o průměru 1–4 μm (Tan et al., 2010), která jsou chlazená, zachytávána na podklad a tvoří soudržnou vláknennou vrstvu. Velikost průměru vláken může být ovlivněna volbou velikosti průměru trysek, rychlostí proudícího vzduchu a druhem polymeru. Tloušťka materiálu obvykle bývá několik milimetrů. Porozita materiálu může být ovlivněna rychlostí posunu pásu na níž se ukládají vzniklá vlákna nebo kombinací s jinou technologií (Thomas et al., 2015). Materiál připravený touto technologií nedisponuje příliš dobrými mechanickými vlastnostmi. Ty je však možné ovlivnit v kombinaci s metodou elektrostatického zvlákňování. Poměr množství vzniklých vláken z obou metod (mikrovláken (melt-blown)/ nanovláken

(elektrospinning)), kdy se zvyšujícím se počtem nanovláken klesá velikost pórů (Erben et al., 2016), umožňuje korigovat mechanické vlastnosti vzniklého materiálu. Tento materiál nachází uplatnění v kostním tkáňovém inženýrství (Erben et al., 2015). Další uplatnění by technologie meltblown mohla mít v oblasti cévního tkáňového inženýrství (PLA scaffoldy) a je rovněž zkoumána pro tvorbu náhrad šlach (Thomas et al., 2015).

Metoda tažení vláken (Drawing)

Metoda tažení vláken umožňuje výrobu nanovláken s tloušťkou desítky nanometrů a délkou až v řádu desítek centimetrů. Princip metody spočívá v umístění hrotu jehly do polymerní taveniny. Následně je hrotem s polymerní taveninou taženo do požadovaného směru a vzdálenosti. Dochází k tvorbě vlákna mezi hrotem a nádobou s polymerní taveninou. Pro docílení co nejdelšího vlákna je žádoucí při procesu zajistit teplotu co nejbližší k T_m polymeru. Po docílení požadované délky a tloušťky je vlákno ochlazeno a případně dále formováno (Xing et al., 2008). Kromě samostatných vláken je také možné formovat přesně definované struktury s požadovanou orientací vláken a porozitou materiálu. Nevýhodou technologie je její nízká produktivita. Uplatnění by tato metoda mohla potenciálně najít např. jako scaffold určený k obnově nervové tkáně – míchy za použití nánosu polypyrrolu na vláknitou strukturu scaffoldu, pro docílení vodivosti materiálu elektrickým proudem (Strnadová, 2019).

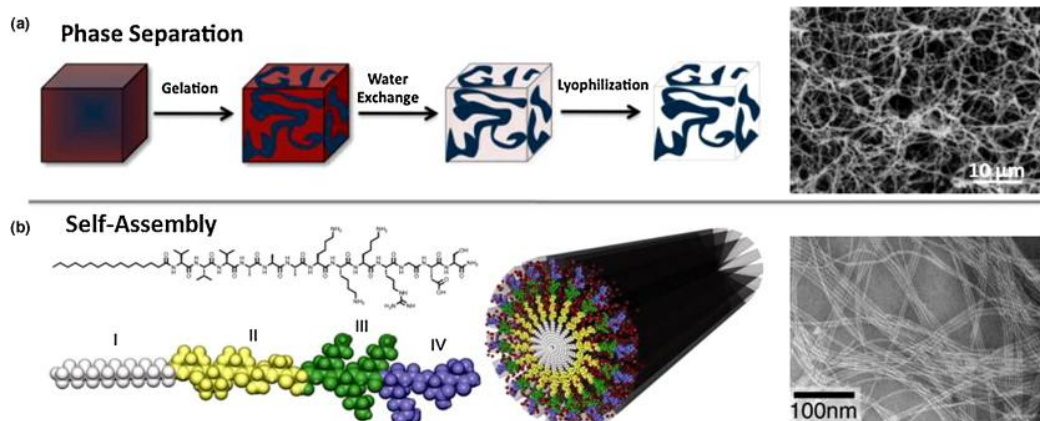
Fázová separace

Tato technologie je založena na termodynamické reakci, která využívá oddělení dvou fyzikálně různých fází (Petráš, 2009). Metoda funguje za určitých teplotních podmínek (Lu et al., 2013) a jako výchozí roztok je použit systém polymer-rozpouštědlo (Ma, 2004), který je ochlazením uveden do gelovitěho stavu. Následně je původní rozpouštědlo nahrazeno rozpouštědlem novým a tím dojde ke vzniku vláknité struktury v neporézním gelu. Poté je u gelu snižována teplota na teplotu tuhnutí druhého rozpouštědla, které je dále odstraněno sublimací za sníženého tlaku. Vzniká tzv. nanovláknenná pěna (Petráš, 2009) (viz obrázek 2 (a)) s vlákny o tloušťce 50 nm až 1 mm podle zvoleného polymeru a rozpouštědla (Ma, 2004). Touto metodou je dosaženo třírozměrné struktury, která by

mohla být vhodná pro kostní tkáňové inženýrství (např. použití PLLA s hydroxyapatitem) (Lu et al., 2013).

Self-assembly

Self-assembly metoda využívá samosprávné organizace určitých molekul do větších struktur, které utváří nanovláknna (Alghoraibi and Alomari, 2018) o průměrech jednotek nm (Lu et al., 2013) až 100 nm na základě nekovalentních vazeb (Alghoraibi and Alomari, 2018) nebo slabších kovalentních vazeb (Lu et al., 2013). Tímto způsobem dochází k tvorbě micelárních tubic, jež utváří vláknitou strukturu (viz obrázek 2 (b)) (Ma, 2004). Tato metoda může být použita pro tvorbu vláknitých proteinů (peptidů), které adsorbují na povrch buněk, kde dochází k jejich pospojování, což poskytne mechanickou podporu pro vytvoření třírozměrné sítě. Samoorganizaci peptidů lze ovlivnit pH a koncentrací solných iontů. Tímto způsobem bylo vytvoření proteinů testováno pro aplikaci v kostním tkáňovém inženýrství (Lu et al., 2013).



Obrázek 2: Princip technologie výroby porózního materiálu technologiemi (a) fázovou separací b) Self-assembly (Wang et al., 2013).

Freeze-drying

Metoda používá zmrazení roztoku polymeru na -70 až -80 °C, který je uložen v komoře za sníženého tlaku, přičemž je zmrzlá voda odstraněna sublimací a je vytvořena třírozměrná vláknitá struktura, přičemž porozita může být regulována tlakem při procesu.

Pro tkáňové inženýrství by mohlo větší vhodnost poskytnout použití vody jako rozpouštědla namísto organických rozpouštědel. (Lu et al., 2013).

Solvent-casting and particulate leaching

Metoda vymývání částic je založena na principu rozpuštění porogenu. K polymeru ve formě roztoku polymeru s rozpouštědlem je vmísen porogen o vhodné velikosti a tvaru částic např. NaCl. Následně je odpařením odstraněno rozpouštědlo a ze ztuhlého polymeru jsou vymyty částice porogenu (Ma, 2004). Vzniká struktura s propojenými póry a porozitou 80 až 90 % (Sola et al., 2019). Velikost pórů může být regulována velikostí částic porogenu, poměrem a výběrem systému polymeru a rozpouštědla. Tvar pórů a jejich propojenost nelze ovlivnit a je náhodná (Ma, 2004).

Centrifugální zvlákňování (Forcespinning)

Jedním z dalších typů zvlákňování polymerních roztoků či tavenin je centrifugální zvlákňování, které umožňuje tvorbu vláken s průměry o velikosti desítek μm za působení odstředivých sil. Zvlákňovací tryska je umístěna ve středu bubnu a rotuje kolem své osy o určitých otáčkách. Pomocí odstředivé síly, která destabilizuje polymerní roztok, jsou produkována vlákna, která jsou zachytávána na vnitřní stěny bubnu. Dochází tak ke tvorbě vláknité struktury s narovnanými souběžně orientovanými vlákny ve směru otáčení (Bin Ding et al., 2019). Morfologie materiálu může být ovlivněna rychlostí rotace hlavy s polymerem, konfigurací trysek či teplotou (Alghoraibi and Alomari, 2018).

Elektrostatické zvlákňování

Princip technologie je založen na zvlákňování z polymerního roztoku nebo taveniny polymeru na podkladovou vrstvu za působení elektrického pole z vysokonapěťového zdroje (Lukáš et al., 2009) o napětí obvykle 10kV, 20kV ale také až 120kV. Pro tvorbu vláken je zapotřebí překonat povrchové napětí zvlákňovaného roztoku/ taveniny, čímž dojde ke tvorbě Taylorova kuželu (Petr Vrbata, 2015) viz obr. 3. Dochází k odpařování rozpouštědla a vlákna nabývají pevného stavu. Následně jsou vlákna v elektrickém poli dlužena a odnášena na podkladové vrstvě a navíjena na odtahový vál,

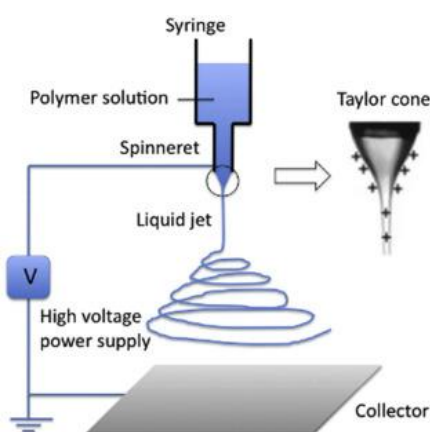
kde tvoří kompaktní, náhodně orientovanou, vlákennou vrstvu s velikostí pórů 20-1000 nm. Vzniklá vlákna mohou být také zpevněna zákrutem, přičemž vzniká nanovlákněná příze (Ratner, 2013). Elektrostatickým zvlákňováním je dosaženo velmi malých průměrů vláken o velikosti v řádu desítek až stovek nm. Tloušťku vláken lze regulovat např. silou elektrického pole, volbou rozpouštědla či koncentrací polymerního roztoku (Lukáš et al., 2009). V oblasti tkáňového inženýrství takto vzniklý vlákenný materiál poskytuje svou třídímenzionální porózní strukturou vhodné podmínky pro buněčnou adhezi a proliferaci a může tak substituovat extracelulární hmotu (Ratner, 2013).

Pro zvlákňování touto technologií je častějším způsob zvlákňování z polymerního roztoku. Může probíhat při RT a proces je tedy méně náročný. Avšak velkou nevýhodou je problematická recyklace organických rozpouštědel, která mohou být toxická a u zvlákněného materiálu je pak problematická jeho sterilizace, tak aby byl vhodný pro biomedicínské aplikace. Za použití polymerní taveniny odpadá krok procesu hledání vhodného rozpouštědla a jeho případná toxicita, ale tato varianta je náročná na podmínky zvlákňování – zejména na teplotu. Ta je požadována dostatečně vysoká pro uvedení zvoleného polymeru do kapalného stavu, tak aby bylo umožněno jeho zvláknění. Vlákna tak na rozdíl od polymerního roztoku nevznikají odpařením rozpouštědla, ale ochlazením během letu na podkladovou vrstvu. Tloušťka vláken zvlákněná z polymerní taveniny bývá vyšší než u vláken zvlákněných z polymerního roztoku a porozita bývá naopak nižší.

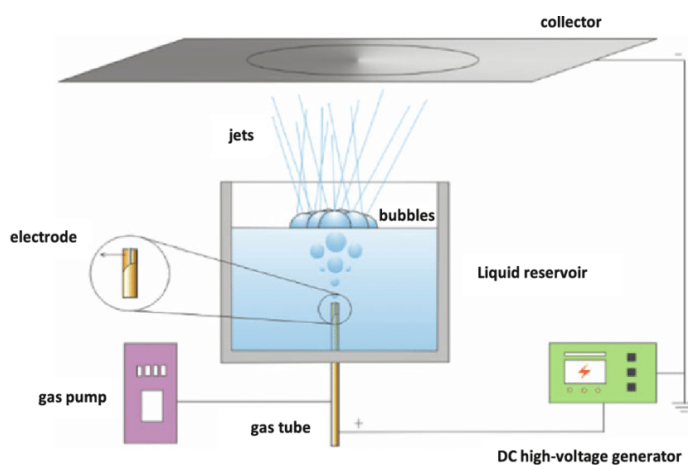
Tloušťku získaných vláken lze ovlivňovat řadou parametrů – zvolením polymeru, rozpouštědla a podmínkami zvlákňování jako jsou teplota (ovlivňuje viskozitu roztoku), vlhkost, vzdálenost kolektoru od zvlákněvaného roztoku (čím větší je jeho vzdálenost, tím vznikají větší průměry vláken v důsledku snižování velikosti elektrického pole, avšak musí být dostatečně vzdálený pro možnost odpaření rozpouštědla). U polymeru je důležitou vlastností jeho vodivost (vyšší vodivost → nižší průměry vláken), molekulová hmotnost polymeru a jeho koncentrace v roztoku (udává viskozitu roztoku – vhodnou viskozitou je rozmezí 800-4000 mPas), což má vliv na povrchové napětí (Petr Vrbata, 2015).

Metody elektrostatického zvlákňování lze rozdělit na jehlové (viz obrázek 3) bez-jehlové zvláknění (viz obrázek 4). Metoda jehlového zvláknění funguje za použití jedné

kapiláry, na které se tvoří jedna polymerní tryska. Produktivita této metody je výrazně nižší než u bez-jehlové metody, kde vzniká velké množství trysek. Princip bez-jehlového zvlákňování je založen na zvlákňování z volné hladiny polymerního roztoku nebo taveniny. Z povrchu strun, válců nebo spirál, které jsou pokryty tenkou vrstvou polymerního roztoku, vzniká velké množství polymerních trysek (Lukáš et al., 2009) a ty tvoří nanovláknennou vlečku, která je unášena působením elektrického pole na podkladový materiál.



Obrázek 3: Schéma jehlového elektrostatičkého zvlákňování (Ghorani and Tucker, 2015).



Obrázek 4: Schéma bez-jehlového elektrostatičkého zvlákňování z volné hladiny (Mohammadzadehmoghadam et al., 2016).

Dále lze technologie rozlišit na stejnosměrné elektrostatičké zvlákňování (DC elektrospinning) a střídavé elektrostatičké zvlákňování (AC elektrospinning). Střídavé elektrostatičké zvlákňování je zprostředkováno střídavým elektrickým polem za použití elektrody, která nepotřebuje kolektor a tím je produktivita mnohem vyšší

než u stejnosměrného zvlákňování. U střídavého elektrického zvlákňování je použito tzv. virtuální proti-elektrody, která je z emitovaných nanovláken. Experimentálně bylo zjištěno, že spotřeba polymerního roztoku je u DC metody bezjehlové až 6krát nižší a u jehlové až 80krát nižší než u AC metody, což souvisí s produktivitou, která je vyšší u střídavého zvlákňování (Lukáš et al., 2009).

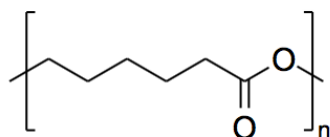
3 Biodegradabilní polymery pro tkáňové inženýrství

V posledních desetiletích jsou intenzivně zkoumány biodegradabilní polymery, především syntetické, pro oblast regenerativní medicíny (Fernández et al., 2012). Biomateriálem může být nazýván materiál, který záměrně interaguje s biologickým systémem za účelem léčby, obnovy tkáně, orgánu nebo funkcí těla. Polymery se dají rozdělit dle původu na polymery přírodního nebo syntetického charakteru. Dále je možné je rozlišit na degradabilní a nedegradabilní. Pro biomedicínské účely se zaměřením na regenerativní medicínu bývají hojně zkoumány polyesterů, které disponují dobrou biokompatibilitou, biodegradabilitou a dalšími požadovanými vlastnostmi (viz kapitola 2). Velkou výhodou biodegradabilních polyesterů je možnost docílit požadovaných vlastností jako je smáčivost materiálu, čas degradace, buněčná adheze, povrchová úprava či modifikace funkčními skupinami (karboxylová, hydroxylová, amino, bromo, chloro skupina, ...) (Tian et al., 2012).

Biodegradabilní polyesterů

Polyesterů nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích zdravotnictví jako jsou chirurgické materiály (chirurgické šicí nitě), materiály pro kontrolované uvolňování léčiv, kostní chirurgii, urologii nebo jako tkáňové nosiče pro tkáňové inženýrství. Kromě níže zmíněných je věnována velká pozornost glykolidu (GL) nebo polyethylen glykolu (PEG) pro možné uplatnění ve tkáňovém inženýrství (Fernández et al., 2012).

Polykaprolakton (PCL)



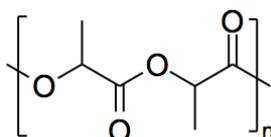
Obrázek 5: Chemická struktura poly-ε-kaprolaktonu

Polykaprolakton (pbrázek 5) je alifatický semikrystalitický polyester, který je získáván polymerizací otevřením kruhu monomerního cyklického kaprolaktonu. PCL vyniká vysokou elasticitou, která může dosáhnout hodnoty prodloužení až 470 %. Pevnost v tahu

je u PCL kolem 23 MPa. Výhodou PCL je jeho rozpustnost ve velkém množství rozpouštědel a jeho dobrá tepelná odolnost, teplota zesklnění je velmi nízká (-62 °C), následně začne měknout kolem 60 °C (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013).

PCL je biodegradabilní polymer, který degraduje hydrolytickým štěpením alifatického lineárního řetězce po dobu celkového rozkladu dvou až tří let (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013), která závisí na molekulové hmotnosti PCL (Woodruff and Hutmacher, 2010). Jeho propustnost pro mnoho léčiv, biokompatibilita a netoxicita umožňuje použití pro postupné uvolňování léčiv. Tento polymer je zkoumán jako možný mikro/nano nosič léčiv (v podobě částic nebo vláken) a je také vhodný jako scaffold pro tkáňové inženýrství (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013).

Kyselina polylactonová (PLA)



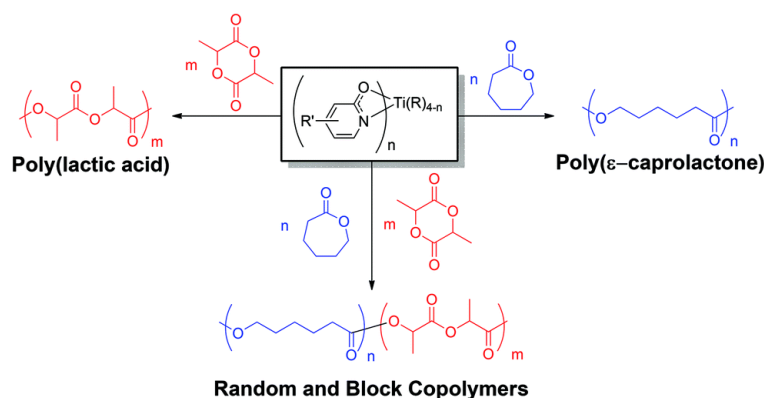
Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny polylactonové

PLA patří do skupiny biodegradabilních polyesterů (i.e. PLA). Monomerem je kyselina mléčná, která je získávána fermentací nebo chemickou syntézou. Kyselina polylactonová (obrázek 6) může nabývat dvou konfigurací – L-forma (PLLA) a D-forma (PDLA) (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013) nebo může být PDLLA, kdy se v řetězci objevuje L-forma i D-forma (Gierej, et al. 2019). PLA vzniká bakteriální fermentací karbohydrátů. Proces zahrnuje použití bakterií druhu *Lactobacillus delbrueckii*, *L. amylophilus* a další, vhodné pH v rozmezí 5,4 - 6,4, teplotu kolem 38-42 °C a nízkou koncentraci kyslíku. Pro výrobu PLA je používána především čistá kyselina L-mléčná polymerizací za otevření kruhu, kdy je dosaženo vysoké molekulové hmotnosti (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013).

PLA disponuje dobrými mechanickými vlastnostmi, tahovou pevností s modul kolem 4,8 GPa (o 200 % vyšší než u PCL) a je netoxická. Teplota skelného přechodu nastává při teplotě 60-65 °C a teplota tání kolem 175 °C (Todo and Takayama, 2011). Kyselina polylactonová degraduje hydrolyticky (Grafahrend et al., 2011, Todo and Takayama, 2011).

Ve zdravotnictví byla kyselina polymléčná prvně použita jako obvazový materiál v kombinaci s polyglykolidem (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013). Svou biokompatibilitou a biodegradabilitou se PLA ukázala jako vhodný biomateriál (Todo and Takayama, 2011). a byla schválena jako bezpečný materiál FDA (United State Food and Drug Administration) pro nosné aplikace v oblasti ortopedie, neurologie a určená k orálnímu podání (Ghanbarzadeh and Almasi, 2013).

Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu (PLCL)



Obrázek 7: Schéma syntézy kopolymeru PLCL (Gilmour et al., 2015)

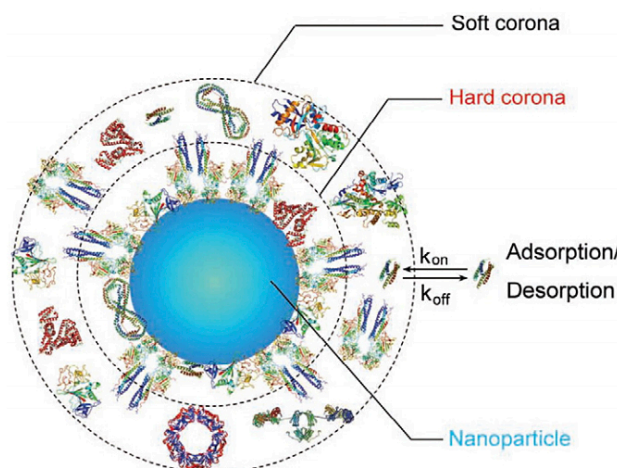
PLLA je velmi dobře vstřebatelná, má vysoký stupeň elasticity a vysokou teplotu zesklenní. Tyto vlastnosti lze ovlivnit tvorbou blendu nebo kopolymeru s polymerem o nižší teplotě zesklenní jako je PCL s T_g -60 °C. Různým poměrovým zastoupením obou polymerů lze dosáhnout požadovaných mechanických vlastností kopolymeru a také lze ovlivnit čas degradace. Kopolymerizací PLLA a PCL může vzniknout blokový řetězec (diblok, triblok, multiblok) nebo statistický řetězec (náhodné uspořádání monomerních jednotek polymerů PLA a PCL v řetězci). Z pravidla bývá v PLCL vyšší podíl PLA složky (Fernández et al. 2013). Vzniká polymerizací za otevření kruhu v možných různých poměrech PLA:PCL např. 90:10, 80:10, 75:25, 70:30. Nejvyšší molekulové hmotnosti a výtěžnosti je docíleno při teplotách 130°C a 140°C. Při teplotách nižších hůře reaguje PCL složka a při teplotách vyšších mají nižší efektivitu katalyzátory, čímž je dosaženo nižší molekulové hmotnosti výsledného kopolymeru (Fernández et al. 2013).

4 Vliv proteinů na buněčnou interakci s materiálem

Proteiny jsou považovány za hlavní zprostředkovatele interakce mezi buňkou a materiálem. Proteiny poskytují materiálu tzv. biologickou identitu. Míra biologické identity závisí na fyziologických reakcích jako jsou signály, transport látek, kumulace proteinů a určení cytotoxicity. Buňky obtížněji interagují s materiálem tělu cizímu, proto je míra úspěšnosti interakce proteinů i buněk dána biokompatibilitou materiálu. Na více hydrofobních površích je vyvolána adsorpce proteinů, jejichž množství klesá se zvyšujícím se počtem OH skupin v řetězci polymeru. Větší množství hydroxylových skupin v řetězci brání formaci proteinů na materiálu. Pro adsorpci proteinů je vhodná smáčivost materiálů s kontaktním úhlem vyšším než $60-65^\circ$ (Salmerón-Sánchez a Altankov, 2010, Wei et al., 2014). V různých místech lidského organismu se vyskytují odlišné komplexy proteinů, které interagují s implantovaným materiálem svou unikátní cestou. První v kontaktu s implantátem bývá obvykle krev. Plasma, nacházející se v krvi, obsahuje přes 1000 proteinů a každý z těchto proteinů může potencionálně interagovat s materiálem. Po vložení nanomateriálu do těla se difúzně nebo spontánně, při vhodných termodynamických podmínkách, adsorbuje velké množství volných proteinů. Následně se utváří vrstva proteinů na povrchu materiálu, která je nazývána proteinová korona. Proteinovou koronu určuje její tloušťka, hustota, složení (druhy a množství jednotlivých proteinů), konformace proteinů a afinita proteinů k materiálu. Její struktura a složení souvisí s druhem materiálu (vliv morfologie, chemické struktury, ...) a místu aplikace v těle (Walkey and Chan, 2012). Neexistuje univerzální komplex proteinů, který by umožnil vytvoření proteinové korony na jakémkoliv druhu materiálu, avšak obvykle obsahuje hojně zastoupených 2-6 druhů proteinů, přičemž tři nejpočetněji se vyskytující tvoří až 56 % celkového množství adsorbovaných proteinů. Během adsorpce dochází ke konformačním změnám proteinů, které souvisí s morfologií materiálu a chemickou strukturou materiálu a proteinů. Proteiny, které tvoří s materiálem silné nevazebné interakce – vodíkové můstky, mají vyšší vazebnou energii a jsou obvykle méně ochotné desorbovat z materiálu a měnit svou konformaci během procesu adsorpce na materiál (Walkey and Chan, 2012).

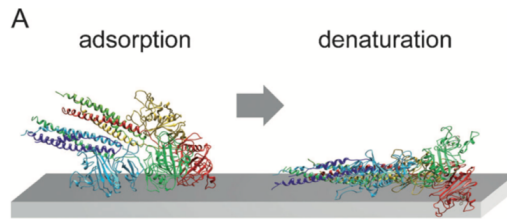
Kromě interakce mezi proteiny a materiálem dochází i k interakcím mezi samotnými proteiny, kde je rozlišována tzv. měkká korona (soft corona) a tvrdá korona (hard corona). Tvrdá korona je tvořena silně vázanými proteiny, které mají vysokou afinitu k materiálu.

Proteiny se zde adsorbují v řádu sekund a desorbují až osm hodin. Měkkou koronu tvoří slabě vázané proteiny, které adsorbují minuty až hodiny a desorbují v řádu minut. Měkká korona má nižší afinitu k materiálu, což je dáno slabšími vazebnými interakcemi s materiálem než u tvrdé korony. Existuje více hypotéz o měkké a tvrdé koruně a jejich interakcích s materiálem. Jedna tvrdí, že proteiny tvrdé korony přímo interagují s povrchem materiálu, zatímco měkká korona interaguje s tvrdou korunou slabě přes protein-protein interakce. Další hypotézou je, že proteiny měkké i tvrdé korony mohou přímo interagovat s materiálem s rozdílnými vazebnými energiemi. Celkové množství adsorbovaných proteinů zůstává přibližně konstantní, ale může se měnit množství jednotlivých typů zastoupených proteinů nebo se mohou měnit druhy adsorbovaných proteinů v čase (Walkey and Chan, 2012).



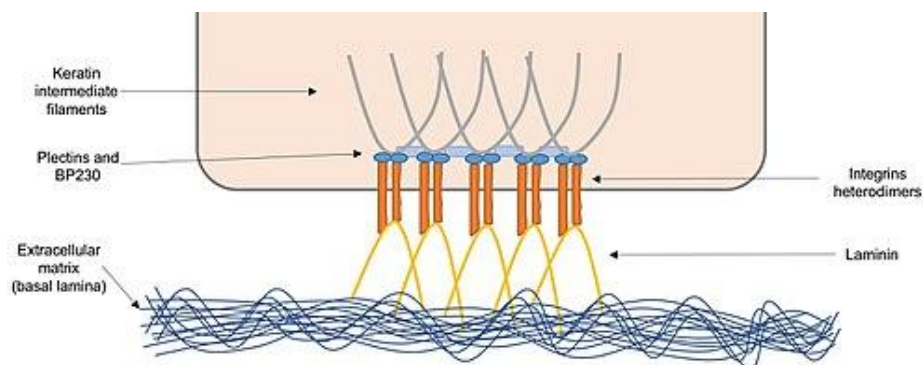
Obrázek 8: Znárodnění měkké a tvrdé korony adsorbovaných proteinů na nanočástici (Cia., 2017)

Biologickou odpověď organismu určují adsorbované proteiny na materiálu a potvrzují tím vhodnost/ nevhodnost materiálu pro buněčnou adhezi a spouští enzymatickou kaskádu. Dle studií na nanomateriály nejvíce adsorbují proteiny Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-IV, Apolipoprotein C-III, Clusterin, Fibrinogen, Ig gamma chain, Ig light chain, Serum albumin. Po adsorpci proteinu na povrch materiálu může dojít k jeho denaturaci, která způsobuje negativní buněčnou odezvu – špatnou adhezi a proliferaci. Denaturace je proces, při němž dochází k rozpadu struktury proteinu nebo prostorové konfigurace proteinů a tím ke změně jejich funkce a následné další interakce s okolím (viz obrázek 9) (Salmerón-Sánchez a Altankov, 2010).



Obrázek 9: Znárodnění rozpadu struktury proteinu způsobenou jeho denaturací (Wei et al., 2014).

Interakce mezi buňkami a materiálem představuje několik dílčích kroků jako jsou adsorpce proteinů na povrch materiálu, následná buněčná adheze a posléze buněčná proliferace. Klíčovou roli hraje koncentrace, distribuce a pohyblivost proteinové vrstvy na povrchu materiálu. Buňky rozeznávají tyto proteiny přes integrinové receptory, které se nachází v buněčné stěně. Po interakci integrinů s proteiny buňky začínají adherovat. Supramolekulární komplex se strukturálními proteiny (alfa-actinin, vinculin, talin) a signály (paxilin, Src, FAK) napomáhá buňkám adherovat na povrch materiálu a spouští buněčnou odpověď (viz obrázek 10). Pokud je odezva přes integrinové receptory negativní, může dojít k nádorovému buněčnému bujení. Při Interakci mezi buňkou a materiálem v *in vivo* podmínkách dochází k obousměrným a dynamickým procesům. Buňky ve tkáni neustále přijímají informace, dělí se a často mění svou formaci. Hodně druhů buněk se hůře adaptuje na *in vitro* podmínky a hůře přežívají mimo komplexní organismus. Po implantaci cizího materiálu do těla může dojít ke špatné interakci s buňkami z důvodu nedostatku extracelulární hmoty (ECM). Buňky v *in vivo* potřebují odlišné fyzikálně chemické signály z okolí ECM než v těle. Důležitým parametrem jsou také mechanické vlastnosti. Na tužším materiálu mohou buňky hůře adherovat a proliferovat a je pro ně biokompatibilita obtížnější (Salmerón-Sánchez a Altankov, 2010).



Obrázek 10: Schéma interakce mezi buňkou, proteiny a extracelulární hmotou.

Experimentální část

Cílem této diplomové práce je sledování vlivu morfologie a smáčivosti mikro/nanovlákných polyesterových materiálů na adsorpci proteinů a buněčnou adhezi a proliferaci. Pro testování byly použity vláknenné materiály z čistých polymerů a jejich blendy, které byly připraveny pomocí elektrostatického zvlákňování. Materiály byly hodnoceny z hlediska morfologie metodou měření průměrů vláken. Dále byla měřena smáčivost materiálů. Materiály byly analyzovány z hlediska adsorpce proteinů za použití hovězího sérového albuminu (BSA) a následně z hlediska buněčné adheze a proliferace. Zkoumáno bylo množství silně vázaných proteinů na jednotlivých materiálech metodou SDS-PAGE elektroforézou a fluorimetricky metodou Quant-iT proteinů assay kit a slabě vázané proteiny spektrofotometrickou metodou podle Bradforda. Buněčné testování probíhalo ve čtyřech testovacích dnech za použití 3T3 myších fibroblastů. Buněčná viabilita byla hodnocena na testovaných materiálech metodou CCK. Adheze a proliferace buněk byla zkoumána elektronovou skenovací mikroskopií a fluorescenční mikroskopií. Experimentální část práce se zabývá metodikou testování, získanými výsledky a následnou diskuzí. Dosažené výsledky jsou diskutovány z pohledu vzájemných souvislostí interakce mezi materiálem, proteiny a buňkami.

5 Materiály a metody

Pro testování byla zvolena sada vlákných polyesterových materiálů popsána v tabulce 2.

Tabulka 2: Použité polyesterové biodegradabilní polymery

Polymer	Označení	Výrobce
Polycaprolacton (Mw 45 000)	PCL45	Sigma Aldrich
Polycaprolacton (Mw 80 000)	PCL80	Sigma Aldrich
Poly(lactide-co-ε-caprolactone)	PLCL	Purasorb
Kyselina polymléčná	PLA	Corbion Purac Biomaterials

Tabulka 3: Použité přístroje pro zvolené metody testování

Přístroj	Použití	Výrobce
Quorum Q150R ES	pozlacení vzorků pro SEM	Quorum Technologies Ltd.
Force Tensiometer K12	měření smáčivosti materiálů	Krüss GmbH
Anprolene AN74i	sterilizace materiálů	H.W.Andersen Products, Ltd.
PS-3D Sunflower Mini-Shaker	automatická míchačka	Biosan Ltd.
Centrifuge 5415 C	(SDS-PAGE)	Eppendorf AG
Spark Multimode Microplate Reader	CCK, Bradfordova m., Quant-iT protein assay kit	Tecan Trading AG
EVE	automatické počítání buněk	NanoEntek Bio-Technology (Beijing) Ltd.
Vega 3 SB – EasyProbe	SEM	Tescan Orsay Holding, a.s.
Nikon Eclipse TI	fluorescenční mikroskopie	Nikon Instruments Inc.
Mini-PROTEAN Tatra Cell	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Azure c600 Imaging System	focení gelů SDS-PAGE	Azure Biosystems, Inc.

Tabulka 4: Programy použité pro zpracování výsledků získané z testování

Programy	Použití	Společnost
NIS Elements	měření průměrů vláken	Nikon Instruments Inc.
Microsoft Excel Verze 16.37	statistické zpracování dat průměrů vláken, měření smáčivosti a in vitro testování	Microsoft s.r.o.
Adobe Photoshop CC 2018	zpracování mikroskopických snímků	Adobe Inc.
Krüss Laboratory Desktop	měření smáčivosti	Krüss GmbH

Tabulka 5: Použité chemikálie a média

Název	Výrobce
Bradfordovo činidlo	Fisher Scientific
BSA	Sigma Aldrich
Bromfenolová modř	Amresco
CCK	Dojindo

Chlorid sodný	Penta
Chlorid draselný	Penta
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth
DAPI	Sigma Aldrich
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Penta
DMEM	Biosera
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	Penta
Ethanol 96,8 %	Penta
FBS	Biosera
Glutamin	Biosera
Glycerol	
Glycin	VWR
Kyselina octová	Penta
Methanol	Penta
Phalloidin	Sigma Aldrich
PEN/STREP Amphotericin B	Lonza
Protein MW Marker, Wide Range K494	Amresco
SDS	Sigma Aldrich
TRIS	Amresco
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypanová modř	
Trypsin	Biotech
β-merkapt ethanol	Roth
2,5 % glutaraldehyd	Sigma Aldrich
30 % akryl-bisakrylamid mix	Amresco

Tabulka 6: Použité roztoky

Metoda	Název	Složení	Poznámka
	PBS	800 ml dH ₂ O 8 g NaCl 0,2 g KCl 3,63 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 0,24 g KH ₂ PO ₄	
Interakce s proteiny	Roztok pro adsorpci proteinů	50 mg BSA 1 ml PBS	
	Roztok pro desorpci silně vázaných proteinů	1 g SDS 100 ml PBS	
SDS – PAGE	CBB barvicí roztok	400 ml dH ₂ O 450 ml metanol 100 ml kyselina octová 2,5 g CBB R-250	
	CBB odbarvovací roztok	400 ml dH ₂ O 450 ml metanol 100 ml kyselina octová	
	Running buffer	800 ml dH ₂ O 10 g SDS 30,3 g TRIS 144,1 g Glycin	
	Sample buffer	10 ml 1,5M TRIS-HCl (pH 6,8) 12 ml 10 % SDS 30 ml glycerol 15 ml β-merkapt ethanol 1,8 mg bromfenolová modř	
	Sušící roztok	370 ml dH ₂ O	

		450 ml metanol 100 ml kyselina octová 30 ml glycerol	
	Tris 1,5 M, pH 8,8	18,17 g Tris 80 ml dH_2O upraveno pH na hodnotu 8,8 pomocí HCl	doplnit do 100 ml dH_2O
	Tris 1,5 M, pH 6,8	18,17 g Tris 80 ml dH_2O upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí HCl	doplnit do 100 ml dH_2O
	Vzorkový pufr	10 ml 1,5M Tris (pH 6,8) 6 ml 20 % SDS 30 ml glycerolu 15 ml β -merkaptetanolu 4 mg bromfenolové modře	
	5 % gel pro SDS-PAGE	5,5 ml dH_2O 1,3 ml 30 % akryl-bis akrylamid 1 ml 1,5M TRIS (pH 6,8) 0,08 ml 10 % SDS 0,08 ml ammonium persulfate 0,008 ml TEMED	
	10 % gel pro SDS-PAGE	7,9 ml dH_2O 6,7 ml 30 % akryl-bis akrylamid 15 ml 1,5M TRIS (pH 8,8) 0,2 ml 10 % SDS 0,2 ml ammonium persulfate 0,008 ml TEMED	
	10 % SDS	10 g SDS 90 ml dH_2O	doplnit do 100 ml dH_2O
	10 % amonumpersulfát	1 g APS 8 ml dH_2O	doplnit do 100 ml dH_2O
Kultivace buněk	DAPI working solution	ředění 1: 1000	zásobní roztok 20 mg/ ml
	Kompletní kultivační sérum	DMEM + 10 % FBS, 1 % glutamin, 1 % PEN/STREP Amphotericin B	

5.1 Morfologie materiálů

Pro hodnocení morfologie materiálů byla zvolena metoda měření průměrů vláken ze snímků pořízených na skenovací elektronovém mikroskopu. Na kovový terčík byla připevněna oboustranná lepicí páska a na ni byl pomocí pinzety umístěn vzorek materiálu o přibližných rozměrech 5x5 mm. Takto připravený terčík byl vložen do zlatičky (viz obrázek 11), kde byla nanášena tenká vrstva zlata (10 nm). Pozlacený terčík byl umístěn do komory SEM (skenovacího elektronového mikroskopu) a následně byly pořízeny snímky o různých zvětšeních (500x, 1000x, 3000x, 5000x) za použití napětí 10-20 kV. Snímky byly dále zpracovávány v programu NIS Elements, kde byly naměřeny průměry vláken. Na řadě snímků od každého materiálu bylo naměřeno celkem tři sta

náhodných průměrů vláken, které byly statisticky zpracovávány. Byly zjišťovány průměrné hodnoty velikosti průměrů vláken, četnosti dle množství průměrů vláken jednotlivých materiálů a doplněny byly další statistické údaje.



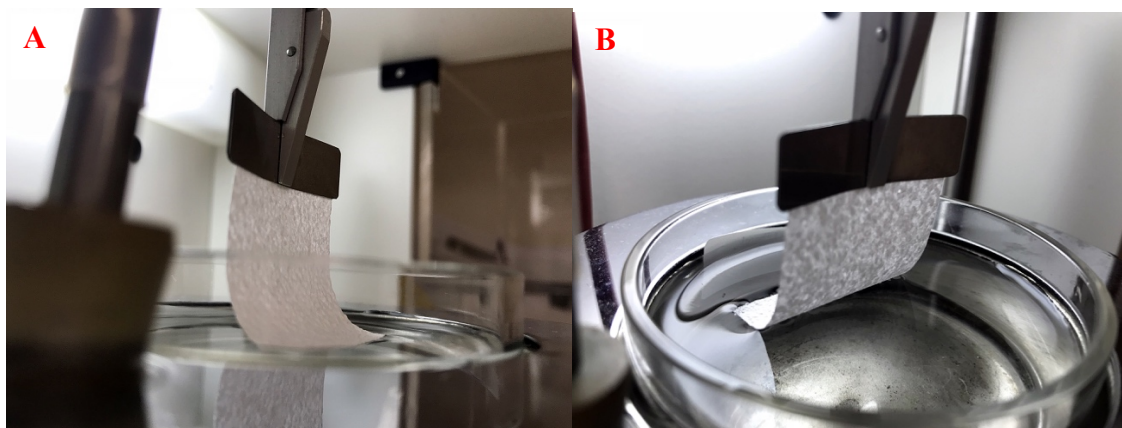
Obrázek 11: Komora zlatičky s vloženým terčíkem s vzorkem materiálu PCL45

5.2 Smáčivost materiálů

Další sledovanou charakteristikou materiálů byla smáčivost materiálů, která byla měřena na mikrotensiometru K12 s cílem zjištění hmotnostního přírůstku vzorku v závislosti na čase. Jedná se o princip vztlínání kapaliny do porézního pevného materiálu. Přístroj také umožňuje měření povrchového a mezi povrchového napětí kapalin, kritické micelární koncentrace a odhad kontaktního úhlu na pevných látkách, vláknech či prášcích.

Pro testování byly připraveny vzorky od všech materiálů o rozměrech 3x4 cm. Vzorek byl upevněn do čelistí zařízení, které byly umístěny nad kádinku s kapalinou – v tomto případě s vodou. Nutné bylo odaretování vah přístroje, na nichž byl upevněn testovaný vzorek. Kádinka s tekutinou byla posunuta do výšky co nejbližší k testovanému vzorku, ale zároveň tak, aby nedošlo k jeho smočení. Poté mohlo být na počítači zpuštěno samotné měření vztlínání kapaliny do kapilár materiálu. Kádinka s vodou se přibližovala ke vzorku, dokud nedošlo ke smočení jeho spodní hrany vodou (viz obrázek 12). V okamžiku smočení se kádinka zastavila a bylo měřeno vztlínání vody do materiálu.

Zároveň v programu propojeném s přístrojem vznikal ilustrativní graf zvyšující se hmotnosti vzorku důsledkem pronikání kapaliny do porézní struktury materiálu v závislosti na čase. Data byla dále statisticky zpracovávána.



Obrázek 12: Testování smáčivosti vzorku vodou na přístroji tensiometr K12: pohled z boku (A) a pohled z předu (B) přístroje.

5.3 Adsorpce proteinů

Koncentrace vázaných proteinů byla zkoumána pomocí adsorpce BSA na povrchu materiálů. Pro zjištění množství adsorbovaných proteinů byly analyzovány roztoky slabě vázaných proteinů získaných z oplachu vzorků a silně vázaných proteinů získaných pomocí desorpčního činidla. Pro analýzu adsorbovaných proteinů byly použity tři metody. Slabě vázané proteiny byly zkoumány spektrofotometrickou metodou podle Bradforda. Tato metoda udává kvantitativní vyhodnocení množství slabě vázaných proteinů v testovaném roztoku. Roztoky silně vázaných proteinů získaných desorpceí pomocí 1 % SDS byly analyzovány separační metodou SDS-PAGE elektroforézou, která separativně odděluje jednotlivé molekuly proteinů v závislosti na jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Další metodou pro zjišťování množství silně vázaných proteinů je fluorescenční metoda Quant-iT protein assay kit.

5.3.1 Příprava roztoků slabě a silně vázaných proteinů pro analýzu jejich adsorpce na materiálech

Od každého materiálu bylo nastříháno 5 vzorků o rozměrech 2 x 2 cm a každý vzorek byl následně zvážen. Ke 4 vzorkům od každého materiálu byl přidán 1 ml roztoku BSA v PBS o koncentraci 50 mg/ ml pro adsorpci proteinů na povrch materiálu. K pátému vzorku, sloužícímu jako negativní kontrola, byl přidán 1 ml čistého PBS. Vzorky byly inkubovány po dobu jedné hodiny při 37 °C. Každý vzorek byl následně opláchnut v 1 ml PBS. Tyto roztoky obsahují proteiny, které jsou na materiálech jen slabě vázané. Opláchnuté vzorky byly poté vloženy do desorpčního roztoku (s obsahem 1 % SDS v PBS), který na proteiny působí jako denaturační činidlo, a byly inkubovány jednu hodinu při RT. V tomto roztoku se silně vázané proteiny desorbují z povrchu materiálu. Poté byly materiály vyjmuty z desorpčního roztoku a roztoky slabě a silně vázaných proteinů byly dále analyzovány.

5.3.2 Metoda podle Bradforda

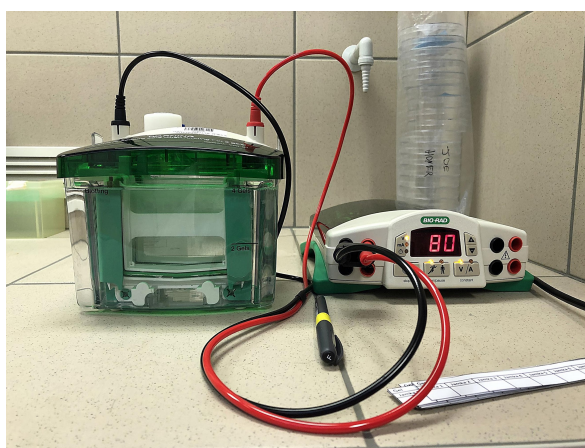
Metoda podle Bradforda spočívá v interakci proteinů s barvivem CBB v kyselém prostředí. Po navázání barviva na proteiny dochází ke změně barvy roztoku z červeno-hnědé na modrou. Tím dochází k posunu absorpčního maxima CBB z 465 nm na 610 nm, přičemž ideální vlnovou délkou pro měření je 595 nm.

Pro testování bylo použito Bradfordovo činidlo a zásobní roztok BSA (50 g/ ml) na objem 1 ml. Ze zásobního roztoku byly do mikro zkumavek připraveny sestupné koncentrace zásobního roztoku v PBS (1 mg/ ml, 0,75 mg/ ml, 0,5 mg/ ml, 0,25 mg/ ml a 0 mg/ ml) pro sestavení kalibrační křivky. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo přidáno 250 μ l Bradfordova činidla a následně 5 μ l vzorku. Z roztoků slabě vázaných proteinů byly analyzovány vždy 4 vzorky s proteiny a 1 vzorek NC od každého materiálu. Následně byly vzorky inkubovány po dobu deseti minut při RT. Poté byla měřena absorbance jednotlivých jamek na spektrofotometru při vlnové délce 595nm. Data byla dále statisticky zpracována. Pomocí vzniklé kalibrační křivky a získané rovnice křivky byly dopočítány koncentrace proteinů ve vzorcích jednotlivých materiálů.

5.3.3 SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE elektroforéza je separační metoda založena na principu rozdělení směsi proteinů na základě jejich velikosti v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS. Jsou tvořeny bandy, jejichž pozice a tloušťka určuje množství a molekulovou hmotnost proteinů v porovnání s použitým markerem o známých molekulových hmotnostech.

Ke vzorkům byl vždy přidán vzorkový pufr v poměru 1:1, čímž došlo k denaturaci proteinů při zahřátí na 95 °C. Pomocí dvojice skel byl připraven polyakrylamidový gel, který se skládal ze dvou částí zaostřovacího (horní) 5 % a separačního (dolní) 10 % gelu dle tabulky 6, a v něm vytvořeny jamky pomocí hřebínku. Skla s gely byly následně umístěny do nádoby přístroje (viz obrázek 13). Do volných prostor vaničky byl nalit running buffer (cca 500 ml), tak aby byla elektroda ponořena. Do jamek gelu bylo přidáno 5 μ l markeru proteinů K494-500uL a po 15 μ l vzorků od každého materiálu (3 vzorky s proteiny + 1 NC). Elektrody byly připojeny ke zdroji a byla zpuštěna samotná elektroforéza na 15 minut s napětím 80 V po dobu průchodu vzorků skrz separační gel a poté bylo napětí zvýšeno na 120 V po dobu cca jedné hodiny. Následovalo obarvení proteinů v gelech pomocí barvicího roztoku s CBB (viz tabulka 6), do kterého byly gely umístěny a dány na automatickou míchačku do následujícího dne. Z barvicí lázně byly gely přemístěny do odbarvovacího roztoku (viz tabulka 6). Odbarvování probíhalo, dokud na gelech nezůstaly obarvené pouze bandy proteinů. Poté byly gely nafoceny pomocí dokumentačního přístroje Azure (viz obrázek 14) a přes noc vloženy do sušícího roztoku. Získané gely se vzniklými bandy byly opticky hodnoceny.



Obrázek 13: Snímek zařízení určeného pro SDS-PAGE elektroforézu.



Obrázek 14: Přístroj Azure c600 pro dokumentování gelů z SDS-PAGE.

5.3.4 Quant-iT Protein Assay Kit

Metoda Quant-iT Protein Assay Kit je fluorescenční spektrometrická metoda, pomocí které se kvantifikuje koncentrace proteinů v testovaných roztocích. Koncentrace jsou zjišťovány za pomoci použité kalibrační křivky, z jejíž rovnice jsou hodnoty dopočítávány. Získané hodnoty je možné přepočítat na hmotnost testovaného vzorku.

Roztoky se silně vázanými proteiny byly 10x naředěny v PBS pro umožnění měření touto metodou. Poté byl připraven pracovní roztok v poměru 1:200 (činidlo Quant-iT: pufr). Do 96 jamkové destičky bylo přidáno po 200 μl pracovního roztoku a 10 μl jednotlivých vzorků (roztoky silně vázaných proteinů) + 1 NC od každého materiálu. Pro kalibrační křivku bylo do destičky dáno rovněž po 200 μl do osmi jamek a vzestupně přidáno po 10 μl různých koncentrací BSA (0 ng/ μl , 25 ng/ μl , 50 ng/ μl , 100 ng/ μl , 200 ng/ μl , 300 ng/ μl , 400 ng/ μl , 500 ng/ μl). Následovalo měření na spektrofotometru při vlnových délkách 470 nm a 570 nm. Z naměřených dat byla sestrojena kalibrační křivka. Ze získaných dat vzorků byly dopočítány koncentrace za pomoci vzniklé rovnice kalibrační křivky. Dopočítané výsledné hodnoty koncentrací proteinů byly přepočítány na 1 g testovaných vzorků a dále statisticky zpracovány v programu Excel. (Pozn.: Provedena byla dvě měření z týchž vzorků roztoků po desorpci jednotlivých materiálů, které byly zpracovány do grafů viz příloha D).

5.4 *In Vitro* testování

Pro buněčné testování byla zvolena linie 3T3 (myší embryonální fibroblasty). Testování probíhalo po dobu 14 dní, přičemž byly 4 odběrové dny – 1., 3., 7. a 14. od nasazení buněk na testované materiály. Pro hodnocení buněčné viability byl zvolen metabolický test CCK. Z každého odběrového dne byla pořízena řada snímků pomocí skenovací elektronové mikroskopie a fluorescenční mikroskopie, kdy byla zkoumána proliferace buněk na materiálech.

5.4.1 Příprava materiálů pro kultivaci buněk

Z jednotlivých materiálů bylo připraveno 8 vzorků - 4 vzorky pro metabolický test, 2 vzorky pro fluorescenci, 1 vzorek pro SEM + 1 určený pro NC (materiál s čistým kultivačním médiem). Materiály bylo zapotřebí sterilizovat. Sterilizace probíhala za působení ethylenoxidu po dobu 12 hodin při teplotě 37 °C. Po sterilizaci bylo potřeba materiál dva týdny odvětrat pro odstranění toxických reziduí při RT. Sterilní materiály byly vloženy do 24 jamkových mikrotitračních destiček, přičemž každá destička byla určena pro jeden odběrový den. Materiály byly opláchnuty PBS a zatěžkány skleněnými kroužky pro zamezení pohybu materiálu. Skleněné kroužky byly také vloženy do jamek určených pro pozitivní kontrolu (buňky nasazené na plastik bez materiálu).

5.4.2 Příprava buněčné suspenze a nasazení buněk na materiály

Buňky byly rozmrazeny z kryogenního stavu ve vodní lázni při teplotě 37 °C a resuspendovány v 15 ml kultivačního média DMEM, které bylo předehřáto rovněž na 37 °C v kultivační láhvi. Buňky s médiem byly umístěny do CO₂ inkubátoru při 37 °C. Následovalo pasážování buněk, které probíhá při 70-80 % buněčné konfluenci dna kultivační láhve. Nejprve bylo odsáto dosavadní kultivační médium od adherovaných buněk na plastiku. Poté byly buňky opláchnuty pufrem PBS, opláchnuty trypsinem a po opětovném přidání trypsinu byla kultivační lahve inkubována po dobu 5 minut v inkubátoru. Působením trypsinu se buňky uvolnily ode dna kultivační lahve a následně bylo přidáno 5 ml čistého média. Z roztoku buněčné suspenze a trypanové modři v poměru 1:1 byl spočítán aktuální počet živých buněk v suspenzi za pomoci automatické

počítačky buněk EVE™. Buněčná suspenze byla následně zředěna kultivačním médiem na požadovanou finální koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/ ml.

Do každé jamky mikrotitrační destičky s materiály, s výjimkou negativních kontrol (čisté médium bez buněk), a jamek určených pro pozitivní kontrolu bylo přidáno po 1 ml připravené buněčné suspenze a destičky byly umístěny do CO₂ inkubátoru při 37 °C.

5.4.3 Testování buněčné viability pomocí CCK-8 testu

Pro testování buněčné viability byla zvolena metoda CCK za použití 10 % roztoku CCK v kultivačním médiu. Tento roztok obsahuje vysoce rozpustnou tetrazoliovou sůl, která je buňkami redukována za vzniku formazanového barviva žluté barvy, které je rozpustné ve vodném prostředí. Množství formazanového barviva, produkovaného aktivitou buněk, je přímo úměrné počtu živých buněk. Citlivost detekce CCK-8 je vyšší než u ostatních tetrazoliových solí, jako je např. metabolický test MTT [Takanezawa, 2016].

Při každém odběrovém dni, 1., 3., 7. a 14. den od nasazení buněčné suspenze na materiál, byly z kultivačních jamek odebrány zatěžkávací kroužky. Jednotlivé vzorky, počínaje negativními kontrolami, byly přemístěny do jamek čisté mikrotitrační destičky. Ke každému vzorku a pozitivním kontrolám bylo přidáno 500 µl připraveného roztoku CCK. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 3 hodin při 37 °C v CO₂ inkubátoru. Po inkubaci bylo přeneseno 200 µl roztoku z jamek inkubované destičky do nové 96 jamkové mikrotitrační destičky (v případě potřeby byly vzorky ředěny, aby bylo možné naměření jejich absorbance a hodnoty zpětně násobeny dle použitého ředění). Takto připravená destička byla vložena do spektrofotometru, kde byla měřena absorbance roztoku při vlnové délce 450 nm, která je přímo úměrná buněčné viabilitě (životaschopnosti). Výsledky byly statisticky zpracovány a vyhodnocovány v programu Excel, kde byly dopočítávány průměrné hodnoty absorbancí testovaných materiálů se směrodatnými odchylkami v jednotlivých odběrových dnech.

5.4.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie umožňuje vizuální pozorování buněčné adheze a proliferace na materiálech díky jejich obarvení fluorescenčními barvivy. V této práci byly použity barviva Phalloidin a DAPI. Obarvením je možné pozorovat rozprostření buněk na materiálu, jejich shlukování či tvar buněk.

Z mikrotitrační destičky s buňkami adherovanými na materiálech bylo odsáto médium. Následoval 2x oplach v PBS. Po druhém oplachu PBS byly materiály přemístěny do nové sterilní destičky a bylo přidáno přiměřené množství 2,5 % glutaraldehydu (přibližně 1 ml) po dobu 15 minut při teplotě 4 °C pro docílení fixace buněk. Poté byly vzorky 2x opláchnuty PBS a byl přidán roztok 0,1 % BSA + 0,1 % Triton X-100 v PBS po dobu 5 minut při RT pomocí něhož byla permeabilizována buněčná membrána. Vzorky byly opět promyty roztokem PBS a barveny roztokem Phalloidinu. Dále byla destička inkubována za nepřístupu světla, pro docílení správného obarvení buněk, po dobu 30 minut při RT. Po obarvení byl roztok odsát, vzorky byly promyty roztokem PBS a následovalo barvení roztokem DAPI working solution (tabulka 6), které působilo dalších 5 minut ve tmě při RT. Fluorescenční barvivo DAPI obarvilo buněčná jádra. Posledním krokem byl 2x oplach v PBS. Vzorky zůstaly ponořeny v dostatečném množství PBS v jamkách mikrotitrační destičky a na fluorescenčním mikroskopu byly pořízeny snímky obarvených buněk.

5.4.5 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie je založena na principu odrazu dopadajících paprsků na zkoumaný povrch. Vzniklý obraz je tvořen sekundárním signálem svazků elektronů. Podle charakteru povrchu se mění úroveň signálu a je tvořen výsledný obraz.

Od materiálů s adherovanými buňkami bylo odsáto médium a byly dvakrát opláchnuty PBS. Do nové destičky byly přemístěny materiály a ke každému byl přidán 1 ml 2,5 % glutaraldehydu, který působil 15 minut při teplotě 4 °C. Roztok glutaraldehydu byl odsát, vzorky byly promyty v PBS a poté byla použita vzestupná ethanolová řada pro odvodnění vzorků od nejnižší po nejvyšší koncentraci ethanolu (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %). Každá ethanolová koncentrace působila na vzorky 10 minut, pak byla odsáta a přidána koncentrace vyšší. Po působení poslední 100 % koncentrace ethanolu byly

vzorky přemístěny z destičky na parafilm. Po uschnutí byly ustříženy dva malé vzorky z každého kruhového vzorku a připevněny (každý vzorek jinou stranou pro zamezení špatného nalepení a tím nemožnost vyfocení buněk) na oboustrannou lepící pásku, která byla připevněna ke kovovému terčíku určeného pro elektronovou mikroskopii. Terčík byl s materiálem umístěn do komory zlatičky a byla nanesena tenká vrstva zlata (10 nm). Takto připravený vzorek byl vložen do komory elektronového mikroskopu, kde byla pořízena řada snímků s různým zvětšením (500x, 1000x, 3000x, 5000x) za použití napětí 20 kV.

6 Výsledky a diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zjišťování vlivu chemického složení a morfologie polyesterových vlákenných materiálů na adsorpci proteinů a buněčnou adhezi a proliferaci. Pro hodnocení morfologie materiálů byla použita metoda měření průměrů vláken ze snímků pořízených skenovací elektronovou mikroskopií. U adsorpce proteinů na materiály bylo zjišťováno množství slabě a silně vázaných proteinů metodami SDS – PAGE, Quant-iT assay protein kit a metodou podle Bradforda. Pro testování buněčné viability na materiálech bylo použito testování CCK a pro hodnocení buněčné adheze a proliferace byla použita fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronová mikroskopie.

V této práci byly použity vlákenné materiály připravené z různých polyesterů Ing. Andreou Klápšřovou a Ing. Kristýnou Havlíčkovou pomocí elektrostatického zvlákňování na nanospideru NS 1WS 500U. Pro zvlákňování byly použity polymery a jejich blendy viz tabulka 7.

Tabulka 7: Tabulka s použitými polymerními roztoky pro výrobu mikro/nano-vlákenných materiálů

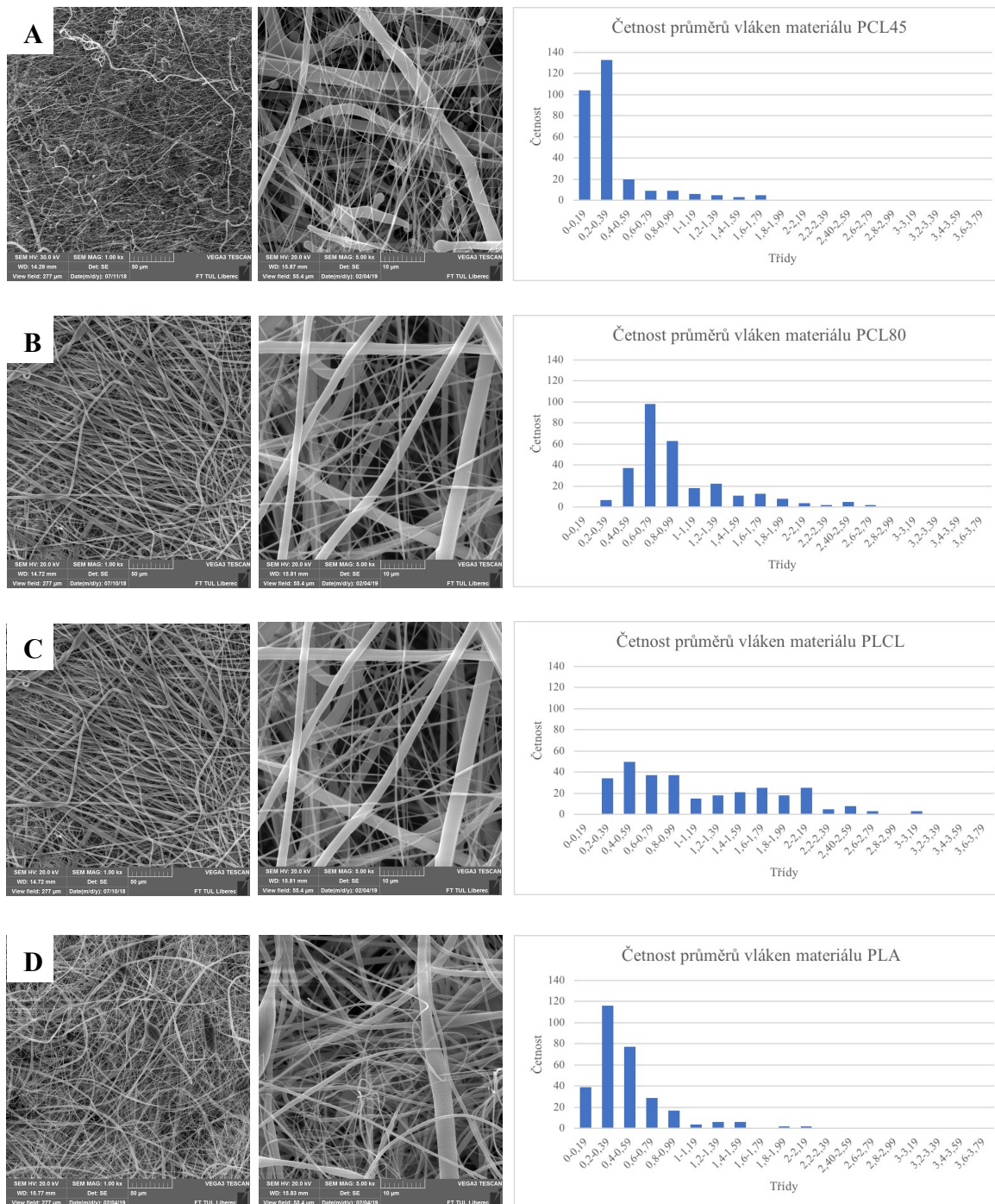
Polymer	Roztok pro zvlákňování	Poznámka
PCL45	16hm% 8:1:1 (chloroform: etanol: kyselina octová)	
PCL80	10hm% 8:1:1 (chloroform: etanol: kyselina octová)	
PLCL		
PLA		
Blend 1:1 (PCL45: PLCL)		<i>Směs polymerů byla mísená z výše připravených roztoků v daném poměru</i>
Blend 1:1 (PCL80: PLCL)		
Blend 1:3 (PCL80: PLCL)		
Blend 3:1 (PCL80: PLCL)		

6.1 Morfologie materiálů

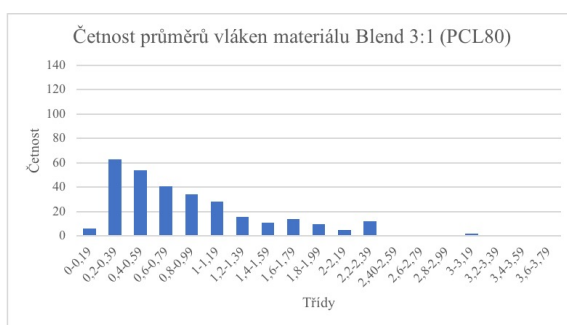
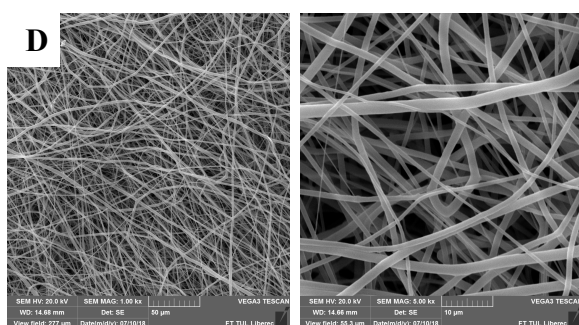
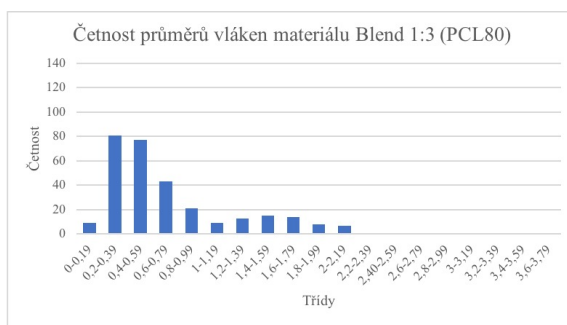
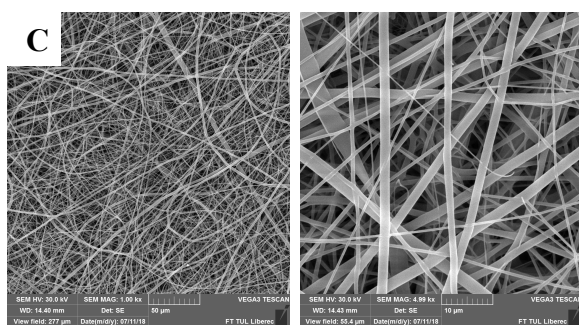
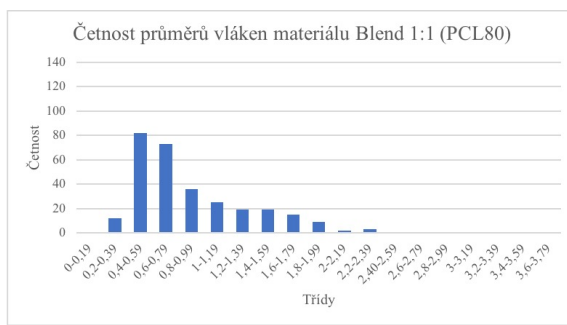
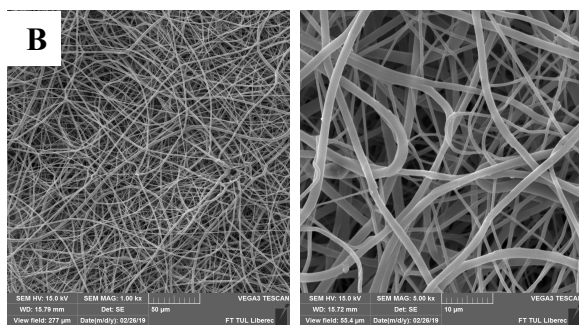
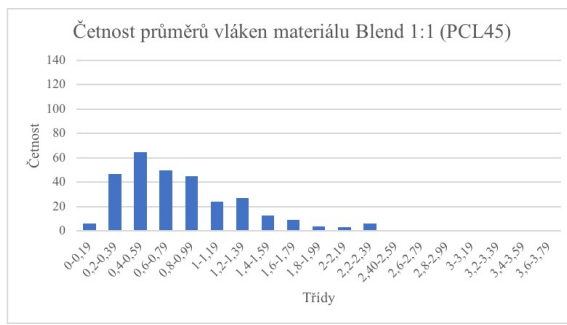
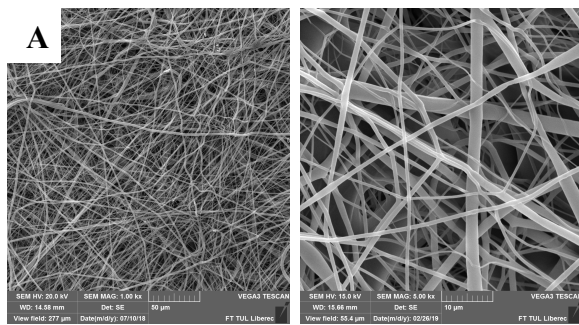
Testované polyesterové vlákenné materiály měly srovnatelnou plošnou hmotnost. V rámci zkoumání morfologie vlákenných vrstev byly měřeny průměry vláken jednotlivých materiálů (tabulka 8) ze snímků pořízených pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (kapitola 5.1). U některých materiálů byl rovněž naměřen specifický povrch Mgr. Janou Karpíškovou, Ph.D.

Tabulka 8: Testované polyesterové vlákenné materiály

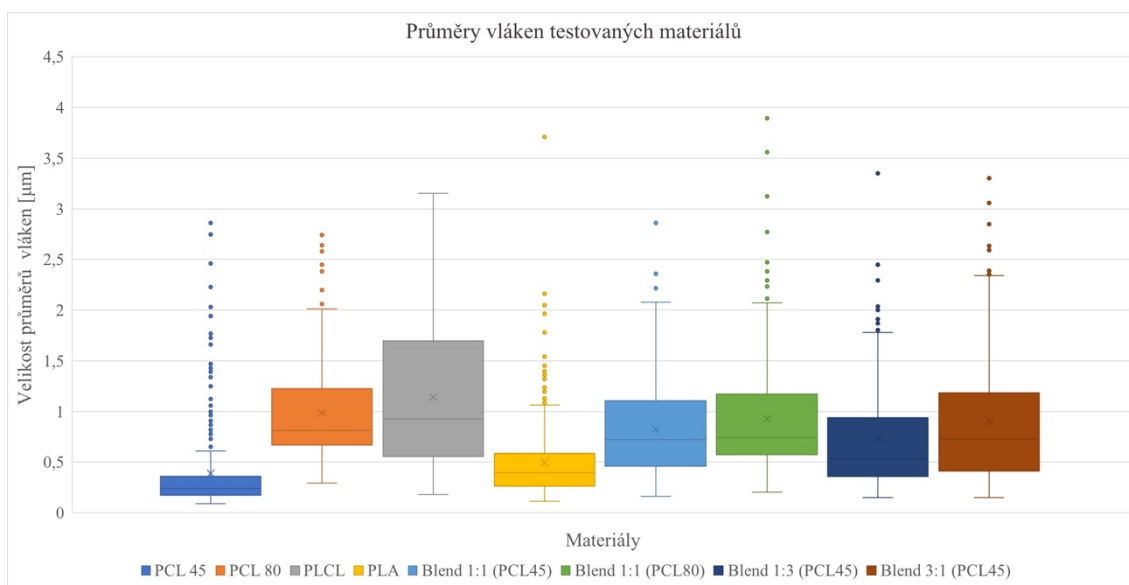
Materiál	Průměry vláken [μm]	Specifický povrch [m^2/g]
PCL45	$0,39 \pm 0,43$	
PCL80	$0,99 \pm 0,48$	2,59
PLCL	$1,14 \pm 0,68$	1
PLA	$0,5 \pm 0,39$	
Blend 1:1 (PCL45)	$0,83 \pm 0,49$	
Blend 1:1 (PCL80)	$0,93 \pm 0,54$	1,83
Blend 1:3 (PCL80)	$0,74 \pm 0,53$	1,52
Blend 3:1 (PCL80)	$0,91 \pm 0,63$	2,17



Obrázek 15: Snímky materiálů pořízené skenovací elektronovou mikroskopií se zvětšením 1000x (měřítko 50 μm) (snímek vlevo) a se zvětšením 5000x (měřítko 10 μm) (snímek vpravo) a histogramy znázorňující danou četnost velikosti průměrů vláken materiálů A (PCL45), B (PCL80), C (PLCL) a D (PLA).



Obrázek 16: Snímky materiálů pořízené skenovací elektronovou mikroskopií se zvětšením 1000x (měřítko 50 µm) (snímek vlevo) a se zvětšením 5000x (měřítko 10 µm) (snímek vpravo) a histogramy znázorňující danou četnost velikosti průměrů vláken materiálů A (Blend 1:1 (PCL45)), B (Blend 1:1 (PCL80)), C (Blend 1:3 (PCL80)) a D (Blend 3:1 (PCL80)).



Obrázek 17: Krabicový graf hodnot naměřených průměrů vláken testovaných materiálů včetně vyznačení průměrných hodnot průměrů vláken (x), mediánu (— (uvnitř krabice)) a odlehých hodnot (•).

Velikosti průměrů vláken byly srovnatelné u materiálů PCL80, PLCL a všech blendů, přičemž jejich průměrné hodnoty se pohybovaly od 0,7 μm do 1 μm (viz krabicový graf na obrázku 17). U materiálů PCL45 a PLA je patrná výrazně nižší průměrná hodnota průměrů vláken oproti ostatním materiálům (viz krabicový graf na obrázku 17) a rovněž lze pozorovat užší distribuci nejhojněji se vyskytujících velikostí průměrů vláken (histogramy na obrázku 15 materiálu A a materiálu D). Materiál PLCL má nejširší distribuci nejčastěji se vyskytujících průměrů vláken (velikosti vláken pohybující se od 0,5 μm do 1,7 μm) (krabicový graf na obrázku 17). Z hlediska distribuce vláken je patrné že u materiálu PCL45 se vyskytují, kromě velkého množství nanovláken, i mikroválka (histogram materiálu A na obrázku 15 a krabicový graf na obrázku 17) a u materiálu PLCL se vyskytuje větší množství jak menších, tak větších průměrů vláken (histogram materiálu C na obrázku 15) a vykazují tak charakter bimodálního rozdělení. Všechny blendy disponovaly srovnatelnými průměry vláken (viz obrázek 16), což je zřejmé i z krabicového grafu zobrazeném na obrázku 17.

U vybraných materiálů byl dále měřen specifický povrch vláken, kdy u materiálu PCL80 byla zaznamenána nejvyšší hodnota specifického povrchu (2,59 m^2/g) a nejnižší u materiálu PLCL (1 m^2/g). U blendů se zvyšujícím se podílem složky PCL80 se zároveň zvyšoval i specifický povrch vláken (viz tabulka 8). U materiálů PCL45, jeho blendu

a PLA nebylo možné specifický povrch doměřit kvůli časové náročnosti a z důvodu problému se samotným měřením.

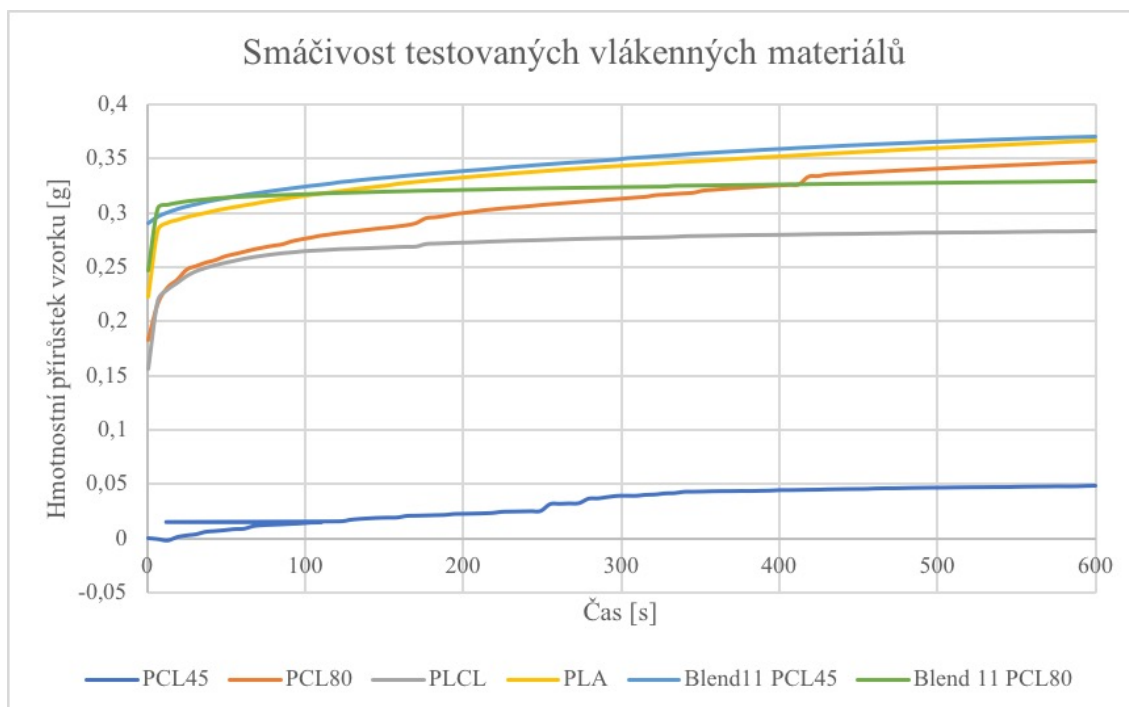
6.2 Charakteristika smáčivosti materiálů

V rámci charakterizace materiálů byla měřena smáčivost materiálů zjišťováním jejich sorpce kapaliny jako doplňující a orientační informace s níž může souviset adsorpce proteinů a buněčná adheze a proliferace.

Pro měření smáčivosti materiálů byl použit mikrotenziometr, kterým byla zjišťována sorpce vody do vzorků materiálů po dobu 10 minut. Sorpce kapaliny byla zjišťována jako hmotnostní přírůstek v závislosti na čase (kapitola 5.2). Hmotnosti testovaných vzorků o velikosti 3 x 4 cm se pohybovaly v rozmezí 0,017 – 0,029 g s drobnými odchylkami v závislosti na tloušťce materiálu. Přesné hmotnosti testovaných vzorků a grafy smáčivosti jednotlivých vzorků testovaných materiálů jsou uvedeny v příloze A. Tabulka 9 uvádí průměrné hodnoty hmotností vzorků jednotlivých materiálů a množství zadržené vody po pěti minutách měření sorpce kapaliny vzorky.

Tabulka 9: Hmotnosti vzorků testovaných materiálů pro měření smáčivosti

Průměrná hodnota	PCL45	PCL80	PLCL	PLA	Blend 1:1 (PCL45)	Blend 1:1 (PCL80)
Hmotnost vzorku [g]	0,0193	0,0215	0,0176	0,0232	0,0241	0,0274
Zadržaná voda v 5. minutě měření na 1 g vzorku [g]	1,2356	14,5751	15,7915	14,7575	14,5054	11,8999



Obrázek 18: Obrázek znázorňující graf průměrných naměřených hodnot smáčivosti jednotlivých testovaných materiálů

Materiál PCL45 vykazoval výrazně nižší smáčivost ve srovnání s ostatními materiály a to 5-7x méně po 10 minutách testování (graf na obrázku 18). Klesající hmotnost měřených vzorků u materiálu PCL45 (příloha B graf na obrázku B-1) značí tendenci nesmáčivosti materiálu. Nízká ochota vzlínivosti by mohla souviset s tloušťkou vláken, která se také u PCL45 liší od ostatních testovaných materiálů, kdy má materiál PCL45 výrazně nižší průměry vláken (obrázek 15 materiálu A). Oproti tomu PCL80 má výrazně vyšší nasákavost s předpokladem stále rostoucí křivky (graf na obrázku 18). V souvislosti s tloušťkou vláken má PCL80 výrazně vyšší průměry vláken (obrázek 15 materiálu B) než PCL45, a to opět koresponduje s jeho smáčivostí vodou. PLA má srovnatelné průměry vláken jako PCL45, ale je smáčen vodou nejlépe z materiálu zvlákněných z čistých polymerů, což by mohlo být dáno jeho chemickou strukturou. U blendů je možné pozorovat velmi rychlé vzlínání vody do kapilár materiálu z počátku měření (graf na obrázku 18). Je zde zřejmý synergický efekt čistých polymerů, z nichž jsou blendy zvlákněny. Na křivkách průběhu měření vzorků PCL80 (příloha B graf na obrázku B-2) jsou zřetelné nerovnosti průběhu křivky, které mohou být způsobeny vyšší porozitou v některých částech vláknité struktury materiálu, která krátkodobě způsobí vyšší nasákavost vzorku.

U materiálů PCL80, PLA a Blendu 1:1(PCL45) je z grafu na obrázku 10 patrný stálý růst křivky. Lze tedy předpokládat nárůst i po uplynutých 10 minutách měření. Materiály PCL45, PLCL a Blend 1:1(PCL80) disponují křivkami s mírnějším průběhem po první minutě testování, což by mohlo signalizovat plná nasycení testovaného vzorku nebo vyrovnání kapilárních a gravitačních sil a tím zastavení vztlínání kapaliny do kapilár materiálu. Přestože PLCL se jevil po PCL45 jako nejméně vztlínavý, pozorujíc hmotnostní přírůstek vody vztahující se na hmotnost vzorku nabývá nejvyšší průměrné hodnoty a to 15,7915 g vody na 1 g vzorku, což by mohlo být dáno jeho odlišnou morfologií z pohledu velikosti vláken a tím odlišnou porozitou.

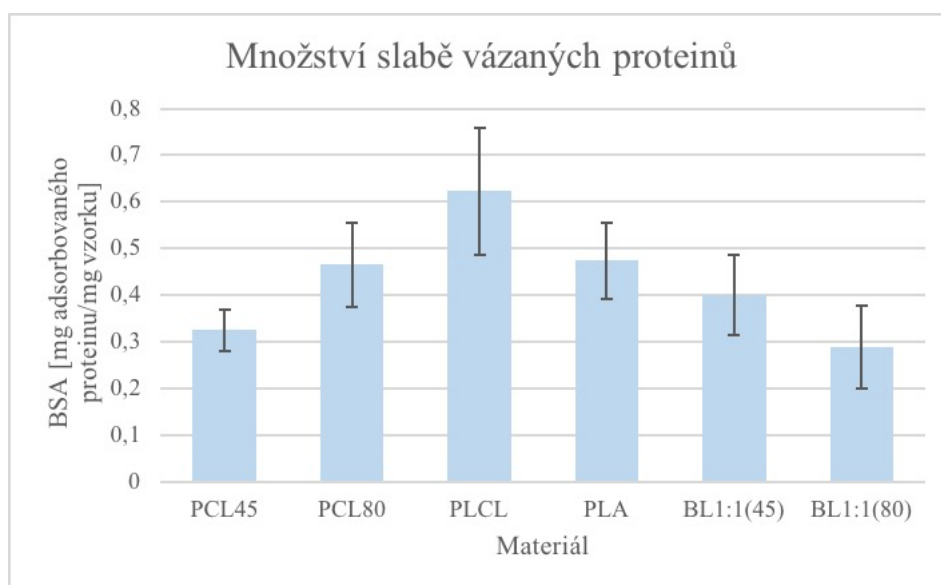
Pro další zkoumání souvislostí mezi chemickou strukturou a smáčivostí materiálů by bylo vhodné zvýšit citlivost přístroje (zkoumání počátečního vztlínání kapaliny do materiálu) a testování větších vzorků po delší dobu.

6.3 Analýza adsorpce proteinů

Adsorpce proteinů byla testována hovězím sérovým albuminem (BSA) použitým s koncentrací 50 mg/ml na vzorek materiálu o velikosti 2x2 cm. Vzorky všech testovaných materiálů byly předem zvážené (příloha C). Následovala inkubace jednu hodinu při 37 °C, kdy došlo k adsorpci proteinů. Následoval oplach pomocí roztoku PBS, kdy byly uvolněny slabě vázané proteiny. Poté bylo použito denaturační činidlo (1 % SDS), kdy byly z materiálu desorbovány silně vázané proteiny (kapitola 5.3.1). Získané roztoky se slabě a silně vázanými proteiny byly dále analyzovány. Analýza množství desorbovaných silně a slabě vázaných proteinů probíhala pomocí separační metody SDS-PAGE elektroforézy, fluorimetrií (Quant-iT assay protein kit) a spektrofotometrií (metoda podle Bradforda), jejichž postupy jsou popsány v kapitolách 5.3.2, 5.3.3 a 5.3.4.

6.3.1 Analýza slabě vázaných proteinů (soft corona)

Množství proteinů uvolněných v rámci oplachu po adsorpci proteinů, kdy byly získány roztoky slabě vázaných proteinů, bylo zjišťováno za použití spektrofotometrické metody podle Bradforda (dle kapitoly 5.3.2). Graf na obrázku 19 znázorňuje dopočítané hodnoty množství slabě vázaných proteinů BSA ze získaných hodnot z měření absorbancí na spektrofotometru.



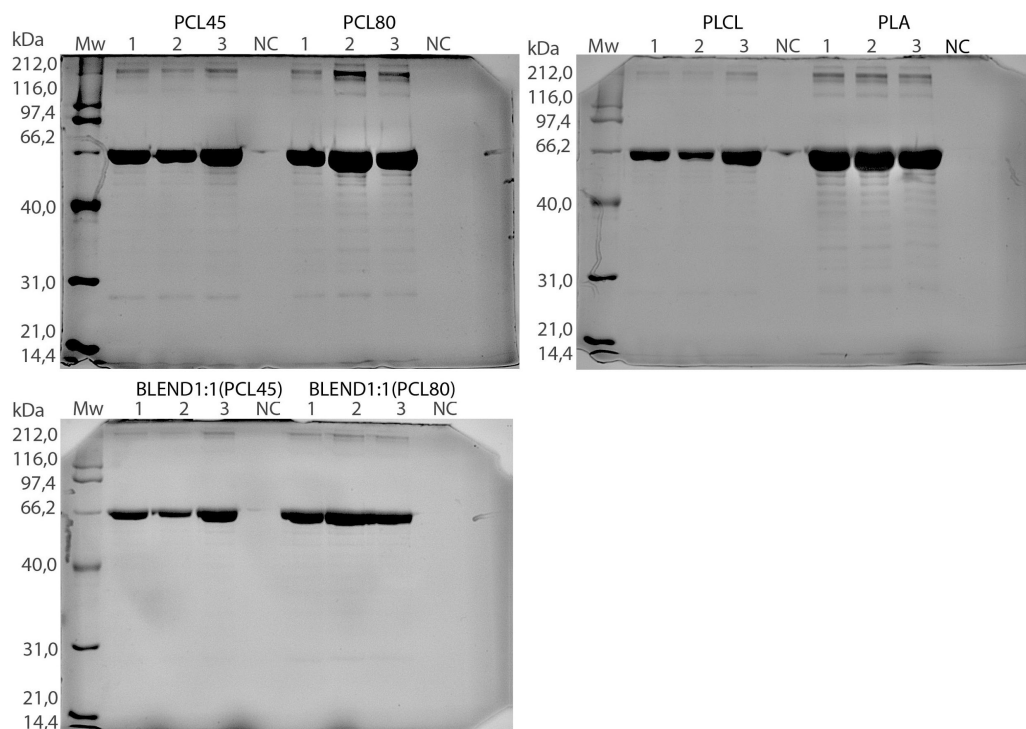
Obrázek 19: Graf množství slabě vázaných proteinů po oplachu PBS měřených spektrofotometricky metodou dle Bradforda (při 595 nm) (pozn. BL1:1(45) = Blend1:1(PCL45), BL1:1(80) = Blend1:1(PCL80))

Z grafu na obrázku 19 vyplývá, že materiály z čistých polymerů (PCL a PLA) neváží tak dobře slabě vázané proteiny jako jejich kopolymer PLCL, který váže slabě vázané proteiny výrazně více a nabývá hodnoty BSA nad 0,6 mg na 1 mg vzorku (graf na obrázku 19). Následně nejvíce adsorbují slabě vázané proteiny na materiál PCL80. Materiály PCL80 a PLA mají srovnatelné hodnoty smáčivosti a slabě vázané proteiny váží srovnatelně. Dále je zřejmý rozdíl mezi materiály PCL45 a PCL80, kde lze pozorovat u PCL45 malé průměry vláken, nízkou smáčivost a nízkou adsorpci slabě vázaných proteinů. Kdežto materiál PCL80 ve srovnání s PCL45 disponuje vyššími průměry vláken, vyšší smáčivostí a lépe na něj adsorbují slabě vázané proteiny.

6.3.2 Analýza silně vázaných proteinů (hard corona)

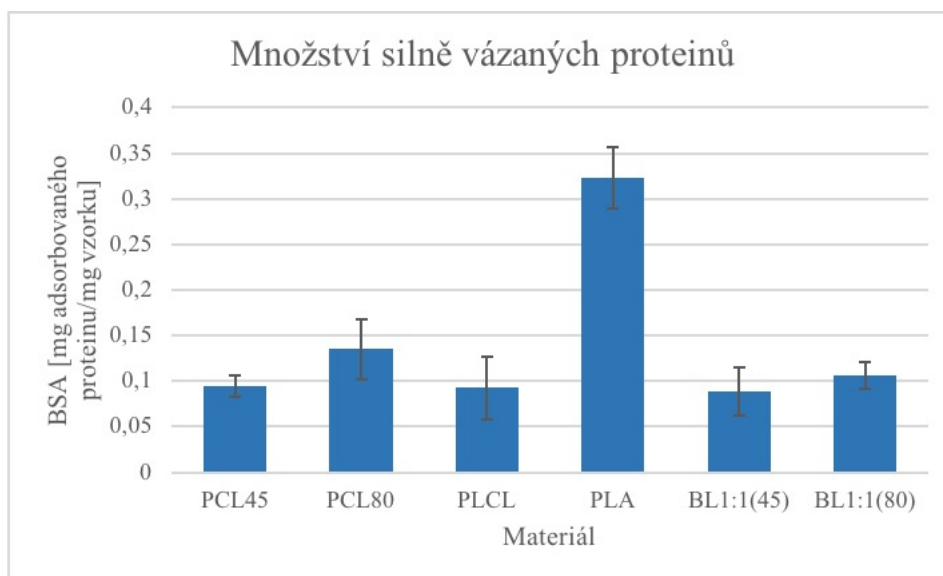
Silně vázané proteiny byly analyzovány z roztoků po desorpci v roztoku 1 % SDS. Analýza probíhala pomocí SDS-PAGE elektroforézy a fluorometricky (Quant-iT protein assay kit). Ředění vzorků 10x pro fluorimetrickou analýzu bylo prováděno s ohledem na desorpční činidlo SDS, které ovlivňuje spektrofotometrické metody. Metodu dle Bradforda nebylo možné pro kvantifikaci roztoků silně vázaných proteinů použít z důvodu přítomnosti desorpčního činidla SDS, kdy se po ředění vzorků koncentrace proteinů dostávají pod detekční limit metody. Proto byly vzorky analyzovány pomocí fluorescenční spektrofotometrické metody Quant-iT protein assay kit.

Metoda SDS-PAGE elektroforéza hodnotí množství adsorbovaných silně vázaných proteinů na materiálech za použití roztoků silně vázaných proteinů po desorpci aplikovaných do polyakrylamidového gelu a působení elektrického pole. Hodnoceny jsou vzniklé bandy proteinů příslušící odpovídající molekulové hmotnosti podle markeru o známých hodnotách, který je na levé straně každého gelu (viz obrázek 20). Postup testování je popsán v kapitole 5.3.3.



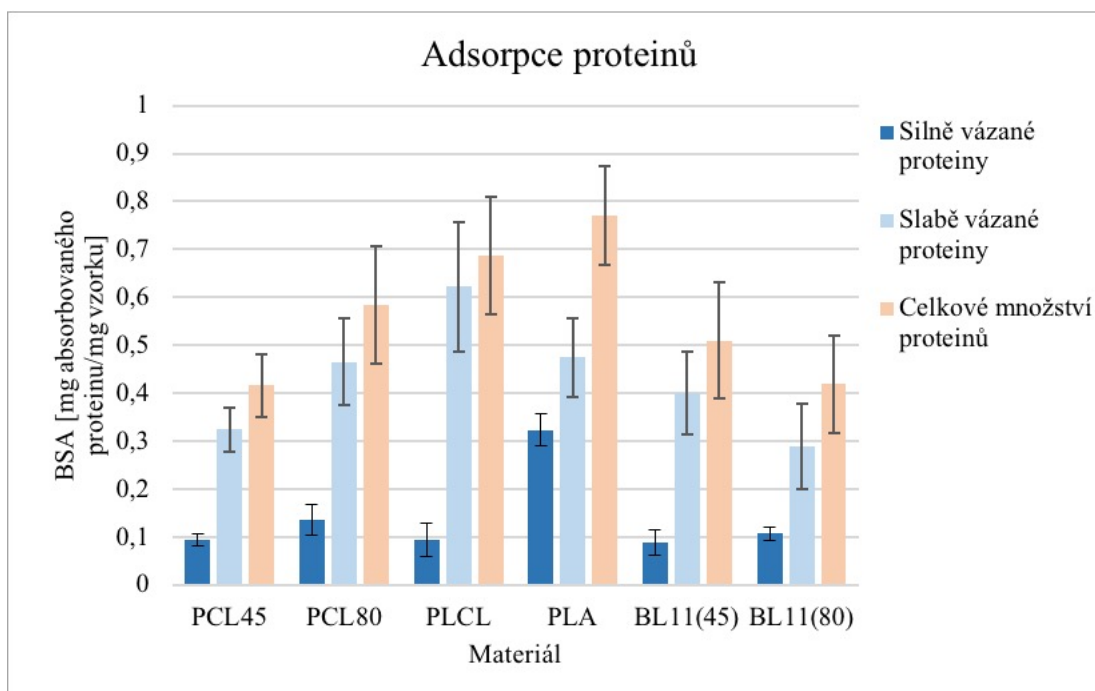
Obrázek 20: Snímky gelů silně vázaných proteinů na vzorcích testovaných materiálů s vyznačeným markerem molekulových hmotností získaných z SDS-PAGE elektroforézy.

Další použitou metodou pro hodnocení silně vázaných proteinů byla Quant-iT protein assay kit (kapitola 5.3.4), která kvantifikuje množství adsorbovaných proteinů na základě fluorescenční spektrofotometrické analýzy z roztoku silně vázaných proteinů po desorpci (graf na obrázku 21).



Obrázek 21: Graf množství silně vázaných proteinů na materiálech (průměrné hodnoty) po desorpci pomocí 1 % SDS metodou Quant- iT protein assay kit (pozn. BL1:1(45) = Blend1:1(PCL45), BL1:1(80) = Blend1:1(PCL80))

Výsledky testování Quant-iT protein assay kit potvrzují výsledky získané metodou SDS-PAGE elektroforézou (snímky gelů na obrázky 20 a graf na obrázku 21), kde je zřejmé největší množství silně vázaných proteinů adsorbovaných na materiálu PLA.



Obrázek 22: Graf znázorňující adsorpci slabě vázaných proteinů, silně vázaných proteinů a celkového množství adsorbovaných proteinů na jednotlivých testovaných materiálech (pozn. BL11(45) = Blend1:1(PCL45), BL11(80) = Blend1:1(PCL80))

Jak je patrné ze snímků jednotlivých gelů obrázku 20 a grafu na obrázku 21, nejvíce silně vázaných proteinů váže materiál PLA a následně materiál PCL80. Ostatní materiály vážou silně vázané proteiny srovnatelně okolo 0,1 mg na 1 mg vzorku. Slabě vázané proteiny nejvíce adsorbují na materiál PLCL a následně na PLA a PCL80.

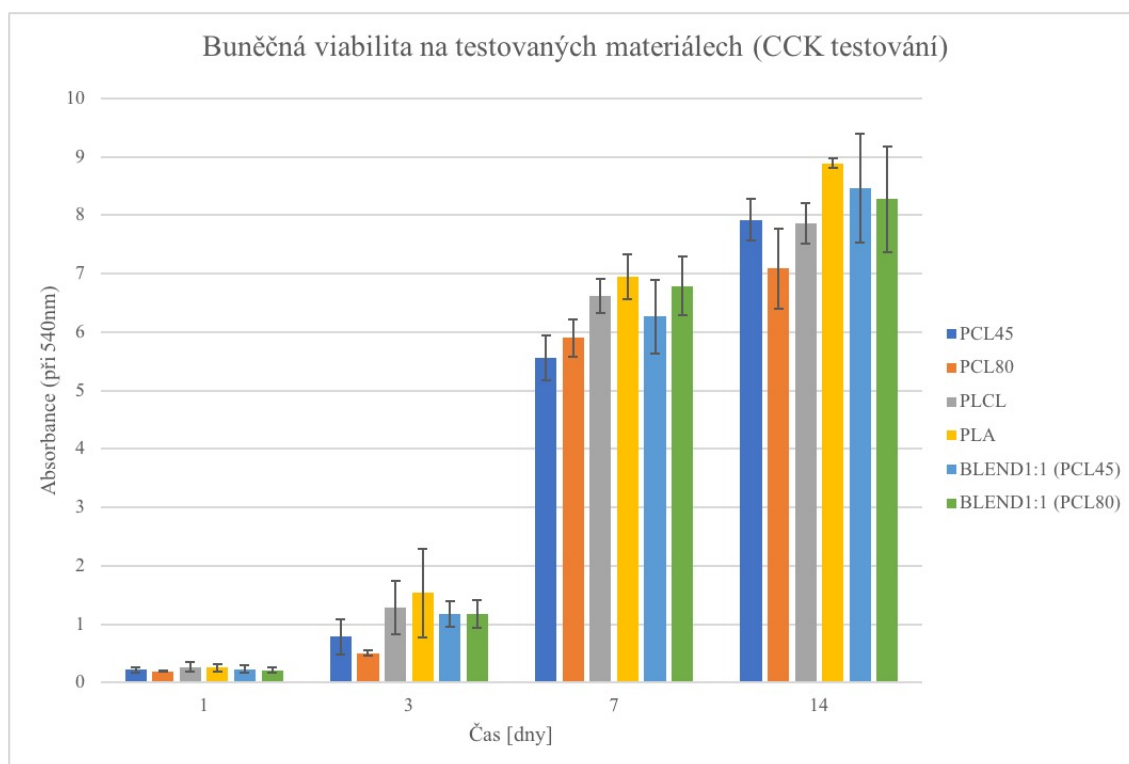
Lze pozorovat určitý trend u adsorpce slabě i silně vázaných proteinů u materiálů PCL45 a PCL80 (graf na obrázku 22), kdy materiál PCL80 váže slabě i silně vázané proteiny víc v porovnání s materiálem PCL45. Rovněž jejich blendy mají nižší adsorpci proteinů jak slabě, tak silně vázaných (graf na obrázku 22). To by mohlo být dáno kvalitou adsorpce proteinů na materiál a jeho denaturací (Wei et al., 2014).

U materiálů PCL80, PLCL a Blendu 1:1(PCL80) je patrný vliv specifického povrchu na množství adsorpce silně vázaných proteinů. Materiál PCL80 má hodnotu specifického povrchu dvakrát vyšší než PLCL a také váže větší množství silně vázaných proteinů. Blend 1:1(PCL80) nabývá hodnot mezi oběma polymery jak u specifického povrchu, tak u adsorpce silně vázaných proteinů. U slabě vázaných proteinů se tento trend nepotvrdil, lze však pozorovat jistý vliv chemického složení.

Celkově největší množství proteinů adsorbuje na materiál PLA a následně na materiál PLCL. Materiály obsahující PCL složku vykazují z provedených testování obecně nižší hodnotu celkového množství proteinů adsorbovaného na jednotlivých materiálech.

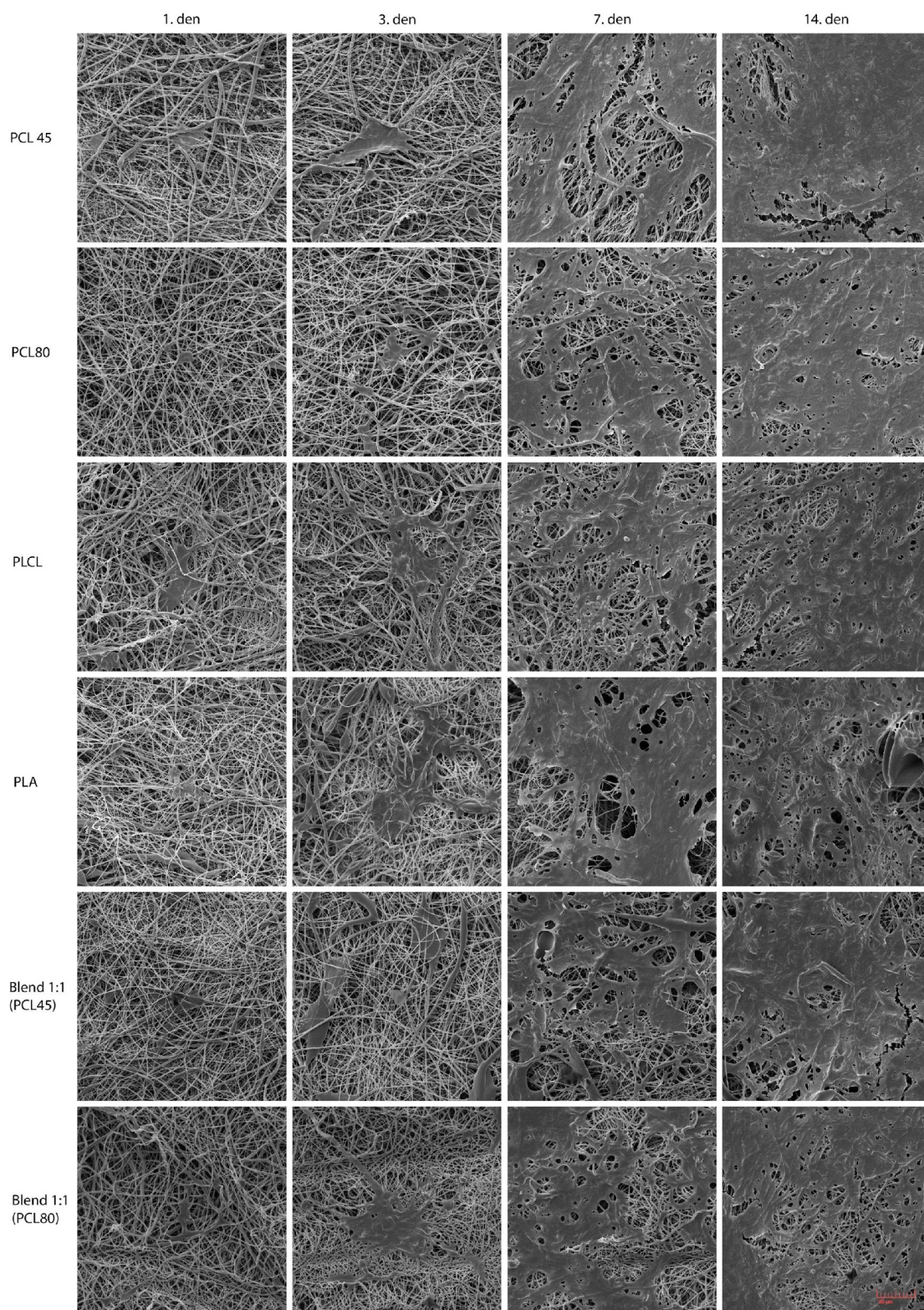
6.4 *In vitro* testování s myšimi fibroblasty 3T3

U testovaných materiálů byla zjišťována buněčná adheze a následná proliferace na testovaných vlákněných materiálech. Pro testování buněčné viability byla použita buněčná linie 3T3-SA myší fibroblasty. Pro testování byla zvolena koncentrace buněk v suspenzi $1 \cdot 10^4$ buněk/ jamku. Testování probíhalo ve čtyřech odběrových dnech (1., 3., 7. a 14. den) za použití testu CCK (kapitola 5.4.3), který umožňuje hodnocení buněčné viability spektrofotometrickou metodou. Dále byla hodnocena buněčná adheze a proliferace ze snímků pořízených na fluorescenčním mikroskopu (kapitola 5.4.4) a skenovacím elektronovém mikroskopu (kapitola 5.4.5).



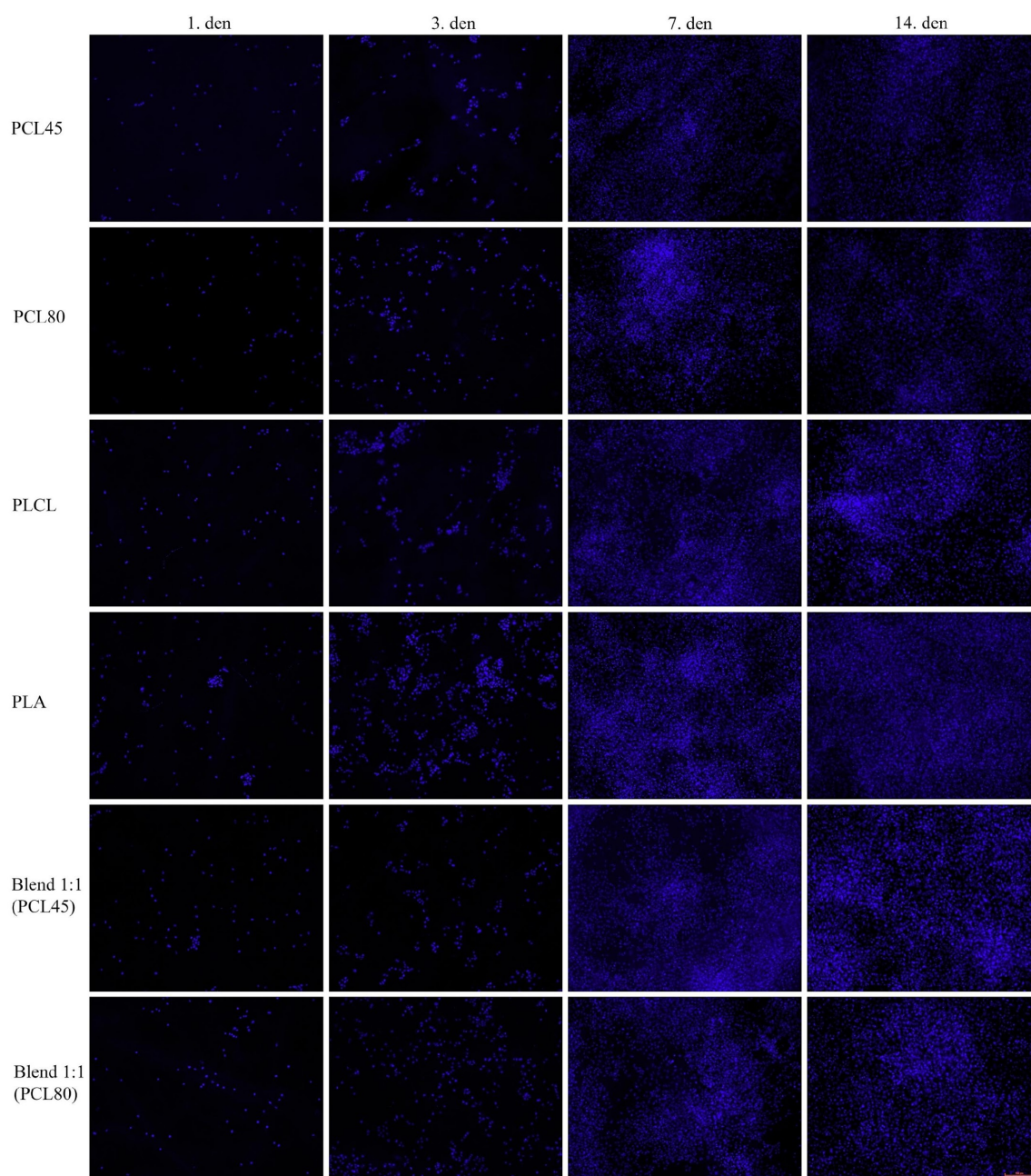
Obrázek 23: Graf znázorňující viabilitu buněk na materiálech PCL45, PCL80, PLCL, PLA, Blend1:1(PCL45), Blend1:1(PCL80) ve čtyřech odběrových dnech (1., 3., 7. a 14. den) - CCK

Pro hodnocení buněčné adheze a proliferace byly pořízeny mikroskopické snímky na skenovacím elektronovém mikroskopu (kapitola 5.4.4, obrázek 24) a fluorescenčním mikroskopu (kapitola 5.4.5, obrázek 25, obrázek 26) při různých zvětšeních. Nevýhodou mikroskopické analýzy je zachycení velmi malé části testovaného vzorku. Buňky nemusí homogenně proliferovat na celé ploše materiálu, a proto je hodnocení snímků spíše subjektivní.

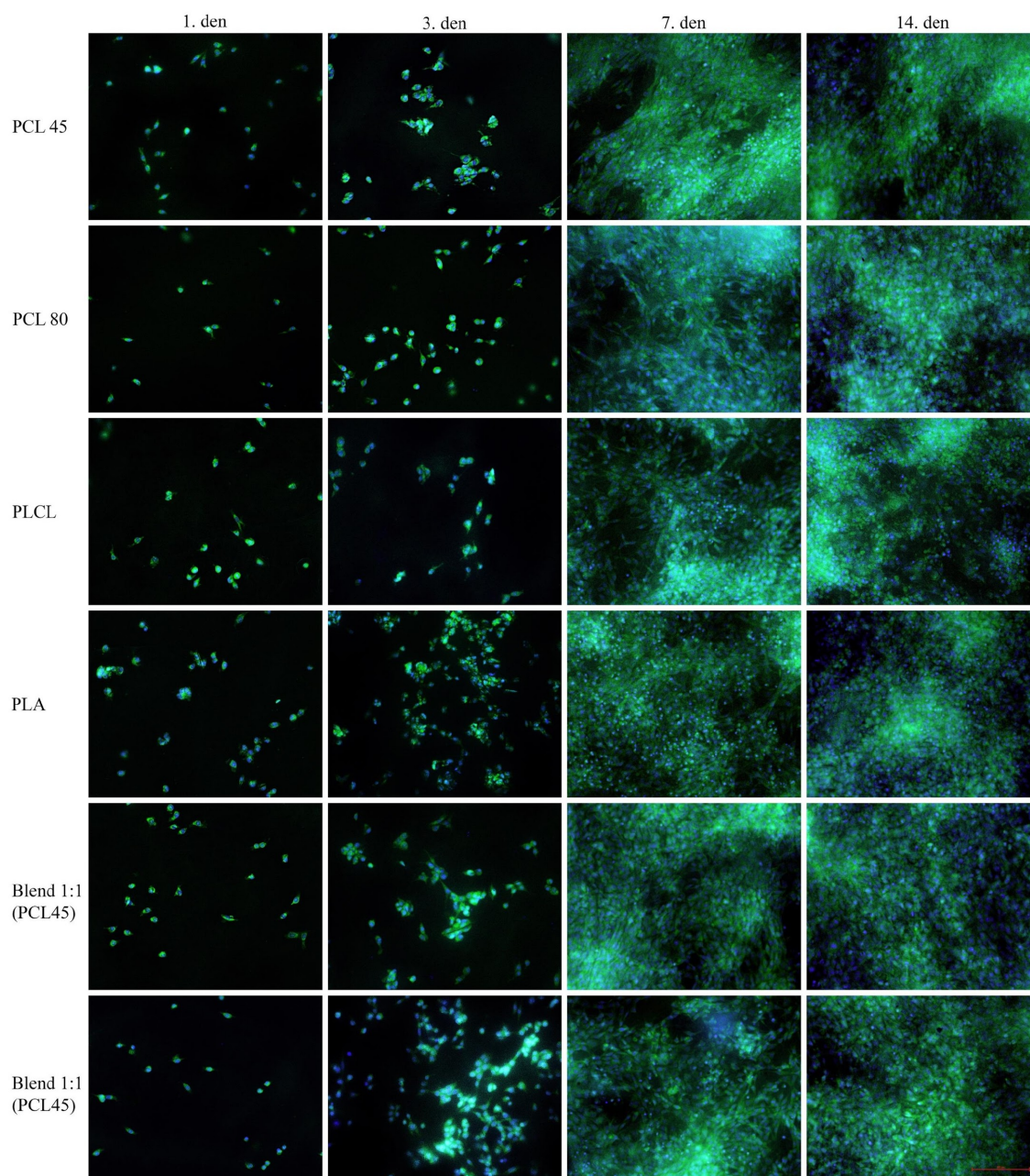


Obrázek 24: Snímky z elektronové mikroskopie z 1., 3., 7. a 14. testovacího dne kultivace buněk na materiálech PCL45, PCL80, PLCL, PLA, Blend 1:1 (PCL45:LCL), Blend 1:3 (PCL45:PLCL), Blend 3:1 (PCL45:PLCL) použitých pro testování mikro/nanovlákněných vrstev v interakci s buňkami 3T3-mýšimi fibroblasty se zvětšením 1000x (měřítko 50 μ m).

Buňky na materiálech byly rovněž hodnoceny pomocí fluorescenční mikroskopie, kde byla barvena buněčná jádra (DAPI) (obrázek 25) a aktinová vlákna obsažená v cytoplazmě buňky (Phalloidin – FITZ) (obrázek 26), čímž byl zřetelný jejich tvar a mohlo být pozorováno jejich rozložení a prosperita na testovaných materiálech na základě jejich morfologie.



Obrázek 25: Snímky z fluorescenční mikroskopie obarvených buněčných jader pomocí DAPI (modrá) na mikro/nanovlákněných vrstvách materiálů PCL 45, PCL 80, PLCL, PLA, Blend 1:1 (PCL45), Blend 1:1 (PCL80) se zvětšením 10x a měřítkem 100 μ m



Obrázek 26: Snímky z fluorescenční mikroskopie složených snímků obarvených buněčných jader pomocí DAPI (modrá) a celých buněk phalloidin-FITZ (zelená) na mikro/nanovlákněných vrstvách materiálů PCL45, PCL80, PLCL, PLA, Blend 1:1(PCL45), Blend 1:1(PCL80) se zvětšením 20x a měřítkem 100 μ m.

Na snímcích fluorescenční mikroskopie (obrázek 25 a 26) a grafu absorbance (graf na obrázku 23) z prvního testovacího dne lze pozorovat srovnatelnou buněčnou adhezi na všech materiálech. Znatelné rozdíly jsou viditelné ve třetím odběrovém dni, kdy buněčná viabilita nabývá nejvyšší hodnoty u materiálu PLA (graf na obrázku 23). To potvrzují také SEM snímky (obrázek 24). Tento trend pokračuje sedmý i čtrnáctý odběrový den, kdy materiál PLA nabývá nejvyšších hodnot absorbance (resp. viability)

z testovaných materiálů, což potvrzuje fluorescenční mikroskopie (obrázek 25). Na snímcích ze čtrnáctého odběrového dne pořízených na SEM se buňky jeví jako konfluentní vrstva a není možné hodnocení. Ze složených snímků (obrázek 26) ve třetím odběrovém dni je u blendů dobře viditelná tendence buněk rozprostírat se po materiálech, což odpovídá výsledkům viability, kde blendové materiály měly nejvyšší buněčnou viabilitu po PLA (graf na obrázku 23). Nejnižší viabilita je pozorována u materiálů PCL45 a PCL80, což je patrné sedmý odběrový den na snímcích buněčných jader (obrázek 25) a snímcích ze SEM (obrázek 24). Blendy a materiál PLCL vykazují srovnatelnou buněčnou viabilitu (graf na obrázku 23).

Pro dobrou adsorpci proteinů je doporučován dle studií kontaktní úhel $60-65^\circ$ a vyšší (Salmerón-Sánchez a Altankov, 2010, Wei et al., 2014), což bylo potvrzeno v práci Mgr. Hany Bidmonové u materiálu PLA, kde se kontaktní úhel pohyboval kolem $60-70^\circ$ (Bidmonová, 2009). To koresponduje se získanými výsledky adsorpce proteinů a následnými testy buněčné viability, kde nejvíce buňky proliferovaly na materiálu PLA. Zároveň na PLA adsorbuje největší množství silně vázaných proteinů, hodně slabě vázaných proteinů a celkově na materiál PLA adsorbuje největší množství proteinů z testovaných materiálů (téměř $0,8 \text{ mgproteinů/mg vzorku}$). Dále PLA disponuje malými průměry vláken a druhou nejvyšší průměrnou hodnotou smáčivosti. Na materiály PCL45 a PCL80 adsorbují proteiny srovnatelně jako u jejich blendů, avšak vykazují nejnižší buněčnou viabilitu. To by mohlo být dáno denaturací proteinů viz literatura (Wei, 2014) na základě jejich chemické struktury (Walkey and Chan, 2012) a následnou obtížnou adhezí buněk. PLCL disponoval srovnatelnou buněčnou viabilitou jako blendy. Proteiny slabě vázané adsorbovaly na materiál PLCL nejlépe a celkové množství adsorbovaných proteinů bylo nejvyšší po PLA. Je zřejmý vliv PLCL složky v blendech, kdy blendy vykazují dobrou buněčnou viabilitu následně po PLA. Avšak proteiny (slabě i silně vázané) adsorbují na blendy málo ve srovnání s ostatními materiály, což by mohla mít za důsledek obsažená složka PCL v blendech. Smáčivost blendů vodou je srovnatelná s materiálem PLA.

Vliv na buněčnou adhezi by mohla mít také kvalita vázaných proteinů s ohledem na množství vázaných proteinů a druh vázaných proteinů, jejichž adsorpce na materiálech se může měnit v čase v závislosti na slabě vázaných proteinech (soft corona) a silně vázaných proteinech (hard corona) (Walkey and Chan, 2012). Kvalita vázaných proteinů může rovněž souviset s případnou denaturací (změnou konfigurace) proteinů bez ohledu

na množství navázaných proteinů na materiálech. Vhodné by bylo další zkoumání adsorpce proteinů a jeho vlivu na buněčnou adhezi a proliferaci na polyesterových mikro/nanovlákných materiálech.

Závěr

V rámci této práce byl studován vliv morfologie a chemického složení polyesterových vláknenných materiálů na adsorpci proteinů a adhezi a proliferaci buněk.

Pro testování byly použity vláknenné materiály z degradabilních polyesterů: PCL, PLA, kopolymer PLCL a blendy PCL a PLCL. Testované materiály měly srovnatelnou plošnou hmotnost a průměr vláken se lišil v závislosti na použitém polymeru. Průměry vláken byly měřeny ze snímků pořízených na skenovacím elektronovém mikroskopu. Nejnižšími průměry a zároveň nejužší distribucí nejhojněji se vyskytujících průměrů vláken disponoval materiál PCL45 a následně PLA, u nichž se průměrná hodnota nacházela kolem 0,5 μm . Nejširší distribuce vláken byla pozorována u materiálu PLCL pohybující se od 0,5 do 1,7 μm . U ostatních materiálu byly průměry vláken srovnatelné s průměrnou hodnotou kolem 1 μm . U materiálu byla dále hodnocena smáčivost kapalinou (vodou) pomocí mikrotenziometru. Z výsledků měření je patrné, že nejvíce smáčivý jsou materiály PLA a blendy. U blendů jsou hodnoty smáčivosti vyšší, než je smáčivost čistých polymerů PCL a PLCL a je zde zřejmý synergický efekt. Nejhorších hodnot smáčivosti nabýval materiál PCL45, který měl nanovláknennou strukturu, a to až o 5-7x nižší hodnoty sorbované vody než u PCL80. Materiál PLA, který nabýval vysokých hodnot smáčivosti, měl z pohledu průměrů vláken svou morfologií nejbližší k materiálu PCL45, který se jevil jako nejméně sorbující vodu. To by mohlo souviset s chemickou strukturou polymerů.

V rámci biologického testování byla studována adsorpce proteinů a buněčná adheze a proliferace. Adsorpce proteinů byla zkoumána za použití modelového proteinu BSA. Zjišťováno bylo množství slabě (tzv. soft corona) a silně (tzv. hard corona) vázaných proteinů adsorbovaných na materiálech z roztoku slabě vázaných proteinů po oplachu PBS a z roztoku silně vázaných proteinů po desorpci za přítomnosti 1 % SDS. Celkově největší množství proteinů adsorbovalo na materiál PLA, kde byly zároveň nejvíce zastoupené silně vázané. Nejvíce slabě vázaných proteinů adsorbovalo na materiál PLCL, který zároveň vázal největší celkové množství proteinů po PLA. Nejhůře adsorbovaly slabě i silně vázané proteiny na materiály PCL45 a PCL80 a následně na jejich blendy. V in-vitro testování s 3T3 myšními fibroblasty prokázalo testování CCK, zaměřené na buněčnou viabilitu, nejvyšší hodnotu u materiálu PLA, což korespondovalo se snímkem mikroskopické buněk na testovaných materiálech. Nejnižších hodnot dosahovaly

materiály PCL (PCL45 a PCL80) a to bez prokazatelného vlivu morfologie materiálů. U blendů je pozorován synergický efekt obou složek polymerů. Ze získaných výsledků je patrné, že adsorpce proteinů a interakce materiálu s buňkami má určitý trend. U materiálů s velkou adsorpcí proteinů, zejména silně vázaných, je pozorována lepší buněčná proliferace. Dále je pozorována u materiálů s obsahem PCL, zejména PCL45 a PCL80, nižší adsorpce proteinů a buněčná proliferace.

Pokračování této práce vidím ve zkoumání souvislostí interakce proteinů s materiálem s bližším zaměřením na jeho chemickou strukturu. Pro další charakterizaci materiálů z pohledu interakce proteinů a adheze a proliferace buněk by bylo vhodné použít kompletní krevní sérum (např. plazmu) a různé buněčné linie. Dále by bylo vhodné studovat charakteristiku materiálu z pohledu smáčivosti by bylo vhodné zvýšit citlivost měření pro lepší zachycení počátku vzlínání kapaliny u blendů a použít pro měření i jinou kapalinu než, jak tomu bylo v tomto případě, vodu - např. glycerin z důvodu vyšší viskozity, která by umožnila pomalejší vzlínání, a tudíž lepší zachycení počátku sorpce, a z důvodu nižší povrchové energie, než má voda.

Seznam použité literatury

Alghoraibi, I., Alomari, S., 2018. Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication, in: Barhoum, A., Bechelany, M., Makhlof, A. (Eds.), Handbook of Nanofibers. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42789-8_11-2

Basterretxea, A., Gabirondo, E., Sanchez-Sanchez, A., Etxeberria, A., Coulembier, O., Mecerreyes, D., Sardon, H., 2017. Synthesis and characterization of poly (ϵ -caprolactam-co-lactide) polyesteramides using Brønsted acid or Brønsted base organocatalyst. *Eur. Polym. J.* 95, 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.05.023>

Bauer, S., Schmuki, P., von der Mark, K., Park, J., 2013. Engineering biocompatible implant surfaces. *Prog. Mater. Sci.* 58, 261–326. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001>

Bidmonová, H., 2009. Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 2. Polyvinylalkohol, chitosan, kyselina (D, L) polymléčná (Diplomová práce). Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.

Bin Ding, Xianfeng Wang, Jianyong Yu, 2019. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-01374-8>

Choi, J.S., Choi, Y.C., Kim, J.D., Kim, E.J., Lee, H.Y., Kwon, I.C., Cho, Y.W., 2014. Adipose tissue: A valuable resource of biomaterials for soft tissue engineering *Macromol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s13233-014-2135-5>

Cia, K., Wang, A., Yin, L., Cheng, J., 2017. Bio-nano interface: The impact of biological environment on nanomaterials and their delivery properties. *Journal of Controlled Release* 263, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.034>

Erben, J., Pilarova, K., Sanetrnik, F., Chvojka, J., Jenčová, V., Blažková, L, Havlíček, J., Novák, J., Mikeš, P., Prosecká, E., Lukáš, D., Kuželová Košťáková, E., 2015. The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, *Materials Letters*, 143, P. 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.12.100>

Erben, J., Jencova, V., Chvojka, J., Blazkova, L., Strnadová, K., Modrak, M., Kostakova, E., 2016. The Combination of Meltblown Technology and Electrospinning – the Influence of the Ratio of Micro and Nanofibers on Cell Viability. *Materials Letters*. 173. DOI: 10.1016/j.matlet.2016.02.147.

Fernández, J., Etxeberria, A., Sarasua, J.-R., 2012. Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co--caprolactone) statistical copolymers. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 9, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.01.003>

Gierej, A., Vagenende, M., Filipkowski, A., Siwicki, B., Buczynski, R., Thienpont, H., Vlierberghe, S., Geernaert, T., Dubruel, P., Berghmans, F., 2019. Poly(D,L-Lactic Acid) (PDLLA) Biodegradable and Biocompatible Polymer Optical Fiber, *Journal of Lightwave Technology*, vol. 37, no. 9, pp. 1916-1923, doi: 10.1109/JLT.2019.2895220

Gilmour, D., J., Webster, R., L., Perry, M., R., Schafer., L., L., 2015. Titanium pyridonates for the homo-and copolymerization of rac-lactide and ϵ -caprolactone. *Dalton Transactions*, 2015, 44, 12411-12319. <https://doi.org/10.1039/C5DT01162K>

Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., 2013. Biodegradable Polymers, in: Chamy, R. (Ed.), *Biodegradation – Life of Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56230>

Ghorani, B., Tucker, N., 2015. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocoll.* 51, 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.024>

Grafahrend, D., Heffels, K.-H., Beer, M.V., Gasteier, P., Möller, M., Boehm, G., Dalton, P.D., Groll, J., 2011. Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation. *Nat. Mater.* 10, 67–73. <https://doi.org/10.1038/nmat2904>

Hanzl Vojtěch, 2018. Funkcionalizace tkáňového nosiče trombocytárními růstovými faktory (Bakalářská práce). Technická Univerzita v Liberci, Liberec.

Jarošová Eva, Studium interakce krevní plasmy a biodegradabilních vlákných polyesterových materiálů (Bakalářská práce). Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní, Liberec.

- Lukáš, D., Sarkar, A., Martinová, L., Vodsed'álková, K., Lubasová, D., Chaloupek, J., Pokorný, P., Mikeš, P., Chvojka, J., Komárek, M., 2009. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Text. Prog.* 41, 59–140. <https://doi.org/10.1080/00405160902904641>
- Ma, P.X., 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* 7, 30–40. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00233-0)
- Michálek, J., Smrčková D., M., Příkladný, M., Krumbholcová CH., E., 2018. Příběh jednoho materiálu, aneb 2-hydroxyethyl-methakrylát: monomer, polymer, vlastnosti a aplikace. *Chem. Listy* 112, 490–497
- Mohammadzadehmoghadam, S., Dong, Y., Barbhuiya, S., Guo, L., Liu, D., Umer, R., Qi, X., Tang, Y., 2016. Electrospinning: Current Status and Future Trends, in: Fakirov, S. (Ed.), *Nano-Size Polymers*. Springer International Publishing, Cham, pp. 89–154. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39715-3_4
- Petráš, D., Kimmer, D. a Soukup, K., 2009. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. 103, 1009-1016.
- Pleváková Veronika, 2019. Biologické vlastnosti biomateriálů (Diplomová práce). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín.
- Ratner, B.D., 2013. The Nature of Matter and Materials, in: *Biomaterials Science*. Elsevier, pp. 6–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00002-4>
- Salmeron-Sanchez, E., Altankov, G., 2010. Cell-Protein-Material Interaction in Tissue Engineering, in: *Tissue Engineering*. DOI: 10.5772/8584
- Sola, A., Bertacchini, J., D'Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmioli, S., Messori, M., 2019. Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. *Mater. Sci. Eng. C* 96, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.086>
- Stejskal Pavel, 2011. Kovové biokompatibilní materiály (Bakalářská práce). Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav materiálových věd a inženýrství, Brno.

Strnadová, K., Stanislav, L., Krabicová, I., Sabol, F., Lukášek, J., Řezanka, M., Lukáš, D., Jenčová, V., 2019. Drawn aligned polymer microfibers for tissue engineering, *Journal of Industrial Textiles*. <https://doi.org/10.1177/1528083718825318>

Takanezawa, Y., Nakamura, R., Sone, Y., Uruguchi, S., Kiyono, M., 2016. Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2016; 262:135-141. doi:10.1016/j.toxlet.2016.09.007

Tan, Dawud & Zhou, Chunfeng & Ellison, Christopher & Kumar, Satish & Macosko, Christopher & Bates, Frank. (2010). Meltblown fibers: Influence of viscosity and elasticity on diameter distribution. *Journal of Non-newtonian Fluid Mechanics - J Non-Newtonian Fluid Mech.* 165. 892-900. <https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2010.04.012>

Thomas, S., Grohens, Y., Ninan, N. (Eds.), 2015. Nanotechnology applications for tissue engineering. William Andrew, Oxford, England ; Waltham, Massachusetts.

Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X., 2012. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog. Polym. Sci.* 37, 237–280. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>

Todo, M., Takayama, T., 2011. Fracture Mechanisms of Biodegradable PLA and PLA/PCL Blends. *Biomaterials – Physics and Chemistry*. DOI: 10.5772/24199

Veverková Ivana, 2013. Vliv velikosti mezivláknových pórů na buněčnou proliferaci (Diplomová práce). Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, Liberec.

Vrbata Petr, 2015. Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv (Disertační Práce). Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.

Walkey, C.D., Chan, W.C.W., 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 41, 2780–2799. <https://doi.org/10.1039/C1CS15233E>

Wang, X., Ding, B., Li, B., 2013. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Mater. Today* 16, 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.005>

Wei, Q., Becherer, T., Angioletti-Uberti, S., Dzubiella, J., Wischke, C., Neffe, A.T., Lendlein, A., Ballauff, M., Haag, R., 2014. Protein Interactions with Polymer Coatings and Biomaterials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 8004–8031. <https://doi.org/10.1002/anie.201400546>

Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 35, 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>

Xing, X., Wang, Y., Li, B., 2008. Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate) 8.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Princip tkáňového inženýrství znázorňující získání a separaci buněk ze zvířete, výrobu scaffoldu, nasazení buněk na scaffold a implantaci do těla pacienta (Choi et al., 2014).....	13
Obrázek 2: Princip technologie výroby porózního materiálu technologiemi (a) fázovou separací b) Self-assambly (Wang et al., 2013).....	18
Obrázek 3: Schéma jehlového elektrostatického zvlákňování (Ghorani and Tucker, 2015).	21
<i>Obrázek 4: Schéma bez-jehlového elektrostatického zvlákňování z volné hladiny (Mohammadzadehmoghadam et al., 2016).</i>	<i>21</i>
Obrázek 5: Chemická struktura poly- ϵ -kaprolaktonu	23
Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny polymléčné.....	24
Obrázek 7: Schéma syntézy kopolymeru PLCL (Gilmour et al., 2015)	25
Obrázek 8: Znázornění měkké a tvrdé korony adsorbovaných proteinů na nanočástici (Cia., 2017).....	27
Obrázek 9: Znázornění rozpadu struktury proteinu způsobenou jeho denaturací (Wei et al., 2014).....	28
Obrázek 10: Schéma interakce mezi buňkou, proteiny a extracelulární hmotou.	28
Obrázek 11: Komora zlatičky s vloženým terčíkem s vzorkem materiálu PCL45	33
Obrázek 12: Testování smáčivosti vzorku vodou na přístroji tensiometr K12: pohled z boku (A) a pohled z předu (B) přístroje.	34
Obrázek 13: Snímek zařízení určeného pro SDS-PAGE elektroforézu.	36
Obrázek 14: Přístroj Azure c600 pro dokumentování gelů z SDS-PAGE.	37
Obrázek 15: Snímky materiálů pořízené skenovací elektronovou mikroskopií se zvětšením 1000x (měřítko 50 μm) (snímek vlevo) a se zvětšením 5000x (měřítko 10 μm) (snímek vpravo) a histogramy znázorňující danou četnost velikosti průměrů vláken materiálů A (PCL45), B (PCL80), C(PLCL) a D (PLA).	44
Obrázek 16: Snímky materiálů pořízené skenovací elektronovou mikroskopií se zvětšením 1000x (měřítko 50 μm) (snímek vlevo) a se zvětšením 5000x (měřítko 10 μm) (snímek vpravo) a histogramy znázorňující danou četnost velikosti průměrů vláken materiálů A (Blend 1:1 (PCL45)), B (Blend1:1 (PCL80)), C (Blend 1:3 (PCL80)) a D (Blend 3:1 (PCL80)).....	45

Obrázek 17: Krabicový graf hodnot naměřených průměrů vláken testovaných materiálů včetně vyznačení průměrných hodnot průměrů vláken (x), mediánu (— (uvnitř krabice)) a odlehlých hodnot (•).	46
Obrázek 18: Obrázek znázorňující graf průměrných naměřených hodnot smáčivosti jednotlivých testovaných materiálů.....	48
Obrázek 19: Graf množství slabě vázaných proteinů po oplachu PBS měřených spektrofotometricky metodou dle Bradforda (při 595 nm) (pozn. BL1:1(45) = Blend1:1(PCL45), BL1:1(80) = Blend1:1(PCL80))	50
Obrázek 20: Snímky gelů silně vázaných proteinů na vzorcích testovaných materiálů s vyznačeným markerem molekulových hmotností získaných z SDS-PAGE elektroforézy.	52
Obrázek 21: Graf množství silně vázaných proteinů na materiálech (průměrné hodnoty) po desorpci pomocí 1 % SDS metodou Quant- iT protein assay kit (pozn. BL1:1(45) = Blend1:1(PCL45), BL1:1(80) = Blend1:1(PCL80))	53
Obrázek 22: Graf znázorňující adsorpci slabě vázaných proteinů, silně vázaných proteinů a celkového množství adsorbovaných proteinů na jednotlivých testovaných materiálech (pozn. BL11(45) = Blend1:1(PCL45), BL11(80) = Blend1:1(PCL80))	54
Obrázek 23: Graf znázorňující viabilitu buněk na materiálech PCL45, PCL80, PLCL, PLA, Blend1:1(PCL45), Blend1:1(PCL80) ve čtyřech odběrových dnech (1., 3., 7. a 14. den) - CCK	55
Obrázek 24: Snímky z elektronové mikroskopie z 1., 3., 7. a 14. testovacího dne kultivace buněk na materiálech PCL45, PCL80, PLCL, PLA, Blend 1:1 (PCL45:LCL), Blend 1:3 (PCL45:PLCL), Blend 3:1 (PCL45:PLCL) použitých pro testování mikro/nanovlákných vrstev v interakci s buňkami 3T3-myšimi fibroblasty se zvětšením 1000x (měřítko 50μm).	57
Obrázek 25: Snímky z fluorescenční mikroskopie obarvených buněčných jader pomocí DAPI (modrá) na mikro/nanovlákných vrstvách materiálů PCL 45, PCL 80, PLCL, PLA, Blend 1:1 (PCL45), Blend 1:1 (PCL80) se zvětšením 10x a měřítkem 100μm ...	58
Obrázek 26: Snímky z fluorescenční mikroskopie složených snímků obarvených buněčných jader pomocí DAPI (modrá) a celých buněk phalloidin-FITZ (zelená) na mikro/nanovlákných vrstvách materiálů PCL45, PCL80, PLCL, PLA, Blend 1:1(PCL45), Blend 1:1(PCL80) se zvětšením 20x a měřítkem 100μm.....	59

Seznam tabulek

Tabulka 1: Materiály používané ve tkáňovém inženýrství, jejich vlastnosti a aplikace (Ratner, 2012; Scott Lamber, 2018, Michálek, 2018).....	15
Tabulka 2: Použité polyesterové biodegradabilní polymery	30
Tabulka 3: Použité přístroje pro zvolené metody testování	30
Tabulka 4: Programy použité pro zpracování výsledků získané z testování.....	30
Tabulka 5: Použité chemikálie a média.....	30
Tabulka 6: Použité roztoky.....	31
Tabulka 7: Tabulka s použitými polymerními roztoky pro výrobu mikro/nano-vlákných materiálů.....	42
Tabulka 8: Testované polyesterové vlákné materiály	43
Tabulka 9: Hmotnosti vzorků testovaných materiálů pro měření smáčivosti	47

Seznam příloh

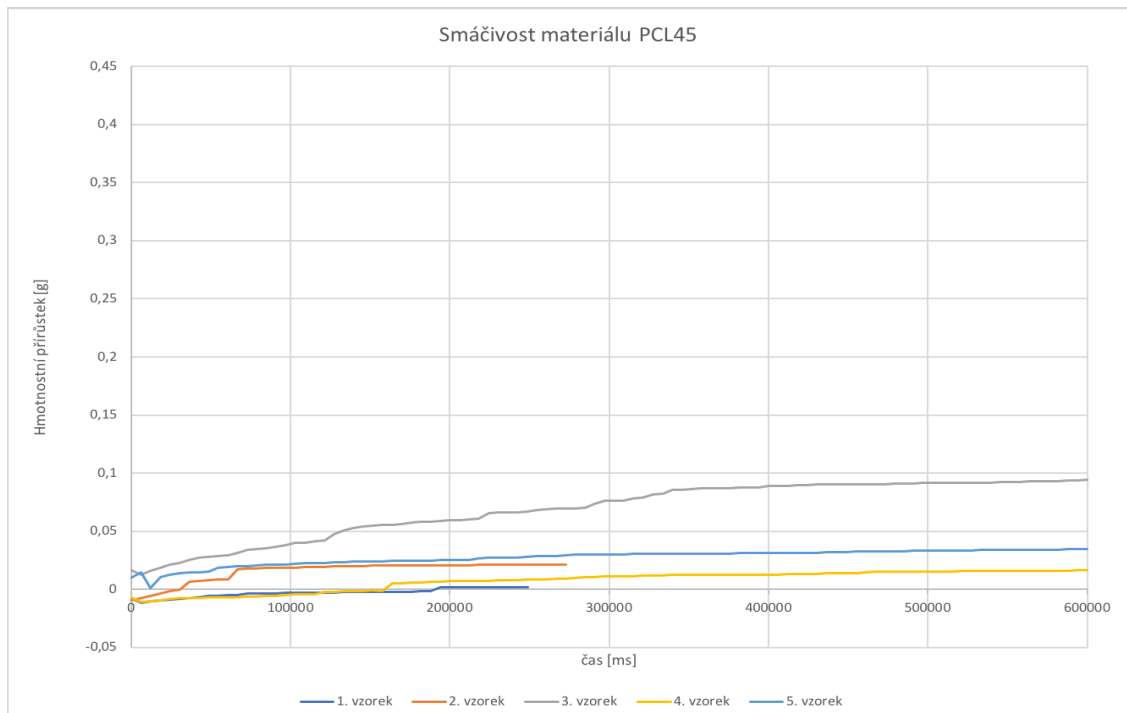
Příloha A: Hmotnosti vzorků pro testování smáčivosti materiálů	72
Příloha B: Grafy testování smáčivosti materiálů pro jednotlivé materiály	73
Příloha C: Hmotnosti vzorků pro adsorpci proteinů	76
Příloha D: Grafy testování metodou Quant-iT kit protein assay	76

Příloha A: Hmotnosti vzorků pro testování smáčivosti materiálů

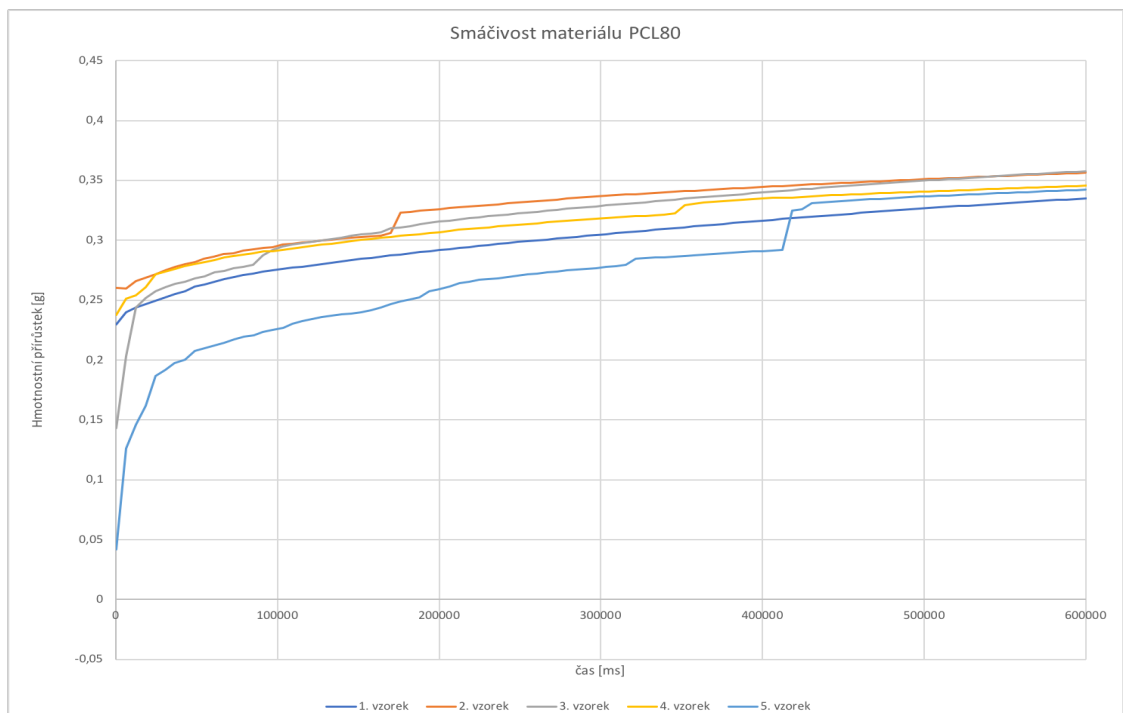
Tabulka A-1: Hmotnosti vzorků jednotlivých materiálů určených pro měření smáčivosti materiálů

[g]	PCL45	PCL80	PLCL	PLA	Blend 1:1 (PCL45)	Blend 1:1 (PCL80)
1. vzorek	0,0191	0,0209	0,0183	0,0200	0,0240	0,0283
2. vzorek	0,0193	0,0209	0,0190	0,0255	0,0240	0,0288
3. vzorek	0,0184	0,0216	0,0168	0,0236	0,0242	0,0285
4. vzorek	0,0192	0,0223	0,0170	0,0237	0,0243	0,0240
5. vzorek	0,0207	0,0217	0,0168	0,0233	0,0239	0,0274

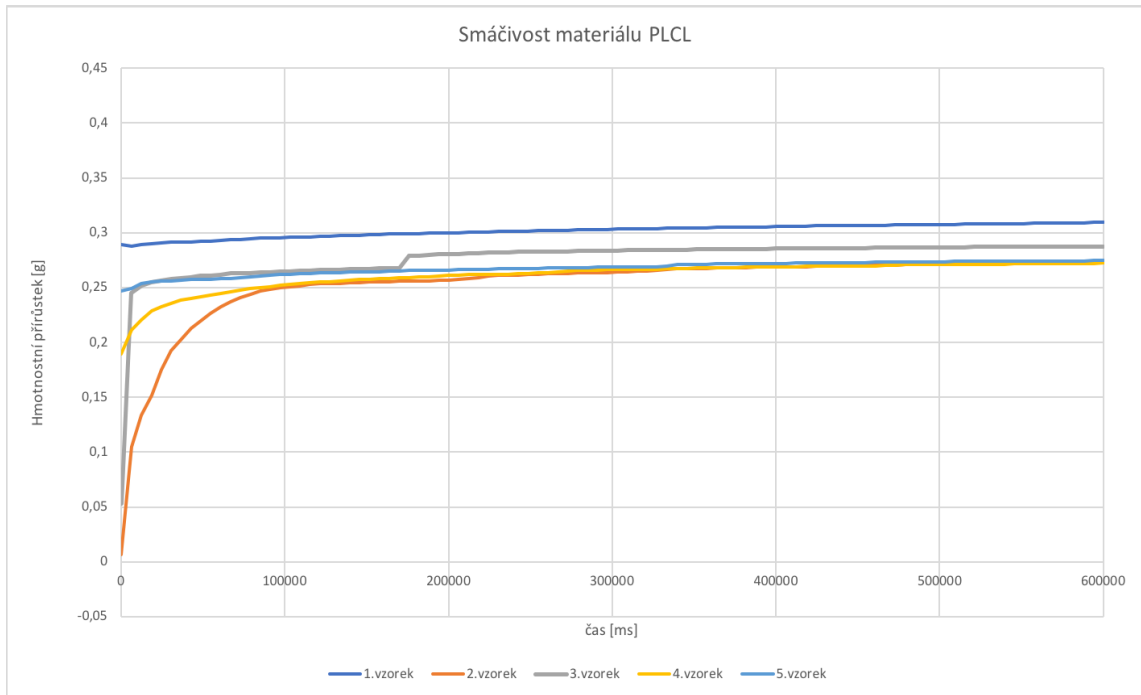
Příloha B: Grafy testování smáčivosti materiálů pro jednotlivé materiály



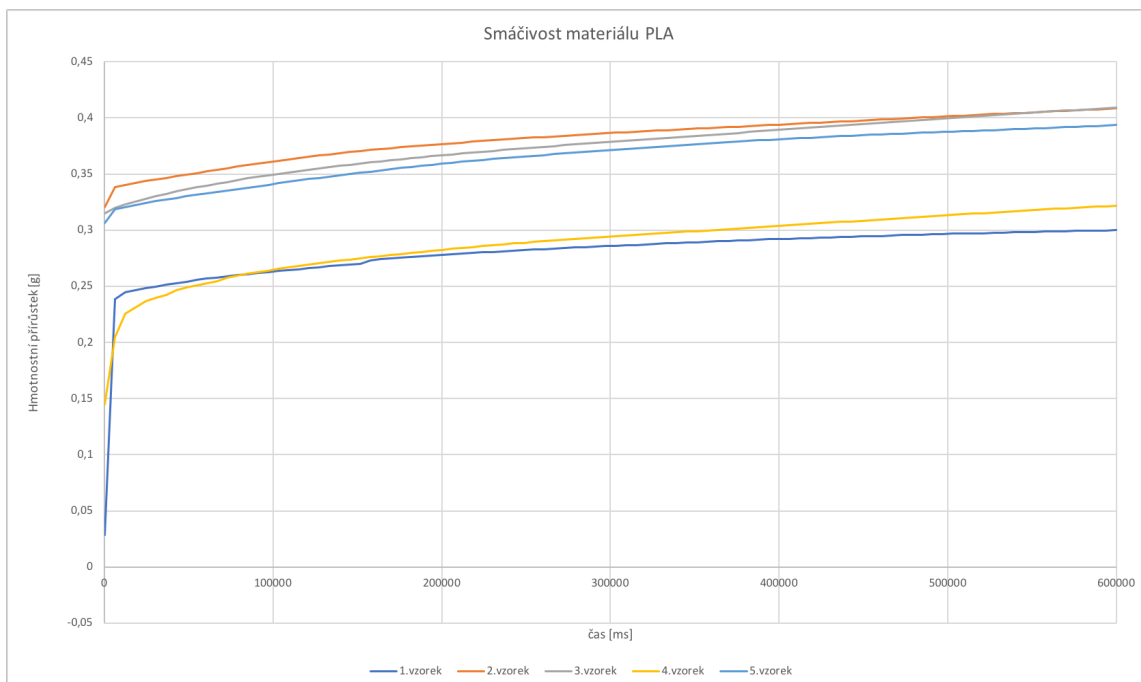
Obrázek B-1: Graf průběhu smáčivosti materiálu PCL45



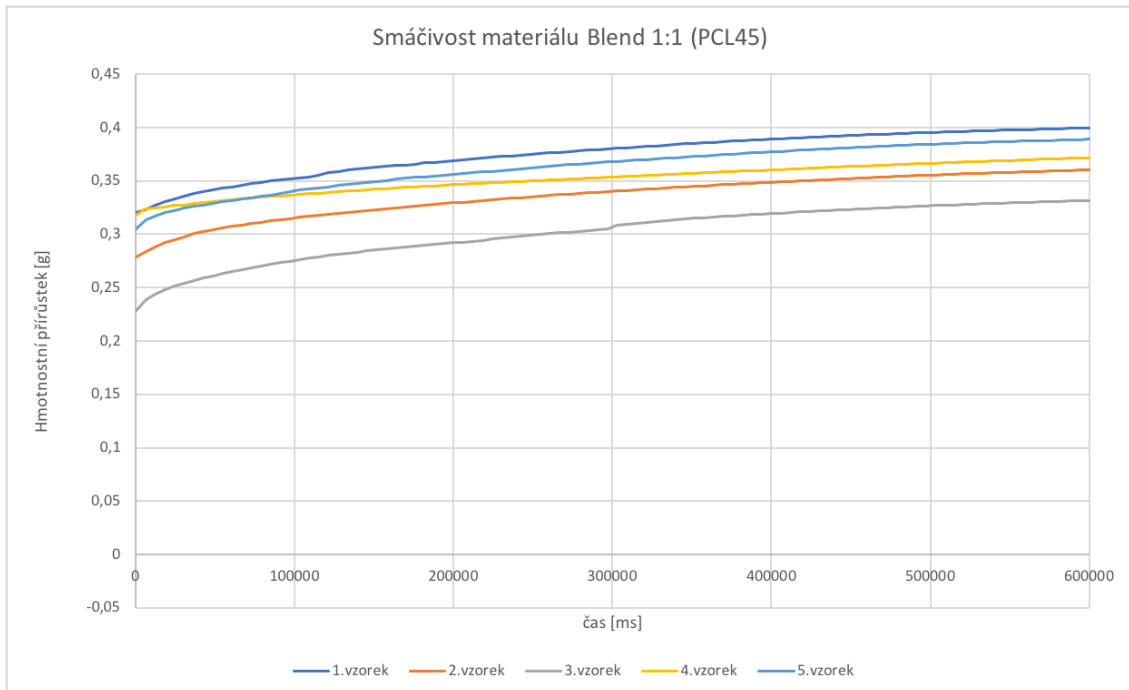
Obrázek B-2: Graf průběhu smáčivosti materiálu PCL80



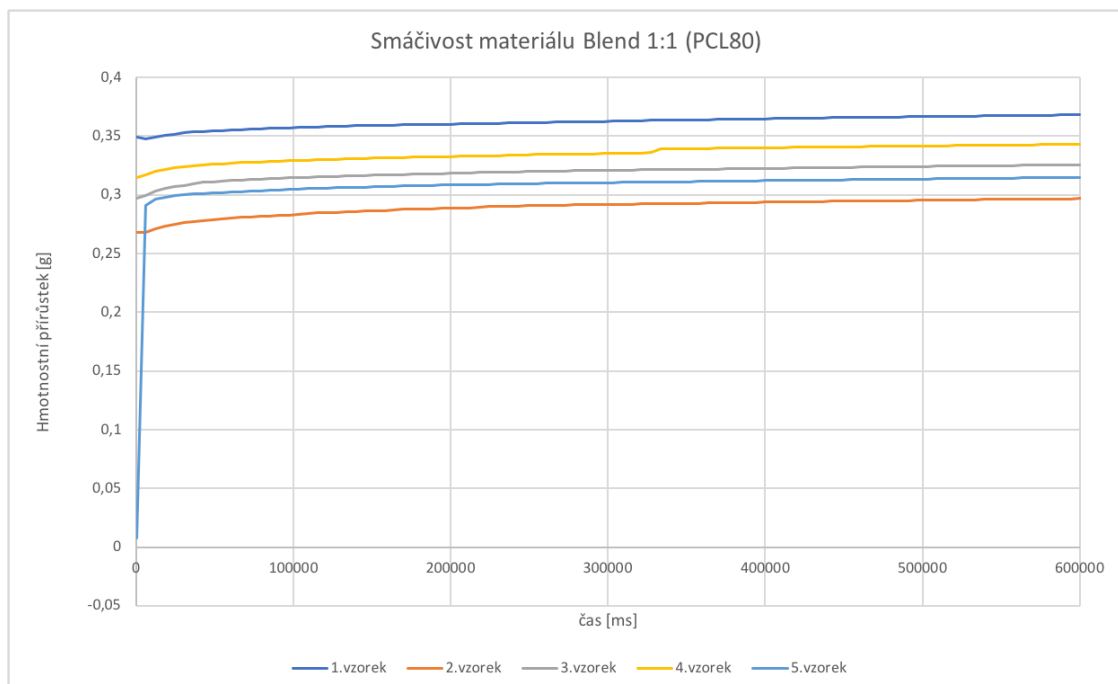
Obrázek B-3: Graf průběhu smáčivosti materiálu PLCL



Obrázek B-4: Graf průběhu smáčivosti materiálu PLA



Obrázek B-5: Graf průběhu smáčivosti materiálu Blend 1:1 (PCL45)



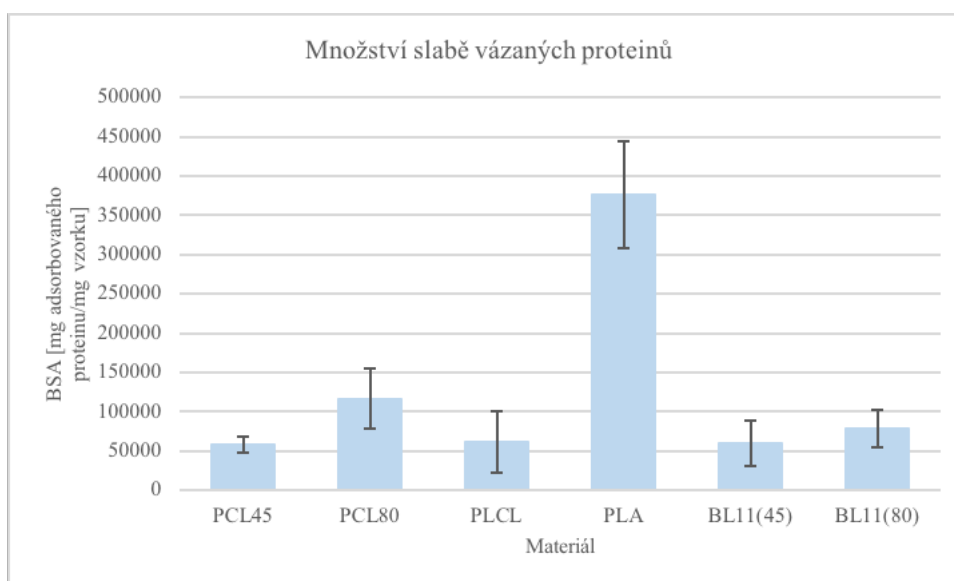
Obrázek B-6: Graf průběhu smáčivosti materiálu Blend 1:1 (PCL80)

Příloha C: Hmotnosti vzorků pro adsorpci proteinů

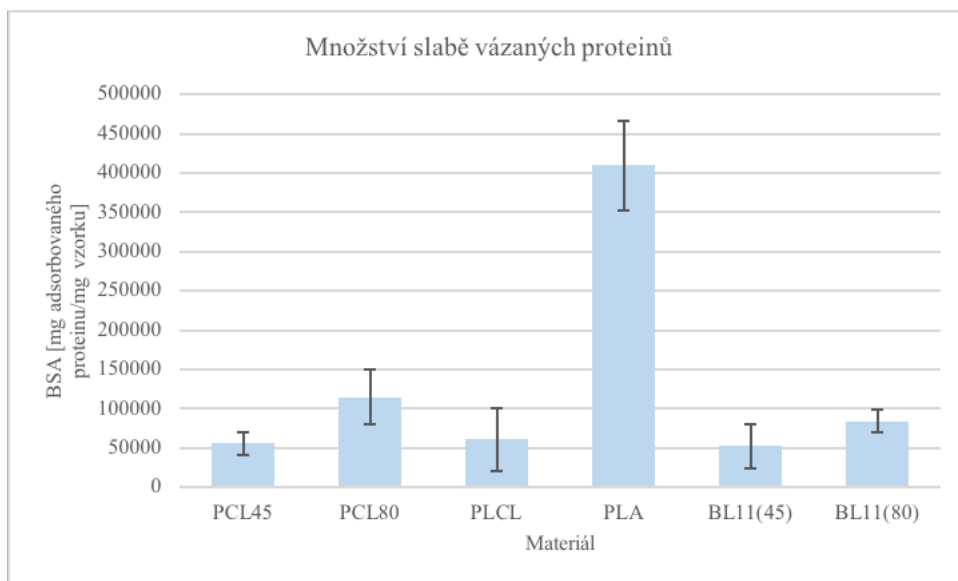
Tabulka C-1: Hmotnosti vzorků materiálů pro měření adsorpce proteinů

[mg]	PCL 45	PCL 80	PLCL	PLA	Blend 1:1 (PCL 45)	Blend 1:1 (PCL 80)
1. vzorek	8,1	8,8	8,5	7,8	8,9	10,2
2. vzorek	8,2	8,8	8,6	7,7	8,8	10,2
3. vzorek	8,3	8,9	8,6	7,7	8,7	10,2
4. vzorek	8,4	8,6	8,5	7,9	8,6	9,1
NC	8,6	8,4	8,3	8,0	8,6	10,3

Příloha D: Grafy testování metodou Quant – iT kit protein assay



Obrázek D-1: Graf množství silně vázaných proteinů na materiálech (1. měření) po desorpci pomocí 1 % SDS metodou Quant – iT protein assay kit



Obrázek D-2: Graf množství silně vázaných proteinů na materiálech (2. měření) po desorpci pomocí 1 % SDS metodou Quant – iT protein assay kit