

Příprava filmů a koloidů na bázi vodivých polymerů a chitosanu

Bc. Markéta Zálešáková

Diplomová práce
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Zálešáková**
Osobní číslo: **T210088**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Příprava filmů a koloidů na bázi vodivých polymerů a chitosanu**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

1. Zpracujte literární přehled týkající se vlastností vodivých polymerů se zaměřením především na polyaniline a polypyrrole a jejich využití v tkáňovém inženýrství.

II. Praktická část:

1. Připravte elektricky vodivé filmy a koloidy na bázi polypyrrolu a chitosanu.

2. Stanovte elektrickou vodivost filmů.

3. Seznamte se s kultivací běžných buněčných linií, následné dovednosti využijte při testování biologických vlastností vodivých polymerů jako je adheze, proliferace či migrace.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [2] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.
- [3] HUMPOLICEK P. et al. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications 2018, 91, pp 303–310, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.037>.
- [4] KASPARKOVA V. et al. Exploring the Critical Factors Limiting Polyaniline Biocompatibility. Polymers. 2019, 11(2):362, doi: [10.3390/polym11020362](https://doi.org/10.3390/polym11020362).
- [5] SKOPALOVA K. et al. Modulation of Differentiation of Embryonic Stem Cells by Polypyrrole: The Impact on Neurogenesis. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(2):501, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22020501>.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Kateřina Skopalová**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Biomedicínské aplikace vyžadují nejen biokompatibilní materiály, ale zejména materiály, které mohou reagovat na vnější podněty jako je např. elektrický proud. Vodivé polymery splňují obě kritéria a řadíme je mezi tzv. „chytré materiály“. Diplomová práce byla zaměřena na seznámení se s vlastnostmi vodivých polymerů a jejich možnosti využití v tkáňovém inženýrství. Největší pozornost je věnována dvěma slibným zástupcům polypyrrolu a polyanilinu. Cílem praktické části pak byla příprava koloidních disperzí a filmů na bázi polypyrrolu a chitosanu. Byla stanovena velikost koloidních částic a změřena vodivost připravených koloidních filmů. Dále byla testována biokompatibilita připravených materiálů. Cytotoxicita koloidních disperzí byla stanovena pomocí MTT testu. Kromě cytotoxicity byla zkoumána také schopnost buněčných linií NIH/3T3 a ES-R1 proliferovat na připravených koloidních filmech. Výsledky ukazují, že připravené materiály na bázi polypyrrolu a chitosanu jsou vodivé a vykazují dobrou biokompatibilitu u obou použitých buněčných linií.

Klíčová slova: chitosan, koloidní disperze, koloidní film, polypyrrol, tkáňové inženýrství, vodivé polymery

ABSTRACT

Biomedical applications require not only biocompatible materials, but also materials that react to external stimuli such as electrical currents. Conducting polymers fulfil both criteria and are classified as “smart materials”. The focus of this thesis was to learn about the properties of conducting polymers and their potential application in tissue engineering. Most attention is paid to two promising representatives of polypyrrole and polyaniline. The aim of the practical part was the preparation of colloidal dispersions and films based on polypyrrole and chitosan. The size of the colloidal particles was determined and the conductivity of the prepared colloidal films was measured. Furthermore, the biocompatibility of the prepared materials was tested. The cytotoxicity of the colloidal dispersions was determined by MTT assay. In addition to cytotoxicity, the ability of NIH/3T3 and ES-R1 cell lines to proliferate on the prepared colloidal films was also investigated. The results show that the materials based on polypyrrole and chitosan are conductive and show good biocompatibility for both cell lines used.

Keywords: chitosan, conducting polymers, colloidal dispersion, colloidal film, polypyrrole, tissue engineering

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. za profesionální vedení, odborné rady, věnovaný čas a pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří svou pomocí přispěli ke vzniku této diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	13
1.1 OD HISTORIE PO SOUČASNOST	13
1.2 PŘÍSTUPY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	14
1.2.1 Aplikace biomateriálů jako lešení	14
1.2.2 Využití buněk pro tvorbu umělých tkání a orgánů.....	14
1.2.3 Aplikace lešení a signálních molekul.....	14
1.2.4 Využití scaffoldů, buněk a signálních molekul	15
1.2.5 Technologie genově aktivované matrice (GAM).....	15
1.3 ZDROJE A TYPY BUNĚK PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	16
1.3.1 Kmenové buňky	17
1.3.2 Buněčné kultury	19
1.4 SCAFFOLDY A POŽADOVANÉ VLASTNOSTI	20
1.4.1 Architektura lešení	20
1.4.2 Mechanické vlastnosti	21
1.4.3 Biokompatibilita, bioaktivita a rozložitelnost	21
2 BIOMATERIÁLY	22
2.1 KOVY	22
2.2 KERAMIKA	22
2.3 SYNTETICKÉ POLYMERY	23
2.4 PŘÍRODNÍ POLYMERY	23
3 CHITOSAN	25
4 VODIVÉ POLYMERY (CP)	26
4.1 MECHANISMUS ELEKTRICKÉ VODIVOSTI CP	27
4.1.1 Doping	28
4.1.2 Self-dopingový efekt	29
4.2 POLYMERIZAČNÍ PŘÍSTUPY	29
4.2.1 Chemická syntéza.....	30
4.2.2 Elektrochemická syntéza	30
4.3 POLYANILIN (PANI)	31
4.4 POLYPYROL (PPY).....	32
5 VÝROBA VODIVÝCH BIOMATEIRÁLŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	34
5.1 VODIVÉ SMĚSI NEBO KOMPOZITNÍ FILMY	34
5.2 VODIVÁ NANOVLÁKNA	35
5.4 VODIVÉ KOMPOZITNÍ 3D SCAFFOLDY	36

II PRAKTICKÁ ČÁST	37
6 CÍLE PRÁCE	38
7 MATERIÁL A METODY	39
7.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	39
7.2 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ.....	40
7.3 VODIVÉ KOLOIDNÍ DISPERZE A FILMY.....	41
7.3.1 Příprava koloidů.....	42
7.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	44
7.4.1 Kultura myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3.....	44
7.4.2 Kultura myších embryonálních kmenových buněk ES-R1.....	44
7.4.3 Pěstování buněčných kultur	44
7.5 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY.....	45
7.5.1 Charakterizace koloidů pomocí měření velikosti částic.....	45
7.5.2 Vodivost koloidních filmů	45
7.5.3 Biokompatibilita.....	45
8 VÝSLEDKY A DISKUZE	48
8.1 CHARAKTERIZACE KOLOIDNÍCH DISPERZÍ POMOCÍ MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	48
8.2 VODIVOST KOLOIDNÍCH FILMŮ.....	49
8.3 TESTOVÁNÍ BOKOMPATIBILITY.....	50
8.3.1 Cytotoxicita koloidních disperzí – MTT test	50
8.3.2 Test proliferace buněk na koloidních filmech.....	53
9 ZÁVĚR	57
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
SEZNAM OBRÁZKŮ	65
SEZNAM TABULEK	66

ÚVOD

Tkáňové inženýrství je vyvíjející se obor, který má potenciál poskytovat trvalá řešení poškození a ztráty tkáně milionům lidí každý rok. Základní přístup k tkáňovému inženýrství zahrnuje použití buněk, scaffoldů a signálních faktorů, samotných nebo v kombinaci. Míra úspěšnosti tkáňového inženýrství je závislá na schopnostech scaffoldů napodobovat funkci extracelulární matrix (ECM) specifické tkáně a poskytovat kompatibilní prostředí pro regeneraci tkání a transplantaci orgánů. Dosud byly vyvinuty různé typy biomateriálových scaffoldů, buď přírodního nebo syntetického původu. Za účelem výroby elektricky vodivých konstruktů pro regeneraci nervových, svalových a srdečních tkání jsou v dnešní době atraktivní vodivé polymery (Liang and Goh, 2020).

Vodivé polymery včetně polyanilinu (PANI) a polypyrrolu (PPy) byly rozsáhle zkoumány pro kultivaci buněk citlivých na elektrické impulzy. Mezi polymery přitahuje PPy zvláštní pozornost pro své laditelné elektrické vlastnosti, biokompatibilitu, dobrou environmentální a tepelnou stabilitu, snadnou syntézu a dobré mechanické vlastnosti. Navíc implantovaný PPy vykazoval regeneraci neuronů a růst axonů s minimální imunitní reakcí *in vivo* (Manzari-Tavakoli *et al.*, 2020). Při použití vodivých polymerů v tkáňovém inženýrství však existují překážky. Jedním z omezení použití je jejich vlastní neschopnost degradovat, což může způsobit indukci chronického zánětu. Navíc křehkost, hydrofobnost, špatná rozpustnost a zpracování ztěžuje použití samotného vodivého polymeru. Většina studií se proto zaměřila na konstrukci vodivých polymerů na bázi kompozitů. Biokompatibilita a biodegradačních vlastností vodivých polymerů se obecně dosahuje jejich začleněním do přírodních biodegradovatelných sloučenin, jako je například chitosan (Ahmad Ruzaidi *et al.*, 2021).

Chitosan, odvozený od chitinu, je unikátní přírodní polysacharid se strukturální podobností s glykosaminoglykany extracelulární matrice. Díky vynikajícími vlastnostem jako je biologická rozložitelnost, biokompatibilita a antimikrobiální aktivita se aktivně používá v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, buď jako samotný biomateriál nebo v kombinaci s jinými polymery (Sultankulov *et al.*, 2019).

Diplomová práce je zaměřena zejména na vlastnosti vodivých polymerů a jejich možné využití v tkáňovém inženýrství. V praktické části byly připraveny koloidní disperze a vodivé filmy na bázi PPy a chitosanu. Cytotoxicita připravených koloidů byla vyhodnocena pomocí

MTT testu. Dále byla sledována proliferace myších embryonálních fibroblastů (NIH/3T3) a myších embryonálních kmenových buněk (ES-R1) na vodivých filmech.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství (TE) lze považovat za jednu z vědeckých platforem regenerativní medicíny. Slibuje náhradu konvenčních způsobů léčby, jako jsou transplantace orgánů, umělé implantáty atd. Jedná se o tvorbu nových tkání záměrnou a řízenou stimulací vybraných cílových buněk prostřednictvím systematické kombinace molekulárních a mechanických signálů, a to zejména pro terapeutické rekonstrukce lidského těla (Langer and Vacanti, 2016).

1.1 Od historie po současnost

Jedna z prvních experimentálních studií tkáňového inženýrství týkající se oblasti transplantací byla publikována v roce 1988. V této studii vědci nasadili fetální a dospělé potkaní a myší hepatocyty, buňky pankreatických ostrůvků a buňky z tenkého střeva na syntetické lešení. Tyto skelety – scaffoldy se skládaly z biologicky odbouratelných polymerů organizovaných do propletených vláknitých sítí napodobující funkční tkáň. Životaschopnost buněk na polymerním scaffoldu se lišila v závislosti na typu polymerního materiálu. Až 90 % životaschopnost buněk byla zaznamenána u polyglactinu 910. Po 4 dnech kultivace byly scaffoldy z buněk a polymeru implantovány myším a potkanům do různých míst (omentum, mezilopatkový tukový polštář, mezenterium). Bylo zaznamenáno celkem šest případů úspěšného připojení hepatocytů a střevních buněk v omentu (Vacanti *et al.*, 1988).

Během několika let po tomto úspěšném pokusu bylo zkonstruováno a implantováno mnoho tkání. Jedním z nejznámějších případů bylo vytvoření umělého ucha v roce 1997. Syntetické lešení ve tvaru vnějšího ucha bylo naočkováno bovinními chondrocyty a implantováno pod kůži myši. Po 12 týdnech histologie ukázala životaschopné a fungující chondrocyty, tvorbu chrupavky a novou extracelulární matrici (ECM), která nakonec zcela nahradila původní syntetické lešení (Orlando *et al.*, 2011). V roce 1991 se mladý pacient s Polandovým syndromem, vrozenou malformací hrudního koše a absencí hrudní kosti, stal prvním člověkem, který dostal implantát určený k náhradě chybějící kosti. Tento implantát byl složený z autologních chondrocytů nasazených na lešení z porézních polymerních vláken (Vacanti, 2006).

Dnes je TE prosperující oblastí. Téměř každá tkáň lidského těla byla studována z hlediska možnosti nahrazení živými tkáňovými strukturami. Každý rok více klinických studií ukazuje úspěch vedoucí ke klinické aplikaci. Stále však existují značné technické problémy, které je

potřeba v této oblasti překonat, jako je například efektivní výroba biokompatibilních materiálů, neimunogenní univerzální buněčné linie a další (Langer and Vacanti, 2016).

1.2 Přístupy tkáňového inženýrství

Tkáně se skládají ze specifických typů buněk, extracelulární matrix a lokálních signálních molekul, které dohromady tvoří jejich vlastní komplexní mikroprostředí. Existuje několik přístupů tkáňového inženýrství, které se zaměřují jak na reprodukci tohoto mikroprostředí, tak na jeho účinnou obnovu v poškozené tkáni. Základní strategie TE lze však rozdělit na metody založené na lešení a metody bez lešení (Ahmed *et al.*, 2018).

1.2.1 Aplikace biomateriálů jako lešení

Scaffoldy jsou struktury fungující jako templáty pro tvorbu tkáně tím, že umožňují buňkám adherovat, migrovat, proliferovat a produkovat extracelulární matrix. Mohou být vyrobeny ze syntetických nebo absorbovatelných, přirozeně se vyskytujících, biologických, degradovatelných nebo nedegradovatelných polymerních materiálů. Použití scaffoldů umožňuje zachovat prostor a stabilizovat ránu *in vivo*, což je nezbytné pro úspěšnou a efektivní regeneraci. Navzdory výhodám, které scaffold poskytuje, může mít použití samotného scaffoldu nepříznivé účinky, které se mohou projevit snížením životaschopnosti buněk v důsledku zhoršené difúze živin a biodegradací materiálu (Zurina *et al.*, 2020).

1.2.2 Využití buněk pro tvorbu umělých tkání a orgánů

V přístupech bez scaffoldu mohou být buňky zaváděny lokálně nebo dokonce i systémově. Přímá aplikace buněk však brání jejich terapeutickému působení v důsledku buněčné disperze a šíření do jiných tkání. Buňky lze také podávat prostřednictvím techniky buněčných listů nebo trojrozměrných buněčných mikrosfér. Techniku buněčných listů lze popsat jako dvourozměrné (2D) samoorganizované mnohobuněčné náplasti a lze je ve své struktuře a kolektivním chování přirovnat k buněčným listům v embryonálním vývoji (Zurina *et al.*, 2020).

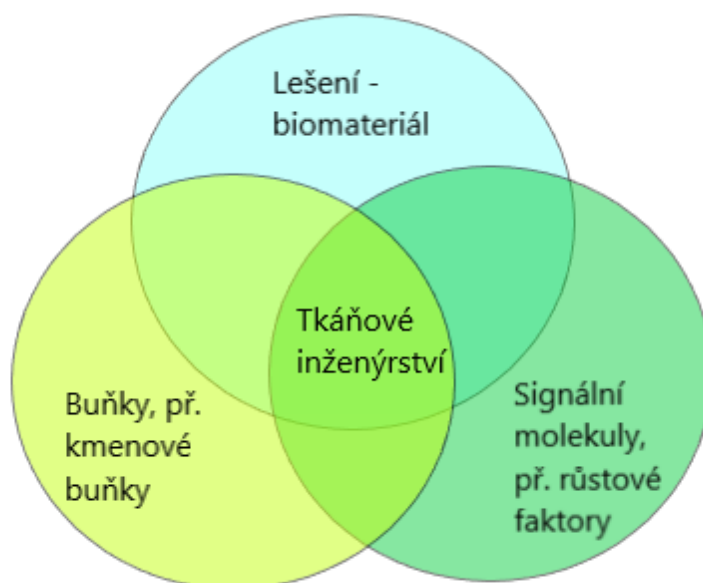
1.2.3 Aplikace lešení a signálních molekul

Procesy tvorby nových tkání a ukládání extracelulární matrix jsou regulovány řadou růstových faktorů a biomolekul. Růstové faktory (RF) jsou rozpustné difúzní signální polypeptidy, které hrají zásadní roli v buněčném růstu, diferenciaci a proliferaci. Jejich přidání ke konstruktům lešení pro regeneraci tkáně bývá mnohdy nezbytné. Bylo zjištěno, že

RF indukují neovaskularizaci a zajišťují adekvátní přísun živin do vyvíjejících se tkání. V dnešní době jsou jako růstové faktory hodně používané kostní morfogenní proteiny, základní fibroblastové růstové faktory a vaskulární epiteliální růstový faktor. Aplikace RF je prováděna například pomocí DNA plazmidů kódovaných genem požadovaného RF nebo zavedení genu kódujícího konkrétní RF do specifického buněčného typu pomocí vektoru (Sharma *et al.*, 2019).

1.2.4 Využití scaffoldů, buněk a signálních molekul

Použití lešení, buněk a signálních molekul dohromady je nejčastěji využívaný přístup v tkáňovém inženýrství. Tato lešení posetá buňkami se buď kultivují *in vitro*, aby se syntetizovaly tkáně, které pak mohou být implantovány do poraněného místa, nebo jsou implantovány přímo do poraněného místa, kde je pomocí vlastních systémů těla indukována regenerace tkání nebo orgánů *in vivo*. Tato kombinace buněk, signálů a scaffoldu je často označována jako triáda tkáňového inženýrství viz schéma na Obrázku 1 (O'Brien, 2011).



Obrázek 1 Principy tkáňového inženýrství (upraveno podle O'Brien, 2011)

1.2.5 Technologie genově aktivované matrice (GAM)

Strategie dodávání lešení a biosignálů vyžaduje také přímé přidání růstových faktorů, které však mají krátký biologický poločas. Jsou vyžadovány vysoké a opakované dávky růstových faktorů, což má za následek vysoké náklady a potenciálně nežádoucí vedlejší

klinické účinky, jako je heterotopická osifikace, zvýšené riziko rakoviny, hypotenze a edém. Přístupy tkáňového inženýrství tedy byly rozšířeny o technologii genově aktivované matrice (GAM), kdy se jedná o přímý přenos genů vsazených do lešení. Jednou z výhod je řízená a prodloužená exprese proteinu v průběhu času bez opakovaných dávek v místě opravy tkáně. GAM v podstatě slouží jako sklad pro geny a zároveň poskytuje strukturální podporu a vhodné mikroprostředí pro tvorbu nové tkáně. Vývoj genových vektorů s nízkou cytotoxicitou a uspokojivou účinností genové transfekce, stejně jako způsoby zavedení genových vektorů do vhodného lešení bezpečným a účinným způsobem však vyžadují hlubší průzkum (He *et al.*, 2022).

1.3 Zdroje a typy buněk pro tkáňové inženýrství

Navzdory pokroku v přípravě biomateriálů s vhodnými mechanickými a biologickými vlastnostmi, či pokroku v sestavení bioreaktorů pro generování správného tkáňového mikroprostředí, zůstává zdroj buněk, které tvoří tkáně, velkou výzvou pro oblast tkáňového inženýrství (Bajpai and Andreadis, 2012). Zdroj buněk používaných v TE zcela závisí na tkáni nebo orgánu, který má být regenerován, a na přirozeném regeneračním potenciálu konkrétního místa. Buňky používané v tkáňovém inženýrství mohou být čerstvě izolované buňky odebrané z jiného místa a umístěné přímo do místa defektu, dále buňky nasazené na lešení sestavené *in vitro* nebo jednoduše lokální buňky, které jsou blízko místa defektu a jsou schopny se zapojit se do regenerace tkáně *in situ*. (Laird *et al.*, 2021).

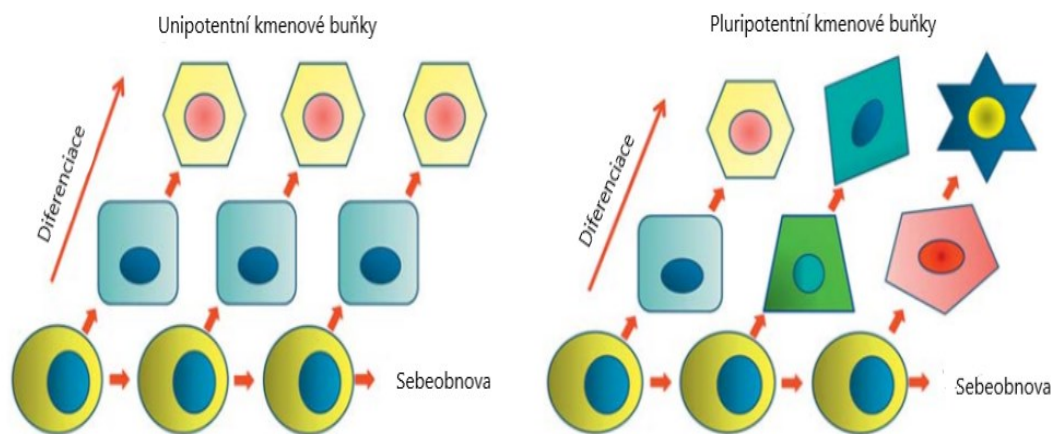
Rozlišujeme hlavní tři typy buněčných zdrojů uvažovaných v tkáňovém inženýrství a to autologní (buňky pacienta), alogenní (dárcovské buňky) nebo xenogenní (odvozené ze zvířecích buněk). Za nejméně bezpečné jsou považovány xenogenní buňky, protože byly hlášeny případy výskytu prasečího endogenního retroviru u prasat. Přestože se autologní buňky považují za nejbezpečnější pro TE, dostatečný odběr činil problém u starších pacientů nebo těžce nemocných (Sharma *et al.*, 2019).

Cílem je najít ideální buněčný zdroj, který lze snadno izolovat, je schopen expanze a lze jej kultivovat za účelem exprese a syntézy molekul specifických pro danou tkáň. Somatické buňky, jako jsou osteoblasty a chondrocyty, byly mezi prvními buněčnými zdroji, které byly použity v různých aplikacích tkáňového inženýrství. Diferencované buňky však mají relativně vysokou spotřebu kyslíku a nízký potenciál pro expanzi (T. Brown *et al.*, 2013). Většina studií v dnešní době se zaměřuje na kmenové buňky, které jsou multipotentní a lze je izolovat z velkého množství tkání (Chung and Burdick, 2009).

1.3.1 Kmenové buňky

Jedny z nejslibnějších buněk pro tkáňové inženýrství jsou kmenové buňky. Jedná se o nediferencované buňky přítomné v embryonální, fetální a dospělé fázi života a dávají vzniknout diferencovaným buňkám, které jsou stavebními kameny tkání a orgánů. V postnatálním a dospělém stádiu života se tkáňově specifické kmenové buňky nacházejí v diferencovaných orgánech a pomáhají při opravě po poranění orgánu. Mezi dospělé kmenové buňky řadíme například hematopoetické kmenové buňky schopné diferenciace na všechny krvinky a mezenchymální kmenové buňky MSC, ze kterých mohou vzniknout kosti, chrupavky a tukové tkáně. MSC také tvoří důležitou část hematopoetického stromatu, ale nemohou se diferencovat na krevní buňky. Hematopoetické kmenové buňky byly první kmenové buňky, jejichž existence byla potvrzena funkčními testy a zároveň první kmenové buňky, které se začaly uplatňovat v medicíně (Lagarkova, 2019).

Hlavní charakteristiky kmenových buněk jsou sebeobnova (schopnost extenzivně se množit bez ztráty diferenciačního potenciálu) a potence (schopnost diferencovat se na různé typy buněk). Kmenové buňky také vylučují různé druhy trofických faktorů, které mohou regulovat imunitní odpověď nebo upravovat buněčné mikroprostředí pro regeneraci tkání, což jim dává výrazné výhody oproti terminálně diferencovaným buňkám. Kromě toho mohou být všechny tyto buňky geneticky modifikovány pro získání požadovaných vlastností. Každá jednotlivá dceřiná buňka se může symetricky dělit na další kmenové buňky nebo se diferencovat na jednu nebo více specializovaných buněk, v závislosti na pluripotenci kmenové buňky, při zachování populace tkáňových buněk. K asymetrickému dělení dochází, když kmenová buňka generuje identickou dceřinou buňku a druhou diferencovanou dceřinou buňku. Tento proces umožňuje opravu a regeneraci orgánů při zachování populace kmenových buněk viz Obrázek 2 (Kolios and Moodley, 2013).



Obrázek 2 Kmenové buňky – sebeobnova a diferenciacie (upraveno podle Takahashi and Yamanaka, 2006)

1.3.1.1 Typy kmenových buněk podle diferenciačního potenciálu

Kmenové buňky lze na základě diferenciačního potenciálu kategorizovat do 5 skupin: totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní a unipotentní.

Totipotentní neboli omnipotentní buňky jsou nejvíce nediferencované buňky a nacházejí se v raném vývoji. Oplodněný oocyt a buňky prvních dvou dělení jsou totipotentní buňky, které se dále diferencují na embryonální i extraembryonální tkáně, čímž tvoří embryo a placentu. Pluripotentní jsou buňky, které mají schopnost diferenciacie na typy buněk reprezentující všechny tři zárodečné vrstvy. Mezi pluripotentní kmenové buňky můžeme zařadit např. embryonální kmenové buňky (ESC), které jsou odvozeny z kultur buněk vnitřní buněčné hmoty blastocysty. Objev a izolace lidských ESC otevřely nové dveře ve výzkumu vývoje tkání a mnoha různých chorobných stavů. Možné riziko imunogenicity, tumorigenicity a také etické problémy týkající se použití lidských embryí však stále limitují jejich použití v klinice (Shokeir, Harraz and El-Din, 2010).

Další skupinou jsou multipotentní kmenové buňky, které se nacházejí ve většině tkání dospělého organismu a diferencují se na buňky z jediné zárodečné vrstvy. MSC jsou nejvíce uznávanými multipotentními buňkami. Tyto buňky se mohou diferencovat na tkáň odvozenou z mezodermu, jako je tuková tkáň, kostní, chrupavčitá a svalová. Oligopotentní kmenové buňky jsou schopné tvořit 2 nebo více linií v rámci specifické tkáně. Hematopoetické kmenové buňky jsou typickým příkladem oligopotentních kmenových buněk (Lagarkova, 2019). Kmenové buňky schopné diferencovat se pouze do jednoho

specifického buněčného typu a tím tvořit jedinou linii nazýváme unipotentní (Müller, Lemcke and David, 2018).

Ve výzkumu Takahashi a Yamanaka v roce 2006 se podařilo vytvořit pluripotentní buňky přeprogramováním somatických buněk, konkrétně myších fibroblastů. Tyto buňky se nazývají indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) a mají podobné vlastnosti jako ESC (Takahashi and Yamanaka, 2006). Neomezený expanzní potenciál iPSC a absence etických problémů z nich tak činí cenný buněčný zdroj pro tkáňové inženýrství. Kromě toho neexistují žádná skutečná omezení pro výrobu iPSC ve velkém měřítku (Azari *et al.*, 2022). Zbývá však vyřešit mnoho důležitých otázek, jako jsou rozdíly mezi různými liniemi iPSC v diferenciacích a expanzních schopnostech a vhodné stádium diferenciaci buněk pro specifické aplikace tkáňového inženýrství (Bakhshandeh *et al.*, 2017).

1.3.2 Buněčné kultury

Již více než století se dvourozměrné (2D) buněčné kultury používají jako *in vitro* modely ke studiu buněčných odpovědí na stimulační z biofyzikálních a biochemických podnětů. Buněčné kultury jsou uchovávány ve speciálních miskách s médiem obsahujícím požadované živiny, růstové faktory a hormony umístěných v přísně kontrolovaných teplotních podmínkách, obvykle při 37 °C (Białkowska *et al.*, 2020). Růst buněk ve 2D monovrstvách umožňuje přístup k podobnému množství živin a růstových faktorů přítomných v médiu, což vede k homogennímu růstu a proliferaci. Tato vlastnost činí tyto platformy atraktivní pro biology a klinické uživatele díky jednoduchosti a účinnosti. Za určitých okolností však mohou 2D systémy vést k biologickým aktivitám buněk, které se znatelně odchyľují od reakce *in vivo*, jelikož buňky v našem těle provádějí bioaktivity v reakci na stimulaci z vysoce komplexního 3D mikroprostředí. Dobře navržené mikroprostředí v tkáňovém a buněčném inženýrství může být použito k podpoře proliferace, migrace, produkce matrice a diferenciaci kmenových buněk (Duval *et al.*, 2017).

1.4 Scaffoldy a požadované vlastnosti

Lešení jsou umělé struktury, na které mohou být nasazeny buňky a které jsou schopné podporovat tvorbu trojrozměrné tkáně, dokud buňky nevytvoří adekvátní extracelulární matici (ECM). ECM je směs biomolekul produkovaných buňkami, které tvoří konkrétní tkáň. Obsahuje různé proteiny a vlákna, včetně signálních proteinů, proteoglykanů, retikulárních vláken, adhezních proteinů, kolagenových vláken a elastických vláken, z nichž mnohé přispívají k míře tuhosti ECM. Konkrétní složení ECM závisí na mnoha parametrech včetně pH, genové expresi, aplikovaných mechanických silách a kyslíku potřebného pro správnou funkci. Všechny součásti ECM jsou nezbytné pro udržení biologické, fyzikální a mechanické signalizace, která řídí základní buněčné funkce včetně diferenciace, adheze, migrace, apoptózy, polarity, genové exprese, proliferace a morfogeneze tkání. Optimální lešení by mělo napodobovat strukturální a mechanicko-chemické vlastnosti fyziologického ECM. Materiálové vlastnosti, jako je topografie, pórovitost a biokompatibilita jsou často limitujícím faktorem pro adhezi buněk na skeletech pro tkáňové inženýrství (Laird *et al.*, 2021).

1.4.1 Architektura lešení

Trojrozměrná struktura s propojenou sítí pórů a vhodnou povrchovou chemií je stěžejní pro buněčný růst a průtokový transport živin a metabolického odpadu. Propojené póry umožňující migraci buněk a zlepšují dostupnou povrchovou plochu pro vazbu mezi buňkami a skeletem a interakci s okolními tkáněmi. Buňky primárně interagují se scaffoldy prostřednictvím chemických skupin (ligandů) na povrchu materiálu. Scaffoldy syntetizované z přírodních extracelulárních materiálů (např. kolagenu) přirozeně obsahují tyto ligandy ve formě Arg-Gly-Asp vazebných sekvencí, zatímco lešení vyrobené ze syntetických materiálů mohou vyžadovat záměrné začlenění těchto ligandů, například adsorpcí proteinů. Hustota ligandu je ovlivněna specifickým povrchem, tj. dostupným povrchem v póru, ke kterému mohou buňky přilnout. To závisí na střední velikosti pórů v lešení. Póry tedy musí být dostatečně velké, aby umožnily buňkám migrovat do struktury, kde se nakonec navážou na ligandy ve skeletu, ale dostatečně malé, aby vytvořily vysoký specifický povrch, což vede k minimální hustotě ligandu, která umožní účinnou vazbu kritického počtu buněk na scaffold. Proto pro jakékoli lešení existuje kritický rozsah velikostí pórů, které se mohou lišit v závislosti na použitém buněčném typu a tkáni (O'Brien, 2011). Například bylo dokázáno, že lešení s velikostí pórů blízkou 300 μm podporují

osteogenezi díky vyšší permeabilitě a potenciálu pro vaskularizaci, zatímco menší velikosti pórů blíží se 100 μm jsou příznivější pro chondrogenezi. Ukázalo se také, že zvýšená makroporozita lešení zlepšuje angiogenezi *in vivo*, zatímco mikroporozita (póry s průměrem menším než 10 μm) může zlepšit interakce mezi buňkami a skeletem, což má za následek osteogenní účinky (Karageorgiou and Kaplan, 2005).

1.4.2 Mechanické vlastnosti

Lešení by mělo sloužit jako dočasná mechanická opora a vlastnosti by měly odpovídat tkáním v místě implantace. Pokud lešení není schopno replikovat mechanické síly přenášené na buňky za fyziologických podmínek, mohou být buňky stimulovány k diferenciaci od požadované linie směrem k nežádoucímu fenotypu. Mechanická vlastnost, která je důležitá pro udržení strukturální stability biomateriálu, je však často ohrožena v důsledku zvýšené poréznosti a nedostatečné kapacity pro vaskularizaci (Malafaya *et al.*, 2008). Nelze také opomenout elasticitu lešení a odolávání cyklickému mechanickému namáhání bez jakéhokoli porušení nebo jakékoli jiné trvalé deformace pro aplikace elastických tkání, jako jsou krevní cévy, kůže, srdeční chlopně, chrupavka, šlacha a močový měchýř (Croisier and Jérôme, 2013).

1.4.3 Biokompatibilita, bioaktivita a rozložitelnost

Scaffoldy a produkty vznikající při jejich degradaci musí být především biokompatibilní. To vyžaduje, aby materiály skeletu byly netoxické pro buňky, snadno byly odbourány, a aby svou přítomností vyvolaly zanedbatelnou imunitní odpověď. Musí se však jednat o materiály, které mohou interagovat s hostitelskou tkání a vázat se na ni. Důležité také je zahrnutí biologických podnětů a růstových faktorů ke stimulaci buněčného vrůstání, adheze a diferenciaci. Cílem tkáňového inženýrství je umožnit tělu vlastním buňkám produkovat vlastní extracelulární matrix, aby časem nahradily implantované lešení nebo konstrukt tkáňového inženýrství. Scaffoldy nejsou určeny jako trvalé implantáty, proto musí být biologicky odbouratelné například enzymatickými procesy s řízenou rychlostí degradace a resorpce, aby odpovídala růstu buněk/tkáně *in vitro* a *in vivo*. Degradční produkty by měly být netoxické (Alegret, Dominguez-Alfaro and Mecerreyes, 2019).

Konečným kritériem pro lešení v tkáňovém inženýrství, na kterém závisí všechna výše uvedená kritéria, je výběr biomateriálu, ze kterého by lešení mělo být vyrobeno.

2 BIOMATERIÁLY

Biomateriál je definován jako materiál určený k propojení s biologickými systémy k hodnocení, léčbě, rozšíření nebo nahrazení jakékoli tkáně, orgánu nebo funkce těla. Návrh a výběr biomateriálu je kritickým krokem ve vývoji scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Obecně by ideální biomateriál měl být netoxický, biokompatibilní, schopný podporovat příznivé buněčné interakce a vývoj tkání, přičemž by měl mít odpovídající mechanické a fyzikální vlastnosti (Mano *et al.*, 2007). Různé biomateriály mají různé fyzikální a chemické vlastnosti a mohou být zpracovány do různých tvarů (např. filmy, pěny, gely a částice). Mohou být použity samostatně nebo jako součást kompozitů/hybridů za účelem vylepšení jejich vlastností. Typicky se při výrobě lešení pro tkáňové inženýrství používají skupiny biomateriálů jako jsou kovy, keramika, syntetické polymery a přírodní polymery (Municoy *et al.*, 2020).

2.1 Kovy

Kovové scaffoldy jsou studovány zejména pro TE tvrdých tkání kvůli jejich vhodným mechanickým vlastnostem ve srovnání s biologicky odbouratelnými polymerními materiály. Několik biologicky kompatibilních kovových materiálů, jako jsou nerezové oceli, slitiny kobaltu, titanu a hořčíku se běžně používají jako implantáty při ortopedické a zubní léčbě. Často se používají k náhradě a regeneraci poškozených kostí nebo k zajištění strukturální podpory hojení kostních defektů. Z běžných kovových biomateriálů je hořčík a řada jeho slitin účinných díky svým mechanickým vlastnostem blízkým lidské kosti, jejich přirozenému iontovému obsahu, který může mít důležitou funkční roli ve fyziologických systémech, a jejich *in vivo* biodegradabilní vlastnosti v tělesných tekutinách. Díky tomu mohou být slitiny na bázi hořčíku použity jako biokompatibilní, bioaktivní a biodegradabilní lešení pro nosné aplikace (Yazdimamaghani *et al.*, 2017).

2.2 Keramika

Keramická lešení, jako je hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý, se používají například pro aplikace regenerace kostí. Vykazují vynikající biokompatibilitu díky své chemické a strukturní podobnosti s minerální fází přirozené kosti. Keramika také podporuje diferenciaci a proliferaci osteoblastů. Ačkoli je hydroxyapatit primární složkou kosti a může se zdát jako ideální náhrada kostního štěpu, není kontrola nad rychlostí jeho degradace (O'Brien, 2011). Existuje řada komerčně dostupných syntetických náhrad kostních štěpů na

bázi kompozitu převážně kolagenu a fosforečnanu vápenatého, většinou používané pro dentální aplikace a pro opravy kloubů a zlomených kostí. Tyto kompozity mají složení podobné přirozené kostní tkáni a mají potenciál dosáhnout zlepšených mechanických vlastností kombinující pevnost keramiky s flexibilitou polymerů. (Vukajlovic *et al.*, 2019).

2.3 Syntetické polymery

Polystyren, kyselina polyléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a polykaprolakton (PCL) jsou příklady syntetických polymerů, které byly použity na výrobu scaffoldů. Výhodami těchto materiálů jsou předvídatelné a reprodukovatelné, mechanické a fyzikální vlastnosti, jako je pevnost, modul pružnosti či rychlost degradace. Výroba je vzhledem k funkcím levná. Naopak nevýhodami jsou snížená bioaktivita a větší riziko nežádoucí imunologické odpovědi. Existují také obavy z procesu degradace PLGA a PGA, při které je produkován oxid uhličitý a tím snižováno pH v místě aplikace scaffoldu, což může vést k nekróze buněk a tkání. Syntetické polymerní scaffoldy jsou široce kombinovány s přírodními polymery, přirozeně izolovanými proteiny nebo peptidy, aby se zlepšila například hydrofobnost, přichycení buněk a biologická odbouratelnost (Janoušková, 2018).

V mnoha studiích bylo prokázáno, že malé elektrické proudy stimulují tkáňové reakce, jako je opětovný růst a hojení ran. Těch bylo dosaženo pomocí kovových elektrod, které jsou inherentně nekompatibilní s biologickými tkáněmi. Existuje však zajímavá skupina organických vodivých polymerů, které poskytují elektrickou stimulaci a zároveň biokompatibilitu (Ateh, Navsaria and Vadgama, 2006). Této skupině polymerů bude věnována zvláštní kapitola.

2.4 Přírodní polymery

Přírodní polymery jsou polymery produkované biologickými systémy, jako jsou mikroorganismy, rostliny a zvířata. Lze je klasifikovat jako proteiny (hedvábí, kolagen, želatina, fibrinogen, elastin, keratin, aktin a myosin), polysacharidy (celulóza, amyulóza, dextran, chitin a glykosaminoglykany) nebo polynukleotidy (DNA, RNA) (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Jedním z oblíbených přírodních polymerů používaných v TE je chitosan, derivát chitinu, kterému bude věnována zvláštní kapitola.

Na rozdíl od syntetických polymerních lešení jsou přírodní polymery biologicky aktivní a typicky podporují vynikající adhezi a růst buněk. Kromě toho jsou také biologicky

odbouratelné a umožňují hostitelským buňkám v průběhu času produkovat vlastní extracelulární matici a nahradit degradované lešení. Výroba lešení z biologických materiálů s homogenními a reprodukovatelnými strukturami však představuje výzvu. Struktura přírodních polymerů je složitá a stěžuje jejich zpracování v důsledku teplotní citlivosti a degradaci ještě před dosahem bodu tání. Kromě toho mají lešení obecně špatné mechanické vlastnosti, což omezuje jejich použití například v nosných ortopedických aplikacích (O'Brien, 2011).

Výše popsané výhody a nevýhody lešení vyrobených z jednofázového biomateriálu vedly k výzkumu vývoje kompozitních scaffoldů obsahujících více fází. Řada studií se například zaměřila na zavedení keramiky do lešení na bázi polymerů, zatímco jiné kombinují syntetické polymery s přírodními polymery (O'Brien, 2011). Jeden z výzkumů se zaměřil na přípravu nanokompozitu kombinovaného z PGA a kolagenu. Výsledky na zvířecích modelech ukázaly, že PGA-kolagenové nanokompozity byly zcela prorosteny buňkami a vaskularizovány do 5 dnů po implantaci. Dobré výsledky také přinesli studie pro obnovu chrupavky, kdy bylo sestaveno lešení z PGA a kyseliny hyaluronové naočkované mezenchymálními kmenovými buňkami (Asghari *et al.*, 2017).

3 CHITOSAN

Chitin je přírodní polymer přirozeně se vyskytující v exoskeletu korýšů, hmyzu a buněčných stěnách hub a je co do množství hned na druhém místě za celulózu nejrozšířenější polysacharid na Zemi. Jedná se o polysacharid složený z molekul N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny 1,4- β -glykosidickou vazbou. Hlavním derivátem chitinu je chitosan, získaný obvykle alkalickou deacetylací chitinu. Díky stabilní krystalové struktuře je chitosan rozpustný pouze v kyselých roztocích pod pH 5 (Rinaudo, 2006). Vzhledem k jeho zanedbatelné toxicitě a biologické rozložitelnosti, našel chitosan značné uplatnění ve farmaceutickém průmyslu. Uvádí se, že samotný chitosan má příznivé farmakologické vlastnosti, jako jsou například hojivé, protinádorové, protivředové a hemostatické účinky, dále může také ovlivňovat spermicidní aktivitu, či hladinu cholesterolu. V poslední době se používá ve farmaceutickém průmyslu jako matricová molekula pro aplikace léčiv a v tkáňovém inženýrství (Ahsan *et al.*, 2018).

Chitosan může být tvarován do porézních lešení pomocí různých jednoduchých postupů, jako je například lyofilizace a elektrostatické zvlákňování. Může také tvořit směsi s řadou přírodních a syntetických polymerů, čímž vznikají lešení s požadovanými vlastnostmi jako je přizpůsobitelná velikost pórů a chemie povrchu. Kationtová povaha chitosanu napomáhá tvorbě komplexů s aniontovými glykosaminoglykany (GAG), včetně heparinu a chondroitin sulfátu. Tyto chitosan-GAG komplexy mohou modulovat aktivitu několika růstových faktorů a cytokinů například při regeneraci kostí a chrupavek. Další výhodou chitosanu je jeho biologická odbouratelnost a rychlost jeho degradace lze snadno modulovat stupněm deacetylace. Protože scaffoldy používané pro různé tkáně vyžadují různé rychlosti degradace, tato vlastnost činí chitosan použitelný pro téměř všechny typy tkání. Dostupnost funkčních skupin na chitosanu poskytuje příležitost pro konjugaci biologicky aktivních molekul, čímž podporuje buněčný růst, proliferaci a diferenciaci (Ahsan *et al.*, 2018).

4 VODIVÉ POLYMERY (CP)

Mnoho funkcí lidského těla je regulováno elektrickými signály, od nervové soustavy, srdečního tepu až po embryonální vývoj a opravy tkání po zranění. Nervový systém je největší elektricky aktivní infrastrukturou v našem těle. Využívá elektřinu k přenosu informací z neuronu na neuron prostřednictvím synapsí, zatímco svalové buňky srdce produkují elektrické impulsy, které procházejí celým orgánem, což vede ke svalové kontrakci a rytmickým srdečním tepům. Některé tkáně, jako je kostní dřev, využívají vodivost k regeneraci nové tkáně. Proto materiály, které se spojují s elektricky aktivními tkáněmi pro účely tkáňového inženýrství, musí být také vodivé, aby se zlepšila biologická odpověď na vnější podněty (Alegret, Dominguez-Alfaro and Mecerreyes, 2019). Rozsáhlé experimentální studie na širokém spektru buněk, jako jsou mezenchymální kmenové, kostní a chrupavkové, nervové a srdeční buňky, dokázaly, že elektrická stimulace ovlivňuje základní chování buněk (tj. buněčnou adhezi, proliferaci, diferenciaci a migraci) (Zarei *et al.*, 2021).

Elektroaktivní biomateriály jsou součástí nové generace „chytrých“ biomateriálů, které umožňují přímou dodávku elektrické, elektrochemické a elektromechanické stimulace do buněk. Do této skupiny jsou zahrnuty vodivé polymery, elektrety, piezoelektrické a fotovoltaické materiály. Elektrety a piezoelektrické materiály umožňují dodání elektrického stimulu bez potřeby externího zdroje energie, ale kontrola nad stimulem je omezená. Na druhé straně vodivé polymery umožňují vynikající kontrolu nad elektrickým stimulem, mají velmi dobré elektrické a optické vlastnosti, mají vysoký poměr vodivosti/hmotnosti a na rozdíl od běžných anorganických a kovových vodivých materiálů mohou být biokompatibilní, hydrofilní (40–70° kontaktní úhel s vodou podporuje adhezi buněk) biologicky odbouratelné a porézní (Balint, Cassidy and Cartmell, 2014). Kombinovaná elektrická a iontová vodivost CP je jednou z jejich nejatraktivnějších vlastností pro biologické aplikace. Díky iontové vodivosti může být elektrický signál převeden na iontový signál, který je přirozeným komunikačním systémem v buňkách. Tímto CP překonávají další důležité omezení anorganických materiálů, a to iontovou nepropustnost. Kromě toho mají CP schopnost zachycovat a řízeně uvolňovat biologické molekuly (tj. reverzibilní doping). Výhodou je také snadná syntéza a přizpůsobení fyzikálně-chemických vlastností CP konkrétním potřebám, a to jednoduchou změnou podmínek polymerace nebo jejich redoxního stavu (Guo and Ma, 2018).

Vzhledem k výše popsaným vlastnostem byly CP označeny jako materiály s velkým potenciálem v mnoha biomedicínských aplikacích, včetně biosenzorů, systémů dodávání léků, technologií elektrické stimulace a tkáňového inženýrství (Guimard, Gomez and Schmidt, 2007). K naplnění skutečného potenciálu CP je však třeba čelit několika výzvám, zejména těm, které jsou spojeny s elektrochemickou stabilitou CP, a které jim umožňují pracovat za fyziologických podmínek při zachování jejich vynikajících fyzikálně-chemických vlastností (Imae and Krukiewicz, 2022).

4.1 Mechanismus elektrické vodivosti CP

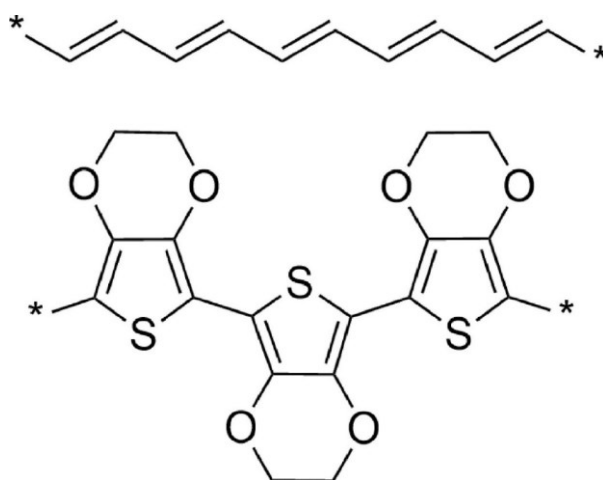
Počáteční práce na vodivých polymerech byly vyvolány pozorováním vodivosti polyacetyleny. Tento polymer, který je za normálních okolností pouze polovodič, je při oxidaci pomocí par jódu schopen zvýšit svoji vodivost až 10 milionkrát. Protože je obtížné polyacetylen syntetizovat a na vzduchu je nestálý, přesunula se pozornost na polyheterocykly, vodivé polymery s dobrou stabilitou a vysokou vodivostí, a to zejména polypyrrol (PPy), polyanilin (PANI) a polythiofeny (PT), jejich deriváty a kompozity. Celkem dnes existuje více než 25 vodivých polymerních systémů. Běžné CP, jejich zkratka a vodivost jsou uvedeny v Tabulce 1 (Balint, Cassidy and Cartmell, 2014).

Tabulka 1 Vodivost vybraných CP (upraveno podle (Guimard, Gomez and Schmidt, 2007))

Vodivý polymer	Maximální vodivost [$S \cdot cm^{-1}$]	Druh dopingu
Polyacetylen (PA)	200–1000	n,p
Polyparafenylen (PPP)	500	n,p
Polyparafenylen-sulfid (PPS)	3–300	p
Polyparavinylen (PPv)	1–1000	p
Polypyrrol (PPy)	40–200	p
Polythiofen (PT)	10–100	p
Polyanilin (PANI)	5	n,p

Obecná struktura CP se skládá z konjugované páteře se střídajícími se jednoduchými a dvojnými vazbami. Dvojně vazby zahrnují π -vazby, které jsou charakterizovány překrývajícími se p-orbitaly. To znamená, že nepárové elektrony spojené s každým atomem v páteři ve skutečnosti nepatří žádnému jednotlivému atomu, ale spíše se vzájemně

překrývají v orbitalech, a proto se mohou volně pohybovat. Právě tato delokalizace π -elektronů a pohyb aniontů nebo kationtů v materiálu poskytuje základ pro elektrickou i iontovou vodivost. Nejslibnější varianty pro bioelektronické aplikace jsou PPy stejně jako PT a jejich deriváty. Obrázek 3 (nahore) ukazuje polyacetylenový řetězec jako příklad jednoduchého konjugovaného π -systému a poly(3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT) jako příklad složitější struktury. V obou případech lze pozorovat kontinuální dráhu konjugované vazebné struktury. I když je konjugovaná struktura charakteristická pro všechny systémy CP, není to jediný faktor, který určuje tepelné, mechanické a chemické vlastnosti CP (Heck *et al.*, 2022).



Obrázek 3 Struktura polyacetyleny (nahore), poly(ethylendioxythiofenu) (dole)
(Převzato podle Heck *et al.*, 2022)

4.1.1 Doping

Doping CP je kritickým aspektem, který určuje elektrochemickou funkčnost. Dopanty jsou nabitě molekuly, které jsou elektrostaticky spojeny s páteří CP. Dopování nastává v důsledku částečné oxidace (p-doping) nebo redukce (n-doping) polymerního řetězce prostřednictvím přidání aniontových, respektive kationtových molekul. Výsledkem částečné oxidace (redukce) je vytvoření nabitě částice zvané polaron. Dva polarony v těsné blízkosti mohou vést k vytvoření bipolaronu. Tvorba stabilních polaronových a bipolaronových jednotek je kritická pro mechanismus vodivosti CP, a proto je výběr dopantu a účinnost dopovacího procesu rozhodující pro výkon materiálů na bázi CP. V praxi je většina CP obvykle modifikována p-dopingem, protože typické n-dopingové molekuly mají špatnou stabilitu v atmosférických podmínkách a také nízkou vodivost ve srovnání s dopanty typu p.

K dopingovému procesu dochází během syntézy a může být prováděn chemicky, elektrochemicky nebo fotodopováním. CP mohou být dopovány řadou molekul, jako jsou malé ionty solí, peptidy nebo polymery, včetně polysacharidů a proteinů. Chloridové anionty se běžně používají k dopování CP kvůli jejich biologické kompatibilitě. Chemická povaha dopantu neovlivňuje pouze elektroaktivitu, ale ovlivňuje také povrchové a objemové strukturní vlastnosti. Větší biomolekuly jako je kyselina hyaluronová (HA), mohou změnit hustotu polymeru a výrazněji ovlivnit vlastnosti, jako je povrchová topografie a fyzikální manipulační vlastnosti. Malé dopanty naopak mohou snadněji difundovat z CP a mohou být vyměněny s jinými ionty v okolním prostředí. Vlastnosti CP (např. objem) lze tedy regulovat prostřednictvím procesu dynamického dopování a dedopingu, ke kterému dochází během oxidace a redukce CP (Alegret, Dominguez-Alfaro and Mecerreyes, 2019). Pro začlenění molekul, které nejsou schopné redoxní reakce, jako je většina biologických dopantů, je nutné syntetizovat/dopovat CP elektrochemicky (Talikowska, Fu and Lisak, 2019).

4.1.2 Self-dopingový efekt

Dlouhodobé testy elektrochemické stability poukázaly na nestabilitu elektrických vlastností CP. Například významné (95 %) snížení vodivosti bylo zaznamenáno, když byl PPy vystaven dlouhodobé (16 h) polarizaci. I když se ukázalo, že PEDOT je stabilnější než PPy, došlo k významnému snížení nosnosti náboje (30 %) a vodivosti (11 %). Elektrochemická nestabilita CP by měla být spojena se ztrátou dopingové molekuly. Toto omezení bylo překonáno ve výzkumu Yue a Epstein, kteří syntetizovali samo-dopovaný CP, PANI reakcí anilinu s kyselinou sírovou. Jako výsledek byla pozorována tvorba CP, ve které byl dopant (sulfonová skupina) kovalentně navázán na kostru PANI. Vodivost tohoto PANI substituovaného skupinou sulfonové kyseliny byla až $0,1 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a jeho elektroaktivita byla zachována i v zásaditém prostředí (Yue and Epstein, 1990). Dále bylo zjištěno, že přítomnost sulfonových skupin v hlavním řetězci CP zlepšuje jeho rozpustnost bez ovlivnění jeho vodivosti. Kovalentní vazba mezi PANI a jeho dopantem také omezila riziko vyluhování dopantu s časem a jeho migrací, čímž se zabránilo potenciálním cytotoxickým účinkům. Od té doby je úprava CP tak, aby vykazovala samodopingový efekt, atraktivním předmětem výzkumu (Imae and Krukiewicz, 2022).

4.2 Polymerizační přístupy

První CP byl syntetizován pomocí chemické oxidační polymerace polyacetyleny v polovině 70. let. Od té doby bylo vyvinuto několik technik pro syntézu CP, včetně

fotochemie, metateze, pyrolýzy a plazmové polymerace. Chemická a elektrochemická polymerace však zůstávají nejčastěji používanými přístupy. Jednoduchost těchto technik umožňuje kontrolu během syntézy CP a přizpůsobení výsledných vlastností. Nejvýznamnějším rozdílem mezi elektrochemickými a chemickými metodami syntézy CP je to, že tenké CP filmy v řádu 20 nm lze vyrábět pomocí elektrochemických technik, zatímco prášky nebo silnější filmy se typicky vyrábějí chemickou polymerací (Balint, Cassidy and Cartmell, 2014).

4.2.1 Chemická syntéza

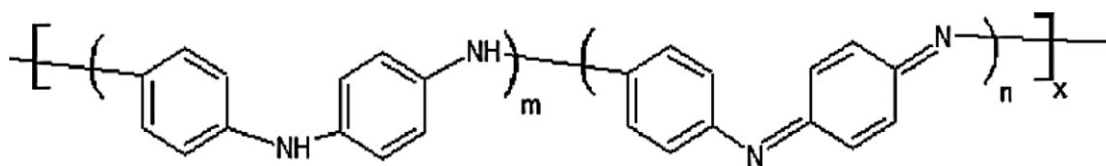
Chemická polymerace umožňuje hromadnou syntézu smícháním roztoku monomeru a oxidačního činidla, jako je chlorid železitý (FeCl_3) a persíran amonný (Liang and Goh, 2020). Tento proces vede k tvorbě prášku nebo filmu polymeru. Způsoby chemické syntézy jsou například kondenzační polymerace (tj. kroková polymerace) nebo adiční polymerace (tj. polymeraci s růstem řetězce). Kondenzační polymerace probíhá ztrátou malých molekul, jako je kyselina chlorovodíková nebo voda. Radikálové, kationtové a aniontové polymerace jsou příklady adiční polymerace, které se vyznačují příslušným radikálovým, kationtovým nebo aniontovým meziproduktem na reaktivním konci polymerního řetězce během syntézy. Chemická polymerace CP má tu výhodu, že je nezávislá na substrátu a vhodná pro výrobu všech CP ve srovnání s elektrochemickými technikami. Chemické techniky však vedou k tvorbě filmů, které po výrobě často vyžadují dopování ke zvýšení vodivosti (Green *et al.*, 2008).

4.2.2 Elektrochemická syntéza

Elektrochemická syntéza je běžnou alternativou pro výrobu CP, zejména proto, že tento syntetický postup je relativně přímočarý. Elektrochemická polymerace se provádí pomocí tříelektrodové konfigurace (pracovní, protilehlá a referenční elektroda) v roztoku monomeru, vhodného rozpouštědla a elektrolytu (dopantu). Proud prochází roztokem a na kladně nabitě pracovní elektrodě nebo anodě dochází k elektrodepozici. Monomery na povrchu pracovní elektrody podléhají oxidaci za vzniku radikálových kationtů, které reagují s jinými monomery nebo radikálovými kationty a vytvářejí nerozpustné polymerní řetězce na povrchu elektrody. Je třeba vzít v úvahu řadu důležitých proměnných, včetně doby depozice a teploty, systému rozpouštědla (obsah vody), elektrolytu, systému elektrod a depozičního náboje. Každý z těchto parametrů má vliv na morfologii filmu (tloušťku a topografii), mechaniku a vodivost (Guimard, Gomez and Schmidt, 2007).

4.3 Polyanilin (PANI)

Jako jeden z prvních objevených a nejslibnějších konjugovaných CP je PANI, známý také jako anilínová čerň. K jeho snadné syntéze dochází prostřednictvím oxidačního procesu. PANI existuje v různých formách podle stupně jeho oxidace, s různou elektrickou vodivostí. Částečně oxidovaná struktura zvaná smaragdín je zobrazena na Obrázku 4, kde m a n jsou v poměru 1:1. Tato forma je nejstabilnější a používá se hlavně pro senzorové materiály na bázi PANI. Pernigranilin, plně oxidovaná forma, a leukoemeraldin, naopak plně redukováná forma, jsou nestabilní a existují pouze za určitých podmínek. Při fyziologickém pH existuje PANI v dedopovaném, nevodivém stavu, který má omezenou použitelnost pro většinu biomedicínských aplikací (Imae and Krukiewicz, 2022). Elektrická vodivost závisí na podmínkách prostředí, zejména pH, dále na ploše povrchu a pórovitosti, teplotě během polymerace a dopujících aniontech, jako je chlorid, sulfát, polystyrensulfonát atd (Capáková *et al.*, 2020).



Obrázek 4 Chemická struktura PANI (převzato podle Nezakati *et al.*, 2018)

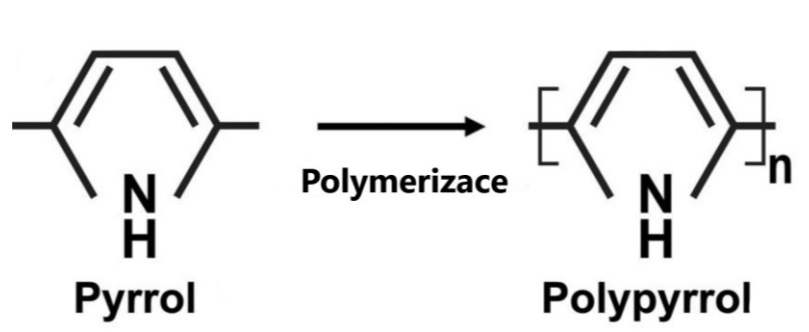
Podle povahy podmínek může proběhnout syntéza PANI v různých morfologických formách, jako jsou nanovrstvy, nanovlákná nebo nanotyčinky. Reakční doba je klíčovým parametrem pro přípravu materiálů PANI. Například role míchání po dobu 48 hodin a déle vedla k vytvoření vysoce aglomerovaných jednotek, jako jsou nanovrstvy a nanokvěty. Některé strukturální formy mají vysokou krystalinitu s vysokou vodivostí, což umožňuje jejich využití pro elektronická zařízení, včetně senzorů vlhkosti (Anisimov *et al.*, 2021).

PANI může tvořit hybridní kompozity s různými biopolymery, které obsahují kyslíkové a dusíkové heteroatomy, jako je celulóza, chitosan, škrob a alginát, které mohou zvýšit hydrofilitu a vodivost materiálu. PANI má také mnoho výhod, jako je snadná syntéza, nízká cena, dobrá environmentální stabilita a schopnost elektricky přepínat mezi stavem vodivým a izolantem. Bohužel jeho použití v biologických aplikacích je omezeno jeho nedostatečnou flexibilitou a špatnou biologickou odbouratelností. Po implantaci PANI byly zaznamenány případy chronického zánětu. PANI byl zkoumán pro biosenzory, neurální sondy a řízené dodávání léčiv. Zkoumání PANI pro aplikace tkáňového inženýrství postupovalo pomaleji

než vývoj PPy pro podobné aplikace. V poslední době však přibýlo více důkazů o schopnosti PANI podporovat buněčný růst. Buněčná kompatibilita je však nejspíš specifická pro konkrétní buňky a záleží také na modifikaci PANI (Guimard, Gomez and Schmidt, 2007).

4.4 Polypyrol (PPy)

Pravděpodobně nejvíce studovaným vodivým polymerem je konjugovaný polymer polypyrol. Chemická struktura PPy se skládá z opakujících se jednotek monomeru pyrrolu, aromatického kruhu obsahujícího dusík. Mechanismus polymerace je předmětem diskuse. Proces dopingu PPy je p-doping, kdy je polymer oxidován a bude mít kladný náboj. Jedna ze dvou hlavních teorií je, že monomery pyrrolu jsou nejprve oxidovány, aby se uvolnil radikálový kation, poté následuje spojení dvou kationtů a výroba bipyrrolu. Jak oxidace pokračuje, řetězec stále roste (Liang and Goh, 2020). Chemická syntéza PPy se používá při velkovýrobě a zahrnuje smíchání silného oxidačního činidla (typicky FeCl_3) s roztokem monomeru, viz Obrázek 5. Syntéza může probíhat při pokojové teplotě v široké škále rozpouštědel, včetně vody. Naopak elektrochemická syntéza je upřednostňována pro výzkumné účely kvůli jednoduchosti techniky, kontrole tloušťky materiálu, geometrie a umístění, možnosti dopingu během syntézy, širokému výběru dostupných dopujících iontů a vytváření kvalitních filmů (Ateh, Navsaria and Vadgama, 2006). Podobně jako u PANI, výsledná vodivost PPy závisí na podmínkách prostředí a teplotách aplikovaných během syntézy PPy (Capáková *et al.*, 2020).



Obrázek 5 Polymerace PPy z pyrrolových monomerů za použití FeCl_3 jako oxidantu (upraveno podle Liang and Goh, 2020)

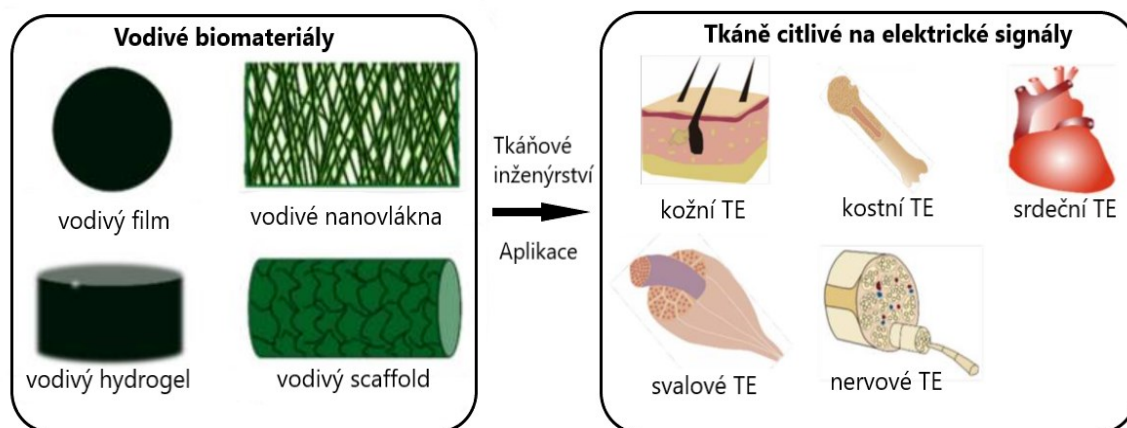
PPy má mnoho vynikajících vlastností, které z něj činí velmi slibný biomateriál. Všestrannost PPy lze přičíst jeho dobré elektrické vodivosti, environmentální stabilitě na vzduchu a ve vodě, relativně snadné syntéze elektrochemickými i chemickými metodami a potenciálu pro kopolymerizaci, aniž by byla ohrožena jeho elektroaktivita (Lee *et al.*, 2006). Může být vyroben s velkým povrchem a také s různou pórovitostí. Kromě toho

vykazuje výbornou biokompatibilitu *in vivo*. Dosud bylo hlášeno, že PPy podporuje buněčnou adhezi a růst řady různých typů buněk, včetně endoteliálních buněk, neuronů a podpůrných buněk (tj. glia, fibroblasty), primárních neuronů a mezenchymálních kmenových buněk. Jeho použití proto může být pro neurální implantáty, biosenzory, molekulární paměťová zařízení, mikrochirurgické nástroje atd (Guimard, Gomez and Schmidt, 2007).

I přes mnoho výhod má PPy některé vlastnosti, které komplikují jeho použití v tkáňovém inženýrství. Za prvé, jeho křehkost ho činí nevhodným pro aplikace v měkkých tkáních. Za druhé, nemůže být snadno použit v některých tradičních metodách výroby lešení, jako je elektrostatické zvlákňování, kvůli jeho špatné rozpustnosti. A nakonec, protože je většinou nedegradovatelný, je náročné ho použít k výrobě rozložitelných lešení. K odstranění těchto nedostatků byly provedeny studie začleňování PPy do přírodních i syntetických biomateriálů. Kompozitní materiály mají výhodu přizpůsobení materiálových vlastností úpravou poměru mezi materiály (Liang and Goh, 2020).

5 VÝROBA VODIVÝCH BIOMATEIRÁLŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Vodivé biomateriály používané v tkáňovém inženýrství se vyrábí ve formě vodivých kompozitních filmů, vodivých nanovláken, vodivých hydrogelů a vodivých kompozitních scaffoldů. Aplikace těchto biomateriálů může být například v inženýrství kostní tkáně, inženýrství svalové tkáně, inženýrství nervové tkáně, inženýrství srdeční tkáně a aplikace hojení ran (viz Obrázek 6).



Obrázek 6 Formy vodivých biomateriálů a jejich aplikace v tkáňovém inženýrství (upraveno podle Guo and Ma, 2018)

5.1 Vodivé směsi nebo kompozitní filmy

CP jsou velmi křehké a je velmi obtížné z nich vyrobit čistý vodivý polymerní film. Jedním ze způsobů, jak kompenzovat nedostatky vodivého polymeru, je jeho použití společně s jiným degradovatelným polymerem, který kombinuje pozitivní vlastnosti obou materiálů. Syntetické a přírodní polymery včetně PLA, PLGA, chitosanu a hedvábného fibroinu byly použity pro smíchání s CP, jako jsou PANI a PPy. Například vodivý PPy/PCL film byl vytvořen nejprve ponořením PCL filmu do směsi z polystyrenulfonové kyseliny (PSS) a pyrrolu. Potom byl ke směsi přidán FeCl_3 jako oxidační činidlo, což vedlo k tvorbě PCL vodivého filmu potaženého PPy. Film vykazoval měrný odpor podobný přirozené srdeční tkáni (Guo and Ma, 2018).

V jedné ze studií byly syntetizovány vodivé kompozity PPy s použitím biologicky aktivní polysacharidové kyseliny hyaluronové (HA) jako dopantu za účelem vytvoření biomateriálů pro aplikace TE a hojení ran. Tyto vodivé PPy filmy zadržovaly HA na svých površích několik dní *in vitro* a podporovaly vaskularizaci *in vivo*, proto byly prohlášeny za slibné

biomateriály. Nicméně, PPy/HA filmy byly křehčí, méně vodivé oproti filmu PPy/PSS, pravděpodobně kvůli nehomogennímu růstu filmů PPy/HA (Collier *et al.*, 2000).

5.2 Vodivá nanovlákna

Biomateriály by měly napodobovat strukturu extracelulární matrix. Kolagen jako hlavní protein ECM má formu nanovláken. K napodobení přirozeného ECM byly vyvinuty nanovláknenné polymerní lešení pomocí několika různých technik, jako je například elektrostatické zvlákňování, separace fází a molekulární montáž. Elektrostatické zvlákňování neboli elektrospinning je nejrozšířenější technika výroby nanovláken, která využívá vysokonapěťové elektrostatické pole. Proces je relativně jednoduchý a spoléhá na elektrostatické odpuzování roztoku polymeru za vzniku dlouhých, souvislých polymerních vláken. Vlákno vyrobené elektrostatickým zvlákňováním vykazuje velkou povrchovou plochu a pórovitost a jeho průměr je nastavitelný mezi několika nanometry až několika mikrometry. Dalšími vlastnostmi jsou dobrá elektroaktivita, tepelná stabilita a biologická rozložitelnost (Dahlin, Kasper and Mikos, 2011).

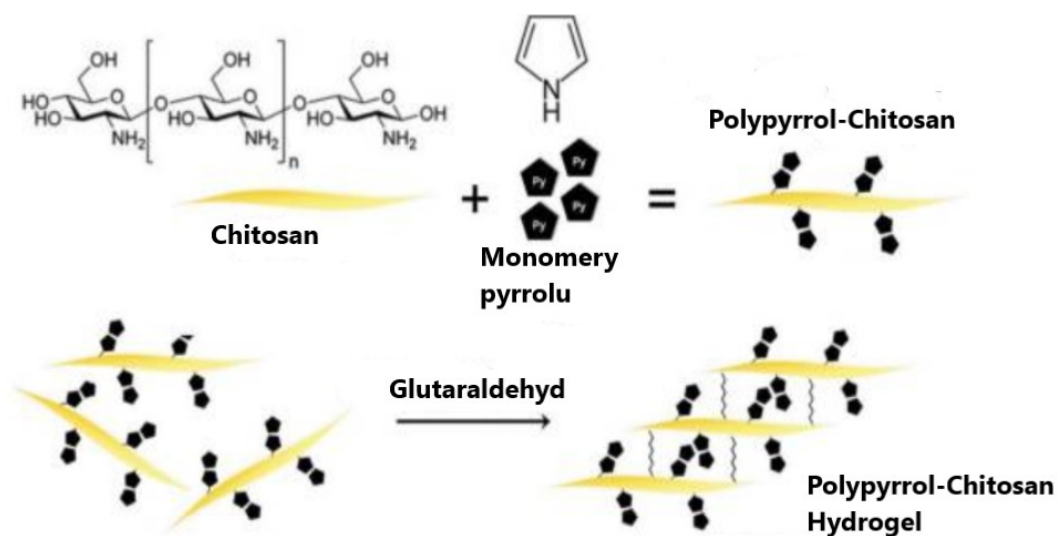
Jedním z příkladů je syntéza rozložitelného elektroaktivního chitosan-anilinový tetrameru pro přípravu elektroaktivních nanovláken. Chitosan-anilinový tetramer byl rozpuštěn ve směsi kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu a poté elektrostaticky zvlákňován do elektroaktivních nanovláken (Guo and Ma, 2018). Bylo prokázáno, že fibroinová vlákna potažená PPy podporují adheenci a proliferaci mezenchymálních kmenových buněk a fibroblastů. PPy byl také syntetizován na PLGA vláknech a bylo prokázáno, že umožňuje růst a diferenciaci hipokampálních neuronů (Balint, Cassidy and Cartmell, 2014).

5.3 Vodivé hydrogely

Polymerací CP uvnitř hydrogelových sítí vznikají elektroaktivní hydrogely, které kombinují redoxní spínací schopnosti vodivých polymerů s rychlou iontovou mobilitou a biokompatibilitou hydrogelů. Díky vodnému prostředí hydrogelů, které je příznivé pro biologické molekuly, jako jsou peptidové sekvence, enzymové protilátky a DNA, jsou elektroaktivní hydrogely schopné velmi dobře napodobovat extracelulární matici.

Tyto vlastnosti činí hydrogely ideální pro implantabilní biosenzory, zařízení pro uvolňování léčiv a hluboké mozkové stimulatory. Příklady elektroaktivních hydrogelů jsou PANI–polyakrylamidové a PPy/PANI–polyakrylamidové hydrogely. V mnoha studiích byl

také úspěšně imobilizován PPy v chitosanu většinou prostřednictvím oxidativní chemické polymerace. Nejprve byl smíchán monomer pyrrolu s chitosanem rozpuštěným v kyselině octové. Poté byl přidán FeCl_3 k zahájení polymerace. Volné aminoskupiny ve směsi byly zesíťovány přidáním glutaraldehydu, tím byl získán Chitosan/PPy hydrogel, viz schéma na Obrázku 7. Pokud jde o vodivost, primárním trendem je, že vodivost se zvyšuje s množstvím PPy v kompozitu (Liang and Goh, 2020).



Obrázek 7 Proces tvorby PPy-Chitosan hydrogelu (upraveno podle (Liang and Goh, 2020))

5.4 Vodivé kompozitní 3D scaffoldy

Kromě hydrogelů jsou výše uvedené vodivé směsi, kompozity nebo nanovlákná obvykle ve formě filmu nebo membrány a nevykazují 3D struktury důležité pro regeneraci tkání. Proto byly vyrobeny 3D vodivé kompozitní lešení pro aplikace TE. Pokročilé nanokompozitní materiály na bázi polymerů si získaly oblibu pro široké inženýrské aplikace.

Jednou ze slibných technik pro výrobu nanovláknenných skeletů je tepelně indukovaná fázová separace. Příkladem je vodivé a biologicky odbouratelné nanokompozitní nanovláknenné lešení PLA/PANI. Tyto scaffoldy s dobře distribuovaným nanostrukturovaným PANI zvýšily osteogenní diferenciaci mesenchymálních buněk z kostní dřene. Navrhování lešení, které může napodobovat strukturu nativních tkání a vést k růstu buněk ve 3D struktuře, však zůstává trvalou výzvou pro kosterní sval nebo srdeční sval (Guo and Ma, 2018).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

- Příprava a charakterizace koloidních disperzí na bázi polypyrrolu a chitosanu.
- Příprava a charakterizace koloidních filmů na bázi polypyrrolu a chitosanu.
- Testování biologických vlastností připravených filmů a koloidů.

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Použité chemikálie

- ActinRed™ 555 (kat. č.: R37112, Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- Calf Serum (kat. č.: CA-115/500, Biosera, Francie)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO, kat. č.: 276855–100ML, Sigma Aldrich, USA)
- Formaldehyd 36–38 % (kat. č.: 14150-11000, Penta s. r. o., Česká republika)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, kat. č.: LM–S2041/500, BioSera, Francie)
- Hoechst 33258 (kat. č.: H3569, Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- Chitosan označený dodavatelem jako „průměrná molekulová hmotnost“ (CH-A; molekulová hmotnost ~ 400 000, stupeň deacetylce 75–85 %) (kat. č.: 448877-50G, Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid železitý (kat. č. 157740-1KG, Sigma Aldrich, USA)
- Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories GmbH, Rakousko)
- Médium DMEM (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)
- MTT (Invitrogen Corporation, USA)
- Pyrrol (kat. č.:131709-100ML, Sigma Aldrich, USA)
- Triton™ X–100 (kat. č.: X100-100ML, Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (kat. č.: XC-T1717/100, Biosera, Francie)
- Spectra Por 2 (mezní molekulová hmotnost 12 000–14 000; Spectrum Laboratories Inc., USA)

7.2 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga 5702 R chlazený model pro vzorky závislé na teplotě (Eppendorf, ČR)
- Elektroměr Keithley 6517 B, zdrojový měřič Keithley 2410 a spínač Keithley 7002 (USA)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem (Olympus, Japonsko)
- Inkubátor Heracell™ 150i (ThermoFisher Scientific, USA)
- Inverzní mikroskop IX51 (Olympus, Japonsko)
- Laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko)
- Spektrofotometr INFINITE M200 PRO NanoQuant (Tecan, Švýcarsko)
- Třepačka Vortex GENIE 2 (Scientific Industries, USA)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK)

7.3 Vodivé koloidní disperze a filmy

Vodivé polymery jsou flexibilní organické vodivé materiály, které se dají připravit v mnoha různých formách lišících se svými biologickými vlastnostmi. PPy se v současnosti nejčastěji připravuje oxidací monomeru pyrrolu chloridem železitým. Oxidace probíhá ve vodném prostředí a jakýkoli předmět, který je v kontaktu s reakční směsí, je potažen tenkým polymerním filmem. Poté, co je rozhraní potaženo a reaktanty jsou stále přítomny v reakční směsi, pokračuje srážecí polymerace ve vodném prostředí a vznikají makroskopické polymerní agregáty, které se vysráží jako prášek. Takový prášek je však většinou nerozpustný a obtížně zpracovatelný. Jedním ze způsobů, jak se těmto komplikacím vyhnout, je příprava vodivých polymerů v koloidní formě (Stejskal *et al.*, 2021).

Pro aplikace v biologických systémech jsou zajímavou formou vodné koloidní disperze CP. Syntetizují se disperzní polymerací pyrrolu v přítomnosti sterického stabilizátoru. (Kašpárková *et al.*, 2019). Obvykle lze jako stabilizátory použít ve vodě rozpustné syntetické polymery nebo povrchově aktivní látky, avšak pro materiály přicházející do kontaktu s buňkami a tkáněmi jsou lepšími kandidáty polysacharidy, jako je například chitosan. Průběh reakce probíhá ve třech fázích, a to adsorpce, nukleace a růst částic. Nejprve je oligomer adsorbován na řetězec stabilizátoru. Adsorbované oligomery stimulují růst polymerního řetězce a vzniká jádro. Výsledkem reakce je vznik koloidně stabilních disperzí s částicemi chráněnými před další agregací povrchovou vrstvou sterického stabilizátoru (Stejskal and Sapurina, 2005).

Stejně jako u disperzní polymerace vedoucí ke vzniku koloidních částic obsahuje filmtvorná směs monomer, oxidant a sterický stabilizátor. Proces tvorby filmu začíná oxidací, kdy se PPy přemění na svůj radikálový kation. Poté dva takové radikály vytvoří pyrrolový dimer. Velké množství pyrrolových dimerních kationtů interaguje s radikálovými kationty za vzniku polymerního řetězce PPy. Filmy z PPy vyrobené disperzní polymerací ve spojení s přípravou koloidních disperzí jsou však dosud popsány jen zřídka (Jasenská *et al.*, 2021).

7.3.1 Příprava koloidů

Prvním krokem pro přípravu koloidních disperzí a filmů bylo rozpuštění chitosanu v 0,5 % kyselině octové. Rozpuštění probíhalo na třepačce v Incucellu při 55 °C po dobu 24 hodin. Byly připraveny vzorky koloidních disperzí a filmů PPy/Chitosan s různým množstvím stabilizátoru (chitosanu) viz tabulka 2.

Tabulka 2 Složení reakčních směsí používaných pro přípravu koloidů stabilizovaných chitosanem prostřednictvím oxidace pyrrolu chloridem železitým

Vzorek	Chitosan [wt. %]	PPy [mmol]	FeCl ₃ [mmol]
PPy/Chitosan_0,5 %	0.5	5	5
PPy/Chitosan_1 %	1	5	5

7.3.1.1 Příprava vodivé koloidní disperze PPy/Chitosan

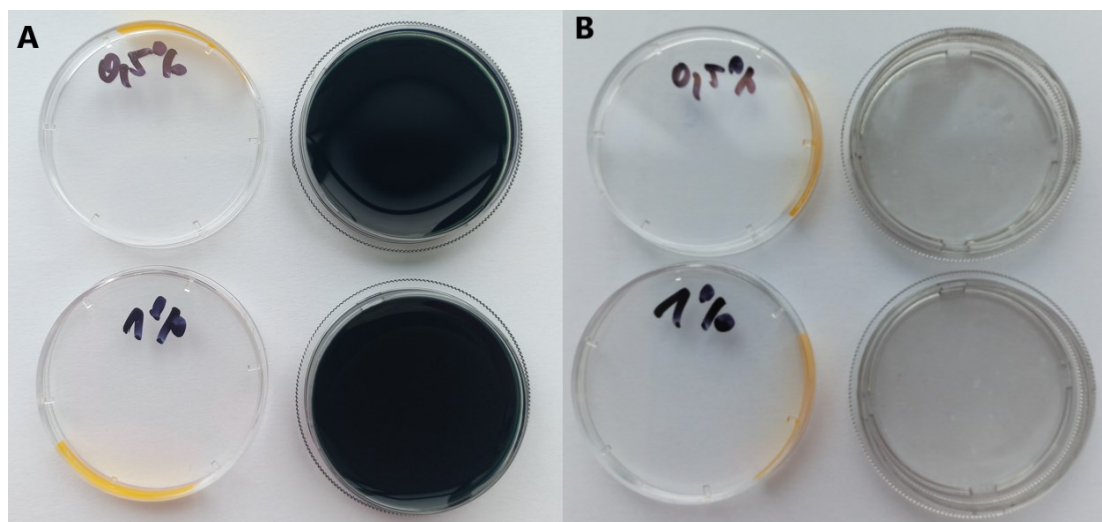
Pro přípravu koloidu disperzní polymerací byl rozpuštěn 5 mM pyrrol v 60 ml roztoku chitosanu. Polymerace byla zahájena při teplotě 23 ± 2 °C přidáním 0,486 g chloridu železitého (5 mM) k reakční směsi. Směs se míchala 10 minut a poté se ponechala v klidu polymerovat. Polymerace byla dokončena během 24 hodin. Za účelem odstranění zbytkových monomerů a nízkomolekulárních nečistot, byly koloidní disperze vyčištěny dialýzou s použitím dialyzační membrány Spectra Por 2 (mezní molekulová hmotnost 12 000–14 000; Spectrum Laboratories Inc., USA). Před dialýzou byla membrána namočená v demineralizované vodě po dobu 30 minut, aby se odstranily membránové konzervační látky, a poté důkladně opláchnuta ve vodě. Koloid PPy/Chitosan (25 ml) byl napipetován do membrány a přenesen do kádinky obsahující 1 l 0,5 % roztok kyseliny octové, který byl denně vyměňován po dobu 14 dnů. Dialyzační proces pak pokračoval dalších 14 dnů, kdy byla místo roztoku kyseliny octové použita ultračistá voda. Ukázka připravených koloidních disperzí je na Obrázku 8.



Obrázek 8 Ukázka vzorků připravených koloidních disperzí

7.3.1.2 Příprava vodivého filmu PPy/Chitosan

Kompozitní filmy byly připraveny *in situ* během přípravy koloidních disperzí PPy na tkáňových polystyrenových kultivačních miskách (TPP; Švýcarsko). V roztoku chitosanu byl rozpuštěn 5 mM pyrrol a reakce zahájena pomocí 5 mM chloridu železitého (Sigma Aldrich, USA). Oxidace pyrrolu probíhala 24 hodin (viz obrázek 9, A). Kultivační misky potažené filmem (PPy/Chitosan) byly opláchnuty methanolem (viz obrázek 9, B).



Obrázek 9 Ukázka vzorků filmů před oplachem (A), Ukázka připravených vzorků filmů (B), PPy/Chitosan_0,5 % a PPy/Chitosan_1 %

7.4 Biologický materiál

7.4.1 Kultura myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3

Pro testování cytotoxicity a proliferace byla použita adherentní buněčná linie NIH/3T3 odvozená od myších embryonálních fibroblastových buněk (ATCC® CRL-1658™, American Type Culture Collection, ATCC). Jako kultivační médium bylo použito médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA Laboratories GmbH, Rakousko) obsahující 10 % Calf séra (BCS, Biosera, Francie) a 100 U·ml⁻¹ penicilin/streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie).

7.4.2 Kultura myších embryonálních kmenových buněk ES-R1

Pro testování proliferace byla dále použita linie pluripotentních kmenových buněk Embryonální kmenové buňky (linie ES-R1) v nediferencovaném stavu byly kultivovány na miskách pro tkáňové kultury. Aby se dokázaly kmenové buňky lépe přichytit a růst jako adherentní kultura, byl povrch tkáňového plastiku potažen 0,1 % želatinou. Pro kultivaci bylo použito kompletní médium s následujícím složením: DMEM, 15 % fetální telecí sérum, 100 U·ml⁻¹ penicilin, 0,1 mg·ml⁻¹ streptomycin, 100 mM roztok neesenciálních aminokyselin (vše od Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 0,05 mM 2-merkptoethanolu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 1000 U ml⁻¹ LIF (Gibco, MA, USA).

7.4.3 Pěstování buněčných kultur

Buněčné linie byly pěstovány v biologickém inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ při 37 °C (HERAcell 150i) v polystyrenových kultivačních nádobách (TPP, Švýcarsko). Pro udržování vysoké životnosti byla prováděna pravidelná pasáž buněčných linií. Nejprve byla vyloučena kontaminace pod inverzním světelným mikroskopem (IX51, Olympus, Japonsko). Následně bylo médium odsáto z kultivační nádoby a buňky byly promyty fosfátovým pufrům (0,2 mL·cm⁻²) (PBS, Biosera, Francie). Po důkladném propláchnutí buněk byl přidán trypsin (0,1 mL·cm⁻²) (Biosera, Francie). Trypsin byl v nádobě ponechán, dokud se buňky neoddělily od povrchu. Následně bylo přidáno kompletní kultivační médium pro inaktivaci trypsinu. Vzniklá buněčná suspenze byla vložena do falkony a stočena v centrifuze na 3 min a 1100 rpm. Získaná buněčná suspenze byla použita pro testování biologických vlastností materiálu a na novou buněčnou pasáž.

7.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

7.5.1 Charakterizace koloidů pomocí měření velikosti částic

Velikosti koloidních částic byly stanoveny dynamickým rozptylem světla (DLS) za použití přístroje Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Tato metoda představuje rychlou a přímou techniku pro snadnou kontrolu velikosti částic a distribuce koloidních částic. Měření hydrodynamických poloměrů koloidních částic, vyjádřených jako z – průměr součinitelů (D_z) bylo provedeno při teplotě 25 °C. Intenzita rozptýleného světla ($\lambda = 633$ nm) byla pozorována při úhlu rozptylu 173°. Byl také stanoven index polydisperzity (PDI) popisující šířku distribuce velikosti částic. Vzorky pro analýzu byly připraveny zředěním 20 μ l koloidní disperze v 3 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové. Všechny vzorky byly testovány ve třech opakováních.

7.5.2 Vodivost koloidních filmů

Vodivost je intenzivní elektrická charakteristika materiálu, která nezávisí na velikosti a tvaru vzorků. Vodivost filmů byla stanovena čtyřbodovou van der Pauwovou metodou, při které jsou čtyři platinové/rhodiové elektrody zapuštěny do okrajů měřeného vzorku. Byl použit programovatelný elektroměr Keithley 6517 B, zdrojový měřič Keithley 2410 a spínač Keithley 7002 (USA). Měření byla prováděna při teplotě 25 °C. Všechny vzorky byly testovány ve třech opakováních.

7.5.3 Biokompatibilita

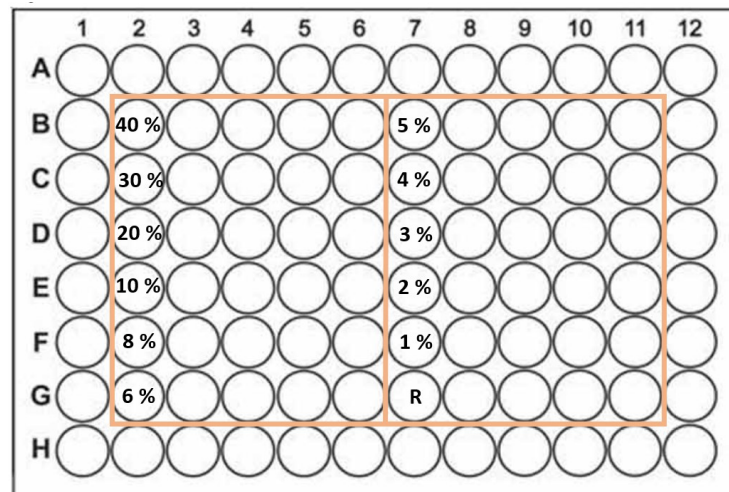
Pro využití materiálu v tkáňovém inženýrství je jedním z důležitých faktorů jeho biokompatibilita. Materiál, který přijde do kontaktu s tkání nesmí být cytotoxický, mutagenní či způsobovat alergické reakce. Aby bylo možné zjistit, zda jsou buňky po vystavení různým látkám schopny zůstat naživu, je důležité kvantifikovat jejich životaschopnost. Životaschopnost buněk se vztahuje k počtu zdravých buněk ve vztahu k referenčním (neošetřeným buňkám). K tomuto účelu lze použít několik testů. Tyto testy mohou být založeny na různých parametrech, jako je integrita buněčných membrán, metabolická aktivita nebo redoxní potenciál buněčné populace. Jedním z běžně používaných testů je měření metabolické aktivity pomocí MTT testu. Dále bývá sledována schopnost buněk adherovat a následně proliferovat na testovaném materiálu.

V této práci byla zkoumána cytotoxicita vzorků koloidní disperze PPy/Chitosan_0,5 % a PPy/Chitosan_1 % na buněčné kultuře NIH/3T3 a proliferace byla testována pomocí NIH/3T3 a ES-R1 na vzorcích filmu PPy/Chitosan_0,5 % a PPy/Chitosan_1 %. Příprava vzorků pro biologické hodnocení byla provedena v souladu s normou ISO 10993–5: 2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků.

7.5.3.1 Cytotoxicita koloidních disperzí – MTT test

MTT test je kolorimetrický test, který se běžně používá ke kvantitativnímu hodnocení životaschopnosti buněk. Tento test je založen na redukci žlutého barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid] na fialové krystalky formazanu metabolicky aktivními buňkami. Hlavním redukčním činidlem odpovědným za redukci MTT je koenzym NADH, který je produktem glykolýzy v cytoplasmě a oxidativní fosforylace v mitochondriích. Jehličkovité krystaly formazanu se dále rozpouštějí v organických rozpouštědlech, například dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo olejích. Výsledný barevný roztok se měří na optickou hustotu při specifické vlnové délce mezi 500 a 600 nm pomocí spektrofotometru. Intenzita barvy formazanu je přímo úměrná počtu životaschopných, metabolicky aktivních buněk (Buranaamnuay, 2021).

Pro testování cytotoxicity byla připravena buněčná suspenze v koncentraci $1 \times 10^5/\text{ml}$, která byla dále napipetována do 96 jamkových destiček. Po 24 hodinách v inkubátoru bylo médium nahrazeno roztoky koloidů zředěných v kultivačním mediu o objemové koncentraci 1–40 % (viz Obrázek 10). Buňky kultivované v čistém mediu bez koloidu byly použity jako reference. Jednalo se tedy o napipetování příslušného objemu vzorku disperze a doplnění do objemu 100 μl na každou jamku, tj. koncentrace 40 % odpovídá 40 μl koloidní disperze a 60 μl kultivačního média. Takto připravené desky byly uloženy do inkubátoru. Po 24 hodinách před provedením MTT testu byla provedena kontrola buněk pod inverzním mikroskopem. Zbytek roztoku koloidní disperze byl z jamek odsát a poté bylo do destiček napipetováno 90 μl kultivačního média a 10 μl roztoku MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemí) s výslednou koncentrací 0,5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Následně se mikrotitrační desky vložily do inkubátoru. Po uplynutí 4 hodin inkubace byl odsát obsah jamek a bylo přidáno 80 μl DMSO a ponecháno inkubovat 20 minut. Dále byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí fotometru Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Testování bylo provedeno v pěti opakováních.



Obrázek 10 Schéma nasazení 96jamkové mikrotitrační destičky pro testování, R – reference

7.5.3.2 Test proliferace buněk na koloidních filmech

Pro využití materiálu v tkáňovém inženýrství je zásadní schopnost buněk přilnout a množit se na materiálu. Adhezi buněk ovlivňují tři hlavní třídy proteinů: 1) molekuly buněčné adheze, 2) proteiny extracelulární matrix, 3) proteiny cytoplazmatické membrány. Pokud jsou buňky schopny na materiál přilnout, je další důležitou vlastností to, zda jsou buňky schopny se na něm dělit a růst. Morfologie proliferujících buněk se kontroluje fluorescenční mikroskopií. K vizualizaci buněk se barví aktinová vlákna a jádro. Barvivo ActinRedTM 555 je použitelné v rámci určování struktury a funkce cytoskeletu a Hoechst 33258 se využívá jako kontrastní barvivo pro barvení nukleových kyselin.

Proliferace NIH/3T3: Připravené kultivační misky s filmem byly sterilizovány 30 min pomocí UV záření. Následně byly na filmy nasazeny buňky o koncentraci $1 \times 10^5/\text{ml}$. Po 4 dnech inkubace se provedla fixace buněčné kultury 4 % formaldehydem, dále permeabilizace 0,5 % Tritonem X-100 a nakonec nabarvení buněčné kultury barvivem ActinRedTM 555 a Hoechst 33258. Proliferace byla vyhodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81. Testování bylo provedeno ve třech opakováních

Proliferace ES-R1: Připravené kultivační misky s filmem byly sterilizovány 30 min pod UV zářením. Byly testovány dvě sady filmů: 1) neošetřené filmy, 2) filmy ošetřené 0,1 % želatinou. Buňky byly nasazeny v koncentraci 8000 buněk/cm². Buňky byly zafixovány po 4 dnech kultivace. Vyhodnocení bylo stejné jako v případě linie NIH/3T3.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Charakterizace koloidních disperzí pomocí měření velikosti částic

Koloidní disperze CP stabilizované polysacharidy jsou chytré formulace, které pomáhají řešit problém špatné rozpustnosti CP ve vodném prostředí a zlepšují cytocompatibilitu finálního kompozitu. Syntéza probíhá disperzní polymerací pyrrolu v přítomnosti sterického stabilizátoru. (Truong *et al.*, 2022). V praktické části této práce byly úspěšně připraveny vzorky koloidu PPy/Chitosan s různým množstvím stabilizátoru (chitosanu). Vzorky nevykazovaly žádné známky destabilizace (agregace/sedimentace).

Velikosti koloidních částic a index polydisperzity (PDI) v koloidní disperzi byly stanoveny na důkladně dialyzovaných vzorcích, vyčištěných od možných nečistot (např. monomerů, zbytkových prekurzorů atd.), které by mohly působit na buňky cytotoxicky. Cílem DLS analýzy bylo stručně vyhodnotit průměrný rozměr částic za předpokladu sférické geometrie. Bylo zjištěno, že všechny vzorky PPy/Chitosan jsou koloidního charakteru (1-1000 nm). Koloidní částice vykazovaly různé velikosti v závislosti na množství stabilizátoru. Koloidy PPy/Chitosan_0,5 % měly větší velikost (174 ± 3 nm) než koloidy PPy/Chitosan_1 % (112 ± 1 nm) viz tabulka 3. Index polydisperzity se pohyboval v hodnotách okolo 0,1 (konkrétně 0,091 pro PPy/Chitosan_0,5 % a 0,116 pro PPy/Chitosan_1 %). PDI může dosahovat hodnot v rozmezí od 0 do 1. Koloidní částice s PDI menším než je 0,1 značí monodisperzitu, hodnoty vyšší než 0,1 polydisperzitu (Raval *et al.*, 2019). Hodnoty PDI připravených koloidů se pohybují na hraně rozlišení mezi mono a polydisperzitou, nicméně dalo by se říct, že koloidní disperze budou obsahovat spíše částice o stejné velikosti.

Tabulka 3 Velikost (D_z – Průměr součinitelů) koloidních částic stabilizovaných pomocí chitosanu jako sterického stabilizátoru.

Vzorek	D_z [nm] (\pm Sm. odch.)	PDI
PPy/Chitosan_0,5 %	174 ± 3	0,091
PPy/Chitosan_1 %	113 ± 1	0,116

Tyto naměřené velikosti částic vzorků koloidů PPy/Chitosan a hodnoty indexu polydisperzity jsou výrazně menší, než částice koloidů PANI/Chitosan připravené enzymově katalytickým polymeračním procesem, které vykazovaly velikost 585 ± 10 nm (Jasenská *et al.*, 2022). Ve studii zaměřené na přípravu koloidů PPy stabilizovaných hyaluronátem

sodným bylo naměřena velikost koloidních částic 447 ± 8 nm (Truong *et al.*, 2022). Tím lze usoudit, že velikost koloidních částic není závislá pouze na množství a typu stabilizátoru, ale i na použitém polymeru.

8.2 Vodivost koloidních filmů

Úspěšně připravené koloidní disperze mohly být dále použity pro přípravu *in situ* kompozitních tenkých vrstev – filmů. Vodivost těchto filmů byla stanovena čtyřbodovou van der Pauwovou metodou. U vzorků koloidních filmů PPy/Chitosan byla naměřena průměrná vodivost v podobných hodnotách, viz tabulka 4. Vzorek PPy/Chitosan_0,5 % vykazoval téměř stejnou vodivost ($0,224 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$) jako vzorek filmu PPy/Chitosan_1 % ($0,238 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Ve studii Jasenské (2021), kde byla zkoumána vodivost kompozitních filmů na bázi PANI a hyaluronátu sodného (SH) a ve druhém případě PANI a chitosanu, se hodnoty pohybovaly od $1,1 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (PANI/SH) do $2,3 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (PANI/Chitosan) (Jasenská *et al.*, 2021). Přijatelné hodnoty vodivosti pro vhodnou elektrickou stimulaci ve fyziologických podmínkách se pohybují v rozmezí $1-10^{-3} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Hu *et al.*, 2014). Připravené filmy jsou tedy vhodnými kandidáty na biomateriál, který bude v TE využíván pro stimulaci buněčných linií elektrickým proudem.

Tabulka 4 Průměrný měrný odpor a průměrná vodivost vzorků koloidních filmů

Vzorek	Průměrný měrný odpor [$\Omega\cdot\text{cm}$] (\pm Sm. odch.)	Průměrná vodivost [$\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$] (\pm Sm. odch.)
PPy/Chitosan_0,5 %	$4,467 \pm 0,005$	$0,224 \pm 0,000$
PPy/Chitosan_1 %	$4,200 \pm 0,002$	$0,238 \pm 0,000$

Vodivost PPy je specificky způsobena vedením typu p (bipolaron), přeskokováním elektronů mezi řetězci a pohybem aniontů nebo kationtů v materiálu. PPy může mít vodivost až $7,5 \times 10^3 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Přesná hodnota závisí na přenosu náboje do sousedních molekul, polaronu, řetězce a délce konjugace a může být řízena použitím různých typů a množství dopantů. Primárním faktorem, který omezuje vodivost PPy, je „porucha“ (tj. místa defektů) v páteři PPy. Více těchto defektů může vzniknout v důsledku redoxního přepínání nebo vystavení kyslíku/vodě, což vede ke snížení vodivosti (Balint, Cassidy and Cartmell, 2014).

Kritickým faktorem omezujícím použití CP v řadě biomedicínských aplikací je snížení jejich vodivosti při fyziologickém pH. Při zkoumání vodivosti vzorků polyanilinových

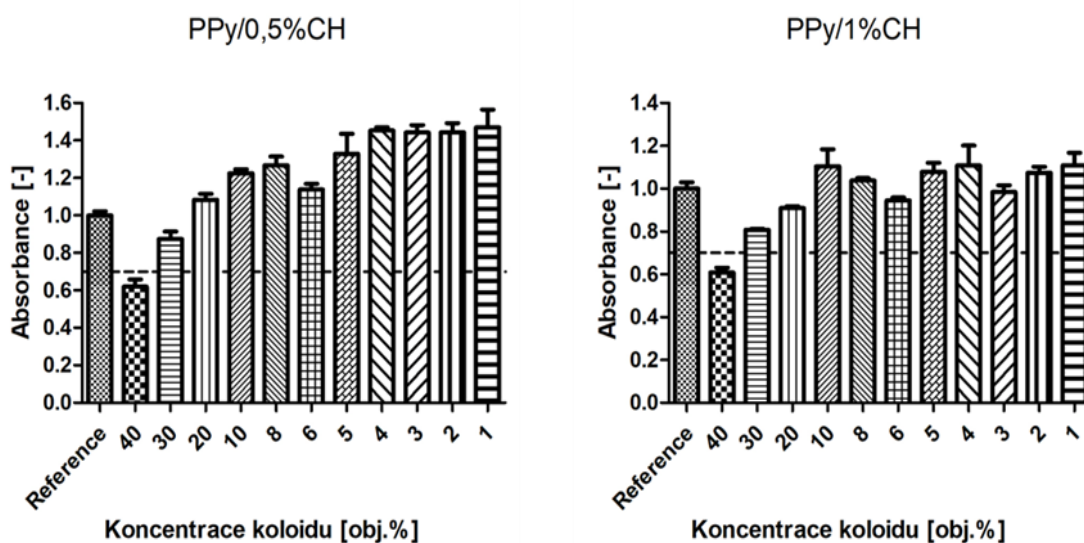
a polypyrrolových solí při různých pH bylo zjištěno, že došlo ke snížení vodivosti s rostoucí hodnotou pH z 3 na 9. Zatímco pokles vodivosti u PANI je dramatický a omezuje použití tohoto polymeru za fyziologických podmínek, snížení vodivosti PPy je zanedbatelné (Capáková *et al.*, 2020). Jedním z přístupů zlepšování vodivých vlastností CP je vytváření kompozitních materiálů na bázi CP a přírodních nebo syntetických biomateriálů. Primárním trendem je, že vodivost se zvyšuje se zvyšujícím se množstvím PPy v kompozitu. To však může vést k proporcionálnímu kompromisu mechanických vlastností. (Liang and Goh, 2020). Úspěšně připravené vodivé filmy mohly být dále použity pro testování biologických vlastností – buněčné proliferace.

8.3 Testování biokompatibility

Rozhodující vlastností jakéhokoli materiálu používaného v tkáňovém inženýrství je jeho biokompatibilita. Je velmi dobře známo, že biokompatibilita je komplexní charakteristika kombinující řadu individuálních biologických vlastností, které jsou testovány pomocí alternativních metod *in vitro*. I když *in vitro* experimenty mohou poskytnout cenné informace, jejich interpretace stále představuje výzvu, protože každý model (např. různé buněčné linie) se může chovat odlišně a lze proto vyvozovat různé závěry (Humpolíček *et al.*, 2018).

8.3.1 Cytotoxicita koloidních disperzí – MTT test

Cytotoxicita je jednou ze základních biologických vlastností určujících použitelnost materiálů. Zde byla cytotoxicita koloidních disperzí PPy/Chitosan hodnocena pomocí MTT testu za použití buněčné linie fibroblastů (NIH/3T3). Myší fibroblasty jsou nejběžnějšími buňkami měkkých tkání, které se používají pro hodnocení cytotoxicity. Životaschopnost buněk referenčního vzorku byla nastavena jako 1 (100 % životaschopnost). Podle ISO 10993-5 (2019) životaschopnost vyšší než 0,7 představuje nepřítomnost cytotoxicity, zatímco vzorky s životaschopností nižší než 0,7 jsou určeny jako cytotoxické. Dříve byla životaschopnost hodnocena podle stupnice: > 0,8 odpovídá nepřítomnosti cytotoxicity, > 0,6 – 0,8 mírná cytotoxicita, > 0,4–0,6 střední cytotoxicita a < 0,4 silná cytotoxicita, proto se některých publikacích s takovým vyhodnocením setkáváme. Relativní životaschopnost buněk v přítomnosti testovaných koloidních disperzí s různým procentuálním zastoupením je znázorněna na obrázku 11.



Obrázek 11 Výsledky cytotoxicity koloidů PPY/Chitosan_0,5 % PPY/Chitosan_1 %, přerušovaná čára zvýrazňuje hodnotu 0,7, což je limitní hranice cytotoxicity.

V případě vzorku PPY/Chitosan_0,5 % byla cytotoxicita (životaschopnost buněk nižší než 70 %) pozorována pouze v přítomnosti 40 % koloidu. Jedná se však pouze o mírnou cytotoxicitu. Snižující se koncentrací koloidu hodnoty absorbance postupně rostly (menší výkyv byl zaznamenán u koncentrace 6 %, kdy mohlo dojít k chybě při pipetování). Všechny koncentrace pod 20 % dosahovaly vyšších hodnot, než 1, tedy reference. Hodnoty absorbance byly ustáleny při koncentraci koloidu pod 4 %, kdy se již hodnoty výrazně neměnily. Z výsledků MTT testu pro vzorek koloidu PPY/Chitosan_1 % lze opět pozorovat mírnou cytotoxicitu pouze v případě 40 % koncentrace koloidu. Snižující se koncentrací koloidů se hodnoty absorbance zvyšují a svého maxima dosahují při koncentraci 10, 4 a 1 %. Nerovnoměrné zvyšování hodnot absorbance může být v důsledku chybného pipetování. Při porovnání výsledků pro oba vzorky koloidu lze konstatovat, že koncentrace 40 % koloidu je mírně cytotoxická. Naopak nižší koncentrace obou vzorků cytotoxicitu nevykazují a ve většině případů převyšují hodnotu reference. Vyšších hodnot absorbancí dosahuje vzorek PPY/Chitosan_0,5 %.

PPy je jedním z nejrozšířenějších vodivých polymerů používaných v biologických aplikacích. Bylo prokázáno, že PPy ve své základní formě je výrazně méně cytotoxický než polymer ve formě solí a vykazuje celkově lepší biokompatibilitu ve srovnání s PANI (Humpolíček *et al.*, 2018). V návaznosti na to bylo zjištěno, že cytotoxické vlastnosti PPy solí se mohou zlepšit po úpravě fosfonáty (zejména diethylfosfonát, dibuthylfosfonát) a jsou srovnatelné s cytotoxicitou čistého PPy (Capáková *et al.*, 2020). V mnoha studiích byl PPy

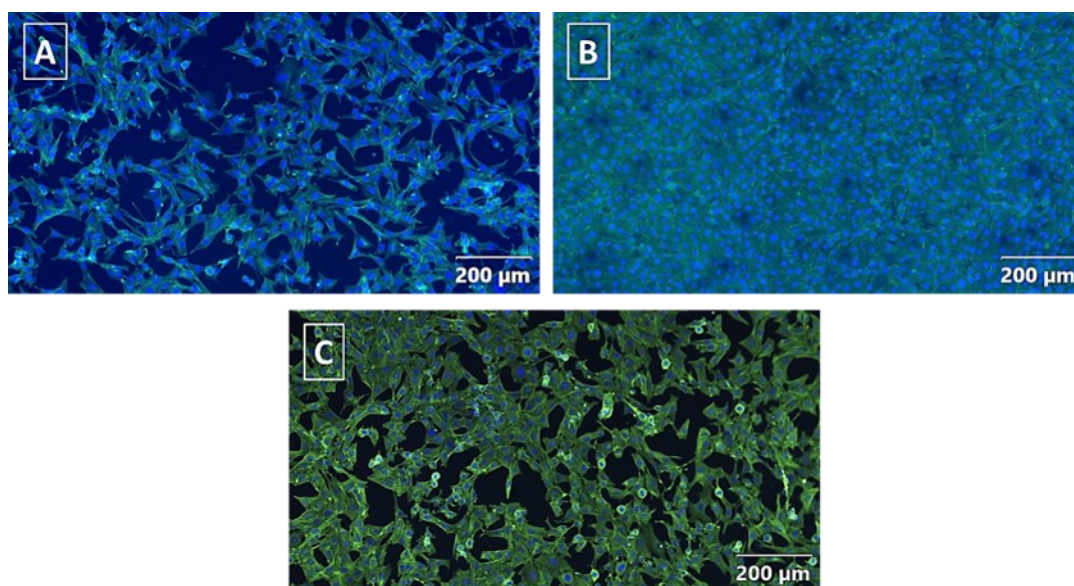
začleněn do různých materiálů prostřednictvím různých metod polymerace, aby se zlepšily vlastnosti výsledného materiálu a podpořily buněčné funkce (Liang and Goh, 2020). V případě scaffoldů připravených chemickým zesíťováním koloidních částic CP a hyaluronátu sodného SH (PPy/HA a PANI/SH) bylo prokázána necytotoxicita, s buněčnou životaschopností vyšší než 70 % (Truong *et al.*, 2022).

V poslední době si získávají zvýšenou pozornost nanokompozitní materiály na bázi chitosanu, díky své biologické rozložitelnosti a netoxické povaze. V jedné ze studií byla zkoumána biokompatibilita koloidních disperzí PANI/Chitosan vyrobených enzymově katalyzovanou polymerací, kdy bylo dosaženo necytotoxického prahu při ředění koloidní disperze v kultivačním médiu nižším než 10 %. Již dříve bylo publikováno, že cytotoxicita koloidů na bázi PANI může být ovlivněna nejen koncentrací PANI, ale také typem stabilizátoru (Jasenská *et al.*, 2022).

Biokompatibilita chitosanu dodnes není zcela objasněna. Potenciální cytotoxický účinek částic chitosanu závisí na velikosti částic a mohl by být také indukován molekulovou hmotností stabilizačního chitosanu (Jasenská *et al.*, 2022). Při zkoumání cytotoxicity vláken z poly(L-laktidové kyseliny)-polykaprolaktonu (PLLA/PCL) potažených chitosanem a polypyrolem, byl potvrzena pozitivní přítomnost chitosanu. Cytotoxicita ve vzorcích Chitosan/PPy-PLLA/PCL byla významně nižší než v kontrolních vzorcích, zatímco filmy z vláken PPy-PLLA/PCL omezovaly životaschopnost buněk (Xu *et al.*, 2019). Několik dalších studií *in vitro* a *in vivo* potvrdilo minimální toxické účinky a biologickou inertnost chitosanu. Studie také zdůraznily skutečnost, že po implantaci scaffoldů na bázi chitosanu nedošlo k žádným komplikacím, jako je zánět nebo alergická reakce. Použité podmínky deacetylace, stejně jako biologický původ chitosanu, ovlivňují řadu biologických a fyzikálně-chemických vlastností polymeru (Bharadwaz and Jayasuriya, 2020).

8.3.2 Test proliferace buněk na koloidních filmech

Pro vytvoření biomateriálu aplikovatelného v TE je důležité znát interakce mezi materiálem a buňkami. Obecně nás zajímá, zda jsou buňky schopny na materiál adherovat a následně proliferovat. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla vyhodnocena morfologie a proliferace buněčných linií NIH/3T3 po 4 dnech na dvourozměrném povrchu vzorků filmu PPy/Chitosan_0,5 % a PPy/Chitosan_1 % v porovnání s referencí (kontrolou– tkáňový plastík) (Obrázek 12). Buňky byly obarveny barvivem ActinGreenTM 555 pro vizualizaci cytoskeletu a barvivem Hoechst 33258 pro obarvení nukleových kyselin.

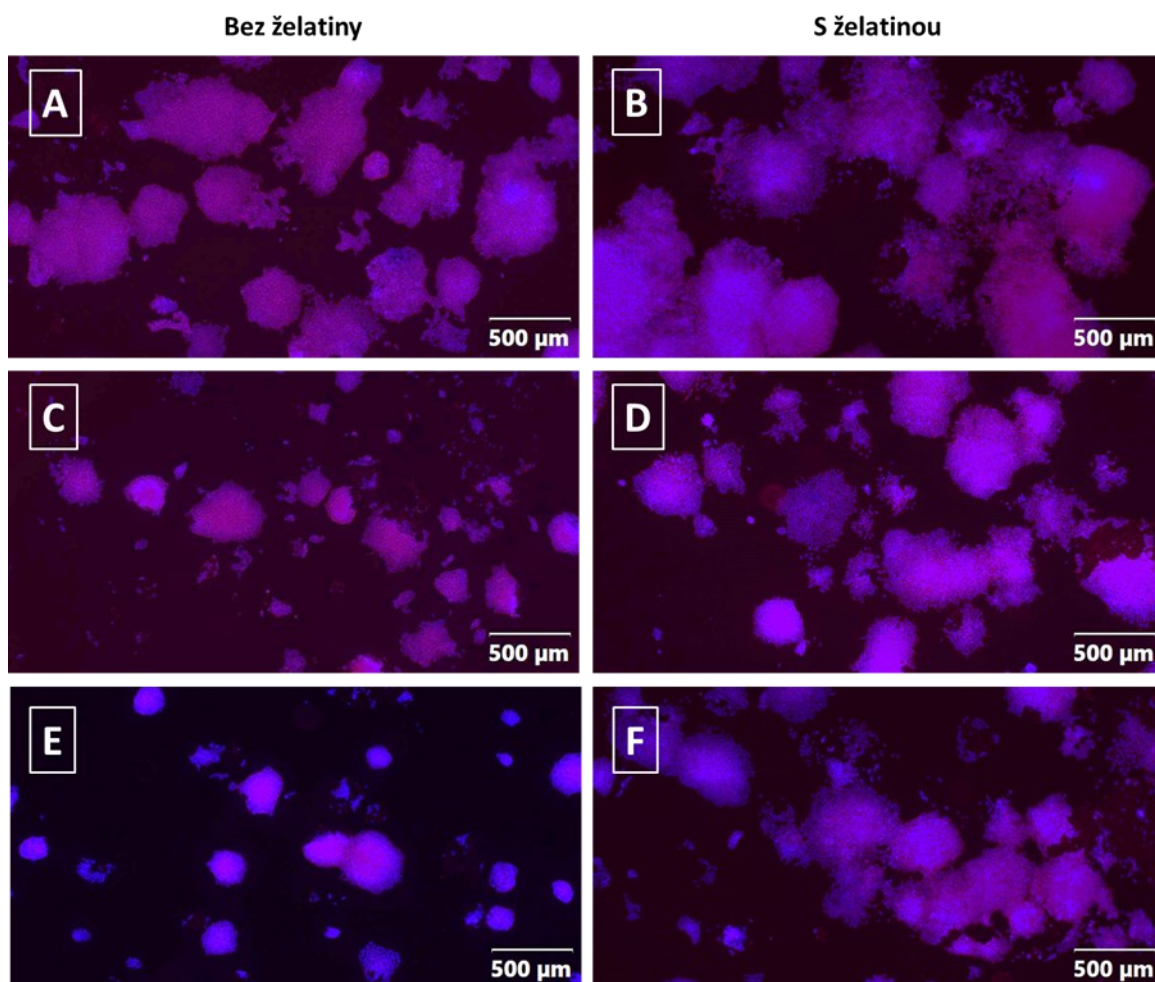


Obrázek 12 Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 na povrchu koloidního filmu: (A) PPy/Chitosan_0,5 %, (B) PPy/Chitosan_0,1 %, (C) Reference

Z mikrofotografií na obrázku 12 (A) je zřejmé, že myší embryonální fibroblasty jsou schopny růst a proliferovat na filmu PPy/Chitosan_0,5 % po dobu 4 dnů srovnatelným způsobem, jako vzorek referenční (C). Je možné pozorovat pouze malý úbytek buněk oproti referenci. Buňky vykazovaly rovnoměrnou distribuci na povrchu a podobnou morfologii, kdy cytoskelet fibroblastů je typicky rozvětvený, protáhlý a buněčné jádro je oválného tvaru. Proliferace na vzorku filmu PPy/Chitosan_1 % vykazovala četný nárůst oproti referenci a vzorku filmu PPy/Chitosan_0,5 % viz Obrázek 12 (B). Distribuce buněk však nebyla na povrchu rovnoměrná jako u reference. Tento jev mohl být způsoben nerovnoměrným povrchem filmu. Můžeme tedy dojít k závěru, že žádný z kompozitních filmů negativně neovlivnil počáteční adhezi a proliferaci buněk. Ačkoli příslušné povrchy umožňovaly při krátkodobých experimentech buněčnou adhezi a proliferaci, není jisté, zda by tento trend

přetrval i při dlouhodobějším kontaktu buněk s testovaným povrchem a mohl by být předmětem dalšího výzkumu.

Dále byla hodnocena schopnost růstu a proliferace buněčných linií ES-R1 po 4 dnech na dvourozměrném povrchu vzorků filmu PPy/Chitosan_0,5 % a PPy/Chitosan_1 % v porovnání s referencí (kontrolou) (Obrázek 13). Buňky byly obarveny barvivem ActinRedTM 555 pro vizualizaci cytoskeletu a barvivem Hoechst 33258 pro vizualizaci jader. Jelikož buňky ESR1 jsou standardně kultivovány na tkáňovém plastiku potaženém 0,1 % želatinou, byly i připravené vodivé filmy pokoutovány. Byla ale sledována i sada filmů, které potaženy želatinou nebyly, s cílem zjistit, zda chitosan podporuje adhezi buněk podobně jako želatina.



Obrázek 13 Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie ES R1 na vzorcích koloidních filmů a reference: (A-B) Reference, (C-D) PPy/Chitosan_0,5 %, (E-F) PPy/Chitosan_0,1 %.

Na Obrázku 12, kdy se jedná o vzorek reference, je možné pozorovat typickou distribuci kulovitých buněk ES-R1 do shluků. Při hodnocení schopnosti růstu a proliferace referenčních vzorků, větší proliferaci vykazuje vzorek reference s želatinou. Na vzorcích filmu PPy/Chitosan_0,5 % (Obrázek 12, C) bez želatiny lze vidět menší shluky buněk, je zde znatelný pokles proliferace oproti referenci. Růst buněk na vzorku filmu PPy/Chitosan_0,5 % (Obrázek 12, D) s želatinou je srovnatelný s referenčním vzorkem bez želatiny. Nejnižší míru buněčné proliferace vykazuje vzorek filmu PPy/Chitosan_1 % bez želatiny (Obrázek 12, E). Lze tedy shrnout, že buňky ES-R1 byly schopny adherovat a růst na všech površích s želatinou. Na vzorcích bez želatiny byl růst buněk oproti referenci omezený.

V posledních desetiletích byly provedeny četné studie s cílem vyhodnotit biokompatibilitu čistého PPy filmu. Například ve výzkumu Ramanaviciene *et al.* (2007) bylo prokázáno, že chemicky syntetizované částice PPy neměly žádný znatelný cytotoxický účinek na buňky myšího peritonea. Zároveň po 6týdenním působení PPy na buňky nebyl identifikován žádný zánět, ani alergické reakce (Ramanaviciene *et al.*, 2010). V mnoha dalších studiích bylo dokázáno, že PPy film má přijatelnou biokompatibilitu umožňující adhezi, růst a diferenciaci několika buněčných linií, jako jsou nervové, kostní, mezenchymální kmenové a endoteliální buňky. Při analýze vztahu mezi koncentrací PPy a životaschopností myších kmenových buněk výsledky ukázaly, že všechny použité koncentrace PPy byly vhodné, neovlivňovaly buněčnou morfologii a proliferaci (Vaitkuvienė *et al.*, 2014). Pro zlepšení biokompatibility a vlastností materiálu, byl PPy připravován ve formě kompozitů, například s chitosanem. Byla testována proliferace buněčných linií MG-63 (lidský kostní osteosarkom) na vzorcích bioimplantátů potažených různými koncentracemi PPy/Chitosan po dobu 5 nebo 7 dnů. Buněčná proliferace byla největší u vzorku s koncentrací 50:50 (PPy:Chitosan) ve srovnání se vzorky o koncentracích 90:10 a 80:20 (PPy:Chitosan) (Kumar *et al.*, 2017).

Buněčné chování na površích je významně ovlivněno chemií a morfologií povrchů, protokoly syntézy, použitým dopantem, purifikačními kroky a koncentrací prekurzorů. Hydrofobní nebo extrémně hydrofilní povrchy obvykle nepodporují adhezi buněk. Dalším faktorem je množství a kvalita povrchových funkčních skupin nebo strukturních motivů. Kladně nabitě skupiny, jako jsou aminy, většinou podporují buněčnou adhezi, stejně jako specifické strukturní motivy, které jsou rozpoznávány buněčnými receptory. Na druhou stranu, záporně nabitě skupiny, jako jsou sulfonáty, mohou omezovat buněčnou adhezi

(Šafaříková et al., 2018). Nezareagované monomery či zbytkové kyseliny používané během syntézy CP jdou často cytotoxické a mohou biokompatibilitu snižovat. Metoda syntézy a koncentrace monomeru může změnit morfologii povrchu a ovlivnit tak buněčné chování. Vyšší koncentrace monomeru mají obecně tendenci vytvářet silnou a vysoce drsnou vrstvu PPy filmu na povrchu, což může negativně ovlivnit buněčnou adhezi a životaschopnost. Naopak tenké a bezpórové PPy filmy získané nižší koncentrací monomeru by mohly zajistit dobrý růst a proliferaci. Při morfologii povrchu je však potřeba uvažovat nad buněčnou linií použitou jako model. Bylo zjištěno, že hrubý profil povrchu materiálu mohl pravděpodobně usnadnit proliferaci kostních buněk. Naopak Schwannovy buňky rostly více na tenkých, vřetenovitých morfologických površích. Také myší mezenchymální kmenové buňky vykazovaly dobrý růst a proliferaci na tenkých PPy filmech bez pórů (Borges *et al.*, 2023).

Je však důležité neopomenout, že buněčné modely 2D (tj. monovrstva) jsou omezené a nereprezentují správně biologický lidský systém a jeho prostředí, a proto se výsledky zjištěné pro tyto modely mohou za klinických podmínek změnit. Testy biokompatibility by měly brát v úvahu biologické modely, které napodobují reakci hostitele a zánětlivý proces.

9 ZÁVĚR

Mnoho pozitivních vlastností CP, jako je jejich biokompatibilita, laditelná vodivost, snadná syntéza a jednoduchá modifikace, činí CP velmi atraktivními materiály v biologických aplikacích včetně TE. PPy je jedním z nejoblíbenějších mezi těmito vodivými polymery. Stále však existují překážky při použití CP v TE. Mezi ně patří například špatné interakce polymer-buňka, absence míst interakce mezi buňkami, hydrofobnost, špatná rozpustnost a schopnost degradace. Příprava CP jako kompozitů, například s přírodními polymery, řeší nedostatky použití samotného CP.

V této práci byly chemickou syntézou úspěšně připraveny koloidní disperze a koloidní vodivé filmy z PPy a polysacharidu chitosanu s různým hmotnostním zastoupením. Měření velikosti koloidních částic ukázalo, že větší množství chitosanu podpořilo tvorbu menších koloidních částic, zatímco výsledky vodivosti filmů se u porovnávaných vzorků významně nelišily. Hlavní přínos studie spočívá ve zkoumání biologických vlastností neboli biokompatibility připravených kompozitů. Pomocí MTT testu bylo zjištěno, že koloidní disperze z PPy a chitosanu vykazují u obou zkoumaných vzorků slabou cytotoxicitu až ve 40 % koncentraci. Dále byla biokompatibilita koloidních filmů demonstrována naočkováním buněčných linií NIH/3T3 a ES-R1 na kompozitní filmy z PPy a chitosanu a pozorováním správného uchycení a proliferace buněk. U buněčných linií NIH/3T3 byla prokázána schopnost buněk na filmu adherovat a proliferovat srovnatelně s referencí. U vzorku s větším množstvím chitosanu dokonce s významně větší proliferací. U buněčných linií ES-R1 byl nárůst buněk na koloidních filmech s želatinou taktéž srovnatelný s referencí.

Vzhledem ke snadné syntéze a výborné biokompatibilitě kompozitů obsahujících PPy a chitosan by mohlo být použití tohoto materiálu slibnou strategií nejenom v tkáňovém inženýrství. Jelikož dosud není znám přesný mechanismus toho, jak vodivý materiál nebo vnější elektrická stimulace podporuje zrání a diferenciaci buněk, budoucí výzkum by se měl zaměřit na biologické interakce na molekulární úrovni, včetně změn genové exprese a proteomiky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmad Ruzaidi, D.A. *et al.* (2021) ‘Advocating Electrically Conductive Scaffolds with Low Immunogenicity for Biomedical Applications: A Review’, *Polymers*, 13(19), p. 3395. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym13193395>.

Ahmed, S. *et al.* (2018) ‘A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, pp. 849–862. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176>.

Ahsan, S.M. *et al.* (2018) ‘Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, pp. 97–109. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>.

Alegret, N., Dominguez-Alfaro, A. and Mecerreyes, D. (2019) ‘3D Scaffolds Based on Conductive Polymers for Biomedical Applications’, *Biomacromolecules*, 20(1), pp. 73–89. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01382>.

Anisimov, Y.A. *et al.* (2021) ‘Polyaniline/Biopolymer Composite Systems for Humidity Sensor Applications: A Review’, *Polymers*, 13(16), p. 2722. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym13162722>.

Ateh, D.D., Navsaria, H.A. and Vadgama, P. (2006) ‘Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues’, *Journal of The Royal Society Interface*, 3(11), pp. 741–752. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0141>.

Azari, Z. *et al.* (2022) ‘Stem CELL-MEDIATED angiogenesis in skin tissue engineering and wound healing’, *Wound Repair and Regeneration*, 30(4), pp. 421–435. Available at: <https://doi.org/10.1111/wrr.13033>.

Bajpai, V.K. and Andreadis, S.T. (2012) ‘Stem Cell Sources for Vascular Tissue Engineering and Regeneration’, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(5), pp. 405–425. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0264>.

Bakhshandeh, B. *et al.* (2017) ‘Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials’, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), pp. 144–172. Available at: <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1430464>.

Balint, R., Cassidy, N.J. and Cartmell, S.H. (2014) ‘Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering’, *Acta Biomaterialia*, 10(6), pp. 2341–2353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>.

Bharadwaz, A. and Jayasuriya, A.C. (2020) ‘Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration’, *Materials Science and Engineering: C*, 110, p. 110698. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110698>.

Białkowska, K. *et al.* (2020) ‘Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), p. 6225. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>.

Borges, M.H.R. *et al.* (2023) 'Recent advances of polypyrrole conducting polymer film for biomedical application: Toward a viable platform for cell-microbial interactions', *Advances in Colloid and Interface Science*, 314, p. 102860. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102860>.

Buranaamnuay, K. (2021) 'The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols', *Open Veterinary Journal*, 11(2), p. 251. Available at: <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9>.

Capáková, Z. *et al.* (2020) 'The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole 2 : Doping with organic phosphonates', *Materials Science and Engineering: C*, 113, p. 110986. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110986>.

Chung, C. and Burdick, J.A. (2009) 'Engineering Cartilage Tissue'.

Collier, J.H. *et al.* (2000) 'Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications', *Journal of Biomedical Materials Research*, 50(4), pp. 574–584. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(20000615\)50:4<574::AID-JBM13>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000615)50:4<574::AID-JBM13>3.0.CO;2-I).

Dahlin, R.L., Kasper, F.K. and Mikos, A.G. (2011) 'Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering', *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), pp. 349–364. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0238>.

Dhandayuthapani, B. *et al.* (2011) 'Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review', *International Journal of Polymer Science*, 2011, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1155/2011/290602>.

Duval, K. *et al.* (2017) 'Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture', *Physiology*, 32(4), pp. 266–277. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.

Green, R.A. *et al.* (2008) 'Conducting polymers for neural interfaces: Challenges in developing an effective long-term implant', *Biomaterials*, 29(24–25), pp. 3393–3399. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.047>.

Guimard, N.K., Gomez, N. and Schmidt, C.E. (2007) 'Conducting polymers in biomedical engineering', *Progress in Polymer Science*, 32(8–9), pp. 876–921. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012>.

Guo, B. and Ma, P.X. (2018) 'Conducting Polymers for Tissue Engineering', *Biomacromolecules*, 19(6), pp. 1764–1782. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00276>.

Hao, L. *et al.* (2022) 'Polypyrrole Nanomaterials: Structure, Preparation and Application', *Polymers*, 14(23), p. 5139. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym14235139>.

He, S. *et al.* (2022) 'Controlled pVEGF delivery via a gene-activated matrix comprised of a peptide-modified non-viral vector and a nanofibrous scaffold for skin wound healing', *Acta Biomaterialia*, 140, pp. 149–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.11.037>.

Heck, J. *et al.* (2022) ‘The influence of physicochemical properties on the processibility of conducting polymers: A bioelectronics perspective’, *Acta Biomaterialia*, 139, pp. 259–279. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.052>.

Hu, W.-W. *et al.* (2014) ‘Electrical stimulation to promote osteogenesis using conductive polypyrrole films’, *Materials Science and Engineering: C*, 37, pp. 28–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.019>.

Humpolíček, P. *et al.* (2018) ‘The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile’, *Materials Science and Engineering: C*, 91, pp. 303–310. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.037>.

Imae, I. and Krukiewicz, K. (2022) ‘Self-doped conducting polymers in biomedical engineering: Synthesis, characterization, current applications and perspectives’, *Bioelectrochemistry*, 146, p. 108127. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108127>.

Janoušková, O. (2018) ‘Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering’, *Physiological Research*, pp. S335–S348. Available at: <https://doi.org/10.33549/physiolres.933983>.

Jasenská, D. *et al.* (2021) ‘Conducting composite films based on chitosan or sodium hyaluronate. Properties and cytocompatibility with human induced pluripotent stem cells’, *Carbohydrate Polymers*, 253, p. 117244. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117244>.

Jasenská, D. *et al.* (2022) ‘Enzyme-Catalyzed Polymerization Process: A Novel Approach to the Preparation of Polyaniline Colloidal Dispersions with an Immunomodulatory Effect’, *Biomacromolecules*, 23(8), pp. 3359–3370. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00371>.

Karageorgiou, V. and Kaplan, D. (2005) ‘Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis’, *Biomaterials*, 26(27), pp. 5474–5491. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.

Kašpárková, V. *et al.* (2019) ‘Polyaniline colloids stabilized with bioactive polysaccharides: Non-cytotoxic antibacterial materials’, *Carbohydrate Polymers*, 219, pp. 423–430. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.038>.

Kolios, G. and Moodley, Y. (2013) ‘Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine’, *Respiration*, 85(1), pp. 3–10. Available at: <https://doi.org/10.1159/000345615>.

Kumar, A.M. *et al.* (2017) ‘Promising bio-composites of polypyrrole and chitosan: Surface protective and in vitro biocompatibility performance on 316L SS implants’, *Carbohydrate Polymers*, 173, pp. 121–130. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.083>.

Lagarkova, M.A. (2019) ‘Such Various Stem Cells’, *Biochemistry (Moscow)*, 84(3), pp. 187–189. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0006297919030015>.

- Laird, N.Z. *et al.* (2021) ‘Applications of nanotechnology in 3D printed tissue engineering scaffolds’, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 161, pp. 15–28. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.01.018>.
- Langer, R. and Vacanti, J. (2016) ‘Advances in tissue engineering’, *Journal of Pediatric Surgery*, 51(1), pp. 8–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022>.
- Lee, J.-W. *et al.* (2006) ‘Carboxylic Acid-Functionalized Conductive Polypyrrole as a Bioactive Platform for Cell Adhesion’, *Biomacromolecules*, 7(6), pp. 1692–1695. Available at: <https://doi.org/10.1021/bm060220q>.
- Liang, Y. and Goh, J.C.-H. (2020) ‘Polypyrrole-Incorporated Conducting Constructs for Tissue Engineering Applications: A Review’, *Bioelectricity*, 2(2), pp. 101–119. Available at: <https://doi.org/10.1089/bioe.2020.0010>.
- Malafaya, P.B. *et al.* (2008) ‘Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures’, *Biomaterials*, 29(29), pp. 3914–3926. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.023>.
- Mano, J.F. *et al.* (2007) ‘Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends’, *Journal of The Royal Society Interface*, 4(17), pp. 999–1030. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0220>.
- Manzari-Tavakoli, A. *et al.* (2020) ‘Fabrication of nanochitosan incorporated polypyrrole/alginate conducting scaffold for neural tissue engineering’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 22012. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78650-2>.
- Müller, P., Lemcke, H. and David, R. (2018) ‘Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies’, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(6), pp. 2607–2655. Available at: <https://doi.org/10.1159/000492704>.
- Municoy, S. *et al.* (2020) ‘Stimuli-Responsive Materials for Tissue Engineering and Drug Delivery’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), p. 4724. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21134724>.
- O’Brien, F.J. (2011) ‘Biomaterials & scaffolds for tissue engineering’, *Materials Today*, 14(3), pp. 88–95. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- Orlando, G. *et al.* (2011) ‘Regenerative Medicine and Organ Transplantation: Past, Present, and Future’, *Transplantation*, 91(12), pp. 1310–1317. Available at: <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318219ebb5>.
- Ramanaviciene, A. *et al.* (2010) ‘Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice’, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(2), pp. 311–315. Available at: <https://doi.org/10.1211/jpp.59.2.0017>.
- Raval, N. *et al.* (2019) ‘Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development’, in R.K. Tekade (ed.) *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Academic Press (Advances in Pharmaceutical Product Development and Research), pp. 369–400. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>.

Rinaudo, M. (2006) 'Chitin and chitosan: Properties and applications', *Progress in Polymer Science*, 31(7), pp. 603–632. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.

Sharma, P. *et al.* (2019) 'Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope', *Journal of Medicine and Life*, 12(3), pp. 225–229. Available at: <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0032>.

Shokeir, A.A., Harraz, A.M. and El-Din, A.B.S. (2010) 'Tissue engineering and stem cells: Basic principles and applications in urology: Basics and applications of stem cells in urology', *International Journal of Urology*, 17(12), pp. 964–973. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2010.02643.x>.

Stejskal, J. *et al.* (2021) 'Pressure-Sensitive Conducting and Antibacterial Materials Obtained by *in Situ* Dispersion Coating of Macroporous Melamine Sponges with Polypyrrole', *ACS Omega*, 6(32), pp. 20895–20901. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02330>.

Stejskal, J. and Sapurina, I. (2005) 'Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report)', *Pure and Applied Chemistry*, 77(5), pp. 815–826. Available at: <https://doi.org/10.1351/pac200577050815>.

Sultankulov, B. *et al.* (2019) 'Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine', *Biomolecules*, 9(9), p. 470. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom9090470>.

T. Brown, P. *et al.* (2013) 'Stem Cell-based Tissue Engineering Approaches for Musculoskeletal Regeneration', *Current Pharmaceutical Design*, 19(19), pp. 3429–3445. Available at: <https://doi.org/10.2174/13816128113199990350>.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', *Cell*, 126(4), pp. 663–676. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.

Talikowska, M., Fu, X. and Lisak, G. (2019) 'Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review', *Biosensors and Bioelectronics*, 135, pp. 50–63. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.001>.

Truong, T.H. *et al.* (2022) 'New approach to prepare cytocompatible 3D scaffolds via the combination of sodium hyaluronate and colloidal particles of conductive polymers', *Scientific Reports*, 12(1), p. 8065. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11678-8>.

Vacanti, C.A. (2006) 'The history of tissue engineering', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(3), pp. 569–576. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x>.

Vaitkuvienė, A. *et al.* (2014) 'Some biocompatibility aspects of conducting polymer polypyrrole evaluated with bone marrow-derived stem cells', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, pp. 152–156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.06.030>.

Vukajlovic, D. *et al.* (2019) 'Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications', *Materials Science and Engineering: C*, 96, pp. 955–967. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.026>.

Xu, Y. *et al.* (2019) 'Fabrication of Chitosan/Polypyrrole-coated poly(L-lactic acid)/Polycaprolactone aligned fibre films for enhancement of neural cell compatibility and neurite growth', *Cell Proliferation*, 52(3), p. e12588. Available at: <https://doi.org/10.1111/cpr.12588>.

Yazdimamaghani, M. *et al.* (2017) 'Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering', *Materials Science and Engineering: C*, 71, pp. 1253–1266. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.027>.

Yue, J. and Epstein, A.J. (1990) 'Synthesis of self-doped conducting polyaniline', *Journal of the American Chemical Society*, 112(7), pp. 2800–2801. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00163a051>.

Zarei, M. *et al.* (2021) 'Fabrication and characterization of conductive polypyrrole/chitosan/collagen electrospun nanofiber scaffold for tissue engineering application', *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, pp. 175–186. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.031>.

Zurina, I.M. *et al.* (2020) 'Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach', *Acta Biomaterialia*, 113, pp. 63–83. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.016>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CP	vodivé polymery (Conductive Polymers)
DLS	dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering)
ECM	extracelulární matrix (Extracellular Matrix)
ESCs	embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells)
GAM	genově aktivovaná matrice (Gene-Activated Matrix)
GAG	glykosaminoglykan
HA	kyselina hyaluronová
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky (Induced Pluripotent Stem Cells)
MSC	mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal Stem Cell)
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
PANI	polyanilin
PCL	polykaprolakton
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PLLA	kyselina poly-L-mléčná
PPy	polypyrrol
PSS	polystyrensulfonová kyselina
PT	polythiofen
RF	růstový faktor
SH	hyaluronát sodný
TE	tkáňové inženýrství (Tissue Engineering)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Principy tkáňového inženýrství (upraveno podle O'Brien, 2011)	15
Obrázek 2 Kmenové buňky – sebeobnova a diferenciacie (upraveno podle Takahashi and Yamanaka, 2006)	18
Obrázek 3 Struktura polyacetyleny (nahore), poly(ethylendioxythiofenu) (dole) (Převzato podle Heck <i>et al.</i> , 2022).....	28
Obrázek 4 Chemická struktura PANI (převzato podle Nezakati et al., 2018).....	31
Obrázek 5 Polymerace PPy z pyrrolových monomerů za použití FeCl ₃ jako oxidantu (upraveno podle Liang and Goh, 2020)	32
Obrázek 6 Formy vodivých biomateriálů a jejich aplikace v tkáňovém inženýrství (upraveno podle Guo and Ma, 2018)	34
Obrázek 7 Proces tvorby PPy-Chitosan hydrogelu (upraveno podle (Liang and Goh, 2020)	36
Obrázek 8 Ukázka vzorků připravených koloidních disperzí.....	43
Obrázek 9 Ukázka vzorků filmů před oplachem (A), Ukázka připravených vzorků filmů (B), PPy/Chitosan_0,5 % a PPy/Chitosan_1 %	43
Obrázek 10 Schéma nasazení 96jamkové mikrotitrační destičky pro testování, R – reference	47
Obrázek 11 Výsledky cytotoxicity koloidů PPy/Chitosan_0,5 % PPy/Chitosan_1 %, přerušovaná čára zvýrazňuje hodnotu 0,7, což je limitní hranice cytotoxicity.....	51
Obrázek 12 Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 na povrchu koloidního filmu: (A) PPy/Chitosan_0,5 %, (B) PPy/Chitosan_0,1 %, (C) Reference.....	53
Obrázek 13 Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie ES R1 na vzorcích koloidních filmů a reference: (A-B) Reference, (C-D) PPy/Chitosan_0,5 %, (E-F) PPy/Chitosan_0,1 %	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vodivost vybraných CP (upraveno podle (Guimard, Gomez and Schmidt, 2007)	27
Tabulka 2 Složení reakčních směsí používaných pro přípravu koloidů stabilizovaných chitosanem prostřednictvím oxidace pyrrolu chloridem železitým	42
Tabulka 3 Velikost (z – Průměr součinitelů) koloidních částic stabilizovaných pomocí chitosanu jako sterického stabilizátoru	48
Tabulka 4 Průměrný měrný odpor a průměrná vodivost vzorků koloidních filmů	49

