

Příprava kompozitních mikrogelů na bázi alginátu pro biomedicínské aplikace

Bc. Barbora Polášková

Diplomová 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 DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Barbora Polášková
Osobní číslo: T23478
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Příprava kompozitních mikrogelů na bázi alginátu pro biomedicínské aplikace

Zásady pro vypracování

Mikrogely na bázi alginátu jsou vyhledávány biomateriály zejména pro jejich vysokou biokompatibilitu a schopnost enkapsulovat buňky, proteiny a léčiva. Vlastnosti mikrogelů, jako je velikost, tvar a porozita, lze přitom snadno upravit pro konkrétní aplikace a výsledné materiály injektovat do těla pro lepší cílení účinku. Jejich vlastnosti lze navíc ještě zlepšit enkapsulací vhodných materiálů, jako je například polypyrrol (PPy), vodivý polymer, který vykazuje značné protizánětlivé, imunomodulační a antioxidační účinky. Náplní práce bude zpracování literární rešerše na téma mikrogelů používaných v medicíně, se zaměřením na kompozitní materiály na bázi alginátu a vodivých polymerů. Následně proběhne optimalizace přípravy alginátových mikrogelů a koloidů PPy. Oba materiály budou charakterizovány dostupnými fyzikálně chemickými metodami a výsledky porovnány. Pro získání žádaných vlastností může být alginát dále modifikován, například selektivní oxidací. V dalším kroku budou částice PPy enkapsulovány do alginátových mikrogelů. U vzniklých kompozitních mikrogelů budou kromě materiálových vlastností provedeny biologické testy *in vitro*, zaměřené zejména na zjištění cytotoxicity, imunomodulačních a antioxidačních vlastností. U vybraných materiálů bude také proveden tzv. scratch test pro studium jejich vlivu na buněčnou migraci a simulované hojení ran. Výsledky budou porovnány a diskutovány.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Kjesbu, J. S.; Zaytseva-Zotova, D.; Sämfors, S.; Gatenholm, P.; Troedsson, C.; Thompson, E. M.; Strand, B. L. Alginate and Tunicate Nanocellulose Composite Microbeads – Preparation, Characterization and Cell Encapsulation. *Carbohydrate Polymers* **2022**, 286, 119284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119284>.
- [2] Fleten, K. G.; Hyldbakk, A.; Einen, C.; Benjakul, S.; Strand, B. L.; Davies, C. de L.; Mørch, Y.; Flatmark, K. Alginate Microsphere Encapsulation of Drug-Loaded Nanoparticles: A Novel Strategy for Intraperitoneal Drug Delivery. *Marine Drugs* **2022**, 20 (12), 744. <https://doi.org/10.3390/md20120744>.
- [3] Dalheim, M. Ø.; Vanacker, J.; Najmi, M. A.; Aachmann, F. L.; Strand, B. L.; Christensen, B. E. Efficient Functionalization of Alginate Biomaterials. *Biomaterials* **2016**, 80, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.043>.
- [4] Rokstad, A. M. A.; Lacík, I.; de Vos, P.; Strand, B. L. Advances in Biocompatibility and Physico-Chemical Characterization of Microspheres for Cell Encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, 67–68, 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.010>.
- [5] Mørch, Y. A.; Donati, I.; Strand, B. L.; Skjåk-Bræk, G. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules* **2006**, 7 (5), 1471–1480. <https://doi.org/10.1021/bm060010d>.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Jan Vícha, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- 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 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 na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Zapouzdřené mikrogelové částice inspirované biologickými systémy si v oblasti výzkumu biomateriálů získávají čím dál větší pozornost. Studium mikrogelů nabízí značný potenciál pro další vývoj a vědecké zkoumání. Tato práce se zaměřuje na přípravu a charakterizaci kompozitních hydrogelů na bázi alginátu (AL), které jsou navrženy ke zmírnění zánětlivé odpovědi. Úspěšná syntéza mikroskopických hydrogelových sfér byla dosažena pomocí nové a inovativní metody založené na spontánní kondenzační reakci mezi alginátem a pyrrolem, a to bez potřeby oxidačních činidel či katalyzátorů. Kompozitní alginátové hydrogely s inkorporovaným polypyrrolem (PPy) byly připraveny řízenou metodou enkapsulace, která zajišťovala rovnoměrnou velikost mikrogelových kuliček díky přesnému nastavení parametrů, jako je koncentrace koloidního roztoku, frekvence vibrací, napětí a průtok. Pro pochopení jejich chování byly připravené hydrogely hodnoceny z hlediska protizánětlivých vlastností, cytotoxicity a schopnosti podporovat migraci a diferenciaci buněk v biologickém modelu hojení ran. Analýza dat potvrdila tvorbu mikroskopických hydrogelových sfér, stejně jako jejich biokompatibilitu a protizánětlivý účinek. Výsledné hydrogely by mohly představovat revoluční přístup v prevenci komplikací spojených s mokvajícými zanícenými ranami.

Klíčová slova: alginát, polypyrrol, mikrogel, enkapsulace, hojení ran, polysacharid, biokompatibilita, biologické testy, protizánětlivý účinek, nízká toxicita

ABSTRACT

Encapsulated microgels inspired by biological systems are increasingly gaining attention in the field of biomaterials research. The study of microgels offers significant potential for further development and scientific exploration. This thesis focuses on the preparation and characterization of composite hydrogels based on alginate (AL) designed to mitigate inflammatory responses. A successful synthesis of microscopic hydrogel spheres was achieved via a novel and innovative method, based on a spontaneous condensation reaction between alginates and pyrrole without the need for oxidizing agents or catalysts. The composite alginate hydrogels incorporating polypyrrole (PPy) were synthesized using a controlled encapsulation method that ensured the uniformity of the microbeads size through precise control of parameters such as colloidal solution concentration, vibration

frequency, voltage, and flow rate. To understand their behavior, the prepared hydrogels were evaluated for their anti-inflammatory properties, cytotoxicity, and ability to support cell migration and differentiation in a biological wound healing model. Data analysis confirmed the formation of microscopic hydrogel spheres, as well as their biocompatibility and anti-inflammatory qualities. The resulting hydrogels could be revolutionary in preventing complications associated with weeping inflamed wounds.

Keywords: alginate, polypyrrole, microgel, encapsulation, wound healing, polysaccharide, biocompatibility, biological tests, anti-inflammatory effect, low toxicity

Nyní bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D., dále také Ing. Filipu Latečkovi, Ing. Monice Muchové, Ph.D. a Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za jejich ochotu a pomoc při provádění experimentů. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu nejen při práci na mé závěrečné diplomové práci, ale i po celý čas studia.

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

OBSAH

ÚVOD	13
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 POLYSACHARIDY	15
1.1 KLASIFIKACE POLYSACHARIDŮ	17
1.2 VLASTNOSTI POLYSACHARIDŮ	19
2 ALGINÁT SODNÝ	21
3 POLYPYRROL	23
4 HYDROGELY	25
4.1 MIKROGELY	25
4.2 MIKROGELY A BÁZI ALGINÁTU	25
4.3 KOMPOZITY S VODIVÝMI POLYMERY	26
5 METODA PŘÍPRAVY KOMPOZITNÍCH MIKROGELŮ	28
5.1 PŘÍPRAVA KOLOIDŮ POLYPYRROLU	28
5.2 ENKAPSULACE	29
6 METODY CHARAKTERIZACE MIKROGELŮ	33
6.1 MIKROSKOPICKÁ ANALÝZA	33
6.2 DLS	34
6.3 SPEKTROSKOPICKÉ METODY	35
7 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ	37
7.1 BUNĚČNÉ KULTURY VYUŽÍVANÉ PŘI BIOLOGICKÝCH TESTECH	37
7.2 TEST VIABILITY BUNĚK (MTT)	38
7.3 TEST STANOVENÍ AKTIVITY MAKROFÁGŮ (NO PRODUCTION ASSAY)	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
8 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE KOMPOZITNÍCH ALGINÁTOVÝCH MIKROGELŮ	41
8.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	41
8.2 PŘÍPRAVA ROZTOKU POLYPYRROLU	41
8.3 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KOMPOZITNÍCH ALGINÁTOVÝCH MIKROGELŮ	43
8.4 PŘÍSTROJE A METODY	45
8.5 BIOLOGICKÉ TESTY	46
9 VÝSLEDKY A DISKUSE	49
9.1 CHARAKTERIZACE AL_PPY MIKROGELŮ	49
9.2 BIOLOGICKÉ TESTY	56
ZÁVĚR	60

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	70
SEZNAM TABULEK	71
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	72

ÚVOD

Polysacharidy, rozmanitá skupina přírodních biopolymerů, hrají zásadní roli v medicíně již po staletí. Tyto biomakromolekuly vykazují mimořádnou strukturální a funkční rozmanitost. Jejich hojnost v přírodě a kompatibilita s biologickými systémy učinily z polysacharidů nepostradatelné součásti vývoje medicínských materiálů dlouho před tím, než byla pochopena jejich chemická struktura.

Historicky byly látky bohaté na polysacharidy odvozené z rostlin, řas a hub nedílnou součástí tradičních léčebných praktik napříč kulturami. Již starověcí Číňané, Indové a Egypťané i přes jejich empirické znalosti tradičně připravovali a užívali bylinné extrakty, gumy a pryskyřice pro jejich terapeutické účinky, a to od hojení ran až po úlevu při zažívacích potížích.

S pokrokem v analytické chemii a molekulární biologii se jedinečné vlastnosti polysacharidů začaly postupně řádně studovat. Nově nabyté poznání o jejich nenahraditelnosti jakožto strukturálních složek, zásobáren energie a mediátorů buněčné komunikace v biologických systémech poskytly důležité informace o jejich biomedicínském potenciálu. Mezi širokou škálou polysacharidů se jako obzvláště zajímavým univerzálním materiálem ukázal být alginát díky schopnosti tvořit hydrogely v přítomnosti dvojmocných kationtů. Jedná se o biomedicínsky velice atraktivní polysacharid nejen z důvodu skvělé biokompatibility s biologickým prostředím, ale především díky své jedinečné hemokompatibilitě. Hemokompatibilita je zásadní vlastnosti materiálů, které přichází do styku s krví. Zajišťuje tedy, že po vystavení materiálu organismu nedojde ke srážení krve, imunitní reakci nebo zánětu. Neinvazivní a šetrné interakce alginátu s krví z něj činí ideální materiál pro aplikace, jako jsou obvazy na otevřené rány či injektovatelné hydrogely. Další látkou, která se dostala do popředí výzkumů posledních let, je vodivý polymer polypyrrol. Díky své jedinečné schopnosti podporovat elektrickou stimulaci buněk je velmi cenným materiálem pro využití v tkáňovém inženýrství nebo pro biosenzory. Zároveň není toxický pro živý organismus, což bývá u většiny dalších vodivých polymerů zřídka. Nově nabyté znalosti o jeho protizánětlivých účincích činí polypyrrol o to atraktivnějším materiálem ke zkoumání.

Kompozity alginátu a polypyrrolu představují revoluční materiály pro pokročilé biomedicínské aplikace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYSACHARIDY

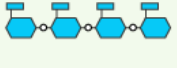
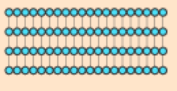
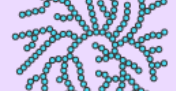
Polysacharidy jsou biomakromolekuly sestávající se obvykle z více než deseti monosacharidových jednotek spojených glykosidovými vazbami. Biomakromolekula, neboli biopolymer, je forma polymeru, který přirozeně vzniká v živém organismu spojením malých organickým molekul, tzv. monomerů, kondenzací za odštěpení vody [1]. Tyto vysokomolekulární látky hrají klíčovou roli ve struktuře a metabolismu živých organismů. Jejich molekulová hmotnost dosahuje často až několika milionů Daltonů (Da). Polysacharidy obvykle zauímají složitou strukturu, a to buď lineární (např. celulóza) nebo rozvětvenou (např. glykogen) [2]. Díky své složité a komplexní struktuře bývají obvykle nerozpustné ve vodě, přičemž některé mohou tvořit koloidní roztoky.

Jejich strukturální variabilita vychází z rozdílů v typu monosacharidů, povaze glykosidických vazeb, míře větvení a přítomnosti funkčních skupin. Tato přirozená variabilita přináší širokou škálu vlastností, které lze přizpůsobit konkrétním účelům, od ukládání energie až po pokročilé terapeutické systémy. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem jsou také vhodné k modifikaci a zlepšení jejich vlastností, jako je rozpustnost, gelace, mechanická pevnost nebo bioaktivita, což je základní princip jejich rozmanitých aplikací v biomedicině a farmaceutickém průmyslu [3].

V přírodě se polysacharidy běžně vyskytují ve formě škrobu, jelikož se jedná o zásobní homopolysacharid rostlin a hub. Jedná se o nejhojnější přírodní biopolymer získaný z mnoha přírodních zdrojů, jako jsou rostliny, zvířata, bakterie, houby, řasy, členovci atd. [4]. V houbách se může dále vyskytovat například strukturní polysacharid ve formě chitinu, který se nachází v buněčných stěnách. Dalším zajímavým příkladem polysacharidu v přírodě je dextran, homopolysacharid produkovaný bakteriemi mléčného kvašení [5]. U živočichů se nachází polysacharidy ve formě glykogenu vyskytujícího se v játrech a svalech či chitinu ve schránkách korýšů a hmyzím exoskeletu [6].

Nejzastoupenějším polysacharidem na Zemi je celulóza (Obr. 1). Lze ji nalézt v buněčných stěnách rostlin, ve kterých poskytuje mechanickou podporu a reguluje vnitřní tlak buňky, nebo jako produkt některých druhů bakterií s jedinečnými vlastnostmi, jako je vysoká čistota a schopnost zadržovat vodu. Celulóza se řadí k nerozvětveným lineárním polysacharidům, jelikož se skládá z monomerních jednotek β -D-glukózy, které jsou spojeny pomocí β -1,4-glykosidové vazby. Jednotlivé glukózové jednotky jsou otočeny o 180° k dalším sousedním monomerům a tvoří periodické disacharidové jednotky zvané celobióza.

Jedinečnost této struktury spočívá ve vodíkových interakcích mezi hydroxylovými skupinami (-OH) v sousedních jednotkách i mezi řetězci. Dochází tedy ke tvorbě intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb, což způsobuje její pevnost, nerozpustnost ve vodě a částečnou krystalinitu její struktury. Zároveň je ale skvěle biologicky odbouratelná (enzymaticky), což z ní činí materiál šetrný k životnímu prostředí.

	Cellulose	Starch		Glycogen
		Amylose	Amylopectin	
Source	Plant	Plant	Plant	Animal
Subunit	β -glucose	α -glucose	α -glucose	α -glucose
Bonds	1-4	1-4	1-4 and 1-6	1-4 and 1-6
Branches	No	No	Yes (~per 20 subunits)	Yes (~per 10 subunits)
Diagram				
Shape				

Obr. 1: Zástupci polysacharidů

zdroj: <https://medicinalherbals.net/wp-content/uploads/2018/05/Polysaccharides.jpg>

Bylo prokázáno, že některé polysacharidy pocházející z rostlin jsou biologicky aktivní jako antivirové, protinádorové, imunostimulační, protizánětlivé, antikoagulační látky a mají pozitivní vliv při léčbě diabetu i vředových chorob [7].

V poslední době se materiály odvozené od biopolymerů dostaly do centra pozornosti díky svému slibnému potenciálu nahradit konvenční materiály pro biomedicínské aplikace, například pro péči o rány [6].

Polysacharidy jako celulóza, chitosan, alginát a kyselina hyaluronová se staly předmětem intenzivního výzkumu díky své biokompatibilitě, nastavitelným vlastnostem a funkční všestrannosti. Celulóza může být například zpracována do obvazů na rány či scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Chitosan, získávaný z chitinových schránek korýšů, se rozsáhle využívá v systému přenosu léčiv a při antimikrobiálních aplikacích. Podobně kyselina hyaluronová, podstatná složka extracelulární matrix, patří k nejpoužívanějším kosmetickým složkám na světě.

1.1 Klasifikace polysacharidů

Polysacharidy se klasifikují podle různých kritérií, jako je složení monosacharidů, strukturální konfigurace, původ a biologické funkce. Tyto klasifikace poskytují rámec pro pochopení rozmanitosti polysacharidů a jejich specifických rolí.

1.1.1 Klasifikace podle složení monosacharidů

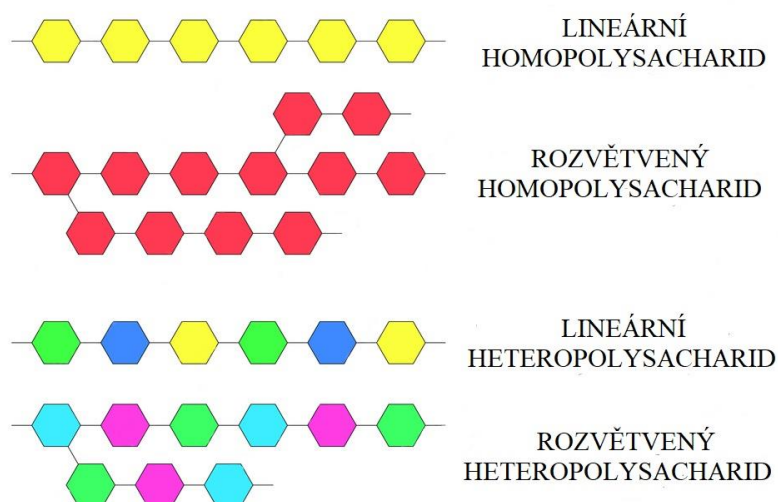
Polysacharidy lze rozdělit do dvou hlavních kategorií:

- Homopolysacharidy: Jsou složeny pouze z jednoho typu monosacharidové jednotky. Příkladem je celulóza, která se skládá z β -D-glukózy spojené β -1,4-glykosidovou vazbou, nebo škrob tvořený dvěma typy polymerů, amylózou a amylopektinenem. Tyto polysacharidy často slouží ke strukturálním nebo energetickým účelům. Celulóza například tvoří primární stavební rámec buněčných stěn rostlin, zatímco škrob slouží jako hlavní zásoba energie [8].
- Heteropolysacharidy: Obsahují dvě a více různých monosacharidů. Příkladem je alginát, složený z kyseliny mannuronové a guluronové, nebo hyaluronová kyselina, která obsahuje střídavé jednotky N-acetylglukosaminu a glukuronové kyseliny. Heteropolysacharidy často plní složitější funkce, například v buněčné signalizaci nebo strukturálním zpevnění [8].

1.1.2 Klasifikace podle strukturální konfigurace

Polysacharidy se mohou členit podle jejich strukturálního uspořádání (Obr. 2), které významně ovlivňuje jejich fyzikální a chemické vlastnosti.

- Lineární polysacharidy: Mají jednoduchou, nerozvětvenou strukturu. Příkladem jsou celulóza a amylóza (součást škrobu). Lineární uspořádání umožňuje rozsáhlé vodíkové vazby, což přispívá k vysoké pevnosti materiálů, jako je celulóza [9, 10].
- Větvené polysacharidy: Mají postranní řetězce připojené k páteři řetězce. Mezi příklady patří amylopektin (další složka škrobu) a glykogen. Větvená struktura zvyšuje rozpustnost a usnadňuje enzymatický rozklad, což činí tyto polysacharidy účinnými zásobníky energie [9].



Obr. 2: Klasifikace polysacharidů podle strukturální konfigurace

zdroj:vlastní

1.1.3 Klasifikace podle funkce

Z funkčního hlediska lze polysacharidy dělit podle jejich primárního účelu:

- Strukturální polysacharidy: Například celulóza, chitin a alginát poskytují mechanickou oporu a ochranu buňkám a organismům.
- Zásobní polysacharidy: Jako škrob a glykogen slouží jako energetické zásoby, které lze mobilizovat podle potřeby [11].
- Bioaktivní polysacharidy: Patří sem kyselina hyaluronová a β -glukany, které aktivně interagují s biologickými systémy a ovlivňují procesy, jako je imunitní odpověď, kontrola zánětů nebo oprava tkání.

1.1.4 Klasifikace podle původu

Polysacharidy lze kategorizovat také na základě jejich zdroje, což často určuje jejich dostupnost, cenu a možnosti využití.

- Polysacharidy rostlinného původu: Například celulóza, škrob a pektin. Tyto polysacharidy nacházejí široké uplatnění v potravinářství, farmacii a průmyslu.
- Polysacharidy živočišného původu: Patří sem například chitin, nacházející se v exoskeletech korýšů a hmyzu, a jeho derivát chitosan. Tyto materiály jsou intenzivně zkoumány pro aplikace v dodávání léčiv a hojení ran.

- Polysacharidy mikrobiálního původu: Příkladem jsou xantanová guma a dextran, produkovány bakteriemi. Tyto polysacharidy jsou ceněny pro své jedinečné reologické vlastnosti a bioaktivitu.
- Polysacharidy z řas: Zahrnují alginát, agar a karagenan, získávané z mořských řas. Jejich schopnost tvořit gely je zvláště důležitá v biomedicině.

1.2 Vlastnosti polysacharidů

Široké spektrum aplikací polysacharidů v biomedicině je z velké části dáno jejich jedinečnými fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi. Tyto atributy, ovlivněné jejich molekulární strukturou a funkčními skupinami, činí polysacharidy vysoce přizpůsobivými pro různé biomedicínské účely.

1.2.1 Biokompatibilita

Polysacharidy jsou obecně biokompatibilní, což je činí vhodnými pro interakci se živými tkáněmi. Jejich hydrofilní povaha a nízká imunogenicita přispívají k biokompatibilitě, což umožňuje jejich použití v nosičích léčiv, lešeních pro tkáňové inženýrství a obvazech na rány [3].

1.2.2 Bioaktivita

Některé polysacharidy vykazují vlastní bioaktivní vlastnosti. Například chitosan má antimikrobiální aktivitu díky své kationtové povaze, kdy interaguje se záporně nabitými membránami mikroorganismů [12].

1.2.3 Biodegradabilita

Polysacharidy jsou přirozeně biodegradabilní, což znamená, že je lze enzymaticky nebo chemicky rozložit na jejich základní monosacharidy. Tato vlastnost je klíčová v biomedicínských aplikacích, protože zajišťuje, že materiály na bázi polysacharidů mohou být přirozeně vstřebány nebo vyloučeny z těla bez toxicity. Rychlost degradace lze upravit modifikací struktury polysacharidů, například zesíťováním [3].

1.2.4 Interakce s biologickými molekulami

Polysacharidy mohou interagovat s proteiny, nukleovými kyselinami a dalšími biologickými makromolekulami prostřednictvím elektrostatických sil, vodíkových vazeb

nebo hydrofobních interakcí. Například polysacharidy na bázi glukózy, jako jsou β -glukany, mohou zvýšit celkovou reakci imunitního systému aktivací makrofágů [13].

1.2.5 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti polysacharidů sahají od tuhosti celulózy po viskoelasticitu alginátu a kyseliny hyaluronové. Tyto vlastnosti jsou důležité pro navrhování vhodných materiálů, které napodobují přirozené prostředí tkání. Například tuhost celulózy ji činí ideální pro vytváření odolných lešení, zatímco viskoelasticita alginátových hydrogelů je vhodná pro replikaci dynamických měkkých tkání.

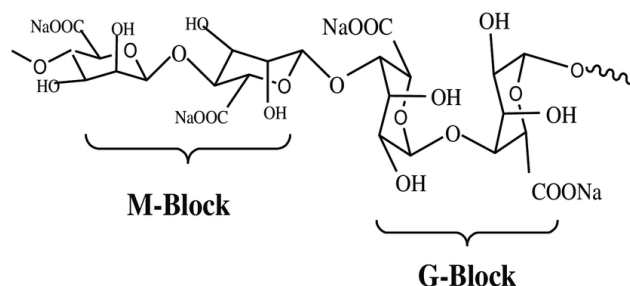
1.2.6 Chemická modifikovatelnost a schopnost gelace

Polysacharidy lze snadno chemicky modifikovat, což umožňuje zavádět nové funkce nebo zlepšovat stávající vlastnosti. Funkcionalizace alginátu karboxylovými nebo aminoskupinami, například zlepšuje jeho bioadhezivní vlastnosti.

Schopnost tvořit hydrogely je jednou z nejvýznamnějších vlastností polysacharidů. Hydrogely, což jsou trojrozměrné sítě polymerních řetězců se schopností navázat značné množství tekutin bez jejich rozpadnutí. Polysacharidy, jako je alginát a agaróza, tvoří hydrogely za specifických podmínek, například v přítomnosti dvojmocných kationtů, jako je například vápenatý kationt (Ca^{2+}).

2 ALGINÁT SODNÝ

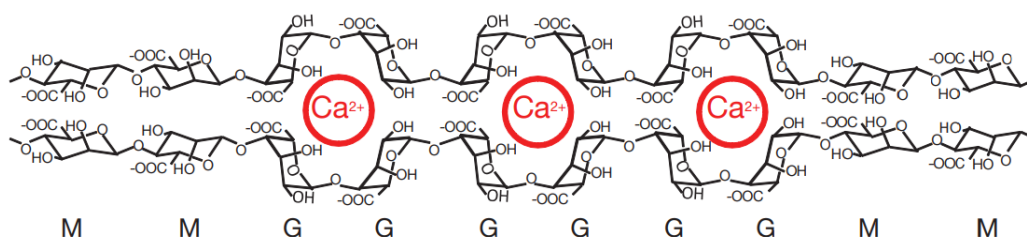
Alginát sodný (AS) je netoxický ve vodě rozpustný přírodní aniontový polysacharid, extrahovaný z hnědých řas či vyprodukovaný při bakteriální biosyntéze [14, 15]. Jedná se o lineární polymerní řetězec sestávající se ze dvou typů náhodně distribuovaných bloků monomerních jednotek, kyseliny β -D-mannuronové (M) a kyseliny α -L-guluronové (G), spojených 1,4-glykosidovými vazbami (Obr. 3). Tvoří tzv. blokový kopolymer [15, 16].



Obr. 3: Molekulární struktura alginátu sodného

zdroj: <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2015.1071685> [17]

Ve vodných roztocích mohou karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$) AS ionizovat za vzniku záporných nábojů ($-\text{COO}^-$), což způsobuje odpuzování mezi molekulami v řetězci, čímž se snižuje viskozita roztoku. Kromě toho mohou karboxylové skupiny AS tvořit také příčné vazby, tzv. crosslinky, s multivalentními kationty [18]. Tvorba stabilní struktury hydrogelů je možná díky přítomnosti G-bloků, které se propojují pomocí vícemocných kationtů (Obr. 4), jako jsou Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , prostřednictvím modelu „vajička“ [15].



Obr. 4: Gelová struktura alginátového zesílení pomocí Ca^{2+}

zdroj: <https://doi.org/10.1038/nature11409> [19]

Díky schopnosti gelovat je alginát hojně využíván při zapouzdřování v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [16].

Vysoký obsah G-bloků zapříčiňuje pevnější a tepelně stabilnější strukturu gelů. Zatímco M-bloky přispívají k pružnější a elastičtější struktuře gelu, protože tvoří slabší

interakce s dvoumocnými kationty. MG-bloky zlepšují přizpůsobivost gelu. Rozložení těchto bloků ovlivňuje také kinetiku gelace. Nejrychleji tuhnou alginátové gely s vyšším obsahem G-bloků, bohužel jejich přítomnost způsobuje křehkost gelu. Pružnější ale pomaleji tuhnoucí jsou alginátové gely s vyšším obsahem M-bloků. M-bloky také lépe interagují s vodou, což zvyšuje viskozitu roztoku [18].

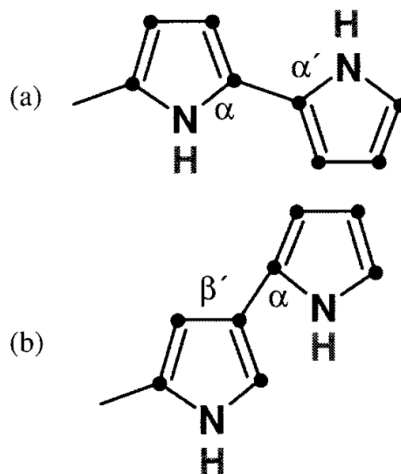
Vlastnosti alginátových kuliček vytvořených ionotropní gelací jsou výrazně ovlivněny molekulovou hmotností (M_w) a poměrem M/G v polymerním řetězci alginátu [15, 16].

Algináty jsou atraktivní v biomedicínských aplikacích díky své nízké toxicitě a dobrému imunogennímu profilu [20].

3 POLYPYRROL

Polypyrrol je polymer tvořený pětičlenným aromatickým heterocyklickým monomermem pyrrolem [21, 22]. Polypyrrol (PPy) je tedy syntetický organický polymer připravený polymerací pyrrolu pomocí oxidační metody. Byl poprvé popsán jako vodivý polymer v roce 1968 Dall'Oliem, který získával pyrrolové černě elektrochemickou oxidací pyrrolu ve vodné kyselině sírové na platinové elektrodě [22, 23].

Polypyrrol je jedním z vodivých polymerů rozsáhle studovaných kvůli svým jednoduchým metodám přípravy, vynikajícím redoxním vlastnostem, schopností vytvářet oxidovanou formu, která poskytuje vynikající vodivost, nerozpustnosti ve vodě, komerční dostupnosti a výborným elektrickým a optickým vlastnostem. Jeho skutečná struktura není zcela jasná, a to především kvůli její velké složitosti. O makromolekulární struktuře PPy je obecně známo, že se skládá z vazeb α - α' , které jsou postupně otočeny o 180° a o kterých se předpokládá, že vytvářejí jednorozměrný polymerní řetězec, i když pravděpodobně existuje řada vazeb α - β' , které vedou ke dvourozměrné polymerní struktuře. Obě tyto vazby jsou schematicky znázorněny na Obr. 5 [22, 23].



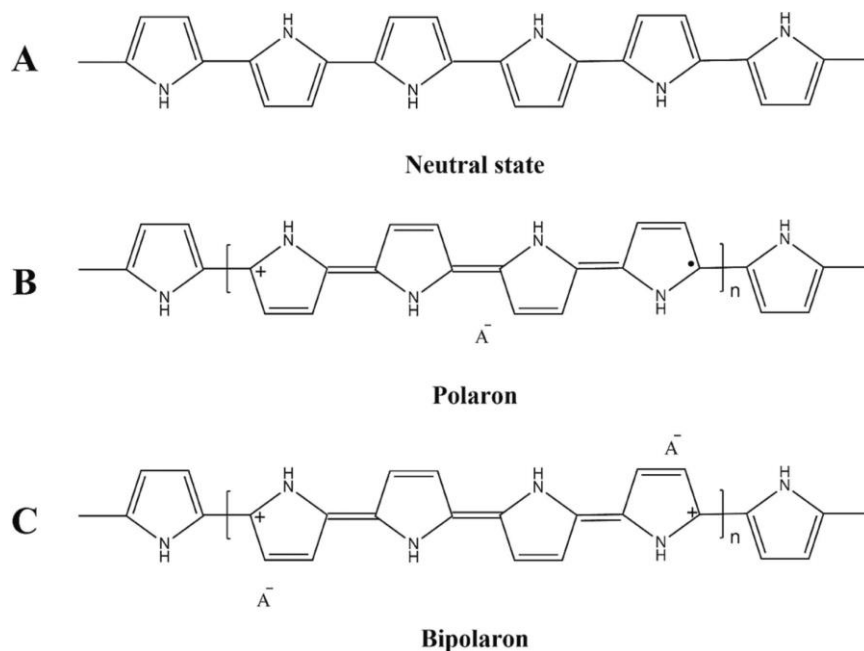
Obr. 5: Schéma dvou typů vazeb polypyrrolového řetězce

zdroj: <https://doi.org/10.1016/B978-012513910-6/50068-2> [22]

3.1.1 Vodivost polypyrrolu

Vodivost PPy je zapříčiněna střídáním jednoduchých a dvojitých vazeb v matici polymeru, které vytváří π -konjugovaný systém. Mobilitu elektronů umožňuje delokalizace π -elektronů skrz polymerní řetězec. V neutrálním stavu je PPy izolantem (Obr. 6A).

Při oxidaci neutrální matrice PPy vznikají polarony (Obr. 6B), radikálové kationty. Po další oxidaci páteře PPy vznikají bipolarony (Obr. 6C), vázané kationty nebo dikationty [24].



Obr. 6: Struktura neutrálního (A) a oxidovaného polypyrrolu – polaronu (B) a bipolaronu (C)

zdroj: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108585> [24]

3.1.2 Biokompatibilita polypyrrolu

Biokompatibilita PPy je vysoká, což zdůrazňuje jeho potenciální biomedicínské využití. Vzhledem k jeho větší chemické stabilitě na vzduchu a ve vodě byl v preklinických studiích široce studován pro implantabilní biomedicínská zařízení [25].

Přestože se jedná o biokompatibilní polymer, po jeho syntéze bývají přítomny nízkomolekulární nečistoty ve formě PPy oligomerů či monomerů, které se mohou projevit cytotoxicky. Proto je nesmírně důležité řádné promytí syntetizovaných struktur pro zachování biokompatibility. Vzhledem k rozdílům v syntéze PPy popsaných v literatuře však není možné extrapolovat stávající znalosti o biokompatibilitě PPy na všechny možné typy buněk, tudíž je zapotřebí provedení dalších studií [24].

4 HYDROGELY

Hydrogely jsou 3D zesíťované struktury mající hydrofilní povahu a tudíž jsou schopny absorpce velkého množství vody, fyziologického roztoku či vodného roztoku, aniž by došlo k jejich rozpuštění [26].

4.1 Mikrogely

Mikrogely jsou malé částice hydrogelů o rozměrech desítek až stovek mikrometrů tvořených trojrozměrnou sítí polymerů, které jsou schopny absorbovat a zadržovat vodu, fyziologický roztok či jiné kapaliny [27]. Tyto typy materiálů nabízejí jedinečné výhody ve srovnání s jinými typy hydrogelů, a to včetně laditelných velikostí od stovek nanometrů po mikrometry, velké povrchové plochy pro biokonjugaci, vysoké citlivosti na změny teploty a pH a nastavitelných mechanických vlastností [28].

4.2 Mikrogely a bázi alginátu

Phùng et al. (2022) sumarizoval různé polysacharidy z různých přírodních zdrojů pro přípravu mikrogelů, přičemž se jako nejvhodnější materiál ukázal alginát sodný (AS). Alginát sodný má ve srovnání s jinými polysacharidy dobré vlastnosti kyslíkové bariéry a také nejlepší profil uvolňování nesené látky v simulované gastrointestinální tekutině [16].

Alginátové mikrokapsule byly po mnoho let používány jako imunitní bariéry pro transplantace buněk, kde alginátový gel chrání transplantát před imunitním systémem hostitele. Mikroenkapsulace tak poskytuje potenciální způsob, jak překonat potřebu imunosupresivních léků. Ačkoli bylo již navrženo a použito různé typy buněk pro imobilizaci v gelu, hlavní zájem byl soustředěn na použití alginátových mikrokapsulí pro enkapsulaci Langerhansových ostrůvků jako potenciální léčbu cukrovky 1. typu [15].

4.2.1 Využití mikrogelů na bázi alginátu

V posledních letech si hydrogelové mikrogely získaly pozornost jako účinné nástroje pro zapouzdření, ochranu a kontrolu uvolňování bioaktivních sloučenin v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Kompozitní alginátové hydrogely nabízejí slibné řešení problémů s rychlým uvolňováním zapouzdřených materiálů [29].

Alginátové mikrogely lze například potenciálně využít pro přenos buněčného obsahu, což lze použít v regenerativní medicíně tak, že budou sloužit jako injekční nosiče na podporu opětovného růstu tkáně [30]. Obecně se použití polymerních mikročástic jako

alternativa nativní extracelulární matrix (ECM) jeví jako slibný pokus o poskytnutí trojrozměrných templátů a syntetické extracelulární matrix pro kultivaci buněk. Nativní ECM dělá mnohem více než jen fyzickou podporu buněk. Představuje také substrát se specifickými ligandy pro buněčnou adhezi a migraci a reguluje buněčnou proliferaci a funkci pomocí různých růstových faktorů. Při výrobě odpovídajících biomateriálů nastává tedy nejen konstrukční výzva při jejím napodobení. Mikrogelové systémy jsou obvykle v průměru menší než 500 μm , a jejich povrchová plocha až 500 cm^2/g . Tento jev může umožnit kultivaci velkého množství buněk v malých objemech. Zvyšující se výskyt onemocnění souvisejících s věkem a současný nedostatek dárcovských orgánů zvýšil zájem o využití této techniky jako terapeutického nástroje. Příkladem může být léčba selhání ledvin, kardiovaskulárních onemocnění, selhání jater (dodáním enkapsulovaných hepatocytů nebo buněk pupečnickové krve) a diabetes mellitus (mikroenkapsulací Langerhansových ostrůvků) [31].

4.3 Kompozity s vodivými polymery

Vodivé polymery spolu s uhlíkovými materiály spadají do kategorie vodivých nekovových materiálů. Jedněmi z nejvíce skloňovaných vodivých polymerů jsou polypyrrol (PPy) a polyanilin, které díky svým aromatickým strukturám, umožňujícím snadnou delokalizaci elektronů a nabývají tak schopnost elektrické vodivosti [32]. Jejich využití v biomedicíně je podmíněno nejen vodivostí, ale také dalšími biologickými vlastnostmi, jako jsou antioxidační a imunomodulační účinky.

Volné radikály jsou přirozeně generovány a vnášeny do biologického systému v důsledku každodenní metabolické aktivity. Tyto radikály poškozují živé tkáně a jejich dlouhodobé působení může vést ke vzniku závažných onemocnění, jako jsou nádorová onemocnění, zánětlivé procesy, infekce, ischemicko-reperfúzní poranění srdeční a mozkové tkáně, neurodegenerativní a kardiovaskulární choroby, či k urychlení stárnutí organismu. Mezi hlavní vnější faktory, které tyto patologické procesy spouštějí, patří vysokofrekvenční záření, xenobiotika a oxidační stres. Prevence řady onemocnění souvisejících s oxidačním poškozením je možná prostřednictvím vnějšího doplňování antioxidantů. V této souvislosti roste zájem o látky s antioxidačním účinkem, a to nejen pro jejich potenciál chránit lidský organismus před škodlivými účinky volných radikálů, ale také pro jejich využití při zpomalování oxidace tuků a dalších složek potravin [33].

Konjugované polymery vykazují výrazné antioxidační vlastnosti. Pro jejich reálné využití v biomedicině je však nezbytné zlepšit jejich biokompatibilitu a snížit případnou toxicitu. Jako perspektivní se jeví syntéza kompozitních materiálů kombinujících biodegradabilní polymery s vodivými polymery, např. s polypyrrolem, čímž lze využít jejich vysoký aplikační potenciál [33].

Kompozitní materiály založené na dialdehydových polysacharidech a PPy vykazují významné imunomodulační vlastnosti. Tyto materiály jsou biokompatibilní, netoxické a schopné modulovat imunitní odpověď, což je klíčové pro aplikace v oblasti hojení ran a tkáňového inženýrství. Tyto kompozity mají vliv na aktivitu neutrofilů a makrofágů, dvou hlavních typů imunitních buněk zapojených do zánětlivých a hojivých procesů. Kompozity s vodivými polymery představují mimořádně atraktivní biomateriály vhodné pro cílenou regeneraci tkání, zejména nervové, svalové a kožní, kde je žádoucí kombinace imunostimulace, antioxidačních vlastností a elektrické vodivosti. [34, 35]

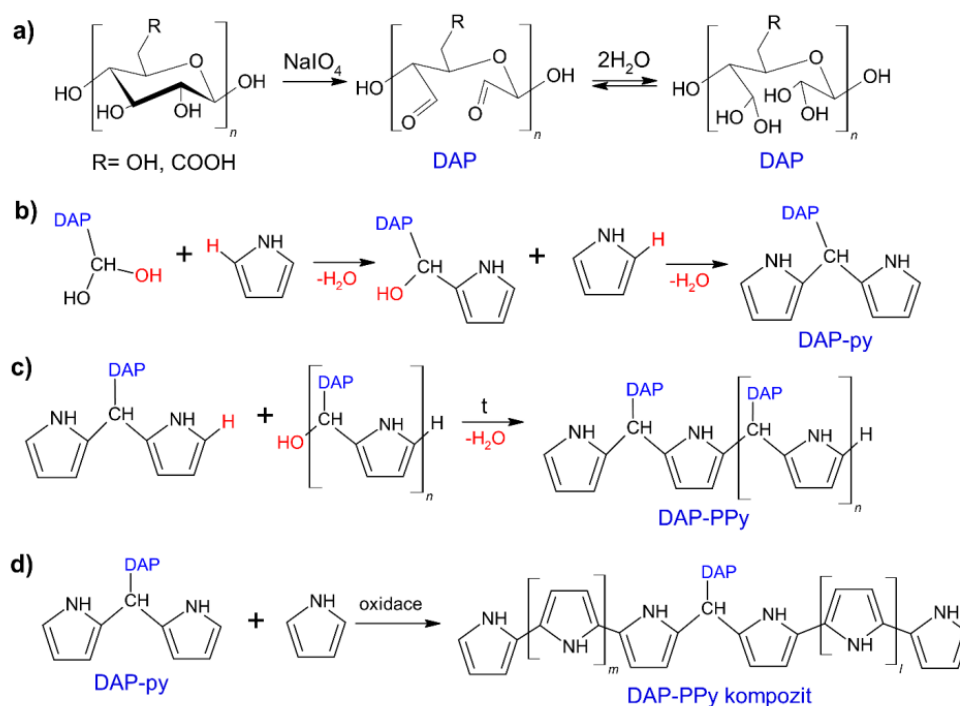
5 METODA PŘÍPRAVY KOMPOZITNÍCH MIKROGELŮ

Polypyrrol lze vyrábět jako prášky, koloidní suspenze nebo filmy, avšak jeho aplikace je limitována špatnou rozpustností a zpracovatelností. Koloidní disperze PPy jsou vhodné kvůli své lepší zpracovatelnosti, úzké distribuci velikostí částic a dobré stabilitě [36]. Koloidní disperze PPy jsou také vhodné k přípravě kompozitních mikrogelů, proto je jejich příprava stručně popsána v následující kapitole.

5.1 Příprava koloidů polypyrrolu

Pro přípravu koloidních disperzí se obecně využívá stabilizátorů. Základním požadavkem na stabilizátor je interakce s PPy a vytvoření stabilizačního obalu, který stericky zabraňuje agregaci ve vzorku. Mezi vhodné stabilizátory se řadí poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP) díky své biokompatibilitě, dále například nanokrystalická celulóza, polyakrylamid, poly(vinylakohol), želatina nebo polysacharidy. Disperzním médiem bývá voda, vzácně se do něj přidávají i alkoholy nebo kyseliny. Pokud se pracuje s vodivými materiály, je striktně vyžadována čistá voda a necytotoxické stabilizátory. Klasická polymerizace pyrrolu vyžaduje k iniciaci oxidaci. Proto je při přípravě koloidních disperzí PPy/PVP zapotřebí přítomnost oxidačního činidla, jako je roztok chloridu železitého FeCl_3 [36]. Tento fakt může být problematický z hlediska biokompatibility, pokud by oxidant zůstal v konečném produktu i po dialýze.

V nedávné době byla na Univerzitě Tomáše Bati vynalezena metoda přípravy PPy koloidů bez oxidativní polymerizace. Tato metoda spočívá ve spontánní aldolové kondenzaci sloužící ke kovalentnímu ukotvení pyrrolu k matici dialdehydových polysacharidů (DAP). Tyto DAP se připravují regioselektivní oxidací za použití jodistanu sodného (NaIO_4). Při reakci se dvě sousední hydroxylové skupiny polysacharidu oxidují na reaktivní karbonylové skupiny při současném rozštěpení vazby uhlík-uhlík. Pyrrol potom spontánně reaguje s karbonylovými skupinami pomocí aldolové kondenzace za vzniku pyrrolem dekorovaných DAP (DAP-Py). Následně dojde po mírném zahřátí ke kopolymeraci DAP-Py na DAP-PPy, kdy se jednotlivé DAP-Py spojí podél makromolekuly polysacharidu. Tento kopolymer má hodně vlastností shodných s PPy, zejména co se týče jeho antioxidačních a imunostimulačních charakteristik. DAP-PPy také může sloužit k přípravě kompozitů s kovalentně vázaným PPy, pokud dojde k oxidaci pyrrolu v přítomnosti DAP-Py (Obr. 7) [37].



Obr. 7: Obecné schéma přípravy DAP-PPy kompozitů

zdroj: Dialdehyde Polysaccharides as Templates for Green Synthesis of Polypyrrole-based Materials without Oxidative Polymerization [37]

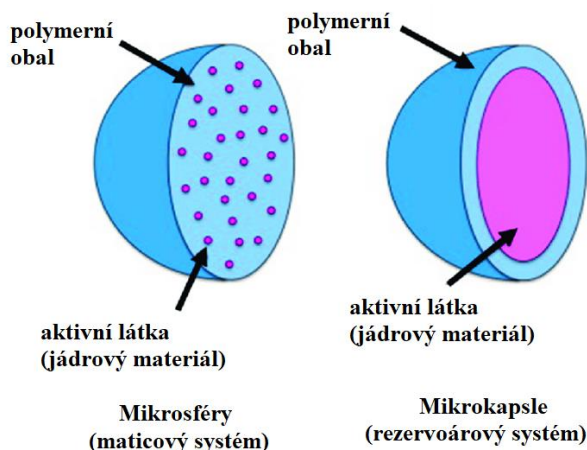
Tyto materiály lze následně využít pro přípravu mikrogelů pomocí enkapsulačních metod.

5.2 Enkapsulace

Enkapsulace je proces stabilizace účinných látek prostřednictvím strukturovaných systémů schopných zachovat jejich chemické, fyzikální a biologické vlastnosti [38]. Tento koncept zapouzdření je inspirován buněčným modelem. Enkapsulace tedy jako ochrana nestabilních či méně odolných materiálů před nepříznivými podmínkami [39].

Technologie enkapsulace si v oblasti polymerní vědy získala značnou pozornost napříč různými obory a mnoha aplikačními oblastmi. V posledních desetiletích pokrok v technologiích založených na enkapsulaci biopolymerů podnítl rozvoj v klíčových oblastech, jako jsou farmacie, potravinářství, kosmetika, zemědělství, elektronika a molekulární diagnostika. Pomocí této technologie byly navrženy a vytvořeny různé nové a inteligentní doručovací matrice a nosiče, které reagují na stále rostoucí požadavky jednotlivých oborů. Proces enkapsulace spočívá v uzavření určité látky (aktivní složky) do nosného materiálu (obalového materiálu). Uzavřená látka se označuje jako jádro, náplň,

aktivní složka, vnitřní fáze nebo náklad. Materiál, který ji obklopuje, bývá nazýván obal, membrána, skořápka, kapsle, nosič, vnější fáze nebo matrice [40]. Obalový materiál může být v pevném stavu, kapalný v kapkách a v bublinkách plynu, které uvnitř zapouzdřují kapalinu nebo plyn jako jádro. Struktura jádra a pláště může mít různé tvary, například koule, mikrokapsle, mikrokuličky, jednojaderné, vícejaderné matrice a vícevrstvý plášť (Obr. 8) [38].



Obr. 8: Schéma struktur mikrosfér a mikrokapslí

zdroj: <https://doi.org/10.3390/app12083837> [41]

Biopolymery se používají jako hlavní složka v různých enkapsulačních systémech díky svým skvělým vlastnostem, mezi které patří vysoká absorpční účinnost, vysoká odolnost v alkalických roztocích, vynikající biokompatibilita a podobnost s živými tkáněmi. Enkapsulační systémy přitahují velkou pozornost kvůli své jednoduchému způsobu produkce, homogenitě, laditelné velikosti, schopnosti enkapsulace léčiv či bioaktivních látek, minimální toxicitě a dobré stabilitě [42]. V této práci byl pro enkapsulace využit Enkapsulátor B-390, viz následující kapitola.

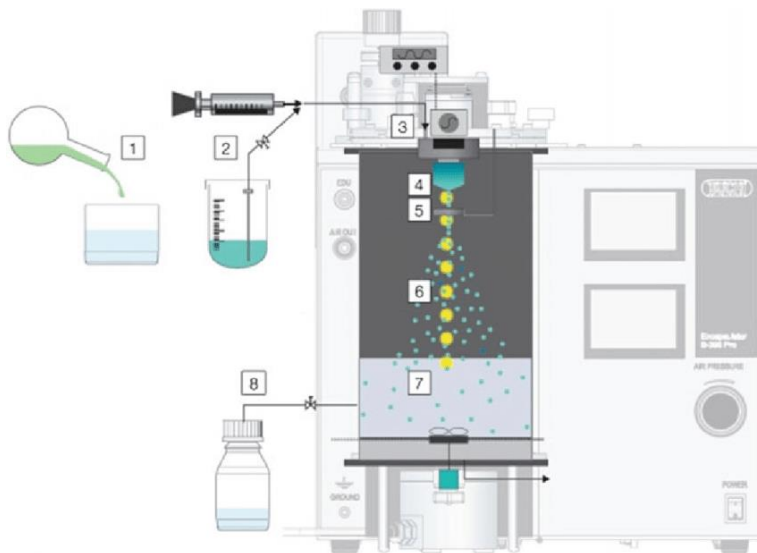
5.2.1 Enkapsulace pomocí Enkapsulátoru B-390

Celý mechanismus enkapsulace pomocí Enkapsulátoru B-390 popisuje Obr. 9. Jako první je roztok je vytlačován pumpou směrem k vibrační trysce. Na špičce trysky se vytváří kapka vlivem vyrovnávání povrchového napětí, gravitace a vytlačovací síly. Jakmile síly gravitace a vytlačování překonají sílu povrchovou, kapka je odtržena a při pádu prochází elektrodou, která ji dodá povrchový náboj. V dalším průběhu pádu jsou pomocí elektrostatických sil odtržené kapky dekomponovány na kapky menších rozměrů, které jsou následně rozptýleny, protože mají stejný náboj, a padají do vytvrzovacího roztoku, tzv.

polymerizační lázně, obsahující v případě alginátu dvoumocné kationty, např. roztok CaCl_2 . Právě tyto kationty difundují do kapky a iniciují iontové zesítnění mezi alginovými karboxyly. Podle koncentrace vápenatých iontů mohou být tyto vazby trvalé nebo dočasné. V této diplomové práci byla na základě literatury zvolena taková koncentrace roztoku CaCl_2 , aby se hydrogelové kuličky alginátu vápenatého, případně jeho kompozit s PPy, tvořily v roztoku trvale, tzn. byly stabilní [43].

Přesné rozměry a rychlost tvorby mikrokuliček jsou řízeny úpravou průměru trysky, rychlosti proudění, frekvence vibrací a fyzikálními vlastnostmi enkapsulované směsi. Pro generování mikrokuliček jsou k dispozici vibrační trysky o různých průměrech a sada koncentrických trysek slouží pro generování kuliček s jádrem (viz. předchozí kapitola). Obecně platí, že se velikost kuliček zmenšuje, pokud:

- 1) se zvyšuje elektrostatický potenciál;
- 2) se zvyšuje koncentrace dvoumocných iontů;
- 3) se snižuje koncentrace a viskozita alginátu;
- 4) se zvyšuje rychlost proudění kapaliny pumpou.



Obr. 9: Mechanismus enkapsulace pomocí Enkapsulátoru B-390

zdroj: https://doi.org/10.1007/978-981-10-6035-9_2 [44]

Velikost mikrokuliček a její distribuce závisí na rychlosti kapaliny a vibrační frekvenci:

$$f = \frac{v}{\lambda} \text{ [Hz]} \quad (1)$$

Kde f je označení frekvence vibrací působících na trysku, v je rychlost kapalného proudu, λ značí vlnovou délku pertubace. Rovnováhu mezi povrchovým napětím a setrvačností určuje optimální vlnová délka:

$$\lambda_{opt.} = \pi\sqrt{2}D \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma D}}} [m] \quad (2)$$

Kde $\lambda_{opt.}$ značí optimální vlnovou délku, D je průměr trysky, η je označení pro dynamickou viskozitu, ρ je hustota a σ označuje povrchové napětí kapaliny.

Průměr mikrokuliček lze určit pomocí následující rovnice č. 3:

$$d = \sqrt[3]{\frac{6V}{\pi f}} [m] \quad (3)$$

Kde d je průměr kapky, V značí objem kapky a f frekvenci vibrací.

Průtoková rychlost je přímo úměrná rychlosti kapaliny a průměru trysky a vypočítá se pomocí rovnice č. 4:

$$V' = \frac{\pi v D^2}{4} [m^3/s] \quad (4)$$

Kde V' označuje objemový průtok kapaliny, v je rychlost kapaliny a D je průměr trysky.

6 METODY CHARAKTERIZACE MIKROGELŮ

Nejen chemické, ale i fyzikální a mechanické vlastnosti mikrogelů se odvíjí od jejich struktury a obsahu látek v kompozitním materiálu [45].

Mikrogely, jejichž struktura je tvořena zesíťovanými polymerními řetězci hydrofilního či amfifilního charakteru. Mikrogely mají, taktéž jako samotné hydrogely, jedinečnou schopnost botnání. V důsledku toho mohou být mikrogely měkké a deformovatelné. Studium jejich morfologie spočívá ve využití mikroskopické analýzy, díky níž jsme schopni charakterizovat nejen povrch, ale i objem mikrogelů. Společně s využitím spektroskopických metod získáváme dostatečný přehled nejen o morfologických vlastnostech, ale i o konkrétním chemickém složení. Charakterizace mikrogelů se zaměřuje taktéž na analýzu velikosti koloidních částic a jejich distribuci materiálu.

6.1 Mikroskopická analýza

Mikroskopické metody slouží k přímému sledování topografie, morfologie či rozměrů měřených vzorků na úrovni jak mikroskopické, tak i nanometrické. Vizuální obraz je často zobrazen ve 2D nebo 3D.

Mezi tyto metody se řadí optická mikroskopie (OM), která využívá k pozorování světelné záření. Optický mikroskop, známý také jako světelný mikroskop, je zařízení využívající ke zvětšení obrazu vzorku viditelné světlo a soustavu čoček. Vzorek bývá umístěn na motorizovaném stolku a osvětlován rozptýleným světelným zdrojem. Obraz je následně zprostředkován přes kondenzorové čočky do zobrazovacího systému, kterým může být lidské oko, fotografický film nebo elektronické zařízení s nábojově vázaným snímáním (např. CCD čip). Při velkých zvětšeních a použití procházejícího světla se jednotlivé body vzorku zobrazují jako rozostřené disky obklopené difrakčními prstenci, známými jako Airyho disky. Rozlišovací schopnost mikroskopu se pak definuje jako schopnost odlišit dva těsně sousedící Airyho disky. Podle Abbeho kritéria je mezní rozlišení určeno vztahem:

$$d = \frac{0,612 \cdot \lambda}{NA}, \quad (5)$$

kde d je rozlišovací mez, λ značí vlnovou délku použitého světla a NA je číselná apertura objektivu. Při běžně používané referenční vlnové délce 550 nm, odpovídající vlnové délce zeleného světla, tedy činí teoretická hranice rozlišení optického mikroskopu přibližně 200 nm. Ve srovnání s jinými typy mikroskopie pro povrchové zobrazování, jako jsou SEM a TEM, je optická mikroskopie omezena difrakčním limitem viditelného světla na zvětšení

1 000x a rozlišením 200 nm [46]. Pro dosažení vyššího rozlišení k analýze povrchů se využívají metody jako je skenovací elektronová mikroskopie (SEM), nebo vnitřní struktury, transmisní elektronová mikroskopie (TEM).

Technika rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) se široce využívá pro vizualizaci a charakterizaci povrchů. Povrch vzorku je snímán hustým elektronovým svazkem, přičemž přijatý signál je převeden do stupňů šedi a zobrazen na monitoru. Jelikož má elektronový svazek mnohem kratší vlnovou délku než viditelné světlo, nabízí elektronový mikroskop výrazně vyšší rozlišení než mikroskop optický. Zatímco optický mikroskop dosahuje maximálního zvětšení přibližně 1 500x, rastrovací elektronový mikroskop může zvětšovat více než 10 000x. Vakuový systém uvnitř přístroje zajišťuje, aby nedocházelo k interakci elektronů s vnější atmosférou a zároveň chrání vzorek před kontaminací [47].

Z důvodu využití urychleného elektronového paprsku musí být analyzovaný vzorek dostatečně elektricky vodivý, nebo je zapotřebí nevodivý vzorek před analýzou upravit. U nevodivých materiálů je nutné jejich povrch pokrýt vodivým filmem, například kovovou nebo uhlíkovou vrstvou, která zajistí potřebný odvod elektronů. Nejčastěji používanými materiály pro naprašování jsou zlato, palladium nebo grafit [47].

Při zobrazování vzorků pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) dochází k interakci elektronového svazku s povrchem materiálu, přičemž elektrony pronikají do hloubky přibližně 1 μm a generují detekovatelný signál. Vznik obrazu je výsledkem sběru jak sekundárních elektronů uvolněných z atomových obalů, tak elektronů zpětně odražených. Nastavením kladného nebo záporného napětí na detekčním stínítku lze selektivně ovlivnit typ zachycených elektronů. Samotný obraz je poté konstruován bod po bodu na základě přesného řízení směru svazku pomocí elektromagnetických cívek, které jej vedou po povrchu vzorku ve formě rastru [48].

6.2 DLS

Analýza pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) je metoda pro měření průměrné velikosti částic a distribuci těchto velikostí v roztoku, suspenzi nebo koloidu. Lze ji využít zejména pro charakterizaci PPy koloidů. Jejími výhodami je její relativní rychlost měření, neinvazivnost a ve srovnání s například s elektronovou mikroskopií vyžaduje minimální přípravu vzorku. Všechny typy spektrofotometrů DLS využívají ke svému měření laser jako zdroj koherentního světla. Koherentní světlo je tvořeno synchronizovanými vlnami. Všechny světelné vlny mají stejnou vlnovou délku i stejnou frekvenci vlnění a jejich extrémy

se překrývají, tzn. jsou ve fázi. Fáze vln se sčítá na základě jejich překrývání, například může dojít ke konstruktivní (zesílení) či destruktivní (vyrušení) interferenci. Ovšem rozptýlené částice se v roztoku neustále náhodně pohybují díky Brownovu tepelnému pohybu, což vede k vytvoření Dopplerova jevu, který ovlivňuje chování vln laserového paprsku po interakci s analyzovanými částicemi. Proto se i rozptyl světla neustále mění (je dynamický) a není stálý (statický). V krátkém časovém úseku si budou naměřené údaje podobné a korelují spolu a k jejich významnému odlišení dochází až po delším časovém úseku a korelace zaniká. V důsledku toho kolísá výsledné elektrické pole detekované přístrojem. Analýzou tohoto kolísání lze vypočítat velikost kulových částic pomocí DLS, která využívá matematický model založený na Stokes-Einsteinově rovnici (6):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (6)$$

kde D značí difúzní koeficient (určený z korelačních dat), k_B je Boltzmannova konstanta, T znamená absolutní teplotu, η je viskozita kapaliny a r označuje hydrodynamický poloměr (velikost částic) [49].

Menší částice se pohybují rychleji a způsobují větší kolísání (rychlejší pokles korelace). Kdežto větší částice mají za následek nižší kolísání, protože se pohybují pomaleji.

6.3 Spektroskopické metody

Spektroskopické metody poskytují nepřímé informace o chemickém složení, elektronové nebo krystalické struktuře či vazbách v řetězcích analyzovaného vzorku. Pracují na principu interakce vzorku s elektromagnetickým zářením, jako je světlo, rentgenové nebo infračervené záření apod. Tato interakce je reprezentována naměřenými daty ve formě spekter, které jsou sekundárně analyzovány k určení potřebných informací.

Ultrafialová viditelná (UV–vis) spektrofotometrie je především kvantitativní analytická technika, která se zabývá absorpcí blízkého ultrafialového záření (180–390 nm) nebo viditelného záření (390–780 nm) chemickými látkami rozpuštěnými v roztoku. Tyto oblasti elektromagnetického spektra (viz tabulka 1) poskytují energii, která způsobuje elektronové přechody. Různé barvy viditelného světla a doplňkové barvy roztoků absorbujících při konkrétních vlnových délkách jsou uvedeny v tabulce. Protože dochází k překrývání vibračních a rotačních přechodů vykazuje UV–vis spektrum analytů v roztoku jen málo jemných struktur. Z tohoto důvodu se tato technika běžně nepoužívá k identifikaci

konkrétních organických či anorganických látek, ale patří mezi nejčastěji používané metody kvantitativní analýzy. Množství absorbovaného záření lze přímo vztáhnout ke koncentraci analytu v roztoku (pomocí tzv. Beerova zákona) při kontrolovaných experimentálních podmínkách [50].

7 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

Biologické testování je klíčové pro hodnocení bezpečnosti a biologické kompatibility nově připravených materiálů.

7.1 Buněčné kultury využívané při biologických testech

Buněčnou kulturou se rozumí proces odebrání buněk ze zvířete nebo rostliny a jejich následný růst ve vhodném umělém prostředí. Zásadou zavedení nových technologií se buněčné kultury staly dostupnějšími, což umožňuje jejich velkovýrobu, čímž se zvyšuje účinnost [51].

Kultivace živočišných buněk se stala běžnou laboratorní technikou v polovině 20. století, ovšem první koncept udržování živých buněčných linií oddělených od jejich původního tkáňového zdroje pochází již z 19. století. V současné době je kultura živočišných buněk jedním z hlavních nástrojů v biologických vědách, zejména v oblastech výzkumu, které mají potenciál pro ekonomickou hodnotu a komerční využití. Vývoj základních kultivačních médií umožnil vědcům pracovat s různými typy buněk za kontrolovaných podmínek, což zásadně přispělo k pochopení buněčného růstu, diferenciaci a identifikaci růstových faktorů a pochopení mechanismů, které jsou základem normálních funkcí různých typů buněk. Moderní technologie dále umožnily výzkum v oblasti bioreaktorů a kultivace s vysokou hustotou buněk [52].

Kultura živočišných buněk má široké uplatnění, od základního výzkumu až po pokročilé aplikace. Poskytuje modelový systém pro různé oblasti vědy a technologie, včetně: [52]

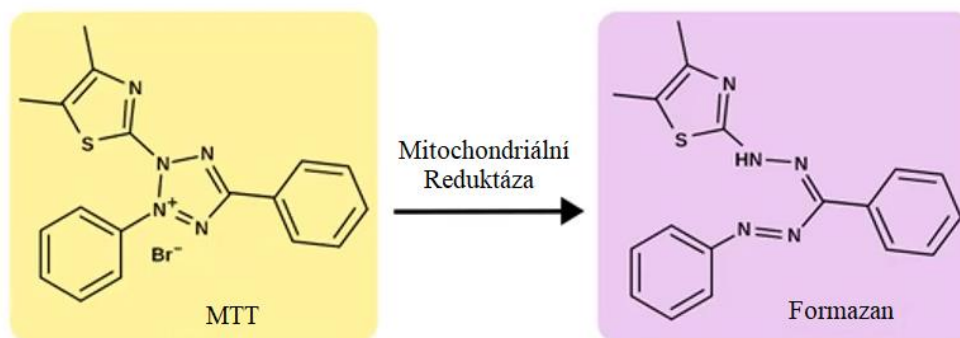
1. Studium základní buněčné biologie, mechanismů buněčného cyklu, specializovaných buněčných funkcí, interakcí mezi buňkami a matricí.
2. Testování toxicity za účelem hodnocení účinků nových léčiv.
3. Genová terapie zaměřené na nahrazení nefunkčních genů funkčními buňkami nesoucími geny.
4. Charakterizace nádorových buněk, role různých chemických látek, virů a záření v nádorových buňkách.
5. Výroba vakcín, monoklonálních protilátek a farmaceutických léčiv.

6. Kultivace virů pro použití při výrobě vakcín, jako jsou plané neštovice, dětská obrna, vzteklna, hepatitida B a spalničky.

Kultura savčích buněk je dnes nezbytným předpokladem pro výrobu biologických léčiv, jako jsou hormony, protilátky, interferony, srážecí faktory a vakcíny [52].

7.2 Test viability buněk (MTT)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-difenylterazoliumbromid) test je citlivý a spolehlivý ukazatel buněčné metabolické aktivity a je preferován před jinými metodami měření tento parametr, jako jsou ATP test nebo test inkorporace ^3H -thymidinu, který navíc zahrnuje použití radioaktivity. Tato metoda je založena na redukci MTT, žlutého ve vodě rozpustného tetrazoliového barviva, které je primárně redukováno mitochondriálními dehydrogenázami na purpurové formazanové krystaly (Obr. 10). Výsledný formazan se analyzuje spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm po rozpuštění v DMSO (dimethylsulfoxid) [53, 54].



Obr. 10: Buněčná aktivita – přeměna MTT na formazan

zdroj: vlastní

Množství produkovaného formazanu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk přítomných ve vzorku. Úroveň aktivity je měřítkem životaschopnosti buněk.[55] Porovnání spekter buněk nevystavených a vystavených mikrogely poskytuje odhad míry cytotoxicity [53].

Mikrogely byly podrobeny MTT testu dle směrnice ČSN EN ISO 10993, která zahrnuje zkoušku přímého kontaktu. Daná směrnice vymezuje pojem inhibiční koncentrace IC₅₀, jako koncentraci látky, při níž dochází k 50 % zabránění růstu či úmrtí organismů. Výsledky

inhibiční koncentrace jsou taktéž vyhodnocovány dle zmíněné směrnice ČSN EN ISO 10993 [56].

7.3 Test stanovení aktivity makrofágů (NO production assay)

Oxid dusnatý (NO) je volný radikál produkovaný z L-argininu působením enzymů NO-syntázy (NOS). NO, prozánětlivý mediátor hraje důležitou roli v regulaci imunitních funkcí, neurotransmisi a vazodilataci. Za abnormálních fyziologických podmínek však může dojít k nadprodukci NO, což vede k různým zánětlivým či neurodegenerativním chorobám. Proto je inhibice produkce této molekuly zásadní v prevenci nebo léčby zánětlivých onemocnění [57]. Regulační schopnost této molekuly na imunitní systém spočívá ve změně činnosti makrofágů, kteří mohou reagovat na různé podněty včetně zánětu a infekce. Oxid dusnatý ovlivňuje nejen fagocytózu, ale i produkci prozánětlivých molekul a cytokinů, což je zásadní v regulaci zánětlivých procesů. Buňky makrofágů dokážou likvidovat intracelulární i extracelulární bakterie, proto se řadí k buňkám imunitní soustavy.

Test stanovení aktivity makrofágů (NO production assay) je laboratorní metoda používaná k určení míry tvorby NO činností makrofágů. Jak už bylo zmíněno, NO je vysoce reaktivní molekula s krátkou životností, a proto není měřena přímo, nýbrž nepřímo kvantifikací stabilních produktů jejích reakcí. K těmto stabilním produktům řadíme dusitany (NO_2^-) a dusičnany (NO_3^-). Vzniklé dusičnany bývají nejprve převedeny na dusitany buď enzymaticky pomocí nitrátreduktázy, nebo chemickou redukcí s použitím kadmia nebo vanadových činidel. Poté jsou tyto dusitany detekovány Griessovou reakcí.

Při Griessově reakci dochází ke vzniku červenofialového azobarviva vzniklého reakcí dusitanů s dvěma činidly. V prvním kroku reakce reaguje se sulfanilamidem v kyselém prostředí za vzniku diazonové soli. Následná reakce diazonové soli s druhým činidlem N-(1-naftyl)-ethylendiaminem (NED) vede ke vzniku růžově zbarvené azosloučeniny. Vzniklé azobarvivo absorbuje záření při 550 nm a jeho koncentrace je měřena pomocí spektrofotometrie [58].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE KOMPOZITNÍCH ALGINÁTOVÝCH MIKROGELŮ

8.1 Použité materiály

Pro testy cytotoxicity byly použity myší makrofágy buněčné linie RAW 264.7. Pro kultivaci těchto buněk bylo použito médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), přičemž bylo do média přidáno 100 Uml^{-1} Penicillin/Streptomycin (Biosera, France). Při analýze testů bylo použito médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium s vysokým obsahem glukózy ($4,5 \text{ g. l}^{-1}$) bez fenolové červeně (Capricorn Scientific, Rakousko). Do bezbarvého média bylo přidáno Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich, USA), Gibco Sodium Pyruvate 100 mM (Thermo Fisher Scientific, USA), L-glutamine a taktéž 100 Uml^{-1} Penicillin/Streptomycin (Biosera, France). Dále byl použit fyziologický roztok (PBS, Invitrogen, USA) určený k promývání buněk. Plastik Techno (TPP, Švýcarsko) byl využit při kultivaci buněčných kultur. Ke stanovení cytotoxicity byl použit MTT (thiazolyl blue) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko). Pro stanovení produkce NO bylo aplikováno Griess reagent (Sigma-Aldrich, USA). V experimentální části byl využit taktéž ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, USA) pro stanovení imunoenzymatických vlastností mikrokuliček a Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Biosera, France) s Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) jako promývací pufr.

8.1.1 Chemikálie

Alginát sodný LF 200S; dialdehyd alginátu připravený podle literatury [34]; pyrrol 99% extra pure (Thermo Fisher Scientific, USA); dihydrát chloridu vápenatého (Sigma-Aldrich, USA); připravené vzorky alginátových enkapsulovaných mikrokuliček s inkorporovaným pyrrolem o různých koncentracích.

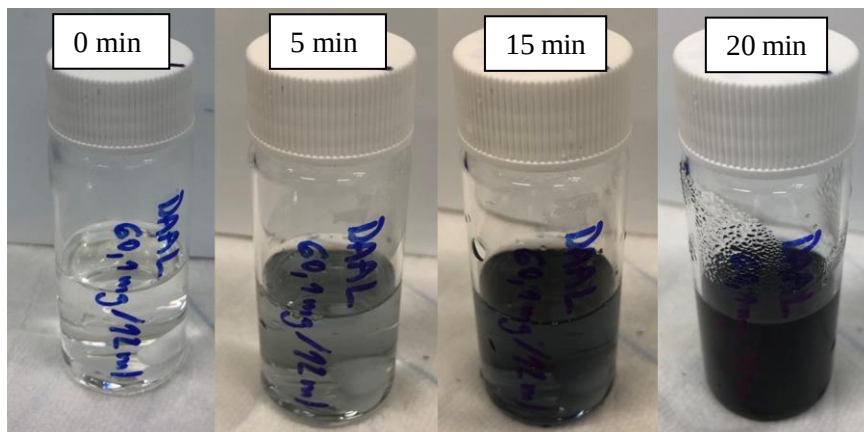
8.2 Příprava roztoku polypyrrolu

Dialdehyd alginátu (DAAL) byl rozpouštěn na míchačce o koncentraci 5 mg/ml v ultračisté vodě (UPW) v objemu 12 ml po dobu 24 h . Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 3. K připravenému roztoku DAAL byl napipetován takový objem extra čistého pyrrolu, aby molární koncentrace pyrrolu činila $0,5 \text{ M}$. Následně se dal tento roztok DAAL_PPy zahřívát ve vodní lázni (viz. Obr. 11) na $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 h . Změna zbarvení roztoku v průběhu času je zaznamenána na Obr. 12. Vzniklý koloid polypyrrolu byl

dialyzován celkem 72 h pomocí membrán s molecular weight cut-off (MWCO) 50 kDa, přičemž prvních 48 h dialýza probíhala v dialyzačním roztoku 0,05 M NaCl a zbylých 24 h v demineralizované vodě (DEMI vodě). Přesné množství polypyrrolu v koloidu bylo stanoveno gravimetrií na $(2,28 \pm 0,13)$ mg/ml. Po provedení gravimetrie byl roztok zkoncentrován pomocí přístroje Centrifuge 5702 R (Eppendorf, Německo) za 4,4 RPM po dobu 5 min s využitím filtru Ultra Centrifugal 100 kDa MWCO (Amicon, Česká republika). Finální koncentrace činila 26,18 mg/ml. Doplnění na přesný objem v přípravě kompozitních alginátových mikrogelů proběhlo dle následující kapitoly 8.3.



Obr. 11: Sestavená aparatura vodní lázně



Obr. 12: Změna zbarvení při reakci vzniku roztoku DAAL_PPy v průběhu času (0; 5; 15; 20 min)

8.3 Příprava a charakterizace kompozitních alginátových mikrogelů

Nejprve byl připraven čistý roztok alginátu sodného LF 200S (AL LF 200S), který byl následně filtrován přes polyethersulfonový (PES) filtr 0,45 μm , viz Tab. 1. Dle výsledků gravimetrie a zkoncentrování roztoku DAAL_PPy bylo vypočítáno potřebné množství koloidu nutné ke smíchání s roztokem AL LF 200S o koncentraci 14,9 mg/ml. Připravené roztoky byly smíchány do objemu 10 ml v daných poměrech k získání 10 mg/ml AL_LF_200S a 5, 10, 15, 20 hm. % DAAL_PPy (vztahené k množství alginátu). Aby byla zachována celková finální koncentrace AL LF 200S, bylo dané množství přidávaného koloidu vždy doplněno UPW na objem 10 ml, viz Tab. 2. Tato směs byla míchána na míchačce minimálně po dobu 2 h před závěrečnou enkapsulací.

Tab. 1: Koncentrace AL LF200S a molární zlomek DAAL_PPy v připravených vzorcích

Značení vzorků	Koncentrace roztoku AL	Hmotnostní zlomek	Finální koncentrace
	c_{AL} [mg/ml]	$w_{\text{DAAL_PPy}}$ [hm. %]	c_{AL} [mg/ml]
AL_LF200S	14,9	0	10
Al_DAAL_PPy_5	14,9	5	10
AL_DAAL_PPy_10	14,9	10	10
AL_DAAL_PPy_15	14,9	15	10
AL_DAAL_PPy_20	14,9	20	10

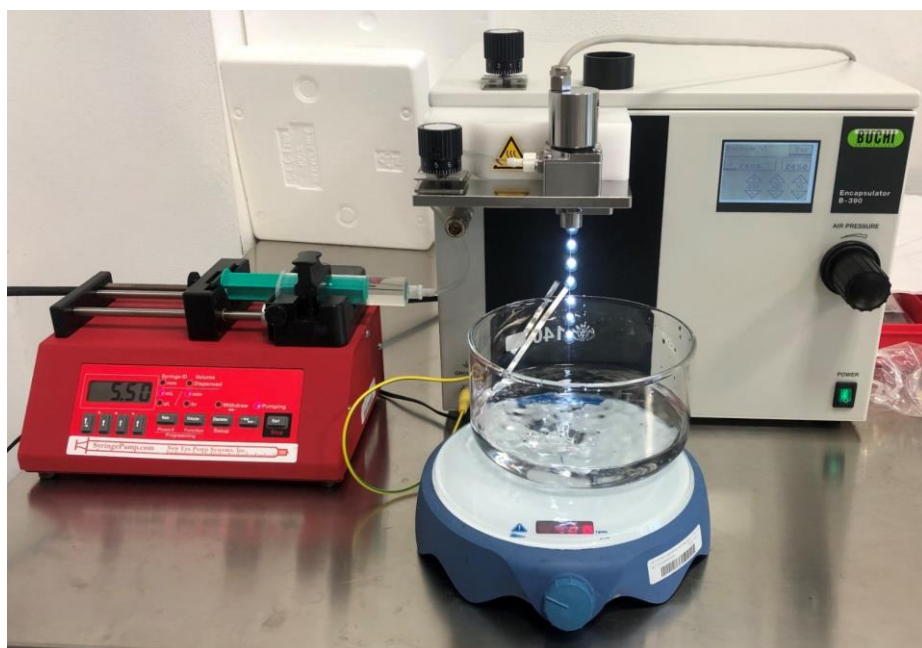
Tab. 2: Objemy roztoku AL LF200S a DAAL-PPy potřebné k přípravě vzorků

Značení vzorků	V_{AL} [μl]	$V_{\text{DAAL_PPy}}$ [μl]	V_{UPW} [μl]
AL_LF200S	8700	0	1300
Al_DAAL_PPy_5	8700	191	1109
AL_DAAL_PPy_10	8700	382	918
AL_DAAL_PPy_15	8700	764	536
AL_DAAL_PPy_20	8700	573	727

K enkapsulaci alginátových hydrogelů byl použit přístroj Encapsulator B-390 (Büchi AG, Švýcarsko) (viz. Obr. 13). Parametry enkapsulace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3). Mikrogely byly následně opakovaně promývány demineralizovanou vodou a ethanolem.

Tab. 3: Parametry enkapsulace

Průměr trysky	200 [μm]
Amplituda	3 [-]
Frekvence	1200 [Hz]
Napětí na elektrodě	2500 [V]
Průtok	5,5 [ml/min]
Míchačka	350 [RPM]



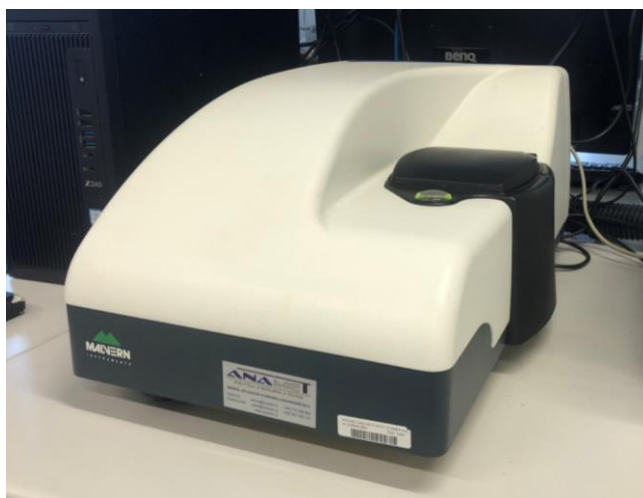
Obr. 13: Přístroj Encapsulator B-390, pumpa a polymerizační lázeň CaCl_2

Koloidní roztok DAAL_PPy a vzorky mikrogelů byly charakterizovány pomocí následujících metod a přístrojů zmíněných v kapitole 8.4.

8.4 Přístroje a metody

8.4.1 Analýza dynamického rozptylu světla alginátových roztoků s inkorporovaným PPy

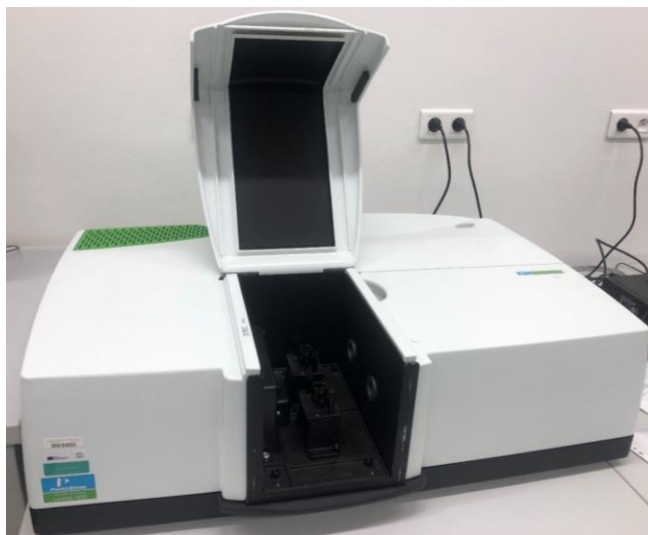
Metoda analýzy dynamického rozptylu světla (DLS) využívající interakce laserového paprsku s částicemi v pohybu nacházejícími se v roztoku, suspenzi nebo koloidu je vhodná k analýze velikosti částic DAAL_PPy koloidů. Pro analýzu byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK) (viz. Obr. 14).



Obr. 14: Přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK)

8.4.2 UV-Vis spektrofotometrie

Měření UV-Vis spektrofotometrie bylo zaznamenáváno pomocí UV-Vis spektrometru PerkinElmer LAMBDA 1050 (Shelton, USA) (Obr. 15) a křemenné kyvetě s délkou dráhy 10 mm při vlnové délce v rozsahu 200–800 nm a bylo vztaženo k deionizované UPW.



Obr. 15: UV-Vis spektrometr PerkinElmer LAMBDA 1050 (Shelton, USA)

8.4.3 SEM analýza

Lyofilizované mikrokuličky byly analyzovány pomocí rastrové elektronové mikroskopie (SEM) za použití mikroskopu Nova NanoSEM 450 (FEI, Česká republika) za 5 kV urychlovacího napětí. I přes jejich vodivý charakter bylo zapotřebí mikrokuličky před analýzou poprášit kovovým práškem zlato-palladium.

8.4.4 Optická mikroskopie

Velikosti enkapsulovaných mikrokuliček byly analyzovány optickou mikroskopií pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX-81 (Tokio, Japonsko) (Obr. 16) při zvětšení 40X.



Obr. 16: Mikroskop Olympus IX-81 (Tokio, Japonsko)

8.5 Biologické testy

8.5.1 Buněčná linie

Při testování biologických vlastností mikrogelů *in vitro* byly využity buněčné linie myších makrofágů RAW 264.7. Výsledky vlivu vzorků mikrokuliček na viabilitu buněk a produkci NO a IL-6 byly získány po 24 h po aktivaci 25 ng/ml LPS. Buňky byly vystaveny přítomnosti čtyř koncentracím vzorků AL_DAAL_PPy (5; 10; 15 a 20 hm. %) a vzorku AL_LF_200S ve třech dávkách, konkrétně 100, 50 a 5 mg mikrokuliček v 1 ml bezbarvého média DMEM. Názvy vzorků byly sestaveny ve formátu typ_koncentrace_dávka, např.

AL_DAAL_PPy_5_100 představuje vzorek AL_DAAL_PPy o koncentraci 5 hm. % a dávce 100 mg/ml.

Buňky makrofágů byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM s vysokým obsahem glukózy bez fenolové červeně s přidavkem roztoků 10 % FBS, 1 % pyruvátu sodného, 1 % L-glutaminu a 1 % roztokem Penicillin/Streptomycin na kultivačních nádobách T-75 (TPP, Švýcarsko). Jejich kultivace probíhala za stálých podmínek při 37 °C s řízenou atmosférou o obsahu 5 % CO₂ a relativní vlhkostí 90 %.

Při vyhodnocování viability buněk, produkce NO a IL-6 byla zavedena negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrolu představovaly buňky makrofágů bez stimulace. Sloužila k určení bazální míry viability a hladiny produkce NO a IL-6, která se běžně vyskytuje bez zánětlivého podnětu a vystavení přítomnosti vzorků. Jako pozitivní kontrola sloužila skupina makrofágů, která byla stimulována lipopolysacharidem (LPS) v koncentraci 25 ng/ml. Lipopolysacharid je endotoxin bakteriálního původu a je taktéž silný aktivátor zánětlivé odpovědi na jeho přítomnost. Pozitivní kontrola sloužila jako referenční hodnota maximální očekávané aktivaci buněk. Výsledky byly normalizovány vůči této referenci.

8.5.2 Testování cytotoxicity

Cytotoxicita byla testována v přímém kontaktu buněk a enkapsulovaných mikrokuliček podle normy ČSN EN ISO 10993-5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro. Metoda byla analyzována na buněčné linii myších makrofágů RAW 264.7 při vlnové délce 570 nm. Výsledky biologických testů byly analyzovány pomocí přístroje multifunkčního modulárního readeru Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Švýcarsko) (Obr. 17). Buněčná suspenze byla napipetována do 24-jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci $2,5 \cdot 10^5$ buněk na 1 ml bezbarvého DMEM média. Poté byly buňky kultivovány po dobu 24 h při 37 °C. Po této době byly buňky vystaveny mikrokuličkám v bezbarvém médiu DMEM v příslušných dávkách 100, 50, 5 mg/ml. Finální analýza byla provedena po 24 h pomocí testu MTT. Test MTT se provádí odpipetováním média se vzorkem s následným proplachem PBS a jeho odsátím. Následně se k buňkám přidá 500 µl roztoku MTT o koncentraci 0,5 mg/ml, který byl po 6 h v inkubátoru odsát. Na závěr bylo k buňkám přidáno 500 µl roztoku DMSO a po 15 min byla změřená absorbance. Jako referenční hodnota pro srovnání byla využita naměřená absorbance životaschopnosti makrofágů bez vystavení kontaktu s mikrogely.



Obr. 17: Přístroj spektrofotometr Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)

8.5.3 Test stanovení aktivity makrofágů

Aktivita makrofágů RAW 264.7 byla stanovena pomocí relativní kvantifikace produkce klíčové signální molekuly imunitních buněk, oxidu dusnatého (NO). Pro stanovení produkce NO byla využita Griessova metoda, která nepřímo měří koncentraci nitritů (NO_2^-), stabilních produktů degradace NO v buněčném supernatantu. Měření produkce NO makrofágy bylo prováděno spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm pomocí Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Švýcarsko). Jako reference byla použita spontánní produkce NO a pro získání pozitivní kontroly, byly buňky makrofágů byly aktivovány pomocí lipopolysacharidu (LPS), který zapříčiňuje jejich zánětlivý stav. Naměřené hodnoty byly normalizovány na produkci NO s pozitivní kontrolou, což umožnilo přímé porovnání imunomodulačního účinku všech vzorků enkapsulovaných mikrokuliček.

8.5.4 Testování imunoenzymatické reakce (Metoda sandwich ELISA)

Produkce interleukinu-6 (IL-6), který je důležitý prozánětlivý cytokin, byla kvantifikována pomocí metody sandwich ELISA. Tento test imunoenzymatické reakce využívá specifické zachycující a detekční protilátky k přesnému měření koncentrace IL-6 v buněčném supernatantu. Vzorky byly analyzovány po 24 hodinách kultivace buněk RAW 264.7 v přítomnosti mikrokuliček a LPS v množství 25 ng/ml. Absorbance byla měřena při vlnové délce 450 nm a referenci 570 nm pomocí téhož přístroje jako v předešlé kapitole 8.5.4.

9 VÝSLEDKY A DISKUSE

9.1 Charakterizace AL_PPy mikrogelů

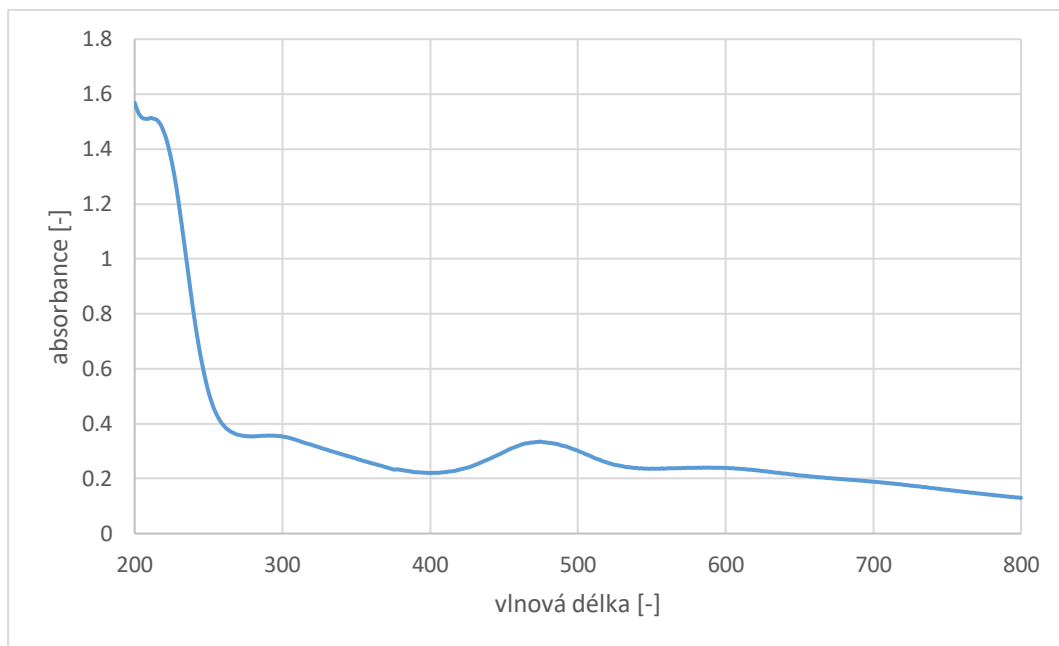
9.1.1 Charakterizace DAAL-PPy koloidů

Koloidní roztok DAAL_PPy o koncentraci 0,2 mg/ml byl podroben analýze DLS (Tab. 4). Částice dosahovaly rozměrů 54 nm hydrodynamického průměru, přičemž polydisperzní index činil 0,267, což značí nízkou polydisperzitu velikostí částic. Zeta potenciál byl stanoven na -36,1 mV. Lze tedy tvrdit, že se jedná o stabilní systém.

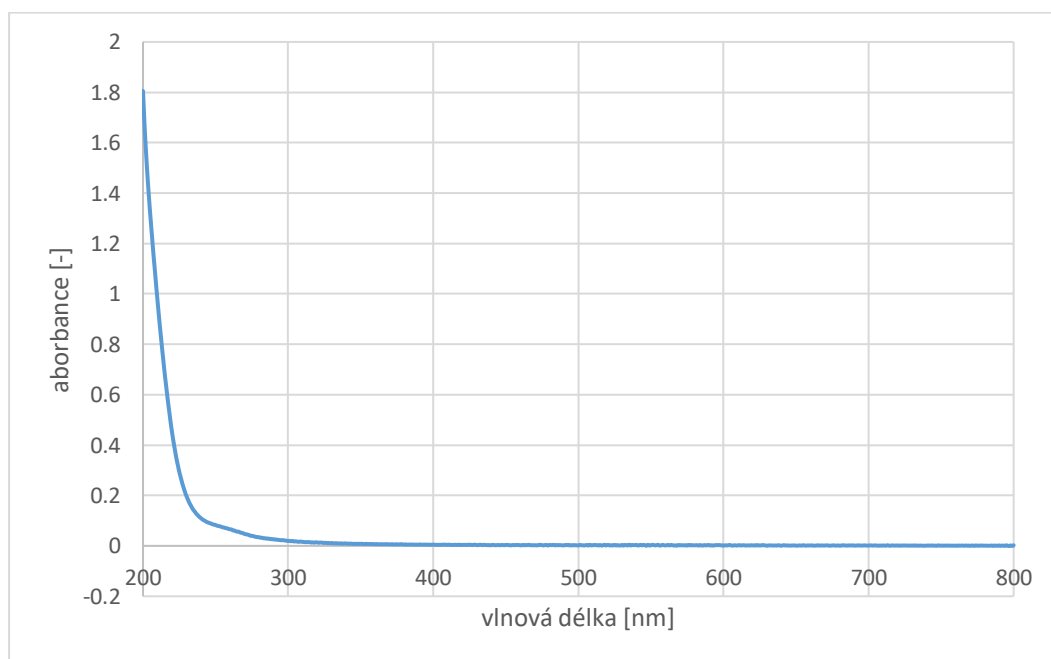
Tab. 4: Hydrodynamické průměry velikosti částic koloidního roztoku DAAL_PPy

Vzorek	Velikost částic [nm]
DAAL_PPy	50,76
	54,50
	54,38
	54,13
	54,11
průměr	(53,6 ± 1,6)

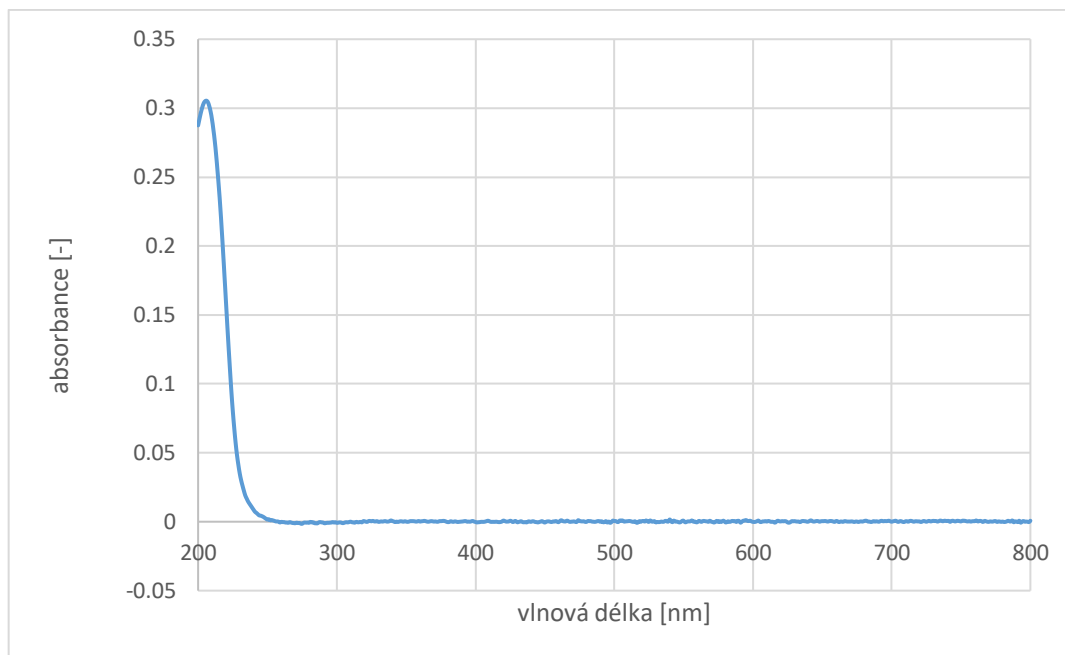
Vzorek DAAL_PPy o koncentraci 0,02 mg/ml byl dále charakterizován pomocí UV-Vis spektroskopie a byl porovnán s roztoky pyrrolu (Py) o koncentraci 0,05 mM a DAAL o koncentraci 1,5 mg/ml (Obr. 19). Na obrázku 18 se ve spektru vyskytují dva zřetelné absorpční pásy, z nichž jeden je kolem 290 nm a druhý je kolem 470 nm. v důsledku přechodu elektronů v konjugované vazbě. Spektrum vzorku DAAL_PPy vykazuje typickou absorbanci konjugovaných pyrrolových cyklů mezi 450-500 nm, která odpovídá π - π^* přechodu z valenčního do protivazebného pásu v důsledku přítomnosti polaronu. Absence tohoto absorpčního pásu u spekter čistých roztoků DAAL i Py dokazuje vznik konjugovaného systému až pomocí samovolné aldolové kondenzace. Na Obr. 20 lze pozorovat absorpční pás charakteristický pro monomerní pyrrol v oblasti 210 nm, který odpovídá přechodům π -elektronů v jeho cyklické struktuře.



Obr. 18: UV-Vis spektrum koloidního roztoku DAAL_PPy (0,02 mg/ml)



Obr. 19: UV-Vis spektrum roztoku DAAL (1,5 mg/ml)



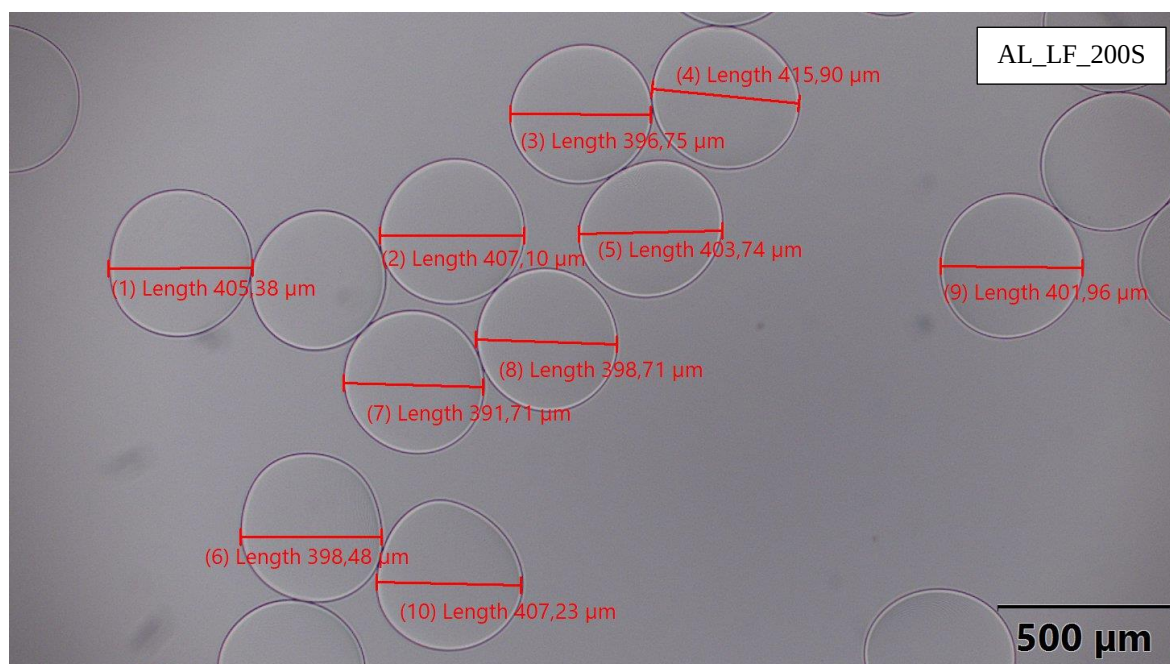
Obr. 20: UV-Vis spektrum roztoku Py (0,05 mM)

9.1.2 Optická mikroskopie

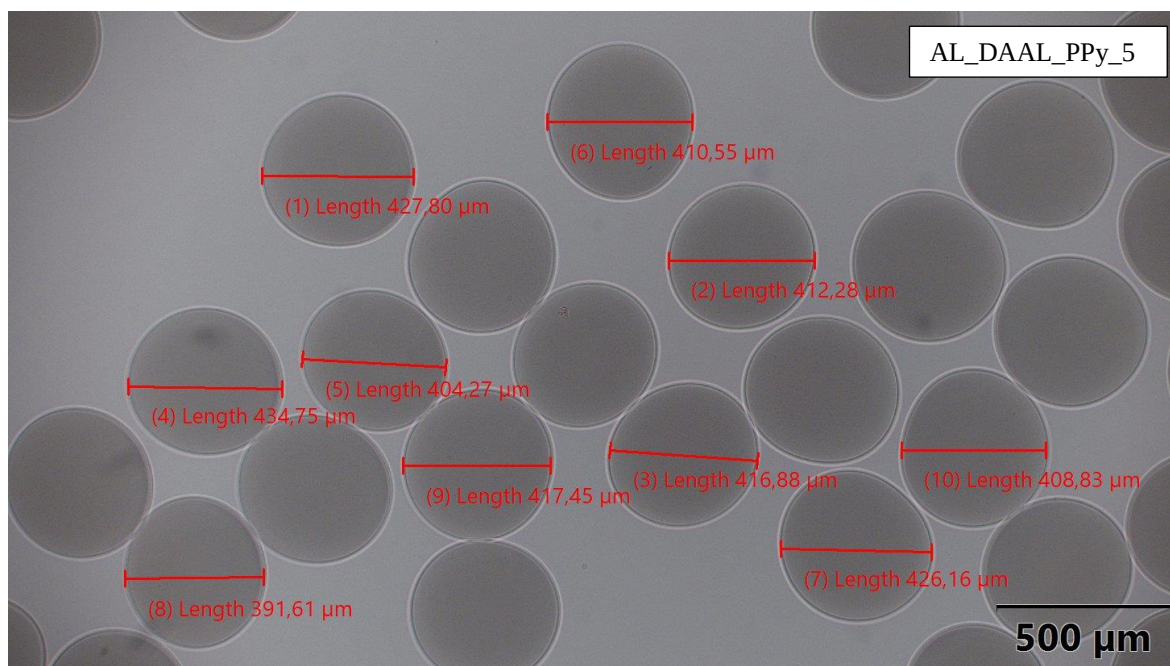
Připravené enkapsulované mikrokuličky byly studovány pomocí optické mikroskopie k určení velikostí jejich průměru. Na obrázcích 21-25 jsou snímky z mikroskopu dokládající velikosti jednotlivých typů mikrokuliček. Jejich průměry jsou potom uvedeny v tabulce (Tab. 5). Mikrokuličky AL_LF200S vykazovaly průměrnou velikost $(403 \pm 7) \mu\text{m}$. Mikrokuličky jsou tedy vysoce homogenní, odchylka jejich velikosti je nižší 3 %. Enkapsulované kuličky AL_DAAL_PPy_5 zaujímaly průměr $(415 \pm 13) \mu\text{m}$, tedy podobně jako u AL_LF200S. U mikrokuliček AL_DAAL_PPy_10 byla pozorován lehce nehomogenní velikost a tvar, což se odráží v nejvyšší pozorované odchylce průměru $(394 \pm 26) \mu\text{m}$. Je zajímavé, že se zvyšováním obsahu koloidu už nedocházelo k dalším deformacím a velikost mikrokuliček AL_DAAL_PPy_15 byla $(419 \pm 9) \mu\text{m}$ a průměr kuliček AL_DAAL_PPy_20 byl $(425 \pm 13) \mu\text{m}$, tedy v rámci odchylek podobný jako u čistých AL_LF200S.

Tab. 5: Hodnoty průměrů velikosti mikrokuliček AL_LF200S, AL_DAAL_PPy_5, AL_DAAL_PPy_10, AL_DAAL_PPy_15 a AL_DAAL_PPy_20

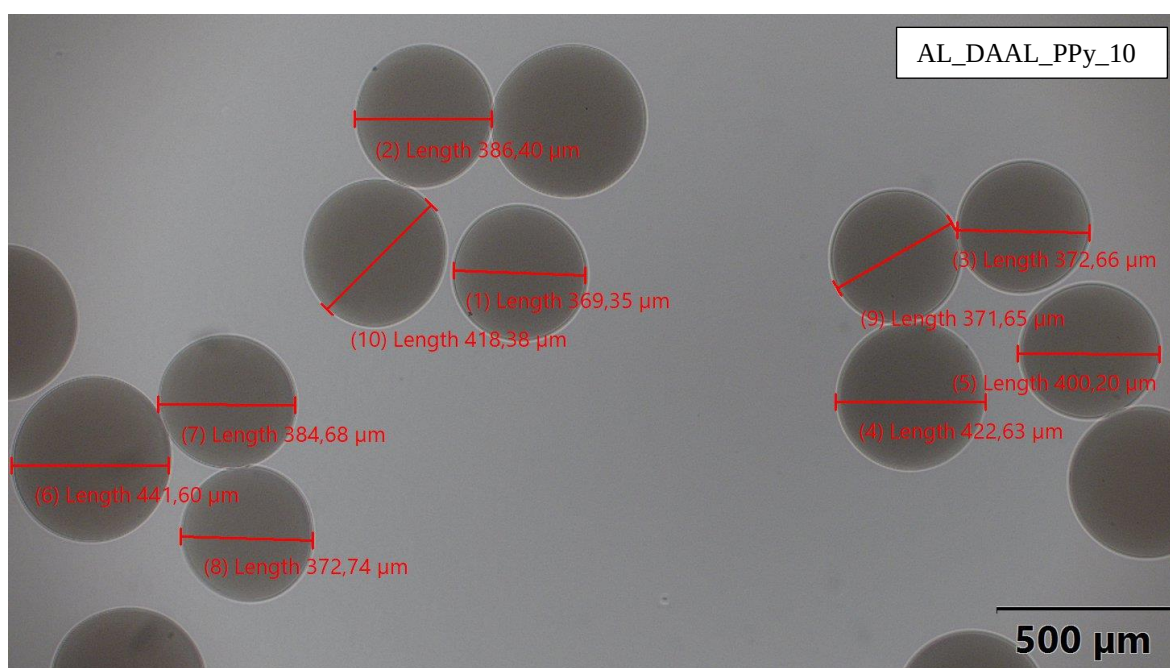
vzorky	AL_LF200S	AL_DAAL_ PPy_5	AL_DAAL_ PPy_10	AL_DAAL_ PPy_15	AL_DAAL_ PPy_20
	d [μm]	d [μm]	d [μm]	d [μm]	d [μm]
1	405	428	369	417	414
2	407	412	386	423	424
3	397	417	373	416	440
4	416	435	423	400	423
5	404	404	400	407	423
6	398	411	442	423	435
7	392	426	385	430	436
8	399	392	373	430	405
9	402	417	372	421	442
10	407	409	418	423	405
průměr	(403±7)	(415±13)	(394±26)	(419±9)	(425±13)



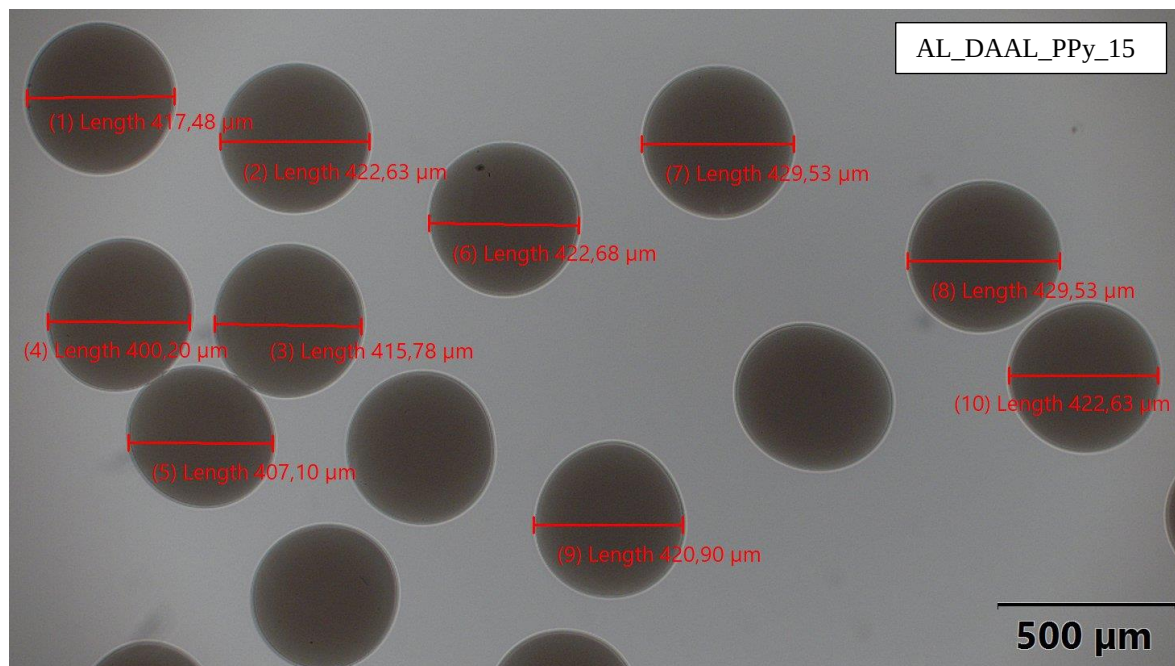
Obr. 21: Fotografie mikrokuliček AL_LF200S



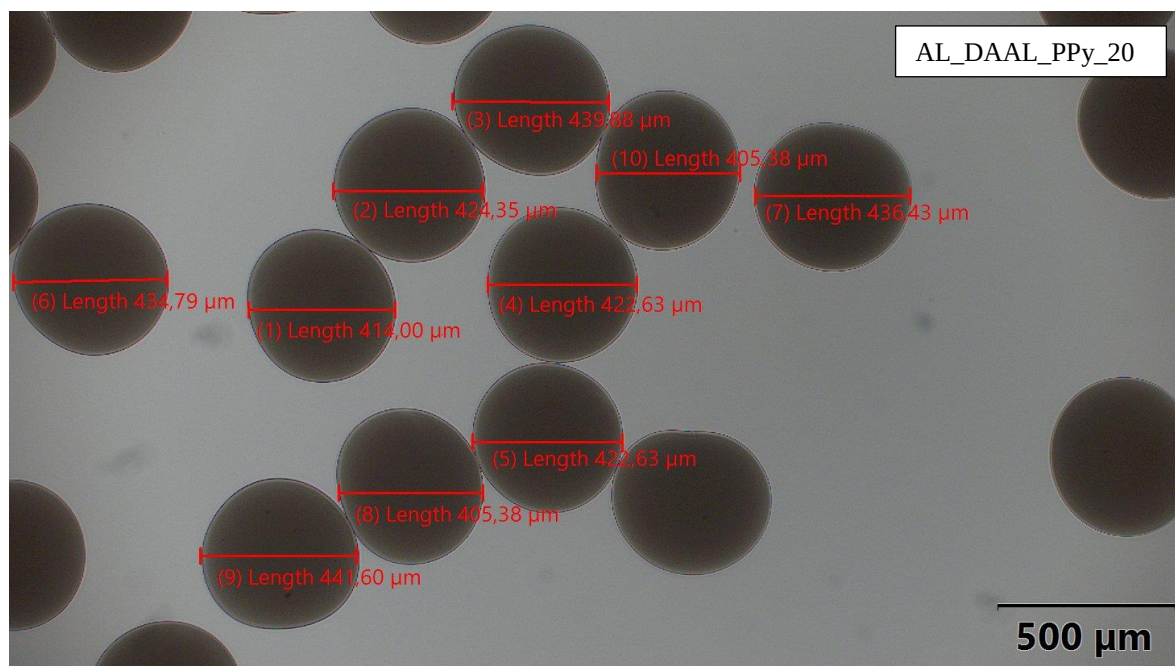
Obr. 22: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_5



Obr. 23: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_10



Obr. 24: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_15

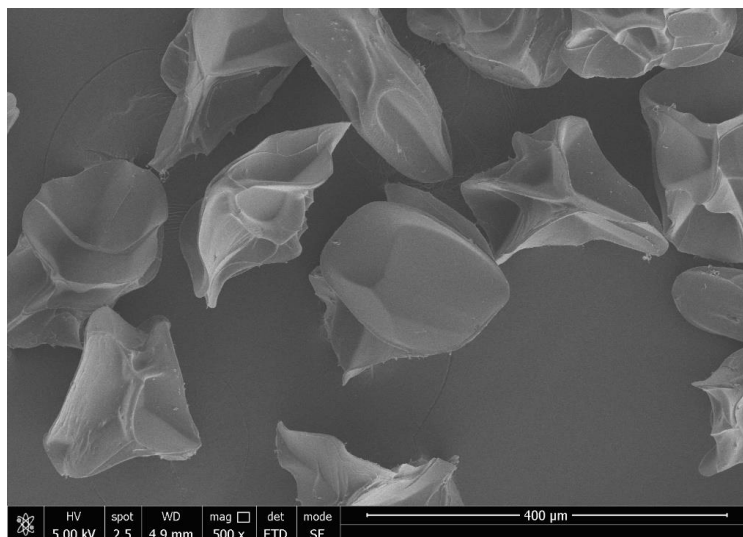


Obr. 25: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_20

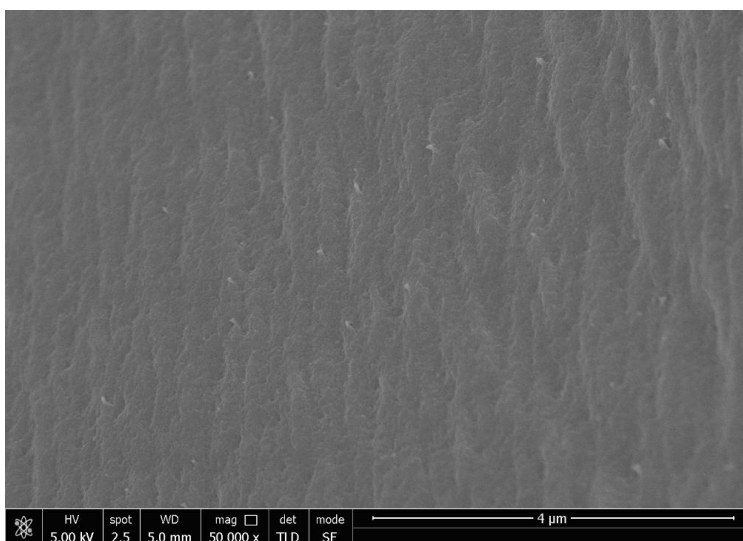
Výsledky ukázaly, že všechny připravené vzorky mikrokuliček vykazovaly velmi podobné velikosti v rozmezí 370-440 μm. Lze tedy potvrdit, že se jedná o kuličky mikroskopických rozměrů. Z naměřených dat lze usoudit, že přidavek DAAL_PPy jen mírně až zanedbatelně ovlivňuje velikost a tvar mikrokuliček.

9.1.3 SEM analýza

Zlyofilizované mikrokuličky vzorku AL_DAAL_PPy_10 byly analyzovány pomocí rastrové elektronové mikroskopie (SEM) při zvětšení 1 000x a 50 000x (Obr. 26 a 27). Byl studován pouze jeden vzorek z důvodu podobných rozměrů vytvořených mikrokuliček všech vzorků. Z obrázku 26 je patrné, že struktura mikrokuliček do značné míry ztratila svůj původní sférický tvar a zhroutila se, pravděpodobně v důsledku absence ošetření kryoptekantem před lyofilizací. Struktura povrchu mikrokuliček je převážně homogenní a bez viditelných pórů. Při vyšším rozlišení (Obr. 27) lze nicméně pozorovat malé výrůstky a drobné strukturální nerovnosti na povrchu mikrokuliček. Tyto výrůstky mohou představovat koloidní částice DAAL_PPy, přičemž pravděpodobně nedošlo k jejich úplnému uzavření do vnitřní struktury mikrogelů.



Obr. 26: Mikrofotografie vzorku AL_DAAL_PPy_10 (zvětšení 1 000x)

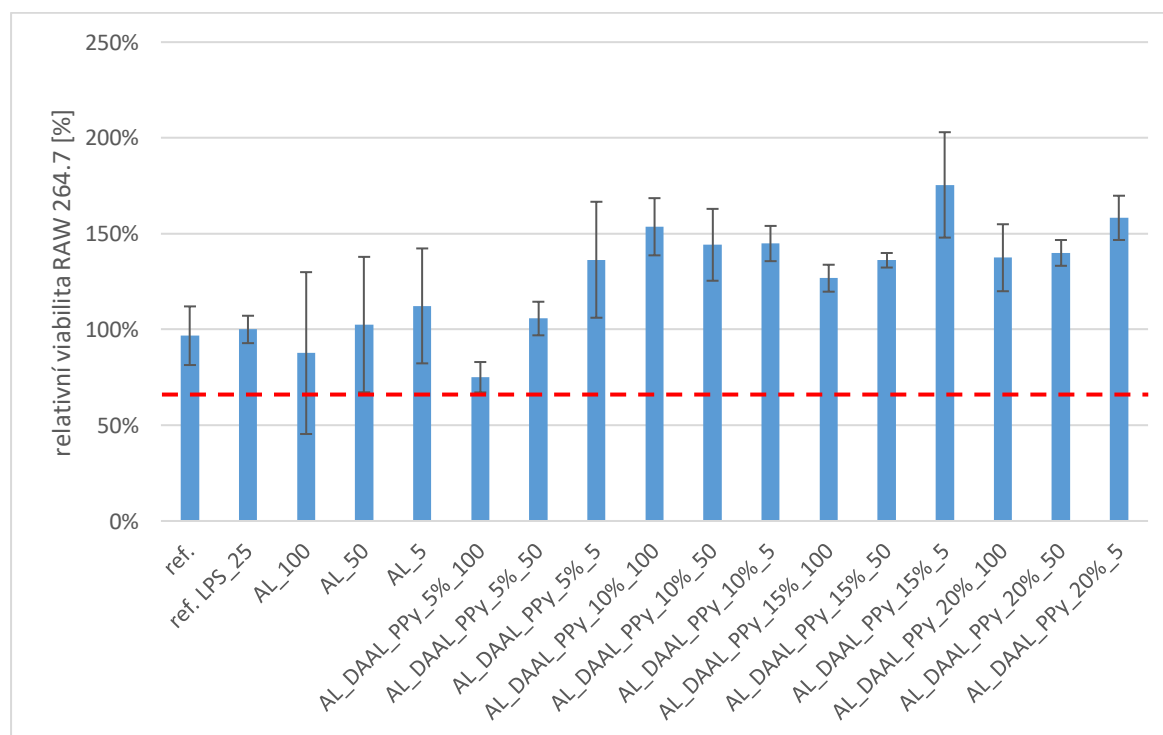


Obr. 27: Mikrofotografie vzorku AL_DAAL_PPy_10 (zvětšení 50 000x)

9.2 Biologické testy

9.2.1 Test cytotoxicity

Test cytotoxicity proběhl přímým kontaktem mikrokuliček v kultivačním médiu na buňky podle normy ČSN EN ISO 10993. Norma stanovuje hodnoty nad 70 % relativní buněčné viability referenčního vzorku je vzorek považován za netoxický. Stanovení cytotoxicity bylo realizováno metodou MTT a za buněčnou linii byly zvoleny myší makrofágy (RAW 264.7). Vzorky byly analyzovány po 24 hodinách kultivace buněk RAW 264.7 v přítomnosti mikrokuliček a LPS v množství 25 ng/ml. Buňky byly vystaveny přítomnosti čtyř koncentracím vzorků AL_DAAL_PPy (5; 10; 15 a 20 hm. %) a vzorku AL_LF_200S ve třech dávkách, konkrétně 100, 50 a 5 mg mikrokuliček v 1 ml bezbarvého média DMEM. Při vyhodnocování viability buněk byla zavedena negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrolu představovaly buňky makrofágů bez stimulace. Sloužila k určení životaschopnosti buněk, které nebyly vystaveny zánětlivému podnětu a expozici vzorků. Jako pozitivní kontrola sloužila skupina makrofágů, která byla stimulována LPS (25 ng/ml). Pozitivní kontrola sloužila jako referenční hodnota maximální očekávané viability aktivovaných buněk. Výsledky byly normalizovány vůči této referenci.

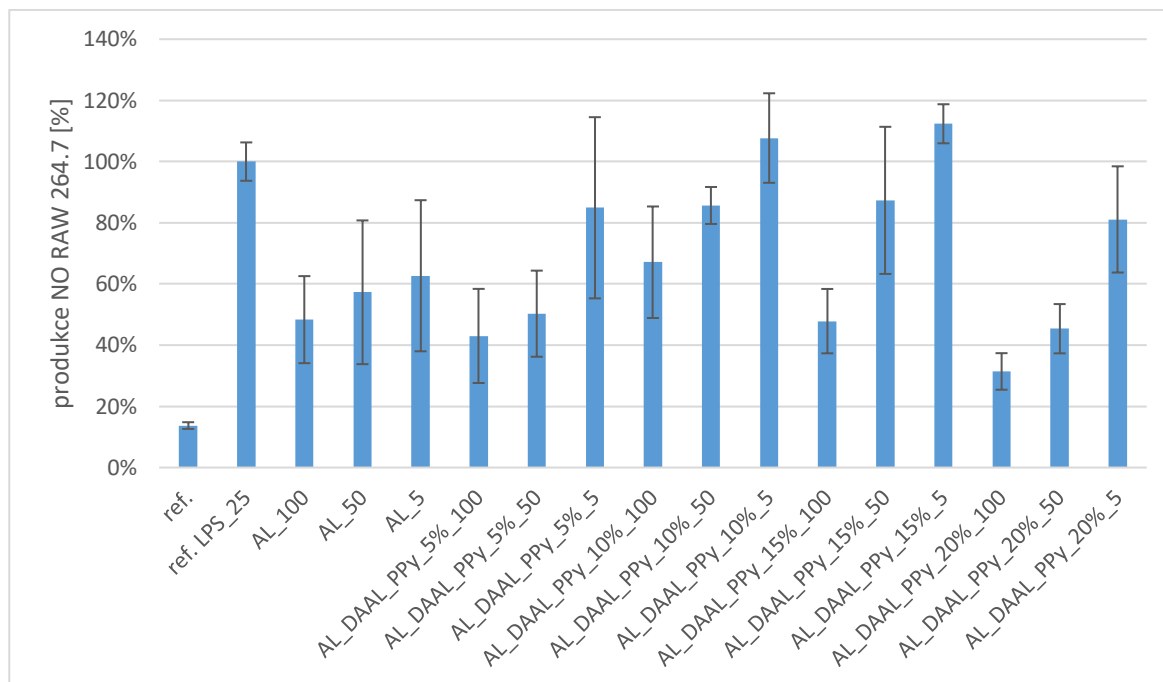


Obr. 28: Graf relativní viability buněk RAW 264.7

Z obrázku 28 vyplývá, že se všechny vzorky mohou považovat za netoxické. Kromě mikrokuliček čistého alginátu AL_LF200S a AL_DAAL_PPy o nejvyšší dávce a nejnižší koncentraci, které snížily viabilitu buněk, docházelo naopak ke zvýšení proliferace makrofágů. Snížení viability až k limitu cytotoxicity pozorované u vzorku AL_DAAL_5%_100, tedy vzorku s nejvyšším množstvím enkapsulovaného koloidu o nejnižší koncentraci, zřejmě není způsobeno vlivem složení či dávky mikrogelů, ale možným odtržením buněk od podkladu v důsledku pohybu mikrokuliček při manipulaci. To je také pravděpodobnou příčinou vysokých odchylek pozorovaných u některých vzorků.

9.2.2 Test stanovení produkce NO

Test produkce NO makrofágy RAW 264.7 proběhl přímým kontaktem mikrokuliček v kultivačním médiu na buňky. Výsledky vlivu vzorků mikrokuliček na NO produkci byly získány po 24 h po aktivaci LPS o koncentraci 25 ng/ml. Buňky byly vystaveny přítomnosti čtyř koncentracím vzorků AL_DAAL_PPy (5; 10; 15 a 20 hm. %) a vzorku AL_LF_200S ve třech dávkách, konkrétně 100, 50 a 5 mg mikrokuliček v 1 ml bezbarvého média DMEM. Při vyhodnocování produkce NO buněk makrofágů byla zavedena negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrolu představovaly buňky makrofágů bez stimulace. Sloužila k určení spontánní produkce NO buněk, které nebyly zaktivovány vystavením zánětlivému podnětu a expozici vzorků. Jako pozitivní kontrola sloužila skupina makrofágů, která byla stimulována LPS (25 ng/ml). Pozitivní kontrola sloužila jako referenční hodnota maximální očekávané produkce aktivovaných buněk bez přítomnosti vzorků. Výsledky byly normalizovány vůči této referenci.



Obr. 29: Graf produkce NO RAW 264.7

Čistý alginátový vzorek AL_LF_200S mírně snižoval produkci NO. Nejnížší dávky všech vzorků a střední dávky téměř všech vzorků neměly významný vliv na produkci NO. Avšak pouze vzorek AL_DAAL_PPy_20_50 vykazoval její mírný pokles. Kdežto při nejvyšších dávkách všech vzorků došlo k podstatnému snížení produkce.

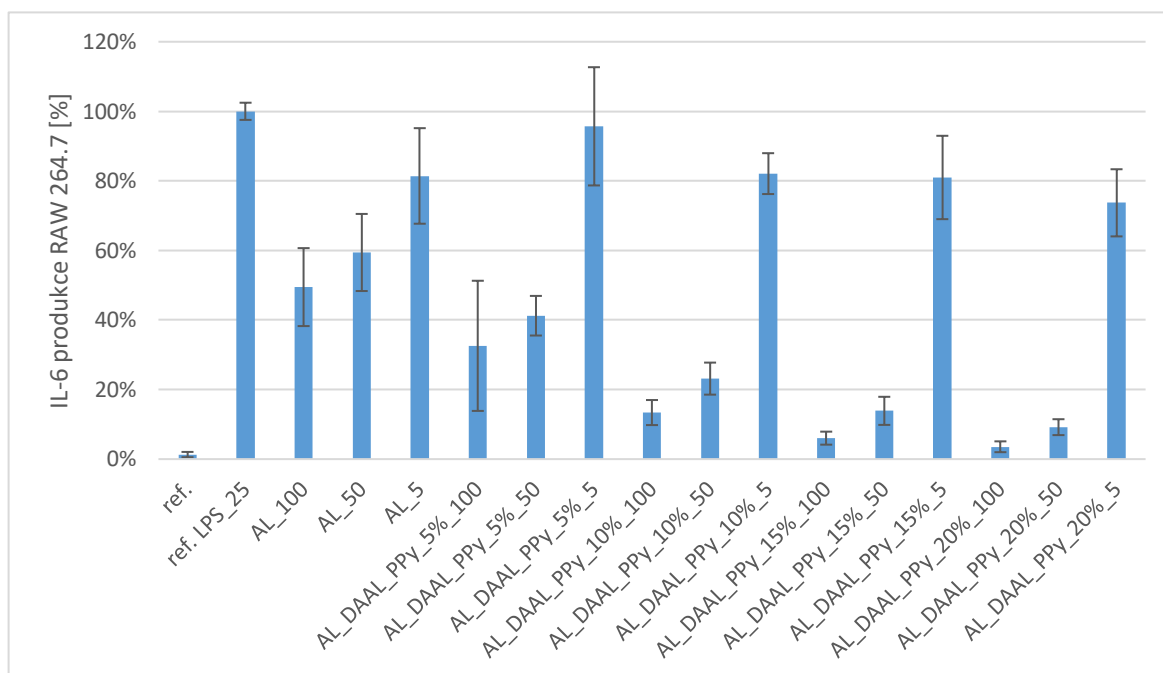
Konkrétně vzorek AL_DAAL_PPy_5_100 snižoval produkci NO, a to o 57 %. Vzorek AL_DAAL_PPy_10_100 produkci snížil o 33 %. Pokles produkce nastal i u vzorku AL_DAAL_PPy_15_100, konkrétně o 52 %. Poslední vzorek AL_DAAL_PPy_20 snížil produkci nejen v dávce a 100 mg/ml, a to o 69 %, ale i v dávce 50 mg/ml, a to o 55 %.

Závěrem lze shrnout, že výsledky testu produkce NO prokázaly možný imunostimulační účinek téměř u všech vzorků o dávce 100 mg/ml. Výsledky také naznačují, že s rostoucím obsahem PPy může docházet k redukcí produkce NO.

9.2.3 Test imunoenzymatické reakce – produkce IL-6

Test imunoenzymatické reakce proběhl přímým kontaktem mikrokuliček v kulturačním médiu na buňky podle 8.5.1. Jako buněčná linie byly zvoleny myší makrofágy (RAW 264.7). Výsledky vlivu vzorků mikrokuliček na produkci IL-6 byly získány po 24 h po aktivaci LPS o koncentraci 25 ng/ml. Buňky byly vystaveny přítomnosti čtyř koncentracím vzorků AL_DAAL_PPy (5; 10; 15 a 20 hm. %) a vzorku AL_LF_200S ve třech dávkách, konkrétně 100, 50 a 5 mg mikrokuliček v 1 ml bezbarvého média DMEM. Při vyhodnocování IL-6 produkce buněk makrofágů byla zavedena negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrolu

představovaly buňky makrofágů bez stimulace. Sloužila k určení spontánní produkce cytokinu IL-6 buněk, které nebyly zaktivovány vystavením zánětlivému podnětu a expozici vzorků. Jako pozitivní kontrola sloužila skupina makrofágů, která byla stimulována LPS (25 ng/ml). Pozitivní kontrola sloužila jako referenční hodnota maximální očekávané produkce aktivovaných buněk bez přítomnosti vzorků. Výsledky byly normalizovány vůči této referenci.



Obr. 30: Graf produkce IL-6 RAW 264.7

Z grafu (Obr. 29) lze konstatovat, že významný vliv na snížení produkce IL-6 vykazují všechny vzorky s DAAL_PPv o nejvyšší dávce. Konkrétně vzorek AL_DAAL_PPv_5 snížil produkci IL-6 o 67 %, AL_DAAL_PPv_10 o 87 %, AL_DAAL_PPv_15 o 94 % a AL_DAAL_PPv_20 o 96 %. Dávky 50 mg/ml měly také významný vliv na produkci cytokinu vzhledem k referenční hodnotě s LPS. U nejnižších dávek všech vzorků nedocházelo k významnému poklesu produkce IL-6. K mírnému snížení produkce IL-6 přispěl i samotný alginát o dávce 50 a 100 mg/ml.

Lze tak konstatovat, že mikrokuličky působí imunomodulačně se závislostí na koncentraci vzorků a dávce mikrokuliček v médiu. Zatímco ve vyšších množstvích dochází k potlačení produkce prozánětlivého cytokinu IL-6, a tedy k potlačení zánětu, u nejnižších množství není jeho produkce významně ovlivněna.

ZÁVĚR

V této diplomové práci byl připraven koloidní roztok DAAL_PPy vznikající reakcí algiátového dialdehydu (DAAL) a pyrrolu (Py) prostřednictvím aldolové kondenzace. Daný koloid nevyžadoval přidavek oxidačního činidla, což syntézu vodivého polymeru činí environmentálně šetrnou. Koloidní částice měly průměrný hydrodynamický průměr ($53,6 \pm 1,6$) nm a zeta potenciál $-36,1$ mV, což potvrzuje dobrou stabilitu systému. Polydisperzní index činil 0,267, což značí nízkou polydisperzitu velikostí částic. UV-Vis spektrum vykazovalo absorpční pásy kolem 290 nm a 470 nm, které potvrzují přítomnost konjugovaného polypyrrolového systému.

Z tohoto koloidu byla následně enkapsulací pomocí zařízení Buchi Encapsulator B-390 připravena řada vzorků AL_DAAL_PPy mikrogelů o různých koncentracích 5, 10, 15 a 20 hm. %. Enkapsulován byl taktéž vzorek čistého alginátu LF 200S o koncentraci 10 mg/ml. Hydrodynamické průměry všech připravených mikrokuliček vykazovaly velmi podobné rozměry v rozmezí 370-440 μ m. Čímž bylo potvrzeno, že se jedná o kuličky mikroskopických rozměrů.

Analýza struktury povrchu pomocí SEM prokázala převážně její homogenní charakter vzorku AL_DAAL_PPy_10 bez viditelných pórů, načeš odhalila přítomnost malých výrůstků. Tyto výčnělky pravděpodobně mohou souviset s nedokonale zabalenými zbytky koloidních částic.

Biologická charakterizace mikrogelů byla provedena na buněčné linii RAW 264.7 (myši makrofágy). Test cytotoxicity (MTT) prokázal, že všechny vzorky splňují kritéria pro necytotoxické materiály podle normy ČSN EN ISO 10993-5. Přítomnost mikrogelů měla dokonce pozitivní vliv na proliferaci buněk. Výjimkou byl pouze vzorek AL_DAAL_PPy_5_100, u kterého došlo ke snížení viability blízko limitní hranice. Tato odchylka však mohla být pravděpodobně způsobena mechanickým odtržením buněk od kultivační destičky.

Imunomodulační vlastnosti byly hodnoceny měřením produkce oxidu dusnatého (NO) a prozánětlivého cytokinu IL-6. Produkce oxidu dusnatého (NO) byla stanovována Griessovou metodou. Výsledky ukázaly, že nejvyšší dávka (100 mg/ml) všech testovaných mikrogelových vzorků vedla k významnému snížení produkce NO, přičemž největší pokles byl pozorován u vzorku AL_DAAL_PPy_20_100, kde došlo ke snížení až o 69 %. Tyto výsledky jasně potvrzují dávkově i koncentrací závislý imunomodulační efekt, který je

přisuzován přítomnosti polypyrrolu (PPy) s potenciálně antioxidačními vlastnostmi. Pokles produkce NO, který je klíčovým prozánětlivým mediátorem produkovaným aktivovanými makrofágy, značí schopnost těchto mikrokuliček tlumit zánětlivou signalizaci.

Produkce interleukinu-6 (IL-6) byla měřena metodou ELISA. Nejvýraznější snížení bylo zaznamenáno u vzorku AL_DAAL_PPy_20_100, kde IL-6 klesla o 96 %. Výrazné snížení prokázal také vzorek AL_DAAL_PPy_15_100, a to o 94 %. Tyto hodnoty u vzorků s nejvyššími koncentracemi a o nejvyšší dávce svědčí o schopnosti materiálu výrazně tlumit zánětlivou odpověď, což je žádoucí vlastnost při aplikacích ve tkáňovém inženýrství a hojení ran.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že připravené AL_DAAL_PPy mikrokuličky kombinují výhody biokompatibilního polysacharidového nosiče s protizánětlivým potenciálem vodivého polymeru. Tyto vlastnosti předurčují tento materiál k využití v biomedicínských aplikacích, zejména jako součást pokročilých systémů pro řízené uvolňování nebo jako funkční složka inteligentních obvazů podporujících hojení chronických či infikovaných ran. Bylo zjištěno, že nejvhodnějšími necytotoxickými mikrogely s imunomodulačními schopnostmi byly vzorky s vyšším obsahem DAAL_PPy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MUSA, Yakubu a Ibrahim Birma BWATANGLANG. Current role and future developments of biopolymers in green and sustainable chemistry and catalysis. In: *Sustainable Nanocellulose and Nanohydrogels from Natural Sources* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [cit. 2024-12-05], s. 131–154. ISBN 978-0-12-816789-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816789-2.00006-7
- [2] YU, Yue, Mingyue SHEN, Qianqian SONG a Jianhua XIE. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018 [cit. 2024-12-05], **183**, 91–101. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2017.12.009
- [3] MOHAMMED, Aiman Saleh A., Muhammad NAVEED a Norbert JOST. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2021 [cit. 2024-12-05], **29**(8), 2359–2371. ISSN 1566-2543, 1572-8919. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-021-02052-2
- [4] KABIR, Sumaya F., Ashiqur RAHMAN, Farzana YEASMIN, Sabrina SULTANA, Rifat Ara MASUD, Nishat Anzum KANAK a Papia HAQUE. Occurrence, distribution, and structure of natural polysaccharides. In: *Radiation-Processed Polysaccharides* [online]. B.m.: Elsevier, 2022 [cit. 2024-12-05], s. 1–27. ISBN 978-0-323-85672-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-85672-0.00005-2
- [5] PRIYA, Sakshi, Manisha CHOUDHARI, Yashika TOMAR, Vaibhavi Meghraj DESAI, Srinath INNANI, Sunil Kumar DUBEY a Gautam SINGHVI. Exploring polysaccharide-based bio-adhesive topical film as a potential platform for wound dressing application: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2024 [cit. 2024-12-05], **327**, 121655. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2023.121655
- [6] ZUBAIR, Muhammad, Ajaz HUSSAIN, Sohail SHAHZAD, Muhammad ARSHAD a Aman ULLAH. Emerging trends and challenges in polysaccharide derived materials for wound care applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2024 [cit. 2024-12-05], **270**, 132048. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.132048
- [7] BESERRA, Fernando Pereira, Ariane Leite ROZZA, Ana Júlia VIEIRA, Lucas Fernando SÉRGIO GUSHIKEN a Cláudia Helena PELLIZZON. Antiulcerogenic Compounds Isolated From Medicinal Plants. In: *Studies in Natural Products Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [cit. 2024-12-05], s. 215–234. ISBN 978-0-444-63603-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63603-4.00006-1
- [8] ASPINALL, Gerald O. Classification of Polysaccharides. In: *The Polysaccharides* [online]. B.m.: Elsevier, 1983 [cit. 2024-12-06], s. 1–9. ISBN 978-0-12-065602-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-065602-8.50006-6
- [9] DIEKJÜRGEN, Dorina a David W. GRAINGER. Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems. *Biomaterials* [online]. 2017 [cit. 2024-12-06], **141**, 96–115. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2017.06.020

- [10] AI, Yongfeng a Jay-lin JANE. Understanding Starch Structure and Functionality. In: *Starch in Food* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [cit. 2024-12-06], s. 151–178. ISBN 978-0-08-100868-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100868-3.00003-2
- [11] APRIYANTO, Ardha, Julia COMPART a Joerg FETTKE. A review of starch, a unique biopolymer – Structure, metabolism and in planta modifications. *Plant Science* [online]. 2022 [cit. 2024-12-06], **318**, 111223. ISSN 01689452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2022.111223
- [12] BENALAYA, Ikbel, Gilberto ALVES, João LOPES a Luís R. SILVA. A Review of Natural Polysaccharides: Sources, Characteristics, Properties, Food, and Pharmaceutical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2024 [cit. 2024-12-06], **25**(2), 1322. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms25021322
- [13] HUANG, Renzhi, Jia ZHANG, Xinxin XU, Maozhong SUN, Liguang XU, Hua KUANG, Chuanlai XU a Lingling GUO. The multiple benefits of bioactive polysaccharides: From the gut to overall health. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2024 [cit. 2024-12-06], **152**, 104677. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2024.104677
- [14] LEE, Kuen Yong a David J. MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012 [cit. 2024-12-06], **37**(1), 106–126. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- [15] MØRCH, Ýrr A., Ivan DONATI, Berit L. STRAND a Gudmund SKJÅK-BRÆK. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules* [online]. 2006 [cit. 2024-12-06], **7**(5), 1471–1480. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm060010d
- [16] PHÙNG, Thị-Thanh-Trúc, Hải-Ngân ĐINH, María UREÑA, Bonastre OLIETE, Emmanuel DENIMAL, Sébastien DUPONT, Laurent BENEY a Thomas KARBOWIAK. Sodium Alginate as a promising encapsulating material for extremely-oxygen sensitive probiotics. *Food Hydrocolloids* [online]. 2024 [cit. 2024-12-06], 110857. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2024.110857
- [17] SALISU, Ahmed, Mohd Marsin SANAGI, Ahmedy ABU NAIM, Wan Aini WAN IBRAHIM a Khairil Juhanni ABD KARIM. Removal of lead ions from aqueous solutions using sodium alginate-graft-poly(methyl methacrylate) beads. *Desalination and Water Treatment* [online]. 2016 [cit. 2024-12-06], **57**(33), 15353–15361. ISSN 19443986. Dostupné z: doi:10.1080/19443994.2015.1071685
- [18] WANG, Hong, Liang YANG a Yanning YANG. A review of sodium alginate-based hydrogels: Structure, mechanisms, applications, and perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2025 [cit. 2025-05-04], **292**, 139151. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.139151
- [19] SUN, Jeong-Yun, Xuanhe ZHAO, Widusha R. K. ILLEPERUMA, Ovijit CHAUDHURI, Kyu Hwan OH, David J. MOONEY, Joost J. VLASSAK a Zhigang SUO. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature* [online]. 2012 [cit. 2024-12-

- 06], **489**(7414), 133–136. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11409
- [20] KJESBU, Joachim S., Daria ZAYTSEVA-ZOTOVA, Sanna SÄMFORS, Paul GATENHOLM, Christofer TROEDSSON, Eric M. THOMPSON a Berit Løkensgard STRAND. Alginate and tunicate nanocellulose composite microbeads – Preparation, characterization and cell encapsulation. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022 [cit. 2024-12-06], **286**, 119284. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119284
- [21] MITCHELL, Geoffrey R. X-Ray Scattering from Non-crystalline and Liquid Crystalline Polymers. In: *Comprehensive Polymer Science and Supplements* [online]. B.m.: Elsevier, 1989 [cit. 2024-11-26], s. 687–729. ISBN 978-0-08-096701-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-096701-1.00031-8
- [22] POTJE-KAMLOTH, Karin. CONDUCTING POLYMER-BASED SCHOTTKY BARRIER AND HETEROJUNCTION DIODES AND THEIR SENSOR APPLICATION. In: *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials* [online]. B.m.: Elsevier, 2001 [cit. 2024-11-26], s. 445–494. ISBN 978-0-12-513910-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012513910-6/50068-2
- [23] RUPINI, Boyina. Conducting polymers as gas sensing material. In: *Carbon Nanomaterials and their Nanocomposite-Based Chemiresistive Gas Sensors* [online]. B.m.: Elsevier, 2023 [cit. 2024-11-26], s. 75–103. ISBN 978-0-12-822837-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822837-1.00006-X
- [24] UZIELIENE, Ilona, Anton POPOV, Raminta VAICIULEVICIUTE, Gailute KIRDAITE, Eiva BERNOTIENE a Almira RAMANAVICIENE. Polypyrrole-based structures for activation of cellular functions under electrical stimulation. *Bioelectrochemistry* [online]. 2024 [cit. 2024-11-26], **155**, 108585. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2023.108585
- [25] GUPTA, Santosh, Akriti SHARMA a Rama Shanker VERMA. Polymers in biosensor devices for cardiovascular applications. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2020 [cit. 2024-11-26], **13**, 69–75. ISSN 24684511. Dostupné z: doi:10.1016/j.cobme.2019.10.002
- [26] PEPPAS, N.A., B.V. SLAUGHTER a M.A. KANZELBERGER. Hydrogels. In: *Polymer Science: A Comprehensive Reference* [online]. B.m.: Elsevier, 2012 [cit. 2025-01-13], s. 385–395. ISBN 978-0-08-087862-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0
- [27] THAKUR, Goutam, Fiona C. RODRIGUES, Eshwari DATHATHRI, Suraj K. NAYAK a Kunal PAL. Protein-based gels. In: *Polymeric Gels* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [cit. 2024-12-06], s. 31–54. ISBN 978-0-08-102179-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102179-8.00002-8
- [28] CHESTER, Daniel, Ethan A. MARROW, Michael A. DANIELE a Ashley C. BROWN. Wound Healing and the Host Response in Regenerative Engineering. In: *Encyclopedia of Biomedical Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [cit. 2024-

- 12-06], s. 1–12. ISBN 978-0-12-805144-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.99896-9
- [29] AMELI, Shahrzad, Moloud NOURANI, Nafiseh BAKHSHI, Bahareh SALEMI, Elham ASSADPOUR a Seid Mahdi JAFARI. Alginate-gelatin composite hydrogels for encapsulating Aloe vera extract; optimization, characterization, and release kinetics. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* [online]. 2025 [cit. 2025-05-04], **9**, 100717. ISSN 26668939. Dostupné z: doi:10.1016/j.carpta.2025.100717
- [30] XU, Mengjie, Miao QIN, Yizhu CHENG, Xiaolian NIU, Jinlong KONG, Xiumei ZHANG, Di HUANG a Huanan WANG. Alginate microgels as delivery vehicles for cell-based therapies in tissue engineering and regenerative medicine. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021 [cit. 2024-11-26], **266**, 118128. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118128
- [31] BRUN-GRAEPP, Amanda K. Andriola Silva, Cyrille RICHARD, Michel BESSODES, Daniel SCHERMAN a Otto-Wilhelm MERTEN. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011 [cit. 2024-11-26], **149**(3), 209–224. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.09.023
- [32] HUANG, Huabo, Junlong YAO, Yulan LIU, Xin TUO, Yumin DA, Xiaoping ZENG a Liang LI. 3D Nanostructured Polypyrrole/Sodium Alginate Conducting Hydrogel from self-assembly with High Supercapacitor Performance. *Journal of Macromolecular Science, Part B* [online]. 2017 [cit. 2024-11-26], **56**(8), 532–540. ISSN 0022-2348, 1525-609X. Dostupné z: doi:10.1080/00222348.2017.1342951
- [33] SAIKIA, Jyoti Prasad, Somik BANERJEE, Bolin Kumar KONWAR a Ashok KUMAR. Biocompatible novel starch/polyaniline composites: Characterization, anti-cytotoxicity and antioxidant activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010 [cit. 2024-11-26], **81**(1), 158–164. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.005
- [34] MÜNSTER, Lukáš, Monika MUCHOVÁ, Martina MARTÍNKOVÁ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Petr HUMPOLÍČEK a Jan VÍCHA. Covalently conjugated polypyrrole-chitosan nanofibrous conductive composites prepared using dialdehyde polysaccharide linkers. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2025, **307**, 141923. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.141923
- [35] MUCHOVÁ, Monika, Lukáš MÜNSTER, Kristýna VALÁŠKOVÁ, Lenka LOVECKÁ, Zdenka VÍCHOVÁ, Josef OSIČKA, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Petr HUMPOLÍČEK, Ondřej VAŠÍČEK a Jan VÍCHA. One-step fabrication of chitosan/dialdehyde cellulose/polypyrrole composite nanofibers with antibacterial, antioxidant, and immunomodulatory effects. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2025, **308**, 142105. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.142105
- [36] KÁČEROVÁ, Simona, Zdenka VÍCHOVÁ, Kristýna VALÁŠKOVÁ, Jan VÍCHA, Lukáš MÜNSTER, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Ondřej VAŠÍČEK a Petr HUMPOLÍČEK.

- Biocompatibility of colloidal polypyrrole. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2023 [cit. 2025-05-04], **232**, 113605. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113605
- [37] VÍCHA, Jan, Lukáš MÜNSTER, Martina MARTÍNKOVÁ, Zdenka VÍCHOVÁ, Ondřej VAŠÍČEK a Petr HUMPOLÍČEK. Dialdehyde Polysaccharides as Templates for Green Synthesis of Polypyrrole-based Materials without Oxidative Polymerization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2024 [cit. 2025-05-04].
- [38] SONAWANE, Shirish H., Bharat A. BHANVASE, Manickam SIVAKUMAR a Shital B. POTDAR. Current overview of encapsulation. In: *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [cit. 2024-11-29], s. 1–8. ISBN 978-0-12-819363-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819363-1.00001-6
- [39] OMER, Noridayu, Yeun-Mun CHOO, Noraini AHMAD a Nor Saadah MOHD YUSOF. Ultrasound-assisted encapsulation of Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) extract. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2021 [cit. 2024-11-29], **79**, 105793. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2021.105793
- [40] DEVI, Nirmala, Mandip SARMAH, Bably KHATUN a Tarun K. MAJI. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2017 [cit. 2024-11-29], **239**, 136–145. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2016.05.009
- [41] EGHBAL, Noushin, Wei LIAO, Emilie DUMAS, Samia AZABOU, Philippe DANTIGNY a Adem GHARSALLAOUI. Microencapsulation of Natural Food Antimicrobials: Methods and Applications. *Applied Sciences* [online]. 2022 [cit. 2024-11-29], **12**(8), 3837. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app12083837
- [42] ABDUL-AL, Mohamed, Morvarid SAEINASAB a Farshid SEFAT. Encapsulation techniques overview. In: *Principles of Biomaterials Encapsulation : Volume One* [online]. B.m.: Elsevier, 2023 [cit. 2024-11-29], s. 13–36. ISBN 978-0-323-85947-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-85947-9.00002-9
- [43] NTNU. *Bioencapsulation research* [online]. B.m.: NTNU – Faculty of Natural Sciences, 2024 [cit. 2024-11-29]
- [44] BANERJEE, Hritwick, Shen SHEN a Hongliang REN. Magnetically Actuated Minimally Invasive Microbots for Biomedical Applications. In: Hongliang REN a Jinji SUN, ed. *Electromagnetic Actuation and Sensing in Medical Robotics* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2018 [cit. 2025-01-13], Series in BioEngineering, s. 11–41. ISBN 978-981-10-6034-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-6035-9_2
- [45] BANDHYOPADHYA, Amit a Susmita BOSE, ed. *Characterization of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2013 [cit. 2025-01-13]. ISBN 978-0-12-415800-9.
- [46] ZHANG, Jianlu, Huamin ZHANG, Jinfeng WU a JiuJun ZHANG. Fuel Cell Degradation and Failure Analysis. In: *Pem Fuel Cell Testing and Diagnosis* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [cit. 2025-05-04], s. 283–335. ISBN 978-0-444-53688-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53688-4.00011-5

- [47] XIAO, Kang, Yirong XU, Xuyang CAO, Hao XU a Yufang LI. Advanced characterization of membrane surface fouling. In: *60 Years of the Loeb-Sourirajan Membrane* [online]. B.m.: Elsevier, 2022 [cit. 2025-05-04], s. 499–532. ISBN 978-0-323-89977-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89977-2.00022-1
- [48] MOHAMMED, Azad a Avin ABDULLAH. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. *Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HARVEX*. 2018 [cit. 2025-01-13]. November 7-9. ISSN 1454 - 8003.
- [49] ROSS HALLETT, F. Scattering and Particle Sizing Applications*. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. B.m.: Elsevier, 1999 [cit. 2025-01-12], s. 2488–2494. ISBN 978-0-12-374413-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374413-5.00277-3
- [50] WORSFOLD, Paul, ed. *Encyclopedia of analytical science*. Amsterdam: Elsevier, 2005 [cit. 2025-01-13]. ISBN 978-0-12-369397-6.
- [51] CALABRESE, Maria Grazia a Pasquale FERRANTI. Novel Foods: New Food Sources. In: *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [cit. 2024-11-29], s. 271–275. ISBN 978-0-12-812688-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22128-8
- [52] VERMA, Anju. Animal Tissue Culture. In: *Animal Biotechnology* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [cit. 2024-11-29], s. 211–231. ISBN 978-0-12-416002-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416002-6.00012-2
- [53] PATRAVALE, Vandana, Prajakta DANDEKAR a Ratnesh JAIN. Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In: *Nanoparticulate Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2012 [cit. 2024-11-29], s. 123–155. ISBN 978-1-907568-98-5. Dostupné z: doi:10.1533/9781908818195.123
- [54] GRELA, Ewa, Joanna KOZŁOWSKA a Agnieszka GRABOWIECKA. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* [online]. 2018 [cit. 2025-01-13], **120**(4), 303–311. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007
- [55] JAIN, Abhishek K., Divya SINGH, Kavita DUBEY, Renuka MAURYA, Sandeep MITTAL a Alok K. PANDEY. Models and Methods for In Vitro Toxicity. In: *In Vitro Toxicology* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [cit. 2024-11-29], s. 45–65. ISBN 978-0-12-804667-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804667-8.00003-1
- [56] PELLEVOISIN, Christian, Christelle VIDEAU, Damien BRIOTET, Corinne GRÉGOIRE, Carine TORNIER, Alain ALONSO, Anne Sophie RIGAUDEAU, Charbel BOUEZ a Nathalie SEYLER. SkinEthicTM RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018 [cit. 2025-01-13], **50**, 418–425. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2018.01.008
- [57] PARK, Sangmin, Hyeji SHIN, Yeeun PARK, Ilgyu CHOI, Byoungduck PARK a Ki Yong LEE. Characterization of inhibitory constituents of NO production from *Catalpa ovata* using LC-MS coupled with a cell-based assay. *Bioorganic Chemistry* [online].

2018[cit. 2025-01-13], **80**, 57–63. ISSN 00452068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2018.05.023

- [58] KAFLE, Bhim Prasad. Application of UV–VIS spectrophotometry for chemical analysis. In: *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [cit. 2025-01-12], s. 79–145. ISBN 978-0-12-814866-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814866-2.00005-1

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Zástupci polysacharidů	16
Obr. 2: Klasifikace polysacharidů podle strukturální konfigurace	18
Obr. 3: Molekulární struktura alginátu sodného	21
Obr. 4: Gelová struktura alginátového zesílení pomocí Ca^{2+}	21
Obr. 5: Schéma dvou typů vazeb polypyrrolového řetězce	23
Obr. 6: Struktura neutrálního (A) a oxidovaného polypyrrolu – polaronu (B) a bipolaronu (C)	24
Obr. 7: Obecné schéma přípravy DAP-PPy kompozitů	29
Obr. 8: Schéma struktur mikrosfér a mikrokapslí	30
Obr. 9: Mechanismus enkapsulace pomocí Enkapsulátoru B-390	31
Obr. 10: Buněčná aktivita – přeměna MTT na formazan	38
Obr. 11: Sestavená aparatura vodní lázně	42
Obr. 12: Změna zbarvení při reakci vzniku roztoku DAAL_PPy v průběhu času (0; 5; 15; 20 min)	42
Obr. 13: Přístroj Encapsulator B-390, pumpa a polymerizační lázeň CaCl_2	44
Obr. 14: Přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK)	45
Obr. 15: UV-Vis spektrometr PerkinElmer LAMBDA 1050 (Shelton, USA)	45
Obr. 16: Mikroskop Olympus IX-81 (Tokio, Japonsko)	46
Obr. 17: Přístroj spektrofotometr Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)	48
Obr. 18: UV-Vis spektrum koloidního roztoku DAAL_PPy (0,02 mg/ml)	50
Obr. 19: UV-Vis spektrum roztoku DAAL (1,5 mg/ml)	50
Obr. 20: UV-Vis spektrum roztoku Py (0,05 mM)	51
Obr. 21: Fotografie mikrokuliček AL_LF200S	52
Obr. 22: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_5	53
Obr. 23: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_10	53
Obr. 24: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_15	54
Obr. 25: Fotografie mikrokuliček AL_DAAL_PPy_20	54
Obr. 26: Mikrofotografie vzorku AL_DAAL_PPy_10 (zvětšení 1 000x)	55
Obr. 27: Mikrofotografie vzorku AL_DAAL_PPy_10 (zvětšení 50 000x)	55
Obr. 28: Graf relativní viability buněk RAW 264.7	56
Obr. 29: Graf produkce NO RAW 264.7	58
Obr. 30: Graf produkce IL-6 RAW 264.7	59

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Koncentrace AL LF200S a molární zlomek DAAL_PPy v připravených vzorcích.</i>	43
<i>Tab. 2: Objemy roztoku AL LF200S a DAAL-PPy potřebné k přípravě vzorků.....</i>	43
<i>Tab. 3: Parametry enkapsulace</i>	44
<i>Tab. 4: Hydrodynamické průměry velikosti částic koloidního roztoku DAAL_PPy</i>	49
<i>Tab. 5: Hodnoty průměrů velikosti mikrokuliček AL_LF200S, AL_DAAL_PPy_5, AL_DAAL_PPy_10, AL_DAAL_PPy_15 a AL_DAAL_PPy_20.....</i>	52

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AS	alginát sodný
Py	pyrrol
PPy	polypyrrol
DAP	dialdehyd polysacharidu
ECM	extracelulární matrix
OM	optická mikroskopie
DLS	dynamický rozptyl světla
UV-vis	ultrafialová viditelná spektrofotometrie
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný

