



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



Vývoj dvouvrstvých vláknenných tkáňových nosičů s odlišnou smáčivostí povrchu pro zpevnění střevních anastomóz

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály
Autor práce: **Bc. Markéta Klíčová**
Vedoucí práce: RNDr. Jana Horáková, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Development of double-layered fibrous scaffolds with various surface wettability for intestinal anastomosis strengthening

Master thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942T002 – Nanomaterials
Author: **Bc. Markéta Klíčová**
Supervisor: RNDr. Jana Horáková, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Klíčová**
Osobní číslo: **M16000161**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Vývoj dvouvrstevných vlákenných tkáňových nosičů s odlišnou smáčivostí povrchu pro zpevnění střevních anastomóz**
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovlákenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma (vláknenné tkáňové nosiče, střevní anastomózy a jejich komplikace, hydrofilní / hydrofobní polymery, úpravy povrchů, smáčivost povrchu a metody jejího hodnocení)
2. Experimentální část: výroba dvouvrstevných vlákenných tkáňových nosičů z biokompatibilních polymerů s rozdílnou smáčivostí povrchu, úprava povrchu vlákenných scaffold, analýza morfologie vláken a smáčivosti povrchu, hodnocení adheze vrstev
3. Vyhodnocení provedených experimentů; optimalizace vybraných polymerů a procesních podmínek pro výrobu vlákenných vrstev s rozdílnou smáčivostí povrchu
4. Zpracování výsledků

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace

Rozsah pracovní zprávy: 40-60 dle potřeby

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 29(6), 739767. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
- [2] DRELICH, Jaroslav, 2013. Guidelines to measurements of reproducible contact angles using a sessile-drop technique. *Surface Innovations* [online]. 1, 248254. Dostupné z: doi:10.1680/si.13.00010
- [3] KIM, Kwangsok, Meiki YU, Xinhua ZONG, Jonathan CHIU, Dufei FANG, Young-Soo SEO, Benjamin S. HSIAO, Benjamin CHU a Michael HADJIARGYROU, 2003. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials*. 24(27), 49774985. ISSN 0142-9612.
- [4] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.

Rozsah práce: min. 50 stran

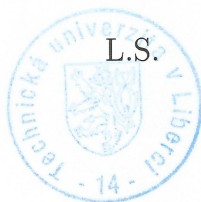
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Horáková, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: 13. října 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 14. května 2018

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 13. října 2017

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

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

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

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14. 5. 2018

Podpis:



Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucí mé diplomové práce, RNDr. Janě Horákové, Ph.D., za excelentní vedení této práce, velkou ochotu, motivaci při řešení veškeré problematiky a pomoc při *in vitro* testování. Také za to, že ve mně probudila velký zájem o téma, ale i o vědu jako takovou.

Velký dík patří i Ing. Petru Mikešovi, Ph.D. a Ing. Andree Klápšťové za pomoc s experimenty a cenné rady při obtížném zvlákňování kyseliny hyaluronové.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lukáši Voleskému za jeho velkou trpělivost, ochotu zodpovídat mé dotazy a poskytnutí svého času při plazmatických úpravách vláknenných materiálů, vyrobených v rámci mé diplomové práce.

Také bych chtěla vyjádřit svou vděčnost doc. MUDr. Václavu Liškovi, Ph.D. za možnost spolupráce na takto zajímavé problematice a za pozvání do Biomedicínského centra v Plzni, kde jsem mohla vidět aplikaci vláknenných vrstev v rámci prvotního *in vivo* testování.

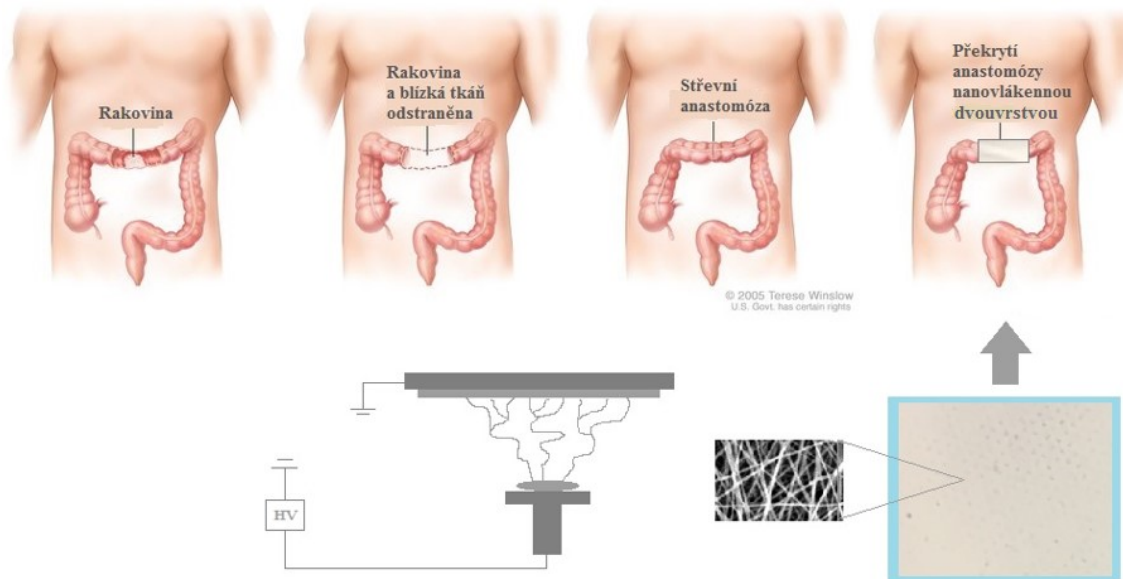
Poděkování patří i Ing. Marku Pokornému, Ph.D., který mi umožnil absolvovat stáž ve firmě Contipro a.s., díky které jsem měla možnost načerpat další znalosti v oblasti elektrostatického zvlákňování biopolymerů.

V neposlední řadě bych ráda vyjádřila poděkování mé rodině a partnerovi za jejich důvěru a obrovskou podporu.

Abstrakt

Netěsnost střevních anastomóz vede k seriózním pooperačním komplikacím. Překrytí chirurgické anastomózy dvouvrstvým vláknenným materiálem představuje zcela inovativní způsob, jak zabránit prosakování střevního obsahu skrz anastomózu a usnadnit hojení. Předpokládá se, že hydrofilní strana přilne k anastomóze, a naopak hydrofóbní strana materiálu vytvoří kontakt s okolním prostředím a zabráni srůstům hladkých tkání v dutině břišní. V této diplomové práci jsou představeny dva materiály, které by potencionálně mohly sloužit pro tento účel. Tyto vláknenné materiály byly vytvořeny pomocí elektrostatického zvlákňování. První dvouvrstvu tvoří hydrofilní ultrajemná nanovlákná kyseliny hyaluronové (HA) a hydrofóbní vlákna poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL). Druhým materiálem je vrstva hydrofilních vláken polyvinylalkoholu (PVA) a vrstva hydrofóbních vláken PCL. Hydrofilní strany obou materiálů byly rovněž ošetřeny methanovým plazmatem, což vedlo ke zvýšení hydrofobicity vláken HA při zachování cytokompatibility. Materiály byly otestovány biologickými *in vitro* testy.

Grafický abstrakt

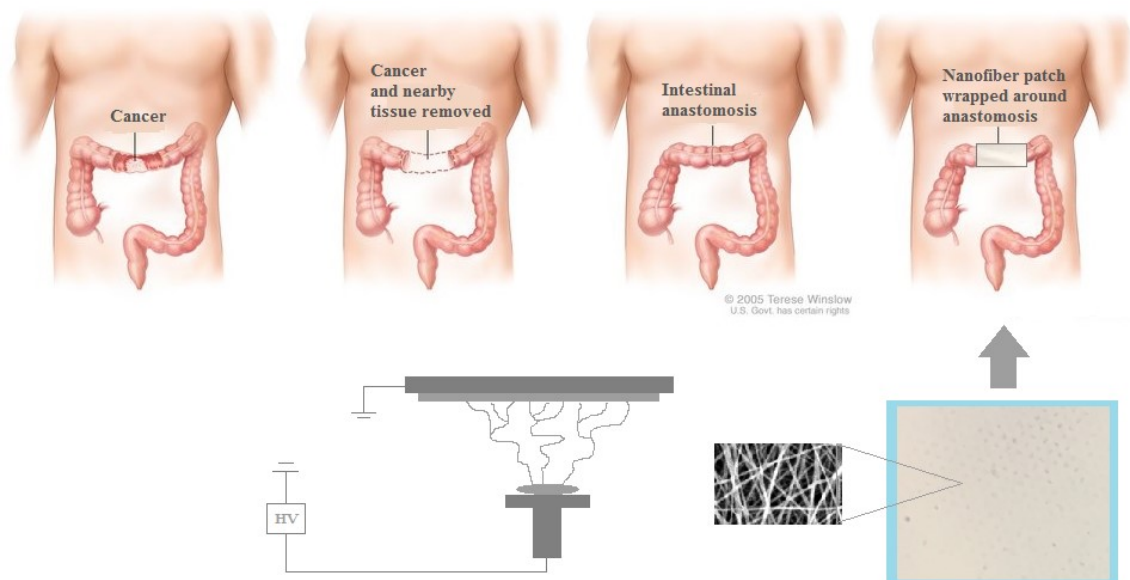


Klíčová slova: nanovlákná, tkáňové inženýrství, elektrostatické zvlákňování, střevní anastomóza, plazmatická modifikace

Abstract

Anastomosis leakage after colorectal resection leads to serious post-operative complications. Covering the surgical anastomosis with fibrous double-layered material introduces an innovative way how to prevent leakage of intestinal contents through anastomosis and facilitate healing. It is assumed that the hydrophilic side adheres to the anastomosis and vice versa, the hydrophobic side of the material creates contact with the surrounding environment and prevents adhesions of smooth tissues in the abdominal cavity. This diploma thesis presents two materials that could potentially serve for this purpose. These fibrous materials were formed by electrospinning. The first material was created by hydrophilic ultrafine nanofibers of hyaluronic acid (HA) and hydrophobic poly- ϵ -caprolactone (PCL) fibers. The second material was made from hydrophilic polyvinyl alcohol (PVA) layer and hydrophobic PCL fibrous layer. The hydrophilic sides of both materials were also treated with methane plasma, resulting in enhanced hydrophobicity of HA fibers while maintaining cytocompatibility. The materials were tested by biological *in vitro* tests.

Graphical abstract



Key words: nanofibers, tissue engineering, electrospinning, gastrointestinal anastomosis, plasma treatment

Obsah

Úvod	13
1 Tkáňové inženýrství.....	14
1.1 Úvod do problematiky.....	14
1.2 Scaffold	15
2 Dvouvrstvé vlákenné tkáňové nosiče.....	17
2.1 Úvod.....	17
2.2 Historie vícevrstvých tkáňových nosičů	17
2.3 Materiály pro přípravu vlákenných tkáňových nosičů.....	19
2.3.1 Hydrofilní polymery	20
2.3.2 Hydrofóbní polymery	21
2.4 Proces výroby – Elektrostatické zvlákňování	22
2.4.1 Princip elektrostatického zvlákňování	23
2.4.2 Parametry elektrostatického zvlákňování	24
2.5 Povrchové modifikace vlákenných vrstev	25
2.5.1 Plazmatická úprava nanovlákenných vrstev	26
2.5.2 Měření smáčivosti materiálu pomocí kontaktního úhlu	28
3 Střevní anastomózy.....	31
3.1 Úvod do problematiky.....	31
3.2 Pooperační komplikace střevních anastomóz	33
4 Experiment 1 – Dvouvrstvý vlákenný materiál polyvinylalkohol/ poly-ε-kaprolakton.....	36
4.1 Metody	36
4.1.1 Příprava polymerních roztoků	36
4.1.2 Měření vlastností zvlákňovacích roztoků	36
4.1.3 Elektrostatické zvlákňování.....	36
4.1.4 Skenovací elektronová mikroskopie	37

4.1.5	Měření kontaktních úhlů	37
4.1.6	Měření adheze	37
4.1.7	Buněčné <i>in vitro</i> testy	38
4.2	Výsledky	40
4.2.1	Vlastnosti zvlákňovacích roztoků	40
4.2.2	Výsledná morfologie vrstev	40
4.2.3	Výsledný kontaktní úhel	43
4.2.4	Adheze vrstvy	43
4.2.5	Výsledky <i>in vitro</i> testování	44
5	Experiment 2 – Dvouvrstvý vlákenný materiál kyselina hyaluronová/ poly-ε-kaprolakton.....	49
5.1	Metody	49
5.1.1	Příprava polymerních roztoků	49
5.1.2	Měření vlastností zvlákňovacích roztoků	49
5.1.3	Elektrostatické zvlákňování	49
5.1.4	Skenovací elektronová mikroskopie	52
5.1.5	Měření kontaktních úhlů	52
5.1.6	Měření adheze	52
5.1.7	Gelová permeační chromatografie – Metoda A.....	52
5.2	Výsledky Metoda A	53
5.2.1	Vlastnosti zvlákňovacích roztoků	53
5.2.2	Výsledná morfologie vrstvy.....	53
5.2.3	Výsledný kontaktní úhel	55
5.2.4	Výsledky gelové permeační chromatografie	55
5.3	Výsledky Metoda B.....	56
5.3.1	Vlastnosti zvlákňovacích roztoků	56
5.3.2	Výsledná morfologie vrstvy.....	56

5.3.3	Výsledný kontaktní úhel	58
5.3.4	Adheze vrstvy	58
6	Experiment 3 – Povrchová úprava hydrofilních stran dvouvrstvých vlákenných materiálů pomocí plazmatického procesu	59
6.1	Metody	59
6.1.1	Příprava vrstev	59
6.1.2	Plazmatická úprava	59
6.1.3	Skenovací elektronová mikroskopie	60
6.1.4	Kontaktní úhel.....	60
6.1.5	Měření adheze.....	60
6.1.6	Určení změn v chemické struktuře po plazmatické úpravě	60
6.1.7	<i>In vitro</i> testování	61
6.2	Výsledky	61
6.2.1	Změna morfologie hydrofilních vrstev po plazmatické úpravě.....	61
6.2.2	Změna kontaktního úhlu	64
6.2.3	Změna chemické struktury - FTIR charakteristika	65
6.2.4	Změna adheze dvouvrstvy po plazmatické úpravě	66
6.2.5	<i>In vitro</i> testování materiálů	67
7	Diskuse	75
7.1	Materiál PVA/PCL.....	75
7.2	Materiál HA/PCL	76
7.3	Povrchová úprava PVA a HA stran vlákenných dvouvrstev	78
8	Závěr	80
	Literární zdroje	82
	Seznam obrázků	99
	Seznam tabulek	101

Seznam zkratek

ATR-FTIR	Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací s technikou zeslabeného úplného odrazu
BSA	Bovinní sérový albumin
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DBD	Dielektrický bariérový výboj
DIW	Destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
ECM	Mezibuněčná hmota
ELSD	Odpařovací detektor rozptylu světla
FBS	Fetální bovinní sérum
FITC	Phalloidin-fluorescein izokyanát
GPC	Gelová permeační chromatografie
HA	Kyselina hyaluronová
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PEO	Polyethylenoxid
PGA	Kyselina poly-glykolová
PLA	Kyselina poly-mléčná
PLLA	Kyselina poly-L-mléčná
PVA	Polyvinylalkohol
PVAc	Poly-vinylacetát
RASL	Right Angle Light Scattering
RF PACVD	Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie

Úvod

Kolorektální karcinom je jedno z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění na světě. Česká republika se navíc řadí mezi země s nejvyšší incidencí. Toto maligní nádorové onemocnění vyžaduje komplexní léčbu. Chirurgická část léčby spočívá v odstranění postižené části střeva s nádorem. Po resekční fázi následuje fáze rekonstrukční, při které dojde k umělému spojení konců ponechané trávicí trubice – tedy k vytvoření tzv. gastrointestinální anastomózy. Byť je tento zákrok častou operací v dutině břišní, procento pooperačních komplikací anastomóz je stále velké. Život ohrožující komplikací je netěsnost anastomózy, která vede k leaku (úniku) obsahu střev do dutiny břišní. Tato komplikace nastává v 3% až 19% případů. Navíc je obtížné anastomotický leak včasné detekovat a proto je stále větší tlak vyvíjen na prevenci.

Aktuálně neexistují na trhu žádné materiály, po jejichž aplikaci by bylo spolehlivě předcházeno komplikacím. Dvouvrstvý vlákenný materiál, vyvíjen v rámci této diplomové práce, je zcela novou slibnou možností a v budoucnu by mohl sloužit nejen jako prevence anastomotického leaku ale i jako podpora hojení anastomózy. Cíl práce tkví ve zhotovení biodegradabilního vlákenného tkáňového nosiče s odlišnou smáčivostí jednotlivých vrstev. Materiál bude hydrofilní stranou přiložen na čerstvě vytvořenou anastomózu a zajistí tak bezpečné hojení bez vedlejších efektů. Resekce části střeva, vytvoření anastomózy i její překrytí vlákenným materiálem proběhne v rámci jednoho chirurgického zákroku.

Pomocí elektrostatického zvlákňování na NanospiderTM byly vyrobeny dva materiály splňující požadavky. Jedná se o dvouvrstvu, připravenou z polyvinylalkoholu (PVA) a poly-ε-kaprolaktonu (PCL) a dvouvrstvu tvořenou kyselinou hyaluronovou (HA) a PCL. Smáčivost těchto vrstev byla ověřena měřením kontaktního úhlu na rozhraní. Také byl nalezen způsob, jak zvýšit hydrofobicitu nanovlákně HA, a to sice pomocí povrchové úpravy methanovým plazmatem. Cytokompatibilita materiálů pak byla ověřena pomocí *in vitro* testů. Na obě strany materiálů byly nasazeny myší fibroblasty a jejich proliferace byla vyhodnocena za použití MTT testu, fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část je sestavena ze tří hlavních pilířů. Tvoří je (1) úvod do tkáňového inženýrství, dále pak kapitola, věnující se (2) studii samotných dvouvrstvých vláknenných materiálů a v neposlední řadě (3) objasnění pojmu „střevní anastomóza“ a představení pooperačních komplikací. Kapitola 2 je psána s důrazem na způsob výroby, hydrofilní/hydrofóbní polymery a povrchové úpravy vláknenných vrstev, které byly použity v této diplomové práci.

1 Tkáňové inženýrství

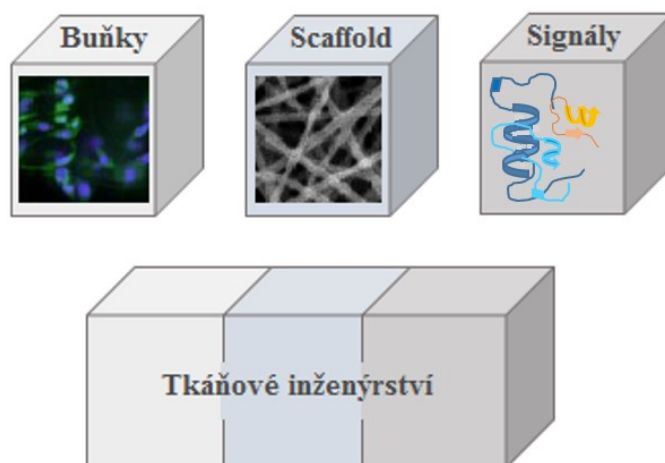
1.1 Úvod do problematiky

Tkáňové inženýrství je definováno jako multidisciplinární obor, jenž si klade za cíl vytvořit biologickou náhradu, sloužící k obnově, náhradě nebo regeneraci poškozené tkáně či orgánu (*Langer a Vacanti 1993*). Tento stále se rozvíjející obor kombinuje poznatky z přírodních věd a principy inženýrství a vytváří alternativu ke konvenčním způsobům náhrad poškozených tkání či orgánů (*Aramwit et al. 2017*).

Ztráta či poškození tkání a orgánů se dnes nejčastěji řeší (1) transplantací dárcovského orgánu či tkáně lidského původu (allograft) nebo (2) transplantací vlastní tkáně, odebrané z jiné části těla pacienta (autograft). Tyto přístupy ovšem představují několik úskalí. V případě allograftů může dojít k odmítnutí orgánu imunitním systémem příjemce a jejich použití je omezeno převahou čekatelů na orgán nad dárce. Autografty sice plně vylučují nežádoucí imunitní reakci pacienta, ale čelí jistým anatomickým omezením (*O'Brien 2011*). Tkáňové inženýrství oproti tomu nabízí řešení zmíněných limitací, na druhou stranu otevírá řadu nových, převážně etických otázek (*Baker et al. 2016; Liguori et al. 2017*).

Tkáňové inženýrství kombinuje tři základní komponenty, kterými jsou buňky, scaffold (nosič) a signály, jak lze vidět na Obrázku 1 (*Goh a Holmes 2017*). Klasický přístup všeobecně zahrnuje následující kroky. Nejprve dojde k izolaci příslušných buněk a jejich kultivaci *in vitro* za biologicky příznivých podmínek, dokud není dosaženo dostatečného množství buněk. Následuje výroba biokompatibilního scaffoldu a jeho osazení buňkami. Růst buněk lze podpořit různými signály, mezi které se řadí použití bioreaktoru či růstových faktorů. Po určité době dojde k implantaci materiálu do organismu. Scaffold je ale možné implantovat i bez předchozího osazení buňkami (*Chan a Leong 2008*).

Stejný přístup bude uplatněn na vláknenné tkáňové nosiče vyvinuté v rámci této diplomové práce. Výsledný dvouvrstvý vláknenný materiál se po sterilizaci umístí přímo na postiženou část střeva a podpoří tak, mimo jiné, regeneraci. Následně se materiál postupně rozloží bez vzniku nežádoucích degradačních produktů a není tak nutná další operace pro vyjmutí materiálu.



Obrázek 1: Základní stavební kameny tkáňového inženýrství.

1.2 Scaffold

Scaffold neboli tkáňový nosič je struktura, která biologicky i strukturně napodobuje nativní mezibuněčnou hmotu (ECM) a poskytuje tak buňkám oporu při růstu nové tkáně (Ikada 2006). Scaffold tedy nezajišťuje pouze výsledný tvar a objem nové tkáně, nicméně je nezbytné, aby podporoval i předávání mechanických a molekulárních signálů mezi buňkami (Laurencin a Nair 2008).

Na vlastnosti scaffoldu jsou tak kladeny velké požadavky. V první řadě musí být materiál biokompatibilní, což znamená, že nesmí způsobit jakoukoli nežádoucí imunitní odezvu organismu, která může vést k nevyžádaným komplikacím, od zpomalení hojení až k odmítnutí nosiče. Je velmi důležité si uvědomit, že tkáňový nosič neslouží jako finální a permanentní součást lidského těla, jako je tomu u běžného implantátu. Je žádoucí, aby buňky v lidském těle produkovaly vlastní ECM a postupně tak nahradily implantovaný scaffold. Z toho vyplývá, že je nezbytné používat biodegradabilní materiály. Na degradačním profilu velmi záleží, je nutné, aby stupeň degradace korespondoval s růstem tkáně uvnitř scaffoldu. Materiál také musí vykazovat vysoce porézní strukturu s propojenými póry, rozměr pórů musí být dostatečný pro migraci buněk a efektivní zajištění dodávání živin i odstranění odpadních látek (O'Brien 2011; Li

Wan- Ju et al. 2007). Na druhou stranu příliš velké póry znesnadňují interakce a komunikace mezi nosným materiálem a buňkami. Optimálně by se velikost pórů měla pohybovat v rozmezí 100 až 500 μm (*Sun et al. 2017; Fadhil Albab et al. 2018*).

Důležitou roli v uchycení buněk hrají i povrchové vlastnosti tkáňového nosiče, jako například smáčivost povrchu. Přílišná hydrofobicita ale i nadměrná hydrofilicita znesnadňuje adhezi buněk a vede tak k nedostatečné buněčné kolonizaci scaffoldu (*Ikada 2011*). Buněčná adheze k povrchu scaffoldu je totiž zprostředkována spontánně adsorbovanými proteiny ECM. Mezi tyto proteiny patří například fibronectin, kolagen či fibrin. Pokud je povrch scaffoldu vysoce hydrofóbní, proteiny se sice adsorbují, ale v denaturovaném stavu a rigidní struktuře. Taková struktura způsobí nízkou buněčnou adhezi, jelikož buněčné receptory adheze (například integriny) mají zhoršený přístup ke specifickým vazebným místům proteinů. Extrémní hydrofilicita naopak způsobuje slabé navázání proteinů, které zprostředkovávají buněčnou adhezi (*Bacakova et al. 2011*). Smáčivost materiálu lze upravit několika způsoby povrchových modifikací, kterým se podrobněji věnuje kapitola 2.5. Záleží také na mechanických vlastnostech scaffoldu a reprodukovatelnosti jeho výroby (*Bissoli a Bruschini 2018*).

Existuje několik druhů tkáňových nosičů, všeobecně je lze rozdělit na nevláknenné a vláknenné scaffoldy. Od toho se odvíjí i způsob jejich výroby. Mezi nevláknenné nosiče se řadí hydrogely, pěny a další, pro jejichž výrobu se používají metody jako vymývání částic porogenu, zpěňování plynem, 3D tisk a další (*Chan a Leong 2008*). Vláknenné nosiče se pak dále dělí na tkané a netkané (*Wolfová et al. 2015*). Tkané vláknenné scaffoldy se vyrábí klasickými textilními metodami jako tkaní či pletení a v případě výroby netkaných nanovláknenných vrstev se nejčastěji používá elektrostatické zvlákňování (*Singh et al. 2015; Stratton et al. 2016*). V rámci diplomové práce byly vyrobeny právě netkané nanovláknenné scaffoldy a podrobně se jim věnuje následující kapitola 2.

2 Dvouvrstvé vlákenné tkáňové nosiče

2.1 Úvod

Nanovláknenné materiály jsou vhodným materiálem pro tkáňové nosiče, jelikož jsou morfologicky podobné nativní ECM, která se skládá z komplikovaných mikro a nano struktur (Wang a Nain 2014). Vlastnosti nanovláken jako vysoká mikro-porosita a velký měrný povrch podporují buněčnou adhesi, proliferaci, diferenciaci a migraci a mnoho publikací se tak zabývá optimalizací vlastností nanovláknenných nosičů pro tkáňové inženýrství (Vasita a Katti 2006). Ve snaze co nejlépe simulovat přirozenou komplexní strukturu tkání, někteří autoři studují vícevrstvené nanovláknenné nosiče.

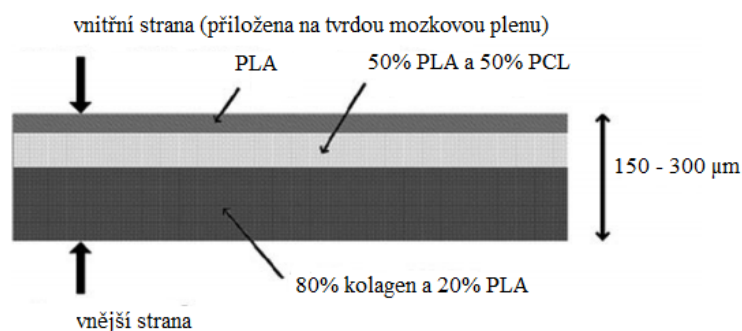
2.2 Historie vícevrstvých tkáňových nosičů

V roce 2005 byla vydána studie od autorů S. Kidoaki *et al.*, kde byly představeny dva nové způsoby výroby vícevrstvých vlákenných materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování. Jednalo se o (1) postupné zvlákňování různých polymerních roztoků, kdy byl nejprve zvlákněn první polymer a teprve poté byl vyměněn polymerní roztok ve stříkačce a byla vytvořena druhá nanovláknenná vrstva na stejný kolektor, a (2) současné zvlákňování dvou polymerních roztoků na jeden kolektor.

Pomocí prvního přístupu byl vytvořen dvouvrstvý tubulární materiál, jelikož vlákna polymerních roztoků byla postupně ukládána na rotační kolektor válcového tvaru. Cílem bylo napodobit strukturu nativní cévy. Pro tyto účely byly polymerní roztoky vrstveny v následujícím pořadí. Nejprve byl zvlákněn roztok polyethylenoxidu (PEO), na tuto vrstvu byla uložena kolagenová vlákna I. typu a vnější vrstvu tvořila vrstva polyurethanových vláken. Následně byl tubulární scaffold manuálně stažen z kolektoru. Vlákna PEO však nevykazovala přílišnou adhezi k vrstvě kolagenových vláken a zůstala tak uchycena na válcovém kolektoru. Byl tak připraven pouze dvouvrstvý tubulární scaffold. V případě druhého přístupu, tedy současného zvlákňování dvou roztoků, autoři pozorovali elektrostatické odpuzování polymerních trysek v oblasti nestability a vlákna obou polymerů proto byla samovolně ukládána v přílišné vzdálenosti od sebe. Aby došlo k překryvu vláken, roztoky byly zvlákněny na kolektor s vysokou rychlostí rotace (Kidoaki *et al.* 2005).

V roce 2013 byl v publikaci od Y. Wang *et al.* vyroben třívrstvý vlákenný materiál, kombinující přednosti přírodních a syntetických polymerů. Takový materiál měl sloužit jako scaffold pro regeneraci tvrdé mozkové pleny a jako alternativa k tehdejším

chirurgickým technikám, používaným při uzavírání tvrdé mozkové pleny po neurooperacích. Výsledný vlákenný materiál byl rovněž vyroben jehlovým elektrostatickým zvlákňováním a obsahoval vnitřní vrstvu kyseliny poly-mléčné (PLA) k redukci adheze tkáně, střední vrstvu z PLA a PCL a vnější stranu tvořil kolagen a PLA k usnadnění regenerace tkáně a zlepšení mechanických vlastností. Strukturu vrstvení lze vidět na Obrázku 2. Pro *in vitro* testování byly vybrány lidské kmenové buňky a bylo potvrzeno, že buňky prolifерují na obou stranách materiálu. Po delší časovém úseku bylo více buněk nalezeno na vnější vrstvě a potvrdil se tak předpoklad, že kombinace kolagenu a PLA zvyšuje buněčnou proliferaci. *In vivo* testy byly provedeny na králičí tvrdé mozkové pleni a bylo shledáno, že scaffold vykazuje excelentní biokompatibilitu (Wang *et al.* 2013).

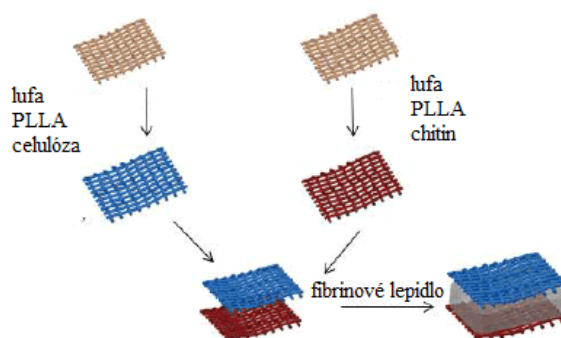


Obrázek 2: Znáznornění struktury vícevrstvého scaffoldu pro náhradu tvrdé pleny mozkové. Převzato a přeloženo z (Wang *et al.* 2013).

Ve studii od P. Askari *et al.* (2015) bylo také použito jehlové elektrostatické zvlákňování k výrobě třívrstvého vlákenného materiálu, vrstvení bylo provedeno v pořadí PVA, poté PCL a nakonec opět PVA. Vrstva PCL rovněž obsahovala tetracyklin hydrochlorid a vrstva PVA naopak sodnou sůl fenytoinu. Studie potvrdila, že v porovnání s jednovrstevnými materiály se tato léčiva uvolňují z materiálu pomaleji. Také se ukázalo, že růst a proliferace fibroblastů na třívrstvých scaffoldech je vyšší v porovnání se samotnou PCL vrstvou. V publikaci od autorů R.B. Trinca *et al.* (2017) byla vyrobena vlákenná dvouvrstva na bázi PCL a směsi chitosanu a PEO. Jednotlivé polymerní roztoky byly zvlákňovány postupně na stejný kolektor a výsledná vrstva měla sloužit jako krytí kožních ran. Vrstva obsahovala PCL vlákna kvůli zlepšení mechanických vlastností scaffoldu, zatímco chitosanová vlákna primárně podporovala funkci hojení rány.

Elektrostatické zvlákňování není jedinou metodou pro výrobu vícevrstvých scaffoldů. Ve studii od T. Knight *et al.* (2013) byla představena nová metoda pro výrobu tubulárních

tkáňových nosičů, a to sice kombinací lisování vrstev a vymývání částic porogenu. Ve studii od B. Cecen *et al.* (2017) byl připraven dvouvrstvý scaffold, také bez použití elektrostatického zvlákňování. Jako nosná struktura byla použita přírodní houba (lufa), která byla postupně ponořována do různých polymerních roztoků. Takto byly připraveny dvě vrstvy, které byly slepeny fibrinovým lepidlem, jak lze vidět na Obrázku 3. Předpokládalo se, že taková struktura dobře splní požadavky kladené na osteochondrální scaffoldy, které musí podporovat jak léčbu chrupavky, tak podchondrální kosti přímo pod kloubovou chrupavkou. Pomocí *in vitro* testů byla potvrzena dobrá proliferace chondrocytů i osteoblastů. Také v publikaci od L. Dong *et al.* (2017) byl vyroben scaffold pro kostní tkáňové inženýrství kombinací 3D tisku polymeru PCL a následné inkorporace chitosanového hydrogelu do struktury. Podařilo se tak sloučit výhody obou materiálů a vytvořit scaffold s dobrými mechanickými vlastnostmi a zároveň vhodným prostředím pro proliferaci buněk.



Obrázek 3: Příprava vícevrstvého tkáňového scaffoldu lepením jednotlivých vrstev fibrinovým lepidlem. Převzato a přeloženo z (Cecen *et al.* 2017).

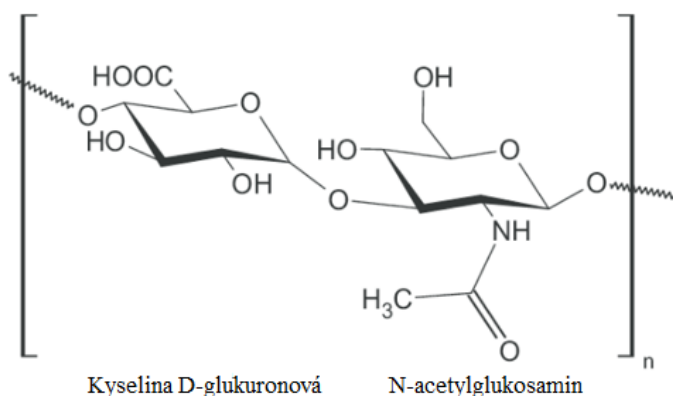
2.3 Materiály pro přípravu vláknenných tkáňových nosičů

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.2, na vlastnosti scaffoldu je kladena celá řada požadavků a volba výrobního materiálu je proto posuzována z několika hledisek. Pro výrobu vláknenných scaffoldů se nejčastěji používají polymery. V odborné literatuře se polymery pro tkáňové inženýrství obvykle dělí na přírodní a syntetické (Wolfová *et al.* 2015). S ohledem na cíle této diplomové práce a použité materiály jsou zde netradičně děleny na hydrofilní a hydrofóbní.

Mezi používané hydrofilní polymery se řadí chitosan, želatina, kolagen, HA, PVA, PEO a polyvinylpyrolidon. Naopak jako hydrofóbní polymery lze uvést PCL, PLA, kyselinu poly-glykolovou (PGA) a jejich kopolymery, polyuretan a další (Maitz 2015; Cortizo a Belluzo 2017; Kumar a Han 2017).

2.3.1 Hydrofilní polymery

Kyselina hyaluronová je přírodní polymer s vysokou molekulovou hmotností, která může dosáhnout až více než $4 \cdot 10^6$ Da (Kwiecinski *et al.* 2011). Z hlediska struktury se HA řadí mezi lineární polysacharidy, opakující se monomerní jednotku tvoří disacharid. Disacharidickou jednotku představují dva monosacharidy, jedná se o N-acetylglukosamin a kyselinu D-glukuronovou, které jsou spojeny β -1,3 glykosidickou vazbou, jak lze vidět na Obrázku 4 (Stratton *et al.* 2016).



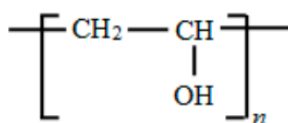
Obrázek 4: Struktura kyseliny hyaluronové. Převzato z (Saboktakin 2011).

HA se v lidském těle nachází jako součást ECM, synoviálních tekutin, v očním sklivci a kůži (Brychta a Staněk 2014). V lidském těle je HA syntetizována v celulární membráně za působení enzymů, které se nazývají hyaluronan syntázy (Siiskonen *et al.* 2015). Uměle lze HA vyrobit pomocí biofermentačních procesů bakterií *Streptococcus* či extrakcí ze zvířecích tkání. Existuje i další technologie, která stojí na katalýze polymerizace disacharidických monomerů pomocí izolované hyaluronan syntázy. Tato poměrně nová metoda výroby by dokázala odstranit problémy, které přináší používané HA bakteriálního či živočišného původu (Boeriu *et al.* 2013). Naopak biodegradace HA probíhá za působení několika druhů hyaluronidáz (Honegrová 2010).

Kyselina hyaluronová vykazuje biokompatibilitu, schopnost tvořit hydrogely, má viskoelastické vlastnosti a je biodegradabilní, tudíž se nabízí její široké využití ve zdravotnictví, dermatologii, farmacii a tkáňovém inženýrství (Yoo *et al.* 2005; Boeriu *et al.* 2013). Dermatologie využívá především schopnost HA hydratovat kůži a redukovat tvorbu jizev. Používá se také pro drobné augmentace, kde ale degradace HA *in vivo* zkracuje výdrž výplně a jedná se spíše o dočasné zvětšení (Brychta a Staněk 2014). Další aplikací HA je viskosuplementace pro synoviální tekutiny. Studie ovšem ukázaly, že HA velmi rychle zdegraduje a léčba tak má velmi malý efekt. Nicméně i nadále lze HA

v ortopedických aplikacích používat, jelikož byly zjištěny protizánětlivé a analgetické účinky HA, čímž jsou zmírňovány bolestivé příznaky artrózy (Dungl 2014).

Polyvinylalkohol patří mezi syntetické lineární polymery. PVA je biokompatibilní, biodegradabilní a v tkáňovém inženýrství lze využít v podobě vláken, hydrogelů a směsí s jinými polymery (Alhosseini et al. 2012; Kamoun et al. 2017). Jak lze vidět na Obrázku 5, monomerní jednotku PVA tvoří vinylalkohol. Vinylalkohol je velmi nestabilní a rychle se rozpadá. Proto se PVA vyrábí polymerizací vinyl acetátu na poly-vinylacetát (PVAc) a následnou hydrolýzou. Výsledkem jsou polymery s různým stupněm hydrolýzy v závislosti na rozsahu reakce, které se dělí na plně a částečně hydrolyzované. Při částečné hydrolýze je PVA tedy vždy kopolymerem PVAc a PVA. Stupeň hydrolýzy se vyjadřuje procenty a obvykle se pohybuje v rozmezí 80 – 99% a více (M. Hassan a A. Peppas 2000; Gaaz et al. 2015). Od stupně hydrolýzy se pak také odvíjí další vlastnosti PVA jako rozpustnost ve vodě, viskozita, povrchové napětí a tedy i obtížnost zpracování takových roztoků elektrostatickým zvlákňováním (Zhou a Wang 2007).



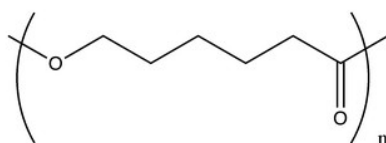
Obrázek 5: Struktura PVA. Převzato z (Gaaz et al. 2015).

2.3.2 Hydrofóbní polymery

Poly-ε-kaprolakton je semikrystalický polyester, jehož strukturu lze vidět na Obrázku 6. Tento syntetický polymer nalezne široké využití v tkáňovém inženýrství pro své dobré mechanické vlastnosti, biokompatibilitu, nízký bod tání (okolo 60°C), mísitelnost s dalšími polymery a postupnou degradaci (Woodruff a Hutmacher 2010; Patrício et al. 2013). PCL je navíc FDA (Food and Drug Administration) schválený, což umožňuje snazší uvedení nového produktu na trh (Woodruff a Hutmacher 2010). Vláknenné vrstvy z PCL se používají jako matrice pro dopravu léčiv, cévní náhrady, kostní scaffoldy, kožní kryty ran a další (Mondal et al. 2016).

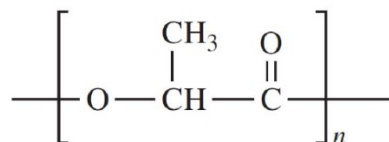
PCL lze připravit katalytickou polymerizací ε-kaprolaktonu za otevření kruhu. Degradace PCL pak probíhá neenzymatickou hydrolýzou esterové vazby, a po dosažení dostatečně nízké molekulové hmotnosti dojde k intracelulární degradaci fragmentů PCL (Woodruff a Hutmacher 2010).

PCL je rozpustný např. v chloroformu, dichlormethanu, benzenu, toluenu, méně poté v acetonu a dimethylformamidu a prakticky nerozpustný v alkoholu a diethyletheru (Woodruff a Hutmacher 2010). Jeho mísitelnosti s dalšími polymery se často využívá v různých odvětvích tkáňového inženýrství. Jako příklad lze uvést kostní tkáňové inženýrství, kde je vyvíjena snaha na zvýšení mechanických vlastností scaffoldu. Toho lze odsáhnout například kombinací PCL a poly-mléčné kyseliny (PLA) (Patrício et al. 2013). Naopak pro kryty ran je možné PCL mísit s přírodními polymery jako je chitosan nebo želatina a tím dosáhnout vyšší buněčné adheze (Mondal et al. 2016).



Obrázek 6: Struktura PCL. Převzato z (Coelho et al. 2010).

Kyselina poly-mléčná se řadí mezi syntetické polymery. PLA je biokompatibilní a biodegradabilní alifatický polyester s vhodnými mechanickými vlastnostmi pro řadu oblastí biomedicíny (Barnes a Harris 2008). Jako porézní scaffold tak nalezne využití v kardiovaskulárním, kostním, kloubním a neurologickém tkáňovém inženýrství (Santoro et al. 2016). Struktura PLA je znázorněna na Obrázku 7. PLA se nejčastěji připravuje polykondenzací kyseliny mléčné nebo polymerizací laktidu za otevření kruhu (Xiao et al. 2012). Molekula PLA je chirální a existuje její L- nebo D- isomer a jejich kombinace (Savioli Lopes et al. 2012). Nejčastěji se používá kyselina poly-L-mléčná (PLLA), jelikož při hydrolytické degradaci esterových vazeb vzniká kyselina L-mléčná, která se přirozeně vyskytuje v lidském těle (Barnes a Harris 2008).



Obrázek 7: Struktura PLA. Převzato z (Ghanbarzadeh a Almasi 2013).

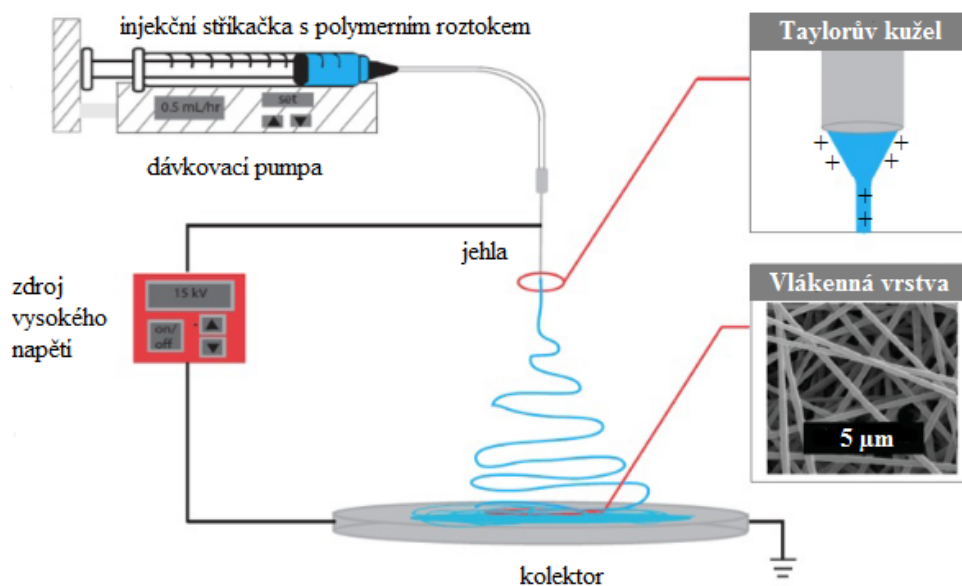
2.4 Proces výroby – Elektrostatické zvlákňování

Nanovláknenné scaffoldy pro tkáňové inženýrství lze vyrobit pomocí několika metod. Jedná se o elektrostatické zvlákňování, dloužení (drawing), fázovou separaci a samoorganizaci. Elektrostatické zvlákňování je nejpoužívanějším přístupem. Kromě vzrůstajícího zájmu o nanotechnologie v posledních dvaceti letech je důvodem

ekonomická výhodnost procesu, jednoduchá obsluha zařízení a variabilita procesu. Změnou vzdálenosti elektrod, korigováním použitého napětí, mísením zvlákňovacích roztoků a dalších parametrů je možné dosáhnout morfologicky různých vláknenných scaffoldů. Lze takto zvláknit řadu syntetických i přírodních polymerů a jejich směsí. Navíc na trhu jsou dostupné různé aparatury pro laboratorní výzkum, ale i stroje pro průmyslovou výrobu. (*Li Wan- Ju et al. 2007*)

2.4.1 Princip elektrostatického zvlákňování

Aparatura pro laboratorní elektrostatické zvlákňování se skládá ze tří základních komponent, a to sice zdroje vysokého napětí, zvlákňovací elektrody a kolektoru (*Garg a Bowlin 2011*). Jehlová aparatura pro laboratorní využití je zachycena na Obrázku 8. Proces tvorby vláken začíná přivedením vysokého elektrického napětí na zvlákňovací elektrodu a tím vytvořením elektrostatického pole mezi onou elektrodou a kolektorem, který je uzemněn nebo opačně nabit. Zvlákňovací elektroda pro laboratorní využití často bývá jehla, do které je z injekční stříkačky dávkován polymerní roztok, a na konci jehly je tvořena kapka polymerního roztoku. Vlivem vnějšího elektrického pole dojde k indukci náboje na povrchu polymerní kapky. Tento náboj je stejné polarity jako vysokonapěťový zdroj a tím pádem je přitahován ke kolektoru. Částice stejného náboje se vzájemně odpuzují, zároveň se ale kapalina snaží držet svůj tvar díky povrchovému napětí. V důsledku dojde k deformaci polokulovitěho tvaru kapky na konci jehly do kónického tvaru. Při dalším zvyšování intenzity pole dojde k dosažení tzv. kritického napětí, při kterém je překonáno napětí povrchové, a z Taylorova kužele se začne tvořit proud roztoku, který míří k oblasti nižšího potenciálu (kolektor). Proud roztoku následně prochází stabilní a nestabilní fází. V rámci bičující nestability dochází k dloužení, úžení a rapidnímu odpařování rozpouštědla. Na kolektor pak ideálně dopadají suchá vlákna (*Huang et al. 2003; Li Wan-Ju et al. 2007*).



Obrázek 8: Aparatura pro elektrostatické zvlákňování z jehly. Převzato z (Zagho a Elzatahry 2016).

Pro průmyslovou výrobu nanovláknenných vrstev se často využívá technologie Nanospider™, která byla vyvinuta profesorem Jirsákem *et al.* z Technické univerzity v Liberci v roce 2003. Zvlákňovací elektrodou v Nanospider™ je struna, na kterou je z uzavřené nádrže natírán polymerní roztok. Vlivem elektrostatického pole se na celém povrchu tenké struny formují Taylorovy kužele a zvlákňování je tak daleko produktivnější, než při použití samostatné jehly. Výsledná vlákenná vrstva je ukládána na netkanou textilií, tzv. spunbond, která je převíjena dle nastavené rychlosti. Při správném nastavení vzdálenosti mezi elektrodami a dalších parametrů dopadají na spunbond suchá nanovláknena (Yalcinkaya 2016).

2.4.2 Parametry elektrostatického zvlákňování

Při elektrostatickém zvlákňování je nutné korigovat hned několik operačních podmínek, které mají zásadní vliv na výslednou morfologii vláken. Tyto parametry lze rozdělit do tří základních skupin, kterými jsou vlastnosti polymerního roztoku, procesní parametry a okolní podmínky.

Mezi důležité vlastnosti polymerního roztoku patří koncentrace, viskozita, vodivost a povrchové napětí. Viskozita je přímo úměrně závislá na koncentraci roztoku. Všeobecnou překážkou při zvlákňování vysokomolekulárních biopolymerů je vysoká viskozita, která znemožňuje tvorbu vláken. Roztoky lze pak zpracovat elektrostatickým zvlákňováním pouze při nízkých koncentracích. Na druhou stranu, přílišné snížení koncentrace vede spíše k elektrostatickému rozprašování (electrospraying) (Wei 2012;

Brenner et al. 2012). Elektrická vodivost je další z důležitých vlastností roztoku. Se zvyšující se elektrickou vodivostí je snižován průměr vláken a tvořena uniformní síť nanovláken. Protože většina biodegradabilních polymerů nenesou náboj, elektrická vodivost se zvyšuje pomocí vhodných rozpouštědel. Pro PCL se tak používá například *N,N*-dimethylformamid (DMF), který má vysokou dielektrickou konstantu (*Li Wan- Ju et al. 2007*). Pro zvýšení vodivosti se do zvlákňovacích roztoků přidávají soli (*Qin et al. 2006*). Ve studii od *Zhang et al. (2005)* bylo pozorováno zvýšení vodivosti roztoků PVA a snížení průměrů vláken po přidání NaCl. Také vysoká hodnota povrchového napětí znesnadňuje tvorbu vláken. Povrchové napětí lze ovlivňovat přidávkou surfaktantů jako například TRITON-X 100, který je ovšem toxický a je nutné zvážit riziko jeho přítomnosti v nanovlákněch (*Kalarikkal et al. 2016*).

Mezi procesní parametry patří především velikost napětí, vzdálenost mezi elektrodami a rychlost dávkování roztoku. Velikost napětí je stěžejní pro celý proces zvlákňování. Napětí musí být dostatečně vysoké, aby došlo k tvorbě Taylorova kuželu a polymerních trysek. Efekt aplikovaného napětí na průměr vláken je kontroverzní. Byla zveřejněna studie od *Beachley a Wen (2009)*, ve které je patrné snížení průměru vláken PCL při zvyšujícím se napětí. Na druhou stranu, v publikaci autorů *S. Huan et al. (2015)* byl pozorován zvyšující se průměr vláken polystyrenu při zvyšujícím se napětí. Také vzdálenost mezi elektrodami je nutné vhodně nastavit, aby došlo k odpaření rozpouštědel a vznikala suchá vlákna.

Celý proces je ovlivněn také okolními podmínkami, jako jsou okolní teplota, vlhkost a další. Zvláště u vodných roztoků biopolymerů je ale nutné, aby okolní vlhkost nebyla vysoká. Při přílišné vlhkosti nedojde k odpaření rozpouštědla. Ve článku od *Um et al. (2004)* bylo zajištěno dostatečné odpařování pomocí metody electroblowing, což je modifikace klasické aparatury pro elektrostatické zvlákňování. Při tomto zpracování nanovláken proudí vzduch okolo elektrody, ze které se zvlákňuje polymerní roztok, a proud vzduchu tak urychluje vypařování rozpouštědla. Pomocí úpravy rozpouštědlového systému, molekulové hmotnosti HA a modifikací aparatury se tak podařilo připravit nanovláknennou vrstvu HA, která je jinak obtížně zvláknitelná.

2.5 Povrchové modifikace vláknenných vrstev

Pro dosažení adekvátní interakce mezi tkáňovým nosičem a buňkami jsou klíčové povrchové vlastnosti scaffoldu. Biodegradabilní polyestery jako PCL, PLA, PGA a jejich

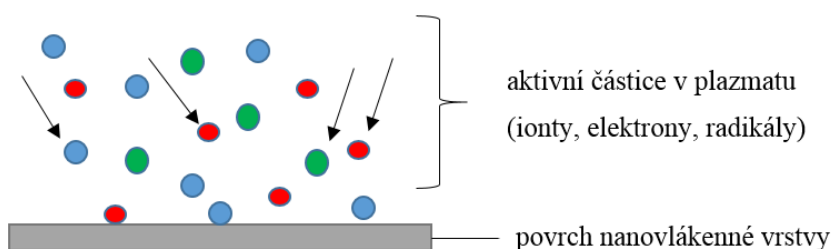
kopolymery jsou sice hojně používané v tkáňovém inženýrství pro svou biokompatibilitu, biodegradabilitu a mechanické vlastnosti. Nicméně jejich nízká smáčivost a hydrofobicita může tvořit překážku v dostatečné buněčné kolonizaci. Nejen z těchto důvodů se způsoby povrchových úprav vláknenných vrstev v posledních letech těší velké pozornosti (Rigogliuso et al. 2012; Janvikul et al. 2013). Metody povrchových úprav lze rozdělit do dvou základních skupin, jedná se o (1) fyzikální modifikace, do kterých patří vysoko-teplotní úpravy a vysoko-energetické iradiační procesy jako plazmatická úprava či vystavení gamma a UV záření, a (2) chemické modifikace, jako například chemické depozice z plynné fáze nebo chemické povrchové úpravy za mokra (Drioli et al. 2017; Kim et al. 2018).

2.5.1 Plazmatická úprava nanovláknenných vrstev

Plazmatická úprava nanovláken je hojně používanou metodou. Výhody povrchových úprav nanovláken pomocí plazmatu tkví ve všestrannosti, jelikož do vláknenných struktur lze zavést různé funkční skupiny v závislosti na parametrech plazmatických procesů (Chen a Su 2011). Navíc je možné modifikovat povrch vláken bez ovlivnění bulkových vlastností (Martins et al. 2009). Úprava plazmatem také nevyžaduje přítomnost žádných toxických rozpouštěděl a v odborné literatuře je zaznamenáno několik případů použití plazmatu pro biomedicínu, ať už se jedná o zlepšení biokompatibility, zvýšení smáčivosti polyesterových scaffoldů, či vytvoření funkčních skupin pro připojení dalších molekul, například léčiv (Valence et al. 2013; Liu et al. 2014). Plazmatická úprava tak otevírá nové možnosti biokompatibilní úpravy vláknenných scaffold, avšak tato metoda má i jisté nevýhody. Jedná se například o obtížnou reprodukovatelnost, kdy operační parametry jako průtok plynu, tlak vakua, použité napětí nemusí nutně vést k depozici stejného množství funkčních skupin na povrch scaffoldu. Optimální procesní parametry také musí být samostatně nalezeny pro každé zařízení a metodu modifikace (Sarmadi 2013).

Plazma je částečně ionizovaný plyn, který se skládá elektronů, iontů, radikálů a neutrálních atomů a molekul. Plazma vzniká tak, že neutrálnímu (zásobnímu) plynu je dodávána energie. Dostatečný přísun energie pro generování a udržení plasmy je nutné udržet po celou dobu procesu a vhodných zdrojů existuje hned několik. Jedním z nejpoužívanějších přístupů pro technologické aplikace je použití elektrického pole. Jinými slovy, volné elektrony v neutrálním plynu jsou pomocí elektrického pole urychlovány na energie dostatečné k ionizaci. Ionizace nastává, když dojde ke srážkám elektronů s dostatečnou energií s neutrálními atomy a molekulami zásobního plynu

(Conrads a Schmidt 2000; Bittencourt 2004; Fridman a Kennedy 2012). Do používaných zásobních plynů patří kyslík (O_2), vodní pára, fluorid sírový (SF_6), chlorid titaničitý ($TiCl_4$), amoniak (NH_3), dusík (N_2), oxid uhličitý (CO_2), tetrafluormethan (CF_4), argon (Ar) a další. Na povrch materiálu lze tak navázat karbonylové (v případě CO_2), hydroxylové (v případě O_2 a vodní páry) a aminové nebo amidové funkční skupiny (v případě NH_3 nebo N_2) (Fridman 2008; Drioli et al. 2017). Na Obr. 9 je znázorněna interakce částic plazmatu s nanovlákněným povrchem, která vede ke změně vlastností.



Obrázek 9: Interakce částic plazmatu s nanovlákněným povrchem.

Plazma se dělí na tzv. studené a horké. V horkém plazmatu je teplota elektronů, atomů a molekul extrémně vysoká a blíží se tepelné rovnováze. Při těchto podmínkách jsou molekuly prakticky ionizované. Naopak v případě studeného plazmatu mají vysokou teplotu pouze elektrony, zatímco ionty setrvávají při pokojové teplotě a pouze malý podíl molekul plynu je ionizováno. Studené plazma je tak vhodné používat i pro polymerní a textilní povrchy, které jsou citlivé na vysoké teploty, při kterých degradují (Muthu 2014).

V závislosti na druhu reaktivního plynu, teplotě a délce procesu lze plazmatickou úpravou vytvořit více hydrofilní, ale i hydrofóbní povrch. V této diplomové práci byla povrchová úprava studeným plazmatem použita pro modifikaci hydrofilních stran dvouvrstvých vlákněných nosičů, to znamená pro PVA a HA vlákna. Taková povrchová úprava může vést ke zvýšení hydrofobicity a případně zesílení vodorozpustných polymerů. Tento přístup je poměrně nový a existuje pouze několik publikací věnující se této problematice.

Polymer HA se síťuje pro vytvoření ve vodě nerozpustné HA, zpomalení hydrolytické degradace, která v lidském těle nastává rychle, a případně i zlepšení mechanických vlastností (Tomihata a Ikada 1997; Fan et al. 2014). HA lze běžně síťovat za přidání různých chemických aditiv jako glutaraldehyd, divinyl sulfon, glyoxal a butandiol-diglycidyl ether, nebo pomocí UV záření (Khunmanee et al. 2017). Síťování PVA se také věnuje řada studií, lze tak provést za přítomnosti činidla glutaraldehydu,

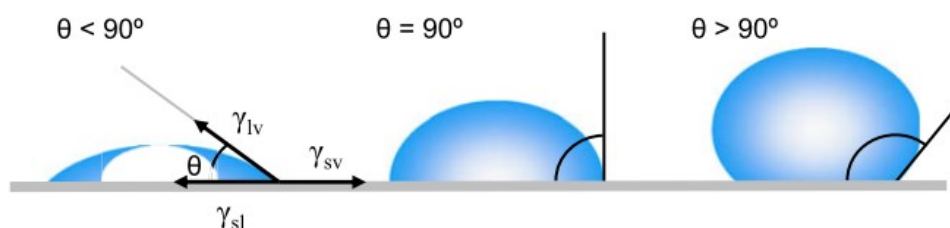
chemickou reakcí s glyoxalem nebo s boráty či vystavením UV záření (Kamoun *et al.* 2017). Avšak chemická síťovací činidla mohou působit cytotoxicky a není tak vhodné výsledné vrstvy používat pro účely biomedicíny (Liguori *et al.* 2016). Plazmatická úprava oproti tomu nabízí novou metodu síťování bez chemických aditiv.

Bylo vydáno několik článků, které se věnují síťování jiných polysacharidů za využití plazmatu. Ve studii od Molina *et al.* (2014) byla představena nová metoda přípravy zesíťovaných hydrogelů polysacharidu chitosanu. Jako metoda pro úspěšné síťování byla zvolena atmosférická plasma s dielektrickým bariérovým výbojem (DBD). Chemická struktura chitosanu přitom nebyla změněna. V roce 2015 byla vydán článek od A. Liguori *et al.*, ve kterém byla poprvé zesíťována vlákna polysacharidu pullulanu za použití atmosférického plazmatu s DBD. Podařilo se tak vytvořit ve vodě nerozpustnou vláknennou vrstvu bez změny morfologie či průměr vláken. Efektivita byla zkoumána ponořením naplasmovaných vzorků do destilované vody (DIW) a následným pořízením SEM snímků. Změny v chemické struktuře pullulanu pak byly vyhodnoceny pomocí infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací s technickou zeslabeného úplného odrazu (ATR-FTIR), kde se ukázal pokles hydroxylových skupin (Liguori *et al.* 2015). Podobný přístup byl úspěšně aplikován i v další studii od Liguori *et al.* (2016), kde bylo znovu aplikováno atmosférické plasma s DBD na elektrostaticky zvlákněný polysacharid, konkrétně želatinu. Podobně lze upravovat i PVA povrchy a obdobných výsledků bylo dosaženo například ve studii od A. Thongpud *et al.* (2008), kde se podařilo vytvořit hydrofóbní povrch PVA vláken pomocí plazmatu se zásobním plynem SF₆.

2.5.2 Měření smáčivosti materiálu pomocí kontaktního úhlu

Míra smáčivosti tkáňových nosičů je velice důležitým parametrem. Smáčivost vyjadřuje, jak tekutina adhezuje k povrchu materiálu, přímo souvisí s povrchovou energií a lze ji kvantifikovat pomocí měření kontaktního úhlu (Menzies a Jones 2010). Kontaktní úhel vyjadřuje chování kapky tekutiny na povrchu materiálu. Jak lze vidět na Obrázku 10, kontaktní úhel θ je definován jako úhel, který svírá tečna k povrchu kapaliny (vedená v bodě kontaktu se všemi třemi fázemi) a povrch materiálu (Zhao a Jiang 2018). Pokud je kontaktní úhel menší než 90°, znamená to, že adhezní síly mezi kapalinou a materiálem jsou vyšší než kohezní síly mezi molekulami kapaliny. Materiál má vysokou povrchovou energii, povrch je smáčivý a kapalina se po něm rozprostře. Naopak úhel vyšší než 90° značí, že kohezní síly mezi molekulami vody nebyly překonány silami

adhezními. Jinými slovy, materiál má nízkou povrchovou energii, jedná se o nesmáčivý povrch a kapalina se snaží minimalizovat kontakt, takže zůstane ve tvaru kapky (von Fraunhofer 2012; Bracco a Holst 2013). Pokud byla jako testovací kapalina použita voda, povrchy se pak značí jako hydrofilní ($\theta < 90^\circ$) nebo hydrofóbní ($\theta > 90^\circ$) (Law 2014).

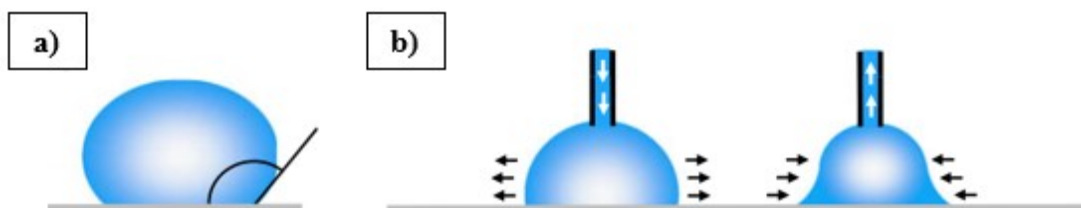


Obrázek 10: Znáznornění kontaktních úhlů, které dělí materiály na smáčivé ($\theta < 90^\circ$) a nesmáčivé ($\theta > 90^\circ$). Převzato z (Bracco a Holst 2013).

Existuje několik metod měření kontaktního úhlu, které lze rozdělit do dvou základních skupin. Jedná se o přímé optické metody a nepřímé silové metody (Bracco a Holst 2013). Mezi přímé optické metody se řadí metoda sedící kapky a metoda přisedlé bubliny, při kterých je kontaktní úhel vyhodnocen pomocí obrazové analýzy. Naopak mezi nepřímé silové metody patří např. Wilhelmyho metoda, při které se do kapaliny ponoří materiál ve tvaru rovné destičky. Pomocí citlivých vah je pak měřena síla potřebná k vyvážení destičky (Bartovská a Šišková 2005; Grulich 2015).

Nejpoužívanější laboratorní metodou je metoda přisedlé kapky. I při této metodě existují dva způsoby, jak změřit kontaktní úhel, a to sice statická a dynamická metoda (viz Obrázek 11). Při statické metodě je na rovný vodorovný povrch materiálu pipetou nadávkována kapka (několik mikrolitrů). Následně je snímán profil kapky na povrchu a vypočten kontaktní úhel pomocí goniometru (Bracco a Holst 2013). Pokud taková analýza není dostatečná, lze využít i dynamické metody, při kterém je manuálně zasahováno do objemu nadávkové kapky na povrchu (Korhonen et al. 2013).

Při dynamickém měření může být objem kapaliny zvětšován či zmenšován. Při zvětšování objemu kapaliny je měřen největší možný kontaktní úhel bez zvýšení mezifázové oblasti mezi kapalinou a povrchem, tedy tzv. postupující (advancing) úhel. Naopak při zmenšování objemu je určen tzv. ustupující (receding) úhel, což je nejmenší možný kontaktní úhel bez snížení mezifázové oblasti mezi kapkou a materiálem (Bandyopadhyay a Bose 2013).



Obrázek 11: Statické (a) a dynamické měření kontaktního úhlu (b). Při dynamickém měření lze měřit postupující (advancing) a ustupující (receding) kontaktní úhel. (Bracco a Holst 2013)

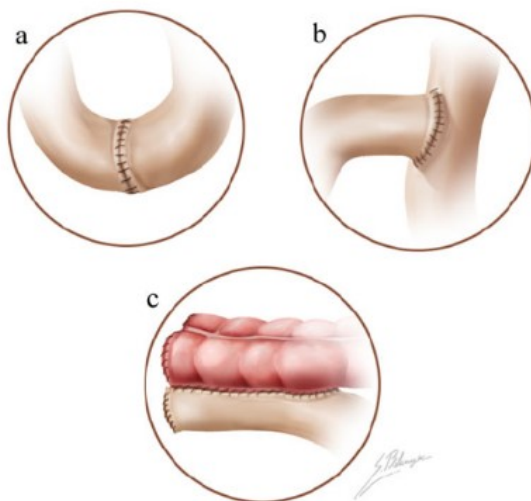
3 Střevní anastomózy

3.1 Úvod do problematiky

Chirurgická anastomóza je uměle vytvořené spojení mezi dvěma dutými orgány. Při chirurgickém zákroku v oblasti gastrointestinálního traktu se postižená část traktu odstraní. Oba konce trubice se následně spojí tzv. anastomózou (*Zachová 2010*). Pro úspěšný průběh hojení je nutné dodržet několik zásadních podmínek při zakládání chirurgického spojení. Jedná se o následující body: (A) oba konce trubice musí být spojeny bez tahu, (B) oba konce trubice musí dobře přiléhat, (C) oba okraje musí i po spojení vykazovat dostatečné krevní zásobení, (D) spojení nesmí bránit normální funkci trávicího traktu a způsobovat poruchy střevní pasáže (*Mortensen a Ashraf 2008; Goulder 2012*). Zároveň nesmí docházet k prosakování obsahu střev skrze anastomózu, netěsnost této chirurgické spojky může vést až k úmrtí pacienta (*Shein a Rogers 2011*).

Nejčastější techniky tvorby chirurgické anastomózy jsou dva a to sice 1) ruční šití a 2) použití staplerů (*Yao et al. 2016*). Volba jedné z technik záleží spíše na preferencích chirurga a zvyklostech pracoviště. Randomizované studie neukázaly větší výskyt netěsnosti anastomózy v případě použití jedné či druhé techniky (*Chen 2012*). V případě ručního šití se používají syntetické nevstřebatelné a hlavně vstřebatelné materiály. Ideální šicí materiál je takový, který nezpůsobuje nežádoucí imunologickou odezvu a zároveň poskytuje dostatečnou mechanickou pevnost. Mezi často používané materiály patří Monosyn® (B. Braun), polyglaktin 910 (např. Vicryl), polydioxanon a hedvábí (*Chen 2012; Blažej et al. 2015*). Druhá možnost, použití staplerů, je známa již přes 100 let, avšak častému využití se těší až s příchodem moderních přístrojů s velmi nízkým výskytem technických problémů a snazší manipulací (*Mortensen a Ashraf 2008*). Tyto přístroje různých typů a velikostí obsahují sterilizované svorky, pomocí kterých jsou uzavřeny rány či chirurgické incize. Staplery představují rychlou metodu spojení tkání a tím pádem i kratší dobu anestezie. Tkáň není tolik poškozena jako při ručním šití, na druhou stranu je nutné stapler precizně umístit, chybné spojení tkáně pomocí svorek je v porovnání se šicí technikou komplikovanější na opravu (*Association of Surgical Technologists 2016*). Pro střevní anastomózy se používají tři druhy staplerů v závislosti na typu založení anastomózy (*Mortensen a Ashraf 2008*).

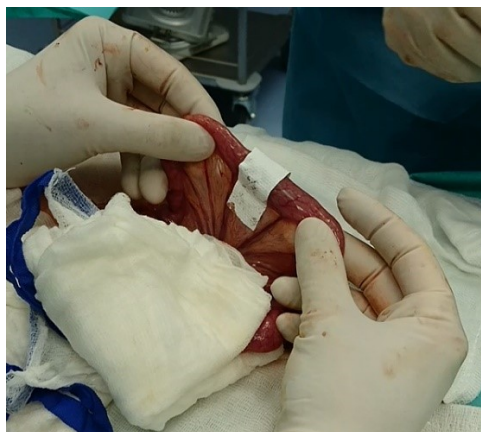
Hlavní typy založení anastomóz existují tři. Jedná se o (a) *end to end* – oba konce k sobě (b) *end to side* – koncem ke straně, a (c) *side to side* – stranou k straně. Tyto techniky vytvoření anastomózy jsou znázorněny na Obrázku 12.



Obrázek 12: Možnosti založení střevních anastomóz. a) End-to-end anastomóza mezi segmenty tenkého střeva. b) End-to-side anastomóza mezi dva segmenty tenkého střeva. c) Side-to-side anastomóza mezi tenkým a tlustým střechem. Převzato z (Gerardo Terrone et al. 2011).

V posledních letech se objevilo několik publikací, které se zabývají vývojem nových metod uzavírání intestinálních anastomóz. Pozornost je kladena především na spojování konců střeva pomocí tkáňových lepidel. Tkáňová lepidla jsou dostupná na bázi kyanoakrylátů, glutaraldehydu, fibrinu a polyethylenoxidových hydrogelů. Každý z těchto druhů přípravků má však jisté nevýhody, ať už se jedná o vysokou cenu, komplikovanou přípravu nebo riziko toxicity vůči tkáním (Behrens Adam M. et al. 2015). Byla zveřejněna studie od autora T. Nordentoft (2015), věnující se vláknenné kolagenové náplasti, která sloužila jako matrice pro fibrinové lepidlo. Tento produkt je známý pod obchodním názvem TachoSil®. Studie ukázala, že uzavírání střevních anastomóz pomocí TachoSil® je bezpečné, nicméně efekt léčení a zabránění komplikací nebyl pozorován (Nordentoft 2015). Pro snížení krvácení a redukci anastomotického leaku po použití staplerů existuje na trhu produkt s názvem Gore® Seamguard®. Tento syntetický porézní materiál je vyroben z PGA a trimethyl-karbonátu. V klinických testech byla testována pouze fibrinová lepidla a Gore® Seamguard®, v největších randomizovaných studiích se však neprokázal pokles v incidenci anastomotického leaku (Boersema et al. 2017). Nanovláknenné materiály se v klinické praxi zatím nevyužívají. Na Obr. 13 je zachycena část tenkého střeva prasete s vláknenných materiálem. Jedná se

o PCL vláknennou vrstvu, kterou je obaleno místo, kde byla provedena anastomóza. Fotografie byla pořízena během prvotních *in vivo* testů, provedených v Biomedicínském centru v Plzni. Implantované vláknenné materiály byly vyrobené na Technické univerzitě v Liberci na zařízení Nanospider™.



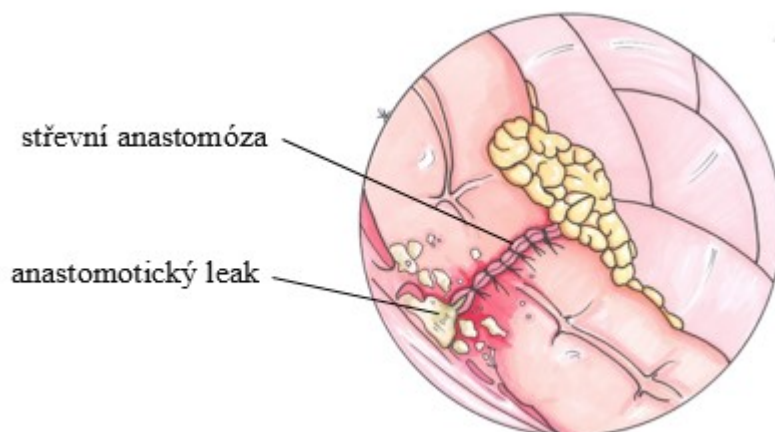
Obrázek 13: Vláknenný PCL nosič překrývá chirurgickou anastomózu, která byla vytvořena na tenkém střevě prasete.

3.2 Pooperační komplikace střevních anastomóz

Od prvního provedení gastrointestinální anastomózy proběhlo již zhruba 200 let. Od té doby je vyvíjeno úsilí zlepšit operační techniky a hlavně minimalizovat pooperační komplikace. I přes rostoucí znalost problematiky a existenci kvalitních nástrojů pro vytvoření anastomóz stále dochází k selhání těchto uměle vytvořených chirurgických spojek (*Betzold a Laryea 2014; Thomas a Margolin 2016*). Taková selhání vedou k akutním i dlouhodobým zdravotním problémům. Nejčastější problémy zahrnují infekci v ráně, krvácení, leak z anastomózy, zúžení střevní trubice až neprůchodnost (*Kirchhoff et al. 2010; Umanskiy a Hyman 2016*).

Jednou z nejobávanějších komplikací je právě netěsnost anastomózy, která vede k tzv. leaku střevního obsahu skrze anastomózu (viz Obrázek 14). Tato závažná komplikace signifikantně zvyšuje pooperační mortalitu a morbiditu (*Gessler et al. 2017*). Při léčbě je klíčová včasná detekce leaku, která ovšem stále zůstává obtížným úkolem kvůli různým klinickým projevům (*Popescu et al. 2017*). Všeobecně naznačují anastomotický leak příznaky pacienta jako agonizující bolest břicha, vysoká horečka, tachykardie (*Hyman et al. 2007*). Zpožděná detekce však přispívá k rozšíření kontaminaci dutiny břišní a sepsi. Sepse je charakterizována jako reakce organismu na mikrobiální infekci. Může se vyvinout až do septického šoku a selhání orgánů,

což vede ke smrti pacienta (Polat et al. 2017). Existuje několik faktorů ovlivňující vznik leaku. Patří mezi ně stav pacienta, vzdálenost anastomózy od konečníku, přičemž nejhůře se hojí spojení tlustého střeva a nejnižší části konečníku, zkušenosti operátora a další. Mezi riskantní faktory patří diabetes, kouření, kardiovaskulární onemocnění, anémie, vysoký věk, obezita, předešlé absolvování chemoterapie nebo radioterapie a medikace, zejména imunosupresivní léčiva (Chen 2012; Mcdermott et al. 2016).

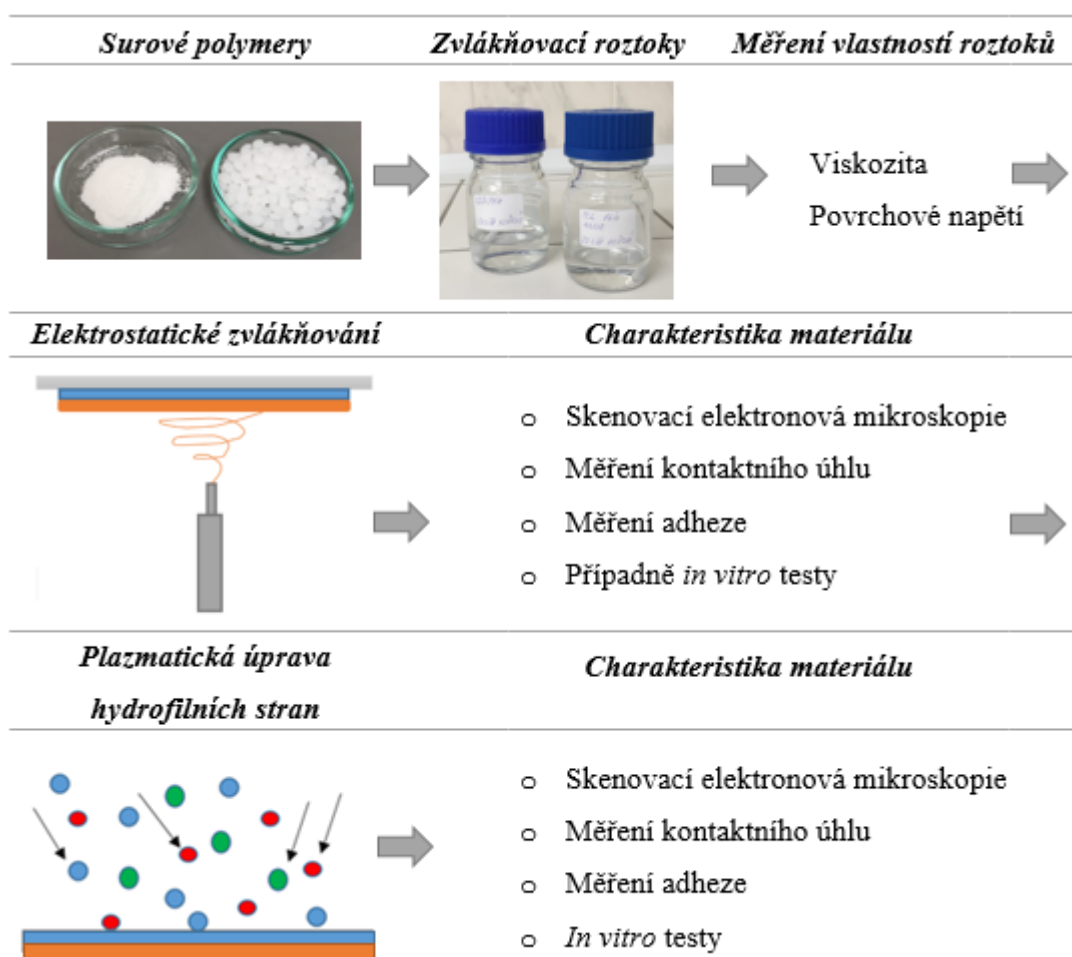


Obrázek 14: Anastomotický leak v dutině břišní (Rowe 2018).

PRAKTICKÁ ČÁST

V rámci praktické části diplomové práce byly vyrobeny dva dvouvrstvé vlákenné materiály, které byly následně podrobeny povrchové úpravě. Praktická část se tak skládá ze tří stěžejních kapitol, kterými jsou (a) Experiment 1 – Dvouvrstvý vlákenný materiál PVA/PCL, (b) Experiment 2 – Dvouvrstvý vlákenný materiál HA/PCL a (c) Experiment 3 – Povrchová úprava hydrofilních stran dvouvrstvých vlákenných materiálů pomocí plazmatického procesu.

Výsledky jsou pak uvedeny u každé kapitoly a následně diskutovány. Pro lepší přehlednost bylo vytvořeno schéma na Obrázku 15, které vyjadřuje jednotlivé zásadní kroky, které byly provedeny v rámci experimentální části.



Obrázek 15: Schéma jednotlivých kroků při výrobě dvouvrstvých vlákenných materiálů.

4 Experiment 1 – Dvouvrstvý vlákenný materiál polyvinylalkohol/poly- ϵ -kaprolakton

4.1 Metody

4.1.1 Příprava polymerních roztoků

Byl připraven 12% w/w vodný roztok PVA, a to sice ředěním 16% PVA Sloviol R (M_w 130,000 g/mol, 88% hydrolýzy, Novácké chemické závody, a.s.). Poly- ϵ -kaprolakton (M_w 43,000 g/mol, Polysciences) byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému chloroform (Penta)/kyselina octová (Penta)/ethanol (Penta) 8/1/1 (v/v/v). Koncentrace PCL v rozpouštědlovém systému činila 16% w/w. Takto připravené roztoky byly za stálého míchání rozpouštěny po dobu 24 hodin a ihned zvlákněny.

4.1.2 Měření vlastností zvláknovacích roztoků

Viskozita byla měřena při konstantních otáčkách na rotačním viskozimetru HAAKETM Roto ViscoTM 1 od firmy ThermoFisher. Měření bylo provedeno při konstantní smykové rychlosti 400 s⁻¹. Dávkované množství polymerních roztoků pro měření bylo vždy 300 μ l. Měření bylo opakováno třikrát pro každý roztok a byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Povrchové napětí bylo určeno pomocí přístroje PocketDyne od firmy Krüss. Tento přístroj měří maximální tlak, který je potřebný k vytlačení bubliny z kapiláry do měřeného roztoku. Naměřený tlak je přímo uměrný povrchovému napětí roztoku, které přístroj vypočítá. Měření bylo provedeno desetkrát pro každý roztok a z naměřených dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

4.1.3 Elektrostatické zvláknování

Elektrostatické zvláknování bylo provedeno na přístroji NanospiderTM typu NS 1WS500U od firmy Elmarco, zvláknovací elektrodou byla struna, na kterou byl nanášen roztok ze zásobníku s průvlakem o průměru 0,6 mm. Roztoky byly zvlákněny postupně, tedy nejprve byl zpracován jeden polymerní roztok a následně byl vyměněn obsah zásobníku za druhý polymer. Byly ověřeny oba způsoby vrstvení, nejprve byla ukládána na spunbond vlákna PVA a poté vlákna PCL. Ve druhém experimentu bylo postupováno v opačném pořadí. Parametry zvláknování jsou vypsány v Tabulce 1.

Tabulka 1: Parametry zvlákňování roztoků PVA a PCL na NanospiderTM.

	PVA	PCL
Napětí na struně [kV]	47,4 kV	46,1 kV
Napětí na kolektoru [kV]	- 10,3 kV	- 10,4 kV
Vzdálenost elektrod [cm]	15,9 cm	18,4 cm
Odtah substrátu [mm/min]	14 – 15 mm/min	15 – 17 mm/min
Rychlost cartridge [mm/s]	133,8 mm/s	133,8 mm/s
Teplota [°C]	23°C	23°C
Vlhkost [%]	42 – 43%	42 – 43%

4.1.4 Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky morfologie vlákných vrstev byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe. Pro zvýšení vodivosti byly vzorky pozlaceny 7 nm vrstvou zlata na přístroji Q150ES of firmy Quorum Technologies. Snímky byly pořízeny v různých zvětšeních, aby byla umožněna dostatečná morfologická charakteristika vrstev. Průměry vláken byly měřeny v programu NIS Elements od společnosti Laboratory Imaging s.r.o. . Bylo změřeno 100 průměrů na snímcích se zvětšením 5000x. Výsledky průměrů jsou tak vždy uvedeny ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka.

4.1.5 Měření kontaktních úhlů

Kontaktní úhly vlákných vrstev byly určeny pomocí přístroje See System 6.2 od firmy Advex Instruments. Vrstva byla nalepena na laboratorní sklíčko pomocí oboustranné lepicí pásky a umístěna na posuvný stolek. Následně bylo pipetou nadávkováno 6 μ l DIW na vrstvu a pomocí CCD kamery pak byly nasnímány fotografie kapky na vrstvě. Pokud byl materiál hydrofilní a kapka se vsakovala, bylo vsakování natočeno a kontaktní úhel byl měřen v první vteřině po dosednutí kapky na povrch. Na každé straně materiálu bylo naměřeno 10 hodnot, ze kterých byl spočten průměr a směrodatná odchylka.

4.1.6 Měření adheze

Adheze dvouvrstvy byla vyjádřena jako kritická síla, při které dojde k odtržení jednotlivých vrstev. Síla byla měřena pomocí pružinového siloměru s rozsahem 5 N. Vzorek dvouvrstvy o velikosti 1,5 cm x 2 cm, byl pomocí oboustranné lepicí pásky připevněn PVA vláknou stranou na rovný pevný povrch a naopak na PCL vláknou stranou byl uchycen k rovné podložce, která byla zavěšena na pružinový siloměr. Následně byla manuálně zvyšována tahová síla, zátěž byla vytvářena kolmo na rovinu upevnění. Průběh byl natáčen pomocí videokamery. Ze zpomaleného záznamu pak byla určena

kritická hodnota, při které došlo k odtržení vrstev. Od výsledné síly bylo odečteno zatížení, které bylo způsobeno zavěšením podložky na siloměr. Měření bylo opakováno 5x a výsledek je proto vyjádřen jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka. Oddělené vrstvy byly dále charakterizovány pomocí SEM (TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe), aby došlo k ověření, zda dochází k úplnému rozdělení vrstev PVA a PCL.

4.1.7 Buněčné *in vitro* testy

Kultivace a nasazení buněk na materiály

Materiály byly vystřihány do velikosti dna 24 jamkových kultivačních destiček (průměr 1,6 cm) a zatíženy skleněnými kroužky. Před nasazením buněk byly materiály 12 h sterilizovány ethylen oxidem (Anprolene) a odvětrány při pokojové teplotě po dobu 2 týdnů. Myší 3T3 fibroblasty byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biosera) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS, Biosera) a 1% směsi antibiotik (penicilin/streptomycin/amfotericin B/glutamin) (Biosera). Buňky byly umístěny v kultivačních lahvičkách do inkubátoru se zvlhčenou atmosférou, obsah CO₂ činil 5 % a teplota byla udržována na 37 °C. Poté, co se vrstva buněk stala konfluentní, bylo odsáto médium, připipetován fosfátový pufr (PBS) a buňky byly opatrně propláchnuty. Dále byly buňky odděleny ze dna kultivační láhve přidavkem trypsinu (Lonza), dále pak resuspendovány v novém médiu. Pro určení počtu buněk bylo do mikrozkušavky typu Eppendorf napipetováno 10 μ l buněčné suspenze a přidáno 10 μ l trypanové modři. Počet buněk byl spočten pomocí přístroje LUNATM od firmy Logos Biosystems. Na vláknenné vzorky pak byly nasazeny myší 3T3 fibroblasty (pasáž 14) v koncentraci 10⁴ buněk/jamku. Buňky byly nasazeny v polovině případů na PVA vrstvu (bez podkladové vrstvy spunbondu) a v polovině případů na PCL vláknennou vrstvu (při testování byla ponechána vrstva spunbondu pro lepší manipulaci se vzorky). Další testování probíhalo po 1 dni a 7 dnech metodami metabolického MTT testu, fluorescenční a elektronové mikroskopie.

MTT test

MTT test slouží k určení metabolické aktivity živých buněk a je založen na redukci žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) pomocí mitochondriálních enzymů na fialovo-modrý formazan, který lze kvantifikovat spektrofotometricky. Po 1 dni a 7 dnech byly vzorky (byly analyzovány 3 vzorky od každého materiálu) přesunuty do nových kultivačních destiček a bylo přidáno 50 μ l

roztoku MTT (Amresco) a 150 μ l média. Vzorky byly inkubovány po 4 h při 37°C. Vzniklé krystalky formazanu byly následně rozpuštěny přidáním 500 μ l kyselého isopropanolu (IPA) ke každému vzorku. Vzniklé roztoky byly několikrát promíchány a následně bylo přeneseno 200 μ l do 96 jamkové mikrotitrační destičky a pomocí přístroje typu ELx808 od firmy BioTek byly změřeny absorbance při vlnových délkách 570 nm a 690 nm. Vlnová délka 690 nm sloužila jako referenční. Výsledná data byla spočtena jako rozdíl hodnot při těchto vlnových délkách a opět vyjádřena ve tvaru průměr $\pm$ směrodatná odchylka. Porovnání získaných hodnot bylo vyneseno do grafu za použití programu GraphPad Prism. Data pocházela z normálního rozdělení a proto byl použit Bonferonni parametrický test. P-hodnota značí, jak je významná odlišnost mezi porovnávanými skupinami a v grafu je tato míra odlišnosti vyznačena pomocí hvězdiček.

Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii

Vzorky (jeden od každého materiálu) po 1 dni a 7 dnech byly 2x opláchnuty v PBS a následně fixovány roztokem 2,5% glutaraldehydu (Sigma Aldrich) v PBS po dobu 10 min při 4°C. Po dokončení fixace byly vzorky 2x opláchnuty v PBS a permeabilizovány v 500 μ l 0,1% roztoku Tritonu X-100 (Sigma Aldrich) v PBS + 0,1% roztoku bovinního sérového albuminu (BSA, VWR Chemicals) po dobu 5 minut. Následně byly vrstvy opláchnuty v PBS a bylo přidáno 500 μ l roztoku phalloidin-fluorescein izokyanátu (FITC, Sigma Aldrich), ředěného 1:1000. Takto připravené vzorky byly ponechány 30 minut v alobalu, aby nedošlo k znehodnocení fluorescenčního barviva na světle. Poté byly vzorky 2x opláchnuty v PBS a k dalšímu barvení byl použit roztok 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI, Sigma Aldrich), ředěný 1:1000. Barvení probíhalo po dobu 5 min a mikrotitrační destička byla opět chráněna alobalem proti světlu. Po dokončení barvení byly vzorky 2x opláchnuty v PBS a ponechány v PBS. Vzorky byly následně nasnímány na fluorescenčním mikroskopu Nikon. Pro porovnání počtu buněk na testovaných materiálech byla provedena jejich kvantifikace. Ze snímků buněčných jader obarvených DAPI (zvětšení 100x) byly spočítány buňky z 10ti zorných polí a výsledky přepočítány počet buněk na 1 mm². Tyto hodnoty byly opět znázorněny v grafu, vytvořeném v software GraphPad Prism. V případě statisticky významné odlišnosti mezi skupinami je vynesena příslušná p-hodnota, která je značena hvězdičkami.

Příprava vzorků pro SEM

Vzorky byly po 7 dnech propláchnuty 2x v PBS a následně fixovány v 2,5% glutaraldehydu (Sigma Aldrich) v PBS po dobu 10 min při 4°C. Následně byly vzorky odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou (60%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100%). Ke vzorku bylo vždy napipetováno 500 µl příslušného ethanolového roztoku a bylo ponecháno po deset minut, dokud nebyl roztok odsát a vyměněn za více-procentní. Po dokončení odvodnění byly vzorky ponechány schnout na parafilmu. Po úplném uschnutí byly vzorky nalepeny oboustrannou lepící páskou na terčík, pozlacený 7 nm vrstvou zlata a nasnímány na skenovacím elektronovém mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe.

4.2 Výsledky

4.2.1 Vlastnosti zvlákňovacích roztoků

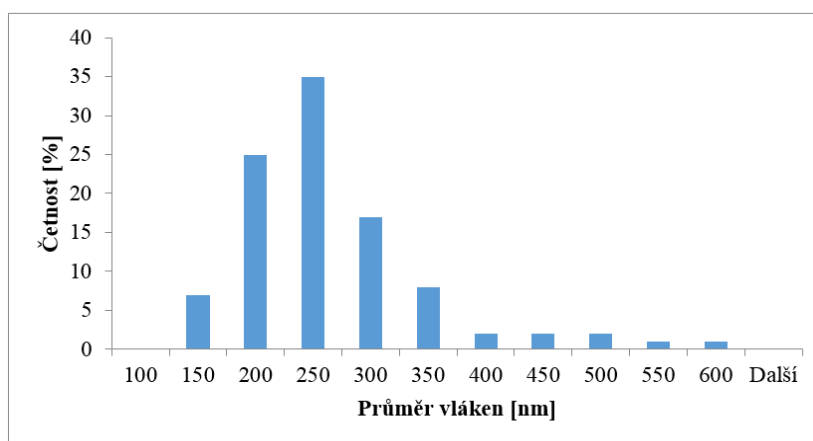
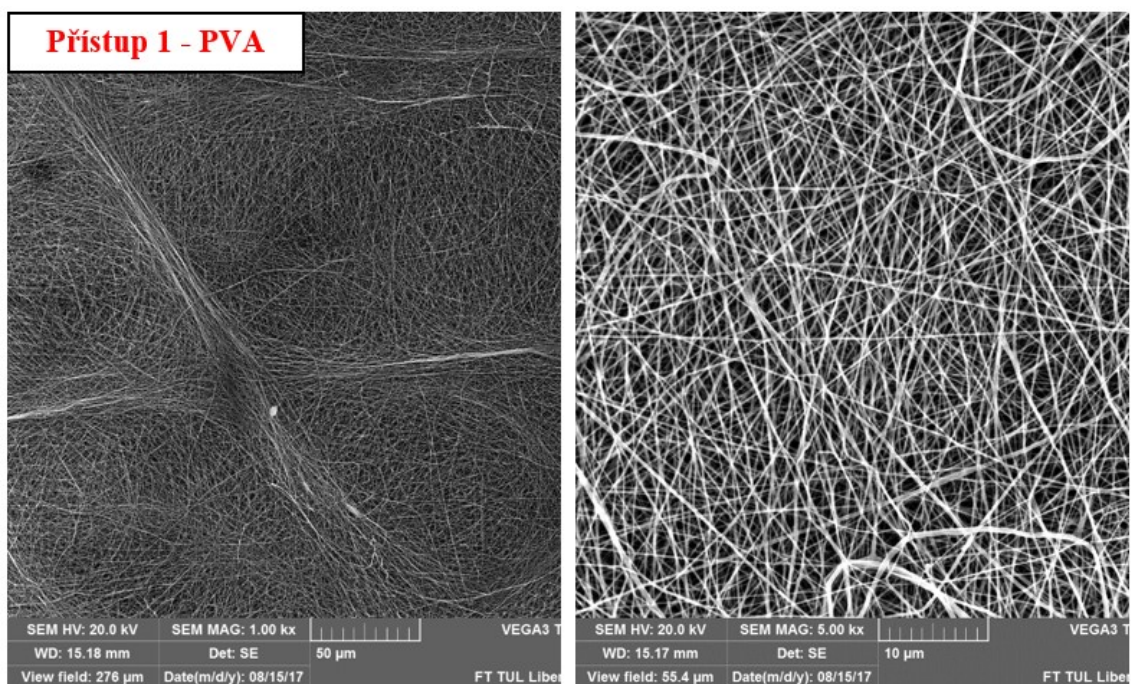
V den zvlákňování byly změřeny vlastnosti zvlákňovacích roztoků, a to sice viskozita a povrchové napětí. Viskozita PVA roztoku činila $(0,486 \pm 0,008)$ Pa·s při teplotě 20°C a povrchové napětí bylo $(81,96 \pm 2,42)$ mN/m při teplotě 25,7°C. Hodnota viskozity PCL byla $(0,189 \pm 0,002)$ Pa·s při teplotě 20°C a povrchové napětí poté $(123,48 \pm 5,00)$ mN/m při teplotě 25,9°C.

4.2.2 Výsledná morfologie vrstev

Na zařízení Nanospider™ byly vyrobeny dva materiály a ověřeny tak oba způsoby pořadí (v textu dále značeny jako Přístup 1 a Přístup 2), ve kterém mohou být roztoky zvlákňovány.

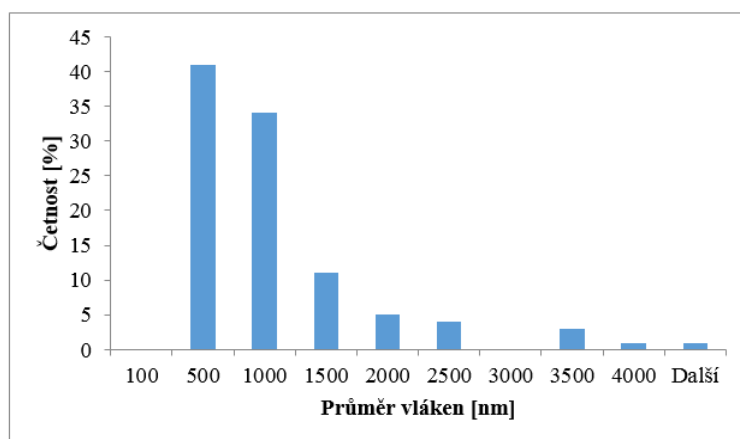
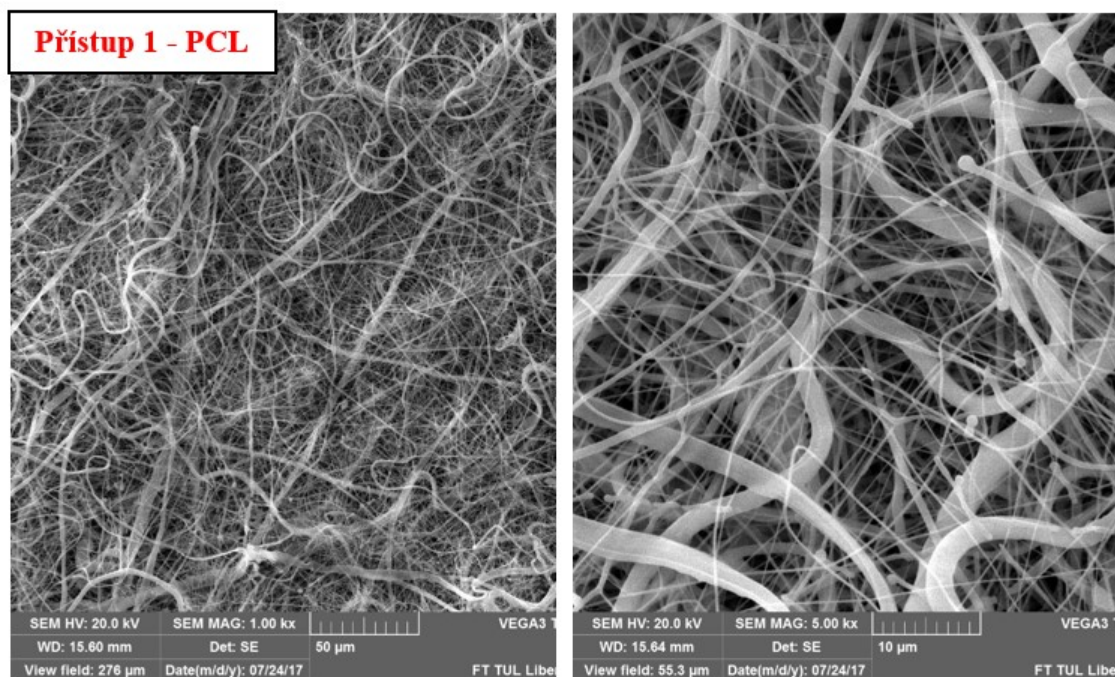
Přístup 1 - Zvlákňování v pořadí PVA - PCL

Nejprve bylo přistoupeno ke zvlákňování roztoku PVA, na vzniklou vláknennou vrstvu byl okamžitě zvlákňován roztok PCL. Oba polymery byly zvlákňovány po dobu 15 minut. Morfologie PVA je společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken znázorněna na Obrázku 16. Průměr vláken činil $(242,11 \pm 84,21)$ nm. Výsledná vláknenná vrstva obsahuje spojitá PVA vlákna. Vlákna jsou hladká a mají pravidelný tvar. Nejsou patrné žádné kapkové defekty, nedocházelo tedy k elektrostatickému rozprašování a koncentrace roztoku byla zvolena vhodně. Na některých místech lze vidět shluky spojených vláken většího průměru, je proto možné, že nedošlo k úplnému odpaření rozpouštědla a některá vlákna dopadala na spunbond mokrá.



Obrázek 16: SEM snímky vlákenné vrstvy PVA, měřítko 50 µm; 10 µm, společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken.

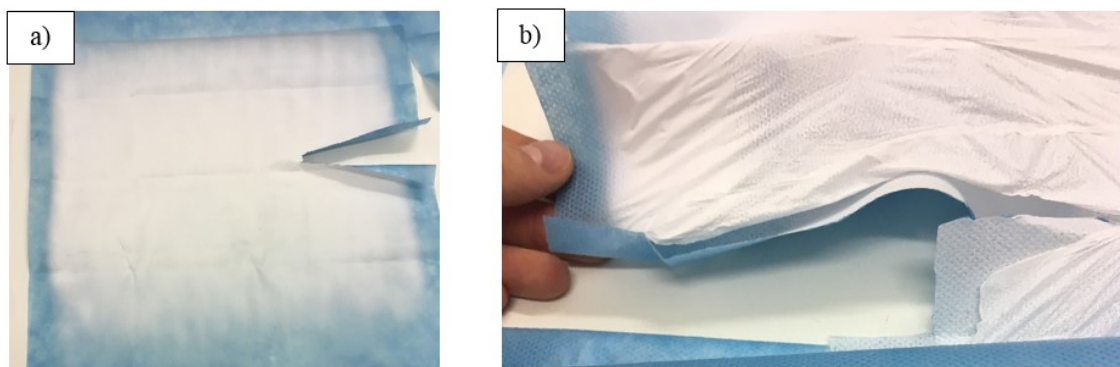
Na Obrázku 17 lze vidět morfologii vrstvy PCL a histogram četnosti naměřených průměrů vláken. Průměr vláken byl $(846,60 \pm 805,61)$ nm. Vrstva obsahuje defekty typické pro PCL vlákna. Co se průměrů týká, vrstva je nehomogenní a obsahuje převážně submikronová vlákna. Místa jsou patrné kapkové defekty.



Obrázek 17: SEM snímky vlákenné vrstvy PCL, měřítko 50 µm; 10 µm, společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken.

Přístup 2 - Zvlákňování v pořadí PCL - PVA

V druhé části experimentu bylo cílem nejprve zvláknit PCL a na vzniklý povrch následně uložit vlákennou vrstvu PVA. Roztoky byly zvlákňovány při stejných podmínkách jako v Přístupu 1. Oba polymerní roztoky bylo možné zvláknit i tímto způsobem, nicméně vytvořená dvouvrstva nevykazovala soudržnost a vrstvy se od sebe samovolně oddělovaly (viz Obr. 18). S vrstvou proto nebude dále pracováno.



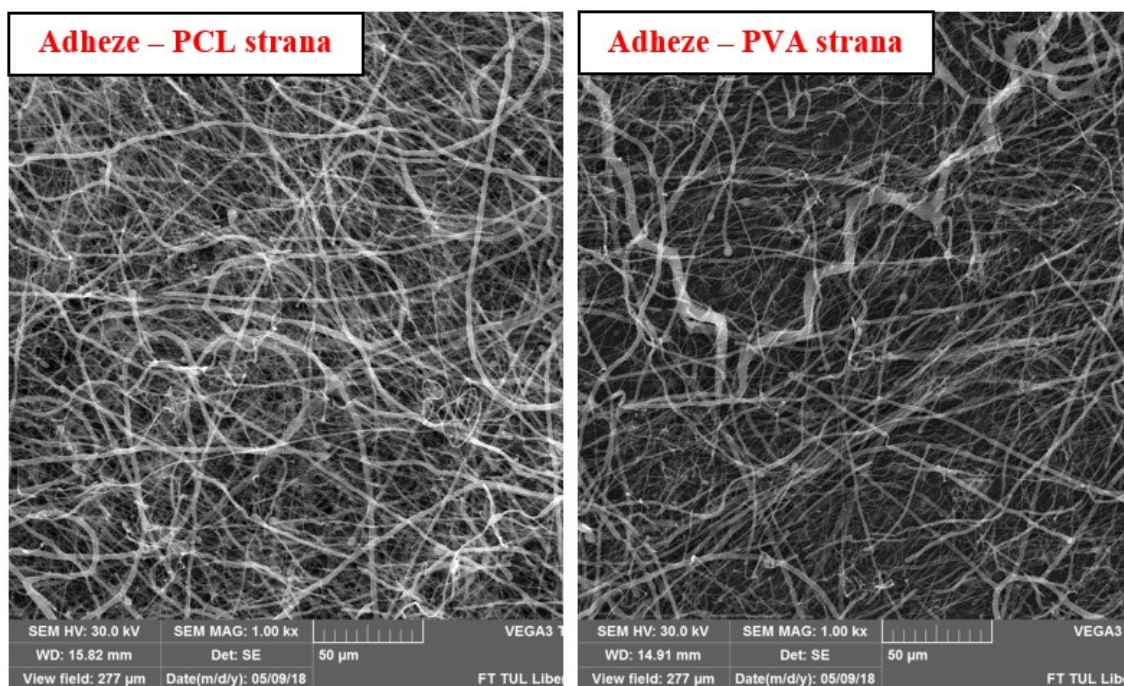
Obrázek 18: Fotografie vlákenné vrstvy substrát - PVA - PCL (a) a vlákenné vrstvy substrát - PCL - PVA (b).

4.2.3 Výsledný kontaktní úhel

Kontaktní úhel byl měřen na soudržné vrstvě (Přístup 1). Hodnota kontaktního úhlu PVA vrstvy činila $(32,85 \pm 6,81)^\circ$. Materiál je smáčivý a kapka se vždy vsákla do materiálu během 15 vteřin. Naopak PCL strana vykazovala kontaktní úhel $(95,33 \pm 21,79)^\circ$.

4.2.4 Adheze vrstvy

Hodnota kritické zátěže, při které došlo k oddělení vrstev (vytvořených Přístupem 1), dosáhla hodnoty $(3,22 \pm 0,19)$ N. Na Obrázku 19 lze vidět SEM snímky a morfologii vrstev po oddělení. Dle SEM snímků lze usoudit, že vrstvy od sebe nebyly plně separovány. Vlákenná morfologie PVA oddělené vrstvy není hladká a uniformní, naopak jsou patrná i defektní vlákna, typická pro PCL. Navzdory tomu, že vrstvy byly zvlákňovány sekvenčně, nejspíš došlo k částečnému propletení vláken PVA a PCL a není tak možné je od sebe odtrhnout jednotlivě.



Obrázek 19: SEM snímky morfologie mechanicky oddělených vrstev vlákenné dvouvrstvy PVA/PCL (Přístup 1), měřítko 50 µm.

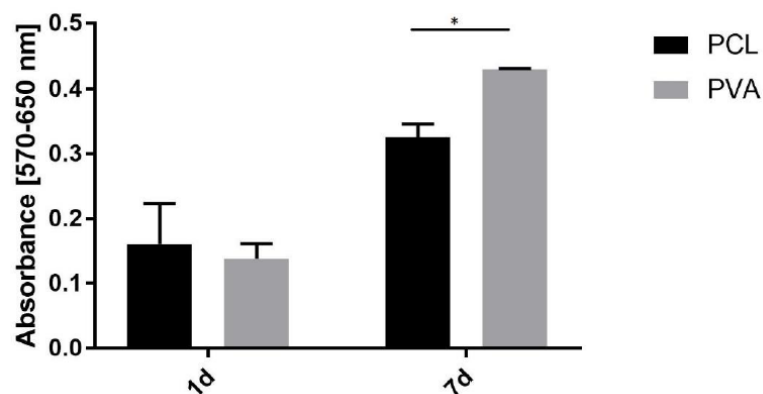
Závěr

Pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování byla připravena vlákenná dvouvrstva z polymerů PVA a PCL. Metoda výroby v pořadí PVA/PCL (Přístup 1) se ukázala jako úspěšná. Jednotlivé vrstvy drží u sebe a neoddělují se. Naopak, pokud je nejprve vyrobena vrstva PCL, na kterou jsou ukládána vlákna PVA (Přístup 2), výsledná vrstva není soudržná, jak lze vidět na Obrázku 18 (b), a tato vrstva nebude dále používána.

4.2.5 Výsledky *in vitro* testování

Test metabolické aktivity buněk kultivovaných na testovaných materiálech (MTT)

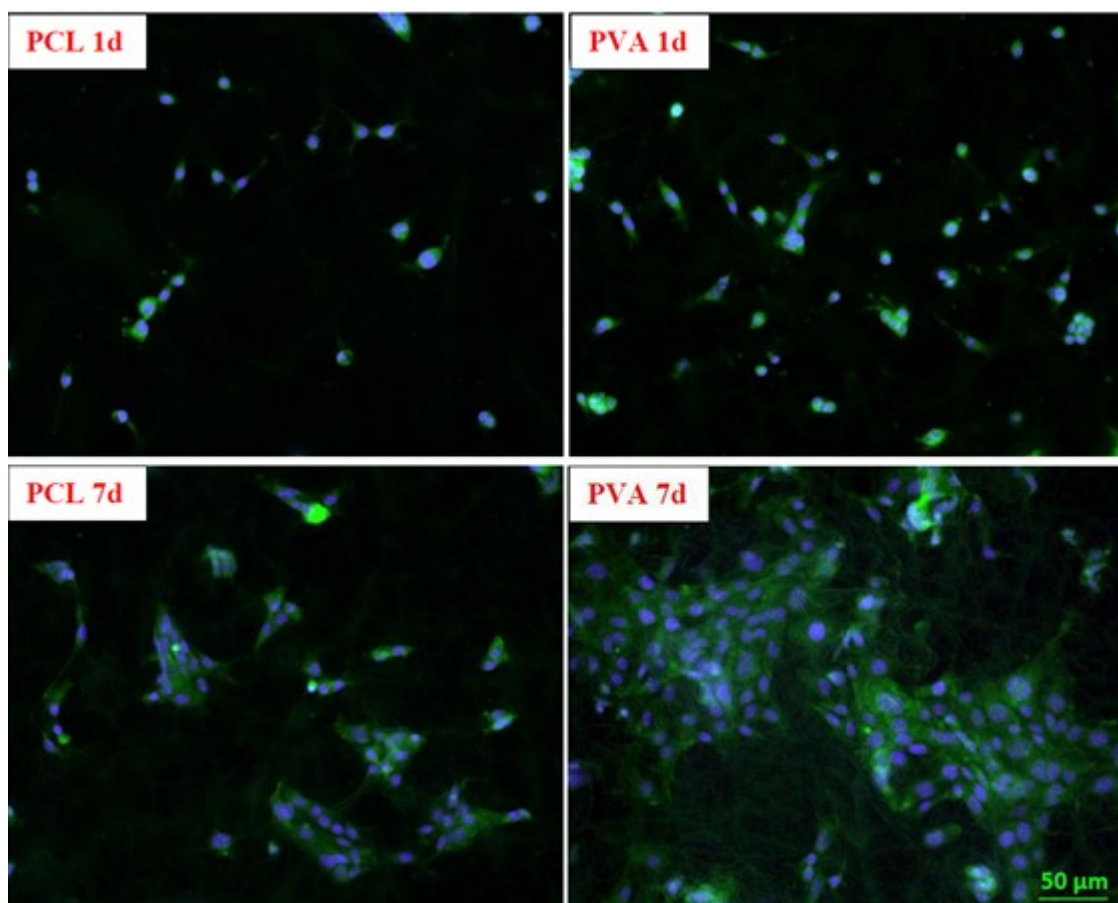
Výsledky metabolické aktivity buněk po 1 a 7 dnech kultivace na vlákenné vrstvě PCL a PVA jsou zobrazeny v grafu na Obrázku 20. Buněčná adheze po 1 dni od nasazení byla srovnatelná na obou stranách kompozitního materiálu. Po týdenní kultivaci došlo k větší proliferaci na vrstvě PVA, kde byla naměřena vyšší absorpance odpovídající metabolické aktivitě, resp. počtu buněk na vlákenných vrstvách.



Obrázek 20: Test buněčné viability po inkubaci vlákenných materiálů s fibroblasty po 1 a 7 dnech kultivace, * $p < 0.05$ (ANOVA, Bonferroni).

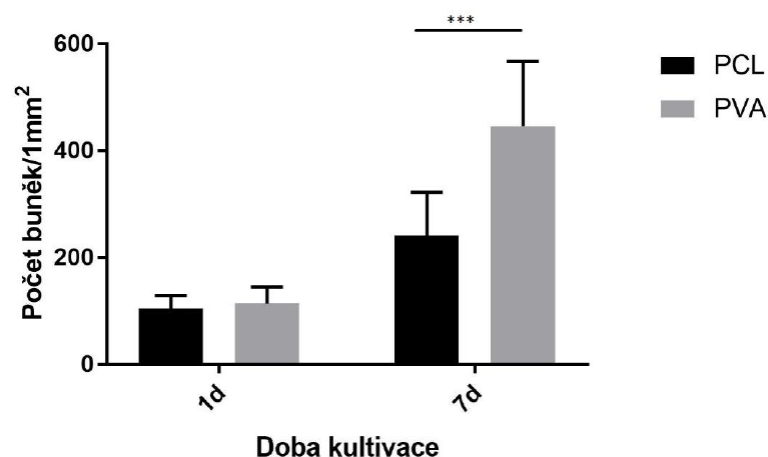
Fluorescenční mikroskopie

Buňky byly vizualizovány fluorescenčně (viz Obr. 21) dvojím barvením phalloidinem+FITC, který se váže na aktinová vlákna cytoskeletu (zelená) a DAPI zvýrazňující buněčná jádra (modrá). Rozprostřenější buňky se nacházely na vrstvě PVA po 1 dni kultivace. Během týdenní kultivace došlo na obou materiálech k proliferaci buněk. Na vrstvě PCL se po týdnu nacházely klastry buněk. Na straně, kde se nacházela vlákna PVA, byla vytvořena téměř konfluentní vrstva buněk.



Obrázek 21: Snímky z fluorescenční mikroskopie buněk obarvených phalloidinem+FITC (zelená) a DAPI (modrá) po 1 a 7 dnech kultivace, měřítko 50 µm.

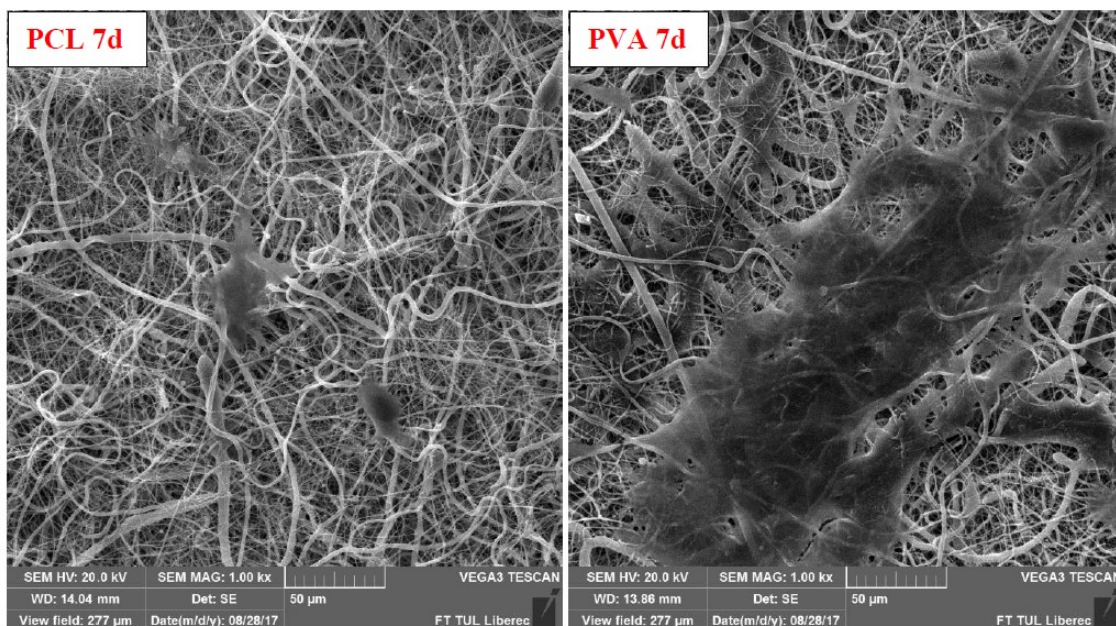
Pro porovnání počtu buněk na testovaných materiálech byla provedena jejich kvantifikace. Výsledky jsou shrnuty v grafu na Obrázku 22. První testovací den byl počet buněk na obou materiálech srovnatelný. Po týdenní kultivaci se nacházelo statisticky významně větší množství buněk na vrstvě PVA, což dokazuje i předchozí snímek z fluorescenční mikroskopie.



Obrázek 22: Počet buněk na 1 mm² získaný kvantifikací buněčných jader na testovaných materiálech, *** $p < 0.001$ (ANOVA, Bonferroni).

SEM

Fibroblasty na testovaných materiálech byly dále vizualizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (viz Obrázek 23). Výsledky se shodují s výstupy fluorescenční mikroskopie, po týdenní kultivaci se nacházelo více buněk na vrstvě PVA než na vlákenném PCL. Ze snímků je patrné, že vlákna PVA se během experimentu rozpustila. Jejich přítomnost však značně ovlivnila buněčnou adhezi a proliferaci, která byla přítomností PVA vláken zlepšená.



Obrázek 23: SEM snímky testovaných vrstev po týdenní kultivaci fibroblastů, měřítko 50 µm.

Závěr

In vitro testování bylo provedeno na materiálu PVA/PCL, který byl vyroben vrstvením v pořadí PVA – PCL a vykazoval tak přilnavost jednotlivých vrstev. Přestože hydrofilní nanovlákná PVA byla rozpuštěna, byl pozorován výrazný vliv přítomnosti tohoto polymeru na buněčnou proliferaci. Po týdenní kultivaci byl naměřen větší počet buněk korespondující s vyšší metabolickou aktivitou buněk na vrstvě obsahující nanovlákná PVA v porovnání s vrstvou PCL.

5 Experiment 2 – Dvouvrstvý vlákenný materiál kyselina hyaluronová/poly- ϵ -kaprolakton

Kompozitní vrstva HA/PCL byla vyrobena dvěma metodami, které budou dále v textu označeny jako Metoda A a Metoda B. V obou případech se jednalo o zpracování polymerních roztoků v elektrostatickém poli.

5.1 Metody

5.1.1 Příprava polymerních roztoků

Pro **Metodu A** byla používána HA ($M_w = 1\,700$ kDa, dodavatel Kutilov) bakteriálního původu v kosmetické kvalitě, $\rho = 0,143$ g/cm³, obsah proteinu pod 0,1%. Byl připraven vodný roztok HA o koncentraci 0,3% w/w. Roztok HA byl obarven červeným barvivem pro snazší pozorování elektrostatického sprayování a orientačnímu určení obsahu kapek HA ve výsledné vrstvě. Poly- ϵ -kaprolakton ($M_w = 43,000$ g/mol, Polysciences) byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému chloroform (Penta)/kyselina octová (Penta)/ethanol (Penta) 8/1/1 (v/v/v). Koncentrace PCL v rozpouštědlovém systému činila 16% w/w. Roztoky byly míchány na magnetickém míchadle po dobu 24 hodin, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění polymerů.

Pro **Metodu B** byla použita HA ($M_w = 1\,200$ kDa, dodavatel Kutilov) bakteriálního původu v kosmetické kvalitě, $\rho = 0,143$ g/cm³, obsah proteinu pod 0,1%. Byl připraven vodný roztok HA o koncentraci 0,5% w/w. Poly- ϵ -kaprolakton ($M_w = 43,000$ g/mol, Polysciences) byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému chloroform (Penta)/kyselina octová (Penta)/ethanol (Penta) 8/1/1 (v/v/v). Koncentrace PCL v rozpouštědlovém systému činila 16% w/w. Takto připravené roztoky byly rozpouštěny po dobu 24 hodin.

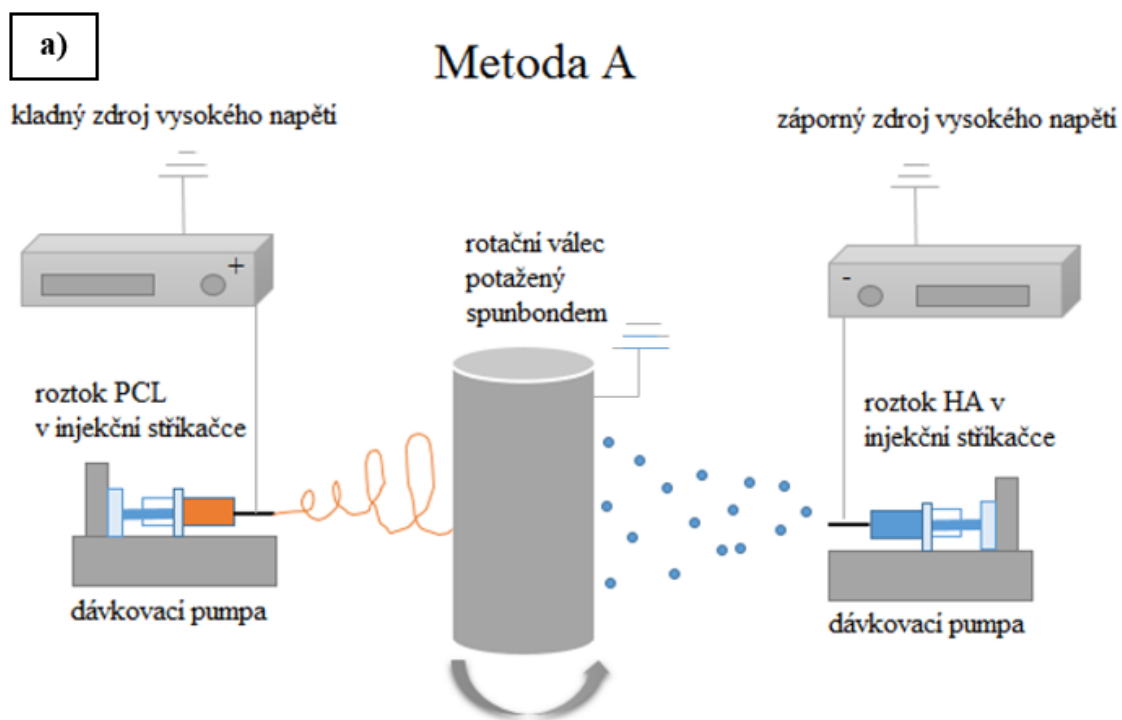
5.1.2 Měření vlastností zvlákňovacích roztoků

Měření viskozit a povrchového napětí roztoků je popsáno v kapitole 4.1.2, v tomto experimentu bylo postupováno stejným způsobem.

5.1.3 Elektrostatické zvlákňování

Pro **Metodu A** byl zvolen přístup, který kombinuje elektrostatické rozprašování (pro roztok HA) a elektrostatické zvlákňování (pro PCL). Předpokládalo se, že kapky vysoko-molekulární kyseliny hyaluronové budou zachyceny mezi PCL vlákna a tím dojde k nižší rozpustnosti HA ve vodě a udržení ve vrstvě i ve vodném prostředí. Aby došlo k dostatečnému propletení vláken PCL a kapek HA, ale zároveň aby nebyly

navzájem ovlivňovány jednotlivé procesy zvlákňování a rozprašování, byly jehly s polymerními roztoky umístěny proti sobě (viz Obrázek 24). Jehla s roztokem PCL byla připojena na kladný zdroj, zatímco jehla s vodným roztokem HA byla připojena na záporný zdroj. Mezi jehly byl umístěn rotující kolektor ve tvaru válce, který byl uzemněn. Vznikající vlákna a kapky byly ukládány na modrý spunbond. Parametry zvlákňování jsou zapsány v Tabulce 3.



Obrázek 24: Schéma (a) a fotografie aparatury pro přípravu vrstvy HA/PCL (b), metodou A.

Tabulka 2: Parametry elst. zvlákňování (PCL) a elst. sprayování (HA), Metoda A.

	16% w/w PCL	0,3% w/w HA
Napětí [kV]	20	- 25 (sníženo z - 29)
Proud [mA]	0,1	0,1
Vzdálenost od kolektoru [cm]	17	15
Průměr jehly [mm]	1,38	0,89
Dávkování roztoku [ml/h]	30	2 (sníženo ze 4)
Okolní teplota [°C]	24,1	24,1
Vlhkost [%]	32 - 35	32 - 35

Pro **Metodu B** se postup výrazně lišil. Roztoky byly postupně elektrostaticky zvlákněny na zařízení Nanospider™. Nejprve byl zvlákněn PCL a následně byl vyměněn roztok v zásobníku za HA. Vznikající vlákna byla ukládána na modrý spunbond. Parametry zvlákňování jsou zapsány v Tabulce 4.

Tabulka 3: Parametry elst. zvlákňování roztoků PCL a HA na Nanospider™. Metoda B.

	PCL	HA
Napětí na struně [kV]	30,7 kV	39 kV
Napětí na kolektoru [kV]	- 10,2 kV	- 10,7 kV
Vzdálenost elektrod [cm]	16,9 cm	13,3 cm
Odtah substrátu [mm/min]	11 mm/min	3 mm/min
Rychlost cartridge [mm/s]	288,1 mm/s	189,2 mm/s
Teplota [°C]	22°C	22°C
Vlhkost [%]	40,9 %	40,7 %

Jelikož elektrostatické zvlákňování HA není tak produktivní jako tvorba vláken PCL, byly provedeny dva cykly nanášení roztoku HA oproti jednomu cyklu nanášení PCL. Bylo tak dosaženo zvláknění většího objemu roztoku HA a také došlo k vytvoření souvislé vrstvy vláken HA. Parametry zvlákňování HA při druhém převíjení jsou uvedeny v Tabulce 5. Materiál byl následně charakterizován pomocí SEM. Na základě SEM snímků bylo rozhodnuto, že pro větší podíl HA ve výsledné vrstvě bude 10 ml roztoku

HA do zvlákněné dvouvrstvy manuálně rozprášeno pomocí difuzéru. Manuální rozprašování bylo provedeno ze vzdálenosti 50 cm od vrstvy.

Tabulka 4: Parametry elst. zvlákňování roztoku HA na NanospiderTM, Metoda B.

	HA
Napětí na struně [kV]	38,9 kV
Napětí na kolektoru [kV]	- 10,7 kV
Vzdálenost elektrod [cm]	13,3 cm
Odtah substrátu [mm/min]	9 mm/min
Rychlost cartridge [mm/s]	154,5 mm/s
Teplota [°C]	22,6°C
Vlhkost [%]	37,2 %

5.1.4 Skenovací elektronová mikroskopie

Metodika snímání vzorků pomocí SEM byla provedena stejným způsobem, jako již bylo popsáno v kapitole 4.1.4.

5.1.5 Měření kontaktních úhlů

Kontaktní úhly byly měřeny stejnou metodou jako bylo popsáno v kapitole 4.1.5. V případě HA/PCL vrstvy vyrobené Metodou A byl kontaktní úhel měřen pouze z jedné strany vrstvy (svrchní), jelikož se nejedná o dvouvrstvu ale kompozitní materiál.

5.1.6 Měření adheze

Adheze byla měřena pouze pro vláknennou dvouvrstvu vyrobenou Metodou B. Metodika měření byla totožná s měřením adheze materiálu PVA/PCL a je popsána v Kapitole 4.1.6.

5.1.7 Gelová permeační chromatografie – Metoda A

Pro ověření efektivity zachycení elektrostaticky rozprášených kapek HA mezi PCL vlákna byla použita gelová permeační chromatografie (GPC). Z výsledné vrstvy byly vystřiženy tři vzorky, plocha každého vzorku činila 2 cm². Následně byl jeden vzorek ponechán bez rozpouštění a ostatní dva byly samostatně ponořeny do DIW po dobu 1 h, resp. 24 h. Následně byly vzorky ponechány volně uschnout a dále analyzovány. Byl použit systém Dionex Ultimate 3000 vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s diode array detektorem a odpařovacím detektorem rozptylu světla (ELSD) Varian LC-385. Pro stanovení PCL byla použita polymerní GPC kolona Phenomenex Phenogel

délky 30 cm s vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částic 5 μm . Jako mobilní fáze byl použit čistý tetrahydrofuran čistoty HPLC, průtok činil 1 ml/min. Pro stanovení kyseliny hyaluronové byla použita polymerní GPC kolona Asahipak GF 7M délky 30 cm s vnitřním průměrem 7,8 mm a velikostí částic 9 μm . Jako mobilní fáze byl použit 5% acetonitril čistoty HPLC v deionizované vodě, průtok činil 0,6 ml/min. Chromatogramy vzorků byly zaznamenávány při vlnové délce 200, 210, 220 a 250 nm a pomocí ELSD detektoru po dobu 23 minut. Teplota nebulizéru ELSD detektoru byla nastavena na 80°C a evaporátoru na 80°C. Průtok dusíku činil 1,3 l/min. Teplota kolonového kompartmentu byla nastavena na 30°C. Bylo nastříkováno 30 μl vzorku.

Vzorků polymerů bylo naváženo okolo 4 mg a tyto navážky byly rozpuštěny ve 4 ml vody v případě kyseliny hyaluronové a 4 ml tetrahydrofuranu v případě PCL. Vzorky byly před nastříknutím filtrovány teflonovým stříkačkovým filtrem s velikostí pórů 0,45 μm .

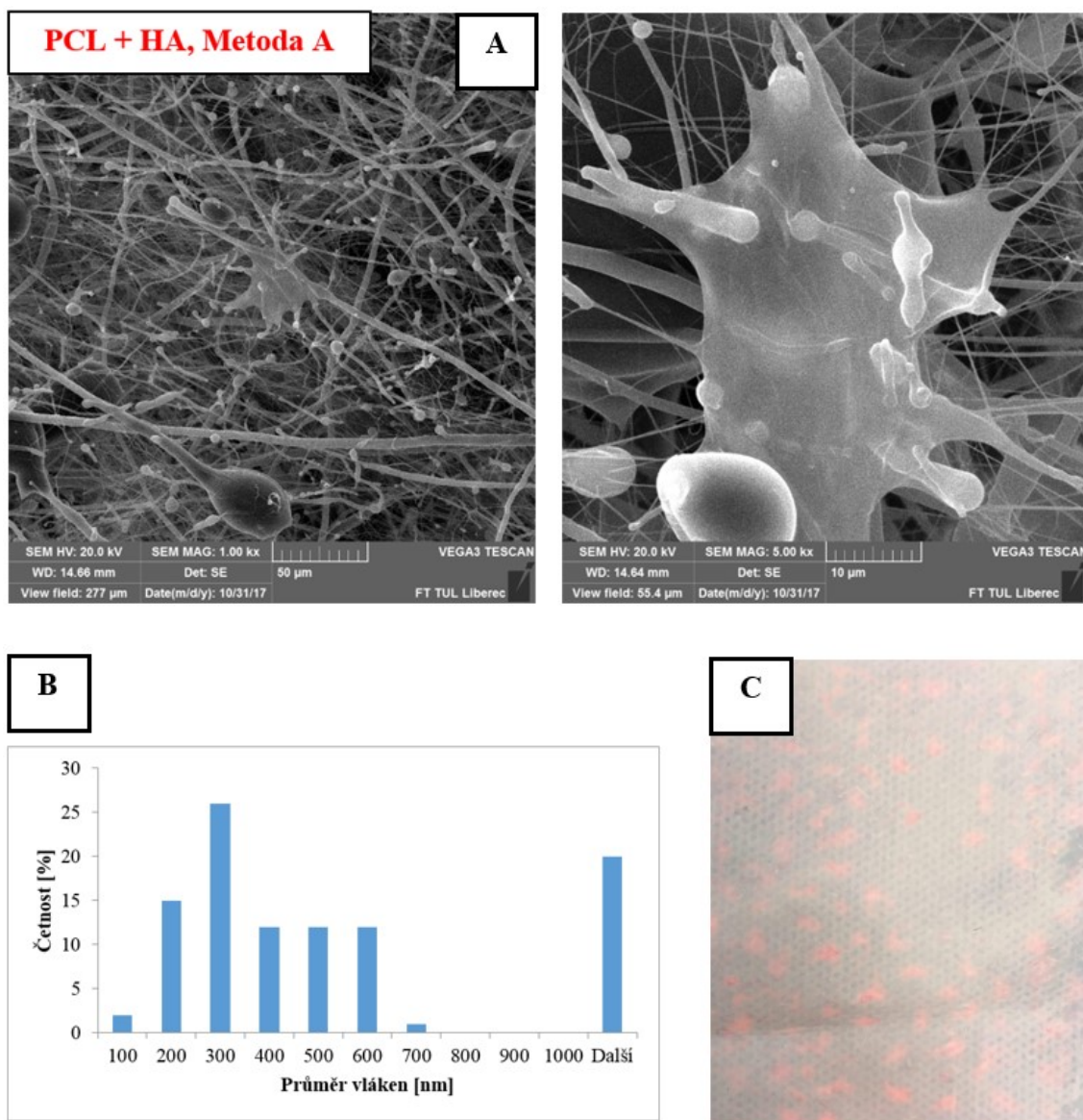
5.2 Výsledky Metoda A

5.2.1 Vlastnosti zvlákňovacích roztoků

V den zvlákňování byly změřeny vlastnosti zvlákňovacích roztoků, a to sice viskozita a povrchové napětí. Viskozita HA roztoku činila $(0,079 \pm 0,002)$ Pa·s při teplotě 27°C a povrchové napětí bylo $(76,96 \pm 0,63)$ mN/m při teplotě 27°C. Hodnota viskozity PCL byla $(0,190 \pm 0,024)$ Pa·s při teplotě 27°C a povrchové napětí poté $(121,53 \pm 6,42)$ mN/m při teplotě 27°C.

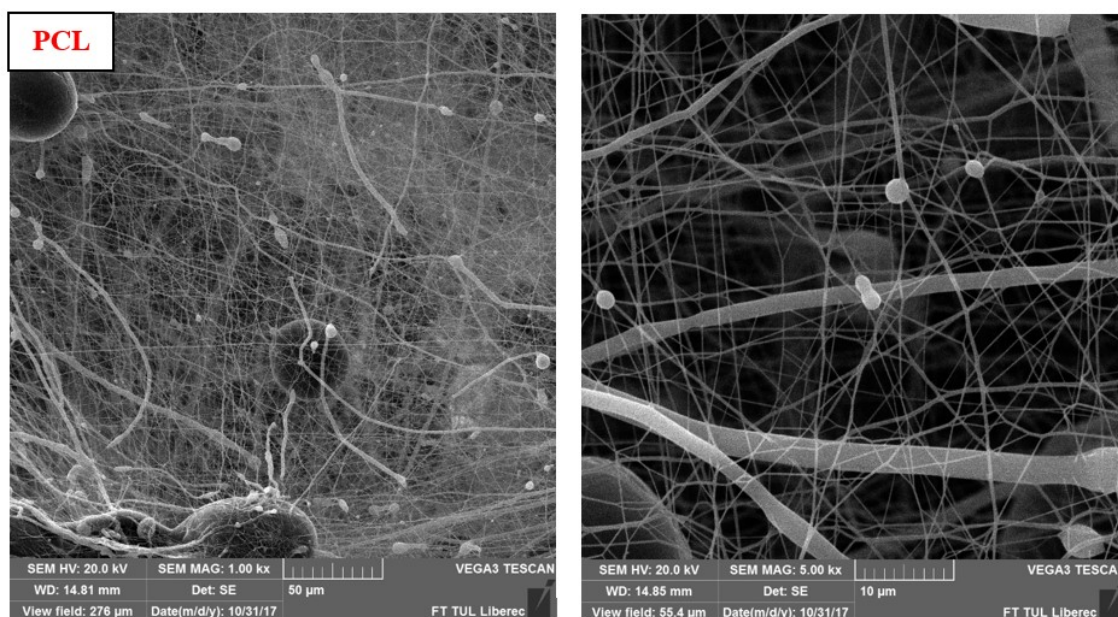
5.2.2 Výsledná morfologie vrstvy

Morfologii materiálu lze vidět na SEM snímcích v Obr. 25 (A), společně s histogramem četnosti naměřených průměrů (B) a fotografií výsledné vrstvy (C). Z fotografie je patrné, že vrstva obsahuje kapky roztoku vysokomolekulární (1,7 MDa) HA, který byl obarven červeným barvivem. V morfologii PCL vláken lze nalézt značné množství defektů včetně kapkových útvarů, což značně stěžuje rozeznání od elektrostaticky rozprášených kapek roztoku HA. PCL vlákna mají průměr $(893,25 \pm 1378,49)$ nm. Průměr vláken je nehomogenní a vrstva obsahuje submikronová i mikronová vlákna.



Obrázek 25: SEM snímky vláknenné vrstvy HA/PCL (Metoda A) měřítko 50 μm ; 10 μm (A), společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken (B) a fotografií výsledné vrstvy (C).

Pro lepší porovnání byly rovněž pořízeny SEM snímky samotné nanovláknenné vrstvy PCL (viz Obr. 26). Tato vrstva PCL byla zvlákněna z jehlové aparatury při stejných podmínkách, které byly aplikovány na roztok PCL při zvláknění PCL/HA materiálu. Snímky samotné PCL vrstvy dokazují, že kapkové defekty jsou přítomny i při zvláknění samotného PCL roztoku.



Obrázek 26: SEM snímky vlákenné vrstvy PCL (porovnání pro Metodu A) měřítko 50 μm ; 10 μm .

5.2.3 Výsledný kontaktní úhel

Kontaktní úhel vrstvy činí $(109,55 \pm 15,37)^\circ$. Materiál je hydrofóbní a na Obrázku 27 lze vidět fotografii, pořízenou CCD kamerou při měření.



Obrázek 27: Fotografie kapek vody na PCL/HA materiálu (Metoda A).

5.2.4 Výsledky gelové permeační chromatografie

Cílem experimentu bylo zajistit nižší rozpustnost HA ve výsledné vrstvě. Bylo tedy nutné ověřit, zda vrstva bude obsahovat elektrostaticky rozprášené kapky HA i po úplném ponoření do destilované vody. Pro tyto účely byly připraveny vzorky pro GPC, kde byly testovány materiály po 1 hod a 1 dni rozpouštění v DIW. Přítomnost HA však nebylo

možné potvrdit vzhledem k tomu, že ve výluhu z vrstvy byla koncentrace HA nižší než 50 mg/l a metoda není citlivá na tak malý podíl.

Závěr

Cílem experimentu bylo vytvořit materiál obsahující efektivně zachycenou kyselinu hyaluronovou mezi PCL vlákna. Při úspěšném experimentu by dále nebylo nutné provádět síťování HA. Pomocí GPC stanovení se vzhledem k nízkému obsahu HA ve vrstvě nepodařilo potvrdit, zda byly elektrostaticky rozprášené kapky vysoce-molekulární kyseliny hyaluronové účinně zachyceny mezi PCL vlákna. Ze SEM snímků je patrné, že PCL vlákna nejsou uniformní a není tak možné s jistotou rozeznat kapky HA od defektů PCL. Na základě těchto výsledků a skutečnosti, že elektrostatické rozprašování a zvlákňování z jehly jsou neproduktivní metody, bylo rozhodnuto, že s materiálem nebude dále pracováno. Další charakteristika vrstvy jako měření adheze a *in vitro* testy proto nebyly provedeny.

5.3 Výsledky Metoda B

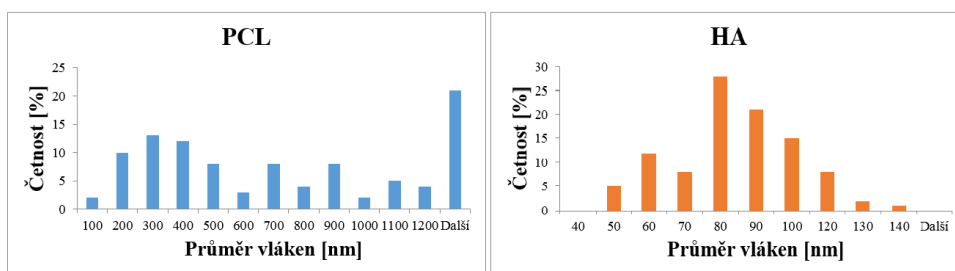
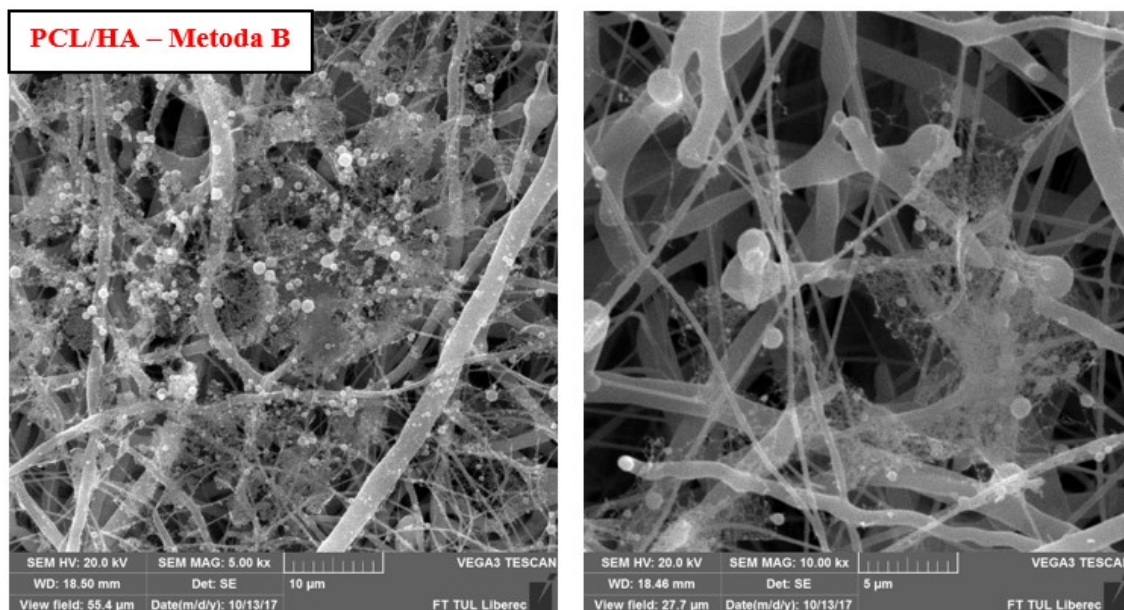
5.3.1 Vlastnosti zvlákňovacích roztoků

Viskozita HA roztoku činila $(0,081 \pm 0,002)$ Pa·s při teplotě 23°C a povrchové napětí bylo $(78,83 \pm 1,15)$ mN/m při teplotě 25,9°C. Hodnota viskozity PCL byla $(0,195 \pm 0,003)$ Pa·s při teplotě 23°C a povrchové napětí poté $(125,81 \pm 7,20)$ mN/m při teplotě 25,9°C. Hodnoty byly měřeny v den zvlákňování.

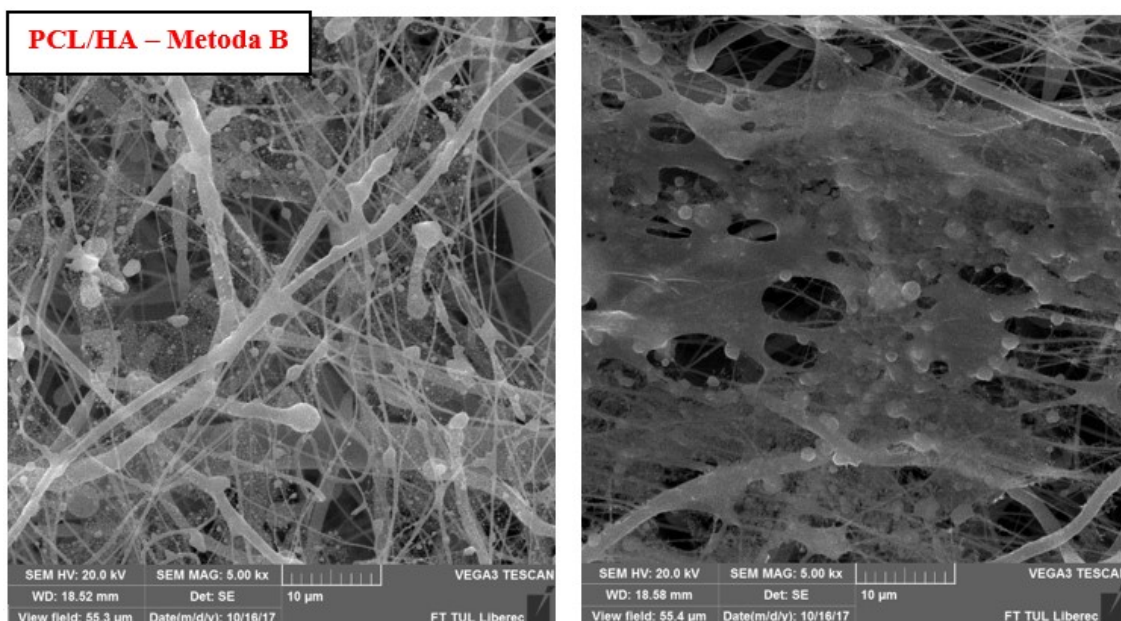
5.3.2 Výsledná morfologie vrstvy

Obrázek 28 obsahuje SEM snímky vrstvy po zvlákňování na NanospiderTM a také histogramy četnosti naměřených průměrů vláken. Průměr PCL vláken činil $(798,55 \pm 685,70)$ nm a průměr jemných HA byl $(79,4 \pm 18,6)$ nm. Vrstva obsahuje ultrajemná nanovlákna HA s občasnými defekty ve tvaru kapek. Docházelo tedy i k elektrostatickému rozprašování. V tomto případě se jedná o koncentrační problém. Koncentrace roztoků HA byly příliš nízká, což potvrzuje i nízká viskozita HA roztoků. Avšak koncentrace musí být udržena na nízkých hodnotách, jinak není možné zpracování vysokomolekulárních roztoků HA elektrostatickým zvlákňováním. Protože zvlákňování nebylo příliš produktivní, nedošlo k vytvoření homogenní vrstvy. Bylo tedy rozhodnuto doplnit obsah HA ve vrstvě manuálním rozprašováním pomocí difuzéru. Obrázek 29 pak zahrnuje SEM snímky po následném obohacení vrstvy o HA. Ze SEM snímků lze vidět, že jemná síť nanovláken HA poskytuje dostatečnou podporu pro doplnění HA tímto

způsobem. Z morfologických snímků je zjevné, že ve vrstvě byla udržena původní struktura a povedlo se tak vytvořit více uniformní povrch. PCL vlákna přesto nebyla plně překryta, jako tomu bylo v případě PVA/PCL vrstvy.



Obrázek 28: SEM snímky elektrostaticky zvlákněné vrstvy HA/PCL (Metoda B), měřítko 10 µm; 5 µm a histogram četnosti naměřených průměrů vláken.



Obrázek 29: SEM snímky elektrostaticky zvlákněné vrstvy HA/PCL (Metoda B) doplněné o manuální rozprašování; měřítko 10 μm .

5.3.3 Výsledný kontaktní úhel

Kontaktní úhel byl měřen z obou stran dvouvrstvy, vytvořené elektrostatickým zvlákněním a manuálním rozprašováním. Hodnota kontaktního úhlu PCL strany činila $(88,63 \pm 20,29)^\circ$ a naopak HA strana vykazovala kontaktní úhel $(46,59 \pm 15,19)^\circ$ a kapka se vsákla během 15 vteřin.

5.3.4 Adheze vrstvy

Nepodařilo se spolehlivě změřit adhezi dvouvrstvy HA/PCL. Vrstva obsahuje nanovláknna HA, která však nejsou uniformně rozmístěna po celé vrstvě PCL vláken. Není tak jisté, zda se na všech vybraných vzorcích o malé ploše (3 cm^2) nachází stejný podíl vláken HA. Hodnoty kritické síly se pak při každém měření výrazně liší a je obtížné zachytit moment oddělení ultrajemné vláknenné vrstvy HA.

Závěr

Podařilo se vytvořit nanovláknennou vrstvu HA/PCL kombinací elektrostatického zvlákněování a manuálního rozprašování. Byly nalezeny podmínky pro zvláknění vodného roztoku HA o vysoké molekulové hmotnosti bez přídavku aditiv. Zpracování roztoků HA v elektrickém poli však nebylo příliš produktivní, proto bylo rozhodnuto doplnit zvlákněnou vrstvu o HA pomocí manuálního rozprašování difuzérem. Takto připravená vrstva byla více homogenní a byla tak vybrána pro další experimenty. Bylo stanoveno, že *in vitro* testování bude provedeno až po povrchové úpravě hydrofilní HA vrstvy,

jelikož HA nanovláknna se ihned rozpustí ve vodě a během testování by nezůstala součástí dvouvrstvy.

6 Experiment 3 – Povrchová úprava hydrofilních stran dvouvrstvých vláknenných materiálů pomocí plazmatického procesu

Plazmatická úprava vrstev byla provedena za účelem zvýšení hydrofobicity elektrostaticky zvlákněných vodorozpustných polymerů, tedy PVA a HA. Tyto experimenty byly vykonány ve spolupráci s Ing. Lukášem Voleským (Katedra materiálů Technické univerzity v Liberci).

6.1 Metody

6.1.1 Příprava vrstev

Byly použity vrstvy PVA/PCL a HA/PCL, vyrobené v kapitole 4 a kapitole 5. Metoda přípravy vrstev byla popsána v kapitole 4.1.3 a 5.1.3.

6.1.2 Plazmatická úprava

Plazmatická modifikace byla provedena studeným methanovým plazmatem, metodou RF PACVD (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition). Zařízení lze vidět na Obrázku 30. Jednalo se o chemickou metodu depozice, chemické reakce probíhaly ve vysokofrekvenčním elektrickém poli ve vakuové komoře, do které byl vpouštěn plynný methan. Další nastavené parametry zahrnovaly tlak vakua [Pa], napětí [V], průtok plynu [sccm] a čas [min]. Při všech procesech byly parametry drženy konstantně na následujících hodnotách: $p = 20 \text{ Pa}$; $U = 200 \text{ V}$; $\text{CH}_4 = 20 \text{ sccm}$; $t = 3 \text{ min}$.



Obrázek 30: Plazmatická komora.

6.1.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Změny v morfologii vrstvy po plazmatické úpravě byly vyhodnoceny pomocí SEM. Metodika je popsána v kapitole 4.1.4. Výsledné hodnoty naměřených průměrů v programu NIS Elements byly dále zpracovány pomocí software GraphPad Prism. Byla tak vytvořena vizualizace naměřených hodnot pomocí kvartilů neboli tzv. krabicový graf (boxplot).

6.1.4 Kontaktní úhel

Kontaktní úhel byl měřen stejnou metodou, jako bylo popsáno v kapitole 4.1.5. Výsledky obsahují naměřené hodnoty plazmaticky upravených stran v porovnání s nemodifikovanými stranami.

6.1.5 Měření adheze

Adheze vrstvy po plazmatické úpravě byla provedena stejnou metodikou jako bylo popsáno v Kapitole 4.1.6.

6.1.6 Určení změn v chemické struktuře po plazmatické úpravě

Případné strukturní změny plazmaticky upravených vrstev byly pozorovány pomocí ATR-FTIR analýzy. Pro tyto účely byl použit přístroj Nicolet iZ10 od firmy Thermo Fisher, ATR technika byla uskutečněna na krystale z Ge. Ve výsledném spektru byla provedena korekce na atmosféru, baseline a vyhlazení.

6.1.7 *In vitro* testování

In vitro testování modifikovaných vrstev probíhalo podobnou metodikou, která byla již popsána v Kapitole 4.1.7. Vzhledem k výsledkům testů PVA/PCL vrstvy bez plazmatické úpravy (viz Kapitola 4.2.5) bylo tentokrát otestováno, zda případné degradační produkty plazmaticky upravených PVA / HA mohou ovlivnit buněčnou viabilitu. *In vitro* testy byly proto navýšeny o testování extraktů.

1) Extrakty

Testování bylo provedeno dle normy ČSN EN ISO 10993:5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Extrakty byly připraveny inkubací vláknenných materiálů (o velikosti dna 24jamkové destičky) v kompletním médiu po dobu 24 hodin a 7 dnů (1 ml). Tyto extrakty byly následně přidány ke konfluentní vrstvě 3T3 myších fibroblastů v 96-ti jamkové destičce (nasazené 1 den předtím v koncentraci 10^4 buněk / jamku). Jako kontroly byly použity: (1) médium ve stejném objemu jako testované extrakty (100, 200 μ l), (2) médium s obsahem cytotoxického Tritonu X-100. Po týdenní inkubaci byl testován pouze jeden objem média / extraktu (100 μ l). Po 24 hodinách inkubace byl proveden standardní MTT test (mikroskopická kontrola buněk, inkubace buněk s 50 μ l MTT 4 hodiny, 37°C, rozpuštění krystalů formazanu ve 100 μ l okyseleného isopropanolu, měření absorbance při 570 nm, 650 nm). Výsledky byly přepočítány proti hodnotě viability kontrolních buněk ve 100 μ l média (100%ní viabilita).

2) Hodnocení adheze a proliferace fibroblastů na kompozitní materiály

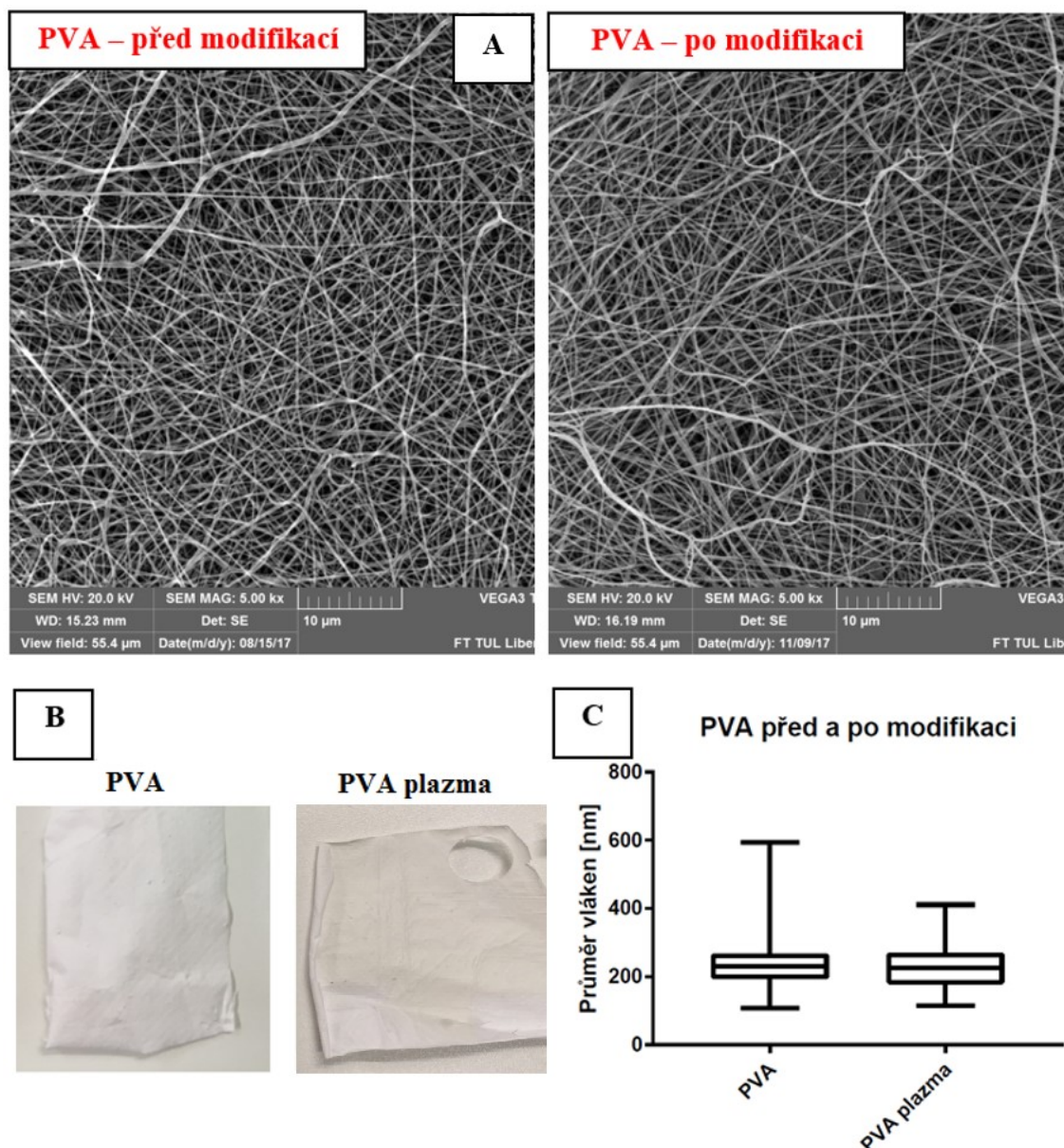
Kompozitní materiály PVA/PCL a HA/PCL po plazmatické úpravě byly osazeny myšími 3T3 fibroblasty (pasáž 11) a hodnotila se interakce jednotlivých stran kompozitních materiálů s buňkami po 1 a 7 dnech kultivace. Materiály byly vystříhány do velikosti dna 24jamkové destičky, zatíženy skleněným kroužkem a vysterilizovány v ethylen oxidu. Metodika MTT testu, fluorescenční mikroskopie a SEM byla popsána v kapitole 4.1.7.

6.2 Výsledky

6.2.1 Změna morfologie hydrofilních vrstev po plazmatické úpravě

PVA/PCL soudržná vrstva, vyrobená vrstvením v pořadí PVA-PCL (Přístup 1), byla upravena pomocí plazmatické úpravy. Modifikaci byla podrobena pouze hydrofilní strana vrstvy. Na Obrázku 31 lze vidět snímky ze SEM před a po modifikaci a také fotografie

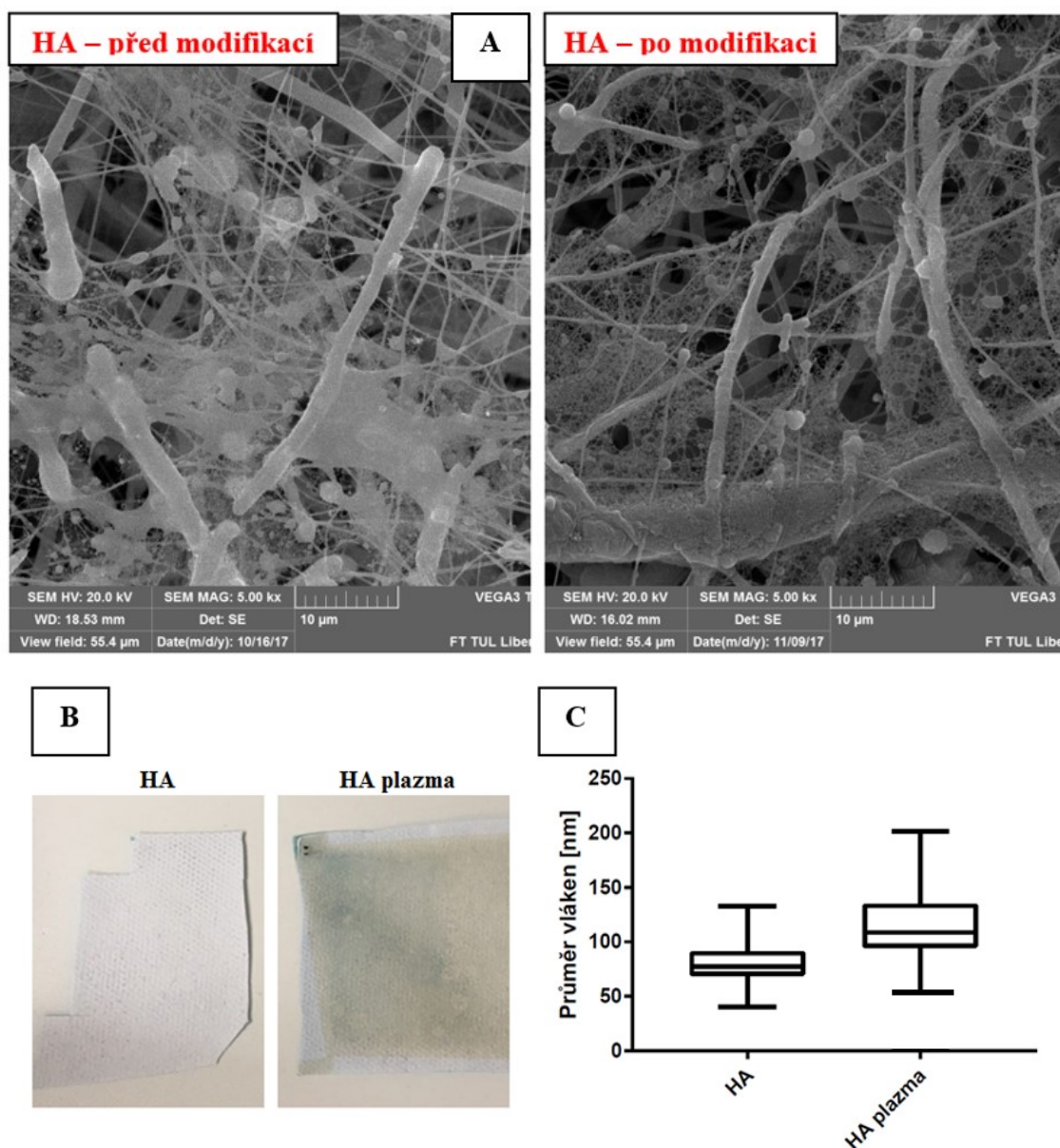
vrstvy. Průměr před modifikací činil $(242,11 \pm 84,21)$ nm a po plazmatické úpravě byl $(236,96 \pm 69,80)$ nm. Nejsou patrné žádné změny v morfologii vláken a nedošlo ani ke změně průměrů vláken. Na fotografiích je vidět pouze nepatrná změna barvy vrstvy, což také indikuje, že nedošlo k dostatečnému zabudování uhlíku do struktury.



Obrázek 31: SEM snímky vrstvy PVA/PCL před a po modifikaci plazmatickou metodou; měřítko 10 μ m (A), společně s fotografiemi (B) a porovnáním průměrů vláken PVA (C).

HA/PCL vrstva, vyrobená elektrostatickým zvlákňováním a manuálním rozprašováním, byla modifikována plazmatickou metodou. Upravena byla pouze hydrofilní HA strana vrstvy. SEM snímky původní a upravené vrstvy jsou součástí Obrázku 32 společně

s porovnáním průměrů vláken a fotografií vrstev. Průměr před modifikací činil $(79,4 \pm 18,6)$ nm a po plazmatické úpravě byl $(113,77 \pm 30,84)$ nm. Ze SEM snímků i z naměřených průměrů vyplývá zjevná změna morfologické struktury vláken. Vláknenná struktura zůstala zachována, ale vlákna mají hrubší a členitější povrch. To může být způsobeno depozicí methanových radikálů na vláknennou strukturu, ale i případným naleptáváním vrstvy dalšími reaktivními částicemi plazmatu. Modifikaci uhlíkovými skupinami lze předpokládat i dle fotografie, jelikož vrstva po úpravě plazmatem je zabarvená a tmavší.



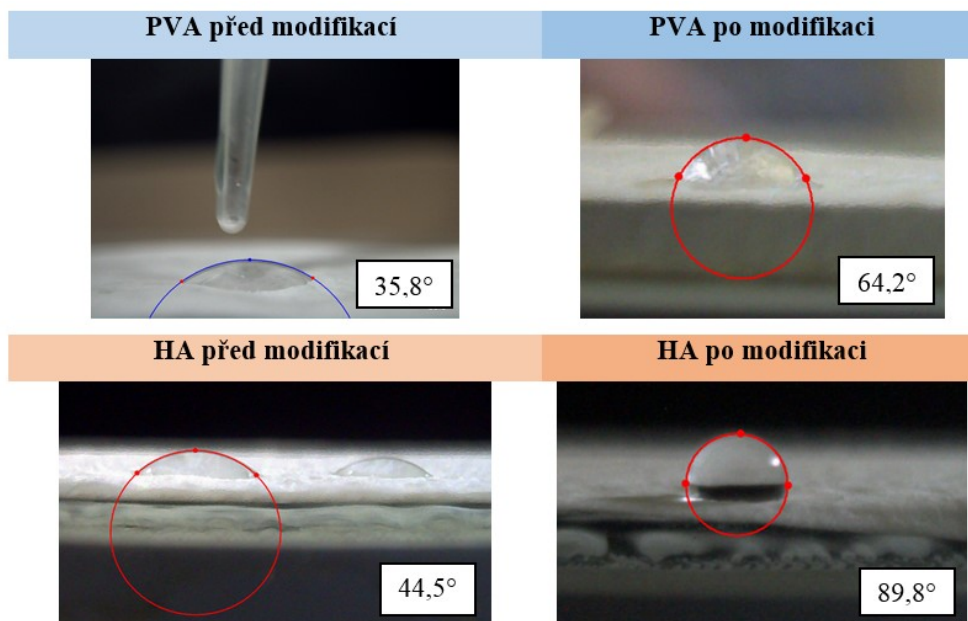
Obrázek 32: SEM snímky vrstvy HA/PCL před a po modifikaci plazmatickou metodou; měřítko 10 μm (A), společně s fotografiemi (B) a porovnáním průměrů vláken HA (C).

6.2.2 Změna kontaktního úhlu

Kontaktní úhel byl měřen z obou stran materiálu, a to sice před i po modifikaci plazmatem. Byla vytvořena Tabulka 6, která porovnává jednotlivá měření. Kontaktní úhel HA vrstvy byl výrazně zvýšen a je proto zjevné, že se podařilo navýšit hydrofobicitu smáčivých stran vrstvy. Pro lepší ilustraci změny smáčivosti byly do Obrázku 33 vloženy fotografie kontaktních úhlů pořízených CCD kamerou.

Tabulka 5: Porovnání kontaktních úhlů vrstev PVA/PCL a HA/PCL před a po plazmatické úpravě.

PVA/PCL před modifikací		PVA/PCL po modifikaci
	Kontaktní úhel [°]	Kontaktní úhel [°]
PCL strana	95,33 ± 21,79	99,8 ± 23,33
PVA strana	32,85 ± 6,80	55,56 ± 26,55
HA/PCL před modifikací		HA/PCL po modifikaci
	Kontaktní úhel [°]	Kontaktní úhel [°]
PCL strana	88,63 ± 20,29	72,04 ± 26,81
HA strana	46,59 ± 15,19	106,29 ± 10,23

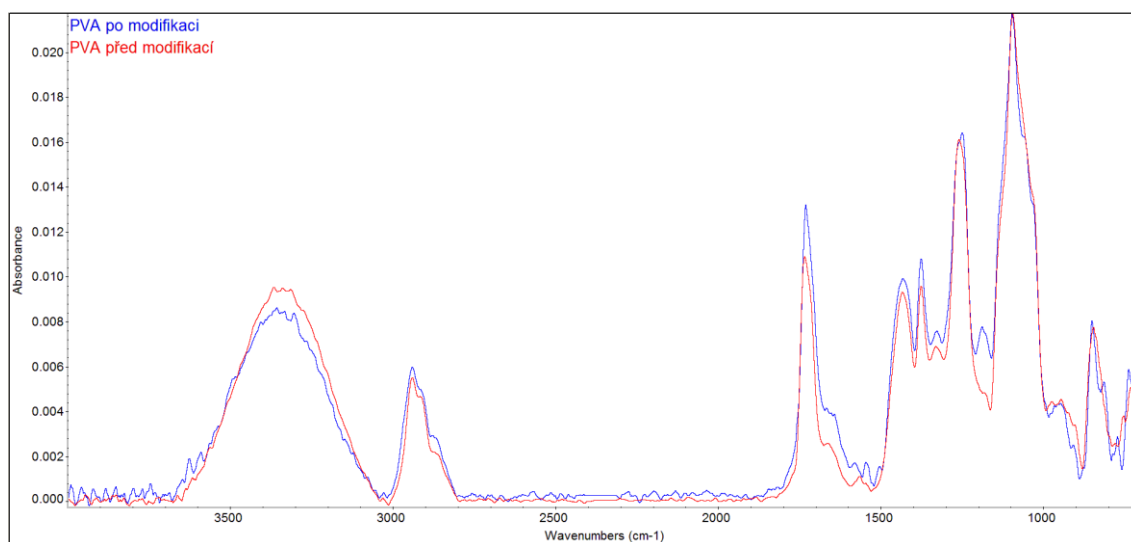


Obrázek 33: Fotografie kontaktních úhlů hydrofilních stran dvouvrstev před a po plazmatické úpravě.

6.2.3 Změna chemické struktury - FTIR charakteristika

Plazmatická úprava byla provedena pro zvýšení hydrofobicity smáčivých stran vrstev. Bylo předpokládáno, že použitím studeného CH_4 plazmatu dojde k navázání $-\text{CH}_3$ skupin na povrch PVA a HA vlákenné vrstvy. Tím by došlo ke snížení počtu hydroxylových skupin polymerů, což by zajistilo nižší rozpustnost ve vodě. Tento předpoklad bylo nutné ověřit a pro tyto účely byla vybrána charakterizace vrstev pomocí FTIR.

PVA/PCL spektra, získaná před a po plazmování, jsou vyneseny na Obrázku 34. Pro PVA jsou typická absorpční maxima v oblasti $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, která přísluší O-H vazbám. Vrchol na $2840 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá alkylovým C-H skupinám a maxima na vlnových délkách $1750 - 1735 \text{ cm}^{-1}$ jsou způsobeny C=O a C-O skupinami, které jsou pozůstatek acetátových skupin (PVA vyrábí polymerizací vinyl acetátu). Zdá se, že opravdu došlo k mírnému poklesu v oblasti $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, která přísluší O-H vazbám, což způsobuje nižší rozpustnost. Zároveň se objevuje jemný nárůst v oblasti 1735 cm^{-1} , který odpovídá navýšení C=O skupin, které jsou rovněž hydrofóbní.

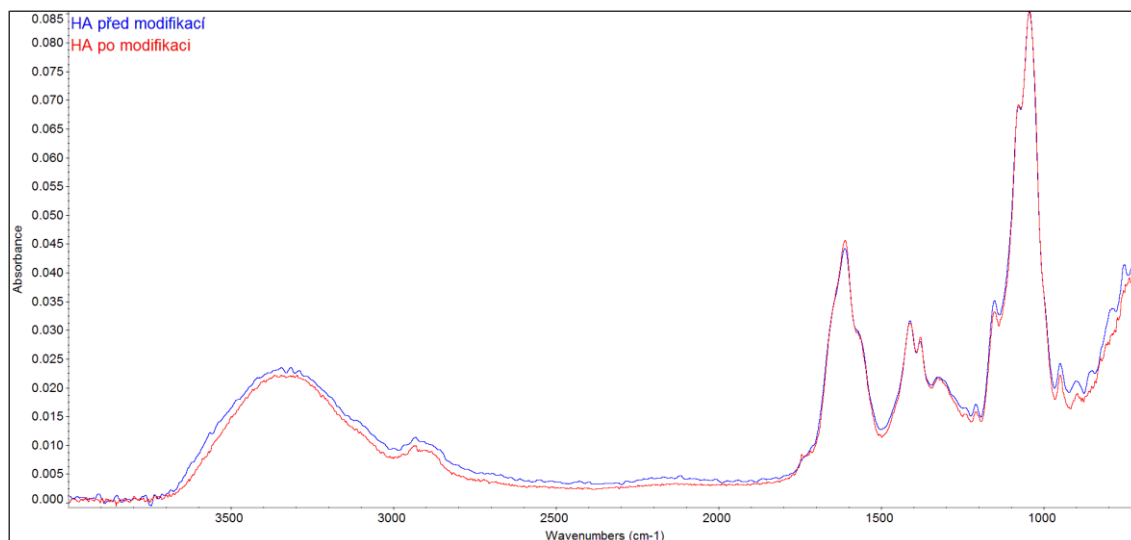


Obrázek 34: FTIR spektrum vláken PVA před a po modifikaci.

HA/PCL spektra jsou vykresleny v grafu na Obrázku 35. Pro získání spekter HA před a po plazmování byly vyrobeny fólie z roztoku HA o stejném původu a koncentraci, jaké byly používány pro zvlákňování a vytvoření dvouvrstvy. K tomuto postupu bylo přistoupeno na základě nehomogenity vytvořené HA/PCL vrstvy, které obsahovala ultrajemná vlákna HA v malém množství oproti PCL vláknům a nebylo tak možné provést spolehlivou FTIR analýzu. Morfologii HA nanovláken lze vidět na SEM snímcích Obrázku 29, na kterých je zjevné, že vrstva HA plně nepokrývá PCL vlákna. Folie byly

připraveny nalitím 1 ml roztoku HA na očištěný alobal. Po 24 hod roztok zaschl a vytvořil hladkou průhlednou fólii, která byly naplazmována při stejných parametrech jako vlákenná vrstva ($p = 20 \text{ Pa}$; $U = 200 \text{ V}$; $\text{CH}_4 = 20 \text{ sccm}$; $t = 3 \text{ min}$), aby bylo dosaženo porovnatelných výsledků v případných změnách chemické struktury.

Charakteristické IR spektrum HA obsahuje několik absorpčních maxim. Patří mezi ně maximum na vlnové délce 3400 cm^{-1} , který je připisován O-H vazbám. Vrchol na 1750 cm^{-1} přísluší C=O karboxylových kyselin. Maximum peaku na 1650 cm^{-1} a také na 1500 cm^{-1} se pak vztahuje k amidu. V případě maxim v rozmezí $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ se jedná o C-O estery a ethery. Ze spekter před a po modifikaci však nelze určitě žádný výrazný rozdíl. Největší změny pravděpodobně nastaly v oblasti nepolárních vazeb mezi uhlíky, na které FTIR není citlivé, a případné změny tak nejsou ve výsledném spektru patrné.

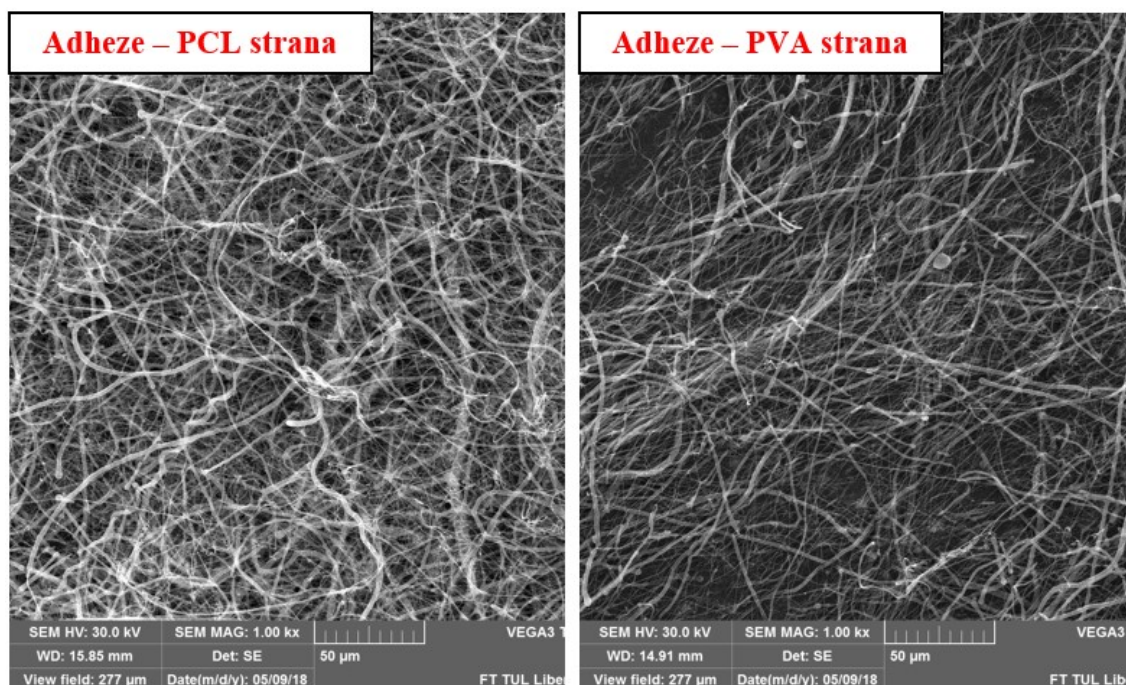


Obrázek 35: FTIR spektra fólií HA před a po modifikaci.

6.2.4 Změna adheze dvouvrstvy po plazmatické úpravě

Hodnota adheze PVA/PCL vrstvy byla měřena před i po úpravě methanovým plazmatem. Kritická síla potřebná k oddělení vrstev po plazmatické modifikaci činila $(2,38 \pm 0,28) \text{ N}$. Tato hodnota je nižší než v případě plazmaticky neošetřené vrstvy PVA/PCL, kde hodnota dosáhla $(3,22 \pm 0,19) \text{ N}$ (viz Kapitola 4.2.4). Plazmatická úprava negativně ovlivnila adhezi jednotlivých vrstev. Toto pozorování mohlo být zapříčiněno změnou pevnosti vláken. Ze SEM snímků PVA vlákenné strany materiálů, viz Obrázek 31(A), nevyplyvá žádná morfologická změna oproti neošetřeným PVA vláknům. Plazmatická úprava ovšem nemusí vytvořit homogenní modifikaci. Pokud místy došlo

k narušení struktury PVA vláken a vytvoření porézního materiálu, mohla být ovlivněna i adheze. Obrázek 36 obsahuje SEM snímky morfologie oddělených vrstev po měření. Opět nedošlo k úplnému rozdělení jednotlivých vrstev, ale lze vidět, že část PCL vláken ulpívá na PVA vrstvě.



Obrázek 36: SEM snímky morfologii mechanicky oddělených vrstev plazmaticky ošetřené vlákenné dvouvrstvy PVA/PCL, měřítko 50 µm.

Hodnota adheze HA/PCL materiálu nebyla měřena před modifikací ani po ošetření methanovým plazmatem. Kompozitní materiál neobsahoval ucelenou vrstvu jemných nanovláken HA a nebylo tak možné spolehlivě určit adhezi, jelikož se hodnoty kritických sil se výrazně lišily v každém bodě vzorku.

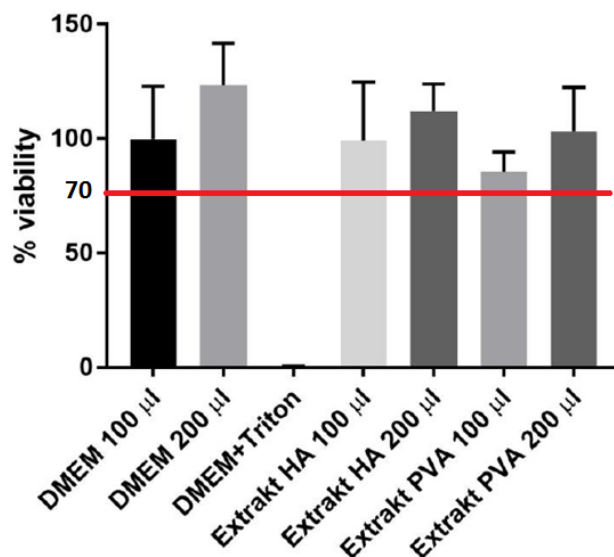
6.2.5 *In vitro* testování materiálů

1) Extrakty

Z výsledků *in vitro* testování PVA/PCL vrstvy v Kapitole 4.2.5 bylo zjevné, že hydrofilní vlákna mohou ovlivňovat výsledky testování, přestože se během experimentu plně rozpustí. Extrakty, připravené inkubací plazmaticky upravených PVA/PCL a HA/PCL vrstev v plném médiu, byly přidány ke konfluentní vrstvě 3T3 myších fibroblastů v 96-ti jamkové destičce.

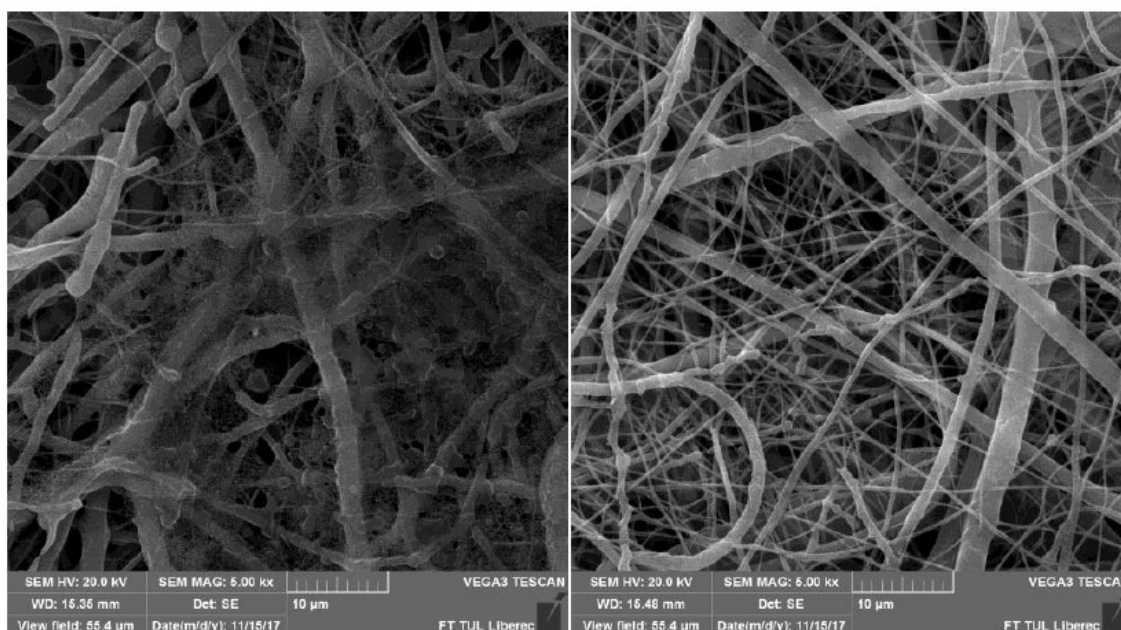
Po 24 hodinách nedošlo ke změně metabolické aktivity buněk do kladných ani záporných hodnot (viz Obr. 37). Mírné odchylky mohou být způsobeny metodikou (odsátí části

konfluentní vrstvy během manipulace apod.). Předpokládalo se, že by případné degradační produkty PCL / HA mohly ovlivnit buněčnou viabilitu, což nebylo testem prokázáno. Nedošlo k poklesu hodnot metabolické aktivity buněk po 70% a dle normy ISO 10993:5 tak materiály nejsou cytotoxické.



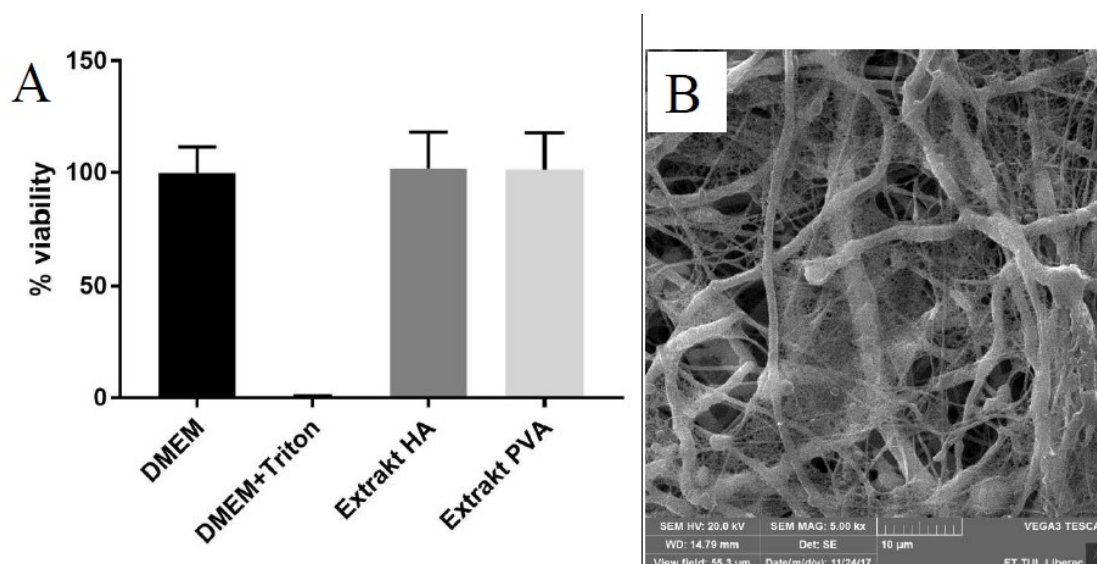
Obrázek 37: Hodnocení metabolické aktivity buněk po 24hodinové inkubaci s extrakty kompozitních materiálů.

Po experimentu byla provedena mikroskopická kontrola materiálů po standardním procesu fixace a odvodnění vzorků vzrůstající ethanolovou řadou. Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie jsou znázorněny na Obr. 38. V případě HA nedošlo k rozpuštění modifikovaných vláken. PVA bylo během experimentu či během přípravy vzorků pro SEM analýzu rozpuštěno; na snímku jsou patrná vlákna PCL, která se nacházela pod rozpuštěnou vrstvou PVA.



Obrázek 38: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie kompozitních materiálů PCL+HA, PCL+PVA po 24hodinové inkubaci v kompletním médiu, měřítko 10 µm.

Po týdenní extrakci materiálů v kompletním médiu byl proveden obdobný experiment. Hodnota viability buněk opět nebyla pozměněna, výsledky byly konzistentnější (viz graf na Obr. 39A). Provedená mikroskopická analýza vypadala obdobně jako v předchozím hodnoceném časovém intervalu - HA byla i po týdenní inkubaci v médiu přítomná (viz Obr. 39B).



Obrázek 39: Hodnocení metabolické aktivity buněk po týdenní inkubaci s extrakty kompozitních materiálů (A), SEM snímek kompozitního materiálu PCL+HA po týdenní inkubaci v kompletním médiu, měřítko 10 µm (B).

2) Hodnocení adheze a proliferace fibroblastů na kompozitní materiály

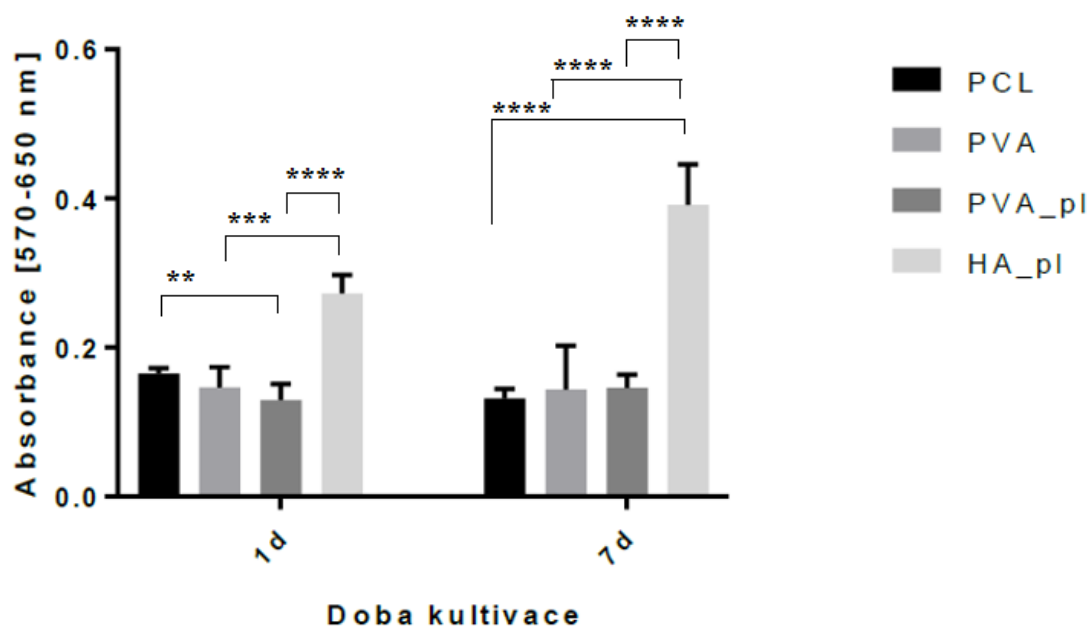
Kompozitní materiály popsané výše byly osazeny myšími 3T3 fibroblasty (pasáž 11) a hodnotila se interakce jednotlivých stran kompozitních materiálů s buňkami po 1 a 7 dnech kultivace.

Značení materiálu bylo následující:

- 1. PCL** (dvouvrstva PCL-PVA – osazena strana PCL)
- 2. PVA** (dvouvrstva PCL-PVA – osazena strana PVA)
- 3. PVA_pl** (dvouvrstva PCL-PVA plazmaticky upravená – osazena strana PVA)
- 4. HA_pl** (dvouvrstva PCL-HA plazmaticky upravená – osazena strana HA)

MTT test

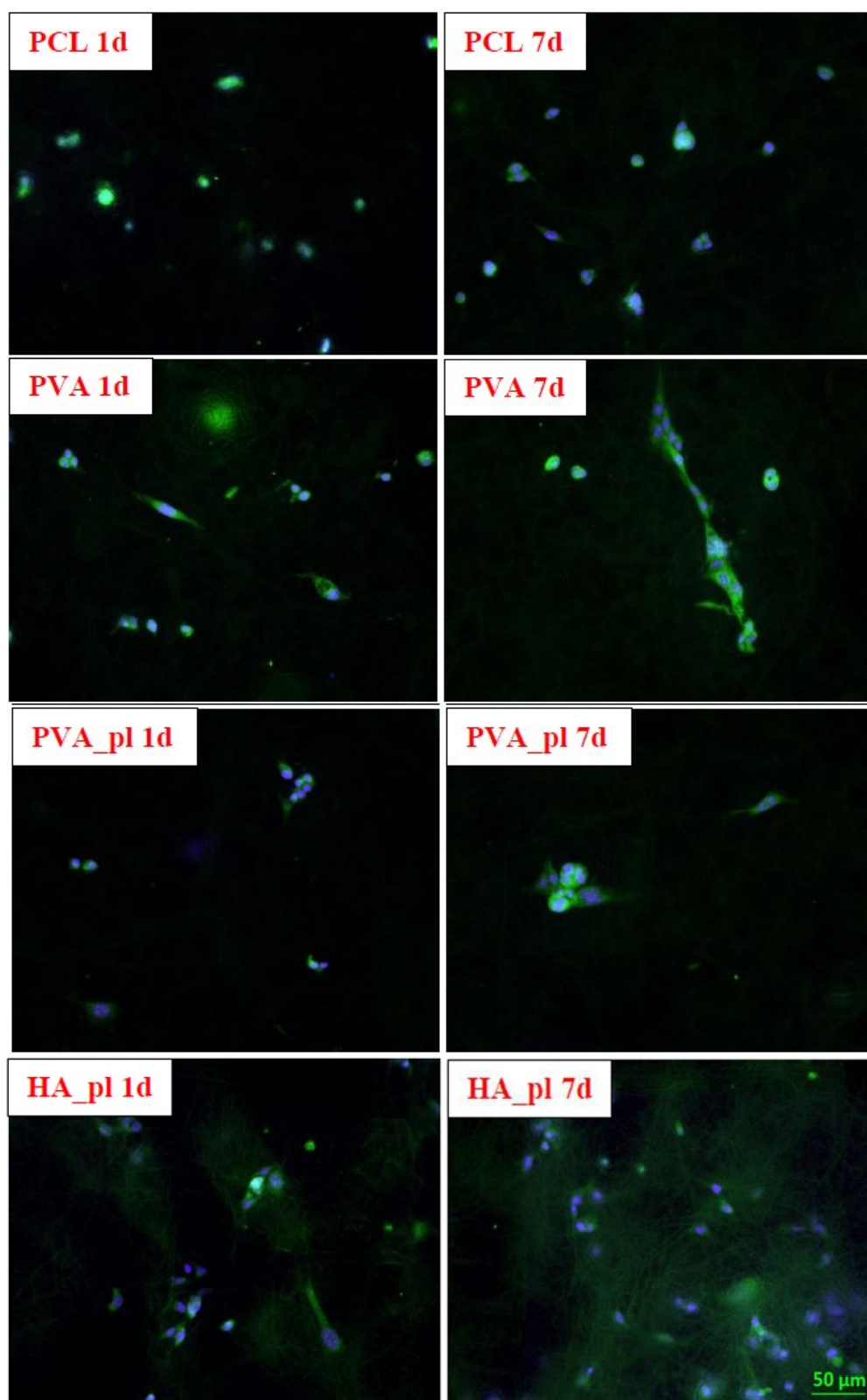
Metabolická aktivita buněk na vláknenných materiálech byla hodnocena pomocí MTT testu po 1, resp. 7 dnech kultivace (viz Obr. 40). První den po nasazení buněk byla naměřená největší hodnota absorbance odpovídající buněčné viabilitě na materiálu obohaceném o kyselinu hyaluronovou po plazmatické úpravě (HA_pl). Po týdenní kultivaci došlo k výrazné proliferaci opět na kompozitním materiálu PCL-HA (HA_pl). Na vrstvách PCL a PVA zůstala hodnota viability na nízkých hodnotách – srovnatelná s prvním dnem. Podobné výsledky na těchto třech materiálech jsou způsobeny pravděpodobně faktem, že došlo k rozpuštění PVA, proto se jednalo o interakci PCL a fibroblastů ve všech případech (PCL, PVA, PVA_pl).



Obrázek 40: Metabolická aktivita buněk nasazených na povrch vláknenných materiálů po 1 a 7 dnech, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA, Bonferroni).

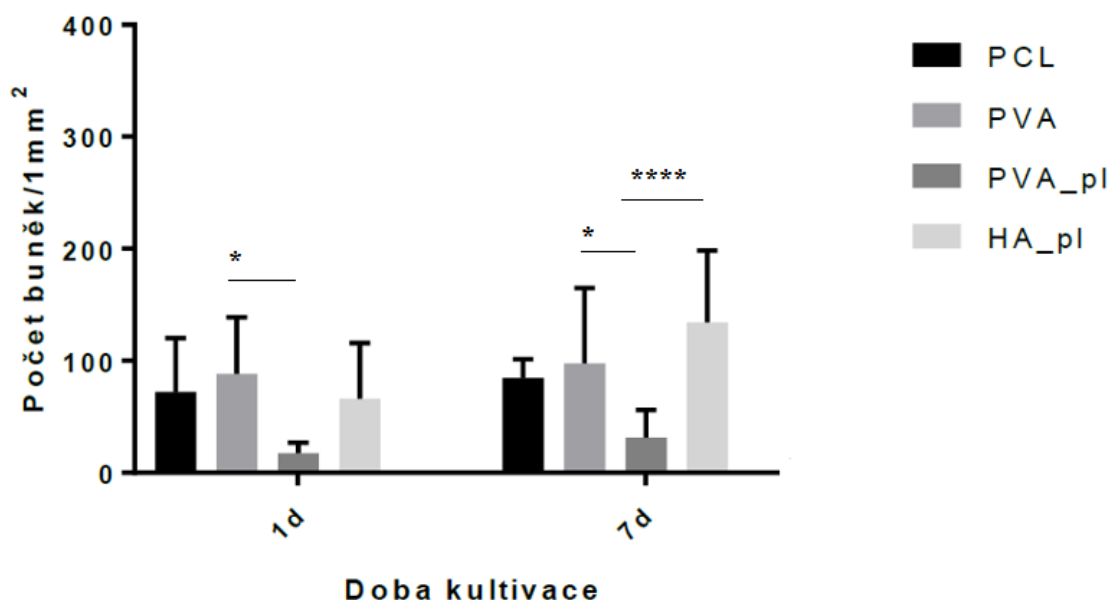
Fluorescenční mikroskopie

Buňky byly vizualizovány dvojím barvením phalloidin a DAPI, které umožňuje zviditelnění cytoplazmy (vazbou phalloidinu na aktinová vlákna cytoskeletu) a jader (vazba DAPI na DNA). Ze snímků na Obrázku 41 je patrné, že materiály PCL, PVA a PVA_pl nepodporovaly adhezi a proliferaci fibroblastů. Buňky měly spíše zakulacený tvar a jejich počet se během týdenního testování nenavýšoval. Naproti tomu materiál obohacený o kyselinu hyaluronovu (HA_pl) po plazmatické úpravě umožňoval dobrou buněčnou adhezi a rozproštění buněk. Po týdnu došlo k buněčné proliferaci, počet buněk se zvýšil oproti prvnímu dni.



Obrázek 41: Snímky z fluorescenční mikroskopie buněk na testovaných materiálech – zeleně se barví aktinová vlákna (phalloidin), modře buněčné jádro (DAPI), měřítko 50 μm .

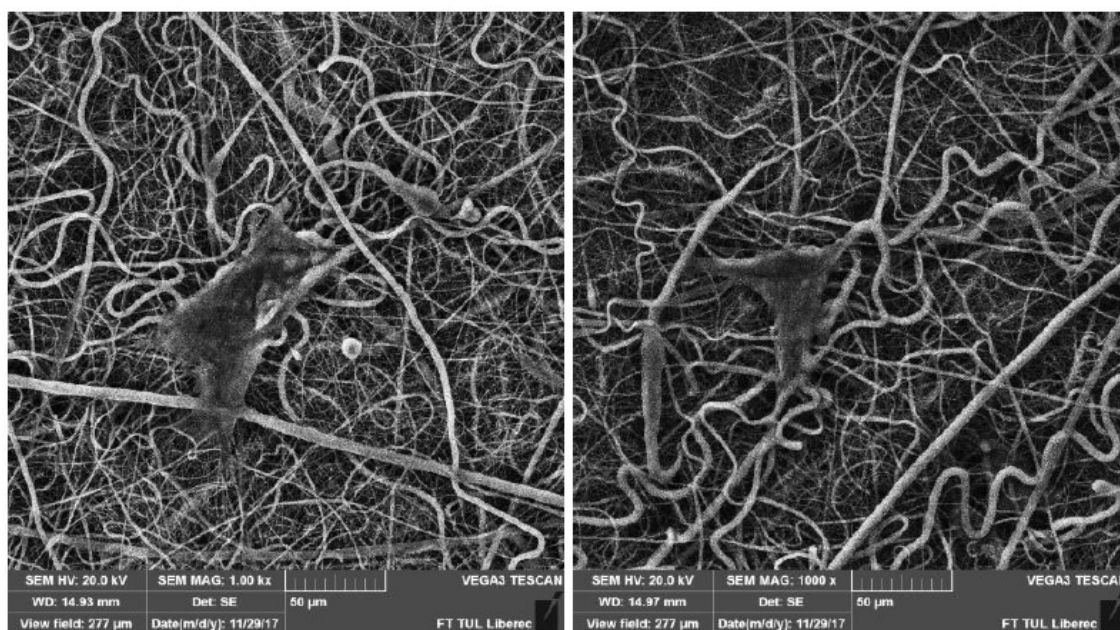
Buněčná jádra byla kvantifikována softwarem MATLAB a výsledky byly přepočítány na počet buněk na jednotce plochy (1 mm^2). Výsledky jsou zobrazeny v grafu na Obrázku 42. Nejnižší počet adhezních buněk byl zaznamenán u materiálu PVA-pl, tento nízký počet přetrvával i po týdenní kultivaci. K nejvýraznější proliferaci došlo na materiálu HA-pl, kde byl detekován nejvyšší počet buněk po týdenní kultivaci.



Obrázek 42: Kvantifikace buněk na testovaných materiálech po 1 a 7 dnech kultivace, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA, Bonferroni).

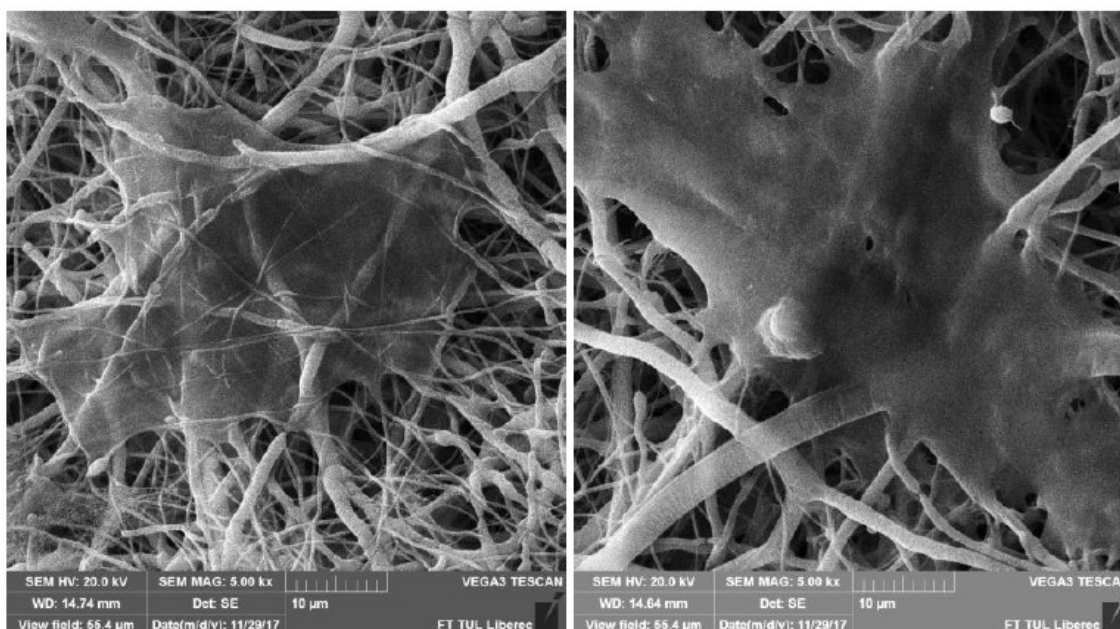
Skenovací elektronová mikroskopie

U kompozitního materiálu PCL-PVA došlo k rozpuštění PVA vrstvy, jak již bylo dokázáno v předchozím experimentu s extrakty. Interakce buněk tak tedy probíhala pouze s vlákněným PCL, nikoliv s PVA, jak je uváděno pro dodržení počátečního označení strany osazení původního materiálu. Na snímku na Obrázku 43 je vidět pouze vrstva PCL s ojedinělými buňkami.



Obrázek 43: Snímky z elektronové mikroskopie fibroblastů na vlákenném nosiči PCL (vrstva PVA vláken již není přítomna) po týdenní kultivaci, měřítko 50 µm.

Vrstva kyseliny hyaluronové byla během týdenní inkubace v médiu neporušena. Buňky na tuto kompozitní vrstvu adherovaly a proliferovaly během týdenního experimentu (viz Obr. 44).



Obrázek 44: Snímky z elektronové mikroskopie fibroblastů na vlákenném nosiči PCL+HA_{pl} po 1 dni a 7 dnech kultivace, měřítko 10 µm.

Závěr

Provedenými experimenty byla ověřena přítomnost kyseliny hyaluronové po plazmatické úpravě na vlákenném nosiči z PCL, která podporovala buněčnou adhezi a proliferaci. Vrstva PVA byla po kontaktu s médiem rozpuštěna, a to i po plazmatické úpravě. Výsledky ukazují potenciál modifikace kyseliny hyaluronové plazmatickou úpravou.

7 Diskuse

Elektrostatické zvlákňování je pro svou variabilitu nejpoužívanějším přístupem pro výrobu vlákných scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Řada studií toto tvrzení potvrzuje, jedná se například o publikace autorů Agarwal *et al.* (2008), Alhosseini *et al.* (2012), Chen *et al.* (2016) či Kishan a Cosgriff-Hernandez (2017). V této diplomové práci bylo elektrostatické zvlákňování použito jako metoda pro výrobu dvouvrstvých vlákných nosičů s odlišnou smáčivostí povrchu. Jako hydrofilní polymery byly vybrány PVA a HA a jako hydrofóbní polymer pak PCL. V případě PVA se tato práce opírá o všestrannost PVA a jeho využití v biomedicině, jak potvrzují i studie autorů Sasipriya *et al.* (2013), Jensen *et al.* (2016) a další. Kyselina hyaluronová se také těší roustoucí oblibě v tkáňovém inženýrství, jak dokazuje i přehledová studie (*review article*) od autorů Collins a Birkinshaw (2013), ale i novější studie od Hussain *et al.* (2017). Byla provedena řada *in vitro*, *in vivo*, i klinických studií v oblasti aplikace HA pro léčení ran. Poly-ε-kaprolakton se hojně využívá v tkáňovém inženýrství pro svou dostupnost a možnosti úprav jeho vlastností. Navíc byly vydány studie, které využívají PCL pro tkáňové inženýrství gastrointestinálního traktu. Například v publikaci od autorů T. Knight *et al.* (2013) byla směs PCL/PLGA použita pro výrobu tubulárního scaffoldu, který měl sloužit jako náhrada části tenkého střeva.

7.1 Materiál PVA/PCL

Jako první materiál byla vyrobena PVA/PCL vlákná dvouvrstva. Vlákný kompozitní materiál byl vytvořen sekvenčním zvlákňováním. Stejný přístup byl použit pro výrobu vícevrstvého materiálu např. ve studii od Kharaziha *et al.* (2013) či Kidoaki *et al.* (2005). Byly vyzkoušeny oba způsoby pořadí vrstvení. V Přístupu 1 byl nejprve zvlákněn PVA, který byl ukládán na spunbond, následně byl zvlákněn PCL a uložen na PVA vrstvu. Ve vrstvě, vytvořené Přístupem 2, byly polymery zvlákněny v opačném pořadí. Kompozitní dvouvrstva byla vytvořena pouze Přístupem 1. Polymery je možné zvláknit i Přístupem 2, nicméně výsledné vrstvy nevykazují soudržnost (viz Obrázek 18).

Nesoudržnost vrstev je nejspíše způsobena rozpouštědlovým systémem. PVA byl připraven jako vodný roztok, avšak je rozpustný i v ethanolu. Když tedy na vytvořenou nanovláknennou vrstvu dopadnou PCL vlákna se zbytkovým rozpouštědlem, ve kterém je ethanol, snadno se vlákna přilnou. Na druhou stranu, PCL ve vodě rozpustný není. Pokud jsou tedy na vrstvu PCL vláken zvláknována vodorozpustná vlákna PVA, nedojde ke spojení dvou vrstev. Dále proto bylo pracováno pouze s homogenní dvouvrstvou, která byla vyrobena v pořadí PVA-PCL (Přístup 1).

Předpokládána hydrofilita PVA strany a hydrofobicita PCL strany byla ověřena měřením kontaktního úhlu. Nízká hodnota kontaktního úhlu na PVA straně (okolo 33°) koresponduje se studií od Ngadimana *et al.* (2015). Hodnota kontaktního úhlu PCL (cca 95°) se shoduje se studií W. Wanga *et al.* (2016).

Tato vrstva byla mimo jiné otestována pomocí *in vitro* testů, kdy byly nasazeny 3T3 myší fibroblasty na obě strany materiálu. Výsledky MTT testu ukázaly nárůst proliferace na PVA straně po 7 dnech kultivace oproti PCL straně. Snímky z fluorescenční mikroskopie tento výsledek potvrdily, nejvíce adherovaných buněk bylo na vrstvě PVA a tvořily tak téměř konfluentní vrstvu. Nižší proliferace na PCL straně vrstvy byla předpokládána, vzhledem k hydrofobicitě PCL. Nižší proliferaci buněk na PCL kvůli nižší smáčivost je popisován i např. ve studii od Jahani *et al.* (2012) a v přehledové studii (*review article*) od autorů Abedalwafa *et al.* (2012) je popsáno několik úprav PCL vrstev, které byly použity za účelem zvýšení nedostatečné buněčné proliferace. SEM snímky potvrdily, že se PVA vrstva během testování rozpustila, jak bylo předpokládáno. Nejspíš však přítomnost PVA na začátku experimentu a případné degradační produkty výrazně ovlivnily buněčnou adhezi a proliferaci.

7.2 Materiál HA/PCL

Jako druhý kompozitní materiál byla připravena dvouvrstva HA/PCL. Byly zvoleny dvě metody přípravy. Jednalo se o Metodu A, ve které bylo kombinováno elektrostatické rozprašování (pro HA roztok) a elektrostatické zvláknování (pro PCL roztok) a Metodu B, ve které bylo zvoleno opět sekvenční elektrostatické zvláknování. Předpokládalo se, že Metodou A dojde k efektivnímu zachycení elektrostaticky rozprašených vysokomolekulárních kapek HA mezi vlákna PCL. Podobný přístup a aparatura byly použity například ve studii od autorů Vitchuli *et al.* (2011), kde byly mezi nanovlákna Nylonu 6 inkorporovány ZnO nanočástice pro zavedení antibakteriálních vlastností

materiálu nebo také v publikaci od Chen a Elabd (2017) a dalších výzkumech. Pomocí GPC stanovení se ovšem hypotézu nepodařilo ověřit. Analyzované vzorky obsahovaly nízký podíl HA, který nebylo možné detekovat. Pro budoucí opakování experimentu je vhodné použít RASL (Right Angle Light Scattering) detektor, který je na polymery s vysokou molekulovou hmotností dostatečně citlivý.

Metodou B byla vyrobena dvouvrstva HA/PCL. Zvlákňování vodných roztoku HA je velice obtížné. Důvodem je přílišná viskozita vodných roztoků a polyelektrolytické vlastnosti. (Brenner *et al.* 2012) Bez chemických aditiv je velice náročné připravit vláknennou vrstvu HA, avšak toxické přísady tvoří překážku pro biomedicínská využití takto připravených nanovláken. Ve studii od autorů Um *et al.* (2004) bylo pro zvlákňování využito mísení s nízkomolekulárních frakcí HA a ethanolu, spolu s modifikací aparatury pro elektrostatické zvlákňování, tzv. electroblowing. Při tomto zpracování nanovláken proudí vzduch okolo elektrody, ze které se zvlákňuje polymerní roztok. Proud vzduchu tak usnadňuje tvorbu Taylorových kuželů a zároveň urychluje vypařování rozpouštědla. Ve studii od autorů Liu *et al.* (2011) byl použit rozpouštědlový systém DIW/kyselina mravenčí/DMF (25/50/25). V publikaci od Brenner *et al.* (2012) bylo poukázáno na degradaci HA při použití rozpouštědel NaOH:DMF. Jako rozpouštědla v práci těchto autorů proto byla zvolena méně kyselá směs hydroxidu amonného (NH₄OH) a DMF. Pro usnadnění zpracování roztoků HA v elektrickém poli a zvýšení produktivity výroby se většina studií přiklání k mísení HA s tvz. nosným polymerem, který lze snadno zvláknit. Zřejmým důsledkem tohoto postupu je však to, že se ve výsledné vrstvě nachází jen určitý procentuální podíl HA. Pro tyto účely se používá např. PVA (Kotzianová *et al.* 2016) nebo PEO (Ji *et al.* 2006).

V této diplomové práci byly nalezeny podmínky, při kterých lze zvláknit vodné roztoky vysokomolekulární (1,4 MDa) HA bez chemických aditiv a při relativně vysokých okolních vlhkostech (41%). Ukázalo se ale, že zvlákňování roztoků HA není tak produktivní, jako zvlákňování PCL roztoků, a proto nebyla vytvořena homogenní dvouvrstva. Vrstva ultrajemných HA nanovláken plně nepřekrývá PCL vrstvu a tím bylo ovlivněno i měření kontaktního úhlu, který dosahuje hodnoty $(46,59 \pm 15,19)^\circ$, což je vyšší hodnota než v případě PVA vrstvy. Nicméně vlákna HA i PVA jsou velmi smáčivá a proto bylo přistoupeno ke zvýšení jejich hydrofobicity.

7.3 Povrchová úprava PVA a HA stran vláknenných dvouvrstev

Cílem diplomové práce bylo vyrobit vláknenný materiál, který se skládá ze dvou vrstev vláken s odlišnou smáčivostí. Elektrostatickým zvlákňováním byly připraveny dva materiály skládající se z PVA/PCL a HA/PCL. V budoucí aplikaci je zamýšleno dvouvrstvu přiložit hydrofilní stranou na čerstvě vytvořenou gastrointestinální anastomózu. Avšak hydrofilní polymery (PVA a HA) se okamžitě po kontaktu s tkání rozpustí. Dle Khunmanee *et al.* (2017) lze nižší rozpustnost lze zajistit pomocí klasických síťovacích technik (za přidání glutaraldehydu, divinyl sulfonu, glyoxalu či UV zářením za přidání UV iniciátorů). Tyto techniky však nejsou zcela vhodné pro biomedicínské aplikace a všeobecně síťování při zachování biokompatibility je velice obtížné. V této diplomové práci proto bylo přistoupeno k ošetření hydrofilní strany dvouvrstvých materiálů studeným methanovým plazmatem. Předpokládalo se, že dojde k navázání uhlíkových funkčních skupin na povrch vláken a tím se sníží rozpustnost. Tato metoda byla vybrána na základě výhod plazmatických procesů, jako je variabilita procesu a možnost zvýšení hydrofobicity vláken bez přídavku chemických aditiv.

Na Obrázku 31 je SEM snímek morfologii PVA vláken po vystavení plazmatu. Na základě článku od autorů Thongpud *et al.* (2008) bylo předpokládáno, že dojde k zvýšení mikrodrsnosti povrchu vláken vlivem depozice uhlíkových funkčních skupin. Avšak SEM snímky před a po plazmatické úpravě s tímto předpokladem nekorespondují. Není vidět žádná změna v morfologii povrchu vláken a nedošlo ani ke statisticky významné změně průměrů vláken. Po plazmatické úpravě došlo ke zvýšení kontaktního úhlu (Tabulka 6), ale hodnota se stále pohybuje v oblasti hydrofilních materiálů. Procesní podmínky plazmatického procesu nebyly dostatečné pro modifikaci povrchu.

V dostupných zdrojích nebyly nalezeny žádné publikace, které by se věnovaly zvýšení hydrofobicity vláken HA pomocí plazmatických procesů. V této práci byla úspěšně navýšena hydrofobicita HA nanovláken. Změna struktury nanovláken je výraznější než v případě modifikace PVA, jak lze vidět na Obrázku 32. Došlo k vytvoření strukturovanějšího materiálu, což rovněž způsobilo zvýšení průměrů vláken. Stejný výsledek potvrzuje i měření kontaktního úhlu, který dosahuje nad 100° a modifikovanou vrstvu HA lze tak označit jako hydrofóbní materiál.

Změny v chemické struktuře byly analyzovány pomocí FTIR. Na základě studií bylo předpokládáno, že dojde ke snížení –OH skupin a především navázání uhlíkových

funkčních skupin, jelikož bylo použito methanové plazma. (Jeong *et al.* 2009; Liguori *et al.* 2015) Tento předpoklad nebyl pomocí FTIR ověřen. Pokud ovšem byly v průběhu plazmatického procesu navázány uhlíkové funkční skupin, došlo k vytvoření nepolárních vazeb, na které není FTIR citlivá. Ve studii od Molina *et al.* (2014) také nebyla pozorována změna v IR spektrech chitosanových gelů před a po plazmatické úpravě. Ze spekter přesto vyplývá důležitý výsledek, tedy že nedošlo k výrazným změnám v chemické struktuře. Pro ověření navýšení uhlíku ve vrstvě by bylo vhodné provést například Rentgenovou fotoelektronovou spektroskopii (XPS), čímž by byla získána prvková analýza vrstvy před a po modifikaci a kvantitativně pak vyhodnocen procentuální obsah jednotlivých prvků.

In vitro testování potvrdilo rozpuštění PVA i po plazmatické úpravě. Výsledky MTT testu, fluorescenční i skenovací elektronové mikroskopie ukazují, že došlo k rozpuštění PVA před i po plazmatické úpravě a fibroblasty interagovaly pouze s vlákněným PCL, který byl součástí dvouvrstvého materiálu. Nedošlo tak k zvýšení buněčné adheze a proliferace oproti PCL vrstvě. Tyto výsledky se neshodují s prvotními *in vitro* testy PVA/PCL vrstvy. Pro porovnatelnost jednotlivých výsledků byla totiž testována opět původní PVA/PCL vrstva. Vrstva PVA se však nejspíše při skladování vlivem vnějších podmínek částečně rozpustila. Výsledky tak nejsou srovnatelné. Je tedy nutné experiment zopakovat. Podstatným výsledkem je, že plazmatická úprava PVA vláken nevedla ke zvýšení jejich rozpustnosti a modifikovaný materiál nepodporoval adhezi fibroblastů. Naopak ultrajemná síť HA vláken zůstala zachována i po týdenním testování a HA strana materiálu podporovala buněčnou adhezi a proliferaci. Ukázalo se tak, že plazmatická úprava HA nanovláken má dobrý potenciál pro zvýšení hydrofobicity HA vrstvy při zachování cytokompatibility.

8 Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyrobit dvouvrstvý vlákenný tkáňový nosič, jehož jednotlivé vrstvy mají odlišnou smáčivost. Výsledný materiál by tak mohl sloužit jako krytí čerstvě vytvořených chirurgických anastomóz v oblasti gastrointestinálního traktu. Pro tyto účely byly vyvinuty dva tkáňové nosiče. Jedná se o dvouvrstvu skládající se z hydrofilních vláken PVA a hydrofóbních vláken PCL, a dvouvrstvý materiál vytvořený z ultrajemných vláken HA a vláken PCL. Materiály pro výrobu nosičů byly vybrány na základě dobré znalosti polymerů PVA, HA a PCL v tkáňovém inženýrství. Oba vyrobené materiály splňují požadavky, kladené na tkáňové nosiče, které byly představeny v teoretické části.

Jako metoda výroby bylo zvoleno bezjehlové elektrostatické zvlákňování technologií Nanospider™, která umožňuje průmyslovou výrobu vlákenných vrstev. Touto metodou byly zvlákňovány všechny polymerní roztoky, včetně vodných roztoků vysokomolekulární (1,4 MDa) HA. Přínosem diplomové práce tedy je nalezení podmínek, při kterých lze připravit ultrajemná vlákna (pod 100 nm) HA při vyšších okolních vlhkostech (41%). Není tak nutné použití klimatizační jednotky. Tento výsledek tvoří rozdíl oproti ostatním výzkumům, které se zabývají jehlovým zvlákňováním roztoků HA s chemickými aditivy pro snížení viskozity, modifikacemi zvlákňovacích aparatur (např. electroblowing) pro usnadnění odpařování vodného rozpouštědla nebo případně mísením roztoků HA s nosným polymerem, který usnadňuje zvlákňování.

Hydrofilní strany obou materiálů byly ošetřeny studeným methanovým plazmatem. Tato metoda byla zvolena jako alternativa k běžným síťovacím metodám pro snížení rozpustnosti polymerů, při kterých je velice obtížné zachovat biokompatibilitu materiálu. Pomocí plazmatické modifikace bylo dosaženo úspěšného navýšení kontaktního úhlu nanovlákně HA vrstvy, který po modifikaci činil $(106,29 \pm 10,23)^\circ$. Při modifikaci se také podařilo zachovat ultrajemnou nanovlákněnou strukturu, která nebyla rozpuštěna ani po týdenní inkubaci v kompletním médiu (viz SEM snímek na Obrázku 39B). Navíc dle *in vitro* testů byl prokázán potenciál plazmatické modifikace HA, jelikož modifikovaná struktura podporovala buněčnou adhezi a proliferaci fibroblastů. V této diplomové práci tak byla představena úspěšná metoda modifikace povrchu vláken HA pro snížení rozpustnosti. Naopak v případě PVA vláken nedošlo po plazmatické úpravě k dostatečným změnám. Toto tvrzení potvrzují morfologické SEM snímky, fotografie vrstvy po úpravě (viz Obrázek 31), nedostatečné navýšení kontaktního úhlu

(Tabulka 6) i výsledky *in vitro* testování, ze kterých je zjevné, že se vrstva rozpustila a fibroblasty interagovaly pouze s vrstvou PCL.

V dalších experimentech by proto bylo vhodné zopakovat plazmatickou úpravu PVA strany při jiných parametrech. Také lze použít jiný nosný plyn nebo metodu. Nejnovější publikace například ukazují na potenciál síťování vodorozpustných polymerů pomocí atmosférického plazmatu. Pokud by se ani tak nepodařilo zvýšit hydrofobicitu, lze přistoupit ke zvláknění roztoků PVA s vyšším stupněm hydrolýzy, jelikož rozpustnost PVA je dána stupněm hydrolýzy a roztoky s vyšší hydrolýzou jsou nerozpustné ve vodných roztocích. V budoucích experimentech lze také zvážit možnost mísení HA s dalším polymerem (např. PEO) a zvláknění jako směsi. Výhoda tohoto přístupu tkví ve zvýšení produktivity zvláknění a v ekonomické výhodnosti, jelikož pořízení HA v lékařské kvalitě je finančně náročné. Pokud by se PCL v postupném *in vivo* testování ukázal jako nevhodný polymer pro zabránění anastomotického leaku, lze jej nahradit jiným hydrofóbním polymerem, například kyselinou poly-L-mléčnou, která při *in vitro* testování ukazuje dobrou cytokompatibilitu.

V blízkém časovém horizontu také proběhnou prvotní *in vivo* testy dvouvrstvých vláknenných materiálu vyrobených v rámci této diplomové práce. Spolupráce byla navázána s Biomedicínským centrem v Plzni, kde pod vedením doc. MUDr. Václava Lišky, Ph.D. již proběhly prvotní implantace. Pro prvotní *in vivo* testování byla vybrána pouze PCL vláknenná vrstva, připravená na NanospiderTM, která sloužila pro vytvoření metodiky operací a budoucímu porovnání s dvouvrstvými materiály. V rámci operací provedených na tenkém střevě prasat se ukázalo, že manipulace s vláknennými materiály při chirurgickém zákroku je jednoduchá, není potřeba žádné další speciální vybavení a překrytí střevní anastomózy je časově nenáročné. Materiály proto mají dobrý potenciál pro tuto aplikaci a v rámci diplomové práce bylo provedeno několik kroků pro jejich úspěšnou výrobu.

Literární zdroje

ABEDALWAFA, Mohammed, Fujun WANG, Lu WANG a Chaojing LI, 2012. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Reviews on Advanced Materials Science*. **34**(2), 123–140. ISSN 1605-8127.

AGARWAL, Seema, Joachim H. WENDORFF a Andreas GREINER, 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* [online]. **49**(26), 5603–5621. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.09.014

ALHOSSEINI, Sanaz Naghavi, Fathollah MOZTARZADEH, Masoud MOZAFARI, Shadnaz ASGARI, Masumeh DODEL, Ali SAMADIKUCHAKSARAEI, Saeid KARGOZAR a Newsha JALALI, 2012. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **7**, 25–34. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S25376

ARAMWIT, Pornanong, Antonella MOTTA a Subhas C. KUNDU, 2017. Tissue Engineering: From Basic Sciences to Clinical Perspectives. *BioMed Research International* [online] [vid. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/8659036/>

ASKARI, Pouyan, Payam ZAHEDI a Iraj REZAEIAN, 2015. Three-layered electrospun PVA/PCL/PVA nanofibrous mats containing tetracycline hydrochloride and phenytoin sodium: A case study on sustained control release, antibacterial, and cell culture properties [online]. [vid. 2018-04-02]. Dostupné z: doi:10.1002/app.43309

ASSOCIATION OF SURGICAL TECHNOLOGISTS, 2016. *Surgical Technology for the Surgical Technologist: A Positive Care Approach*. B.m.: Cengage Learning. ISBN 978-1-337-51737-9.

BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUMIL a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. **29**(6), 739–767. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004

BAKER, Hannah B., John P. MCQUILLING a Nancy M. P. KING, 2016. Ethical Considerations in Tissue Engineering Research: Case Studies in Translation. *Methods*

(San Diego, Calif.) [online]. 99, 135–144. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2015.08.010

BANDYOPADHYAY, Amit a Susmita BOSE, 2013. *Characterization of Biomaterials*. B.m.: Newnes. ISBN 978-0-12-415863-4.

BARNES, Steven J. a Lawrence P. HARRIS, 2008. *Tissue Engineering: Roles, Materials, and Applications*. B.m.: Nova Publishers. ISBN 978-1-60456-293-4.

BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ, 2005. *Co je co v povrchové a koloidní chemii, výkladový slovník* [online]. 2005. B.m.: VŠCHT. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/

BEACHLEY, Vince a Xuejun WEN, 2009. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 29(3), Development of Nanostructures for Medicine Special Issue, 663–668. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2008.10.037

BEHRENS ADAM M., LEE NORA G., CASEY BRENDAN J., SRINIVASAN PRIYA, SIKORSKI MICHAEL J., DARISTOTLE JOHN L., SANDLER ANTHONY D. a KOFINAS PETER, 2015. Biodegradable-Polymer-Blend-Based Surgical Sealant with Body-Temperature-Mediated Adhesion. *Advanced Materials* [online]. 27(48), 8056–8061. ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201503691

BETZOLD, Richard a Jonathan A. LARYEA, 2014. Staple Line/Anastomotic Reinforcement and Other Adjuncts: Do They Make a Difference? *Clinics in Colon and Rectal Surgery* [online]. 27(4), 156–161. ISSN 1531-0043. Dostupné z: doi:10.1055/s-0034-1394089

BISSOLI, Julio a Homero BRUSCHINI, 2018. Scaffolds for Pelvic Floor Prolapse: Logical Pathways. *International Journal of Biomaterials* [online]. 2018 [vid. 2018-03-25]. Dostupné z: doi:10.1155/2018/8040893

BITTENCOURT, J. A., 2004. *Fundamentals of Plasma Physics*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 978-0-387-20975-3.

BLAŽEJ, S., J. PÁRAL a M. KAŠKA, 2015. *Vývoj konstrukcí střevních anastomóz a současný stav jejich možností*. 2015. B.m.: Rozhledy v chirurgii, roč. 94, č.8.

BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK, 2013. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. **2013**, e624967 [vid. 2017-05-02]. ISSN 1687-9341. Dostupné z: doi:10.1155/2013/624967

BOERSEMA, Geesien S. A., Sandra VENNIX, Zhouqiao WU, Maaïke TE LINTEL HEKKERT, Dirk-Jan G. M. DUNCKER, King H. LAM, Anand G. MENON, Gert-Jan KLEINRENSINK a Johan F. LANGE, 2017. Reinforcement of the colon anastomosis with cyanoacrylate glue: a porcine model. *The Journal of Surgical Research* [online]. **217**, 84–91. ISSN 1095-8673. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2017.05.001

BRACCO, Gianangelo a Bodil HOLST, 2013. *Surface Science Techniques*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-642-34243-1.

BRENNER, Eric K., Jessica D. SCHIFFMAN, Ebony A. THOMPSON, Laura J. TOTH a Caroline L. SCHAUER, 2012. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers* [online]. **87**(1), 926–929 [vid. 2016-05-03]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.033

BRYCHTA, Pavel a Jan STANĚK, 2014. *Estetická plastická chirurgie a korektivní dermatologie*. B.m.: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-0795-2.

CECEN, Berivan, Leyla Didem KOZACI, Mithat YUKSEL, Aylin KARA, Nevin ERSOY, Alper BAGRIYANIK a Hasan HAVITCIOGLU, 2017. Two Layered Scaffolds (Loofah/PLLA/Cellulose/Chitin) for Repair of Osteochondral Defect. *Journal of Tissue Science & Engineering* [online]. **8**(3), 1–7 [vid. 2018-03-31]. ISSN 2157-7552. Dostupné z: doi:10.4172/2157-7552.1000210

COELHO, Jorge, Paula FERREIRA, Patrícia ALVES, Rosemeyre CORDEIRO, Ana FONSECA, Joana GÓIS a Helena GIL, 2010. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *The EPMA Journal* [online]. **1**, 164–209. Dostupné z: doi:10.1007/s13167-010-0001-x

COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW, 2013. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. **92**(2), 1262–1279 [vid. 2017-05-02]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028

CONRAD, H. a M. SCHMIDT, 2000. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. **9**(4), 441. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/9/4/301

CORTIZO, M. Susana a Soledad BELLUZO, 2017. *Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering*. ISBN 978-3-319-61287-4.

DONG, Liang, Shao-Jie WANG, Xin-Rong ZHAO, Yu-Fang ZHU a Jia-Kuo YU, 2017. 3D- Printed Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold Integrated with Cell-laden Chitosan Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 13412 [vid. 2018-03-31]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-13838-7

DRIOLI, Enrico, Lidietta GIORNO a Enrica FONTANANOVA, 2017. *Comprehensive Membrane Science and Engineering*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-444-63796-3.

DUNGL, Pavel a kolektiv, 2014. *Ortopedie: 2., přepracované a doplněné vydání*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-9337-5.

FADHIL ALBAB, Muh, Nicholas GIOVANI, Akhmad Herman YUWONO, Nofrijon SOFYAN, Ghiska RAMAHDITA a Yudan WHULANZA, 2018. The influence of phosphorylation and freezing temperature on the mechanical properties of hydroxyapatite/chitosan composite as bone scaffold biomaterial. In: *AIP Conference Proceedings* [online]. s. 020010. Dostupné z: doi:10.1063/1.5023944

FAN, Zhiping, Yemin ZHANG, Shuo FANG, Chen XU a Xinsong LI, 2014. Bionzymatically crosslinked gelatin/hyaluronic acid interpenetrating network hydrogels: preparation and characterization. *RSC Advances* [online]. **5**(3), 1929–1936 [vid. 2017-09-23]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA12446D

FRIDMAN, Alexander, 2008. *Plasma Chemistry*. B.m.: Cambridge University Press. ISBN 978-1-139-47173-2.

FRIDMAN, Alexander a Lawrence A. KENNEDY, 2012. *Plasma Physics and Engineering, Second Edition*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-1-4398-8481-2.

GAAZ, Tayser Sumer, Abu Bakar SULONG, Majid Niaz AKHTAR, Abdul Amir H. KADHUM, Abu Bakar MOHAMAD a Ahmed A. AL-AMIERY, 2015. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites.

Molecules (Basel, Switzerland) [online]. **20**(12), 22833–22847. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules201219884

GARG, Koyal a Gary L. BOWLIN, 2011. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* [online]. **5**(1). ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.3567097

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

GESSLER, Bodil, Olle ERIKSSON a Eva ANGENETE, 2017. Diagnosis, treatment, and consequences of anastomotic leakage in colorectal surgery. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. **32**(4), 549–556. ISSN 0179-1958. Dostupné z: doi:10.1007/s00384-016-2744-x

GHANBARZADEH, Babak a Hadi ALMASI, 2013. Biodegradable Polymers. *Biodegradation - Life of Science* [online]. [vid. 2018-04-04]. Dostupné z: doi:10.5772/56230

GOH, Kheng Lim a David F. HOLMES, 2017. Collagenous Extracellular Matrix Biomaterials for Tissue Engineering: Lessons from the Common Sea Urchin Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **18**(5). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18050901

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

GRULICH, Ondřej, 2015. *Povrchové úpravy biomateriálů v plazmatu* [online]. B.m. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/31063/grulich_2015_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y

HONEGROVÁ, Barbora, 2010. *Oligosacharidy hyaluronanu a jejich biologická funkce* [online]. Praha [vid. 2016-05-04]. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/67457/>

HUANG, Zheng-Ming, Y. -Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA, 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. **63**(15), 2223–2253. ISSN 0266-3538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7

HUAN, Siqi, Guoxiang LIU, Guangping HAN, Wanli CHENG, Zongying FU, Qinglin WU a Qingwen WANG, 2015. Effect of Experimental Parameters on Morphological, Mechanical and Hydrophobic Properties of Electrospun Polystyrene Fibers. *Materials* [online]. **8**(5), 2718–2734. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma8052718

HUSSAIN, Zahid, Hnin Ei THU, Haliza KATAS a Syed Nasir Abbas BUKHARI, 2017. Hyaluronic Acid-Based Biomaterials: A Versatile and Smart Approach to Tissue Regeneration and Treating Traumatic, Surgical, and Chronic Wounds. *Polymer Reviews* [online]. **57**(4), 594–630. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2017.1315433

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

CHAN, B. P. a K. W. LEONG, 2008. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* [online]. **17 Suppl 4**, 467–479. ISSN 1432-0932. Dostupné z: doi:10.1007/s00586-008-0745-3

CHEN, C., 2012. The art of bowel anastomosis. *Scandinavian journal of surgery: SJS: official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* [online]. **101**(4), 238–240. ISSN 1799-7267. Dostupné z: doi:10.1177/145749691210100403

CHEN, Guangkai, Junxia GUO, Jun NIE a Guiping MA, 2016. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. *Polymer* [online]. **83**, 12–19 [vid. 2016-05-03]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2015.12.002

- CHEN, Jyh-Ping a Chien-Hao SU, 2011. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. **7**(1), 234–243. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2010.08.015
- CHEN, Tzu-Ling a Yossef A. ELABD, 2017. Hybrid-Capacitors with Polyaniline/Carbon Electrodes Fabricated via Simultaneous Electrospinning/Electrospraying. *Electrochimica Acta* [online]. **229**, 65–72. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2017.01.140
- IKADA, Yoshito, 2006. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface* [online]. **3**(10), 589–601 [vid. 2017-05-02]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2006.0124
- IKADA, Yoshito, 2011. *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-08-046400-8.
- JAHANI, Hoda, Saeid KAVIANI, Majid HASSANPOUR-EZATTI, Masoud SOLEIMANI, Zeinab KAVIANI a Zahra ZONOUBI, 2012. The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. *Cell Journal*. **14**(1), 31–38. ISSN 2228-5806.
- JANVIKUL, W., P. UPPANAN, B. THAVORNYUTIKARN, W. KOSORN a P. KAEWKONG, 2013. Effects of Surface Topography, Hydrophilicity and Chemistry of Surface-treated PCL Scaffolds on Chondrocyte Infiltration and ECM Production. *Procedia Engineering* [online]. **59**, 3rd International Conference on Tissue Engineering, ICTE2013, 158–165. ISSN 1877-7058. Dostupné z: doi:10.1016/j.proeng.2013.05.106
- JENSEN, BettinaE. B., Izaskun DÁVILA a Alexander N. ZELIKIN, 2016. Poly(vinyl alcohol) Physical Hydrogels: Matrix-Mediated Drug Delivery Using Spontaneously Eroding Substrate. *The Journal of Physical Chemistry. B* [online]. **120**(26), 5916–5926. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.6b01381
- JEONG, Lim, In-Sung YEO, Ha Na KIM, Young Il YOON, Da Hyun JANG, Sung Youn JUNG, Byung-Moo MIN a Won Ho PARK, 2009. Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **44**(3), 222–228. ISSN 1879-0003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.12.008

JI, Yuan, Kaustabh GHOSH, Xiao Zheng SHU, Bingquan LI, Jonathan C. SOKOLOV, Glenn D. PRESTWICH, Richard A. F. CLARK a Miriam H. RAFAILOVICH, 2006. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* [online]. **27**(20), 3782–3792 [vid. 2016-05-03]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.037

KALARIKKAL, Nandakumar, Robin AUGUSTINE, Oluwatobi Samuel OLUWAFEMI, Joshy K. S a Sabu THOMAS, 2016. *Nanomedicine and Tissue Engineering: State of the Art and Recent Trends*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-1-4987-2642-9.

KAMOUN, Elbadawy A., El-Refaie S. KENAWY a Xin CHEN, 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research* [online]. **8**(3), 217–233. ISSN 2090-1232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2017.01.005

KHARAZIHA, M., M. H. FATHI a H. EDRIS, 2013. Tunable cellular interactions and physical properties of nanofibrous PCL-forsterite:gelatin scaffold through sequential electrospinning. *Composites Science and Technology* [online]. **87**, 182–188. ISSN 0266-3538. Dostupné z: doi:10.1016/j.compscitech.2013.08.015

KHUNMANEE, Sureerat, Younghyen JEONG a Hansoo PARK, 2017. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. **8**. ISSN 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731417726464

KIDOAKI, Satoru, Il Kuen KWON a Takehisa MATSUDA, 2005. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* [online]. **26**(1), 37–46. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.063

KIM, Han-Jung, Seon Joo PARK, Chul Soon PARK, Thanh-Hai LE, Sang HUN LEE, Tai Hwan HA, Hyoung-il KIM, Jinyeong KIM, Chang-Soo LEE, Hyeonseok YOON a Oh Seok KWON, 2018. Surface-modified polymer nanofiber membrane for high-efficiency microdust capturing. *Chemical Engineering Journal* [online]. **339**, 204–213. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2018.01.121

- KIRCHHOFF, Philipp, Pierre-Alain CLAVIEN a Dieter HAHNLOSER, 2010. Complications in colorectal surgery: risk factors and preventive strategies. *Patient Safety in Surgery* [online]. **4**, 5. ISSN 1754-9493. Dostupné z: doi:10.1186/1754-9493-4-5
- KISHAN, Alysha P. a Elizabeth M. COSGRIFF-HERNANDEZ, 2017. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. **105**(10), 2892–2905. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36124
- KNIGHT, Toyin, Joydeep BASU, Elias A. RIVERA, Thomas SPENCER, Deepak JAIN a Richard PAYNE, 2013. Fabrication of a multi-layer three-dimensional scaffold with controlled porous micro-architecture for application in small intestine tissue engineering. *Cell Adhesion & Migration* [online]. **7**(3), 267–274. ISSN 1933-6918. Dostupné z: doi:10.4161/cam.24351
- KORHONEN, Juuso T., Tommi HUHTAMÄKI, Olli IKKALA a Robin H. A. RAS, 2013. Reliable Measurement of the Receding Contact Angle. *Langmuir* [online]. **29**(12), 3858–3863. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la400009m
- KOTZIANOVÁ, Adéla, Marek POKORNÝ a Jan HRBÁČ, 2016. Electrospinning of poly(vinyl) alcohol and hyaluronic acid. In: *Libuše Trnková. XVI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists*. 1. vyd., s. 80–83. ISBN 978-80-210-8267-0.
- KUMAR, Anuj a Sung Soo HAN, 2017. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. **66**(4), 159–182. ISSN 0091-4037. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2016.1190930
- KWIECINSKI, J. J., S. G. DOROSZ, T. E. LUDWIG, S. ABUBACKER, M. K. COWMAN a T. A. SCHMIDT, 2011. The effect of molecular weight on hyaluronan's cartilage boundary lubricating ability – alone and in combination with proteoglycan 4. *Osteoarthritis and Cartilage* [online]. **19**(11), 1356–1362. ISSN 1063-4584. Dostupné z: doi:10.1016/j.joca.2011.07.019
- LANGER, R. a J. P. VACANTI, 1993. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*. **260**(5110), 920–926. ISSN 0036-8075.
- LAURENCIN, Cato T. a Lakshmi S. NAIR, 2008. *Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-1-4200-5183-4.

LAW, Kock-Yee, 2014. Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. *The Journal of Physical Chemistry Letters* [online]. **5**(4), 686–688. ISSN 1948-7185. Dostupné z: doi:10.1021/jz402762h

LIGUORI, Anna, Adriana BIGI, Vittorio COLOMBO, Maria Letizia FOCARETE, Matteo GHERARDI, Chiara GUALANDI, Maria Chiara OLEARI a Silvia PANZAVOLTA, 2016. Atmospheric Pressure Non-Equilibrium Plasma as a Green Tool to Crosslink Gelatin Nanofibers. *Scientific Reports* [online]. **6**, 38542 [vid. 2017-12-14]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep38542

LIGUORI, Anna, Laura PALTRINIERI, Augusto STANCAMPIANO, Chiara GUALANDI, Matteo GHERARDI, Vittorio COLOMBO a Maria Letizia FOCARETE, 2015. Solid-State Crosslinking of Polysaccharide Electrospun Fibers by Atmospheric Pressure Non-Equilibrium Plasma: A Novel Straightforward Approach. *Plasma Processes and Polymers* [online]. **12**(11), 1195–1199. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.201500054

LIGUORI, Gabriel, Bertus JERONIMUS, Tácia TAVARES DE AQUINAS, Luiz FELIPE PINHO MOREIRA a Martin HARMSSEN, 2017. Ethical Issues in the Use of Animal Models for Tissue Engineering: Reflections on Legal Aspects, Moral Theory, 3Rs Strategies, and Harm-Benefit Analysis. *Tissue Engineering Part C Methods* [online]. **23**. Dostupné z: doi:10.1089/ten.TEC.2017.0189

LIU, Wei, Jianchao ZHAN, Yan SU, Tong WU, Chunchen WU, Seeram RAMAKRISHNA, Xiumei MO, Salem S. AL-DEYAB a Mohamed EL-NEWEHY, 2014. Effects of plasma treatment to nanofibers on initial cell adhesion and cell morphology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **113**, 101–106. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.031

LIU, Yang, Guiping MA, Dawei FANG, Juan XU, Hongwen ZHANG a Jun NIE, 2011. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* [online]. **83**(2), 1011–1015 [vid. 2016-05-03]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.061

LI WAN-JU, SHANTI RABIE M. a TUAN ROCKY S., 2007. Electrospinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Nanotechnologies for the*

Life Sciences [online]. Major Reference Works. ISSN 9783527610419. Dostupné z: doi:10.1002/9783527610419.ntls0097

MAITZ, M. F., 2015. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* [online]. 1(3), SPECIAL ISSUE ON FUNCTIONAL SURFACES OF BIOMATERIALS, 161–176. ISSN 2405-4518. Dostupné z: doi:10.1016/j.bsbt.2015.08.002

MARTINS, Albino, Elisabete D. PINHO, Susana FARIA, Iva PASHKULEVA, Alexandra P. MARQUES, Rui L. REIS a Nuno M. NEVES, 2009. Surface modification of electrospun polycaprolactone nanofiber meshes by plasma treatment to enhance biological performance. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* [online]. 5(10), 1195–1206. ISSN 1613-6829. Dostupné z: doi:10.1002/smll.200801648

MCDERMOTT, Frank, Sonal ARORA, Jennifer SMITH, Robert STEELE, Gordon CARLSON a Des WINTER, 2016. *Prevention, diagnosis and management of colorectal anastomotic leakage*. B.m.: Association of Surgeons of Great Britain and Ireland.

MENZIES, Kara L. a Lyndon JONES, 2010. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry* [online]. 87(6), 387–399. ISSN 1538-9235. Dostupné z: doi:10.1097/OPX.0b013e3181da863e

M. HASSAN, Christie a Nikolaos A. PEPPAS, 2000. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In: *Adv Polym Sci*. s. 37–65.

MOLINA, R., P. JOVANCIC, S. VILCHEZ, T. TZANOV a C. SOLANS, 2014. In situ chitosan gelation initiated by atmospheric plasma treatment. *Carbohydrate Polymers* [online]. 103(Supplement C), 472–479. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2013.12.084

MONDAL, Debasish, May GRIFFITH a Subbu S. VENKATRAMAN, 2016. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 65(5), 255–265. ISSN 0091-4037. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2015.1103241

MORTENSEN, Neil J. a Shazad ASHRAF, 2008. *ACS Surgery: Principles and Practise. Kapitola 5: Gastrointestinal tract and abdomen*. B.m.: BC Decker Inc. ISBN 978-1-55009-399-5.

MUTHU, Subramanian Senthilkannan, 2014. *Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing: Eco-friendly Raw Materials, Technologies, and Processing Methods*. B.m.: Springer. ISBN 978-981-287-065-0.

NGADIMAN, Nor Hasrul Akhmal, M. Y. NOORDIN, Ani IDRIS, Amira Shakim Abdul SHAKIR a Denni KURNIAWAN, 2015. Influence of Polyvinyl Alcohol Molecular Weight on the Electrospun Nanofiber Mechanical Properties. *Procedia Manufacturing* [online]. **2**, 2nd International Materials, Industrial, and Manufacturing Engineering Conference, MIMEC2015, 4-6 February 2015, Bali, Indonesia, 568–572. ISSN 2351-9789. Dostupné z: doi:10.1016/j.promfg.2015.07.098

NORDENTOFT, Tyge, 2015. Sealing of gastrointestinal anastomoses with fibrin glue coated collagen patch. *Danish Medical Journal*. **62**(5). ISSN 2245-1919.

O'BRIEN, Fergal J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. **14**(3), 88–95 [vid. 2017-05-02]. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X

PATRÍCIO, T., M. DOMINGOS, A. GLORIA a P. BÁRTOLO, 2013. Characterisation of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering. *Procedia CIRP* [online]. **5**, First CIRP Conference on BioManufacturing, 110–114. ISSN 2212-8271. Dostupné z: doi:10.1016/j.procir.2013.01.022

POLAT, Gizem, Rustem Anil UGAN, Elif CADIRCI a Zekai HALICI, 2017. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *The Eurasian Journal of Medicine* [online]. **49**(1), 53–58. ISSN 1308-8734. Dostupné z: doi:10.5152/eurasianjmed.2017.17062

POPESCU, Gabriel, Daniela SALA, Miana GLIGA, Sergiu CIULIC, Radu NEAGOE a Mureşan MIRCEA, 2017. The Incidence and Mortality of Anastomotic Leakage after Colorectal Cancer Surgery. *Jurnalul de Chirurgie* [online]. **13**. Dostupné z: doi:10.7438/1584-9341-13-3-2

QIN, Xiao_Hong, En-Long YANG a Shan-Yuan WANG, 2006. Effect of different salts on electrospinning of polyacrylonitrile (PAN) polymer solution. *Journal of Applied*

Polymer Science [online]. **103**(6), 3865–3870. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.25498

RIGOGLIUSO, Salvatrice, Carfi PAVIA F, Valerio BRUCATO, Vincenzo LA CARRUBBA, Pietro FAVIA, Francesca INTRANUOVO, Roberto GRISTINA a Giulio GHERSI, 2012. *Chemical Engineering Transactions. Chapter: Use of Modified 3D Scaffolds to Improve Cell Adhesion and Drive Desired Cell Responses*. B.m.: Elioticinese Service Point S.r.l., ISBN 978-88-95608-18-1.

ROWE, Aimee, 2018. *The TeachMeSeries. Educational Healthcare Resources* [online]. Dostupné z: <http://teachmesurgery.com/perioperative/gastrointestinal/anastomotic-leak/>

SABOKTAKIN, Mohammad Reza, 2011. Biomedical Properties Study of Modified Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery Systems. In: *Nanopharmaceutics* [online]. B.m.: WORLD SCIENTIFIC, s. 129–172. ISBN 978-981-4368-66-7. Dostupné z: https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814368674_0007

SANTORO, Marco, Sarita R. SHAH, Jennifer L. WALKER a Antonios G. MIKOS, 2016. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **107**, 206–212. ISSN 1872-8294. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.04.019

SARMADI, Majid, 2013. Advantages and Disadvantages of Plasma Treatment of Textile Materials. In: *21st International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 21)*.

SASIPRIYA, K, Suriyaprabha RANGARAJ, Prabu PERIASAMY a RAJENDRAN VENKATACHALAM, 2013. Synthesis and Characterisation of Polymeric Nanofibers Poly (vinyl alcohol) and Poly (vinyl alcohol)/Silica Using Indigenous Electrospinning Set Up. *Materials Research* [online]. **16**, 824–830. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-14392013005000050

SAVIOLI LOPES, M, A JARDINI a Rubens FILHO, 2012. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering* [online]. **42**, 1402–1413. Dostupné z: doi:10.1016/j.proeng.2012.07.534

SHEIN, Moshe a Paul N. ROGERS, 2011. *Urgentní břišní chirurgie*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-2357-0.

SIISKONEN, Hanna, Sanna OIKARI, Sanna PASONEN-SEPPÄNEN a Kirsi RILLA, 2015. Hyaluronan Synthase 1: A Mysterious Enzyme with Unexpected Functions. *Frontiers in Immunology* [online]. **6**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00043

SINGH, Charanpreet, Cynthia S. WONG a Xungai WANG, 2015. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. **6**(3), 500–525. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb6030500

STRATTON, Scott, Namdev B. SHELKE, Kazunori HOSHINO, Swetha RUDRAIAH a Sangamesh G. KUMBAR, 2016. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials* [online]. **1**(2), 93–108 [vid. 2017-05-03]. ISSN 2452-199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2016.11.001

SUN, Jie, Sanjairaj VIJAYAVENKATARAMAN a Hang LIU, 2017. An Overview of Scaffold Design and Fabrication Technology for Engineered Knee Meniscus. *Materials* [online]. **10**(1). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma10010029

THOMAS, Michael S. a David A. MARGOLIN, 2016. Management of Colorectal Anastomotic Leak. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* [online]. **29**(2), 138–144. ISSN 1531-0043. Dostupné z: doi:10.1055/s-0036-1580630

THONGPHUD, A, Boonchoat PAOSAWATYANYONG, P VISAL-ATHAPHAND a Pitt SUPAPHOL, 2008. Improvement of Hydrophobic Properties of the Electrospun PVA Fabrics by SF 6 Plasma Treatment. *Advanced Materials Research* [online]. 55-57, pp. 625–628. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.55-57.625

TOMIHATA, Kenji a Yoshito IKADA, 1997. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. **37**(2), 243–251. ISSN 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199711)37:2<243::AID-JBM14>3.0.CO;2-F

TRINCA, Rafael Bergamo, Cecília Buzatto WESTIN, José Alberto Fracassi DA SILVA a Ângela Maria MORAES, 2017. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *European Polymer Journal* [online]. **88**, 161–170. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021

UMANSKIY, Konstantin a Neil HYMAN, 2016. Anastomotic Complications. In: *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery* [online]. B.m.: Springer, Cham, s. 161–171 [vid. 2018-03-11]. ISBN 978-3-319-25968-0. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-25970-3_10

UM, In Chul, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO, Akio OKAMOTO a Benjamin CHU, 2004. Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules*. **5**(4), 1428–1436.

VALENCE, Sarra de, Jean-Christophe TILLE, Chiraz CHAABANE, Robert GURNY, Marie-Luce BOCHATON-PIALLAT, Beat H. WALPOTH a Michael MÖLLER, 2013. Plasma treatment for improving cell biocompatibility of a biodegradable polymer scaffold for vascular graft applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. **85**(1), 78–86. ISSN 0939-6411. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.012](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.012)

VASITA, Rajesh a Dhirendra S KATTI, 2006. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **1**(1), 15–30 [vid. 2016-05-04]. ISSN 1176-9114. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2426767/>

VITCHULI, Narendiran, Quan SHI, Joshua NOWAK, Kathryn KAY, Jane CALDWELL, Fred BREIDT, Mohamed BOURHAM, Marian MCCORD a Xiangwu ZHANG, 2011. Multifunctional ZnO/Nylon 6 nanofiber mats by an electrospinning–electrospraying hybrid process for use in protective applications. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. **12**. ISSN 1878-5514. Dostupné z: [doi:10.1088/issn.1468-6996](https://doi.org/10.1088/issn.1468-6996)

VON FRAUNHOFER, J. Anthony, 2012. Adhesion and Cohesion. *International Journal of Dentistry* [online]. **2012**. ISSN 1687-8728. Dostupné z: [doi:10.1155/2012/951324](https://doi.org/10.1155/2012/951324)

WANG, Ji a Amrinder S. NAIN, 2014. Suspended micro/nanofiber hierarchical biological scaffolds fabricated using non-electrospinning STEP technique. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* [online]. **30**(45), 13641–13649. ISSN 1520-5827. Dostupné z: [doi:10.1021/la503011u](https://doi.org/10.1021/la503011u)

WANG, Weiguang, Guilherme CAETANO, William Stephen AMBLER, Jonny James BLAKER, Marco Andrey FRADE, Parthasarathi MANDAL, Carl DIVER a Paulo

- BÁRTOLO, 2016. Enhancing the Hydrophilicity and Cell Attachment of 3D Printed PCL/Graphene Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* [online]. **9**(12). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma9120992
- WANG, Yu-fei, Hong-feng GUO a Da-jun YING, 2013. Multilayer scaffold of electrospun PLA-PCL-collagen nanofibers as a dural substitute. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* [online]. **101**(8), 1359–1366. ISSN 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.32953
- WEI, Q., 2012. *Functional Nanofibers and their Applications*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-85709-564-0.
- WOLFOVÁ, Lucie, Lucy VOJTOVÁ, Lucie JUREČKOVÁ a Lenka KOHUTOVÁ, 2015. *Úvod do tkáňového inženýrství*. B.m.: MediaBros s.r.o. ISBN 978-80-260-9720-4.
- WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER, 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online]. **35**(10), 1217–1256. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002
- XIAO, Lin, Bo WANG, Guang YANG a Mario GAUTHIER, 2012. *Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications*. ISBN 978-953-307-471-9.
- YALCINKAYA, Fatma, 2016. Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2016.12.012
- YAO, Libin, Chao LI, Xiaocheng ZHU, Yong SHAO, Song MENG, Linsen SHI a Hui WANG, 2016. An Effective New Intestinal Anastomosis Method. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* [online]. **22**, 4570–4576. ISSN 1234-1010. Dostupné z: doi:10.12659/MSM.902000
- YOO, Hyuk Sang, Eun Ah LEE, Jun Jin YOON a Tae Gwan PARK, 2005. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* [online]. **26**(14), 1925–1933. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.021

ZAGHO, Moustafa M. a Ahmed ELZATAHRY, 2016. Recent Trends in Electrospinning of Polymer Nanofibers and their Applications as Templates for Metal Oxide Nanofibers Preparation. *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications* [online]. [vid. 2018-04-05]. Dostupné z: doi:10.5772/65900

ZACHOVÁ, Veronika, 2010. *Stomie*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-7304-9.

ZHANG, Chunxue, Xiaoyan YUAN, Lili WU, Yue HAN a Jing SHENG, 2005. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal* [online]. **41**(3), 423–432 [vid. 2016-05-04]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027

ZHAO, Tianyi a Lei JIANG, 2018. Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **161**, 324–330. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.056

ZHOU, Weilie a Zhong Lin WANG, 2007. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 978-0-387-39620-0.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1: Základní stavební kameny tkáňového inženýrství.</i>	15
<i>Obrázek 2: Znázornění struktury vícevrstvého scaffoldu pro náhradu tvrdé pleny mozkové. Převzato a přeloženo z (Wang et al. 2013).</i>	18
<i>Obrázek 3: Příprava vícevrstvého tkáňového scaffoldu lepením jednotlivých vrstev fibrinovým lepidlem. Převzato a přeloženo z (Cecen et al. 2017).</i>	19
<i>Obrázek 4: Struktura kyseliny hyaluronové. Převzato z (Saboktakin 2011).</i>	20
<i>Obrázek 5: Struktura PVA. Převzato z (Gaaz et al. 2015).</i>	21
<i>Obrázek 6: Struktura PCL. Převzato z (Coelho et al. 2010).</i>	22
<i>Obrázek 7: Struktura PLA. Převzato z (Ghanbarzadeh a Almasi 2013).</i>	22
<i>Obrázek 8: Aparatura pro elektrostatické zvlákňování z jehly. Převzato z (Zagho a Elzatahry 2016).</i>	24
<i>Obrázek 9: Interakce částic plazmatu s nanovlákněným povrchem.</i>	27
<i>Obrázek 10: Znázornění kontaktních úhlů, které dělí materiály na smáčivé ($\theta < 90^\circ$) a nesmáčivé ($\theta > 90^\circ$). Převzato z (Bracco a Holst 2013).</i>	29
<i>Obrázek 11: Statické (a) a dynamické měření kontaktního úhlu (b). Při dynamickém měření lze měřit postupující (advancing) a ustupující (receding) kontaktní úhel. (Bracco a Holst 2013)</i>	30
<i>Obrázek 12: Možnosti založení střevních anastomóz. a) End-to-end anastomóza mezi segmenty tenkého střeva. b) End-to-side anastomóza mezi dva segmenty tenkého střeva. c) Side-to-side anastomóza mezi tenkým a tlustým střechem. Převzato z (Gerardo Terrone et al. 2011).</i>	32
<i>Obrázek 13: Vlákenný PCL nosič překrývá chirurgickou anastomózu, která byla vytvořena na tenkém střevě prasete.</i>	33
<i>Obrázek 14: Anastomotický leak v dutině břišní (Rowe 2018).</i>	34
<i>Obrázek 15: Schéma jednotlivých kroků při výrobě dvouvrstevných vlákněných materiálů.</i>	35
<i>Obrázek 16: SEM snímky vlákněné vrstvy PVA, měřítko 50 μm; 10 μm, společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken.</i>	41
<i>Obrázek 17: SEM snímky vlákněné vrstvy PCL, měřítko 50 μm; 10 μm, společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken.</i>	42
<i>Obrázek 18: Fotografie vlákněné vrstvy substrát - PVA - PCL (a) a vlákněné vrstvy substrát - PCL - PVA (b).</i>	43

<i>Obrázek 19: SEM snímky morfologii mechanicky oddělených vrstev vlákenné dvouvrstvy PVA/PCL (Přístup 1), měřítko 50 μm.</i>	44
<i>Obrázek 20: Test buněčné viability po inkubaci vlákenných materiálů s fibroblasty po 1 a 7 dnech kultivace, * $p < 0.05$ (ANOVA, Bonferroni).</i>	45
<i>Obrázek 21: Snímky z fluorescenční mikroskopie buněk obarvených phalloidinem+FITC (zelená) a DAPI (modrá) po 1 a 7 dnech kultivace, měřítko 50 μm.</i>	46
<i>Obrázek 22: Počet buněk na 1 mm^2 získaný kvantifikací buněčných jader na testovaných materiálech, *** $p < 0.001$ (ANOVA, Bonferroni).</i>	47
<i>Obrázek 23: SEM snímky testovaných vrstev po týdenní kultivaci fibroblastů, měřítko 50 μm.</i>	48
<i>Obrázek 24: Schéma (a) a fotografie aparatury pro přípravu vrstvy HA/PCL (b), metodou A.</i>	50
<i>Obrázek 25: SEM snímky vlákenné vrstvy HA/PCL (Metoda A) měřítko 50 μm; 10 μm (A), společně s histogramem četnosti naměřených průměrů vláken (B) a fotografií výsledné vrstvy (C).</i>	54
<i>Obrázek 26: SEM snímky vlákenné vrstvy PCL (porovnání pro Metodu A) měřítko 50 μm; 10 μm.</i>	55
<i>Obrázek 27: Fotografie kapek vody na PCL/HA materiálu (Metoda A).</i>	55
<i>Obrázek 28: SEM snímky elektrostaticky zvlákněné vrstvy HA/PCL (Metoda B), měřítko 10 μm; 5 μm a histogram četnosti naměřených průměrů vláken.</i>	57
<i>Obrázek 29: SEM snímky elektrostaticky zvlákněné vrstvy HA/PCL (Metoda B) doplněné o manuální rozprašování; měřítko 10 μm.</i>	58
<i>Obrázek 30: Plazmatická komora.</i>	60
<i>Obrázek 31: SEM snímky vrstvy PVA/PCL před a po modifikaci plazmatickou metodou; měřítko 10 μm (A), společně s fotografiemi (B) a porovnáním průměrů vláken PVA (C).</i>	62
<i>Obrázek 32: SEM snímky vrstvy HA/PCL před a po modifikaci plazmatickou metodou; měřítko 10 μm (A), společně s fotografiemi (B) a porovnáním průměrů vláken HA (C).</i>	63
<i>Obrázek 33: Fotografie kontaktních úhlu hydrofilních stran dvouvrstev před a po plazmatické úpravě.</i>	64
<i>Obrázek 34: FTIR spektrum vláken PVA před a po modifikaci.</i>	65
<i>Obrázek 35: FTIR spektra fólií HA před a po modifikaci.</i>	66

<i>Obrázek 36: SEM snímky morfologie mechanicky oddělených vrstev plazmaticky ošetřené vlákně dvouvrstvy PVA/PCL, měřítko 50 μm.....</i>	<i>67</i>
<i>Obrázek 37: Hodnocení metabolické aktivity buněk po 24hodinové inkubaci s extrakty kompozitních materiálů.....</i>	<i>68</i>
<i>Obrázek 38: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie kompozitních materiálů PCL+HA, PCL+PVA po 24hodinové inkubaci v kompletním médiu, měřítko 10 μm. ...</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 39: Hodnocení metabolické aktivity buněk po týdenní inkubaci s extrakty kompozitních materiálů (A), SEM snímek kompozitního materiálu PCL+HA po týdenní inkubaci v kompletním médiu, měřítko 10 μm (B).</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 40: Metabolická aktivita buněk nasazených na povrch vlákněných materiálů po 1 a 7 dnech, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ (ANOVA, Bonferroni).</i>	<i>71</i>
<i>Obrázek 41: Snímky z fluorescenční mikroskopie buněk na testovaných materiálech – zeleně se barví aktinová vlákna (phalloidin), modře buněčné jádro (DAPI), měřítko 50 μm.</i>	<i>72</i>
<i>Obrázek 42: Kvantifikace buněk na testovaných materiálech po 1 a 7 dnech kultivace, * $p<0,05$; **** $p<0,0001$ (ANOVA, Bonferroni).....</i>	<i>73</i>
<i>Obrázek 43: Snímky z elektronové mikroskopie fibroblastů na vlákněném nosiči PCL (vrstva PVA vláken již není přítomna) po týdenní kultivaci, měřítko 50 μm.</i>	<i>74</i>
<i>Obrázek 44: Snímky z elektronové mikroskopie fibroblastů na vlákněném nosiči PCL+HA_{pl} po 1 dni a 7 dnech kultivace, měřítko 10 μm.....</i>	<i>74</i>

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Parametry zvlákňování roztoků PVA a PCL na NanospiderTM.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabulka 3: Parametry elst. zvlákňování (PCL) a elst. sprayování (HA), Metoda A.</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 4: Parametry elst. zvlákňování roztoků PCL a HA na NanospiderTM. Metoda B.</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 5: Parametry elst. zvlákňování roztoku HA na NanospiderTM, Metoda B.</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 6: Porovnání kontaktních úhlů vrstev PVA/PCL a HA/PCL před a po plazmatické úpravě.</i>	<i>64</i>