

Biologické vlastnosti biomateriálů

Bc. Veronika Pleváková

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Pleváková**
Osobní číslo: **T17298**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biologické vlastnosti biomateriálů**

Zásady pro vypracování:

Biologické vlastnosti materiálů jsou zpravidla testovány pomocí *in vitro* technik, které jsou limitovány především jejich uspořádáním neumožňujícím stanovit vliv dynamických podmínek, které se *in vivo* reálně vyskytují. Cílem práce je proto design materiálů založených na polymerech a jejich následné testování pomocí speciálního vybavení umožňujícího kultivace eukaryotických buněk. Testované materiály by měly být založeny na polymerních materiálech vhodných pro biomedicínské aplikace.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science. DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zdenka Capáková, Ph.D.
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

14. května 2019

Ve Zlíně dne 18. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: PLEVÁKOVÁ VERONIKA

Obor: INŽENÝRSTVÍ POLYMERŮ

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.5.2019

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídá k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá návrhem polymerních biomateriálů ve formě kryogelů a jejich následným testováním pomocí tkáňových kultur. Teoretická část této práce obsahuje krátké shrnutí dosavadních znalostí ohledně polymerních biomateriálů, scaffoldů pro tkáňové inženýrství a polymerních gelů, zejména elektricky vodivých i nevodivých hydrogelů a kryogelů. V praktické části byly nejprve polymerní kryogely připraveny. Povrchové vlastnosti kryogelů byly charakterizovány pomocí BET analýzy a skenovací elektronové mikroskopie. Následně byly kryogely testovány *in vitro* za využití buněčné linie myších fibroblastů.

Klíčová slova: polymer, biomateriál, scaffold, kryogel, polyanilin, polyvinylalkohol

ABSTRACT

This thesis is dealing with the design of polymeric biomaterials in the form of cryogels and their subsequent testing using tissue cultures. The theoretical part of this thesis summarizes the knowledge about polymer biomaterials, scaffolds for tissue engineering and polymer gels, especially electrically conductive and non-conductive hydrogels and cryogels. In the practical part, polymer cryogels were prepared. Their surface properties characterized by BET analysis and scanning electron microscopy. Subsequently, cryogels were tested by *in vitro* assays using a mouse fibroblast cell line.

Keywords: polymer, biomaterial, scaffold, cryogels, polyaniline, polyvinylalcohol

Ráda bych poděkovala své vedoucí Ing. Zdence Capákové, Ph.D za cenné rady a odborný dohled, jak při realizaci praktické části, tak i při psaní této diplomové práce. Tato práce byla podpořena z projektu IGA/CPS/2019/004. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině za podporu ve studiu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 POLYMERNÍ MATERIÁLY	12
1.1 PŘÍRODNÍ POLYMERY	12
1.2 SYNTETICKÉ POLYMERY	12
1.2.1 Termoplastické polymery.....	13
1.2.2 Reaktoplasty	13
1.3 KOMPOZITY.....	13
1.4 BIOMATERIÁLY	14
1.4.1 Biokompatibilita materiálu.....	14
1.4.2 Hostitelská odpověď	15
1.4.2.1 Bioinertní materiál	15
1.4.2.2 Bioaktivní materiál	15
1.4.2.3 Bioresorbovatelný materiál.....	15
2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	17
2.1 SCAFFOLDY	18
2.2 POLYMERNÍ GELY	18
2.2.1 Chemické gely.....	20
2.2.2 Fyzikální gely.....	20
2.3 HYDROGELY.....	20
2.3.1 Struktura hydrogelů.....	21
2.3.2 Syntéza hydrogelů	21
2.3.2.1 Fyzikální zesítnění	22
2.3.2.2 Chemické zesítnění	22
2.3.3 Klasifikace hydrogelů	23
2.3.4 Aplikace hydrogelů	23
2.4 KRYOGELY.....	24
2.4.1 Syntéza kryogelů	24
2.4.2 Polyvinylalkoholové kryogely	27
2.4.3 Polyhydroxyethylmethakrylátové kryogely (PHEMA)	28
2.4.4 Polysacharidové kryogely	28
2.4.4.1 Chitosanové kryogely (CS).....	29
2.4.5 Kryogely na bázi želatiny.....	29
3 ELEKTRICKY VODIVÉ POLYMERY.....	31
3.1 ZDROJ ELEKTRICKÉ VODIVOSTI	32
3.2 POLYPYRROL (PPY)	33
3.3 POLYANILIN	33
3.3.1 Syntéza polyanilinu	35
3.3.2 Aplikace polyanilinu	35
4 SCAFFOLDY S ELEKTRICKY VODIVÝMI POLYMERY	37

4.1	ELEKTRICKY VODIVÉ HYDROGELY	38
4.2	ELEKTRICKY VODIVÉ KRYOGELY	39
II	PRAKTICKÁ ČÁST	40
5	MATERIÁL	41
5.1	SURFAKTANTY	41
5.2	POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE A KULTIVAČNÍ MÉDIUM	42
6	METODIKA	43
6.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ KRYOGELU.....	43
6.2	MATERIÁLOVÁ CHARAKTERISTIKA	45
6.2.1	Lyofilizace vzorků kryogelu	45
6.2.2	BET metoda	45
6.2.3	Skenovací elektronová mikroskopie	46
6.3	BIOLOGICKÉ TESTY	47
6.3.1	Příprava buněk	47
6.3.2	Cytotoxicita	47
6.3.2.1	Zkouška extraktem.....	48
6.3.2.2	Zkouška přímým kontaktem	48
6.3.3	Prorůstání buněk scaffoldem.....	49
7	VÝSLEDKY	50
7.1	MATERIÁLOVÉ CHARAKTERISTIKY	50
7.1.1	Měrný povrch a velikost pórů	50
7.1.2	Struktura kryogelů.....	54
7.2	BIOLOGICKÉ TESTY	55
7.2.1	Cytotoxicita extraktu	55
7.2.2	Cytotoxicita přímým kontaktem	58
7.2.3	Prorůstání buněk scaffoldem.....	62
8	DISKUZE	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	67
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
	SEZNAM TABULEK.....	81

ÚVOD

Nesmírně důležitou složkou mikroprostředí buňky je extracelulární matrix, která poskytuje buňkám strukturní podporu a hraje důležitou roli v proliferaci, adhezi a diferenciaci buněk. Konstrukce biomateriálu by měla být vytvořena tak, aby kopírovala trojrozměrnou strukturu nativní tkáně, jelikož bylo prokázáno, že v dvojrozměrné struktuře se buňky chovají jinak než v kultuře trojrozměrné. Rozvíjející oblast tkáňového inženýrství se zaměřuje na regeneraci poškozených tkání spojením buněk s biomateriály. Tímto spojením vzniknou scaffoldy, které působí jako podklad pro regeneraci tkání, které vedou k růstu nové tkáně. Ideální scaffold je biokompatibilní, má vhodné mechanické vlastnosti, podporuje adhezi buněk, pohyb živin a produktů metabolismu v celé struktuře. Scaffoldy mohou být vytvořeny v různých formách, včetně keramiky, hydrogelů a kryogelů. V dnešní době je velký zájem o přípravu polymerních kryogelů, jelikož malá velikost pórů v již používaných hydrogelech neumožňuje angiogenezi (novotvorba krevních kapilár) v celé struktuře scaffoldu a často vede ke snížení životaschopnosti buněk a ke špatné penetraci buněk dovnitř scaffoldu.

Pro tuto práci byl vybrán kompozitní PVA/PANI kryogel, který obsahuje elektricky vodivý polymer polyanilin a polyvinylalkohol, který dodává výslednému kryogelu mechanickou pevnost a ohebnost. V tkáňovém inženýrství je největším problémem příprava kryogelů s dostatečně velkými a propojenými póry. Z tohoto důvodu byly v rámci praktické části v této diplomové práci připraveny kryogely s NaCl a různými druhy surfaktantů, Tween 40, Poloxamer 188, Triton X-100, SDBS, Igepal CA 630 a Brij 96. Tyto surfaktanty v polymerační směsi vytvořily micely, které po promytí zanechávají póry ve struktuře kryogelu. Čím jsou tyto póry větší, tím lepší by měl být průnik buněk do struktury materiálu a odstranění vzniklých odpadních materiálů. Vzhledem k potenciálním aplikacím v tkáňovém inženýrství byly tyto kryogely podrobeny *in vitro* zkouškám za využití buněčných kultur. Konkrétně byla testována cytotoxicita kryogelů a zároveň i schopnost eukaryotických buněk adherovat a následně prorůstat skrz kryogely.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERNÍ MATERIÁLY

Polymerní materiály se skládají z opakujících se malých a jednoduchých chemických jednotek nazývaných monomery [1]. Polymery hrají důležitou roli v různých odvětvích, velké uplatnění nacházejí například i v lékařských aplikacích. Mezi jejich jedinečné vlastnosti patří: flexibilita, dobrá biokompatibilita, odpovídající fyzikální a mechanické vlastnosti, snadná vyrobiteľnost v požadovaném tvaru a nízká cena [2]. V medicíně se používá široká škála polymerů jako biomateriálů. Mezi nejrozšířenější aplikace polymerů v medicíně patří protézy, implantáty, zubní protézy, stehy, nitrooční čočky, náhrady kloubů, systémy pro dodávání léků, lékařské jednorázové potřeby, obvazy na rány a jiná mimotělní zařízení. Polymery, které jsou široce používány v medicíně, zahrnují polyethylen (PE), polyethylen-tereftalát (PET), polytetrafluorethylen (PTFE), polyurethan (PU), polyoxymethylen (POM) [3, 4].

1.1 Přírodní polymery

Jako nosiče pro buňky a bioaktivní molekuly se používá široká škála polymerů s přírodním původem včetně bílkovin a polysacharidů. Tyto materiály jsou vhodné díky jejich biologickému rozpoznávání interakcí receptor-ligand, proteolýze, biokompatibilitě, snadnému zpracování a podobnosti materiálům, které jsou tělu známé. Přírodní materiály obvykle nemají problém s toxicitou, které často čelí syntetické materiály. Problémem přírodních materiálů, je však jejich tendence k denaturaci nebo k rozkladu při nižších teplotách. Mezi přírodní polymery patří např. chitosan, kolagen, želatina, celulóza, hedvábí, elastin, kyselina hyaluronová a fibrin [5, 6].

1.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery nabízí několik výhod oproti přírodním polymerům. První výhodou syntetických polymerů je možnost výroby ve velkém měřítku reprodukovatelným způsobem a s nízkými náklady. Jejich další výhodou je, že jsou snadněji zpracovatelné a jejich vlastnosti mohou být přizpůsobeny dané aplikaci. Mezi jejich nevýhody patří menší biologická kompatibilita než u přírodních polymerů. Kromě toho produkty jejich degradace nemusí být přirozenými metabolity, a pokud se nahromadí, mohou způsobit zánětlivé reakce [7]. Syntetické polymery se dají rozdělit na dvě velké skupiny: termoplastické polymery a reaktoplasty.

1.2.1 Termoplastické polymery

Termoplastické polymery jsou lineární řetězcové polymery, které jsou při pokojové teplotě v pevném stavu. Při zahřátí mohou být opakovaně roztaveny. Termoplasty jsou snadno zpracovatelné, jelikož jsou při výrobních teplotách vysoce viskózní. Jejich výhodou je snadná recyklace, kdy se polymer zahřeje nad jeho zpracovatelskou teplotu, vytvaruje a ochladí na pokojovou teplotu, aby vznikl požadovaný recyklovaný výrobek. Termoplastické polymerní materiály se používají v každodenních aplikacích, jako jsou lékařské aplikace, spotřebiče, automobilová a letecká technika. Mezi termoplastické polymery patří např. polyethylen, polypropylen, polystyren, polyvinylchlorid a polyamid [8, 9].

1.2.2 Reaktoplasty

Reaktoplasty jsou fyzikální směsi, které prochází nevratnou reakcí označenou jako vytvrzování. Vytvrzování reaktoplastů může být provedena pomocí tepla, tlaku nebo záření. Při zpracování se tyto polymery zesítují, a proto není možné opětovné roztavení [8]. Mezi reaktoplasty patří např. polyuretan, močovinoformaldehydová, melaminformaldehydová, epoxidová a fenolická pryskyřice [9].

1.3 Kompozity

V posledních 30 letech získaly polymerní kompozity pro biomedicínské aplikace stále větší význam, jako strukturní biomateriály. Tyto polymery jsou obvykle navrženy kombinací několika různých polymerních matric a výztužných prvků, jako jsou vlákna nebo částice, čímž se vytvoří materiály s rozšířeným rozsahem mechanických vlastností. Kompozitní materiály nabízejí celou řadu výhod v porovnání s homogenním materiálem. Díky těmto materiálům je možné reprodukovat složitost nativního buněčného prostředí. Kompozity vykazují lepší kontrolu nad vlastnostmi materiálu než čistě přírodní polymery. Mezi používané kompozitní polymery patří např. polyethylenglykol. Současné využití polymerních kompozitů, jako biomateriálů, zahrnuje aplikace tvrdé i měkké tkáně. Mezi aplikace pro tvrdé tkáně patří např. opravy zlomenin kostí, náhrada kloubů, totální náhrada kyčlí a dentální aplikace. Mezi aplikace polymerních kompozitů v měkkých tkáních patří např. prostorové sypané výplně, obvazy na rány, protézy a katetry. Polymerní kompozity se používají i na lékařské přístroje [10, 11].

1.4 Biomateriály

Podle Black a kol. [12] je biomateriál definován jako „systémově a farmakologicky inertní látka určená pro implantaci nebo pro začlenění do živých systémů, které doplňují nebo nahrazují funkce živých tkání nebo orgánů“ [12]. Tímto způsobem může biomateriál zůstat v kontaktu s živými tkáněmi i s tělesnými tekutinami po dlouhou dobu. Výsledkem je vytvoření mezifáze mezi živou tkání a neživým biomateriálem. Materiály, které se používají na výrobu biomateriálů lze obecně rozdělit do následujících kategorií: kovy, polymery, keramika a kompozity. Polymerní materiály lze snadno vyrábět v různých velikostech, tvarech a jsou lehčí než běžné materiály. Polymerní kompozity jsou široce používány v tkáňovém inženýrství, na opravy kostí, cílený transport léčiv, infuze, katetry a vaky pro transport krve nebo plazmy [2, 3]. Biomateriál musí splňovat několik kritérií. V první řadě musí být biomateriál biokompatibilní, tzn. necytotoxický, nekarcinogenní, nemutagenní a neantigenní, což eliminuje mnoho dostupných technických materiálů. Dále by měl mít odpovídající fyzikální a mechanické vlastnosti. V případě trvale implantovaných biomateriálů musí mít biomateriál odolnost vůči degradaci a opotřebení. Z praktického hlediska by měl být biomateriál vhodný k výrobě nebo obrábění do různých tvarů, mít nízké náklady na výrobu a být snadno dostupný [5].

1.4.1 Biokompatibilita materiálu

Biokompatibilita je podle Ramakrishna a kol. [1] definována jako „schopnost biomateriálu provádět požadovanou funkci, vzhledem k léčebné terapii, bez vyvolání jakýchkoli nežádoucích lokálních nebo systémových účinků u příjemce této terapie“. Existují dva hlavní faktory, které určují biokompatibilitu materiálu a to hostitelská reakce vyvolaná materiálem a degradace materiálu v těle. Implantované kovy, keramiky a polymery mohou být vystaveny opotřebení, které vede k uvolnění iontů, což způsobuje nežádoucí lokální i systémové účinky. Z tohoto důvodu biodegradabilní implantáty musí mít vhodné chemické a fyzikální vlastnosti. Po dokončení jejich úlohy by se měly degradovat na netoxické produkty, které mohou být odstraněny z hostitelských tkání mimo implantační místo. Tyto degradační produkty poté mohou být odstraněny močí z organismu [1, 13]. Biomateriály musí být především biochemicky kompatibilní, netoxické, nedráždivé, nealergenní a nekarcinogenní. Je třeba zdůraznit, že biokompatibilita závisí na dané tkáni, kde je materiál použit [14].

1.4.2 Hostitelská odpověď

Pro vývoj nových materiálů je nutné pochopit reakci hostitele na různé biomateriály. V ideálním případě by biomateriály neměly vyvolávat žádné změny a jakékoli nežádoucí reakce v sousedních nebo vzdálených tkáních. Obecně platí, že různé biomateriály na základě vzájemných reakcí a reakcí hostitele mohou být zařazeny do následujících kategorií: bioinertní materiál, bioaktivní materiál a bioresorbovatelný materiál [14].

1.4.2.1 Bioinertní materiál

Tyto materiály byly navrženy pro náhradu tkání v lidském těle. Bioinertní materiály nemohou vyvolat žádnou mezifázovou reakci s tkání. Tyto materiály zůstávají v těle po celou dobu života pacienta, proto by měly být fyziologicky inertní a měly by si zachovat své vlastnosti po mnoho let. Materiály jako platina a zlato byly použity v trvalých protézách a jsou běžnými příklady časně vyvinutých bioinertních biomateriálů [14, 15].

1.4.2.2 Bioaktivní materiál

Bioaktivní materiály vyvolávají biologickou aktivitu na rozhraní s hostitelskou tkání. Tyto materiály byly zavedeny v 80. letech 20. století a mohou se přímo připojit ke tkáním a tvoří biologické vazby během počáteční fáze implantace. Bioaktivní materiály zahrnují bioaktivní sklokeramické systémy, bioresorbovatelné materiály pro chirurgii a další biomedicínské aplikace [14, 15].

1.4.2.3 Bioresorbovatelný materiál

Bioresorbovatelné materiály se postupně vstřebávají a nakonec jsou nahrazeny novými tkáněmi. Při bioresorpci se produkty degradace resorbují v těle. Alifatické polyestery, jako kyselina polyglykolová, kyselina polymléčná a polykaprolakton, se nejčastěji používají jako syntetické bioresorbovatelné polymery. Mezi lékařské aplikace bioresorbovaných materiálů patří např. polymerní ortopedické implantáty, které jsou znázorněny na obrázku 1 [14, 7].

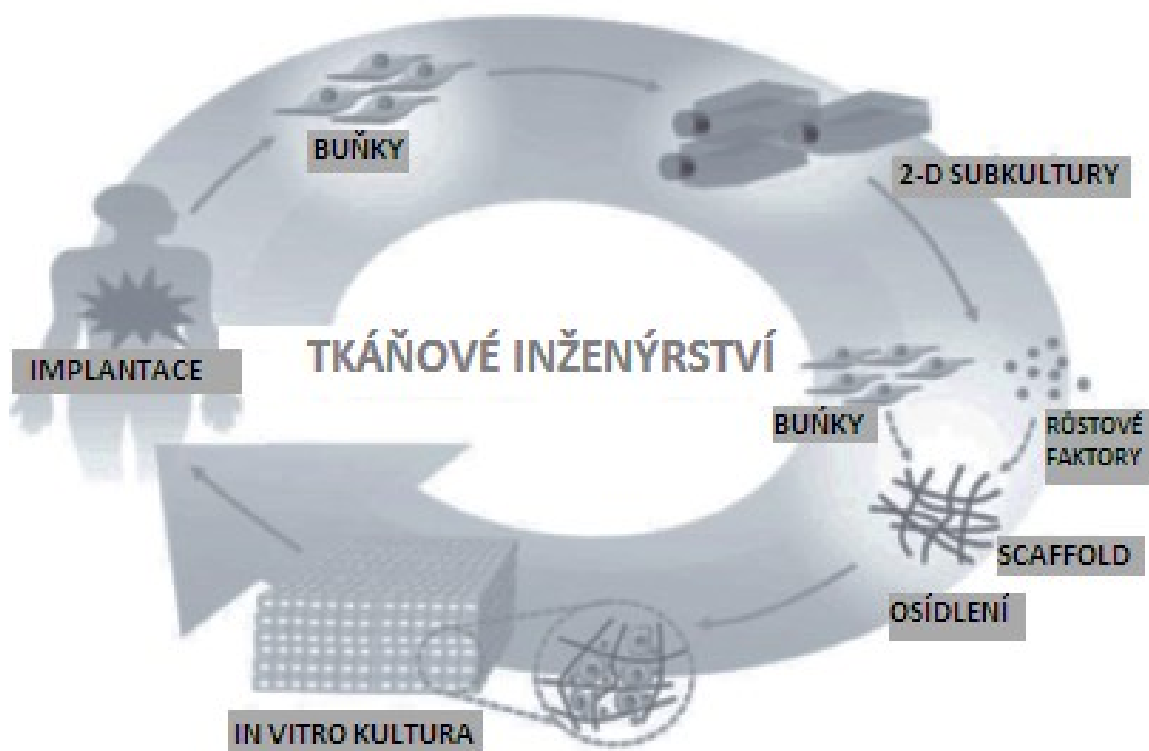


Obrázek 1: Řada bioresorbovatelných implantátů pro použití při léčbě páteře [16].

2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Vznik tkáňového inženýrství je datován počátkem devadesátých let. Technologie tkáňového inženýrství závisí na biomateriálech, které mohou poskytnout fyzickou podporu pro růst tkáně a také stimulují specifické funkce buňky. Cílem tkáňového inženýrství je vyrobit materiál, který by mohl specificky spouštět požadované buněčné odpovědi podporující regeneraci tkání [10, 17].

Tkáňové inženýrství má dvě fáze. První fází (*in vitro*) je tvorba tkáňové konstrukce tak, že se zvolené buňky a scaffold umístí do prostředí bioreaktoru s růstovými médii, kde buňky proliferují. V další fázi (*in vivo*) je vytvořená konstrukce implantována na vhodné místo, kde má za úkol remodelovat normální funkční tkáň nebo orgán. Celý proces tkáňového inženýrství je schématicky znázorněn na obrázku 2 [10].



Obrázek 2: Schématické znázornění procesu tkáňového inženýrství, upraveno podle [3].

2.1 Scaffoldy

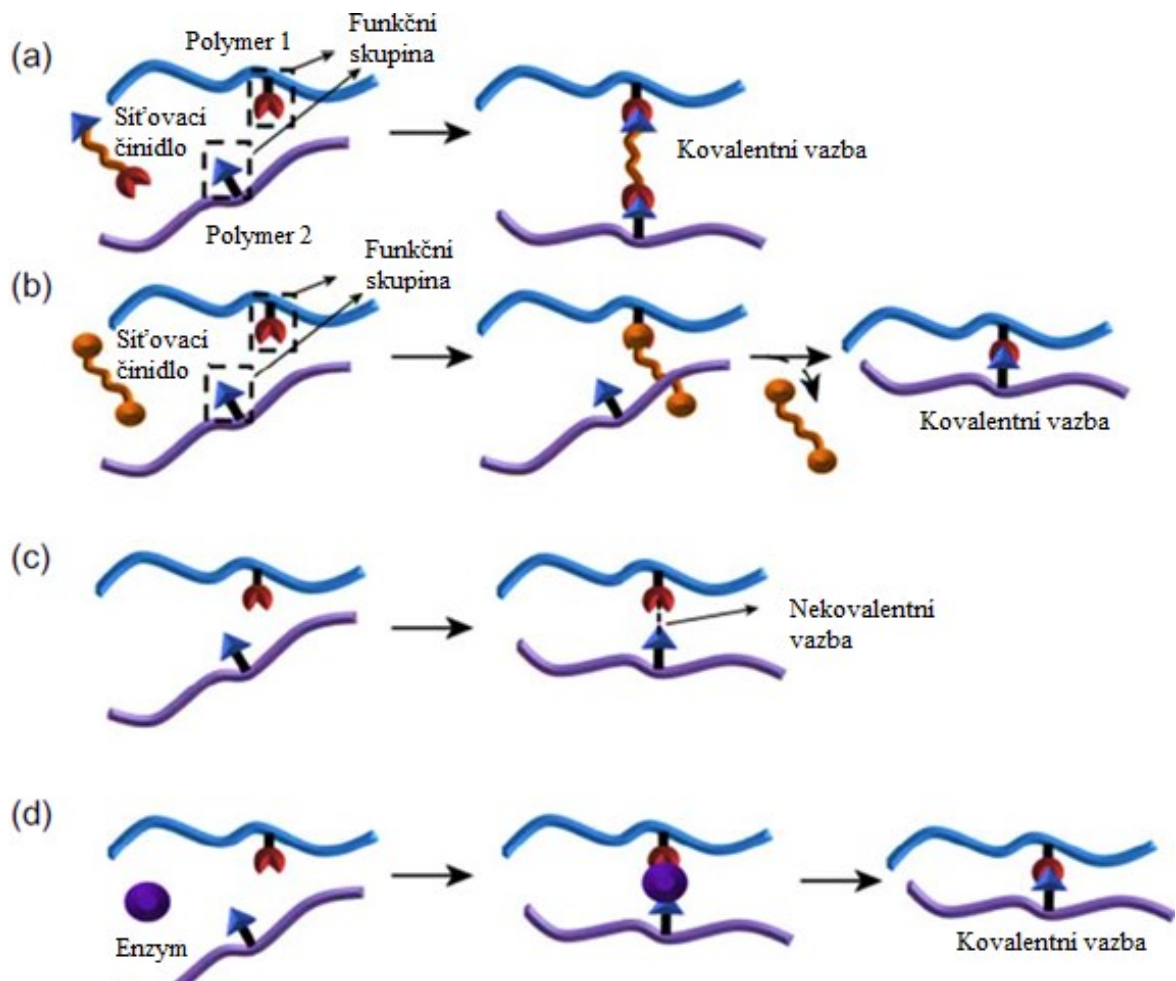
Biologicky aktivní polymerní scaffoldy jsou důležité pro použití při regeneraci tkání v různých klinických aplikacích. Jejich hlavním úkolem je regenerace a oprava tkání. Polymerní scaffoldy vykazují všestranné fyzikální i biologické vlastnosti. Výhodou těchto materiálů je že, scaffold napodobuje přirozenou extracelulární matrix [18].

Struktura scaffoldů používaných pro tkáňové inženýrství má zásadní význam. Scaffold by měl mít vzájemně propojené póry, aby se zajistila buněčná penetrace a adekvátní difúze živin do buněk uvnitř scaffoldu a do extracelulární matrix tvořené buňkami. Pórovitá vzájemně propojená konstrukce je také důležitá, kvůli difúzi odpadních produktů ze scaffoldu [19]. Stejně jako struktura scaffoldu, tak i jeho mechanické vlastnosti jsou velmi důležité. Například pokud by byla pevnost v tlaku příliš nízká, mohlo by dojít k deformaci nebo i k rozdrčení scaffoldu, což by vedlo k deformovanému růstu tkáně nebo by tkáň nerostla vůbec. Jestliže by byla pevnost v tlaku příliš vysoká, nemusely by být buňky vystaveny správným podmínkám *in vivo*, které jsou potřebné pro podporu buněčného růstu [20].

2.2 Polymerní gely

Polymerní gely jsou definovány jako trojrozměrné (3D) sítě složené z molekul polymerů a rozpouštědla, které vyplňuje intersticiální prostory a poskytuje schopnost podrobit se deformaci. Při vytváření gelu se pevné polymerní řetězce v kapalně matrici nerozpouštějí, ale bobtnají. Díky tomu vzniklé gely vykazují viskoelastické vlastnosti. Polymerní gely jsou studovány v biomedicínských aplikacích, jelikož s výjimkou některých tvrdých tkání (jako jsou kosti, zuby a nehty) je lidské tělo gelovitá struktura. Gelovitá struktura v organismu je výhodná především díky schopnosti přenášet živiny a plyny [21].

Před specifickým použitím v biomedicíně inženýrství je důležitá charakterizace polymerního gelu. Mezi charakteristiky patří zesítnění, bobtnání a reologie gelu, které přímo ovlivňují stabilitu gelu a jeho interakci s okolním prostředím [22].



Obrázek 3: Způsoby zesíťení polymerů, (a) kovalentně vázané chemické síťovací činidlo, (b) chemické síťovací činidlo nekovalentně vázané, c) fyzikální zesíťení a (d) enzymatické zesíťení, upraveno podle [23].

Na obrázku 3 jsou znázorněna schémata zesíťení polymerní matrice. Způsoby zesíťení polymerní matrice udávají výslednou tuhost gelů. Při aplikaci v tkáňovém inženýrství je tuhost gelu nejdůležitější vlastností, jelikož definuje buněčné mikroprostředí a ovlivňuje buněčnou morfologii, adhezi a genetické i epigenetické vlastnosti. Pokud jde o použití injektovatelných gelů pro cílený transport léčiv, je důležitá naopak tekutá povaha gelů [24].

2.2.1 Chemické gely

Chemické gely se síťují kovalentními vazbami a syntetizují se polymerací monomerů se síťovadly. Kovalentní interakce poskytují vynikající mechanickou stabilitu a jsou mnohem silnější než nekovalentní interakce. Gel může být ovlivněn změnami pH, teplotou, rozpouštědly a dalšími faktory v okolí. Chemické gely se tak můžou smršťit nebo nabobtnat, což znamená, že změna okolí vede ke změně objemu gelu. Díky tomuto jevu je gel vhodný, jako funkční materiál pro zdravotnické prostředky. Příkladem použití chemických gelů v medicíně jsou měkké kontaktní čočky [25].

2.2.2 Fyzikální gely

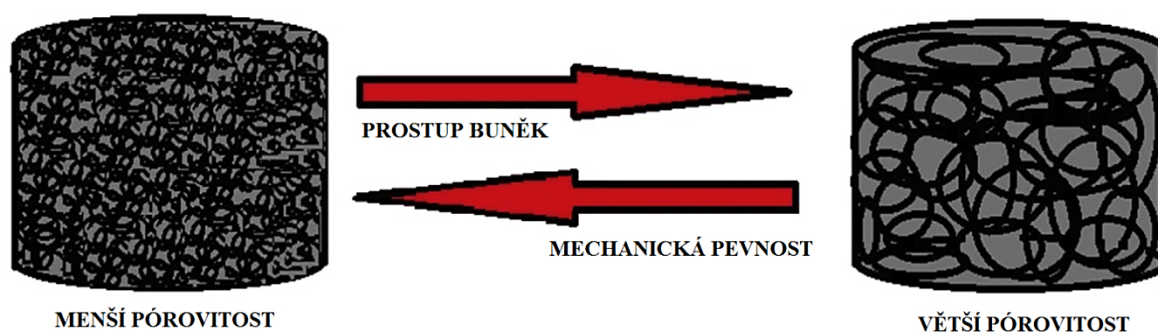
Fyzikální gely jsou často nazývány jako pseudogely. Tyto gely jsou spojitě, neuspořádané, trojrozměrné sítě tvořené silami, které jsou schopny vytvářet nekovalentní křížové vazby. Nekovalentní křížové vazby jsou tvořeny slabšími interakcemi, mezi které patří např. vodíkové vazby, iontové interakce, hydrofobní asociace a zesílení krystalického segmentu. Vzhledem k tomu, že křížové vazby nejsou kovalentní, může kvůli změně prostředí (reverzibilní jev) dojít k rozpadu sítě. Fyzikální gely se v medicíně používají jako scaffoldy pro cílený transport léčiv [25].

2.3 Hydrogely

Aplikace hydrogelů se datuje do roku 1960, kdy Wichterle a Lim [26] představili hydrofilní síť zesíťeného poly(2 - hydroxyethylmethakrylátu), jako materiálu pro výrobu měkkých kontaktních čoček. Hydrogely mohou být vyrobeny ze syntetických nebo přírodních polymerů. Jsou to polymerní materiály, které jsou z velké části hydrofilní a vysoce flexibilní. Obsahují velké množství vody ($\geq 90\%$) [27, 28]. Fyzikální a biochemické vlastnosti hydrogelů velmi závisí na jejich složení a způsobu síťování. Některé hydrogely poskytují požadované kombinace vlastností pro různé biomedicínské aplikace, jako jsou regenerační medicína a cílený transport léčiv. Používají se také v 3D kultivaci buněk pro studium buněčné matrice, buněčné interakce, proliferace, migrace a diferenciací buněk [29].

2.3.1 Struktura hydrogelů

Hlavním cílem tkáňového inženýrství je napodobit extracelulární matrix pro regeneraci poškozené tkáň. Vzhledem k tomu, že hydrogely mají dobrou pórovitost a trojrozměrnou strukturu, která je schopna absorbovat značné množství vody, slouží jako vhodný biomateriál pro tkáňové inženýrství. Ideální hydrogelový scaffold napodobuje vlastnosti přirozené extracelulární matrix a umožní tak difúzi, adhezi a migraci buněk. Každá tkáň potřebuje dostatek krevního zásobení pro její správný růst a vývoj. Hydrogel, který má napodobit přirozenou tkáň, by měl umožnit dostatečnou vaskularizaci, aby buňky, které rostou uvnitř gelů, dostávaly požadované množství živin a kyslíku. Také buněčný růst a ukotvení buněk jsou do značné míry závislé jak na velikosti, tak i na hustotě pórů uvnitř hydrogelu. Na obrázku 4 je znázorněno, že hydrogel nesmí být příliš porézní (kvůli zhoršení mechanických vlastností), ale zároveň nesmí být málo porézní (kvůli špatnému buněčnému prostupu, špatné vaskularizaci a signalizaci) [28, 30].



Obrázek 4: Pórovitost hydrogelů, upraveno podle [28].

2.3.2 Syntéza hydrogelů

Hydrogely mohou být obecně vyrobeny z polymerů obsahujících různé hydrofilní skupiny, jako např. hydroxylové skupiny, karboxylové skupiny, skupiny sulfonových kyselin, amidové skupiny a imidové skupiny [31]. Přírodní polymery, které se používají na výrobu hydrogelů, zahrnují např. kolagen, želatinu, fibrin, alginát a agarózu. Ze syntetických polymerů se používá polyakrylová kyselina, polyethylenoxid, polyvinylalkohol a různé polypeptidy. Na výrobu hydrogelů se používají fyzikální i chemické techniky zesílení [28].

2.3.2.1 Fyzikální zesíťení

U hydrogelů, připravených fyzikálním zesíťením, tvorba sítě nezahrnuje použití potenciálně toxického chemického síťovacího činidla nebo iniciátoru. Mechanické vlastnosti jsou omezeny slabostí fyzikální interakce. Mezi nejjednodušší metody fyzikálního zesíťení patří ohřev/ochlazení polymerního roztoku. Dalším způsobem fyzikálního zesíťení je iontová interakce, která je založena na principu gelovatění roztoku polyelektrolytu (např. alginát sodný) použitím multivalentního iontu s opačnými náboji (např. $\text{Ca}^{2+} + 2\text{Cl}^-$). V závislosti na koncentraci iontů vápníku jsou gely buď termoreversibilní (nízká koncentrace) nebo termoreversibilní nejsou (vysoká koncentrace). Mezi další metody fyzikálního zesíťení patří ještě např. komplexní koacervace. Tato metoda je založena na smíchání polyaniontového roztoku s polykationtovým roztokem. Vodíková vazba a hydrofobní interakce jsou další možnosti syntézy hydrogelů. Tyto hydrogely jsou získány snížením pH vodného roztoku polymerů nesoucích karboxylové skupiny. Poslední metoda fyzikálního zesíťení hydrogelů je zmrazení a rozmrazení, které je více popsáno v kapitole o kryogelech [7].

2.3.2.2 Chemické zesíťení

Polymerní řetězce jsou opatřeny funkčními skupinami schopnými spolu reagovat, což vede ke vzniku silných a stabilních kovalentních vazeb. V závislosti na povaze polymerních řetězců a jejich funkcionalizace se jako metody chemického zesíťení nejčastěji používají radikálová polymerace a polykondenzace [7]. Jiný způsob chemického zesíťení vyžaduje přímou reakci lineárního nebo rozvětveného polymeru s difunkčním nebo multifunkčním síťovacím činidlem. Toto síťovací činidlo spojuje dva polymerní řetězce přes své multifunkční skupiny [10].

2.3.2.2.1 Polykondenzace

Polykondenzační reakce se často používá pro syntézu polymerů za vzniku polyesterů a polyamidů, ale může se také použít k syntéze hydrogelů. Před ozářením polymerního roztoku se polymerní řetězce nepřekrývají a pohyblivost segmentů je vysoká. S rostoucími dávkami ozáření jsou upřednostňovány intermolekulární vazby, což vede ke snížení pohyblivosti segmentů, vytvoří se intermolekulární příčné vazby a vzniknou tak lokální trojrozměrné sítě. Další ozáření zvyšuje hustotu intermolekulárního zesíťení, které vede ke vzniku makroskopických hydrogelů [7].

2.3.2.2.2 Radikálová polymerace

Několik způsobů tvorby zesítených hydrogelů je založeno na reakcích volných radikálů. Jedna z reakcí zahrnuje kopolymerační síťovací reakci mezi jedním nebo více monomery a jedním multifunkčním monomerem, který je přítomen v malém množství. V další reakci mohou být dva ve vodě rozpustné polymery vzájemně zesíteny vytvořením volných radikálů na obou polymerech, které se spojí pomocí vytvořené křížové vazby. Takové způsoby zesítení hydrogelu mohou být zahájeny rozkladem peroxidů a azo sloučenin nebo použitím ionizujícího nebo UV záření. Metody ionizujícího záření používají elektronové paprsky, gama záření nebo rentgenové záření k excitaci polymeru a vytváření zesítené struktury reakcemi volných radikálů [10].

2.3.3 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely mohou být klasifikovány několika způsoby, např. podle způsobu přípravy, iontového náboje nebo podle strukturních vlastností. Podle způsobu přípravy se jedná o homopolymerní hydrogely (vyrobené z jednoho typu monomerní jednotky), kopolymerní hydrogely (vyrobené ze dvou komonomerních jednotek) a multipolymerní hydrogely (vyrobené ze tří nebo více komonomerů). Na základě iontového náboje mohou být klasifikovány jako neutrální hydrogely, aniontové hydrogely, kationtové hydrogely a amfolytické hydrogely. Podle fyzikálních strukturních vlastností mohou být klasifikovány jako amorfní hydrogely a semikrystalické hydrogely, kde u amorfních hydrogelů jsou makromolekuly náhodně uspořádány, zatímco semikrystalické hydrogely jsou charakterizovány oblastmi uspořádaných makromolekulárních řetězců (krystalů) [32].

2.3.4 Aplikace hydrogelů

Aplikace hydrogelů v biomedicině se dá rozdělit do tří skupin: 1) povrchové aplikace zahrnující umělou pokožku a různé typy obvazových materiálů, 2) trvalé implantáty, např. kardiovaskulární, zubní a ortopedické, 3) dočasné implantáty, které zahrnují biodegradabilní implantáty, materiály pro chirurgické šití a scaffoldy pro tkáňové inženýrství [24]. Syntetické hydrogely jsou také velmi slibné pro cílený transport léčiv. Přestože se mnoho studií tímto tématem zabývá, existuje jen málo komerčně dostupných produktů. Hydrogely mají jedinečné vlastnosti pro cílený transport léčiv, jako je vysoká porozita, afinita k vodě a snadno nastavitelný stupeň zesítení [33].

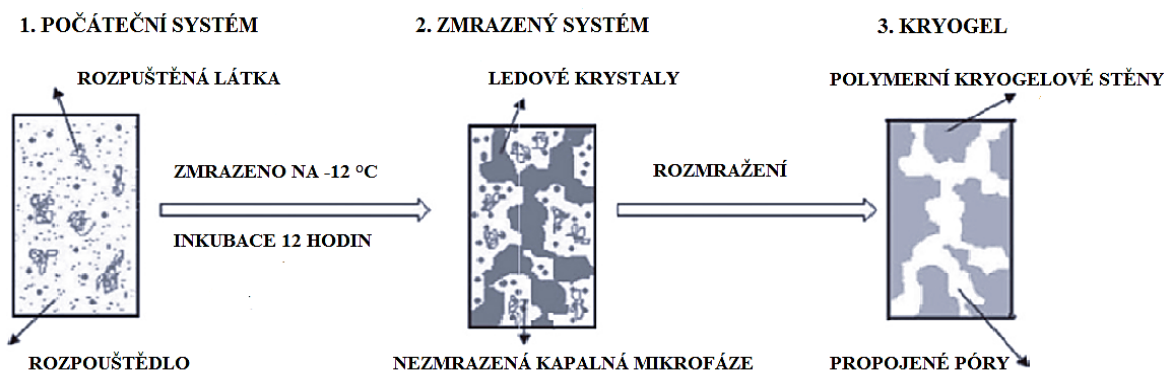
2.4 Kryogely

Kryogely získaly svůj význam na počátku osmdesátých let. Jsou to supermakroporézní polymerní gely, které jsou vyráběny technologií kryogelování, tj. za mrazu a za použití ledu jako porogenu. Supermakroporézní znamená velikost pórů 100 μm a více [34]. Tyto makroporézní polymerní materiály jsou atraktivní pro použití v mnoha oblastech chemie, biologie, biotechnologie a bioinženýrství [35]. Kryogely, stejně jako hydrogely, se mohou vytvářet v libovolném požadovaném tvaru, např. jako bloky, válce, trubky, granule a disky. Jedím z hlavních rozdílů mezi kryogely a jinými makroporézními materiály je, že kryogely mají tkáňovitou elasticitu a odolávají rozsáhlé deformaci bez zničení [36].

2.4.1 Syntéza kryogelů

Pokud je vodný roztok nízkomolekulárních látek vystaven teplotám pod bodem mrazu, voda začíná mrznout, zatímco rozpuštěné látky se vylučují růstem ledových krystalů do nezmrazeného rozpouštědla. Pokud je teplota systému udržována nad eutaktickým bodem, což je asi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro vodné roztoky nízkomolekulárních látek, koncentrace rozpuštěné látky v nezmrazeném rozpouštědle se postupně zvyšuje až do dosažení rovnováhy, při které jsou koncentrace a množství nezmrazené fáze určeny snížením bodu mrznutí. Žádný kryogel se nevytvoří, pokud je teplota mrazu pod eutaktickým bodem daného systému, protože nebude existovat žádná kapalná fáze, ve které by polymerace proběhla [37].

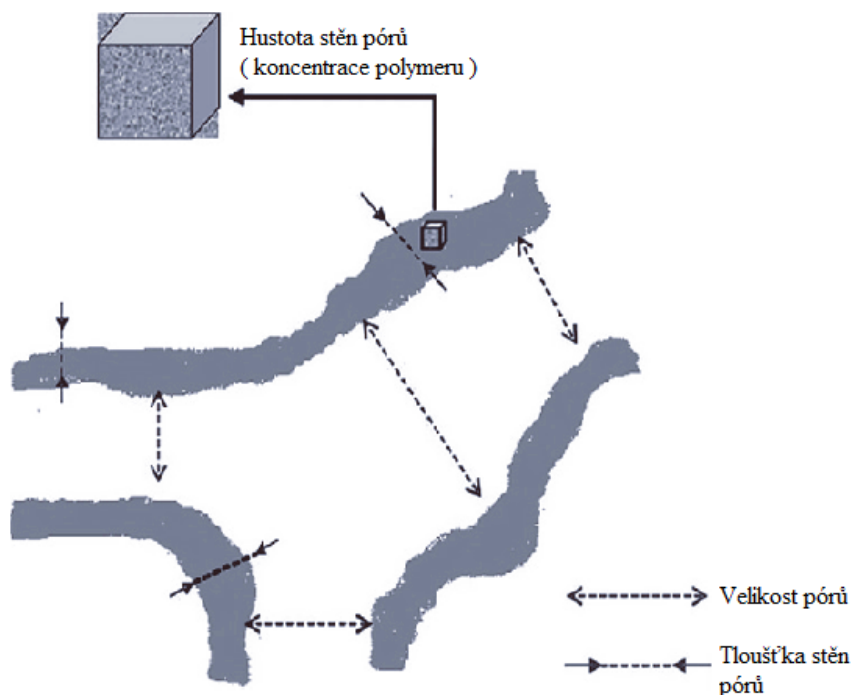
Připravený roztok obsahující gelové prekurzory (jako je monomer, zesíťovací činidlo a iniciátor), je zmrazen. Kryogely se obecně syntetizují při teplotách mezi -5 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a jsou získávány z fyzikálně a kovalentně zesíťovaných polymerních řetězců, které mohou být homogenní nebo heterogenní. Většina rozpouštědla v reakční směsi je zmrazena, zatímco mikrofáze mezi ledovými krystaly zůstává nezmrazená. Samotná chemická reakce probíhá v této nezmrazené kapalně mikrofázi [35]. Monomery - síťovací činidlo rozpuštěné v nezmrazené fázi mohou být polymerovány například radikálovou polymerací za použití standardního systému iniciátorů. Při nízké teplotě probíhá polymerace pomaleji než za teploty okolního prostředí. Když se voda jako rozpouštědlo zmrazí, působí jako porogen a vytváří ledové krystaly, kolem kterých se vytvoří polymerní síť. Jak je znázorněno na obrázku 5, po rozmrazení porogenu se vytvoří velká propojená pórovitá struktura ve formě 3D gelu [34, 37].



Obrázek 5: Znáznornění syntézy kryogelů, upraveno podle [34].

Na rozdíl od homogenních gelů vyráběných při laboratorní teplotě, mají gely produkované polymerací v polozmrazených systémech vysoce heterogenní strukturu s velkými a propojenými póry. Makroporézní kryogely mohou být vyrobeny v podstatě z libovolného monomerního systému, který může být polymerován radikálovou polymerací ve vodném roztoku [37].

Kryogely jsou vyráběny s různou morfologií a vlastnostmi, které mohou být přizpůsobeny pro konkrétní aplikaci. V závislosti na podmínkách syntézy, jako je např. povaha počátečního monomeru, rozpouštědla, iniciátoru, jejich koncentrace, teplota a rychlost zmrazení, se v širokém rozmezí mění velikost pórů [38]. Na obrázku 6 jsou znázorněny parametry, které ovlivňují vlastnosti kryogelů. Mezi tyto parametry patří velikost pórů, která definuje celkový objem pórů a spolu s propojením pórů řídí transport hmoty v kryogelu. Naopak tloušťka stěny pórů a hustota určují mechanické vlastnosti kryogelu [37].



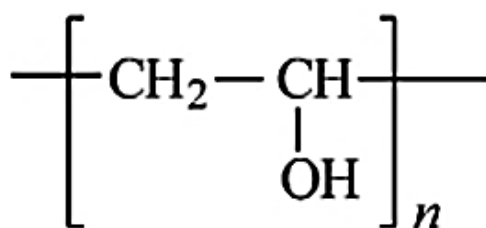
Obrázek 6: Schematické znázornění parametrů ovlivňujících výkon porézních kryogelů, upraveno podle [39].

Velikost propojených pórů v supermakroporézních kryogelech poskytuje zajímavé vlastnosti, jako např. umožnění snadného průchodu buněk bez ucpaní pórů a poskytnutí dostatečného prostoru pro růst buněk, aniž by se zabránilo výměně živin a odpadu [34]. Jednou z hlavních rysů těchto polymerních materiálů je jedinečná kombinace vysoké pórovitosti, vysoké mechanické odolnosti, stability a minimální nespécifické interakce vzhledem k hydrofilní povaze polymerů. Některé kryogely mohou být za určitých podmínek vysušeny a znovu nabobtnány velmi rychle, aniž by došlo k poškození struktury pórů díky elastickým pórovitým stěnám. Tímto způsobem mohou být tyto materiály skladovány po dlouhou dobu bez jakýchkoli změn [40].

Přidání částic do polymerujícího systému vede k výrobě kompozitních materiálů obsahujících např. syntetické částice zabudované do pórovitých stěn kryogelu. Polymerní kryogely, které obsahují specifické ligandy schopné selektivního rozpoznávání a - nebo chemické vazby biomolekul, mají potenciál pro použití v biotechnologii a biomedicině (jako je např. biokatalýza, specifická adsorpce, bioseparace nebo scaffoldy pro tkáňové inženýrství). Bioligandy se do kryogelu zavádí buď kopolymerací strukturních monomerů s funkčními monomery nesoucími chemicky reaktivní funkční skupinu nebo přímou kopolymerací s již obsahujícím požadovaným ligandem [37].

2.4.2 Polyvinylalkoholové kryogely

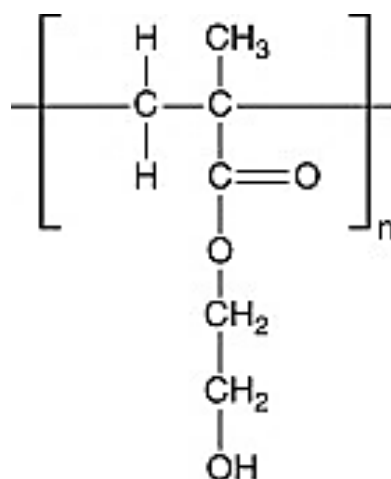
Polyvinylalkohol (viz. obrázek 7) je syntetický polymer s vysokým stupněm hydrolyzy a je považován za ataktický. PVA se připravuje polymerací vinylacetátu s ethanolem. Je to jeden z nejslibnějších biologicky odbouratelných a ve vodě rozpustných polymerů s vynikajícími vlastnostmi, jako je dobrá tepelná stálost, optické vlastnosti a dobré filmotvorné vlastnosti. Používá se v medicíně, filtrech, stavebnictví, chemickém průmyslu, jako scaffold pro tkáňové inženýrství a v chemickém průmyslu. Polyvinylalkohol je považován za alternativu k polyethylenu nebo polypropyleny, pro výrobu biologicky rozložitelných kompozitů [41]. Tento polymer byl jedním z prvních materiálů, ze kterých byl kryogel připraven v článku Lozinského Vladimíra (1996) [42]. PVA samostatně nebo v kombinaci s jinými polymery je velmi populární materiál pro výrobu kryogelů, protože jeho struktura umožňuje různé stupně zesílení. Hlavním typem intermolekulárních vazeb jsou vodíkové vazby mezi OH skupinami sousedních polymerních řetězců. Tyto kryogely vykazují vysokou mechanickou pevnost a dobré elastické vlastnosti. Nicméně čisté PVA kryogely nejsou dostatečně funkční pro praktické aplikace. Proto se PVA používá jako matricový polymer v kompozitu kryogelů. Biokompatibilní PVA kryogely jsou vhodné např. pro umělé tkáně, kontaktní čočky a řízené uvolňování léků [43, 44, 45].



Obrázek 7: Strukturní vzorec polyvinylalkoholu [46].

2.4.3 Polyhydroxyethylmethakryátové kryogely (PHEMA)

Poly(2 – hydroxyethylmethakrylát), viz. obrázek 8, je jedním z nejrozšířenějších hydrofilních polymerů používaných v biomedicínských aplikacích [47]. PHEMA je vhodný jako scaffold určený pro kultivaci buněk. Přítomnost hydroxyskupin a karboxyskupin činí tento polymer kompatibilní s vodou, zatímco hydrofobní methylové skupiny a hlavní řetězce dodávají polymeru hydrolytickou stabilitu a podporují mechanickou pevnost kryogelu. PHEMA kryogely jsou odolné proti vysokým teplotám, kyselé a alkalické hydrolyze a mají nízkou reaktivitu s aminy [48]. Použití v biomedicínských aplikacích je široké. Např. ve studii Hüseyin Alkan a kol. [49] je kryogel PHEMA považován za potenciálního kandidáta pro čištění imunoglobulinu z lidské plazmy.



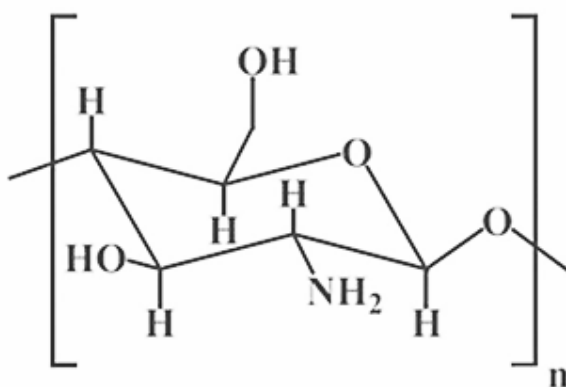
Obrázek 8: Strukturální vzorec
PHEMA [50].

2.4.4 Polysacharidové kryogely

Přírodní polysacharidy jsou levné, obnovitelné, modifikovatelné, biologicky rozložitelné a mají biokompatibilní vlastnosti. Mezi polysacharidy, které se k výrobě kryogelů používají, patří hyaluronan, karboxymethylová celulóza, xantan, b-glukan, škrob (amylóza, amylopektin a jejich směsi), maltodextrin a agaróza. Kryogelace těchto polysacharidů je podobná jako u PVA, kde převažuje vodíková vazba mezi hydroxyskupinami [51]. Polysacharidové kryogely mají vysokou cytocompatibilitu a poskytují tak příznivé prostředí pro adhezi a proliferaci buněk [52].

2.4.4.1 Chitosanové kryogely (CS)

Chitosan (viz. obrázek 9) je aminopolysacharid složený z opakujících se jednotek D-glukosaminu a N-acetylglukosaminu. Tento polymer má vynikající biologické vlastnosti, včetně biologické rozložitelnosti, biologické kompatibility a hemostatických a antimikrobiálních aktivit. Navíc chitosan podporuje hojení ran tím, že stimuluje zánětlivé buňky, včetně polymorfonukleárních leukocytů a makrofágů. Tyto vlastnosti chitosanu ukazují, že chitosanový kryogel má velký potenciál jako obvaz pro hojení ran [53]. Dalším příkladem využití těchto kryogelů prokázali ve studii Meikun Fan a kol. [54] kde zjistili, že chitosanové kryogely s nanočásticemi stříbra mohou být použity pro dezinfekci pitné vody při odstraňování následků katastrof.



Obrázek 9: Strukturní vzorec chitosanu [55].

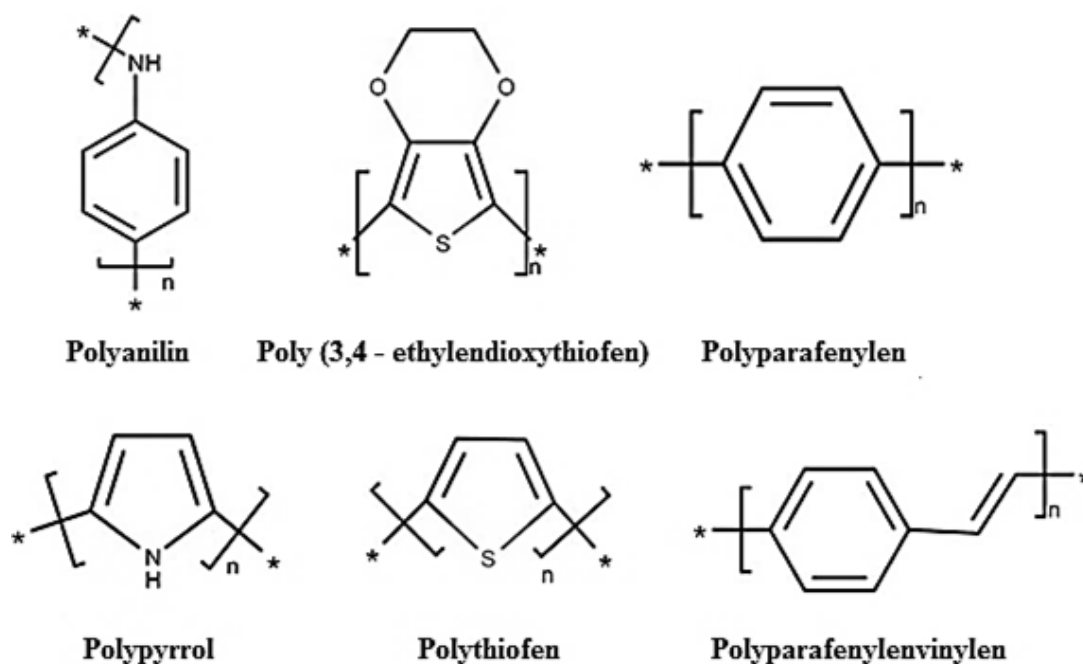
2.4.5 Kryogely na bázi želatiny

Jednou z hlavních složek extracelulární matrix je kolagen, který se běžně používá samostatně nebo v kombinaci s jinými biologickými materiály jako scaffold pro tkáňové inženýrství. Nevýhodou kolagenu je vyvolání imunitní odpovědi, nízká elasticita a patogenní látky, které brání použití kolagenu v přirozené formě v lékařských aplikacích. Kontrolovaná hydrolyza kolagenu vede k výrobě želatiny, která má podobnou chemickou strukturu jako kolagen [56]. Želatina je směs proteinů a peptidů, je biodegradabilní, neimunogenní, biokompatibilní a komerčně dostupný polymer. Je bohatá na peptidové sekvence (Arg-Gly-Asp), které usnadňují buněčnou adhezi a enzymatickou degradaci [57]. Samotná želatina má však nedostatečné mechanické vlastnosti pro použití jako scaffold. Ke zvýšení

mechanické pevnosti byly proto vymyšleny chemické modifikace želatiny, jako je např. inkorporace isokyanátu, zabudování furfurylaminu nebo metakrylace. Želatina byla použita jako substrát pro kultivaci mnoha typů buněk, což ji činí vhodnou k použití na injektovatelné želatinové kryogely, které jsou schopny řízeného uvolňování proteinů. Dále ve studii Min-Eui Han a kol. [58] prokázali, že kryogely založené na želatině jsou slibným systémem v inženýrství tkáňových chrupavek, jelikož podporují buněčnou distribuci a udržují fenotypy chondrocytů [58, 59].

3 ELEKTRICKY VODIVÉ POLYMERY

Obecně platí, že většina polymerních materiálů jsou dobré izolanty. Některé z polymerů však mají vodivé vlastnosti. Oproti běžným vodivým kovům jsou elektricky vodivé polymerní materiály snadno zpracovatelné, mají nízkou hmotnost a nízkou pořizovací cenu. Mezi nejčastěji používané elektricky vodivé polymery patří polypyrrol, polyanilin, poly(3,4 - ethylendioxythiofen), polythiofen, polyparafenylen aj. Příklady těchto polymerů jsou znázorněny na obrázku 10 [60].



Obrázek 10: Strukturní vzorce vybraných elektricky vodivých polymerů, upraveno podle [24].

Tyto polymery umožňují výborné ovládání elektrických stimulů, mají velmi dobré elektrické a optické vlastnosti, mají vysoký poměr vodivosti ke hmotnosti a mohou být vyrobeny jako biokompatibilní, biologicky odbouratelné a porézní materiály [61].

3.1 Zdroj elektrické vodivosti

Vodivost vyplívá z kombinace řady faktorů. Elektricky vodivé polymery mají konjugovaný základní řetězec, což znamená, že je tvořen řadou střídavých jednoduchých a dvojných vazeb. Orbitály se navzájem překrývají, což umožňuje snadnější delokalizaci elektronů. Konečným klíčem k vodivosti je dopant, neboli aniont. Polymer je syntetizován ve své oxidované, vodivé formě a pouze v přítomnosti dopantu je náboj neutralizován. Dopant zavádí do tohoto systému nosič náboje tím, že odstraní nebo přidá elektrony z - do polymerního řetězce a přemístí je jako polarony nebo bipolarony, což jsou volně držené, ale lokalizované elektrony [61, 62]. Elektrická vodivost běžně používaných elektricky vodivých polymerů může být upravena pomocí chemických nebo elektrochemických redoxních reakcí zvaných dopování. Vzhledem k široké rozmanitosti hodnot elektrické vodivosti mohou elektricky vodivé polymery působit jako izolátory, polovodiče a vodiče v závislosti na dopantu nebo úrovni dopingu [63]. Hodnoty elektrických vodivostí vybraných elektricky vodivých polymerů jsou vypsány v tabulce 1.

Tabulka 1: Elektrická vodivost vybraných vodivých polymerů [64].

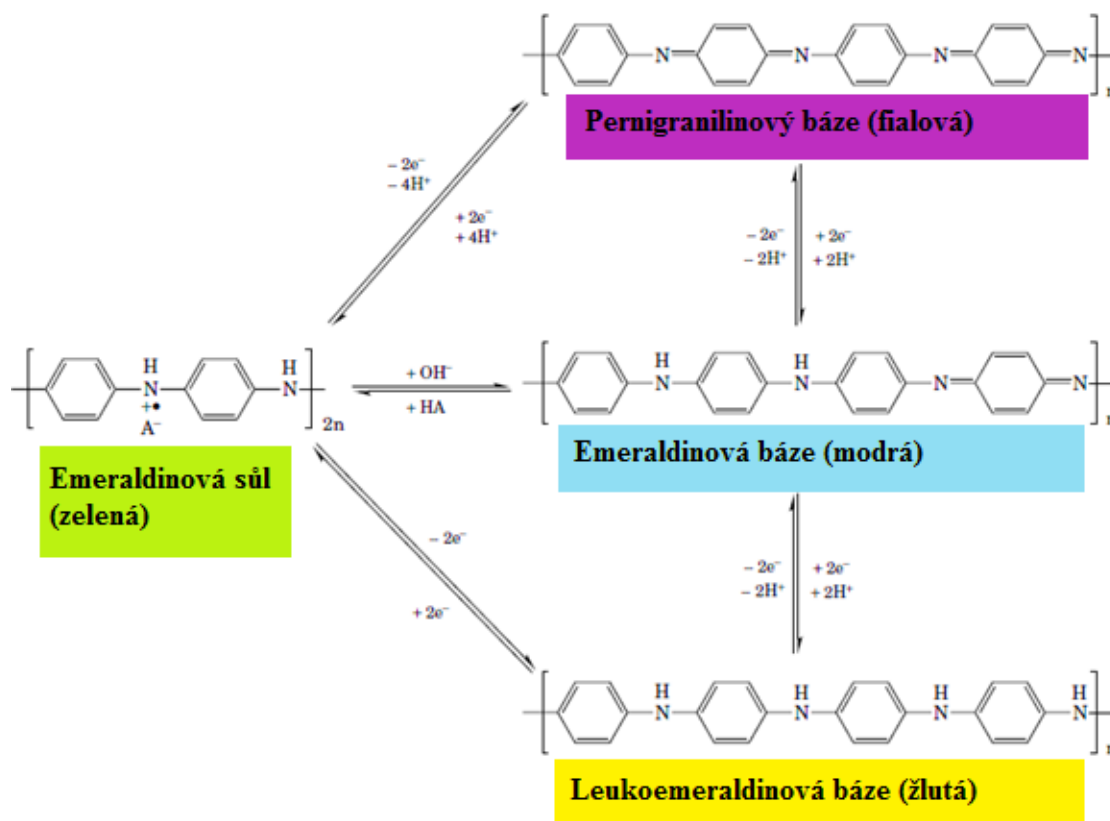
POLYMER	VODIVOST (S/cm)
Polyanilin	0,1 - 5
Polypyrrol	10 - 50
Poly(3,4 - ethylendioxythiophene)	300 - 500
Polythiophen	300 - 400

3.2 Polypyrrol (PPy)

Polypyrrol je nejvíce studovaný elektricky vodivý polymer, který se běžně používá v komerčních aplikacích. Jednou z hlavních nevýhod elektricky vodivých polymerů je jejich špatná stabilita při zvýšené teplotě a vlhkosti. Polypyrrol v oxidovaném stavu je jedním z nejstabilnějších elektricky vodivých polymerů. Vyšší tepelná stabilita polypyrrolu se dá dosáhnout např. přidáním kyseliny a báze. V roce 1986 Münstedt [65] uvedl, že zvýšené tepelné stability bylo dosaženo v PPy s fenylsulfonátovými protiionty za použití jednoduchého ošetření kyselinou a bází [66]. Polypyrrol byl nejprve syntetizován v roce 1912. Pro syntézu tohoto polymeru se používají dva hlavní způsoby a to elektrochemická a chemická polymerace. Tyto způsoby jsou založeny na indukci polymerace různými faktory. Mezi tyto faktory patří chemická iniciace oxidačními činidly, foto indukovaná syntéza a elektrochemická aktivace anodickým proudem. PPy je téměř nerozpustný v obvyklých rozpouštědlech, kvůli silným interakcím mezi řetězci. Výjimkou jsou některé případy, kdy je polypyrrol dopovaný činidly, čímž se jeho rozpustnost zvýší. PPy je velmi slibný „inteligentní“ biomateriál. Tento polymer má dobrou *in vitro* a *in vivo* biokompatibilitu, dobrou chemickou stabilitu a vysokou vodivost. Dnes se polypyrrol používá v mnoha aplikacích, včetně palivových článků, ochrany proti korozi, počítačových displejů, mikrochirurgických nástrojů, biosenzorů a jako biomateriál v inženýrství nervových tkání a neuronových sond [61, 67].

3.3 Polyanilin

Polyanilin (PANI) je známý jako anilinová čerň. PANI je jedním z nejvíce studovaných vodivých polymerů, který může být vyroben jako prášek, tenký film, vlákna i koloidní suspenze. Jeho výhodou je snadná syntéza různými metodami, nízká cena a jeho existence v různých reverzních protonovaných a oxidovaných formách, které mají odlišné elektrochemické vlastnosti. Vodivost polyanilinu závisí na jeho stupni oxidace nebo protonace [63, 68]. PANI může existovat ve třech redoxních formách, známých jako leukoemeraldine (plně redukováná forma), emeraldinová sůl (polo-oxidovaná forma) a pernigranilin (plně oxidovaná forma). Tyto redoxní formy polyanilinu jsou znázorněny na obrázku 11.



Obrázek 11: Chemické přechody při oxidaci/redukci PANI, upraveno podle [69].

Z těchto uvedených forem je vodivá pouze protonovaná a aniontem dopovaná emeraldinová forma, ostatní formy jsou izolanty. Když je emeraldinová forma protonována dopováním, vytváří se vysoce vodivá struktura. Mechanismus vodivosti zahrnuje elektronové otvory, které jsou radikály kationtů dusíku, střídající se podél řetězce polymeru s neutrálními atomy dusíku. Elektron se z neutrálního dusíku přesune do otvoru na přidaném dusíku, který se pak stává neutrálním. Dusík, ze kterého se elektron přesunul, se stává „dírou“. Tímto způsobem vzniká vodivost polyanilinu. Tato vodivost může být ovlivněna především molekulovou hmotností, procentem krystalinity, oxidační hladinou, procentem dopingu a typem dopantu. Sloučeniny použité jako dopant jsou obvykle silné kyseliny, jako je např. kyselina methansulfonová. Doping na úrovni 50% dává nejvyšší vodivost. Při dopingu větším než 50% se vodivost snižuje [70, 71].

3.3.1 Syntéza polyanilinu

Syntéza polyanilinu může být provedena buď chemicky oxidační polymerací, nebo elektrochemickou polymerací. Oxidační chemická polymerace je jednoduchá a vhodná pro výrobu ve velkém měřítku. Syntéza polyanilinu vyžaduje oxidaci monomeru anilinu reakcí a tvorbou anilinových dimerů prostřednictvím rekombinace kationtových radikálových oxidačních míst nebo elektrofilní substitucí. Kontinuální tvorba oxidačních míst kationtových radikálů umožňuje růst anilinového dimeru, PANI oligomerů a meziproductů za vzniku polyanilinu. Během chemické oxidační polymerace se přechod elektroizolační emeraldinové báze do elektricky vodivé emeraldinové soli provádí dopingovým procesem. Dopingového procesu je dosaženo díky syntéze polyanilinu v kyselém médiu. Kyselé médium spouští přenos náboje z kyselého aniontu na polyanilin a dochází ke změně elektrických vlastností polymeru. Při elektrochemické polymeraci se do systému obsahujícího kyselý anilin umístí systém se třemi elektrodami (pracovní elektroda, referenční elektroda a protielektróda). Aplikace potenciálu v elektrochemickém článku vyvolá oxidaci anilinových monomerů a vede k tvorbě PANI filmu na povrchu elektrody. Na rozdíl od dříve zmíněné oxidační chemické polymerace nevyžaduje elektrochemická polymerace iniciátor oxidačního činidla a poskytuje několik výhod. Mezi tyto výhody patří např. silnější přilnavost ke kovovému povrchu a lepší rozpustnost, jelikož chemicky syntetizovaný polyanilin jde těžko rozpustit. Příprava PANI vyžaduje trvalé oxidační podmínky, např. prostřednictvím přítomnosti většího množství oxidačního činidla. Nicméně omezená rozpustnost PANI ve většině organických rozpouštědel je hlavní překážkou pro aplikaci a zpracování polyanilinu v různých průmyslových aplikacích. Pro zlepšení bylo navrženo několik přístupů, včetně emulzní polymerace, dopingu s organickými kyselinami, dopingu s povrchově aktivními látkami, syntézy koloidních PANI dopingem s polymerními stabilizátory a funkcionalizace PANI s polárními funkčními skupinami schopnými indukovat rozpustnost v polárních rozpouštědlech [72, 73].

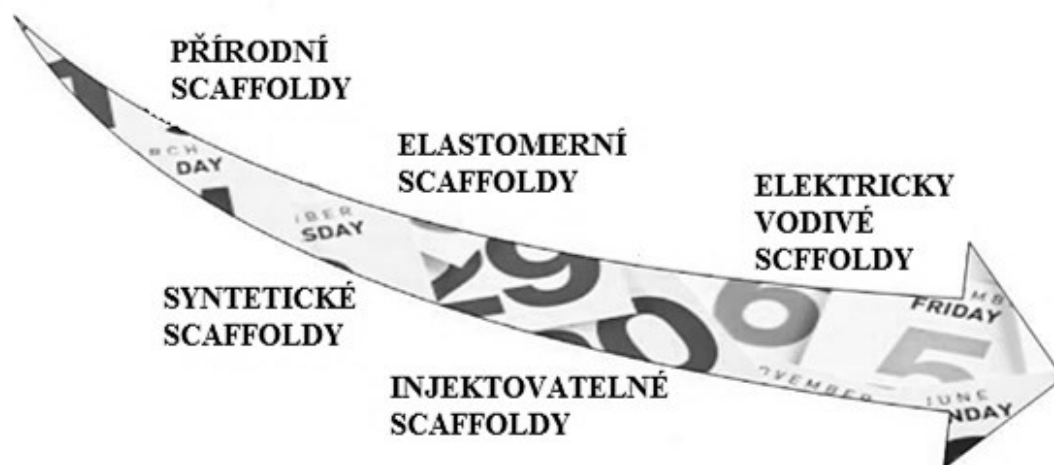
3.3.2 Aplikace polyanilinu

Polymerní systém, který obsahuje PANI jako hlavní složku, vykazuje velký potenciál pro použití v různých oblastech. Aplikace takového polymerního systému závisí na vlastnostech PANI, včetně vodivosti, magnetické aktivity, tepelné citlivosti, optických výhod a mechanických vlastností. Kompozity na bázi PANI byly široce používány při výrobě snímačů/biosenzorů a polovodičů. Polyanilin v biosenzorech vykazuje dvojí funkci a to funkci elektrického signálního zesilovače a funkci substrátu pro úspěšnou vazbu biologické

kých činidel (např. enzymu). Kromě toho je PANI široce využíváný pro vývoj elektrod v kondenzátorech a superkapacitorech, pro snímání plynu a prevenci proti korozi [15, 71]. Jelikož má PANI špatnou zpracovatelnost díky jeho nerozpustnosti a křehkosti, zpracovává se většinou v kompozitní formě s jiným ve vodě rozpustným polymerem, jako jsou polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon a kyselina polyakrylová, které se používají jako stabilizátory. Např. PANI/PVA kompozit vykazuje vlastnosti mikrovlnného stínění přes pásmo X a používá se v elektrických konektorech pro zobrazovací zařízení a jako vlhkostní snímač [74].

4 SCAFFOLDY S ELEKTRICKY VODIVÝMI POLYMERY

Každá buňka produkuje membránový potenciál několika milivoltů (mV) až desítek milivoltů, které závisí na typu buňky, tkáni a stupni buněčné diferenciaci. Elektrický charakter těchto membránových potenciálů vytváří endogenní elektrické pole, stejnosměrné proudy a ultra nízkofrekvenční elektromagnetické pole. Tento elektrický charakter pochází ze segregace nábojů biologickými zástupci, jako jsou transportéry, čerpadla a iontové kanály, které jsou většinou umístěny v plazmové membráně. Toto endogenní elektrické pole ovlivňuje různé buněčné chování včetně embryogeneze, dělení buněk, hojení ran, polarity a buněčné diferenciaci. Ukázalo se, že elektrické signály jsou jedny z mnoha rozhodujících stimulů, které mohou řídit řadu buněčných funkcí. Elektrické stimuly ve scaffoldech podporují buněčnou migraci, buněčnou adhezi, syntézu DNA a sekreci proteinů. Vodivé biomateriály představují revoluci v biomedicínských aplikacích vzhledem k jejich vynikajícím elektricky vodivým a magnetickým vlastnostem. Na obrázku 12 je znázorněn chronologický vývoj scaffoldů pro tkáňové inženýrství od přírodních a syntetických scaffoldů, přes elastomerní a injektovatelné scaffoldy, až po elektricky vodivé scaffoldy [75].



Obrázek 12: Chronologický vývoj scaffoldů pro tkáňové inženýrství, upraveno podle [76].

Pro výrobu scaffoldů s elektricky vodivými materiály bylo použito mnoho výrobních postupů. Bylo zjištěno, že metoda elektrospinningu je slibným způsobem potahování vodivého materiálu na vláknité polymery, jako jsou polycaprolacton, kyselina polymlečná a kyselina

polyglykolová. Elektricky vodivé scaffolds mohou být také vyrobeny elektropolymerací nebo fotochemickou polymerací [62].

4.1 Elektricky vodivé hydrogely

Hydrogely jsou typicky nevodivé, což omezuje jejich aplikaci pro typy buněk, jako jsou nervové buňky a svalové buňky. Zavedení elektricky vodivých polymerů do hydrogelu, jako vodivého materiálu, je atraktivním přístupem k získání materiálů podobných s měkkou tkání. Spojení elektricky vodivých polymerů a hydrogelu umožňuje vytvoření elektro aktivních hydrogelů, které kombinují redoxní schopnosti vodivých polymerů s rychlou iontovou mobilitou a biokompatibilitou hydrogelů. Tyto hydrogely mohou být vyráběny v širokém rozsahu rozměrů a mechanických vlastností, tak aby napodobovaly extracelulární matrix. Vodivé hydrogely mají elektrickou vodivost, která je potřebná pro komunikaci mezi buňkami. Elektrická vodivost ve většině těchto hydrogelů je pod 10 mS/cm. Předpokládá se, že hlavním přínosem elektrické vodivosti je hlavně vodivost roztoku elektrolytu, ve kterém se hydrogel syntetizuje [24, 77]. Příprava vodivých hydrogelů zahrnuje nabobtnání nevodivých hydrogelů v kyselém vodném roztoku monomerů, jako je anilin, thiofen, po kterém následuje *in situ* polymerace. Další metoda zahrnuje supramolekulární interakce mezi dvěma typy polymerních řetězců [78]. Metoda fotochemického zesílení je široce používaná na výrobu hydrogelů pro tkáňové inženýrství. Takto vyrobené elektricky vodivé scaffolds se používají v různých oblastech tkáňového inženýrství, např. v kostní, neurální, srdeční a svalové regeneraci [62].

Nejčastějším příkladem vodivých hydrogelů je kopolymer polyanilinu s polypyrolem, který se používá v tkáňovém inženýrství na výrobu biosenzorů, stimulatorů v mozku a zařízení pro řízené uvolňování léčiv [61]. Řízené uvolňování léčiv z hydrogelů je způsobeno elektrochemicky indukovanými změnami hydrogelů v důsledku reakce na elektrické pole. Mechanismy uvolňování léčiv zahrnují uvolnění léku z gelu, díky difúzi léku podél koncentračního gradientu, kdy elektrický podnět zvyšuje rychlost difúze léčiv do cílového místa [79].

4.2 Elektricky vodivé kryogely

Zajímavým typem vodivých hydrogelů jsou vodivé kryogely. Využití kryogelů na bázi elektricky vodivých polymerů je novým přístupem, který poskytuje řešení problému nehomogenní distribuce vodivých složek ve velkém množství v běžných vodivých hydrogelech. Výzkum 3D materiálů založených na vodivých polymerech je zatím v počátcích, jelikož reakce buněk v 3D a 2D materiálech se liší [80, 81]. Makroporézní řešení pro elektricky řízené tkáňové inženýrství jsou pravděpodobně nejslibnější. Směsná elektronická a iontová vodivost kryogelů může být dále využita při monitorování nebo stimulaci biologických objektů. Jiné použití zahrnují barvicí adsorbenty, řízené uvolňování, substráty pro ukládání vzácných kovů, porézní elektrody biosenzorů, příprava nanočástic kovů *in situ* a buněčné scaffoldy v tkáňovém inženýrství [82]. Například ve studii Deng a kol. [83] byly připraveny tepelně citlivé elektricky vodivé kryogely založené na poly N-isopropylacrylamidu (PNIPAM) a vodivém polyanilinu nebo polypyrrolu, připraveném pomocí *in situ* polymerace anilinu nebo pyrrolu na povrchu kryogelu PNIPAM. Tyto vodivé kryogely vykazovaly makroporézní strukturu, tvarovou paměť a rychlou odezvu jak na teplotu, tak i na infračervené záření. Takto vytvořené kryogely mají velký potenciál pro aplikace v teplotně závislých vypínačích, senzorech citlivých na tlak, magneticky aktivních aktuátorech a zařízení reagující na tvarovou paměť. Tyto vodivé kryogely citlivé na vnější stimuly otvírají nové pohledy na různé elektronické a biomedicínské aplikace [83].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL

Velkým problémem při přípravě kryogelů pro tkáňové inženýrství je dosažení vhodné velikosti a propojenosti pórů. Z tohoto důvodu byly v praktické části při přípravě kryogelů použity různé druhy surfaktantů. Tyto surfaktanty při polymerní reakci vytvořily micely, které po promytí zanechaly v kryogelech různé velikosti pórů. Koncentrace surfaktantů byla volena podle jejich dvojnásobné micelární koncentrace. Hodnoty micelárních koncentrací surfaktantů jsou zobrazeny v tabulce 2.

5.1 Surfaktanty

V rámci této práce byly k syntéze kryogelů vybrány následující surfaktanty:

Triton X-100: 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol, neiontový detergent

Tween 40: Polyoxyethylenesorbitan monopalmitat, neiontový detergent

Brij 96: Polyoxyethylene (10) oleyl ether, neiontový detergent

Poloxamer 188: Poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol), neiontový detergent

SDBS: Dodecyl sodium sulfate, aniontový detergent

Igepal CA 630: Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol, neiontový detergent

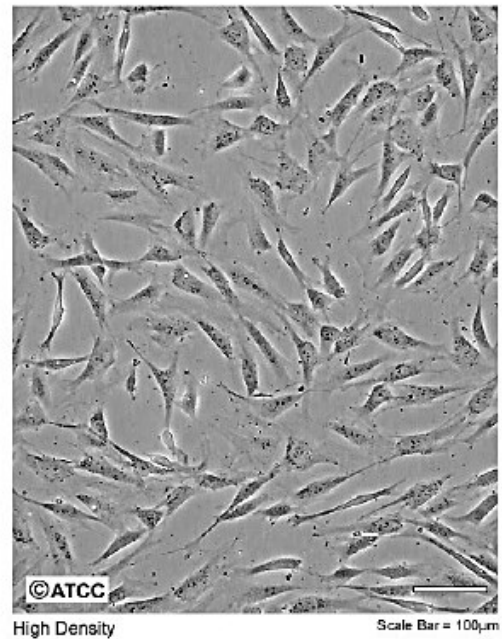
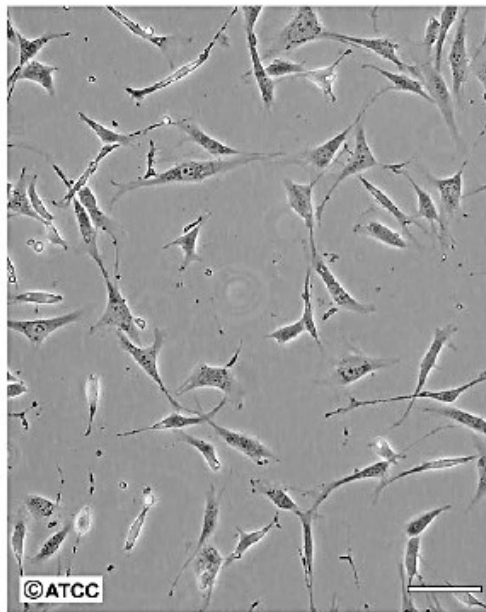
Tabulka 2: Hodnoty jednotlivých micelárních koncentrací surfaktantů

Typ surfaktantu	Kritická micelární koncentrace
Triton X-100	0,220 - 0,240 mM
Tween 40	0,027 mM
Brij 96	0,029 % (w /v)
Poloxamer 188	0,1 %
SDBS	2,070 mM
Igepal CA 630	0,083 mM

5.2 Použitá buněčná linie a kultivační médium

Biologické testování bylo provedeno pomocí buněčné linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC, USA). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM, Biosera, Francie), obsahující 10% telecího séra (Biosera, Francie) a 1% penicilin/streptomycinu (Francie).

ATCC Number: **CRL-1658**
Designation: **NIH/3T3**

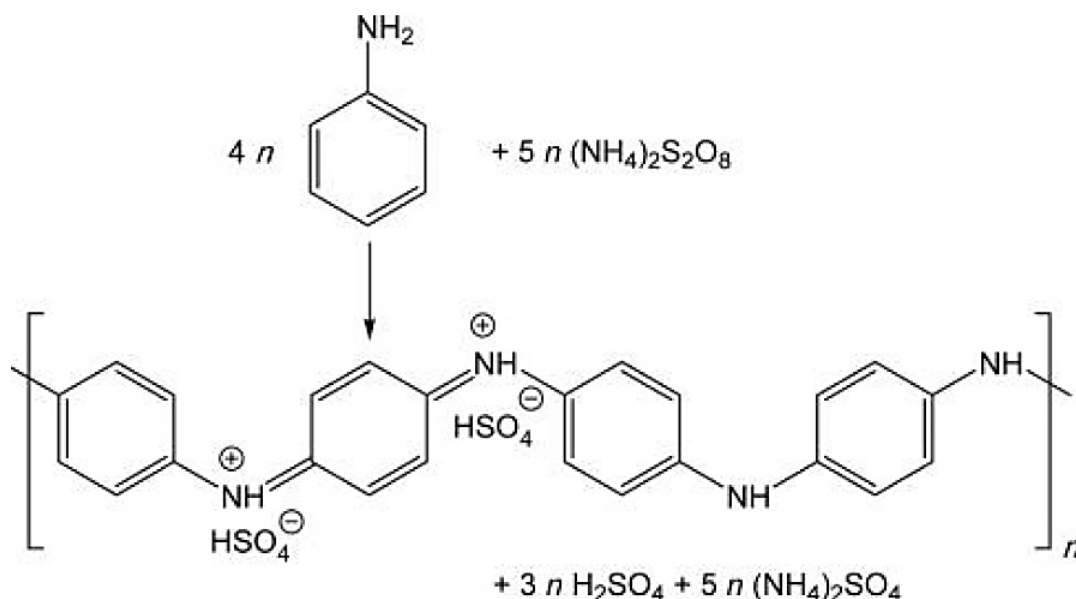


Obrázek 13: Ukázka morfologie buněčné linie NIH/3T3 [84].

6 METODIKA

6.1 Příprava vzorků kryogelu

Kryogely PANI/PVA (polynilin/polyvinylalkohol) byly připraveny oxidací anilinhydrochloridu s peroxydisulfátem amonným za přítomnosti roztoku polyvinylalkoholu. Reakce oxidace anilinu peroxydisulfátem amonným je znázorněna na obrázku 14.



Obrázek 14: Oxidace anilinu peroxydisulfátem amonným napolyanilinovou (emeraldinovou) sůl [82].

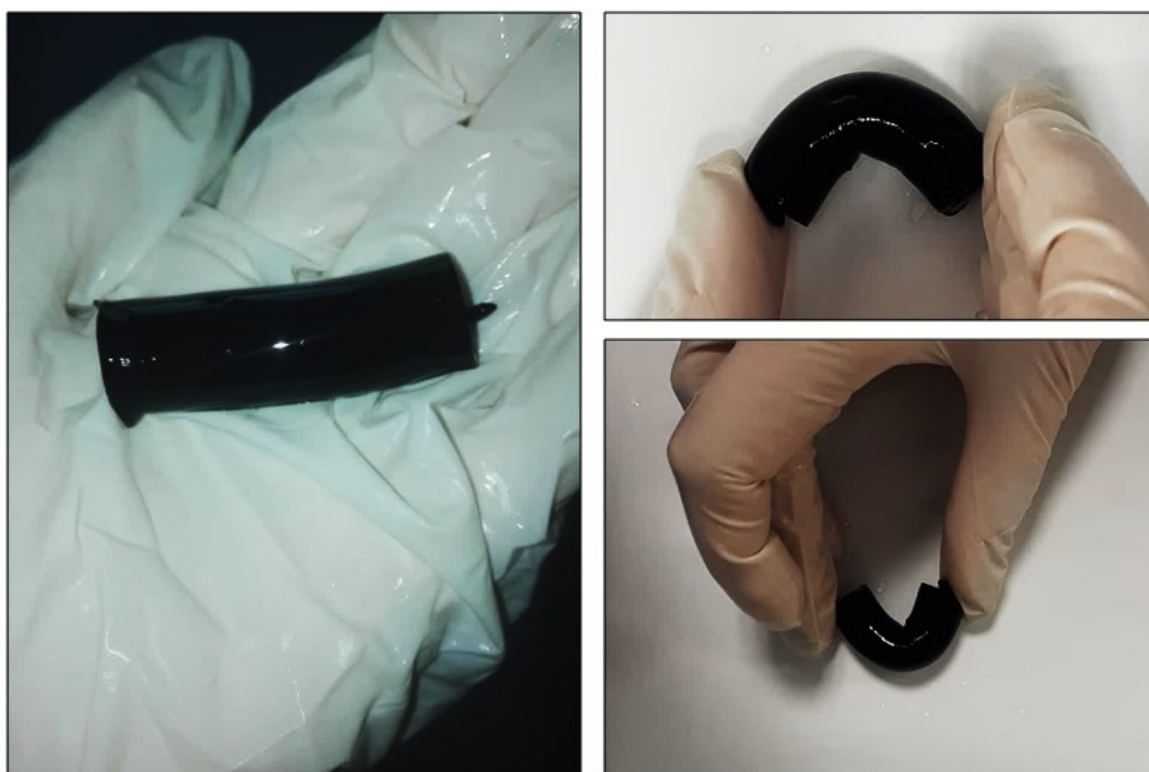
Směs 0,2 M anilin hydrochloridu a 5 hm% polyvinylalkoholu byla rozpuštěna ve 35 ml vody. Následně byl připraven 0,25 M peroxydisulfát amonný, který byl rozpuštěn v 5 ml vody. Takto vytvořené dva roztoky byly smíchány dohromady i se surfaktanty, které byly rozpuštěny v 10 ml vody. Hmotnost surfaktantů byla volena podle jejich dvojnásobných kritických micelárních koncentrací. Takto připravené roztoky s jednotlivými surfaktanty byly přelity do válcovité formy. Poté byly roztoky rychle vymrazeny ethanolem, který byl zchlazen tekutým dusíkem. Následně byly formy s reakční směsí vloženy do mrazáku na $-18\text{ }^\circ\text{C}$, kde probíhala polymerace po dobu 7 dnů. Původně bílé vzorky kryogelů se změnilly na tmavě zelené až černé, jelikož došlo k vytvoření polyanilinu. Po 7 dnech byly vzorky kryogelů vytaženy z mrazáku a po rozmrznutí byly promyty vodou a 0,1 M kyselinou sírovou, kdy došlo k odstranění všech reaktantů nebo vedlejších produktů s nízkou molekulovou hmotností. Celkem bylo připraveno osm vzorků kryogelu, kdy šest z nich obsahovalo surfaktanty, jeden chlorid sodný (Miele) a jeden kryogel byl čistý, bez jiné přísady.

Výsledný kryogel má složenou povahu, kde polyanilin poskytuje vodivost a polyvinylalkohol mechanickou pevnost.

Tabulka 3: Složení jedné dávky roztoku – 50 ml

Složka roztoku	Objem rozpouštědla - vody (ml)
Surfaktant	10
Peroxydisulfát amonný	5
Polyvinylalkohol + anilinhydrochlorid	35

Na obrázku 15 jsou znázorněny připravené vzorky PVA/PANI kryogelů. Jak je vidět, tyto kryogely jsou velmi dobře ohebné a elastické stejně jako živá tkáň.



Obrázek 15: Ukázka připraveného vzorku kryogelu.

6.2 Materiálová charakteristika

6.2.1 Lyofilizace vzorků kryogelu

U kryogelů, které jsou nabobtnány vodou, je lyofilizace důležitá z důvodu možného praskání struktury při BET metodě. Lyofilizace je odstranění vlhkosti z materiálu zmrazením ve vakuu. Tato metoda se provádí při teplotách kolem -80 °C a následuje sušení ve vakuu. Vlhkost se z materiálu odstraní sublimací [85].

Připravené vzorky kryogelů byly lyofilizovány po dobu 5 dnů. Po uplynutí této doby se připravené kryogely přeměnily na xerogely (tzv. suché gely), které byly následně vloženy do volumetrického sorpčního analyzátoru.

6.2.2 BET metoda

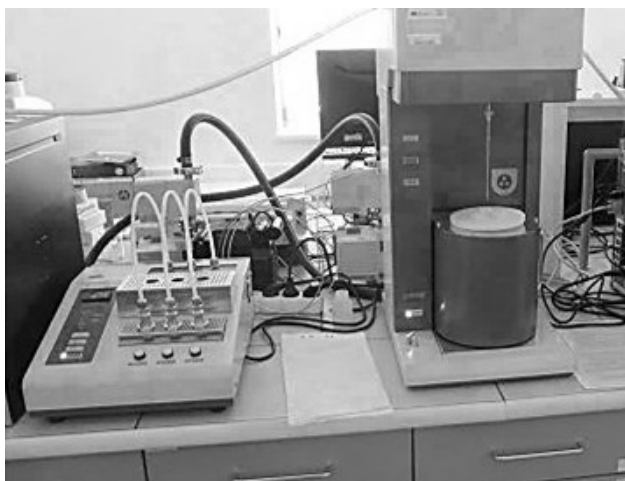
Měření pomocí metody Brunauer-Emmett-Teller (BET) bylo poprvé provedeno v roce 1938. Tato metoda je použitelná pro adsorpční izotermy typu II (disperzní, neporézní nebo makroporézní pevné látky) a typu IV (mezoporézní pevné látky s průměrem pórů 2 - 50 nm. Nedostupné póry nejsou detekovány. BET metoda zahrnuje stanovení množství adsorbátu, které je potřebné k pokrytí vnějších a přístupných vnitřních pórů pevné látky. Toto množství monovrstvy lze vypočítat z adsorpční izotermy pomocí BET rovnice:

$$\frac{p/p_0}{n_a(1-p/p_0)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{C-1}{n_m C} \frac{p}{p_0} \quad (1)$$

Adsorpční izoterma se získá vynesením množství adsorbovaného plynu n_a na svislé ose proti odpovídajícímu relativnímu tlaku p/p_0 na vodorovné ose [86].

Práce s volumetrickým sorpčním analyzátozem BELSORP – mini II (viz. obrázek 16) byla provedena podle mezinárodní normy ISO 9277:2010 Stanovení měrného povrchu pevných látek adsorpcí plynem – metoda BET. Vzorky všech osmi kryogelů byly po lyofilizaci nařezány na malé kousky o hmotnosti asi 0,03 g, které byly vloženy do měřicí cely. Takto připravené měřicí cely byly vloženy do odplyňovacího zařízení, kde byly po dobu 5 hodin při 75 °C . Měření je založeno na adsorpci plynu na povrch pevného materiálu, který byl předem zbaven veškerých molekul okolní atmosféry, sledováním absorbovaného množství plynu o známých parametrech na základě změny tlaku (volumetrická metoda). Po odplynění byly cely umístěny do volumetrického sorpčního analyzátoru BELSORP – mini II, který byl naplněn tekutým dusíkem. Důležitými konstantami pro úspěšné měření jsou hmotnost vzorku a hmotnost prázdné cely, pro kterou je nutno stanovit tzv. mrtvý objem.

V průběhu měření byla zaznamenávána adsorpční (popř. desorpční) izoterma jako závislost adsorbovaného (desorbovaného) množství na změně tlaku při konstantní adsorpční teplotě 77 K.



Obrázek 16: Volumetrický sorpční analyzátor BELSORP – mini II.

6.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) viz. obrázek 17, používá svazek elektronů, který je vytvořen tak, aby snímal testovaný vzorek jako rastr paralelních souvislých linií. Při zasažení vzorku se elektrony odrazí a vzniknou zpětně rozptýlené elektrony nebo se interakcí primárních elektronů se vzorkem vytvoří sekundární elektrony. Vzorek je obvykle pevný předmět a počet sekundárních elektronů emitovaných povrchem závisí na topografii vzorku. Rozměry paprsku sondy určují konečnou rozlišovací schopnost přístroje. Typické SEM mohou dosáhnout zvětšení obrazu 400 000x a mají rozlišení kolem 1nm [87].



Obrázek 17: Skenovací elektronový mikroskop.

6.3 Biologické testy

Pro testování na buněčných liniích je kvůli případné infekci nutné nejdříve testované vzorky vysterilovat. K tomuto účelu byly všechny kryogely ponořeny do 70 % ethanolu po dobu 3 dnů. Následně byly vzorky promývány ultračistou vodou po dobu 14 dnů. Nakonec byly kryogely uchovány v kultivačním médiu.

6.3.1 Příprava buněk

V biologickém inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ (HERAcell 150i) byla v polystyrenových kultivačních nádobách (TPP, Švýcarsko) kultivována buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Po dosažení dostatečného množství (80 - 90% konfluence) bylo v laminárním boxu s řízenou cirkulací vzduchu ALPINA provedeno pasážování buněk. Nejprve bylo odsáto médium pomocí odsávacího zařízení a kultivační nádoba byla promyta 15 ml fosfátového pufru (PBS, koncentrace 0,2 ml/cm²). I fosfátový pufr byl odstát. V dalším kroku bylo do kultivační nádoby přidáno 7,5 ml trypsinu (koncentrace 0,1 ml/cm²). Trypsin byl v nádobě ponechán po dobu 10 minut, kdy došlo k oddělení buněk od nádoby. Oddělení buněk bylo zkontrolováno pomocí mikroskopu Olympus IX 81. Následně bylo přidáno 7,5 ml kultivačního média a vzniklý roztok byl převeden do centrifugační zkumavky pomocí mikropipety. Tato zkumavka byla vložena do centrifugy Eppendorf 5702 R na 3 minuty a 1100 rpm. Vzniklý supernatant byl odsát a ke koncentrovaným buňkám byl přidán 1 ml média. Vznikla tak koncentrace 2×10^7 buněk v 1 ml média.

6.3.2 Cytotoxicita

Dle ISO normy 10993-5 je možné cytotoxicitu testovat pomocí 1) zkoušky extraktem, 2) zkoušky přímým kontaktem nebo 3) zkoušky nepřímým kontaktem. V rámci této diplomové práce bylo provedeno kvantitativní posouzení extraktem a kvalitativní posouzení přímým kontaktem.

Kvantitativní hodnocení cytotoxicity bylo hodnoceno s použitím metabolického testu MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid), který poprvé popsal Mosmann [88] v roce 1983. Životaschopné buňky jsou schopné redukovat žlutý MTT štěpením tetrazoliového kruhu na ve vodě nerozpustný purpurově modrý formazan, který se vysráží v buněčném cytosolu a po lýze buněk může být rozpuštěn. Buňky, které jsou po toxickém poškození mrtvé MTT transformovat nemohou. Reakce je zprostředkována dehydrogenázami – enzymy spojenými s endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi [88].

6.3.2.1 Zkouška extraktem

Připravené buňky v koncentraci 1×10^5 /ml byly napipetovány do 96 jamkových destiček a byly ponechány ke kultivaci po dobu 24 hodin. Zároveň ze všech vzorků kryogelů byly vytvořeny extrakty podle ISO 10993-12. Na analytických vahách bylo naváženo 0,3 g kryogelu a smícháno s 3 ml média. Extrakce byla provedena v chemicky inertních uzavřených nádobách za stálého třepání při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly extrakty přefiltrovány do nových zkumavek. K předkultivovaným buňkám v 96 jamkových destičkách byly pipetovány extrakty v různých koncentracích, jak je znázorněno v tabulce 4. Po 24 hodinách byly ze všech jamek extrakty odsány a přidáno 100 μ l média. Následně bylo k buňkám přidáno MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, výsledná koncentrace 0,5 mg/ml). Po 4 hodinách v inkubátoru bylo z destiček odsáto médium s MTT a pipetou přidáno 80 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid, 99,9 %, Duchefa Biochemie, Nizozemsko). Po 20 minutách působení DMSO byla změřena absorbance na fotometru Infinite M200PRO (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm a referenční vlnové délce 690 nm.

Tabulka 4: Koncentrace extraktu a média

EXTRAKT (μl)	100	75	50	25	10	1
MÉDIUM (μl)	0	25	50	75	90	99

6.3.2.2 Zkouška přímým kontaktem

Vzorky kryogelů byly nařezány na plátky o stejné velikosti průměru i výšky 0,5 cm. Takto nařezané plátky byly ještě rozřezány na stejné čtvrtiny, které byly následně použity k testování. Připravené buňky o koncentraci 1×10^5 /ml byly nasazeny na 48 jamkové destičky. Po 24 hodinách byly nařezané vzorky opatrně položeny do středu buněčné vrstvy v destičkách. Po 48 hodinách byly buňky zafixovány. Odsávacím zařízením bylo odsáto médium a destičky byly promyty 1 ml fosfátového pufru (PBS), který byl následně také odsát. Po odsátí fosfátového pufru byly přidány 2 ml formaldehydu (koncentrace 4%, Penta chemicals Česká republika). Po 15 minutách byl formaldehyd odsát a vzorky byly promyty 1 ml fosfátového pufru (PBS). Poté byly přidány 2 ml Tritonu X-100 (koncentrace 0,5%, Sigma Aldrich, USA). Po 5 minutách byl Triton X-100 odsát a vzorky byly třikrát promyty 1 ml fosfátového pufru (PBS) a nakonec byl 1 ml PBS ponechán v misce. Následně bylo k zafixovaným buňkám přidáno 5 μ g/ml Hoechst 33258 (Invitrogen, USA) a jedna kapka

ActinRed 555 (Thermo Fisher Scientific, USA). Fluorescenční barvivo Hoechst slouží k zviditelnění buněčných jader a ActinRed se váže na aktinová filamenta, čímž se zviditelní buněčný cytoskelet. Takto nabarvené buňky byly po dobu 30 minut ponechány ve tmě a poté foceny pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX81, Japonsko).

6.3.3 Prorůstání buněk scaffoldem

Scaffoldy ve formě kryogelů byly nařezány na stejnou velikost průměru i výšky 0,5 cm. Takto připravené vzorky byly vloženy do 24 jamkových destiček. Na povrch scaffoldů byly napipetovány připravené buňky o koncentraci 1×10^6 /ml. Po 72 hodinách byly buňky zafixovány. Fixace probíhala stejně jako v kapitole 6.3.2.2. V dalším kroku bylo k zafixovaným buňkám přidáno 5 μ l/ml Hoechst 33258 (Invitrogen, USA), který barví DNA buněk. Takto nabarvené buňky byly po dobu 30 minut ponechány ve tmě a poté foceny pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX81, Japonsko).

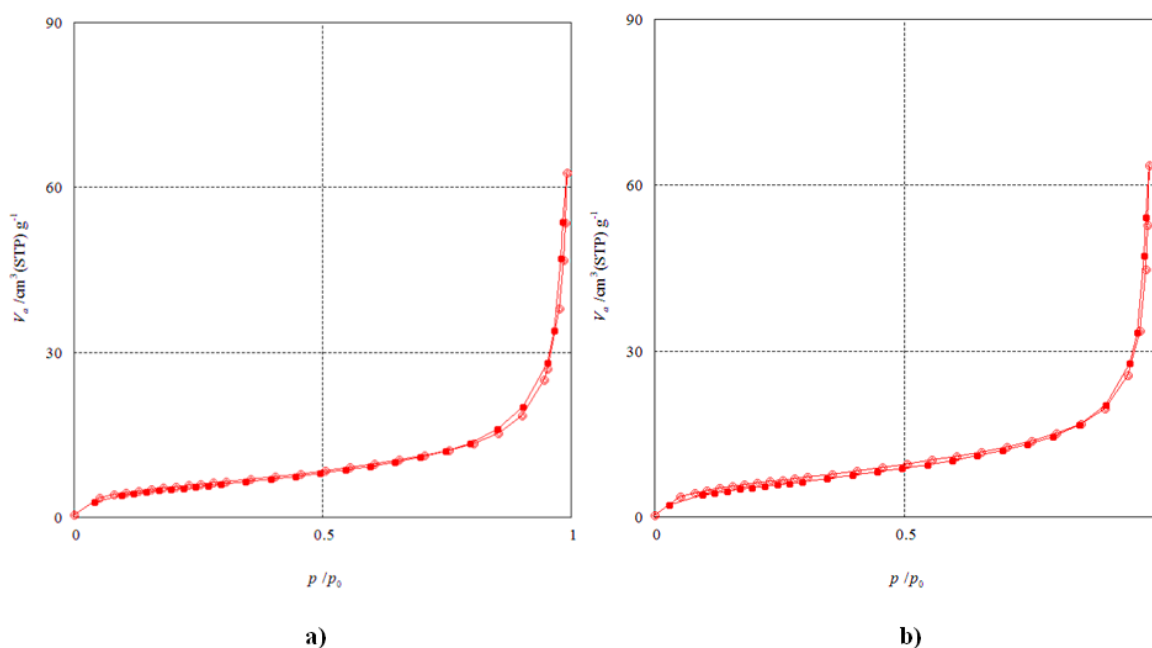
7 VÝSLEDKY

V praktické části bylo připraveno osm vzorků kryogelů na kterých byly nejprve provedeny materiálové charakteristiky pomocí BET a SEM. Následně byly určeny biologické vlastnosti a to konkrétně cytotoxicita extraktů, cytotoxicita přímým kontaktem a prorůstání scaffoldu.

7.1 Materiálové charakteristiky

7.1.1 Měrný povrch a velikost pórů

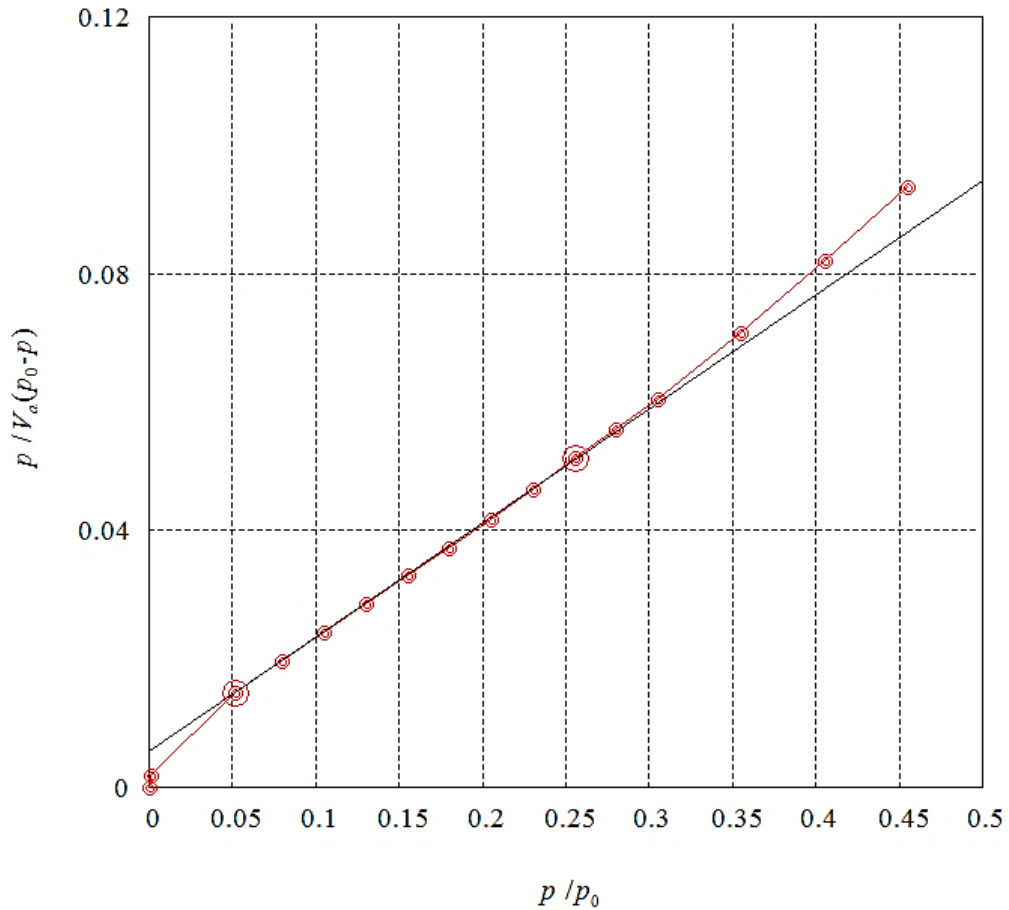
Jako první byla provedena BET metoda u všech osmi vzorků. Adsorpční / desorpční izotermy byly pro všechny vzorky skoro stejné, proto jsou v této práci uvedeny 2 příklady těchto křivek.



Obrázek 18: Adsorpční / desorpční izoterma pro a) kryogel s Tweenem 40, b) čistý kryogel.

Adsorpční / desorpční izoterma znázorňuje závislost adsorbovaného (desorbovaného) množství na relativním tlaku při konstantní teplotě. Z obrázku 18 je vidět, že adsorbované (desorbované) množství roste exponenciálně s rostoucí změnou tlaku. Při nízkých hodnotách relativního tlaku je průběh křivky konkávní, ve střední části lineární a při vyšších hodnotách relativního tlaku je průběh křivky konvexní.

Pro ukázkou výsledného BET grafu (obrázek 19), je v této práci uveden příklad pro čistý kryogel, jelikož BET grafy všech vzorků byly velmi podobné.

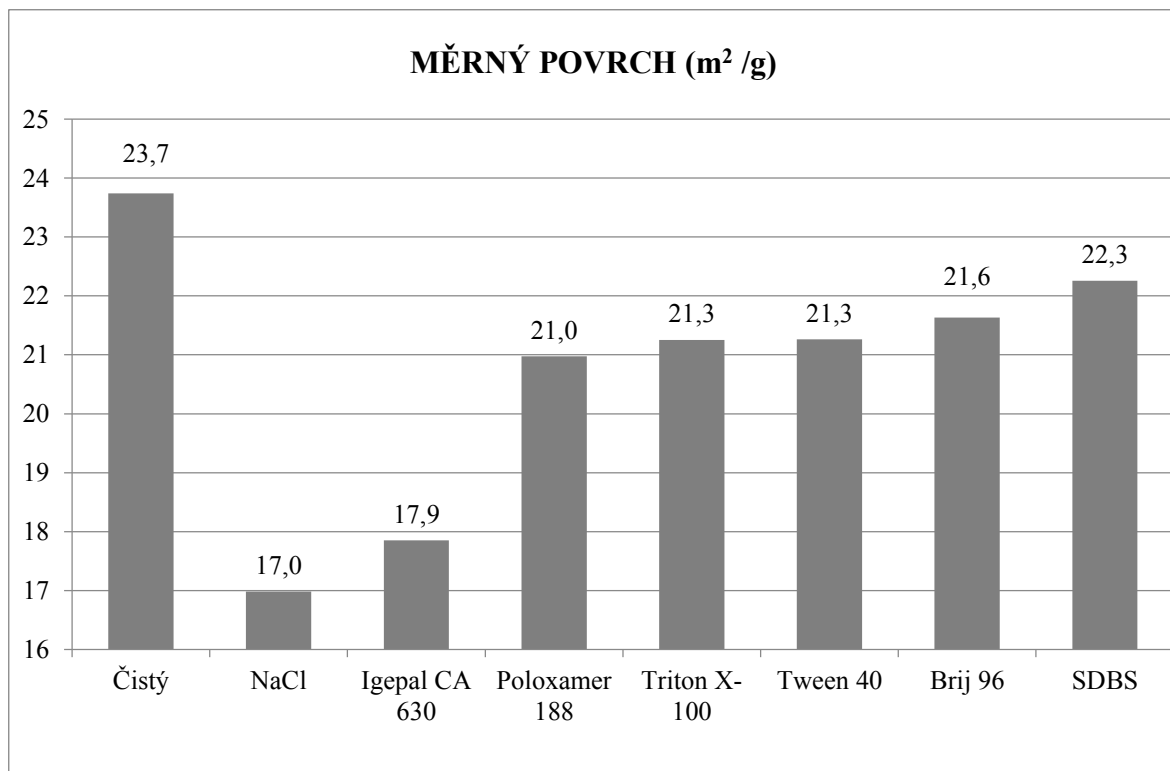


V_m	5.4546 [cm ³ (STP) g ⁻¹]	$a_{s,BET}$	2.3741E+01 [m ² g ⁻¹]
C	33.235	Total pore volume($p/p_0=0.990$)	9.5933E-02 [cm ³ g ⁻¹]
Mean pore diameter	16.163 [nm]		

Obrázek 19: BET graf a naměřené hodnoty pro čistý kryogel, kde V_m je specifický objem adsorbovaného plynu, C je BET konstanta, $a_{s,BET}$ je specifický povrch.

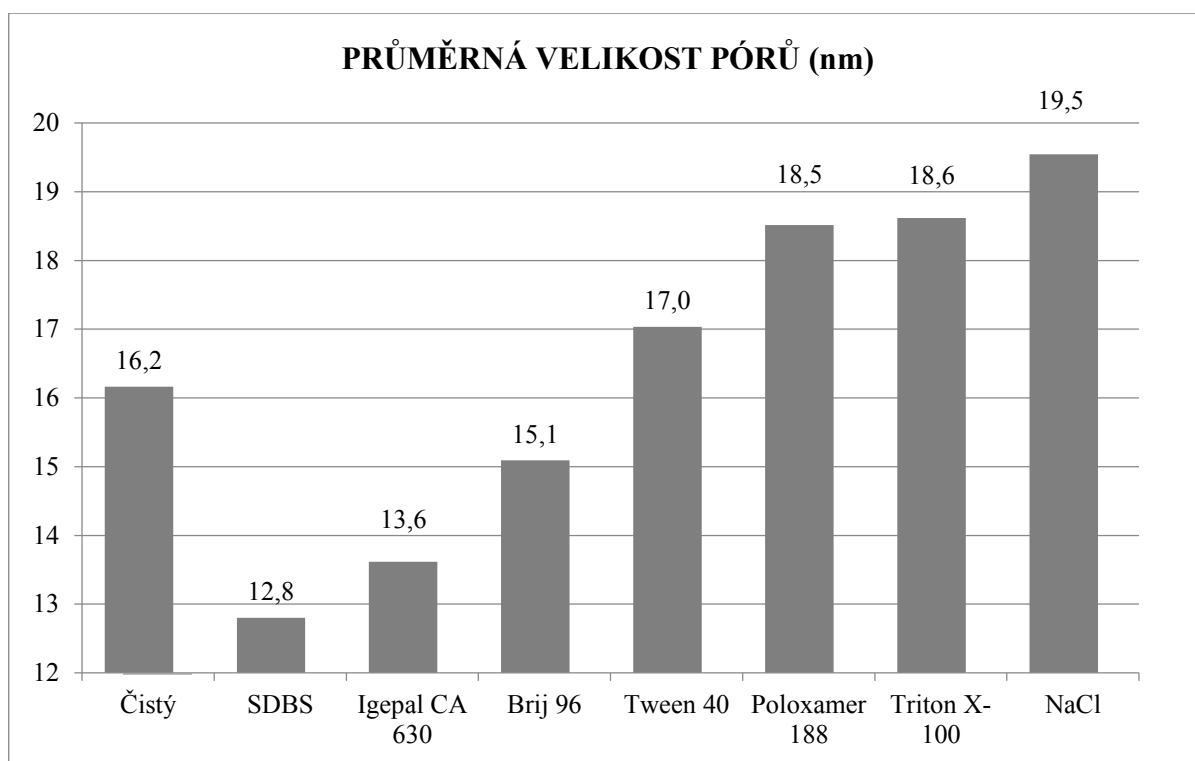
Pro výpočet výsledných hodnot byla zvolena lineární oblast v grafu na ose relativního tlaku 0,05 po 0,25. Z naměřených výsledků na obrázku 19 je vidět, že měrný povrch u čistého kryogelu byl 23,7 m²/g a průměrná velikost pórů byla 16,2 nm.

Z naměřených hodnot měrného povrchu a průměrné velikosti pórů byly vytvořeny grafy, které jsou na obrázku 20 a 21.



Obrázek 20: Graf měrného povrchu jednotlivých kryogelů.

Na obrázku 20 je vidět, že kryogely s Poloxamerem 188, Tritonem X-100, Tweenem 40, Brijem 96 a SDBS měli velmi podobné hodnoty měrného povrchu. Nejvyšší měrný povrch byl naměřen u vzorku čistého kryogelu (23,7 m²/g) a naopak nejmenší u vzorku kryogelu s NaCl (17,0 m²/g). Nízkou hodnotu oproti ostatním vzorkům měl i kryogel s Igepalem (17,9 m²/g).



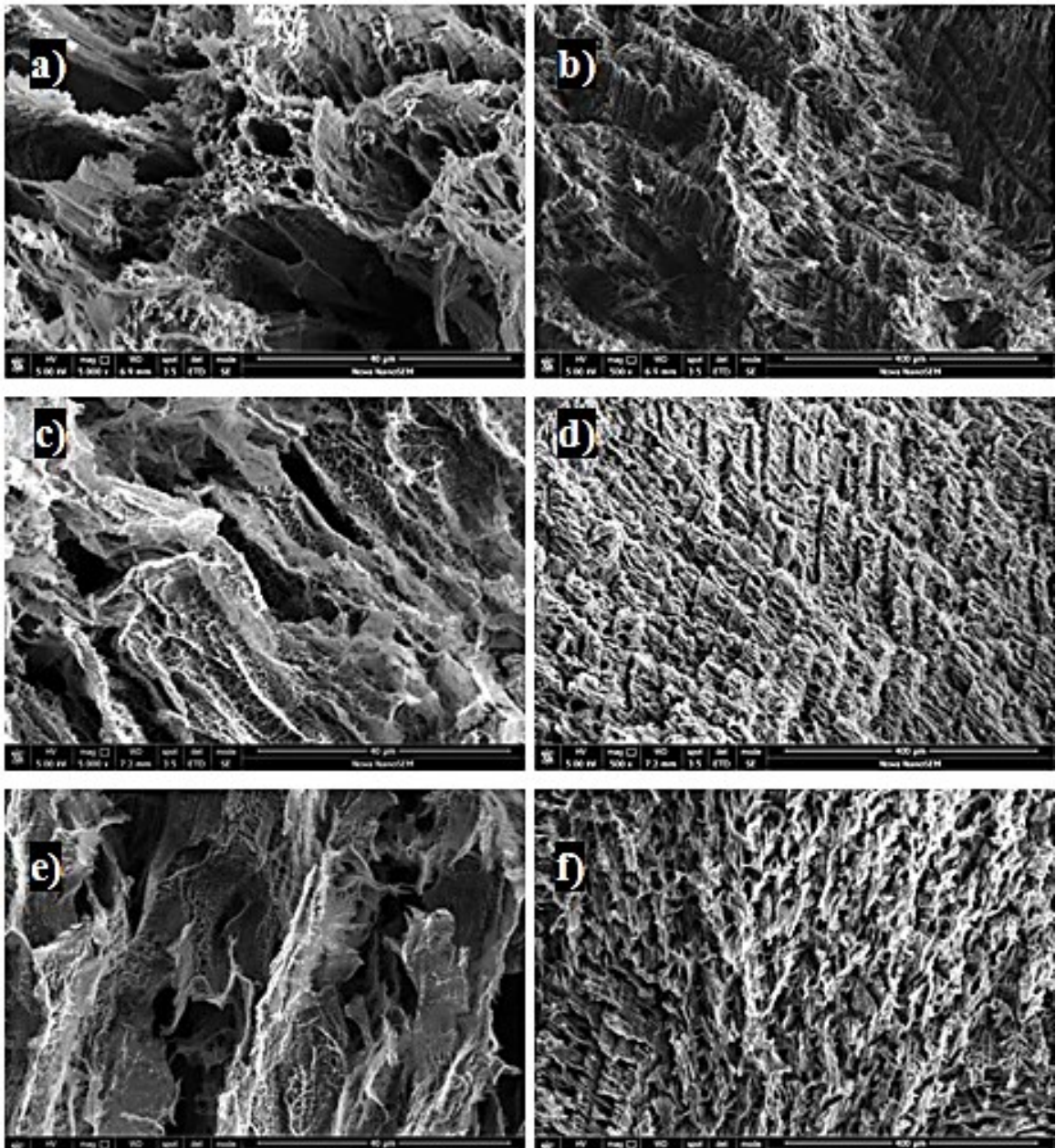
Obrázek 21: Graf průměrné velikosti pórů jednotlivých kryogelů.

Dalším zkoumaným parametrem u kryogelů byla průměrná velikost pórů (viz. obrázek 21). Velikost pórů se jen minimálně lišila, přesto nejvyšší průměrná velikost pórů byla naměřena u vzorku s NaCl (19,5 nm), kvůli tomu, že při přípravě tohoto kryogelu byly použity krystaly NaCl. Naopak nejmenší průměrná velikost pórů kryogelu byla u vzorku se surfaktantem SDBS (12,8 nm) a Igepalem CA 630 (13,6 nm). Velmi podobnou průměrnou velikost pórů měly vzorky s Poloxamerem 188 (18,5 nm) a Tritonem X-100 (18,6 nm). Vzorek se surfaktantem Brij 96 měl průměrnou velikost pórů 15,1 nm a vzorek s Tweenem 40 17,0 nm.

Z výsledků BET metody lze tedy říct, že s rostoucí velikostí měrného povrchu průměrná velikost pórů klesá.

7.1.2 Struktura kryogelů

V návaznosti na výsledné velikosti pórů z BET metody byla pomocí Skenovací elektronové mikroskopie vyfocena struktura pórů v kryogelech. Skenovací elektronová mikroskopie se běžně používá pro analýzu morfologie kryogelů. Z vytvořených fotek lze hodnotit velikost pórů a tloušťku stěn. Pro focení byl vybrán čistý kryogel a vzorky s nejmenší a největší velikostí pórů a měrného povrchu. Tyto kryogely byly foceny při zvětšení 500x a 5000x.



Obrázek 22: Struktura kryogelů: a) NaCl zvětšení 500x, b) NaCl zvětšení 5000x, c) čistý zvětšení 500x, d) čistý zvětšení 5000x, e) SDBS zvětšení 500x, f) SDBS zvětšení 5000x.

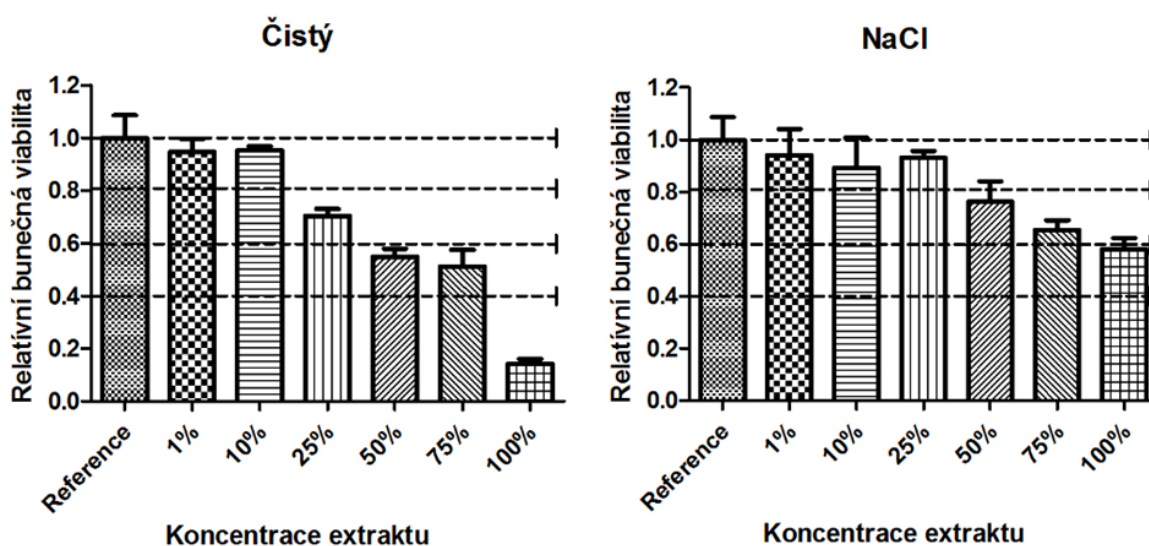
Na obrázku 22 jsou výsledné snímky struktury kryogelů ze SEM. Na snímcích a) a b) je vidět, že kryogel s NaCl měl největší póry z vybraných kryogelů. Struktura čistého kryogelu je znázorněna na snímcích c) a d). Na snímcích z tohoto obrázku je vidět, že velikost pórů čistého kryogelu je o něco menší než u kryogelu NaCl. Na snímcích e) a f) je struktura SDBS kryogelu. Z těchto snímků je vidět, že SDBS má póry ze všech vzorků nejmenší a tloušťka stěn tohoto kryogelu je nejsilnější. Snímky ze SEM tedy potvrdily rozdíly ve velikosti pórů, které byly získány BET metodou.

7.2 Biologické testy

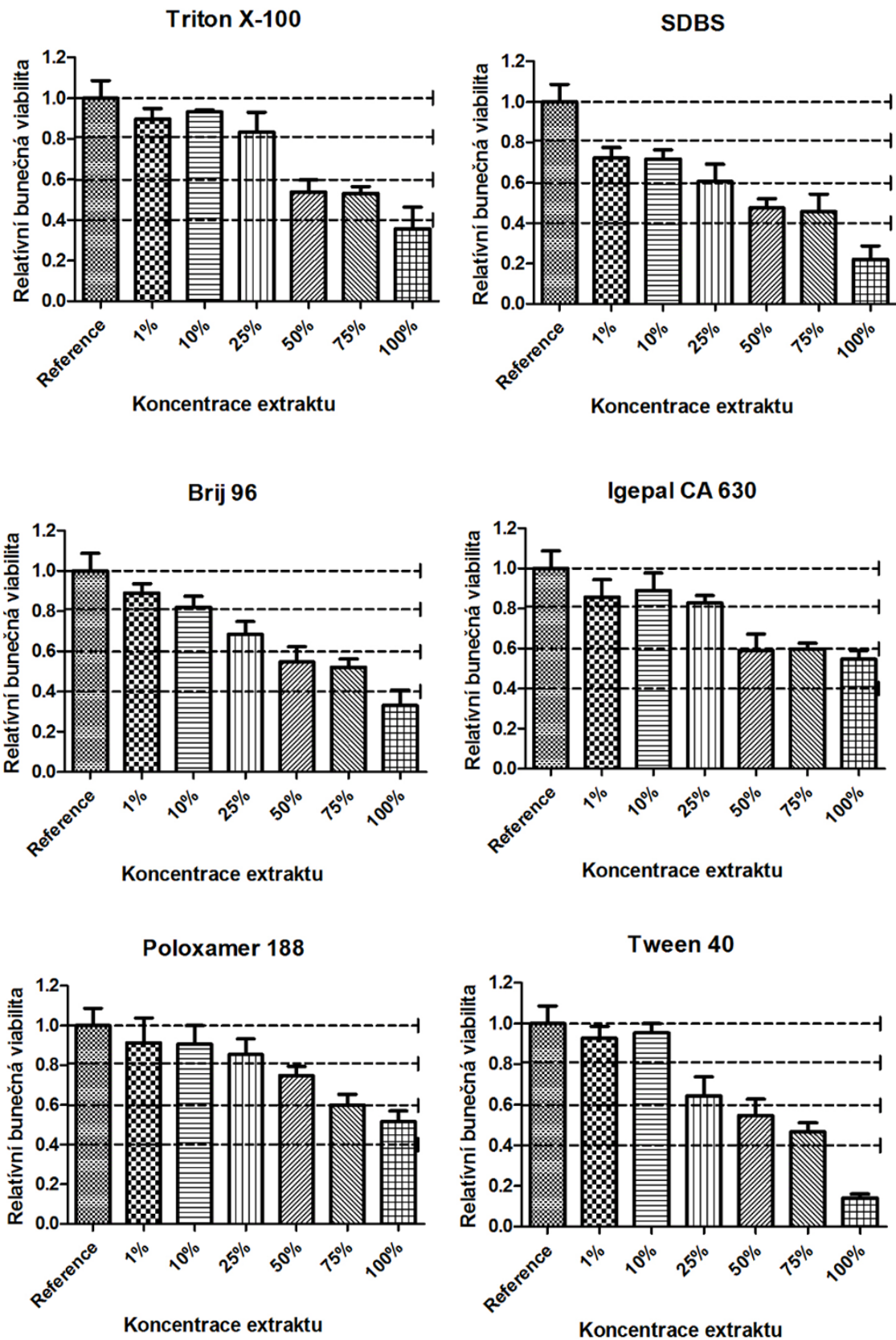
7.2.1 Cytotoxicita extraktu

K určení cytotoxicity byly z kryogelů připraveny extrakty. Cytotoxicita byla stanovena pomocí MTT testu. Reference byla nastavena na relativní buněčnou viabilitu 1, což odpovídá 100% buněčné viabilitě.

Dle normy ISO10993-5 se cytotoxicita hodnotí podle stupnice: > 0,8 bez cytotoxického efektu; 0,6 – 0,8 mírně cytotoxický efekt; 0,4 – 0,6 slabě cytotoxický efekt; < 0,4 silně cytotoxický efekt.



Obrázek 23: Výsledky cytotoxicity kryogelových extraktů.

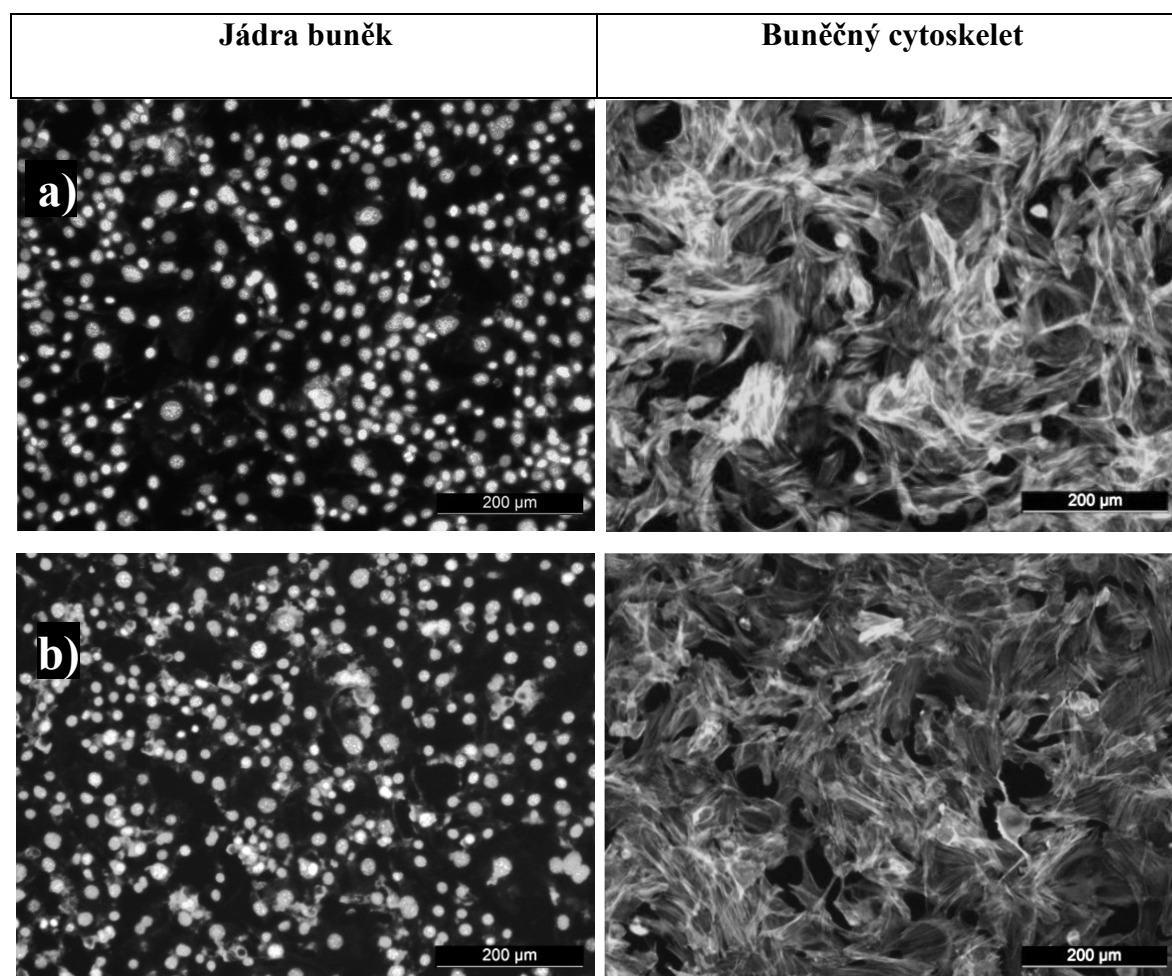


Obrázek 24: Výsledky cytotoxicity kryogelových extraktů.

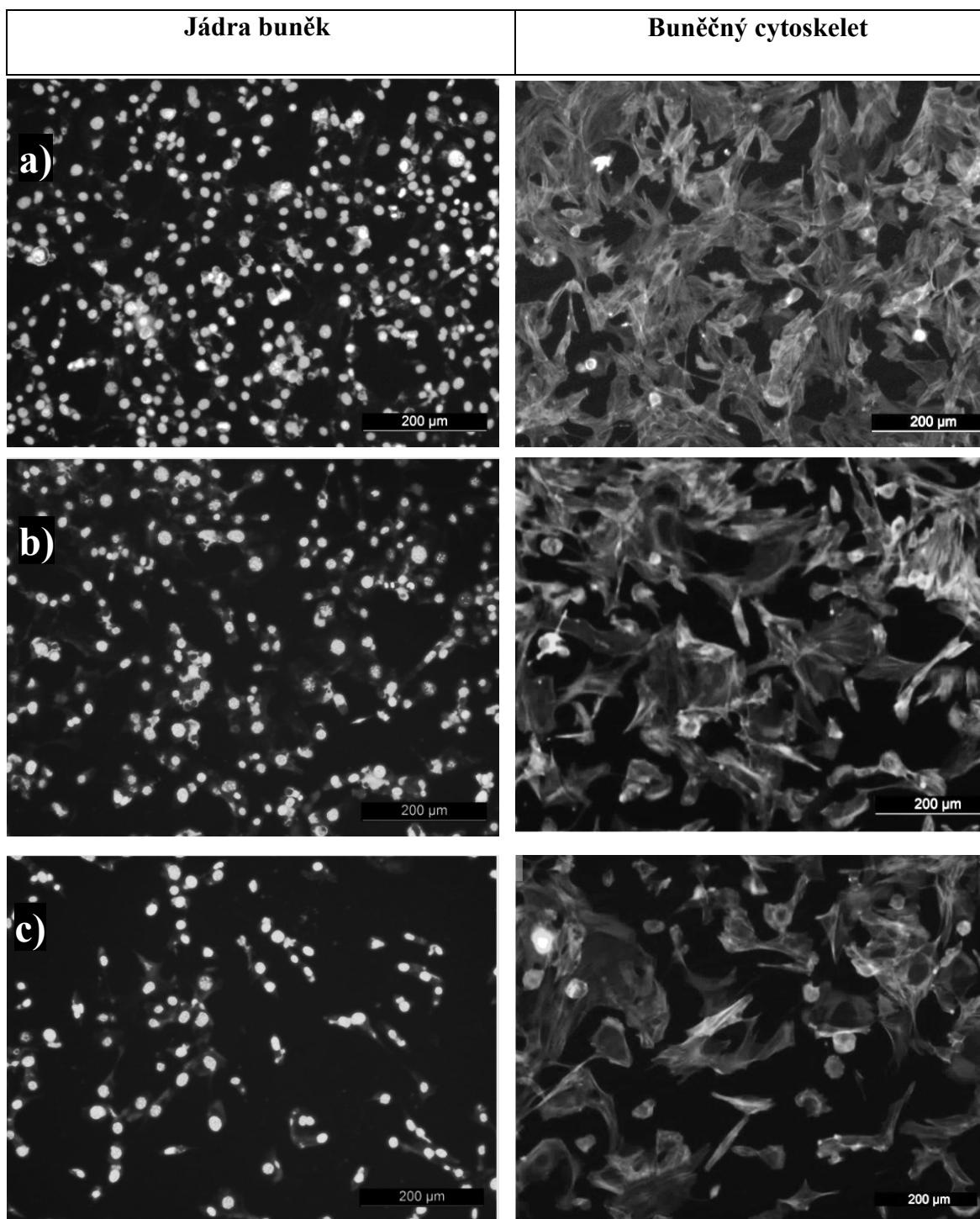
Z výsledků MTT testu na obrázcích 23 a 24 je vidět, že nejvíce cytotoxický kryogel, už při nízkých koncentracích extraktu, byl kryogel s přídavkem surfaktantu SDBS. Dokonce 1% extrakt dosahoval mírně cytotoxického efektu ($0,72 \pm 0,05$). Všechny ostatní vzorky byly do koncentrace 10% extraktu bez cytotoxického efektu. Při 25% extraktu však byly bez cytotoxického efektu už jen vzorky s NaCl, Poloxamerem 188, Igepalem CA 630 a Tritonem X-100. Extrakt z čistého kryogelu v této koncentraci už dosahoval mírné cytotoxicity. Výrazný rozdíl můžeme sledovat při 50% extraktu, kde kryogely s NaCl a Poloxamerem 188 dosahují více jak 70% viability, zatím co všechny ostatní vzorky jsou v rozmezí slabé cytotoxicity. U 100 % extraktu byly zaznamenány nejvyšší rozdíly v buněčné viabilitě. Nejnížší viabilita byla v této koncentraci u kryogelu čistého a s Tweenem 40, kdy hodnoty buněčné viability byly u obou těchto kryogelů $0,14 \pm 0,02$. Další silně cytotoxický kryogel byl s SDBS ($0,22 \pm 0,07$), s Tritonem X-100 ($0,36 \pm 0,08$) a s Brij 96 ($0,33 \pm 0,06$). Nejlepší buněčnou viabilitu u 100 % extraktu měly kryogely s NaCl, Poloxamerem 188 a Igepalem CA 630. Hodnoty relativních buněčných viabilit neklesly pod 0,4. Z toho vyplývá, že vzorky byly slabě cytotoxické. Dokonce u kryogelu s NaCl byla buněčná viabilita na hranici mezi slabou a mírnou cytotoxicitou. Obecně se dá shrnout, že nejnížší cytotoxicitu vykazoval kryogel s NaCl, po kterém následoval kryogel s Poloxamerem 188 a Igepalem CA 630.

7.2.2 Cytotoxicita přímým kontaktem

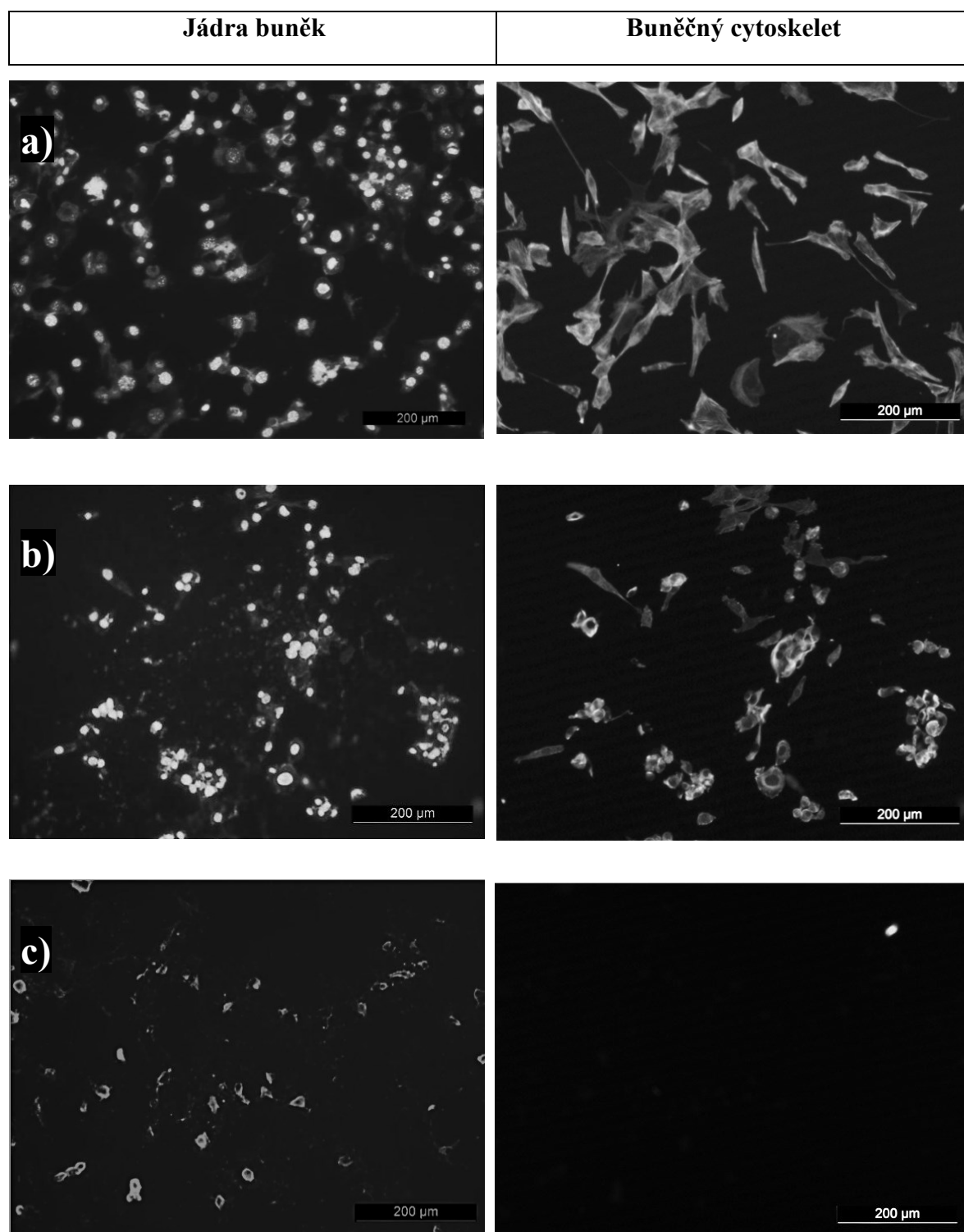
Po MTT testu následovala zkouška cytotoxicity přímým kontaktem. Tento test byl vyhodnocen kvalitativně pomocí mikrofotografií, které jsou znázorněny na obrázcích 25 - 28. Pro lepší viditelnost rozdílů v buněčné morfologii, byly fluorescenčně zvýrazněny jádra buněk a buněčný cytoskelet. Takto nabarvené buňky byly vyfoceny pomocí fluorescenčního inverzního mikroskopu.



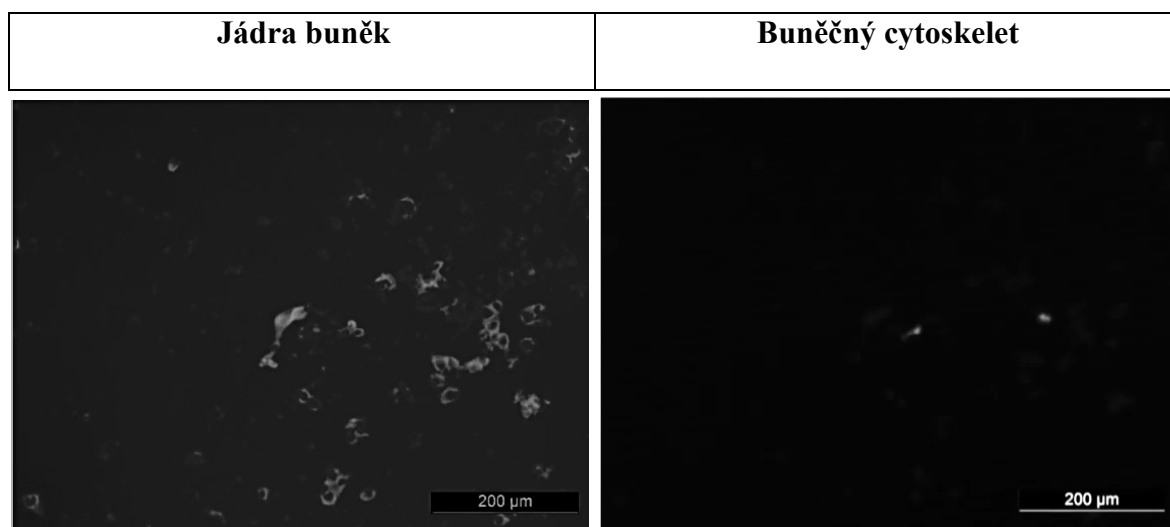
Obrázek 25: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu: a) reference, b) NaCl.



Obrázek 26: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu: a) Igepal CA 630, b) Poloxamer 188, c) Brij 96.



Obrázek 27: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu: a) Triton X-100, b) Tween 40, c) čistý.

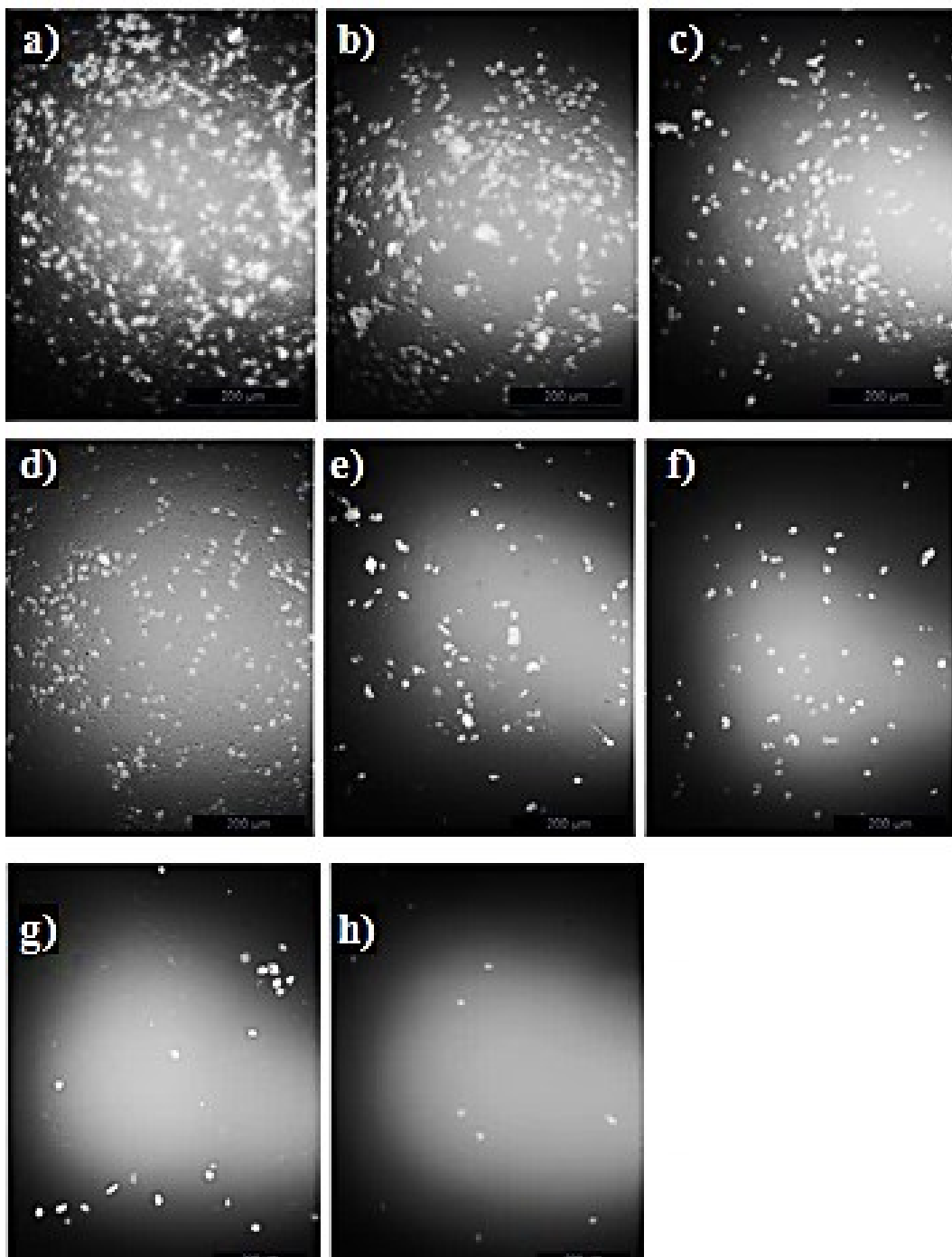


Obrázek 28: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu pro SDBS.

Z obrázků 25 a 26 je vidět, že na kryogelech s NaCl a Igepalem CA 630 rostly buňky v podobném rozsahu jako na referenci. Buňky si v přítomnosti těchto vzorků zachovávaly svoji typickou rozvětvenou a protáhlou morfoloii. O málo nižší počet buněk můžeme pozorovat při kultivaci s kryogelem obsahujícím Poloxamer 188 (obrázek 26 b), avšak buněčná morfoloie zůstává stále zachovaná. Pokles buněk je tak malý, že se stále jedná o necytotoxický efekt. K výraznějšímu poklesu viability dochází při kultivaci v kontaktu s kryogely Brij 96 (obrázek 26c) a Triton X-100 (obrázek 27a). Zároveň je možné vidět, že dochází i ke změnám v morfoloii, kde fibroblasty ztrácí svůj typický rozvětvený tvar a v případě kryogelu Brij 96 dochází k zakulatění cytoskeletu. V tomto případě se jedná už o cytotoxický efekt. Významný rozdíl v počtu buněk byl zaznamenán na dalších třech vzorkách, kryogel Tween 40 (obrázek 27b), čistý (obrázek 27c) a SDBS (obrázek 28). Na vzorku kryogelu Tween 40 bylo možné ještě sledovat cytoskelet, který byl značně zničený a fibroblasty nejevily známky typické morfoloie. Na kryogelu čistém a s SDBS už není možné cytoskelet sledovat. Nejvíce cytotoxické byly tedy vzorky kryogelů čistých a SDBS, kde fibroblasty nebyly v přítomnosti těchto vzorků schopny růst po dobu 2 dní a byly prakticky kompletně rozpadnuté. Výsledky z cytotoxicity v přímém kontaktu korelují s výsledky cytotoxicity extraktu. Opět bylo potvrzené, že nejméně cytotoxické jsou kryogely s NaCl a Igepalem CA 630 a nejvyšší cytotoxicitu vykazuje kryogel s SDBS a čistý.

7.2.3 Prorůstání buněk scaffoldem

Po zkoušce přímým kontaktem bylo foceno prorůstání buněk scaffoldem, které je na obrázku 29. Pro lepší viditelnost, byly jádra buněk nabarveny barvivem Hoechst. Zhoršená kvalita fotografií je způsobena pórovitými 3D strukturami, kde buňky rostou v různých vrstvách. Z tohoto důvodu nebylo možné kvalitní zaostření na buněčná jádra. Na druhé straně to však značí, že buňky byly schopny migrovat hlouběji do pórů scaffoldů.



Obrázek 29: Fotky z prorůstání buněk scaffoldem a) NaCl, b) Tween 40, c) Poloxamer 188, d) Triton X-100, e) čistý, f) Igepal CA 630, g) Brij 96, h) SDBS.

Na obrázku 29 je znázorněno prorůstání buněk jednotlivými kryogely. Tak jako v předchozích dvou testech, nejlépe dopadl kryogel s NaCl, kde můžeme sledovat nejvyšší počet jader. Překvapivě na kryogelech s Tween 40 byly buňky také schopny adherovat a následně proliferovat ve vyšším rozsahu. Avšak větší počet jader byl už zničený, takže při dlouhodobější kultivaci by se buňky pravděpodobně rozpadly. Obecně v porovnání s čistým kryogelem podobně nebo lépe dopadly kryogely s NaCl, Tweenem 40, Poloxamerem 188, Igepalem CA 630 a Tritonem X-100. Na všech těchto kryogelech byly myší fibroblasty schopny se adherovat a po sledovanou dobu proliferovat. Naopak žádné buněčné jádra nebylo možné sledovat na kryogelech se surfaktanty Brij 96 a SDBS.

8 DISKUZE

Porozita scaffoldů je rozhodujícím faktorem, který ovlivňuje schopnost buněk migrovat a růst v rámci struktury, ale také poskytuje biomechanické podněty a ovlivňuje mikroprostředí (např. s ohledem na uvolnění biologicky aktivních látek nebo účinné výměny živin). Navíc porozita ovlivňuje vaskularizaci a usnadňuje mechanické zajištění mezi scaffoldem a okolní tkání [81]. Porozita kryogelů závisí na přípravě. Například termoreverzibilní PVA kryogely vyrobené bez síťovacího činidla mají velikost pórů mezi 100 nm a 1 μm , zatímco chemicky zesíťované PVA kryogely mají velikost pórů od 1 μm do 150 μm [37].

Z důvodu získání scaffoldů s různými velikostmi pórů byla tato práce zaměřena na přípravu kompozitních PVA/PANI kryogelů s různými surfaktanty a NaCl. Takto připravené kryogely byly následně podrobeny jak testování materiálové charakteristiky, tak i buněčnému testování.

Pomocí BET metody byl studován měrný povrch částic a průměrná velikost pórů. Bylo zjištěno, že největší měrný povrch měl vzorek čistého kryogelu. Byly vyrobeny kryogely s různými druhy surfaktantů, které měly větší průměrnou velikost pórů, než čistý PVA/PANI kryogel. Mezi tyto druhy patří kryogely s NaCl, Tritonem X-100, Tweenem 40 a Poloxamerem 188. Největší průměr pórů byl 19,5 nm. Porovnáním může být studie Humpolíček a kol. [81], kde připravili PVA/PANI kryogely o průměrné velikosti pórů až 159 μm . Výsledné póry vybraných druhů kryogelů byly nafoceny pomocí Skenovací elektronové mikroskopie. Pro tuto metodu byly vybrány kryogely čisté a vzorky s největší průměrnou velikostí pórů a to kryogely s NaCl. Jako poslední byl vybrán vzorek kryogelu s SDBS, který měl nejmenší průměrnou velikost pórů ze všech připravených druhů.

Buněčné testování bylo provedeno pomocí zkoušky cytotoxicity dvěma způsoby, a to zkouškou extraktu a přímého kontaktu. Pomocí MTT testu byly zjištěny buněčné viability v závislosti na různých koncentracích extraktu u všech vzorků kryogelu. Je známo, že polyanilinový prášek vykazuje významnou cytotoxicitu, která souvisí s přítomností nízkomolekulárních nečistot. Připravené kryogely by měly mít cytotoxicitu nižší než v případě polyanilinových prášků, což bylo pomocí buněčného tetování potvrzeno. Např. ve studii Humpolíček a kol. [89] 25% extrakt z PANI prášku dosahuje silné cytotoxicity, zatímco 25% extrakty z kryogelů připravených v rámci této diplomové práce byly úplně bez cytotoxického účinku nebo dosahovaly jen mírné cytotoxicity.

Z výsledků zkoušky extraktem bylo také zjištěno, že u všech druhů kryogelů se buněčná viabilita s rostoucí koncentrací extraktu snižovala. Nejvíce cytotoxický kryogel, už při nízkých koncentracích extraktu, byl kryogel s přidavkem surfaktantu SDBS. Naopak nejméně cytotoxický byl kryogel s přidavkem NaCl. U kryogelů s přidavkem NaCl a Poloxamerem 188 při 50% extraktu se podařilo dosáhnout lepší relativní buněčné viability než u čistého PVA/PANI crogelu, který byl při 50% extraktu slabě cytotoxický. Stejně výsledky byly dosaženy pomocí zkoušky přímého kontaktu. Jako poslední byla provedena zkouška prorůstání scaffoldem. I tato zkouška potvrdila výsledky z obou předchozích testů cytotoxicity. Nejvíce buněk rostlo na kryogelech s přidavkem NaCl a nejméně na kryogelech s SDBS.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce je založena na návrhu polymerních materiálů a jejich následném testování pomocí eukaryotických buněk. Pro tuto práci byly vybrány kompozitní PVA/PANI kryogely. Cílem této práce bylo nasyntetizovat pevné a elastické kryogely s různou porozitou, které by zároveň byly co nejméně cytotoxické a buňky by byly schopny adherovat na ně a následně proliferovat a migrovat do vnitřní struktury scaffoldu.

Experimentální část této práce byla zaměřena na přípravu různě porézních kryogelů. Pro přípravu kryogelů byl použit NaCl a vybrané surfaktanty, jako je Tween 40, Poloxamer 188, triton X-100, SDBS, Igepal CA 630 a Brij 96. Tyto surfaktanty způsobily rozdílnou velikost pórů a různou cytotoxicitu výsledných kryogelů. Z výsledků materiálové charakteristiky bylo zjištěno, že rozdíl ve velikosti pórů připravených kryogelů nebyl výrazný. Z tohoto důvodu by v budoucnosti bylo potřeba vyzkoušet vyšší koncentrace použitých surfaktantů. Vzhledem k testům cytotoxicity vyšly nejlépe kryogely s NaCl a Igepalem CA 630. Z tohoto důvodu by bylo vhodné pro případné studie v tkáňovém inženýrství dále testovat jen kryogely s NaCl, Igepalem CA 630 a Poloxamerem 188. Vzhledem k vysoké cytotoxicitě není vhodné zkoušet dále kryogely čisté a SDBS. U připravených kryogelů NaCl, Poloxamer 188 a Igepal CA 630 se podařilo dosáhnout nižší cytotoxicity než u kryogelu čistého, což je velmi důležité pro aplikace v medicíně a v tkáňovém inženýrství. Dále v porovnání s čistým kryogelem byly schopny buňky růst podobně nebo ještě lépe na kryogelech s NaCl, Tweenem 40, Poloxamerem 188, Igepalem CA 630 a Tritonem X-100. Na všech těchto kryogelech byly myší fibroblasty schopné se adherovat a po sledované dobu proliferovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RAMAKRISHNA, Seeram, Murugan RAMALINGAM, T.S. Sampath KUMAR a Vinston O. SOBOYEJO. *Biomaterials: a nano approach*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. ISBN 978-142-0047-813.
- [2] BANORIYA, Deepen, Rajesh PUROHIT a R.K. DWIVEDI. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. *Materials Today: Proceedings*. 2017, **4**(2), 3534-3541. DOI: 10.1016/j.matpr.2017.02.244. ISSN 22147853.
- [3] TIWARI, Atul, ed. a Ravi B. SRIVASTAVA, ed. *Biotechnology in Biopolymers Developments - Applications and Challenging Areas*. Shawbury: Smithers Rapra, 2012. ISBN 978-1-84735-542-3.
- [4] MICHLER, Goerg H. a F. J. BALTA-CALLEJA. *Nano- and micromechanics of polymers: structure modification and improvement of properties*. Cincinnati: Hanser Publications, 2012. ISBN ISBN978-3-446-42767-9.
- [5] DAVIS, J. R. *Handbook of materials for medical devices*. Materials Park, OH: ASM International, 2003. ISBN 08-717-0790-X.
- [6] KIM, Moon Suk, Jae Ho KIM, Byoung Hyun MIN, Heung Jae CHUN, Dong Keun HAN a Hai Bang LEE. Polymeric Scaffolds for Regenerative Medicine. *Polymer Reviews*. 2011, **51**(1), 23-52. DOI: 10.1080/15583724.2010.537800. ISSN 1558-3724.
- [7] PERALE, Giuseppe a J. G. HILBORN. *Bioresorbable polymers for biomedical applications: from fundamentals to translational medicine*. Amsterdam: Elsevier/Woodhead Publishing, 2017. Woodhead Publishing series in biomaterials, no. 120. ISBN 978-0-08-100266-7.
- [8] MURALISRINIVASAN, Natamai Subramanian. *Polymer blends and composites: chemistry and technology*. Beverly, Massachusetts: Scrivener Publishing, 2017. ISBN 978-1-118-11889-4.
- [9] FIRE, Frank L. *The common sense approach to hazardous materials*. 3rd ed. Tulsa, Okla.: PennWell/Fire Engineering, 2009. ISBN 978-1-59370-194-9.

- [10] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [11] AMBROSIO, Luigi. *Biomedical composites*. Second edition. Duxford: Elsevier/Woodhead Publishing, 2017. Woodhead Publishing series in biomaterials. ISBN 978-0-08-100752-5.
- [12] BLACK, Jonathan. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. 2nd ed. New York: Dekker, 1992. ISBN 08-247-8439-1.
- [13] DR. DEEPAK, a M. KALASKAR. *Materials for 3D printing in medicine: metals, polymers, ceramics, hydrogels*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-331-9619-224.
- [14] BASU, Bikramjit a Mitjan KALIN. *Tribology of ceramics and composites: a materials science perspective*. Hoboken, NJ: Wiley, 2011. ISBN 978-1-118-02166-8.
- [15] ARTESHI, Yaser, Ayuob AGHANEJAD, Soodabeh DAVARAN a Yadollah OMIDI. Biocompatible and electroconductive polyaniline-based biomaterials for electrical stimulation. *European Polymer Journal*. 2018, **108**, 150-170. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2018.08.036. ISSN 00143057.
- [16] ONG, Kevin, Min YUN a Joshua WHITE. New biomaterials for orthopedic implants. *Orthopedic Research and Reviews*. 2015, **7**. DOI: 10.2147/ORR.S63437. ISSN 1179-1462.
- [17] THAKUR, Vijay Kumar. *Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-323-48104-5.
- [18] GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. *Nanobiomaterials in soft tissue engineering: applications of nanobiomaterials*. Amsterdam: William Andrew, 2016. Applications of nanobiomaterials, v. 5. ISBN 978-0-323-42865-1.
- [19] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, **14**(3), 88-95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X. ISSN 13697021.
- [20] EBNESAJJAD, Sina. *Handbook of biopolymers and biodegradable plastics: properties, processing and applications*. Waltham, MA: Elsevier/William Andrew, 2013. PDL handbook series. ISBN 978-1-4557-2834-3.

- [21] HENNINK, W.E, S.J DE JONG, G.W BOS, T.F.J VELDHUIS a C.F VAN NOSTRUM. Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, **277**(1-2), 99-104. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.02.002. ISSN 03785173.
- [22] ZHU, Junmin a Roger E MARCHANT. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*. 2011, **8**(5), 607-626. DOI: 10.1586/erd.11.27. ISSN 1743-4440.
- [23] REDDY, Narendra, Roopa REDDY a Qiuran JIANG. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2015, **33**(6), 362-369. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.03.008. ISSN 01677799.
- [24] PAL, Kunal a Indranil BANERJEE. *Polymeric gels: Characterization, properties and biomedical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2018. ISBN 978-0-08-102179-8.
- [25] MISHRA, Munmaya. *BIOMEDICAL POLYMERS and POLYMERIC BIOMATERIALS: Adhesives — Medical Devices and Preparative Medicine*. 1. New York: CRC Press, 2018. ISBN 978-1-4398-9855-0.
- [26] WICHTERLE, O. a D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. 1960, **185**(4706), 117-118. DOI: 10.1038/185117a0. ISSN 0028-0836.
- [27] NAAHIDI, Sheva, Mousa JAFARI, Megan LOGAN, Yujie WANG, Yongfang YUAN, Hojae BAE, Brian DIXON a P. CHEN. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*. 2017, **35**(5), 530-544. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.006. ISSN 07349750.
- [28] STRATTON, Scott, Namdev B. SHELKE, Kazunori HOSHINO, Swetha RUDRAIAH a Sangamesh G. KUMBAR. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*. 2016, **1**(2), 93-108. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001. ISSN 2452199X.

- [29] YUE, Kan, Grissel TRUJILLO-DE SANTIAGO, Mario Moisés ALVAREZ, Ali TAMAYOL, Nasim ANNABI a Ali KHADEMHOSEINI. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015, **73**, 254-271. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045. ISSN 01429612.
- [30] SIVASHANMUGAM, A., R. ARUN KUMAR, M. VISHNU PRIYA, Shantikumar V. NAIR a R. JAYAKUMAR. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2015, **72**, 543-565. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014. ISSN 00143057.
- [31] HOFFMAN, Allan S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, **54**(1), 3-12. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00239-3. ISSN 0169409X.
- [32] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 1. San Diego: Academic Press, 1996. ISBN 01-258-2460-2.
- [33] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008, **49**(8), 1993-2007. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027. ISSN 00323861.
- [34] KUMAR, Ashok. *Supermacroporous cryogels: biomedical and biotechnological applications*. 1. Boca Raton: CRC Press, 2016. ISBN 978-148-2228-816.
- [35] ERTÜRK, Gizem a Bo MATTIASSON. Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1357**, 24-35. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.055. ISSN 00219673.
- [36] LOZINSKY, Vladimir I., Igor Yu. GALAEV, Fatima M. PLIEVA, Irina N. SAVINA, Hans JUNGVID a Bo MATTIASSON. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*. 2003, **21**(10), 445-451. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.08.002. ISSN 01677799.
- [37] MIKHALOVSKY, S.V., I.N. SAVINA, M. DAINIAK, A.E. IVANOV a I.Y. GALAEV. Biomaterials/Cryogels. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, 2011, , 11-22. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00432-3. ISBN 9780080885049.

- [38] PLIEVA, Fatima M., Igor Yu. GALAEV a Bo MATTIASSON. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *Journal of Separation Science*. 2007, **30**(11), 1657-1671. DOI: 10.1002/jssc.200700127. ISSN 16159306.
- [39] PLIEVA, Fatima M., Malin KARLSSON, Maria-Rosa AGUILAR, David GOMEZ, Sergey MIKHALOVSKY a Igor Yu. GALAEV'. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*. 2005, **1**(4). DOI: 10.1039/b510010k. ISSN 1744-683X.
- [40] PLIEVA, Fatima M., Peter EKSTRÖM, Igor Yu. GALAEV a Bo MATTIASSON. Monolithic cryogels with open porous structure and unique double-continuous macroporous networks. *Soft Matter*. 2008, **4**(12). DOI: 10.1039/b804105a. ISSN 1744-683X.
- [41] KARGARZADEH, H., J. HUANG a N. LIN. *Progress in Polymer Science*. 2018, **87**. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2018.07.008. ISSN 00796700.
- [42] LOZINSKY, Vladimir I., Alexander L. ZUBOV a Elena F. TITOVA. Swelling behavior of poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996, **18**(8), 561-569. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00148-4. ISSN 01410229.
- [43] LOZINSKY, V.I. a F.M. PLIEVA. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, **23**(3-4), 227-242. DOI: 10.1016/S0141-0229(98)00036-2. ISSN 01410229.
- [44] DJABOUROV, Madeleine, Katsuyoshi NISHINARI a S. B. ROSS-MURPHY. *Physical gels from biological and synthetic polymers*. New York: Cambridge University Press, 2013. ISBN 978-0-521-76964-8.
- [45] GUN'KO, Vladimir M., Irina N. SAVINA a Sergey V. MIKHALOVSKY. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2013, **187-188**, 1-46. DOI: 10.1016/j.cis.2012.11.001. ISSN 00018686.

- [46] BEN HALIMA, Nihed. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC Advances*. 2016, **6**(46), 39823-39832. DOI: 10.1039/C6RA05742J. ISSN 2046-2069.
- [47] SANTOS, Tiago, Andreia BRITO, Renato BOTO, Pedro SOUSA, Paulo ALMEIDA, Carla CRUZ a Cândida TOMAZ. Influenza DNA vaccine purification using pHEMA cryogel support. *Separation and Purification Technology*. 2018, **206**, 192-198. DOI: 10.1016/j.seppur.2018.06.002. ISSN 13835866.
- [48] HORÁK, D., H. HLÍDKOVÁ, J. HRADIL, M. LAPČÍKOVÁ a M. ŠLOUF. Superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based scaffolds: Preparation and characterization. *Polymer*. 2008, **49**(8), 2046-2054. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.02.041. ISSN 00323861.
- [49] ALKAN, Hüseyin, Nilay BERELI, Zübeyde BAYSAL a Adil DENIZLI. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, **45**(3), 201-208. DOI: 10.1016/j.bej.2009.03.013. ISSN 1369703X.
- [50] TÜKMEN, Deniz, Nevra ÖZTÜK, Sinan AKGÖL a Adil DENIZLI. High Capacity Removal of Mercury(II) Ions by Poly(Hydroxyethyl Methacrylate) Nanoparticles. *Environanotechnology*. Elsevier, 2010, , 23-38. DOI: 10.1016/B978-0-08-054820-3.00002-2. ISBN 9780080548203.
- [51] ZHANG, Hongbin, Fei ZHANG a Juan WU. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze-thaw technique. *Reactive and Functional Polymers*. 2013, **73**(7), 923-928. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.014. ISSN 13815148.
- [52] HU, Xinyu, Yongmei WANG, Liangliang ZHANG a Man XU. Design of a novel polysaccharide-based cryogel using triallyl cyanurate as crosslinker for cell adhesion and proliferation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **126**, 221-228. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.226. ISSN 01418130.

- [53] TAKEI, Takayuki, So DANJO, Shogo SAKOGUCHI, Sadao TANAKA, Takuma YOSHINAGA, Hiroto NISHIMATA a Masahiro YOSHIDA. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018, **125**(4). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.10.015. ISSN 13891723.
- [54] FAN, Meikun, Lin GONG, Yuting HUANG, Dongmei WANG a Zhengjun GONG. Facile preparation of silver nanoparticle decorated chitosan cryogels for point-of-use water disinfection. *Science of The Total Environment*. 2018, **613-614**, 1317-1323. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.256. ISSN 00489697.
- [55] SHARIATINIA, Zahra. Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019, **263**, 131-194. DOI: 10.1016/j.cis.2018.11.008. ISSN 00018686.
- [56] MOHAMMADPOUR, Alemeh, Sareh ARJMAND, Abbas Sahebghadam LOTFI, Hossein TAVANA a Maryam KABIR-SALMANI. Promoting hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a novel laminin-containing gelatin cryogel scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018, **507**(1-4), 15-21. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.121. ISSN 0006291X.
- [57] PANDEY, Gitu, Naresh MITTAPELLY, Anamika PANT et al. Dual functioning microspheres embedded crosslinked gelatin cryogels for therapeutic intervention in osteomyelitis and associated bone loss. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **91**, 105-113. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.06.008. ISSN 09280987.
- [58] HAN, Min-Eui, Byung Jae KANG, Su-Hwan KIM, Hwan D. KIM a Nathaniel S. HWANG. Gelatin-based extracellular matrix cryogels for cartilage tissue engineering. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017, **45**, 421-429. DOI: 10.1016/j.jiec.2016.10.011. ISSN 1226086X.
- [59] KOSHY, Sandeep T., Thomas C. FERRANTE, Sarah A. LEWIN a David J. MOONEY. Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels. *Biomaterials*. 2014, **35**(8), 2477-2487. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.044. ISSN 01429612.
- [60] LICARI, James J. *Coating materials for electronic applications: polymers, processes, reliability, testing*. Norwich, NY: Noyes Publications/William Andrew Publ., 2003. ISBN 08-155-1492-1.

- [61] BALINT, Richard, Nigel J. CASSIDY a Sarah H. CARTMELL. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014, **10**(6), 2341-2353. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015. ISSN 17427061.
- [62] GAJENDIRAN, Mani, Jonghoon CHOI, Se-Jeong KIM, Keongsoo KIM, Heungsoo SHIN, Hyung-Jun KOO a Kyobum KIM. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017, **51**, 12-26. DOI: 10.1016/j.jiec.2017.02.031. ISSN 1226086X.
- [63] CHAKRABORTY, Priyadarshi, Sujoy DAS a Arun K. NANDI. Conducting gels: A chronicle of technological advances. *Progress in Polymer Science*. 2019, **88**, 189-219. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2018.08.004. ISSN 00796700.
- [64] BAGOTŠKIĀ, V., A. SKUNDIN a Yurij VOLFKOVICH. *Electrochemical power sources: batteries, fuel cells, and supercapacitors*. Hoboken, New Jersey, 2015. ISBN 978-1-118-94253-6.
- [65] MÜNSTEDT, H. Properties of polypyrroles treated with base and acid. *Polymer*. 1986, **27**(6), 899-904. DOI: 10.1016/0032-3861(86)90301-0. ISSN 00323861.
- [66] CHEAH, K., M. FORSYTH a V.-T. TRUONG. Ordering and stability in conducting polypyrrole. *Synthetic Metals*. 1998, **94**(2), 215-219. DOI: 10.1016/S0379-6779(98)00006-X. ISSN 03796779.
- [67] RAMANAVIČIUS, A., A. RAMANAVIČIENĖ a A. MALINAUSKAS. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. *Electrochimica Acta*. 2006, **51**(27), 6025-6037. DOI: 10.1016/j.electacta.2005.11.052. ISSN 00134686.
- [68] KUČEKOVÁ, Zdenka. *In vitro testování biologických vlastností polyanilinu*. Zlín, 2014. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Petr Sába.
- [69] SCHWARTZ, Mel M. *Encyclopedia of smart materials*. New York: J. Wiley, 2002. ISBN 04-711-7780-6.
- [70] MATHER, R. R. a R. H. WARDMAN. *The chemistry of textile fibres*. 2nd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. ISBN 978-1-78262-023-5.

- [71] LAI, Jiahui, Yingchun YI, Ping ZHU, Jing SHEN, Kesen WU, Lili ZHANG a Jian LIU. Polyaniline-based glucose biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2016, **782**, 138-153. DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.10.033. ISSN 15726657.
- [72] MAKHLOUF, Abdel Salam Hamdy. *Handbook of smart coatings for materials protection*. Amsterdam: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2014. Woodhead Publishing series in metals and surface engineering, no. 64. ISBN 978-0-85709-688-3.
- [73] TANGUY, Nicolas R., Michael THOMPSON a Ning YAN. A review on advances in application of polyaniline for ammonia detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, **257**, 1044-1064. DOI: 10.1016/j.snb.2017.11.008. ISSN 09254005.
- [74] ADHIKARI, Sarbani a P. BANERJI. Polyaniline composite by in situ polymerization on a swollen PVA gel. *Synthetic Metals*. 2009, **159**(23-24), 2519-2524. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.08.050. ISSN 03796779.
- [75] HATAMZADEH, Maryam, Peyman NAJAFI-MOGHADAM, Ali BARADAR-KHOSHFETRAT a JAYMAND. Novel nanofibrous electrically conductive scaffolds based on poly(ethylene glycol)s-modified polythiophene and poly(ϵ - caprolactone) for tissue engineering applications. *Polymer*. 2016, **107**, 177-190. DOI: 10.1016/j.polymer.2016.11.012. ISSN 00323861.
- [76] DVIR, Tal, Brian P. TIMKO, Mark D. BRIGHAM et al. Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nature Nanotechnology*. 2011, **6**(11), 720-725. DOI: 10.1038/nnano.2011.160. ISSN 1748-3387.
- [77] WU, Yibo, Yong X. CHEN, Jiahan YAN, David QUINN, Ping DONG, Stephen W. SAWYER a Pranav SOMAN. Fabrication of conductive gelatin methacrylate– polyaniline hydrogels. *Acta Biomaterialia*. 2016, **33**, 122-130. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.01.036. ISSN 17427061.
- [78] LI, Wan, Xiaoping ZENG, Hong WANG, Qin WANG a Yajiang YANG. Polyaniline-poly(styrene sulfonate) conducting hydrogels reinforced by supramolecular nanofibers and used as drug carriers with electric-driven release. *European Polymer Journal*. 2015, **66**, 513-519. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.03.020. ISSN 00143057.

- [79] *Materials science and engineering: concepts, methodologies, tools, and applications*. Hershey, PA: Engineering Science Reference, 2017. ISBN 978-152-2517-993.
- [80] SAHINER, Nurettin a Sahiner DEMIRCI. The use of p(4-VP) cryogel as template for in situ preparation of p(An), p(Py), and p(Th) conductive polymer and their potential sensor applications. *Synthetic Metals*. 2017, **227**, 11-20. DOI: 10.1016/j.synthmet.2017.03.003. ISSN 03796779.
- [81] HUMPOLÍČEK, Petr, Katarzyna Anna RADASZKIEWICZ, Zdenka CAPÁKOVÁ et al. Polyaniline cryogels: Biocompatibility of novel conducting macroporous material. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1). DOI: 10.1038/s41598-017-18290-1. ISSN 2045-2322.
- [82] STEJSKAL, Jaroslav, Patrycja BOBER, Miroslava TRCHOVÁ, Adriana KOVALCIK, Jiří HODAN, Jiřina HROMÁDKOVÁ a Jan PROKEŠ. Polyaniline Cryogels Supported with Poly(vinyl alcohol): Soft and Conducting. *Macromolecules*. 2017, **50**(3), 972-978. DOI: 10.1021/acs.macromol.6b02526. ISSN 0024-9297.
- [83] DENG, Zexing, Yi GUO, Peter X. MA a Baolin GUO. Rapid thermal responsive conductive hybrid cryogels with shape memory properties, photothermal properties and pressure dependent conductivity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2018, **526**, 281-294. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.04.093. ISSN 00219797.
- [84] NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™). *Lgcstandards: atcc.org* [online]. b.r. [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1658.aspx?geo_country=cz#characteristics
- [85] SCHASCHKE, Carl. *A dictionary of chemical engineering*. Oxford: Oxford University Press, 2014. Oxford paperback reference. ISBN 978-0-19-965145-0.
- [86] ISO 9277:2010. *Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption — BET method*. Switzerland, 2010.
- [87] LEACH, Richard K. *Fundamental Principles of Engineering Nanometrology*. United States of America: Elsevier, 2010. ISBN 978-0-08-096454-6.

- [88] SCHERLIEß, Regina. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **411**(1-2), 98-105. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.053. ISSN 03785173.
- [89] HUMPOLÍČEK, Petr, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří PACHERNÍK, Jaroslav STEJSKAL, Patrycja BOBER, Zdenka CAPÁKOVÁ a Katarzyna Anna RADASZKIEWICZ. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, **91**. DOI: 10.1016/j.msec.2018.05.037. ISSN 09284931.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PE	Polyethylen
PET	Polyethylentereftalát
PTFE	Polytetrafluorethylen
PU	Polyurethan
POM	Polyoxymethylen
3D	Trojrozměrná síť
Ca ²⁺	Kation vápenatý
Cl ⁻	Chloridový anion
UV	Ultrafialové záření
PVA	Polyvinylalkohol
PHEMA	Poly (2-hydroxyethylmethakrylát)
CS	Chitosan
Arg	Arginin
Gly	Glycin
Asp	Kyselina asparagová
PPy	Polypyrrol
PANI	Polyanilin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
PNIPAM	Poly N-isopropylacrylamid
BET	Brunauer-Emmett-Teller metoda
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Řada bioresorbovatelných implantátů pro použití při léčbě páteře [16].	16
Obrázek 2: Schématické znázornění procesu tkáňového inženýrství, upraveno podle [3].	17
Obrázek 3: Způsoby zesítnění polymerů, (a) kovalentně vázané chemické síťovací činidlo, (b) chemické síťovací činidlo nekovalentně vázané, c) fyzikální zesítnění a (d) enzymatické zesítnění, upraveno podle [23].	19
Obrázek 4: Pórovitost hydrogelů, upraveno podle [28].	21
Obrázek 5: Znázornění syntézy kryogelů, upraveno podle [34].	25
Obrázek 6: Schematické znázornění parametrů ovlivňujících výkon porézních kryogelů, upraveno podle [39].	26
Obrázek 7: Strukturální vzorec polyvinylakoholu [46].	27
Obrázek 8: Strukturální vzorec PHEMA [50].	28
Obrázek 9: Strukturální vzorec chitosanu [55].	29
Obrázek 10: Strukturální vzorce vybraných elektricky vodivých polymerů, upraveno podle [24].	31
Obrázek 11: Chemické přechody při oxidaci / redukci PANI, upraveno podle [69].	34
Obrázek 12: Chronologický vývoj scaffoldů pro tkáňové inženýrství, upraveno podle [76].	37
Obrázek 13: Ukázka morfologie buněčné linie NIH/3T3 [84].	42
Obrázek 14: Oxidace anilinu peroxydisulfátem amonným napolyanilinovou (emeraldinovou) sůl [82].	43
Obrázek 15: Ukázka připraveného vzorku kryogelu.	44
Obrázek 16: Volumetrický sorpční analyzátor BELSORP – mini II.	46
Obrázek 17: Skenovací elektronový mikroskop.	46
Obrázek 18: Adsorpční / desorpční izoterma pro a) kryogel s Tweenem 40, b) čistý kryogel.	50
Obrázek 19: BET graf a naměřené hodnoty pro čistý kryogel, kde V_m je specifický objem adsorbovaného plynu, C je BET konstanta, a_{sBET} je specifický povrch.	51
Obrázek 20: Graf měrného povrchu jednotlivých kryogelů.	52
Obrázek 21: Graf průměrné velikosti pórů jednotlivých kryogelů.	53
Obrázek 22: Struktura kryogelů: a) NaCl zvětšení 500, b) NaCl zvětšení 5000, c) čistý zvětšení 500, d) čistý zvětšení 5000, e) SDBS zvětšení 500, f) SDBS zvětšení 5000.	54

<i>Obrázek 23: Výsledky cytotoxicity kryogelových extraktů.</i>	<i>55</i>
<i>Obrázek 24: Výsledky cytotoxicity kryogelových extraktů.</i>	<i>56</i>
<i>Obrázek 25: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu: a) reference, b) NaCl.....</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 26: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu:a) Igepal CA630, b) Poloxamer 188, c) Brij 96.</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 27: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu:a) Triton X-100, b) Tween 40, c) čistý.....</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 28: Mikrofotografie ze zkoušky přímého kontaktu pro SDBS.</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 29: Fotky z prorůstání buněk scaffoldem a) NaCl, b) Tween 40, c) Poloxamer 188, d) Triton X-100, e) čistý, f) Igepal CA 630, g)Brij 96, h) SDBS.</i>	<i>62</i>

SEZNAM TABULEK**Nenalezena položka seznamu obrázků.**

<i>Tabulka 1: Elektrická vodivost vybraných vodivých polymerů [64].....</i>	<i>32</i>
<i>Tabulka 2: Hodnoty jednotlivých micelárních koncentrací surfaktantů.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 3: Složení jedné dávky roztoku – 50 ml.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabulka 4: Koncentrace extraktu a média.....</i>	<i>48</i>