

Polymerní nanovlákná pro biomedicínské aplikace

Barbora Listová

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Listová**
Osobní číslo: **T22099**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Polymerní nanovláknna pro biomedicínske aplikace**

Zásady pro vypracování

Polymerní nanovláknna nacházejí uplatnění v různých vědeckých a průmyslových aplikacích. Typické aplikace jsou tkáňové inženýrství, vývoj biosenzorů, systémy pro podávání léčiv, či filtrační systémy. K efektivní metodě přípravy nanovláken patří především elektrostatické zvlákňování. V rámci teoretické části se studentka bude věnovat popisu této metody a přípravy nanovláken vybraných polymerů využitelných pro biomedicínske aplikace. Dále se zaměří na využití nanonovláken specificky v oblasti biomedicíny. Praktická část bude zaměřena na přípravu polymerních nanovláken a jejich materiálovou a především biologickou charakterizaci.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Al-Enizi, A. M., Zagho, M. M., & Elzatahry, A. A. (2018). Polymer-based electrospun nanofibers for biomedical applications. *Nanomaterials*, 8(4), 259.
- [2] Dahlin, R. L., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2011). Polymeric nanofibers in tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), 349-364.
- [3] Ibrahim, H. M., & Klingner, A. (2020). A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing*, 90, 106647.
- [4] Nemati, S., Kim, S. J., Shin, Y. M., & Shin, H. (2019). Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano convergence*, 6(1), 36.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Zdenka Víchová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou 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 mohu užít své dílo – bakalářskou 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 bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské 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 na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na polymerní nanovlákná a jejich potenciální využití v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Hlavním cílem bylo připravit polymerní nanovlákná metodou elektrostatického zvlákňování a charakterizovat jejich základní vlastnosti. Praktická část zahrnovala nejen samotný proces elektrostatického zvlákňování polymerních roztoků, ale také morfologickou analýzu vzniklých nanovláken, hodnocení jejich biokompatibility a studium vlivu morfologie na chování buněk.

Klíčová slova: polymerní nanovlákná, elektrostatické zvlákňování, biokompatibilita, tkáňové inženýrství, biomedicína

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on polymer nanofibers and their potential applications in tissue engineering and regenerative medicine. The main objective was to prepare polymer nanofibers using the electrospinning method and to characterize their fundamental properties. The practical part included not only the electrospinning of polymer solutions, but also the morphological analysis of the resulting nanofibers, the evaluation of their biocompatibility, and the investigation of the influence of morphology on cell behavior.

Keywords: polymer nanofibers, electrospinning, biocompatibility, tissue engineering, biomedicine

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Zdence Víchové, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost při zpracování této bakalářské práce, stejně jako za ochotu a vstřícnost při řešení vzniklých otázek. Velké poděkování patří také paní Ing. Lence Lovecké, Ph.D. za výpomoc při elektrostatickém zvlákňování. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 NANOVLÁKNA.....	13
1.1 TECHNIKY VÝROBY NANOVLÁKEN	13
1.1.1 Dvousložkové vytlačování	13
1.1.2 Fázová separace	14
1.1.3 Templátová syntéza.....	14
1.1.4 Meltblown technologie.....	14
1.1.5 Elektrostatické zvlákňování	15
1.2 STRUKTURY NANOVLÁKEN	17
1.2.1 Anizotropní struktura	17
1.2.2 Izotropní struktura	17
2 POLYMERY PRO BIOAPLIKACE.....	20
2.1 POLYVINYLIDENFLUORID (PVDF)	20
2.2 KYSELINA POLYMLÉČNÁ (PLA)	21
2.3 CHITOSAN	21
2.4 CELULÓZA.....	22
2.5 KYSELINA HYALURONOVÁ (HA).....	23
3 APLIKACE V BIOMEDICÍNĚ.....	25
3.1 HOJENÍ A KRYTÍ RAN	25
3.2 NOSIČE LÉČIV	26
3.3 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	27
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	29
4 CÍL PRÁCE	30
5 MATERIÁLY	31
5.1 CHEMIKÁLIE.....	31
5.2 POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE	31
5.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	31
6 METODIKA	33
6.1 PŘÍPRAVA NANOVLÁKEN	33
6.1.1 Příprava polymerních roztoků	33
6.1.2 Elektrostatické zvlákňování	36
6.1.3 Analýza SEM	37
6.2 BUNĚČNÉ TESTOVÁNÍ.....	38
6.2.1 Příprava extraktů	38
6.2.2 Pasážování	38

6.2.3	Cytotoxicita	38
6.2.4	Růst na povrchu	39
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
7.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A ELEKTROSTATICKE ZVLÁKŇOVÁNÍ	41
7.1.1	Analýza SEM	42
7.2	BUNĚČNÉ TESTOVÁNÍ	45
7.2.1	Cytotoxicita	46
7.2.2	Růst na povrchu a v přímém kontaktu.....	48
ZÁVĚR.....		54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		56
SEZNAM OBRÁZKŮ		60
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		61

ÚVOD

Polymerní nanovlákná se v posledních desetiletích stala klíčovým prvkem v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny díky svým unikátním vlastnostem, jako je vysoká pórovitost a strukturální podobnost s extracelulární matrix. Tyto vlastnosti umožňují jejich využití v široké škále biomedicínských aplikací, včetně nosičů léčiv, materiálů pro hojení ran či náhrad tkání. Pórovitá struktura totiž ulehčuje transport živin a kyslíku k buňkám a odvod odpadních produktů, zatímco strukturální podobnost s ECM vytváří pro buňky příroznější prostředí, čím podporuje jejich přichycení a proliferaci. Jednou z nejefektivnějších metod pro přípravu polymerních nanovláken je elektrostatické zvlákňování, které umožňuje přesnou kontrolu nad morfologií a vlastnostmi vláken. Tento proces je však silně závislý na optimalizaci výrobních parametrů, jako jsou viskozita roztoku, elektrické napětí či prostředí, které významně ovlivňují jak samotný proces, tak kvalitu výsledných nanovláken.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na přípravu polymerních nanovláken z chitosanu metodou elektrostatického zvlákňování a jejich charakterizaci z hlediska biokompatibility, buněčné adheze a proliferace. Výběr chitosanu jako materiálu byl motivován jeho přírodním původem, biodegradabilitou a potenciálem pro biomedicínské aplikace. Teoretická část práce poskytuje přehled o technologiích výroby nanovláken, vlastnostech syntetických a přírodních polymerů a výsledné využití nanovláken v biomedicině. Praktická část se soustředí na výrobu chitosanových nanovláken, analýzu jejich morfologie pomocí skenovací elektronové mikroskopie, hodnocení cytotoxicity prostřednictvím MTT testu a ověření schopnosti nanovláken podporovat buněčnou adhezi a proliferaci pomocí fluorescenční mikroskopie. Cílem práce je přispět k rozšíření poznatků o polymerních nanovláčknech a jejich potenciálu pro regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOVLÁKNA

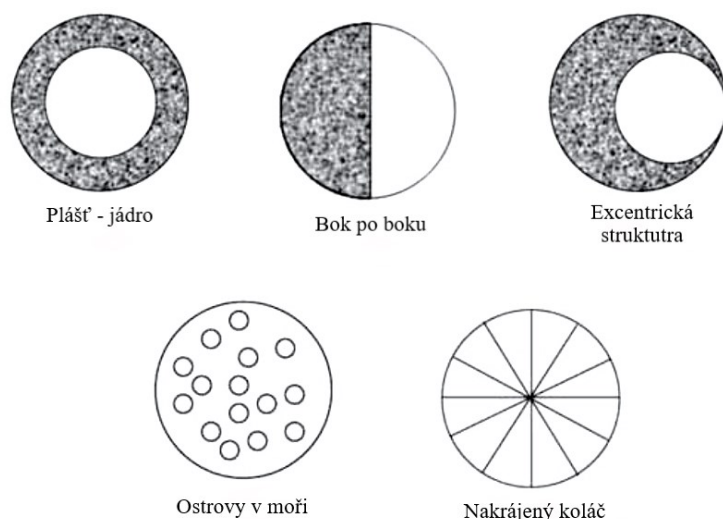
Nanovlákná jsou vlákna o velmi malém průměru, neviditelná pouhým okem. Podle definice se jedná o vláknitý materiál, u kterého je alespoň jeden rozměr menší než 100 nm. Nacházejí široké uplatnění v různých odvětvích jako je např. energetika, elektronika, či při obnovení životního prostředí. Díky svým vlastnostem (jako je například vysoká pórovitost, nízká hustota, dobrá prodyšnost nebo kompatibilita s jinými materiály) se začaly využívat i ve zdravotnictví jako filtry a pro léčbu i hojení ran. V tkáňovém inženýrství zastupují roli stavby scaffoldu pro růst tkáňových buněk a přípravu náhradních orgánů. [1; 2]

1.1 Techniky výroby nanovláken

Volba techniky výroby nanovláken je velmi důležitým krokem, protože mimo zvoleného materiálu, právě ta ovlivňuje vlastnosti výsledných nanovláken jako jsou průměr i délka, póréznost, či mechanické vlastnosti. Nanovlákná mohou být připravena různými technikami, z nichž každá má své výhody i omezení. Jednotlivé techniky budou popsány v dalších kapitolách. [3]

1.1.1 Dvousložkové vytlačování

Za dvousložková vlákna označujeme taková vlákna, která vznikají vytlačováním dvou polymerů z jedné zvlákňovací trysky za vzniku jednoho vlákna. Využívána je také metoda potrubí, kdy jedna složka potkáva druhou na konci trubky, a tím vzniká dvousložkové vlákno. Dvousložková vlákna mohou mít na průřezu strukturu plášť-jádro, bok po boku, strukturu excentrickou, strukturu ostrovů v moři nebo nakrájeného koláče. Tyto struktury jsou zobrazeny na obrázku 1 [4].



Obrázek 1 Dvousložková vlákna na průřezu

(zdroj: [4])

1.1.2 Fázová separace

Mechanismem fázové separace jsou fyzikální rozdíly mezi fázemi. Nejdříve je polymer smíchán s rozpouštědlem až dosáhne stavu zgelování. Poté se fáze s rozpouštědlem extrahuje a zbylá fáze zůstává ponechána. Obecně se fázová separace dělí do pěti fází: rozpouštění, zgelování, extrakce rozpouštědlem, zmrazení a lyofilizace. [4]

1.1.3 Templátová syntéza

Metoda templátové syntézy je založena na myšlence použití struktury již existujícího materiálu jako šablony pro syntézu a řízený růst nových materiálů s požadovanými vlastnostmi. Výsledkem jsou materiály s jedinečnou strukturou a morfologií. Teoreticky lze konstatovat, že na bázi templátové syntézy probíhá například i replikace DNA. [5; 6]

1.1.4 Meltblown technologie

Tento jednokrokový proces zajišťuje přeměnu polymerní suroviny na velmi jemná vlákna a netkanou textilií. Meltblown technologie zahrnuje pět hlavních komponent: extruder, dávkovací čerpadlo, sestava matrice, tvorba tkaniva, namotávání. [7]

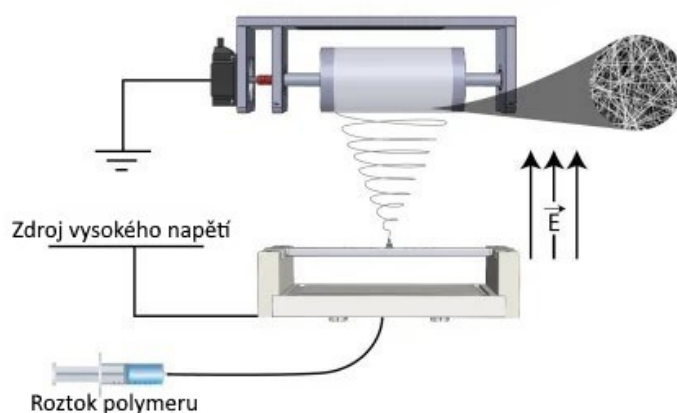
Polymer ve formě prášku nebo granulí je nejdříve převáděn z násypky do extrudéru, kde je taven. Extrudér poté taveninu dodává do dávkovacího čerpadla. Dávkovací čerpadlo následně zajišťuje postupné dávkování taveniny polymeru do sestavy matrice, jenž je zodpovědná za kvalitu výsledných vláken. [8]

Tvorba tkaniva zahrnuje vzduchovou soustavu zajišťující proudění vzduchu o různých teplotách a vysoké rychlosti. Tavenina polymeru je vytlačována malými otvory k ústí horizontálního vzduchu, což způsobuje rychlé tání a prodlužování na jemné vlákno o malém průměru. Proud vzduchu o stejné teplotě jako tavenina pomáhají také transportovat prodloužená vlákna do sběrače. Sběrač zachycuje proudy tenkých vláken, a tak tvoří netkanou textilii s náhodnou orientací vláken. Nakonec jsou vlákna namotávána do válcového tvaru pro snadnější manipulaci. [8]

1.1.5 Elektrostatické zvlákňování

Elektrospinning neboli elektrostatické zvlákňování patří mezi nepoužívanější a zároveň nejprimitivnější metody výroby nanovláken. Tato technologie je unikátní tím, že na rozdíl od ostatních umožňuje vytvářet různé sestavy vláken, což je výhodné zejména pro různorodé využití produktů z těchto vláken a možnosti jejich modifikace s ohledem na specifické aplikace. Elektrostatickým zvlákňováním lze vyrobit vláknité struktury s vlákny orientovanými, náhodně uspořádanými nebo sub mikronovými stočenými a pružinovými strukturami. [9]

Zařízení pro elektrostatické zvlákňování se skládá z vysokonapěťového napájecího zdroje připojeného ke zvlákňovací trysce a uzemněného kolektoru (obrázek 2). Kapka roztoku polymeru se aplikuje na špičku zvlákňovací trysky, která je dostatečně nabitá vysokým elektrickým napětím. Při tom dochází k elektrostatickému odpuzování, kapky roztoku se roztahují a jsou přitahovány ke kolektoru opačné polarity. Rozpouštědlo se vypařuje a zůstávají polymerní vlákna. [10]



Obrázek 2 Zařízení pro elektrostatické zvlákňování

(zdroj: [11])

1.1.5.1 Faktory ovlivňující elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování polymerních roztoků je složitý proces. Zda a jak se bude daný roztok polymeru elektrostaticky zvlákňovat je dáno vlivem několika klíčových parametrů, mezi které patří viskozita roztoku, jeho elektrická vodivost, napětí aplikované při zvlákňování, vlhkost a teplota ovzduší a vzdálenost mezi hrotem zvlákňovací trysky a kolektorem.

Jedním z klíčových parametrů je vzdálenost mezi hrotem zvlákňovací trysky a kolektorem, která ovlivňuje proces natahování kapky roztoku do vláken. Například s větší vzdáleností se obvykle vytvářejí tenčí vlákna kvůli déle trvajícimu natahování kapky roztoku, což umožňuje větší elongaci vláken. To však platí pouze do určité kritické vzdálenosti, po jejímž překročení dojde k destabilizaci vlákna.

Viskozita roztoku je dalším zásadním faktorem, který má přímý vliv na schopnost polymerního roztoku vytvářet vlákna. Příliš vysoká viskozita roztoku může způsobit, že roztok se nebude zvlákňovat vlivem nedostatečné síly k natahování, a naopak při nízké viskozitě se proud roztoku rozdělí na kapky a žádná vlákna se nevytvoří. Optimální viskozita závisí na konkrétním polymeru a jeho koncentraci v roztoku.

Významnou roli v procesu elektrostatického zvlákňování, hraje také vodivost roztoku. Čím je vodivost vyšší, tím lépe se vlákno roztoku natahuje, protože zvyšuje schopnost roztoku reagovat na elektrické pole, což ve výsledku zabraňuje tvorbě kapiček.

Vlhkost ovzduší ovlivňuje rychlost odpařování rozpouštědla během procesu zvlákňování. Zvýšená vlhkost vede ke sníženému odpařování rozpouštědla, tudíž vlákno polymeru bude tuhnout pomaleji a povede k tvorbě nehomogenní morfologie vláken. Vliv vlhkosti na chování roztoku polymeru je závislý na konkrétním polymeru, jeho afinitě k vodě a specifických podmínkách zvlákňování. Například u polymerů, které silně absorbují vodu, může vlhkost výrazně ovlivnit viskozitu roztoku a zpomalit proces zvlákňování.

Dalším podstatným parametrem ovlivňujícím zvlákňování je teplota prostředí, která taktéž ovlivňuje rychlost odpařování rozpouštědla a zároveň má dopad na viskozitu. Obecně platí, že vyšší teplota okolního prostředí urychluje odpařování rozpouštědla a také snižuje viskozitu, tudíž vytvořená vlákna budou mít menší průměr. [10; 12]

1.2 Struktury nanovláken

Neuspořádaná nanovláknata vyrobena primárními procesy elektrostatického zvlákňování se využívají v mnoha oblastech, avšak nesplňují požadavky pro pokročilejší nanovláknata a aplikace. Nedokážou totiž zaručit vyšší kvalitu, funkční variabilitu, větší povrchy a vysokou propustnost a poréznost. Proto bylo provedeno několik úprav základního uspořádání a byly vyvinuty složitější struktury vláken. Zlepšení se soustředí především na orientaci uložených vláken a morfologii vláken. Hlavní typy struktur budou popsány v následujících kapitolách. [12]

1.2.1 Anizotropní struktura

Pokud má materiál anizotropní strukturu, znamená to, že každá jeho část má jiné vlastnosti v závislosti na směru. Živé tkáně vykonávající biologické funkce obvykle disponují anizotropními strukturami na různých úrovních, od molekul až po úroveň celých tkání. V těchto strukturách jsou molekuly uspořádány ve specifickém směru díky speciálním metodám nebo působení vnějších faktorů napomáhajícím vzniku uspořádaného systému. K takovým strukturám řadíme například svalová vlákna obsahující elastická kolagenní vlákna o velikosti nanometrů, která jsou uspořádána paralelně. Tato jedinečná vláknitá struktura vykazuje vysokou elasticitu ve směru svého uspořádání a funguje jako ideální tkáň pro absorpci nárazů a stresu ve směru zatížení. Podobně jsou uspořádány i lidská rohovka a krevní cévy. V rohovce je každá lamina tvořena kolagenovými vlákny, která jsou rovnoměrně uspořádána a zasazena do gelové matrice, což zajišťuje správné zarovnání rohovky. [13]

U nanomateriálů s anizotropní strukturou se setkáváme s unikátními vlastnostmi, díky kterým nachází tyto nanomateriály bohaté využití v oblasti elektroniky, fotovoltaiky nebo biomedicíny. V závislosti na aplikaci je ovšem důležité kontrolovat také orientaci částic vzhledem k ostatním částicím nebo substrátu, na kterém se nachází. Jinde je zase pro účinnost nanomateriálu vyžadována jeho schopnost tvořit vzájemně propojené sítě. Aby tedy bylo možné plně využít všech výjimečných vlastností anizotropních nanomateriálů, je nutná kontrola orientace a konektivita částic současně s prostorovým uspořádáním. [14]

1.2.2 Izotropní struktura

Za izotropní lze označit takový materiál, jehož vlastnosti jsou ve všech směrech stejné, na rozdíl od anizotropní struktury. To znamená, že takové materiály nemají žádnou preferovanou orientaci nebo rozložení, a jejich mechanické, optické, či jiné fyzikální vlastnosti jsou

homogenní v celé své struktuře. Jak už bylo zmíněno, většina biologických materiálů vykazuje anizotropní vlastnosti, ovšem některé mají izotropní a homogenní charakter, jako například parenchym. [15; 16]

1.2.3 Příprava

Příprava nanovláken zahrnuje různé technologie, které umožňují řízenou organizaci materiálů na mikroskopické úrovni. Tyto postupy jsou klíčové pro dosažení požadovaných vlastností, jako je orientace vláken, či už izotropní nebo anizotropní, nebo struktura materiálů s řízenou pórovitostí. Mezi hlavní způsoby přípravy biomateriálů s anizotropní strukturou patří například sušení mrazem ve směru vláken. Náhodné ukládání ledových krystalků během mrazení může způsobit smrštění objemu a místní porušení porézní struktury. Proto se uplatňuje řízená krystalizace ledu, která umožňuje zachování orientace pórovitosti materiálu. Dále se pro vytvoření materiálu s touto strukturou může využívat působení vnějších mechanických nebo magnetických sil. Mechanickým působením na polymerní řetězce lze dosáhnout jejich směrové deformace nebo zarovnání v jednom směru. Díky magnetickému poli je možné se vyhnout přímému kontaktu s materiálem, což přináší řadu výhod. Do systému je potřeba nejdříve dodat magneticky reagující částice, které reagují na vnější magnetické pole. Tímto způsobem lze docílit zarovnání polymerních řetězců nebo usměrnění růstu buněk. V neposlední řadě se mezi primární technologie přípravy anizotropních struktur řadí chemická stimulace, jako je směrová difuze iontů, 3D tisk, anebo již dříve zmíněné elektrostatické zvlákňování. [13]

Existují také techniky samouspořádání, při kterých není nutná přítomnost vnějšího pole ani modifikace nanomateriálu. Organizace částic se zde odehrává prostřednictvím deplečních a kapilárních sil, dipólových interakcí nebo také jejich kombinací. Depleční síla je entropická interakce mezi velkými a malými částicemi v roztoku. Malé částice neboli depletanty jsou trvale v pohybu a naráží do velkých částic, čímž je přitahují blíže k sobě. Vytlačováním menších částic z prostoru mezi většími částicemi roste osmotický tlak, který následně nutí částice, aby se k sobě ještě více přitahovaly. Depleční přitažlivost roste s blízkostí větších částic, a to lze využít pro částice s nízkou křivostí, které se poté v roztoku skládají do dobře definovaných struktur. Kapilární síly vznikají při vysoušení roztoku. Tyto síly způsobují přitahování rovnoběžných povrchů k sobě, protože dochází k odpařování roztoku mezi sousedními částicemi. Dobrým řízením se tímto způsobem dá docílit zahuštění částic nebo jejich zarovnání. Dipólové interakce jsou síly působící mezi dipóly dvou sousedních

částic a pokud má částice vlastní dipólový moment, dokáže usnadnit sestavování částic interakcí s dipóly na blízkých částicích. [14; 17]

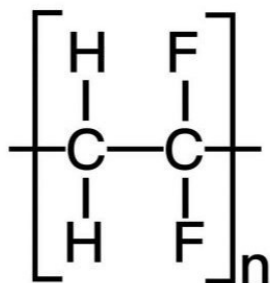
2 POLYMERY PRO BIOAPLIKACE

Polymerní nanovlákná se využívají v nejrůznějších odvětvích kosmetiky, textilního průmyslu i strojírenství. Významnou roli pak hrají, jak již bylo zmíněno, především v medicínských aplikacích, mezi které patří mimo jiné nosiče léčiv, tkáňové inženýrství a hojení ran. V závislosti na konkrétní aplikaci je pak důležitý polymer, ze kterého jsou nanovlákná tvořena. Polymery mohou být přírodního nebo syntetického původu. Přírodní jsou obvykle více preferované, protože jsou častěji biokompatibilní s lidským organismem, což znamená, že ho tělo snadno akceptuje. Na druhou stranu syntetické polymery disponují lepšími mechanickými vlastnostmi. [10]

2.1 Polyvinylidenfluorid (PVDF)

PVDF je syntetický termoplastický polymer s jedinečnou chemickou strukturou, která zajišťuje jeho širokou škálu využití. Opakující se jednotky ($\text{CH}_2\text{-CF}_2$) způsobují vysokou mechanickou pevnost a odolnost polymeru. K jeho dalším výhodám patří nízká hmotnost a flexibilita, finanční dostupnost, dobré chemické a tepelné vlastnosti včetně odolnosti vůči UV záření, a nakonec biokompatibilita. Na základě vhodných chemických vlastností je schopný tvořit netoxická vlákna a filmy. Zajímavá uplatnění nachází především díky svým piezoelektrickým a pyroelektrickým vlastnostem. [18; 19]

Sítě nanovláken PVDF vytvořené pomocí elektrostatického zvlákňování mají specifický povrch s propojenými póry a pouze mikroskopickými mezerami, což je výhodné pro použití v tkáňovém inženýrství. Nanovlákná jsou hydrofobní a lze kontrolovat jejich strukturu, kterou je možné také upravovat na základě úpravy výrobních parametrů. [18]

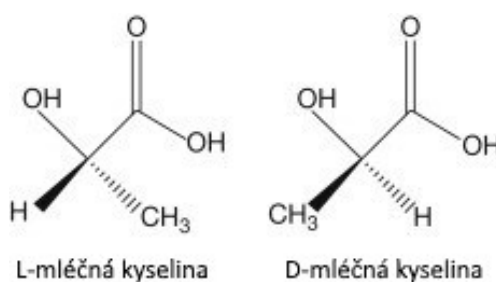


Obrázek 3 Struktura molekuly PVDF

(zdroj: [20])

2.2 Kyselina polymléčná (PLA)

Polykondenzací kyseliny mléčné nebo otevřením polymeračního cyklu dimeru kyseliny mléčné se získává kyselina polymléčná, alifatický polyester se schopností stimulace keratinocytů k migraci. Proto je tento polymer hojně využíván pro hojení a krytí ran. Pro vývoj nosičů léčiv se rovněž preferuje využití kyseliny polymléčné a polylaktidů pro jejich biokompatibilitu, bioabsorbovatelnost a biodegradabilitu. Dále slouží jako šicí materiál a pláty na krytí kostí. [21]



Obrázek 4 Molekula kyseliny mléčné v konfiguraci L a D

(zdroj: [22])

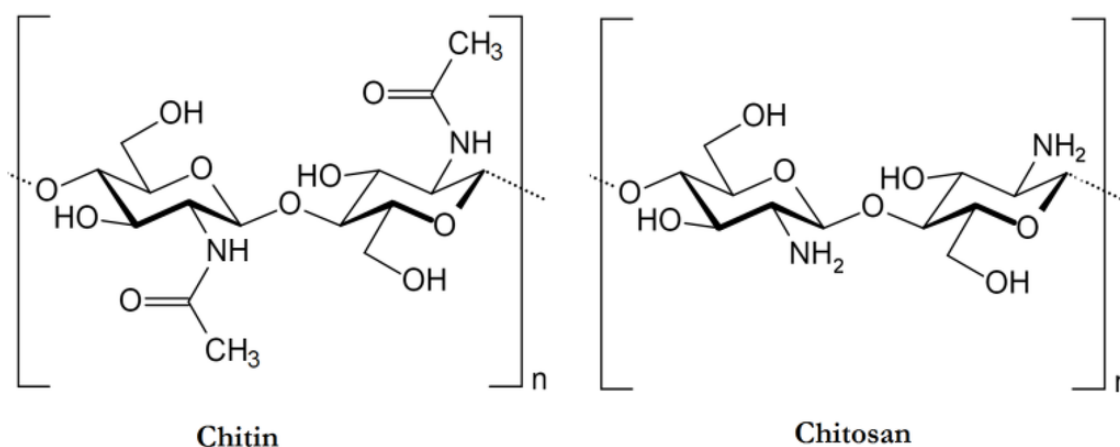
2.3 Chitosan

Polysacharid, a zároveň i biopolymer chitosan je vyráběn z chitinu deacetylací, tedy odstraněním acetylu z chitinu (obrázek 5), a běžně se vyskytuje ve stěnách rostlin a hub a ve skeletech korýšů a hmyzu. Přítomnost kladných aminoskupin v molekule chitosanu umožňuje interakci se zápornými molekulami, což se hojně využívá při přípravě nosičů léčiv. Problém však mohou způsobovat hydroxyskupiny, které se upravují pro lepší rozpustnost ve vodě a lepší mechanické vlastnosti. [23]

Mezi klíčové vlastnosti patří biokompatibilita, biodegradabilita, nízká toxicita a také schopnost ničit mikroorganismy. Z toho důvodu jsou chitosan a nanomateriály z něj vyráběné velmi populární v tkáňovém inženýrství i dalších oblastech biomedicíny. Z hlediska biomedicíny lze tento biopolymer i chemicky a enzymaticky upravovat tak, aby získal fyziologickou aktivitu a případně i specifické fyzikálně-chemické vlastnosti a odpovídal podmínkám pro konkrétní použití. [23]

Některé atributy chitosanu jsou stěžejní pro aplikaci v biomedicině. Mezi ně patří antibakteriální účinek, schopnost biodegradability, kompatibilita s krví, antioxidační vlastnosti

a protizánětlivý účinek. Antibakteriální schopnost je zajištěna díky reakci kladně nabitých NH_2 skupin s proteiny na povrchu buněk mikroorganismů, kdy tento kontakt způsobuje uvolnění látek spouštějících destrukci buňky. Tuto schopnost však ovlivňuje spousta faktorů, mezi které se řadí molekulová hmotnost chitosanu, míra acetylace nebo například koncentrace roztoku a typ mikroorganismu. Největší účinek byl prokázán u patogenů *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a také *Candida albicans*. Co se týká biodegradability v lidském organismu, chitosan je velmi citlivý na působení lysozymů, které jsou součástí enzymatických hydrolytických drah. Kompatibilita biomateriálu s krví je posuzována podle míry vyvolávání hemolýzy. Pokud hemolýza nepřesahuje 5 %, lze biomateriál označit za hemokompatibilní. Antioxidační účinek je zajištěn tvorbou stabilních radikálů díky funkčním skupinám v molekule chitosanu, přičemž tyto radikály rozkládají a neutralizují škodlivé volné radikály tvořené metabolismem. Chitosan ve své molekule obsahuje i negativně nabitě komponenty, které dokážou vyvolat imunitní odpověď potlačením prozánětlivých molekul, čímž působí protizánětlivě. [23]



Obrázek 5 Molekula chitinu a jeho deacetylované formy chitosanu

(zdroj: [24])

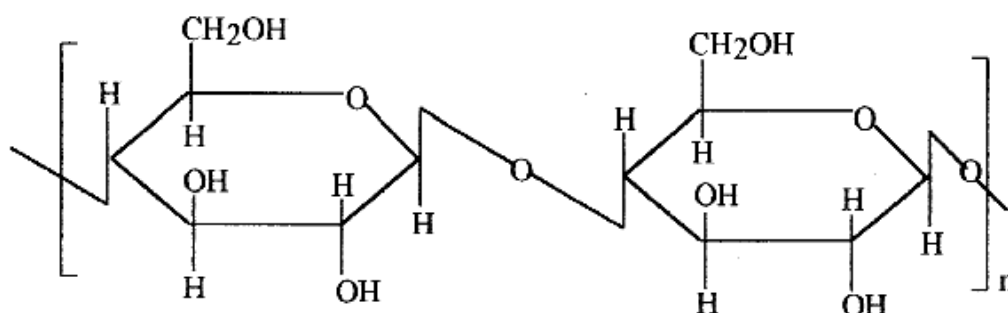
2.4 Celulóza

Dalším často používaným přírodním polymerem se v posledních letech stává celulóza, a to hned v několika podobách jako je nano a mikrovláknová, nano a mikrokrytalická, bakteriální celulóza nebo celulóza v podobě mikrofibril. Je složena z D-glukosových jednotek spojených β -1,4 glykosidovou vazbou, jak je možné vidět na obrázku 6, a jejím primárním zdrojem jsou rostliny, mořské řasy a bakterie. Má ideální vlastnosti, mezi které patří vysoká stabilita vůči kyselému prostředí, chiralita neboli optická aktivita, elasticita a zároveň pevnost

v tahu, nízká hustota a biodegradabilita. Díky hydroxylovým skupinám na povrchu molekul je schopna vytvářet také různé chemické modifikace. [25]

Výroba je založena na chemických, fyzikálních i biologických metodách a jejich kombinacích. Z chemických je třeba zmínit kyselou hydrolýzu kyselinou octovou, sírovou, chlorovodíkovou nebo i organickými kyselinami, která se využívá pro extrakci celulóзовých nanokrystalů ze dřeva nebo obilné slámy. Mechanicky se celulóza získává vysokotlakou homogenizací, jejímž produktem je dlouhá a spleťtá síť celulóзовých nanovláken. Syntézou specifickými octovými bakteriemi se spojují glukóзовé řetězce a vznikají mikrovlákna, která se dále agregují, a nakonec vznikají nanovlákna bakteriální celulózy. [13]

Celulóza je také významnou součástí nosičů léčiv a tkáňového inženýrství obzvláště pro její variabilitu zpracování v různých formách jako jsou hydrogely, aerogely a různé membrány. Na rozdíl od chitosanu celulóza sice nevykazuje biocidní schopnosti, ale její vhodnou modifikací může nabýt antibakteriálních účinků, což umožňuje její využití v materiálech pro hojení ran. [25]



Obrázek 6 Molekula celulózy

(zdroj: [26])

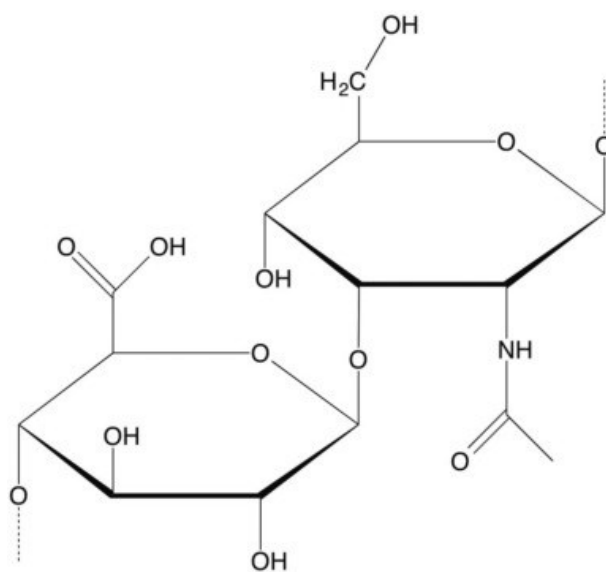
2.5 Kyselina hyaluronová (HA)

Kyselina hyaluronová je polysacharid přirozeně se vyskytující v těle obratlovců např. v hyalinní chrupavce, synoviální tekutině a ve sklivci oka, což ji dělá vysoce biokompatibilní a zároveň biodegradabilní. Protizánětlivé a antikoagulační vlastnosti kyseliny hyaluronové a jejích derivátů jsou nápomocny při hojení ran a popálenin, regeneraci tkání, ale i při diferenciaci buněk. [27]

Záporně nabitě karboxylové skupiny ji činí hydrofilní a vysoce rozpustnou ve vodě, ale zároveň jí umožňují zadržovat molekuly vody a udržovat osmotický tlak. V kosmetickém

průmyslu činí tato skutečnost HA nenahraditelnou složkou pro hydrataci, změkčení a zjemnění pokožky. Svojí viskozitou hraje klíčovou roli v biomechanice kloubů a oka, protože funguje jako lubrikant pro lepší tření kloubů i na povrchu oka při mrkání. [27]

Pomocí receptorů v molekule HA je umožněna její interakce s buňkami i tkáněmi, a to vede ke specifickým funkcím. Dokáže se bez cíleného zaměření selektivně hromadit, je tedy bioefektivní, a z toho lze profitovat u výroby výplňových materiálů. V závislosti na molekulové hmotnosti se mohou konkrétní bioaplikace lišit. Dalšími vlastnostmi, ve kterých je HA přínosem pro biomedicínu, je například schopnost ovlivňovat imunitní systém a antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Určitým faktorem je také forma, v jaké je aplikována, jako jsou například hydrogely, nanočástice nebo může být HA vázána na léčivo. Obecně má HA vysoký potenciál pro vývoj biomateriálů k efektivnímu řešení zdravotních komplikací. [27]



Obrázek 7 Molekula kyseliny hyaluronové

(zdroj: [28])

3 APLIKACE V BIOMEDICÍNĚ

Díky svým jedinečným vlastnostem se nanovlákná stala velmi důležitým materiálem využívaným v oblasti biomedicíny. Mezi nejvýznamnější vlastnosti patří vysoký poměr povrchu k objemu, schopnost napodobovat struktury biologických tkání, či flexibilita v modifikaci jejich vlastností. V biomedicině mají nanovlákná široké spektrum aplikací, které zahrnují jak diagnostiku, tak i terapii a regeneraci tkání. U konkrétního využití nanovláken v biomedicině je rozhodující nejen polymer či materiál, ze kterého jsou nanovlákná vyrobena, ale také jejich výsledná struktura. Biomateriály s anizotropní strukturou mají v biomedicině široké uplatnění. Důležitou roli hrají především v tkáňovém inženýrství, kde mají potenciál nahrazovat uspořádané tkáně, jako jsou šlachy, vazy nebo mimo jiné i kardiovaskulární tkáně. Jejich typickým využitím je regenerace chrupavky *in situ*. V oblasti nosičů léčiv se uplatňují při řízeném uvolňování léčiv tak, aby se zvýšila terapeutická účinnost daného léčiva s minimalizací možné toxicity. Kombinace tvarově specifických anizotropních nanočástic s nanomedicínou se ukázala jako efektivní pro správné cílení, buněčnou interakci a distribuci léčiva. Problémovým odvětvím biomedicíny je také rychlé a účinné hojení ran. Především obvazy nebo scaffoldy s uspořádanými prvky jsou podstatné pro přenos pozitivních signálů vedoucích k migraci buněk, což hojení a regeneraci výrazně usnadňuje. Následující kapitoly budou věnovány konkrétněji popsaným aplikacím. [13]

3.1 Hojení a krytí ran

Kůže jakožto ochranný orgán musí být odolná vůči působení různých vnějších faktorů. Nanovlákná jsou velmi často první volbou pro výrobu obvazů a náplastí určených ke krytí a ochraně poškozené kůže před těmito vlivy. Dokážou vytvářet porézní struktury, díky čemuž dochází k podpoře buněčné proliferace a k napodobení extracelulární matrix co se struktury a fyzikálních vlastností týče, a tím je urychlena regenerace a hojení ran. [3]

Hojení a krytí ran však představuje problémovou oblast biomedicíny. Pro účinné krytí ran je potřeba zajistit teplé, vyživující, vlhké a prodyšné prostředí, které je ovšem ideální i pro růst mikroorganismů v ráně. Proto je vhodné, když materiál ke krytí a hojení disponuje antimikrobiálním účinkem, a zároveň zabezpečuje již zmíněnou prodyšnost a vlhkost. Polymerní nanovlákná jsou užitečná pro tuto aplikaci, protože fungují jako ochranný obvaz zabráňující množení bakterií a mikrobů mechanismem zachytávání aerosolových částic. Tento princip často slouží k léčbě popálenin, kde urychluje hojení a podporuje tvorbu normální tkáně s minimalizací tvorby jizev. Navíc mohou sloužit jako nosiče pro řízené uvolňování

léciv, jako jsou antibiotika nebo protizánětlivé látky, které také urychlují proces regenerace a zabráňují infekcím. Mezi často využívané polymery patří chitin, jeho deriváty a sloučeniny, které mají schopnost absorbovat tekutiny a jsou biokompatibilní. Běžně se také aplikují nanovlákná obsahující stříbrné nanočástice, polymerní nanovlákná s obsahem extraktu ze zeleného čaje nebo například želatinová vlákna vylepšená o přídavek vitaminů A a E. [10]

3.2 Nosiče léčiv

Dalším využitím nanovláken jsou již zmiňované nosiče léčiv. Díky své vysoké povrchové ploše a schopnosti přizpůsobit se různým formám biologických molekul (léčiva, proteiny, RNA) mohou nanovlákná umožnit kontrolované a řízené uvolňování terapeutických látek. To je zvláště výhodné pro léčbu chronických onemocnění, kde je potřeba dlouhodobé a cílené uvolňování léčiv. Pro inkorporaci léčiv nebo nanočástic do polymerních nanovláken se nejčastěji uplatňují dvě metody – přímá a nepřímá. Přímá metoda zabudování nanočástic léčiv do nanovláken spočívá v přípravě homogenní disperze s polymerním roztokem, který se následně elektrostaticky zvlákní. To znamená, že léčivo je součástí roztoku pro elektrospinning. Naproti tomu u nepřímé metody je potřeba povrchové úpravy nanovláken pro uchycení nanočástic na jejich povrchu. Jedná se o velmi jednoduchou techniku, při které se nanovlákná namáčejí do koloidních disperzí nanočástic, čímž dojde k adsorpci nanočástic na povrch nanovláken prostřednictvím elektrostatických sil, vodíkových vazeb nebo interakcí mezi funkčními skupinami. Nepřímá metoda je preferovanější pro začlenění kovových nanočástic, ale má výrazná omezení, která vyžadují vysokou stabilitu a nerozpustnost polymerních nanovláken v koloidním roztoku. [29]

Množství uvolněného léčiva a rychlost jeho uvolňování jsou ovlivněné jak parametry polymerního nanovlákná, tak parametry týkající se inkorporovaného léčiva. Polymerní nanovlákná ovlivňují uvolňování léčiv především svým složením, kdy například hydrofilní a amfifilní kopolymery zvyšují míru zaplnění nanovláken léčivem a zároveň snižují pravděpodobnost jeho prudkého uvolnění. Díky nízké absorpci vody, kterou mají polymery s krystalickými oblastmi kvůli vysoce uspořádané trojrozměrné struktuře krystalu, se léčiva z takových nanovláken uvolňují pomaleji v porovnání s nanovláknými polymerů s amorfními oblastmi. Při mechanickém natahování nanovláken dochází ke zrychlenému uvolňování léčiva oproti jejich standartnímu stavu, protože se tím zmenšuje průměr nanovlákná a zkracuje se difuzní vzdálenost pro částice léčiv. Náhodné uspořádání nanovláken, stejně jako jejich

menší průměr a vyšší krystalinita, je spojeno s rychlejším uvolňováním. Pro vysokou porozitu je zase typické explozivní uvolňování léčiv. Co se týká samotných léčiv, klíčovým parametrem je jejich množství v nanovlákně, jejich molekulová hmotnost, rozpustnost a interakce polymer-léčivo. Čím nižší je molekulová hmotnost léčiva, tím rychleji se uvolňuje. [29]

Nanovlákně se v posledních letech stala významným prostředkem pro dodávání léčiv, založeném na principu zvětšeného povrchu, díky kterému se zvyšuje rychlost rozpouštění léčiva. Výhodou je i možnost povrchové modifikace polymerních nanovláken pro úpravu rychlosti uvolňování léčiva. Výběr vhodného polymeru je závislý na požadovaných attributech uvolňování, například zda bude difuzně řízené nebo je současně žádaná i degradace nanovláken. [29]

3.3 Tkáňové inženýrství

Cílem této podoblasti biomedicínského inženýrství je vytvoření nové tkáně nebo oprava tkáně původní. Podle definice Nature Journal se jedná o soustavu metod, jejichž účelem je nahrazení či regenerace poškozené tkáně pomocí přírodních, syntetických a semisyntetických náhrad tkání. Tyto náhrady mohou být plně funkční nebo se mohou vyvinout do požadované funkčnosti. Pro vytvoření zcela nové tkáně v laboratorních podmínkách, tedy mimo organismus, jsou nezbytné buňky z cílového orgánu či prekursor tkáně. Ovšem kromě buněk je zapotřebí vytvořit také nosič neboli scaffold, na který se buňky naadherují a dále na něm budou proliferovat. Nejčastěji vyráběnými náhradami tkání jsou chrupavky, kosti, vazy, šlachy, ale také cévy. [30; 31]

Pro aplikace polymerních nanovláken v tkáňovém inženýrství, zejména při výrobě scaffoldů, je podstatné, aby vykazovala vlastnosti podporující proliferaci a migraci buněk. Proto je důležité vybírat především materiály, které napodobují přirozenou biologickou funkci a strukturu extracelulární matrix. Je známo, že klíčové je vytvoření 3D struktury kompozitu, který je biokompatibilní, aby buňky mohly správně proliferovat, a tím opravovat nebo nahrazovat poškozené tkáně a orgány. Těmito vlastnostmi nejvíce disponují nanovlákně biodegradabilních polymerů a synteticky vyrobených biopolymerů, které i svým průměrem napodobují přirozenou strukturu fibril. [10]

Scaffoldy jsou obecně dočasnou oporou, která je biokompatibilní s hostitelskou tkání a musí být dostatečně porézní pro zajištění výživy buněk. Jejich výjimečnou schopností je rozklad po přeměně buňky na tkáň bez toxického vlivu na organismus. Při volbě materiálu hrají roli různé faktory. Pro biologické přírodní materiály je typické, že lépe podporují tvorbu

tkáně, ale syntetické materiály zase vyvolávají negativní imunitní odpověď organismu v mnohem menší míře. [31]

V posledních letech je v tkáňovém inženýrství pozornost zaměřena na náhradu krevních cév a kostí. Pro výrobu scaffoldů cév je elektrostatické zvlákňování výhodné, protože se ním dá docílit trubicovitého tvaru o různé délce. Takové náhrady musí být dostatečně pevné a zároveň pružné, což lze zajistit jak výrobou z přírodních, tak ze syntetických polymerů. U kostí je výroba scaffoldů značně ztížena samotnou strukturou kosti. Kompaktní část kosti zajišťuje pevnost a tvrdost kosti, zatímco houbovitá složka zajišťuje její elasticitu. Ve scaffoldu je kompaktní kost tvořena nanokrystaly hydroxyapatitu neboli fosforečnanu vápenatého, což je anorganická složka tvořící zhruba 95 % extracelulární matrix tvrdé tkáně. Zbytek je tvořen organickou částí, tedy houbovitou kostí, kterou může představovat například želatina. Důležitá je taky technika kalcifikace tvrdé tkáně, kterou dokážou zabezpečit bioaktivní keramiky jako skla na bázi fosforečnanu vápenatého s bioaktivními složkami. Adekvátní materiál pro scaffoldy k regeneraci tvrdých tkání tedy představuje kombinace biopolymerů s bioaktivními anorganickými látkami. [10]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této bakalářské práce byla příprava polymerních nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování z polymerních roztoků a jejich následná charakterizace z hlediska morfologie a biologických vlastností. Morfologie nanovláken, včetně průměru vláken, jejich uniformity a povrchové struktury, byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), která umožnila detailní zobrazení a hodnocení kvality vlákenné struktury.

Dále bylo cílem otestovat biokompatibilitu a cytotoxicitu nanovláken prostřednictvím MTT testu, který slouží k měření metabolické aktivity buněk a ověření, zda materiál nevyvolává nežádoucí reakce. Tento test je klíčový pro posouzení bezpečnosti nanovláken pro potenciální biomedicínské aplikace. Esenciální schopností je také adheze a proliferace buněk na povrchu daného materiálu, které byly studovány pomocí fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční značení aktinových vláken cytoskeletu a jaderné DNA buněk umožnilo sledovat interakce buněk s povrchem nanovláken v průběhu času.

5 MATERIÁLY

5.1 Chemikálie

Pro přípravu polymerních roztoků byly použity tyto chemikálie: kyselina octová (Sigma-Aldrich, USA), chitosan o střední molekulové hmotnosti 190-310 kDa (Sigma-Aldrich, USA), polyethylen oxid o molekulové hmotnosti 600 kDa (PEO, Sigma-Aldrich, USA), dialdehyd celulózy (DAC, připraven na CPS UTB, Česká republika) a polypyrrrol (PPy, připraven na CPS UTB, Česká republika).

Součástí kultivačního média bylo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biosera, Francie), calf serum (krevní sérum z telat, Biosera, Francie) a mix antibiotik penicilin-streptomycin (Biosera, Francie). Pro testování cytotoxicity bylo použito MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromid, Duchefa biochemie, Nizozemsko) a roztok DMSO (dimethylsulfoxid, Duchefa biochemie, Nizozemsko). U fluorescenční mikroskopie byl pro přípravu 4% roztoku formaldehydu použit 37% formaldehyd (Penta chemicals, Česká republika) a UPW (ultra pure water). Dále byl použit 0,5% Triton (Sigma-Aldrich, USA) a fluorescenční barviva AktinRed 555 (Invitrogen, USA) a Hoechst 33258 (Invitrogen, USA). Při obou testech bylo využito také PBS (fosfátový pufovaný fyziologický roztok, Biosera, Francie).

5.2 Použitá buněčná linie

Pro testování cytotoxicity a buněčné proliferace byla podle normy ISO 10993 použita buněčná linie NIH/3T3, což jsou fibroblasty z embryonální tkáně myši. Tyto buňky jsou vhodné pro různé testy zejména díky své odolnosti a snadné kultivaci. Jejich kultivace se provádí v kultivačním médiu obsahujícím DMEM o koncentraci $13,46 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ s přídavkem calf sera v koncentraci 10 obj.% a 1 obj.% antibiotik penicilinu a streptomycinu o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

5.3 Přístroje a pomůcky

Během experimentu byly použity tyto přístroje: Sušárna vakuová MEMMERT VO400 vč. skříňky (MEMMERT GmbH + Co. KG, Německo), zařízení na přípravu nanovláken Spin-Line 40 (SPUR as., Česká republika), laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe (Thermo Scientific, USA), fotometr INFINITE M200Pro NanoQuant (Tecan Group

Ltd., Švýcarsko), centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo), komora klimatizovaná CLIMACELL 222 Comfort (BMT Medical Technology, Česká republika), biologický inkubátor HERAcell 150i (Thermo Scientific, USA), mikrobiologický mikroskop Leica DM IL LED Fluo (Leica Microsystems, Německo), fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem (Olympus Corporation, Japonsko), třídimenzionální třepačka GFL 3012 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Německo), skenovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI, USA/Nizozemsko), zařízení na přípravu ultračisté vody – Siplicity UV systém (Merck Millipore, USA/Německo), váha semimikro XA 82/220/R2 Radwag (Radwag, Polsko), automatické pipety a multikanálová pipeta (Eppendorf, Německo) a další drobné pomůcky chemické a biologické laboratoře.

6 METODIKA

6.1 Příprava nanovláken

Polymerní vlákna byla připravena metodou elektrostatického zvlákňování. Samotná příprava nanovláken zahrnovala 2 části – přípravu polymerních roztoků a jejich následné elektrostatické zvlákňování do finálních nanovláken. Následně proběhlo zhodnocení jejich vzhledu a struktury pomocí SEM. V následujících podkapitolách jsou detailně popsány jednotlivé kroky přípravy polymerních vláken.

6.1.1 Příprava polymerních roztoků

Před samotným procesem elektrospinningu bylo nutné připravit homogenní polymerní roztoky. Celkem byly připraveny 4 polymerní roztoky chitosanu s přídatnými látkami s různými funkcemi a v různých poměrech. Přídavek PEO (polyethylenoxidu), který byl obsažen ve všech roztocích, zajišťoval snadnější zvlákňování. Ve 3 roztocích byl navíc obsažen DAC (dialdehyd celulózy), který má funkci síťovadla. Poslední roztok obsahoval kromě PEO a DAC ještě i přídavek PPy (polypyrolu), který byl využit pro svoji vodivost.

6.1.1.1 Chitosan + PEO

V 70% roztoku kyseliny octové byl postupně rozpuštěn chitosan o koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po jeho rozpuštění byl pomalu přidáván PEO tak, aby nedošlo k jeho shlukování. Tyto látky byly míchány v poměru chitosan:PEO = 5:1. Po přidání byla reakční lahev obalena alobalem, aby se zabránilo úniku tepla a roztok byl při $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ míchán po dobu 1,5 hodiny.

Po vytvoření homogenní směsi byl výsledný roztok o objemu 200 ml přefiltrován přes skleněný filtr pro odstranění zbylých nečistot. Přefiltrovaný roztok byl světle nažloutlý, což značilo, že nedocházelo k jeho degradaci.

Nakonec bylo potřeba z roztoku polymeru odstranit veškeré vzduchové bubliny, aby byla zachována jeho homogenita a byl zajištěn plynulý průběh procesu zvlákňování. Odplynění roztoku bylo provedeno umístěním nádoby s roztokem do sušárny vytemperované na $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na 20 minut. Finální roztok s koncentrací $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, obsahem 70% kyseliny octové a poměrem chitosan:PEO = 5:1, měl viskozitu $2,65 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ a vodivost $843 \text{ } \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6.1.1.2 Chitosan + PEO + 3 mol.% DAC

V kyselině octové o koncentraci 87,5 % byl za stálého míchání a teplotě 45 °C rozpuštěn chitosan o objemu 160 ml, koncentraci 25 mg·ml⁻¹ a v poměru chitosan:PEO = 4:1 (rovnice 1). Následně se reakční lahev zabalila do alobalu pro konstantní teplotu a ponechala se na ohříváči s míchadlem zhruba hodinu a půl pro dokonalé rozpuštění chitosanu. Mezitím byl připraven roztok DAC o koncentraci 3 mol.%. Vypočítané množství DAC (rovnice 3) bylo rozpuštěno ve 42 ml destilované vody po dobu 1 hodiny při 70 °C. Dalším krokem bylo zchlazení roztoku DAC, aby se mohl přidat k roztoku chitosanu s PEO. Po ochlazení byl roztok DAC o objemu 40 ml napipetován k chitosanu s PEO a směs byla ponechána přes noc na míchačce při 1200 rpm. Následující den byla provedena filtrace a odplynění, po nichž následovalo zvlákňování. Výsledný roztok o objemu 200 ml měl koncentraci chitosanu 20 mg·ml⁻¹, koncentrace kyseliny octové byla 70 % a chitosan ku PEO byly v poměru 4:1.

U druhého roztoku stejného složení byly provedeny obdobné kroky jako u předchozího roztoku obsahujícího chitosan, PEO a DAC, avšak s určitými úpravami. Důvody přípravy druhého roztoku o stejném složení jsou uvedeny ve výsledcích a diskuzi v kapitole 7.1. Nejprve byl připraven roztok chitosanu s PEO v jedné reakční nádobě a roztok DAC v druhé. Roztok chitosanu s PEO byl následně přefiltrován, a poté byl roztok DAC postupně napipetován k roztoku chitosanu s PEO. Směs byla míchána zhruba 30 minut a následně byla podrobena odplynění v sušárně při 40 °C po dobu 20 minut. Výsledný roztok o objemu 200 ml měl koncentraci 20 mg·ml⁻¹, koncentrace kyseliny octové byla 70 % a chitosan ku PEO byly v poměru 4:1. Vodivost tohoto roztoku byla 845 μS·cm⁻¹.

Rovnice 1 Výpočet potřebné hmotnosti PEO pro roztok v poměru CHIT:PEO = 4:1

20 mg na 1 ml CHIT.....5 mg PEO

4000 mg na 200 ml CHIT.....x mg PEO

1 g PEO.....40 ml CHIT

x.....42 ml CHIT

$$x = \frac{42 \cdot 1}{40}$$

$$x = 1,05 \text{ g PEO}$$

Rovnice 2 Výpočet látkového množství DAC, chitosanu a hmotnosti DAC v roztoku polymeru chitosanu s 3% molární koncentrací

$$n_{DAC} = \frac{x_{DAC} \cdot n_{CHIT}}{1 - x_{DAC}}$$

$$n_{CHIT} = \frac{m_{CHIT}}{M_{CHIT}} = \frac{0,02}{169,53} = 0,00011797 \text{ mol}$$

$$n_{DAC} = \frac{x_{DAC} \cdot n_{CHIT}}{1 - x_{DAC}} = \frac{0,03 \cdot 0,00011797}{1 - 0,03} = 3,6487 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$m_{DAC \text{ v } 1 \text{ ml CHIT}} = n \cdot M = 3,6467 \cdot 10^{-6} \cdot 160,12 = 0,00058422 \text{ g} = 0,58422 \text{ mg}$$

$$m_{DAC} = m_{DAC \text{ v } 1 \text{ ml CHIT}} \cdot V_{CHIT} = 0,58422 \cdot 200 = 116,844 \text{ mg DAC}$$

Kde: n_{DAC} , n_{CHIT} – látkové množství DAC, látkové množství chitosanu [mol]

x_{DAC} – molární procento DAC v roztoku polymeru [-]

m – hmotnost [g]/[mg]

M – molární hmotnost [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

V_{CHIT} – objem roztoku polymeru chitosanu [ml]

Rovnice 3 Výpočet obsahu DAC ve 42 ml roztoku DAC

$$116,844 \text{ mg} \dots\dots\dots 40 \text{ ml}$$

$$\underline{x \text{ mg} \dots\dots\dots 42 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{116,844 \cdot 42}{40}$$

$$x = 122,6862 \text{ mg DAC ve 42 ml roztoku DAC}$$

6.1.1.3 Chitosan + PEO + 1 mol.% DAC

Tento roztok byl připraven stejným způsobem, jako předešlý roztok chitosanu s PEO a 3 mol.% DAC, pouze byla koncentrace DAC snížena ze 3 mol.% na 1 mol.%. Co se týká vodivosti, byla naměřena stejná hodnota jako u roztoku s 3 mol.% DAC, tedy $845 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Koncentrace roztoku chitosanu byla opět $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a poměr chitosan:PEO = 4:1.

6.1.1.4 Chitosan + DAC + PEO + PPy

Při přípravě posledního roztoku bylo vypočítané množství DAC (rovnice 3) rozpuštěno ve 40 ml destilované vody v jedné reakční nádobě a v druhé byl chitosan rozpuštěn ve 160 ml 87,5% kyseliny octové, tedy na koncentraci $25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ jako v případě roztoku chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC. Následně byl do roztoku chitosanu pomalu přidán PEO, který byl opět v poměru chitosan:PEO = 4:1. Po jejich úplném rozpuštění byl roztok přefiltrován a následně obohacen o PPy v množství 5 hm.% vůči chitosanu (rovnice 4). Po důkladném promíchání byl roztok DAC o objemu 40 ml přidán ke směsi chitosanu, PEO a PPy. Nakonec byl roztok o objemu 200 ml a koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ těsně před zvlákňováním krátce odplyněn v sušárně při 40°C .

Rovnice 4 Výpočet přídavku 5 hm. % PPy do roztoku chitosanu s PEO

$$4 \text{ g CHIT} \dots\dots\dots 100 \%$$

$$\underline{x \text{ g PPy} \dots\dots\dots 5 \%}$$

$$x = \frac{5 \times 4}{100}$$

$$x = 0,2 \text{ g} = 200 \text{ mg PPy}$$

$$21,87 \text{ mg PPy} \dots\dots\dots \text{v } 1 \text{ ml roztoku PPy}$$

$$\underline{200 \text{ mg PPy} \dots\dots\dots x \text{ ml roztoku PPy}}$$

$$x = \frac{200 \cdot 1}{21,87}$$

$$x = 9,145 \text{ ml PPy}$$

6.1.2 Elektrostatické zvlákňování

Postup pro zavedení polymerních roztoků do přístroje byl pro všechny roztoky stejný. Roztok byl nabrán pomocí plastové injekční stříkačky tak, aby neobsahoval bubliny. Případné bubliny byly odstraněny a roztok byl aplikován přes hadičku do zvlákňovacích trysek. Následně byla stříkačka umístěna do injekční pumpy, která zajistila postupné a kontrolované vytlačování roztoku.

Každý z roztoků byl zvlákňován na polypropylenový substrát, kdy proces probíhal ve dvou lištách s dohromady 16 zvlákňovacími tryskami. Pouze u roztoku chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC byla využita jen 1 lišta, tedy 8 jetů. Vzdálenost mezi sběračem a těmito

lištami byla 21 cm. Všechny zvlákňovací cykly běžely při relativní vlhkosti 33 % a teplotě 23 °C. Další parametry ovlivňující zvlákňování byly již pro každý roztok odlišné.

U roztoku chitosanu s PEO s koncentrací 20 mg·ml⁻¹ a poměrem 5:1 byla nastavena rychlost vytlačování roztoku do jedné lišty na 0,08 ml·min⁻¹. Napětí aplikované při zvlákňování bylo 70 kV a samotné zvlákňování probíhalo po dobu 60 a 90 min.

Roztok chitosanu s PEO a 3 mol.% DAC v poměru chitosan:PEO = 4:1 byl vytlačován rychlostí 0,03 ml·min⁻¹ platnou pro jednu lištu. Zde bylo napětí nastaveno na 60 kV. Pro roztok chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC bylo použito napětí 75 kV s celkovou rychlostí vytlačování polymeru 0,12 ml·min⁻¹. Cyklus spinování obou roztoků běžel 60 minut. Proces zvlákňování probíhal u všech roztoků na zařízení SpinLine 40 (SPUR as., Česká republika) uvedeném na obrázku 8.



Obrázek 8 Zařízení pro elektrostatické zvlákňování

(zdroj: [32])

6.1.3 Analýza SEM

Z nanovláken byly vystříženy malé vzorky, které se následně připevnilly pomocí oboustranné nanouhlíkové pásky k podstavci a nevodivé vzorky byly potaženy tenkou vrstvou nanočástic zlata a palladia. Tento krok eliminoval akumulaci náboje, která by jinak mohla vést ke zkreslení obrazu, nízkému kontrastu nebo špatnému rozlišení. Nanovláknem byla analyzována rastrovacím elektronovým mikroskopem Nova NanoSEM 450 (FEI, USA), který byl provozován při urychlovacím napětí 5 kV.

6.2 Buněčné testování

Před samotným začátkem buněčného testování se musela nanovlákná vysterilizovat. Sterilizace byla provedena pomocí UV záření po dobu 30 minut. Stejný způsob sterilizace byl použit i pro nádobu, ve které byla nanovlákná následně uskladněna pro další postupy.

6.2.1 Příprava extraktů

Pro získání extraktů byl z každého druhu nanovlákná vystřižnut vzorek o rozměru 4×3 cm, který byl následně situován do 15 ml zkumavky posléze doplněné o živné médium v koncentraci $6 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$. Poté byly zkumavky se vzorky vloženy do třepačky umístěné v inkubátoru vytemperovaném na 37°C . Extrakce probíhala 24 hodin a byla provedena podle normy ČSN EN ISO 10993 – Část 12.

6.2.2 Pasážování

V prvním kroku byly buňky v kultivační nádobě překontrolovány pod optickým mikroskopem. Po kontrole životaschopnosti buněk se z kultivační nádoby odsálo živné médium a buňky byly propláchnuty 15 ml PBS (pufru). Následně se PBS odsálo a do nádoby bylo přidáno 7,5 ml trypsinu za účelem uvolnění buněk přichycených na stěně kultivační nádoby. Kultivační nádoba byla umístěna do inkubátoru, ve kterém byla udržována teplota 37°C , dokud se veškeré buňky neuvolnily. Trypsin však při dlouhém působení může buňky poškodit, proto se vystavují jeho vlivu maximálně po dobu 20 minut. Buňky byly opět zkontrolovány pomocí optického mikroskopu a poté se k buňkám s trypsinem přidalo stejné množství média, aby se trypsin zneutralizoval. Celá tato směs byla převedena do nové 15ml zkumavky a ta byla umístěna do centrifugy s nastavením rychlosti točení 1100 rpm po dobu 3 min při teplotě 37°C . Buňky ve zkumavce se usadily na dno a vzniklý supernatant se opatrně odsál. Buňky se naředily na požadovanou koncentraci v závislosti na použitém testu.

6.2.3 Cytotoxicita

Cytotoxicita je nejpodstatnějším parametrem materiálu pro jeho další využití v biologických systémech. Zda jsou nanovlákná pro buňky cytotoxická bylo otestováno pomocí MTT testu. Do 96 jamkové destičky byly nasazeny buňky o koncentraci 2×10^5 buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$ média podle normy ČSN EN ISO 10993 – Část 5. Destička se následně umístila do inkubátoru o teplotě 37°C a ponechala se zde na 24 hodin.

Následující den byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem pro potvrzení jejich růstu. Další postup zahrnoval odsání živného média z buněk, ke kterým se poté přidal extrakt nanovláknů připraven podle kapitoly 6.2.1 o koncentraci 100 %, 90 %, 75 %, 50 %, 25 % a 10 %. Extrakt byl u buněk ponechán opět po dobu 24 hodin v inkubátoru.

Po uplynulém časovém intervalu se z buněk odstranil extrakt, přidal se roztok MTT o koncentraci $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a destička se odložila na 4 hodiny do inkubátoru. Během této doby buňky prostřednictvím mitochondrií MTT žluté barvy zpracovávají a stává se z něj fialový formazan. Dále se z buněk odsálo médium, byl aplikován DMSO a za jemného třepání během 15 minut byly rozpuštěny všechny vytvořené krystaly formazanu. Nakonec se změřila absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 690 nm. Tímto způsobem byla otestována cytotoxicita všech extraktů jednotlivých koncentrací.

Při zpracování výsledků byly ze souboru hodnot absorbancí reference a jednotlivých koncentrací extraktů vyřazeny odlehlé hodnoty a ze zbylých byl vypočítán průměr a jeho odchylka. Výsledná viabilita buněk byla zjištěna přepočtem absorbance na životaschopnost pomocí vzorce:

Rovnice 5 Přepočet absorbance na viabilitu buněk při dané koncentraci

$$\text{životaschopnost [\%]} = \frac{\text{hodnota absorbance [1]}}{\text{průměrná hodnota absorbance reference [1]}} \cdot 100$$

Kde: Reference – buňky bez vlivu extraktu v čistém médiu

Statistické rozdíly mezi referencí a jednotlivými koncentracemi byly zjištěny pomocí testu jednosměrné ANOVY pomocí softwaru GraphPad Prism.

6.2.4 Růst na povrchu

Schopnost adheze a proliferace buněk na nanovlákních byly dalšími testovanými atributy. Z nanovláken byly vyřezány vzorky tvaru kolečka o průměru cca 1 cm a následně byly vzorky vloženy do 12 jamkové destičky. Do jamek byly nasazeny buňky o koncentraci 2×10^5 buněk/ml kultivačního média a destička byla uložena do inkubátoru na 24 hodin, aby se umožnila buněčná adheze. Poté byla morfologie a množství buněk zkoumána pod fluorescenčním mikroskopem. Pro tento krok byla buněčná jádra a cytoskelet označeny fluorescenčními barvivy.

6.2.4.1 *Fluorescenční mikroskopie*

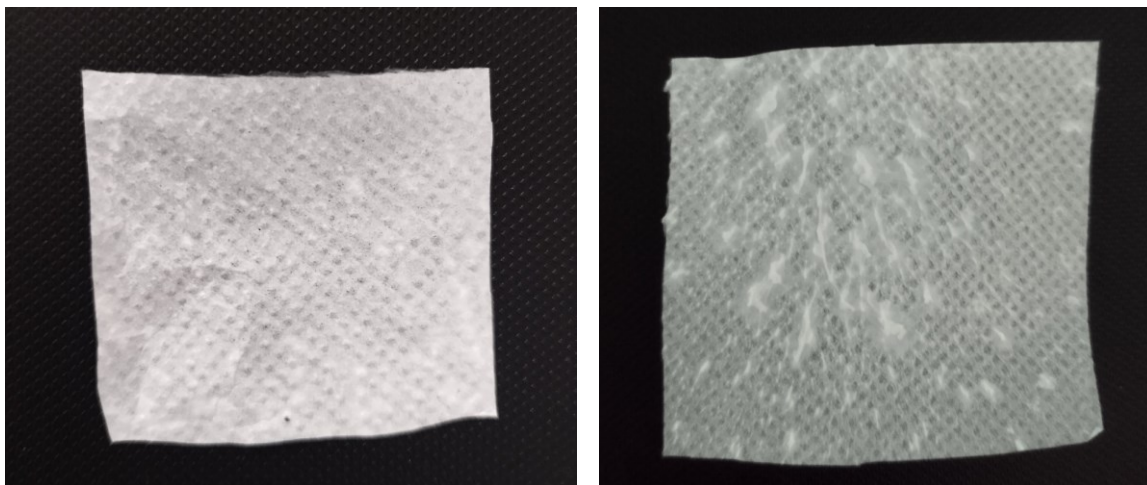
Pro zviditelnění buněk pod mikroskopem, byla buněčná jádra a cytoskelet označeny fluorescenčními barvivy. Nejdříve proběhla fixace a permeabilizace buněk. Z buněk se odsálo médium a přidal se k nim 4% roztok formaldehydu, který buňky zafixoval. Po 15 minutách se formaldehyd odstranil a buňky byly propláchnuty PBS. Dále se přidal 0,5% roztok tritonu X pro zvýšení permeability buněk. Triton se však nechal působit jen krátce, maximálně 5 minut, protože při delším působení buňky poškozuje. Následně se roztok tritonu odsál, buňky se dvakrát propláchly pomocí PBS a třetí dávka již byla ponechána.

K buňkám doplněným o PBS bylo aplikováno barvivo Hoechst 33258 o koncentraci $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, které se váže na DNA v jádře buněk a jedna kapka barviva ActinRed, které barví aktinová vlákna cytoskeletu. Barviva jsou fotosenzitivní a při působení světla se vysvěcují, proto byla destička uložena do inkubátoru, ve kterém je tma, a barviva se nechala působit 20-30 minut. Nakonec byly buňky zkoumány pod fluorescenčním mikroskopem.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Příprava roztoků a elektrostatické zvlákňování

Prvním připraveným roztokem polymeru byl roztok chitosanu s PEO o koncentraci $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poměru chitosan:PEO = 5:1. Před spinováním bylo viditelné, že roztok je dobře připravený. Barva roztoku byla ideální, lehce nažloutlá, tudíž nedošlo k degradaci. Zároveň roztok neobsahoval žádné bubliny, takže byl vhodný pro elektrostatické zvlákňování. Po změření viskozity a vodivosti se roztok zvlákňoval po dobu 60 a 90 minut. Zvlákňování bylo úspěšné, což potvrdila i analýza SEM.



Obrázek 9 Fotografie vzorků chitosanu s PEO zvlákňovaných 60 minut (vlevo) a 90 minut (vpravo)

(zdroj: vlastní)

Dalším připraveným roztokem polymeru byl roztok chitosanu s PEO a 3 mol.% DAC. Po smíchání roztoku chitosanu s PEO s roztokem DAC a odplynění byla směs vizuálně v pořádku. Avšak při elektrostatickém zvlákňování namísto tvorby vláken docházelo ke gelování. Proto byl roztok připraven znovu.

S druhým pokusem o přípravu tohoto roztoku byl zároveň připravován i roztok s PPy. Při přípravě obou směsí se nejdříve připravil roztok chitosanu s PEO a roztok chitosanu s PEO a PPy o koncentraci chitosanu $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poměru chitosan:PEO = 4:1. Po přefiltrování obou roztoků a až těsně před spinováním byl přidán roztok DAC k roztoku chitosanu a PEO. Poté následovalo odplynění. Ani tato úprava postupu však nezajistila úspěšné zvlákňování.

Po zvážení všech možností, jak upravit podmínky, aby byl roztok chitosanu s PEO a DAC schopen tvorby nanovláken, se přistoupilo ke snížení molární koncentrace DAC ze 3 mol.% na 1 mol.%. Tento krok se ukázal jako pozitivní, protože roztok již disponoval schopností tvořit nanovlákná. Tímto způsobem podlehl úpravě pouze roztok chitosanu s PEO a DAC, roztok s PPy se již neupravoval, a tudíž nanovlákná tohoto roztoku vytvořena nebyla. Viskozita nebyla měřena v roztocích obsahujících DAC, jelikož docházelo k jejich rychlému gelovatění. Z toho důvodu bylo nutné provést zvlákňování co nejrychleji, což neumožnilo měření viskozity.

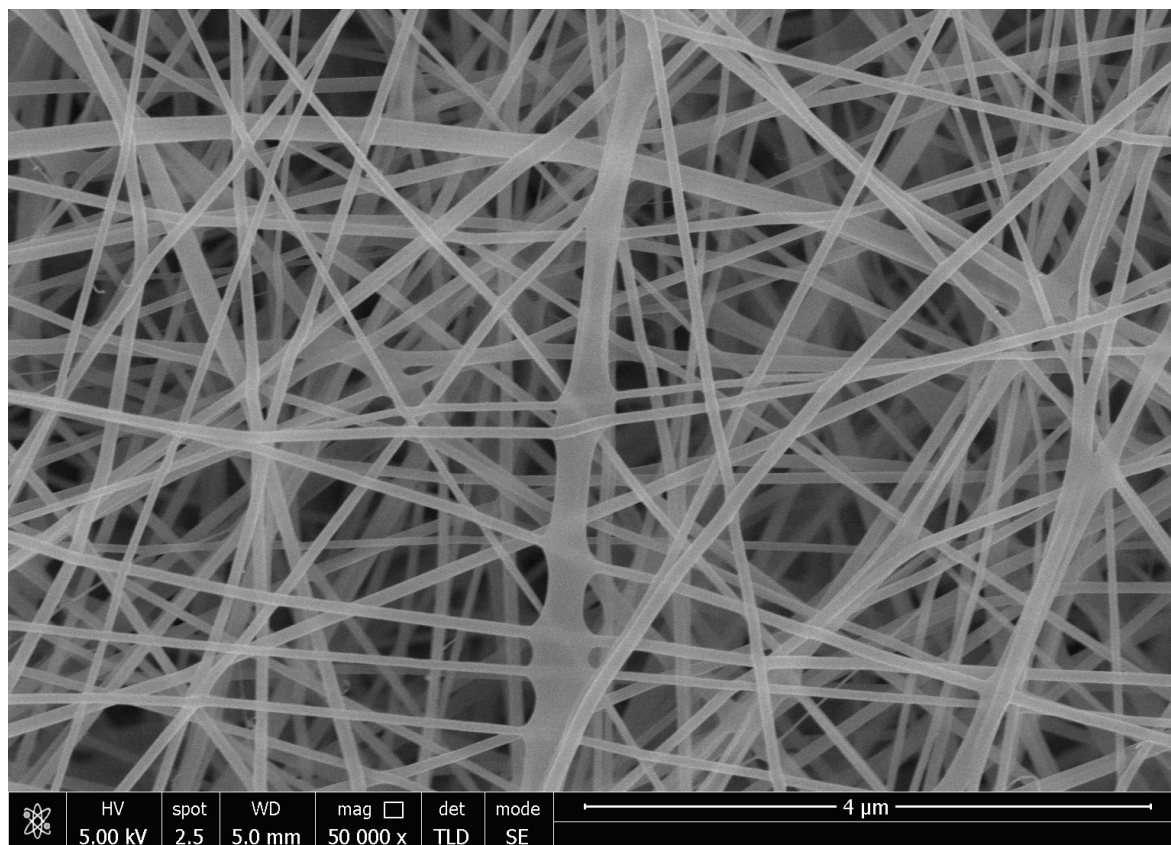


Obrázek 10 Fotografie vzorku chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC

(zdroj: vlastní)

7.1.1 Analýza SEM

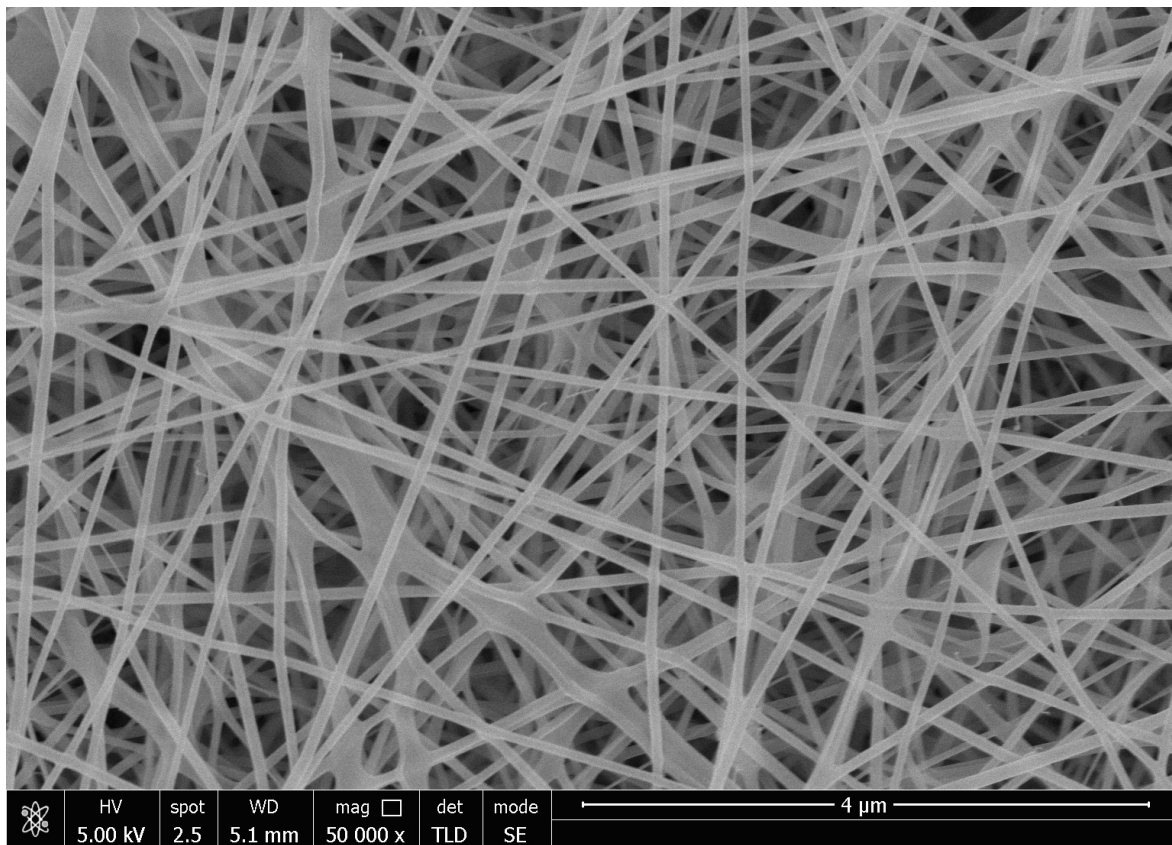
Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je pro charakterizaci nanovláken nepostradatelnou metodou, jelikož poskytuje nezbytné vysoké zvětšení a rozlišení pro vizualizaci struktur v nanoměřítku, které jsou pod rozlišovacími schopnostmi optických mikroskopů. SEM je technika, která poskytuje přímý důkaz, že procesem elektrospinningu skutečně vznikla vlákna. Zároveň odhaluje celkovou morfologii nanovláknenné vrstvy – jak jsou vlákna uspořádána, jaká je porozita materiálu, zda jsou vlákna propojená. Dále umožňuje detailně prohlédnout povrchovou texturu jednotlivých vláken (hladká, porézní, drsná). Navíc SEM slouží k identifikaci případných defektů, jako je například nekonzistence ve struktuře, což je důležité pro kontrolu kvality a optimalizaci procesu elektrospinningu. Celkově tedy SEM poskytuje komplexní obraz o fyzikálních charakteristikách připravených nanovláken a potvrzuje úspěšnost jejich syntézy.



Obrázek 11 Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie nanovláken chitosanu s PEO zvlákněvanými 60 minut při zvětšení 50 000×

(zdroj: vlastní)

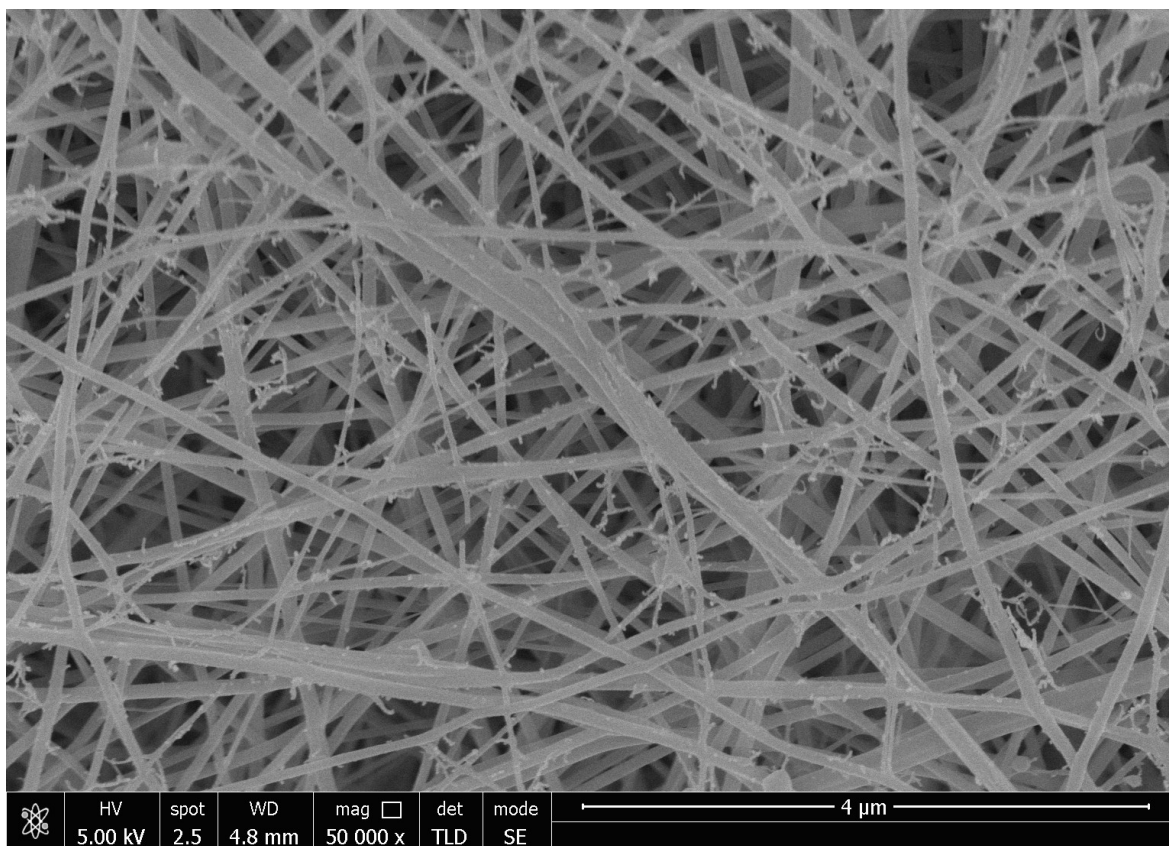
Ze snímku bylo patrné, že nanovlákná chitosanu s PEO, která se zvlákněovala po dobu 60 minut, byla neuspořádaná, tedy nebyla v jednotném směru. Na první pohled nebyly vidět žádné větší shluky či nedokonalosti. Nanovlákná byla hladká bez defektů. Průměrná tloušťka nanovláken byla (110 ± 42) nm, což naznačuje relativně homogenní tloušťku.



Obrázek 12 Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných po dobu 90 minut při zvětšení 50 000×

(zdroj: vlastní)

U nanovláken stejného složení při 90 minutách elektrostatického zvlákňování bylo možné pozorovat větší hustotu nanovláken, než bylo vidět u předchozího snímku. I v tomto případě byla nanovláknina hladká, bez viditelných nerovností či defektů. Tato nanovláknina měla nepatrně menší tloušťku než stejná nanovláknina spinovaná pouze 60 minut. Průměrná tloušťka byla (96 ± 46) nm. I v tomto případě tedy byla tloušťka nanovláken relativně homogenní.



Obrázek 13 Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákňovaných po dobu 60 minut při zvětšení 50 000×

(zdroj: vlastní)

U nanovláken s přídavkem DAC byla patrná odlišnost struktury oproti předchozím nanovláknům. Přítomnost DAC zapříčinila nerovnost a neuhlazenost nanovláken a vytvořila vlastní malou síť. Hustota nanovláken, vzhledem k době zvlákňování, byla velmi podobná prvnímu typu nanovláken. Rozdíl byl ale patrný v jejich průměru. Nanovlákná s přídavkem 1 mol.% DAC měla průměrnou tloušťku (93 ± 45) nm. Celkově tedy byla tato nanovlákná o něco tenčí než nanovlákná bez DAC. Stejně jako v předchozích dvou případech i tento výsledek ukazuje na relativně homogenní tloušťku.

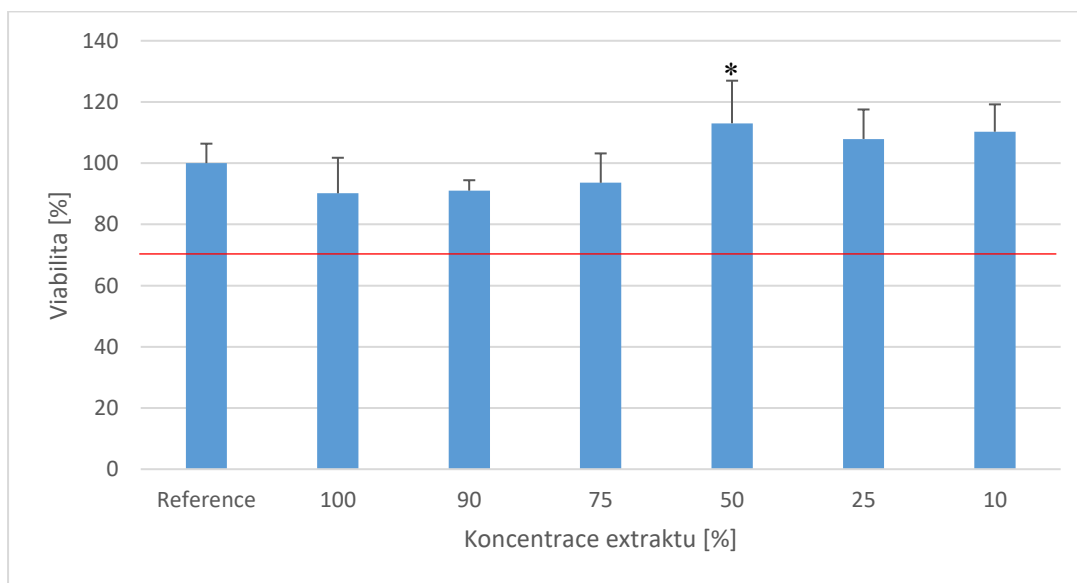
7.2 Buněčné testování

Pro posouzení biokompatibility připravených nanovláknenných materiálů a jejich potenciální vhodnosti pro biomedicínské aplikace (např. jako nosiče pro tkáňové inženýrství, materiály pro krytí ran nebo součásti implantátů) bylo nezbytné ověřit jejich interakci s buněčným prostředím. Z tohoto důvodu byla provedena jednak zkouška cytotoxicity, jejímž cílem je

zjistit, zda materiál neuvolňuje toxické látky nebo sám o sobě nepůsobí škodlivě na buňky. Dále byla hodnocena schopnost povrchu nanovláken podporovat adhezi a proliferaci buněk, což jsou klíčové předpoklady pro úspěšnou integraci materiálu s živou tkání.

Pro zajištění bezpečnosti a účinnosti biomateriálů je důležitým parametrem stanovení cytotoxicity materiálů. Vyhodnocení cytotoxicity zahrnovalo stanovení buněčné viability po expozici různým koncentracím extraktů jednotlivých vzorků.

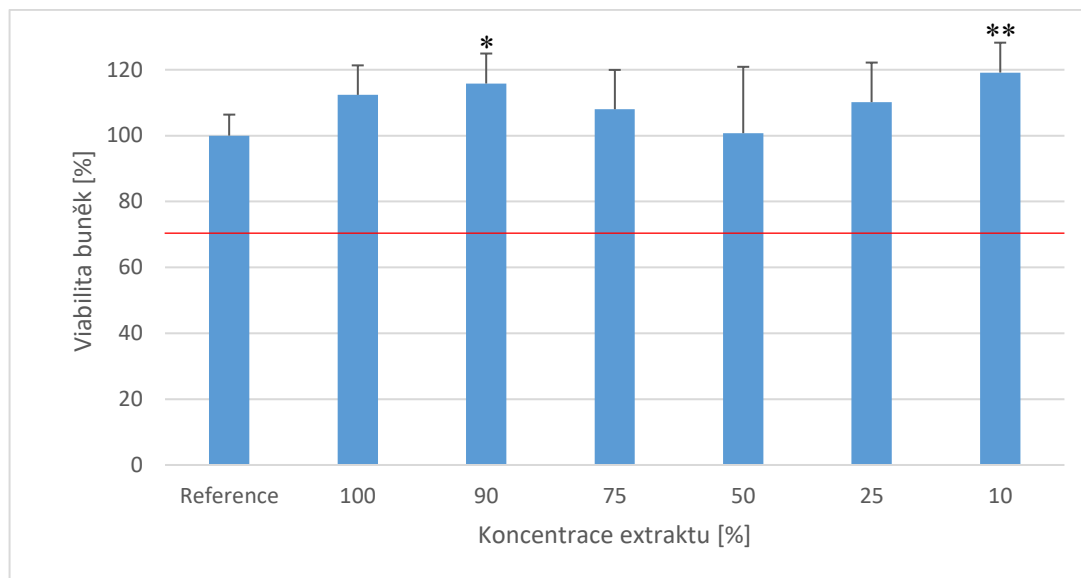
7.2.1 Cytotoxicita



Graf 1 Závislost viability buněk na koncentraci extraktu nanovláken chitosanu s PEO v poměru 5:1 zvlákněvaných 60 minut

Nejvyšší absorbance byla naměřena u extraktu s koncentrací 50 %, což znamená, že zde byl největší podíl přeměněného MTT na fialový formazan, a tedy největší mitochondriální aktivita buněk. To dokazoval i graf 2, kde 50% extrakt přesahoval i životaschopnost buněk u reference. Dle ISO 10993-5 je hranice viability 70 % (vyznačeno červenou linkou) a všechny koncentrace extraktu tuhle hodnotu přesahují, tudíž extrakt cytotoxický nebyl.

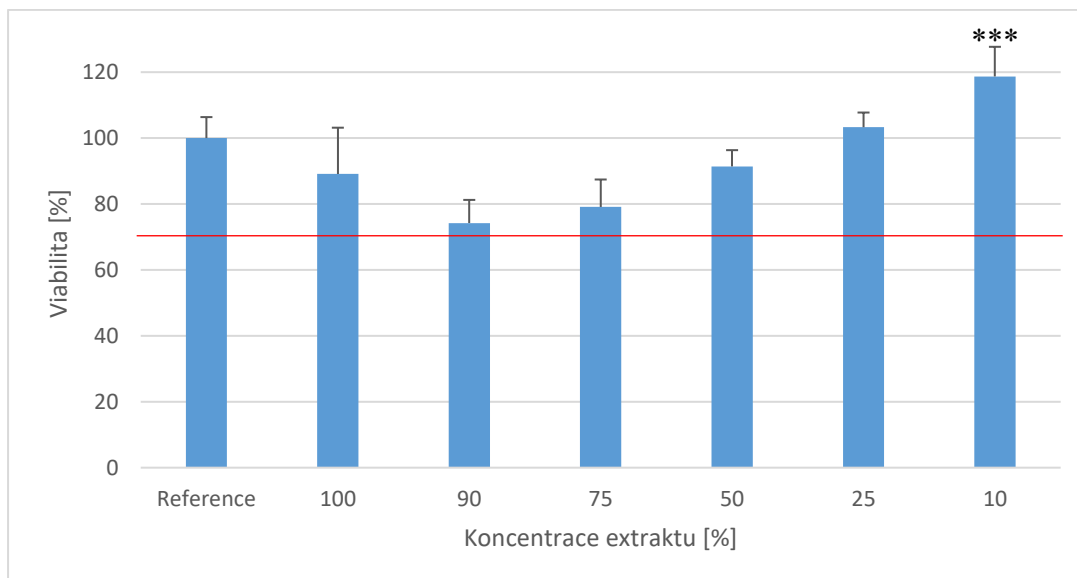
Statistická analýza rozdílů mezi referenčním vzorkem a vzorky o jednotlivých koncentracích ukázala, že mezi referencí a vzorkem o koncentraci 50 % existuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Hodnota $p < 0,05$ naznačuje, že zvolená koncentrace má vliv na výslednou viabilitu buněk.



Graf 2 Závislost viability buněk na koncentraci extraktu nanovláken chitosanu s PEO 5:1 zvlákňovaných 90 minut

V tomhle případě vykazovaly buňky největší mitochondriální aktivitu v koncentraci extraktu 10 %. Extrakt dokonce podporoval růst buněk natolik, že u žádné z koncentrací extraktu neklesla viabilita pod 100 %. Extrakt tedy nebyl pro buňky v žádné koncentraci cytotoxický.

Zajímavým faktem bylo, že extrakt z nanovláken, který se zvlákňoval 90 minut, v porovnání s extraktem nanovláken spinovaných 60 minut, byl podle hodnot viability pro buňky značně podpůrnější, a to zejména v koncentracích 100 %, 90 % a 75 %. Analýzou statisticky významných rozdílů mezi referencí a koncentracemi bylo zjištěno, že mezi referencí a koncentrací 90 % je opravdu statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a mezi referenčním vzorkem a vzorkem o koncentraci 10 % je statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,005$. U obou koncentrací byla hodnota p menší než daná hladina významnosti, což znamená, že zvolené koncentraci měly vliv na viabilitu buněk.



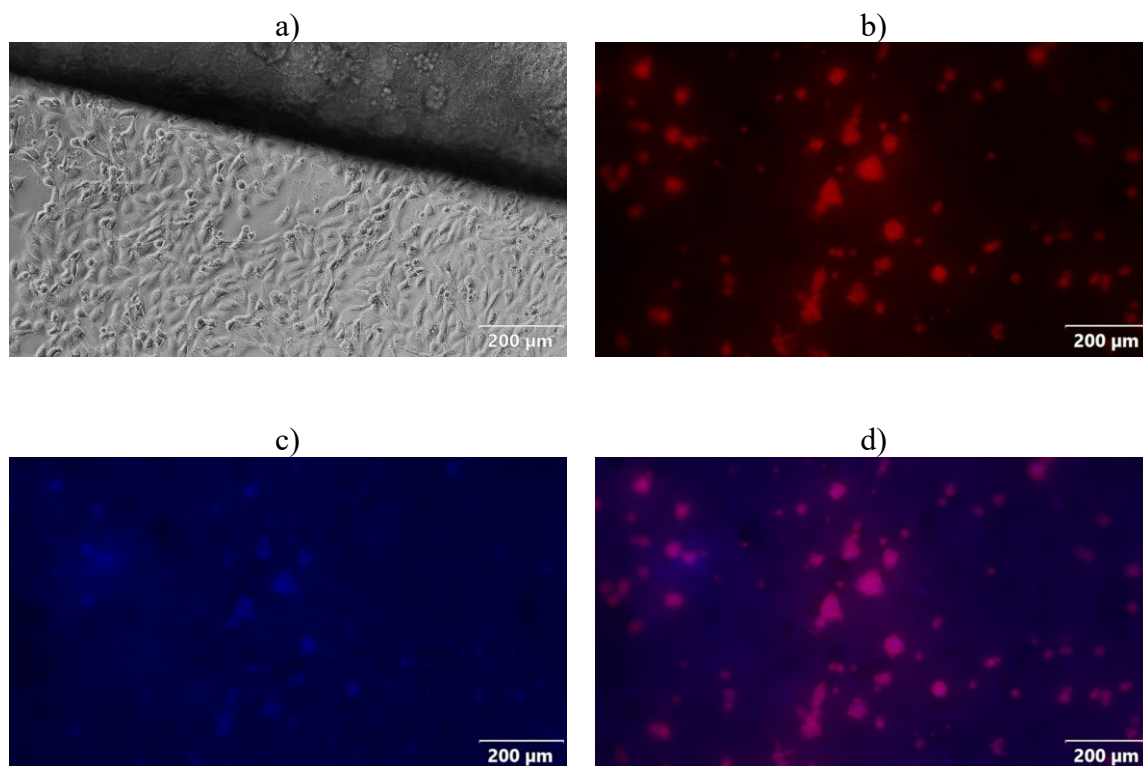
Graf 3 Závislost viability buněk na koncentraci extraktu nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákněvaných 60 minut

U extraktu s DAC byla koncentrace 90 % byla téměř na hranici životaschopnosti buněk. Naproti tomu u koncentrace 10 % viabilita buněk značně narostla. Podle dostupných zdrojů je DAC biokompatibilní, disponuje antimikrobiálními vlastnostmi a má nízkou toxicitu. Tyto atributy by měly přispívat k životaschopnosti buněk. [33]

Právě u koncentrace 10 % byl zjištěn staticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,0005$. Hodnota $p < 0,0005$ naznačuje, že koncentrace roztoku ovlivnila viabilitu buněk, a tak existuje pravděpodobnost, že nižší koncentrace DAC je podpůrnější pro viabilitu buněk.

7.2.2 Růst na povrchu a v přímém kontaktu

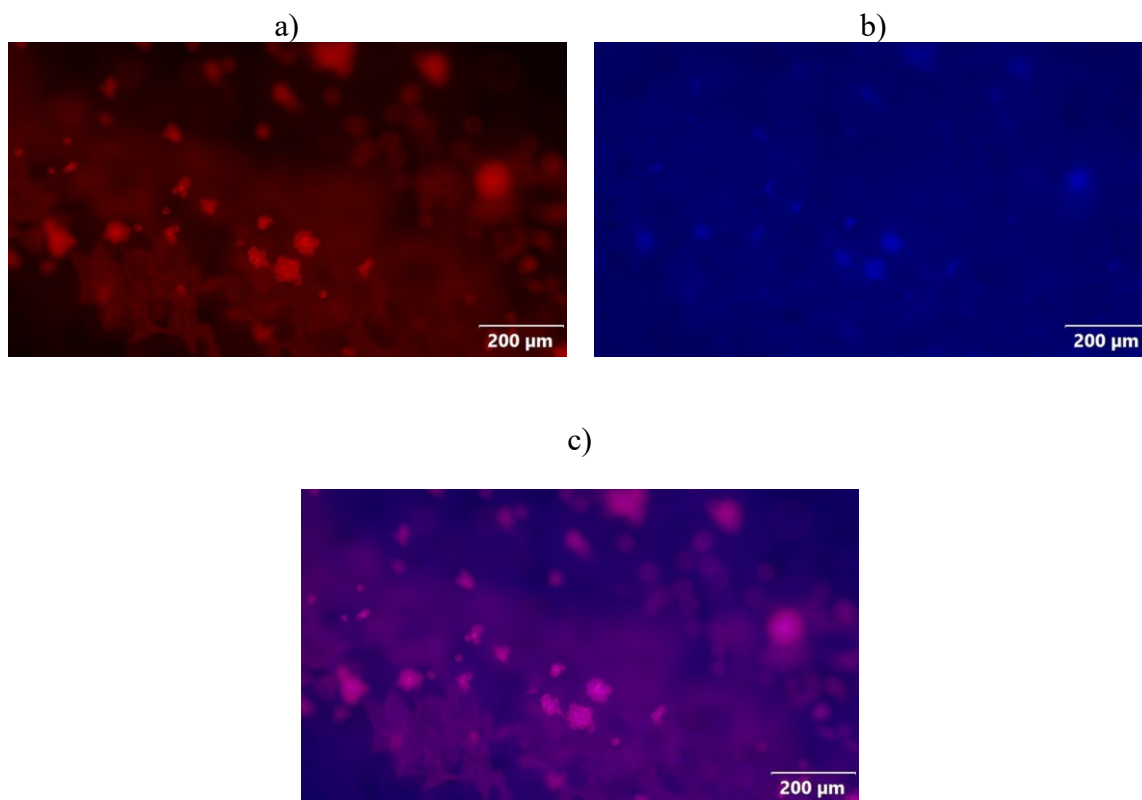
Pozorování adheze a proliferace buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu je velmi podstatným krokem pro zhodnocení funkčnosti a kvality materiálu z pohledu biologie. Díky fluorescenčním barvivům, která zvýrazňují aktinová vlákna cytoskeletu a DNA v jádrech buněk, se získávají informace o tom, do jaké míry daný materiál podporuje adhezi a proliferaci buněk. Výsledná morfologie a hustota buněk slouží jako indikátor biokompatibility materiálu, neboť odrážejí, jak buňky dané prostředí tolerují a jak se na jeho povrchu chovají.



Obrázek 14 Proliferace buněk po 2 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) černobílý snímek buněk na rozhraní materiálu, b) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, c) DNA v jádře, d) aktinová vlákna a jaderná DNA

(zdroj: vlastní)

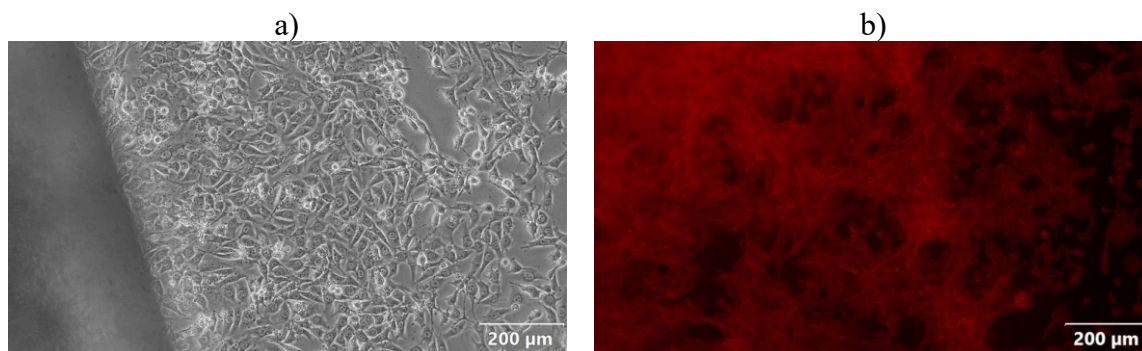
Na obrázku 14a je zobrazen buněčný růst v přímém kontaktu s nanovláknem. Z pozorování vyplývá, že k žádné inhibici růstu nedocházelo. Buňky v kontaktu s materiálem si plně zachovaly životaschopnost i svou typickou fyziologickou morfologii. Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu je možné pozorovat proliferaci buněk na daném materiálu. Na nanovlákněch z chitosanu a PEO zvlákňovaných 60 minut buňky nevykazovaly po 2 dnech výrazný nárůst. Z obrázku 14 b-d je zřejmé, že buňky měly spíše kulovitý tvar a vyskytovaly se ve shlucích, což poukazuje na skutečnost, že buňky nebyly schopny dostatečně proliferovat. Proto byly snímky pořízeny ještě po 5 dnech, aby se zjistilo, zda jsou buňky vůbec schopny na tomto materiálu proliferovat (obrázek 15).

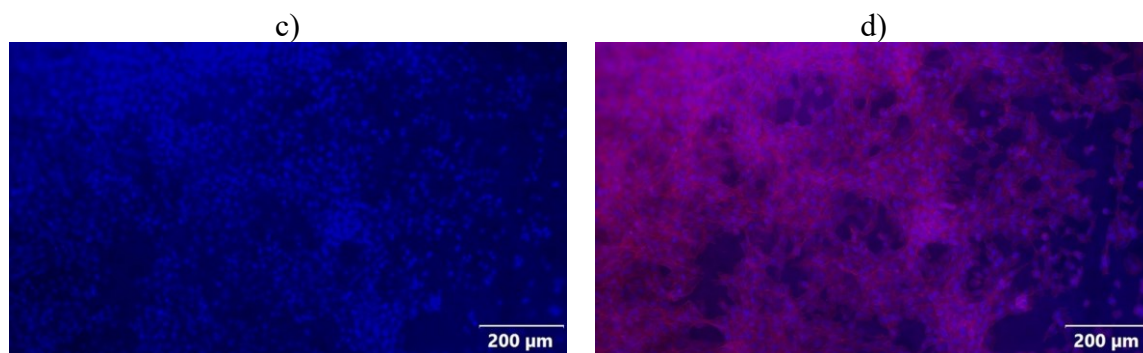


Obrázek 15 Proliferace buněk po 5 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO zvlákněvaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, b) DNA v jádře, c) aktinová vlákna a jaderná DNA

(zdroj: vlastní)

Ze snímků pořízených po 5 dnech je patrné, že ani s delší dobou kultivace nedošlo k výraznému nárůstu počtu buněk a stále si udržely kulovitý tvar. Na tomto materiálu tedy buňky neprokázaly schopnost proliferace.

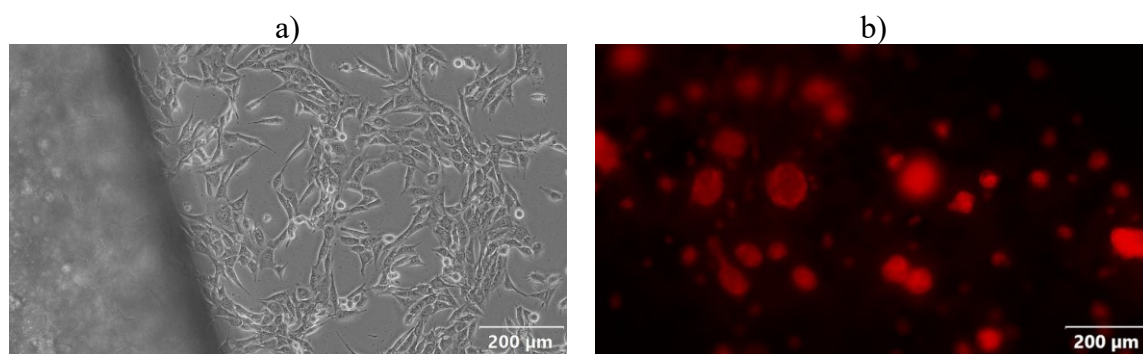


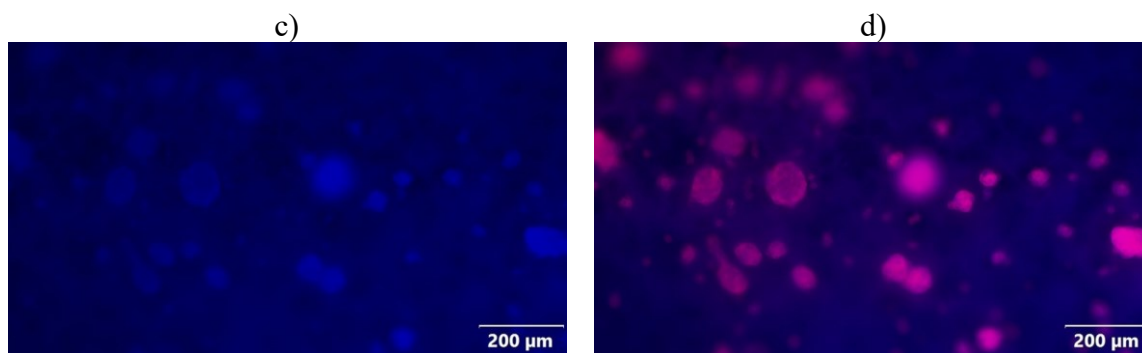


Obrázek 16 Proliferace buněk po 2 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných 90 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) černobílý snímek buněk na rozhraní materiálu, b) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, c) DNA v jádře, d) aktinová vlákna a jaderná DNA

(zdroj: vlastní)

Stejně jako v předešlém případě, buňky v přímém kontaktu s nanovláknem chitosanu s PEO zvlákňovaných 90 minut nevykazovaly žádné abnormality (obrázek 16a). Avšak, oproti nanovláknům chitosanu s PEO zvlákňovaným 60 minut, buňky na povrchu nanovláken stejného složení zvlákňovaných 90 minut vykazovaly mnohem větší schopnost proliferace, jak je patrné ze snímků výše (obrázek 16). Buňky neměly kulovitý tvar typický pro klidový stav, ale naopak byly hezky rozprostřené. Tato morfologie je výsledkem aktinové polymerizace a reorganizace cytoskeletu, které jsou esenciální pro buněčnou adhezi a proliferaci. Důvodem značně lepší proliferace na nanovlákněch spinovaných 90 minut byla s největší pravděpodobností hustota nanovláken. Větší prostory mezi jednotlivými nanovláknem totiž mohly znamenat horší podmínky pro adhezi a následnou proliferaci buněk, a patrně z toho důvodu buňky lépe proliferovaly na hustším materiálu.

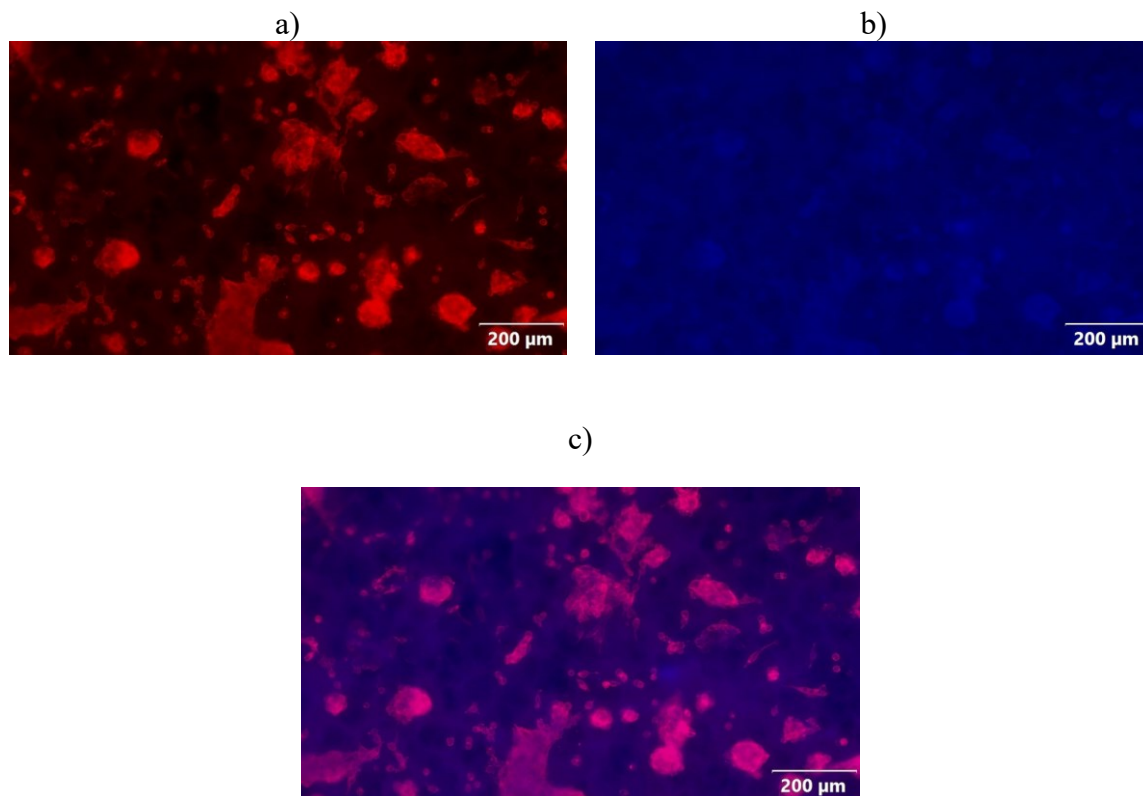




Obrázek 17 Proliferace buněk po 2 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákňovaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) černobílý snímek buněk na rozhraní materiálu, b) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, c) DNA v jádře, d) aktinová vlákna a jaderná DNA

(zdroj: vlastní)

Obrázek 17a demonstruje, jak buňky rostou v přímém kontaktu s nanovlákněným materiálem s přídavkem DAC. Výsledky zde ukazují, jak v předešlých případech, absenci jakékoliv inhibice. Při pozorování proliferace buněk po 2 dnech přímo na povrchu materiálu z chitosanu, PEO a DAC byla ale patrná neideální morfologie buněk (obrázek 17). Buňky měly, stejně jako v případě chitosanu s PEO zvlákňovaných 60 minut, kulovitý tvar a vyskytovaly se ve shlucích, což svědčilo o tom, že buňky dostatečně neproliferovaly. I přes pozitivní vlastnosti DAC, které jsou zmíněny výše v kapitole 7.2.1, buňky na tomto materiálu neproliferovaly v takové míře jak na materiálu bez DAC zvlákňovaném po dobu 90 minut. Avšak ve srovnání s nanovláknem spinovanými po dobu 60 minut bylo pozorováno hustší a homogennější osídlení buněk s přídavkem DACu. Napříč tomu, že po dvou dnech proliferace buňky na nanovlákněch s DAC tvořily shluky, snímky pořízené po 5 dnech dokazují, že při delší době kultivace byli buňky schopny se postupně rozrůstat (obrázek 18), zatímco u nanovláken bez obsahu DAC toho buňky schopné nebyli. Proto je možné jednoznačně potvrdit, že přídavek DAC měl na proliferaci buněk pozitivní vliv.



Obrázek 18 Proliferace buněk po 5 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákněvaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, b) DNA v jádře, c) aktinová vlákna a jaderná DNA

(zdroj: vlastní)

Stručně shrnuto, buňky myších fibroblastů prokázaly schopnost růst v přímém kontaktu se všemi třemi testovanými typy nanovláknenných materiálů. Toto zjištění je plně v souladu s výsledky předchozích testů cytotoxicity (MTT test), které potvrdily, že připravené materiály nejsou pro buňky toxické a nevyvolávají nežádoucí cytotoxickou odpověď.

Přestože všechny vzorky umožnily adhezi a růst buněk, byly mezi nimi pozorovány rozdíly v míře následné buněčné proliferace a v morfologii buněk. Nejlepší podmínky pro proliferaci a rozprostření buněk do typické větvenovité morfologie poskytl materiál z chitosanu s PEO zvlákněvaný po dobu 90 minut. Na zbývajících dvou materiálech (chitosan s PEO zvlákněvaný 60 minut a chitosan s PEO a DAC zvlákněvaný 60 minut) byla buněčná proliferace pomalejší a buňky si častěji zachovávaly spíše kulovitý tvar, zejména v raných fázích kultivace. U vzorku chitosanu s PEO a DAC zvlákněvaného 60 minut bylo nicméně pozorováno postupné zlepšování buněčného růstu a mírné zvýšení proliferace s prodlužující se dobou kultivace.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit polymerní nanovlákná na bázi chitosanu technologií elektrostatického zvlákňování a následně zhodnotit jejich biokompatibilitu s linií myších fibroblastů. Celkem byly úspěšně připraveny 3 druhy nanovláken, a to nanovlákná chitosanu s PEO spinovaná po dobu 60 minut, nanovlákná chitosanu s PEO spinovaná po dobu 90 minut a nanovlákná chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC spinovaná po dobu 60 minut.

Proces elektrostatického zvlákňování je komplexní a jeho úspěšnost závisí na řadě vnitřních i vnějších faktorů, mezi které patří například zvolené napětí, viskozita polymerních roztoků, vlhkost okolního prostředí nebo i koncentrace látek obsažených v roztocích. V rámci této práce se jako klíčový parametr pro úspěšné zvlákňování roztoků s DAC ukázala být právě jeho koncentrace. Při původně testované koncentraci 3 mol.% docházelo ke gelování roztoku, což znemožnilo formování vláken. Úspěšné přípravy nanovláken s DAC bylo dosaženo až po snížení koncentrace na 1 mol.%. Tento jev byl pravděpodobně způsoben vysokou reaktivitou čerstvě syntetizovaného DAC. Připravené nanovláknenné materiály byly následně analyzovány pomocí SEM, která u všech tří typů vzorků potvrdila tvorbu nanovláken s relativně homogenní tloušťkou. Následný test cytotoxicity MTT prokázal domněnku, že ani jeden z materiálů nevykazoval cytotoxické účinky. Naopak bylo zjištěno, že určité koncentrace extraktů podporovaly viabilitu buněk. Hodnocení buněčné adheze a proliferace ukázalo, že buňky nejlépe proliferovaly na nanovláknenném materiálu z chitosanu a PEO zvlákňovaném 90 minut. Tento pozitivní výsledek lze přisoudit zvýšené hustotě nanovláknenné sítě, dosažené delší dobou zvlákňování, která pravděpodobně přispěla k efektivnějšímu rozprostření buněk a jejich pevnější adhezi prostřednictvím většího množství kontaktních bodů. U zbylých dvou materiálů naopak nebyla proliferace výrazná a buňky si zachovávaly kulovitou morfolonii. Ovšem u nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákňovaných 60 minut výsledky naznačují, že s delší dobou kultivace buněk na materiálu docházelo ke zvýšení buněčné proliferace.

Získané výsledky naznačují, že větší hustota nanovláken pozitivně ovlivňuje proliferaci buněk, a tudíž nanovlákná chitosanu s PEO zvlákňovaná 90 minut by v biomedicínských aplikacích mohla být vhodná například pro scaffoldy v oblasti regeneraci měkkých tkání, regenerace nervové tkáně nebo při přípravě materiálů pro hojení ran. Nanovlákná chitosanu s PEO a DAC zvlákňovaných 60 minut, u nichž byl pozorován nárůst proliferace v delším časovém horizontu, by mohla být perspektivní pro aplikace vyžadující postupné osidlování materiálu buňkami, například v tkáňovém inženýrství specifických tkání nebo pro materiály

podporující vaskularizaci. Nanovlákná na bázi chitosanu a PEO by vzhledem k velmi nízké míře buněčné proliferace našla uplatnění jako bariérové materiály, dočasné krycí vrstvy nebo nosiče pro řízené uvolňování léčiv, kde rychlá integrace s okolní tkání není primárním požadavkem. Specifického medicínského účinku či rozšířené funkčnosti by nanovlákná mohla nabýt prostřednictvím inkorporace léčiv či dalších bioaktivních látek přímo do jejich struktury.

Tato práce úspěšně demonstrovala přípravu biokompatibilních nanovláknenných materiálů na bázi chitosanu s odlišnými charakteristikami a naznačila jejich potenciál pro další výzkum a možné uplatnění v oblasti biomedicínských aplikací.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] nanoSPACE, „Co je nanovláknó? Poznejte okem neviditelný zázrak, který chrání a léčí | nanoSPACE", nanospace.cz. Viděno: 15. červenec 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.nanospace.cz/blog/co-je-nanovlakno/>
- [2] A. A. Altaf, M. Ahmed, M. Hamayun, S. Kausar, M. Waqar, a A. Badshah, „Titania nano-fibers: A review on synthesis and utilities", *Inorganica Chim. Acta*, roč. 501, s. 119268, úno. 2020, doi: 10.1016/j.ica.2019.119268.
- [3] G. Anusiya a R. Jaiganesh, „A review on fabrication methods of nanofibers and a special focus on application of cellulose nanofibers", *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, roč. 4, s. 100262, pro. 2022, doi: 10.1016/j.carpta.2022.100262.
- [4] A. A. Almetwally, M. El-Sakhawy, M. Elshakankery, a M. H. Kasem, „Technology of nano-fibers: Production techniques and properties - Critical review", *J. Text. Assoc.*, roč. 78, s. 5–14, kvě. 2017.
- [5] P. Ugo a L. M. Moretto, „16.2 - TEMPLATE DEPOSITION OF METALS", in *Handbook of Electrochemistry*, C. G. Zoski, Ed., Amsterdam: Elsevier, 2007, s. 678–709. doi: 10.1016/B978-044451958-0.50030-6.
- [6] Y. Liu, J. Goebel, a Y. Yin, „Templated synthesis of nanostructured materials", *Chem. Soc. Rev.*, roč. 42, č. 7, s. 2610–2653, bř. 2013, doi: 10.1039/C2CS35369E.
- [7] M. Wehmann a W. J. G. McCulloch, „Melt blowing technology", in *Polypropylene: An A-Z reference*, J. Karger-Kocsis, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, 1999, s. 415–420. doi: 10.1007/978-94-011-4421-6_58.
- [8] J. Drabek a M. Zatloukal, „Meltblown technology for production of polymeric micro-fibers/nanofibers: A review", *Phys. Fluids*, roč. 31, č. 9, s. 091301, zář. 2019, doi: 10.1063/1.5116336.
- [9] W. E. Teo a S. Ramakrishna, „A review on electrospinning design and nanofibre assemblies", *Nanotechnology*, roč. 17, č. 14, s. R89, čer. 2006, doi: 10.1088/0957-4484/17/14/R01.
- [10] A. M. Al-Enizi, M. M. Zagho, a A. A. Elzatahry, „Polymer-Based Electrospun Nanofibers for Biomedical Applications", *Nanomaterials*, roč. 8, č. 4, Art. č. 4, dub. 2018, doi: 10.3390/nano8040259.

- [11] „The Difference Between ElectroSpinning and Electrospraying”, AZoNano. Viděno: 26. srpen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=5060>
- [12] W. Zhang *et al.*, „Structural design and environmental applications of electrospun nanofibers”, *Compos. Part Appl. Sci. Manuf.*, roč. 137, s. 106009, říj. 2020, doi: 10.1016/j.compositesa.2020.106009.
- [13] X. Lu *et al.*, „Fabrication of bio-inspired anisotropic structures from biopolymers for biomedical applications: A review”, *Carbohydr. Polym.*, roč. 308, s. 120669, kvě. 2023, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120669.
- [14] K. Thorkelsson, P. Bai, a T. Xu, „Self-assembly and applications of anisotropic nanomaterials: A review”, *Nano Today*, roč. 10, č. 1, s. 48–66, úno. 2015, doi: 10.1016/j.nantod.2014.12.005.
- [15] „isotropic”. Viděno: 6. listopad 2024. [Online]. Dostupné z: <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/isotropic>
- [16] Y. Garcia, A. Breen, K. Burugapalli, P. Dockery, a A. Pandit, „Stereological methods to assess tissue response for tissue-engineered scaffolds”, *Biomaterials*, roč. 28, č. 2, s. 175–186, led. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.037.
- [17] „Depletion Force - an overview | ScienceDirect Topics”. Viděno: 31. říjen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/depletion-force>
- [18] S. Aghayari, „PVDF composite nanofibers applications”, *Heliyon*, roč. 8, č. 11, lis. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11620.
- [19] J. Kujawa *et al.*, „Current and future applications of PVDF-carbon nanomaterials in energy and sensing”, *Chem. Eng. J.*, roč. 492, s. 151856, čvc. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.151856.
- [20] nth6x, „The Differences Between PVDF and PTFE Membranes - Hawach”, hawachmembrane. Viděno: 10. únor 2025. [Online]. Dostupné z: <http://hawachmembrane.com/the-differences-between-pvdf-and-ptfe-membrane/>
- [21] D. M. Fernandes *et al.*, „Polymeric membrane based on polyactic acid and babassu oil for wound healing”, *Mater. Today Commun.*, roč. 26, s. 102173, bř. 2021, doi: 10.1016/j.mtcomm.2021.102173.

- [22] „Polylactic Acid - an overview | ScienceDirect Topics". Viděno: 10. únor 2025. [Online]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/polylactic-acid>
- [23] H. Yadav, R. Malviya, a N. Kaushik, „Chitosan in biomedicine: A comprehensive review of recent developments", *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, roč. 8, s. 100551, pro. 2024, doi: 10.1016/j.carpta.2024.100551.
- [24] I. Younes a M. Rinaudo, „Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications", *Mar. Drugs*, roč. 13, č. 3, Art. č. 3, bře. 2015, doi: 10.3390/md13031133.
- [25] H. N. Abdelhamid a A. P. Mathew, „Cellulose-Based Nanomaterials Advance Biomedicine: A Review", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 23, č. 10, Art. č. 10, led. 2022, doi: 10.3390/ijms23105405.
- [26] „Figure 4. Chemical structure of cellulose", ResearchGate. Viděno: 10. únor 2025. [Online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-cellulose_fig2_281315467
- [27] H. Ye, R. Zhang, C. Zhang, Y. Xia, a L. Jin, „Advances in hyaluronic acid: Bioactivity, complexed biomaterials and biological application: A review", *Asian J. Surg.*, srp. 2024, doi: 10.1016/j.asjsur.2024.08.100.
- [28] „Hyaluronic Acid - an overview | ScienceDirect Topics". Viděno: 10. únor 2025. [Online]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemical-engineering/hyaluronic-acid>
- [29] S. Thakkar a M. Misra, „Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery", *Eur. J. Pharm. Sci.*, roč. 107, s. 148–167, zář. 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2017.07.001.
- [30] „Tissue engineering - Latest research and news | Nature". Viděno: 22. březen 2025. [Online]. Dostupné z: <https://www.nature.com/subjects/tissue-engineering>
- [31] E. Venkata Prathyusha *et al.*, „Nanostructured polymer composites for bone and tissue regeneration", *Int. J. Biol. Macromol.*, roč. 284, s. 137834, led. 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.137834.

[32] „Zařízení na přípravu nanovláken". Viděno: 22. březen 2025. [Online]. Dostupné z: <https://cps.utb.cz/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/zpracovani-ostatni/zarizeni-na-pripravu-nanovlaken>

[33] S. Mayer *et al.*, „Antimicrobial and physicochemical characterization of 2,3-dialdehyde cellulose-based wound dressings systems", *Carbohydr. Polym.*, roč. 272, s. 118506, lis. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118506.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Dvousložková vlákna na průřezu	14
Obrázek 2 Zařízení pro elektrostatické zvlákňování.....	15
Obrázek 3 Struktura molekuly PVDF	20
Obrázek 4 Molekula kyseliny mléčné v konfiguraci L a D	21
Obrázek 5 Molekula chitinu a jeho deacetylované formy chitosanu	22
Obrázek 6 Molekula celulózy	23
Obrázek 7 Molekula kyseliny hyaluronové	24
Obrázek 8 Zařízení pro elektrostatické zvlákňování.....	37
Obrázek 9 Fotografie vzorků chitosanu s PEO zvlákňovaných 60 minut (vlevo) a 90 minut (vpravo).....	41
Obrázek 10 Fotografie vzorku chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC	42
Obrázek 11 Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovanými 60 minut při zvětšení 50 000×	43
Obrázek 12 Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných po dobu 90 minut při zvětšení 50 000×	44
Obrázek 13 Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákňovaných po dobu 60 minut při zvětšení 50 000×	45
Obrázek 14 Proliferace buněk po 2 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) černobílý snímek buněk na rozhraní materiálu, b) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, c) DNA v jádře, d) aktinová vlákna a jaderná DNA	49
Obrázek 15 Proliferace buněk po 5-6 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, b) DNA v jádře, c) aktinová vlákna a jaderná DNA	50
Obrázek 16 Proliferace buněk po 2 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO zvlákňovaných 90 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) černobílý snímek buněk na rozhraní materiálu, b) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, c) DNA v jádře, d) aktinová vlákna a jaderná DNA	51
Obrázek 17 Proliferace buněk po 2 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákňovaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) černobílý snímek buněk na rozhraní materiálu, b) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, c) DNA v jádře, d) aktinová vlákna a jaderná DNA	52
Obrázek 18 Proliferace buněk po 5-6 dnech na povrchu nanovláken chitosanu s PEO a 1 mol.% DAC zvlákňovaných 60 minut na snímcích z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100×: a) aktinová vlákna cytoskeletu buněk, b) DNA v jádře, c) aktinová vlákna a jaderná DNA	53

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ECM	Extracelulární matrix
DAC	Dialdehyd celulózy
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
HA	Kyselina hyaluronová
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
PBS	Fosfátový pufrovaný fyziologický roztok
PEO	Polyethylen oxid
PLA	Kyselina polymléčná
PPy	Polypyrrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Počet otáček za minutu
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie