

Biomimetika

Leona Mahelová

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Leona Mahelová
Osobní číslo: T150114
Studijní program: B2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Polymerní materiály a technologie
Forma studia: prezenční

Téma práce: Biomimetika

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s problematikou přípravy a studia biomimetických materiálů. Na základě získaných informací navrhne a provede sérii experimentů vlivu povrchové topografie na buněčnou fyziologii.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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 bakalářské práce:

Ing. Zdenka Capáková, PhD.

Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce:

2. ledna 2018

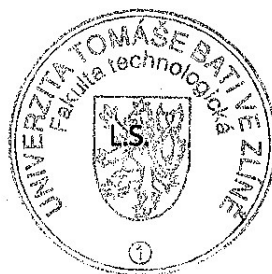
Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 1. března 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: MAHELOVA LEONA.....

Obor: PMT.....

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 obhajoby ¹⁾;
- 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. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít 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 13.5.2018


.....

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 nevydělečně 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 nahlédnutí 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 vzdělávacího 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V předložené bakalářské práci byla věnována hlavní pozornost využití biomimetiky v tkáňovém inženýrství, neboť se u tohoto vědního oboru předpokládá v následujících desetiletích slibný vývoj. Velký potenciál zde mají polymery, a to protože jejich složení a strukturu lze poměrně jednoduše měnit a přizpůsobovat specifickým potřebám, čímž je možné vytvářet kombinace takových vlastností, kterých nelze dosáhnout u jiných materiálů. V praktické části byl posuzován vliv povrchové topografie nanotrubic z TiO_2 a strukturovaného polystyrenu a vliv vodivosti polyanilinu na buněčnou linii myších fibroblastů.

Klíčová slova: Biomimetika, biokompatibilita, scaffold, povrchová topografie, morfologie

ABSTRACT

The main topic of the submitted bachelor thesis was the use of biomimetic in tissue engineering, a promisingly developing field of science. Polymers have a great potential as their composition and structure can be easily modified and adapted to specific needs, thus allows to develop such combinations of properties that can not be achieved with other materials. In the practical part, effects of surface topography of TiO_2 nanotubes and structured polystyrene and effects of conductivity of polyaniline on mouse fibroblasts were assessed.

Keywords: Biomimetic, biocompatibility, scaffold, surface topography, morphology

Zde bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce paní Ing. Zdence Capákové, Ph.D. za poskytnutí cenných rad a trpělivost, zejména při plnění praktické části této práce, a paní Mgr. Petře Rejmontové, Ph.D. za výpomoc v biologických laboratořích. Dále bych chtěla vyjádřit vděčnost mé milující rodině a partnerovi Danilu Gorgol za podporu během studia.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOMATERIÁL A BOKOMPATIBILITA	12
1.1 TESTOVÁNÍ TOXICITY	13
1.1.1 Typy zkoušek na cytotoxicitu <i>in vitro</i>	14
1.1.2 Buněčné kultury pro zkoušky <i>in vitro</i>	15
1.1.3 Bioreaktory a trojrozměrné pěstování buněk <i>in vitro</i>	17
1.1.4 Vyhodnocování zkoušek <i>in vitro</i>	18
1.1.4.1 MTT test	19
1.1.4.2 Průtoková cytometrie	19
1.1.4.3 Fluorescenční mikroskopie	21
2 BIOMIMETIKA	22
2.1 BIOMIMETIKA V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ	24
2.1.1 Aplikace biomimetiky na polymerech v tkáňovém inženýrství	26
3 VLASTNOSTI BIOMATERIÁLŮ OVLIVŇUJÍCÍ INTERAKCI MEZI BUŇKAMI A POVRCHEM	28
3.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ POVRCHU	28
3.2 POVRCHOVÁ ENERGIE, SMÁČIVOST	29
3.3 TOPOGRAFIE A MORFOLOGIE	30
3.4 RIGIDITA	32
3.5 ELEKTRICKÁ VODIVOST	33
4 ÚPRAVA POVRCHŮ BIOMATERIÁLŮ	35
4.1 POLYANILINOVÉ FILMY	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
5 CÍL PRÁCE	39
6 MATERIÁL	40
6.1 TESTOVANÉ POVRCHY	40
6.1.1 Titanová fólie a nanotrubičky z oxidu titaničitého	40
6.1.2 Strukturovaný tkáňový polystyren	41
6.1.3 Polyanilinové filmy	42
6.2 TESTOVANÁ BUNĚČNÁ LINIE	42
6.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	43
6.4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	43

7	METODIKA.....	44
7.1	SYNTÉZA POLYANILINOVÝCH FILMŮ	44
7.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ A BIOREAKTORU	44
7.3	KULTIVACE MYŠÍCH FIBROBLASTŮ.....	44
7.4	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE.....	45
7.5	MTT TEST.....	46
7.6	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	46
8	VÝSLEDKY	47
8.1	VÝSLEDKY <i>IN VITRO</i> ZKOUŠEK NA NANOTRUBICÍCH Z OXIDU TITANIČITÉHO	47
8.2	VÝSLEDKY <i>IN VITRO</i> ZKOUŠEK NA STRUKTUROVANÉM POLYSTYRENU.....	52
8.3	VÝSLEDKY <i>IN VITRO</i> ZKOUŠEK NA POLYANILINOVÝCH FILMECH	55
9	DISKUZE	58
	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	70

ÚVOD

Biomimetika je komplexní a nezávislá vědní disciplína, jíž účelem je využití znalostí biologie pro technologické aplikace, a to zejména pro výrobu zdravotnických prostředků. Nejdůležitějším aspektem každého prostředku, jehož plánovaná aplikace zasahuje do oblasti klinické medicíny či farmacie, je jeho biokompatibilita. Proto byla úvodní část této práce věnována základním pojmům a informacím o biokompatibilitě a toxicitě.

Hlavní pozornost v oblasti biomimetiky byla zaměřena jejímu využití v tkáňovém inženýrství, neboť se u tohoto vědního oboru předpokládá slibný vývoj nejméně v následujících desetiletích. Nově vznikající technologie umožňují výrobu tkáňových scaffoldů s nejrůznějšími biomimetickými vlastnostmi v molekulárním a nanometrickém měřítku. Velký potenciál zde mají právě polymery a to z jednoho prostého důvodu – jejich složení a strukturu lze nenáročně měnit a přizpůsobovat specifickým potřebám, čímž je možné vytvářet kombinace takových vlastností, kterých nelze dosáhnout u jiných materiálů, například vysoká pórovitost, biodegradibilita, elektrická vodivost, různá tvrdost či pružnost.

Posuzování vhodnosti zdravotnických prostředků vždy začíná *in vitro* zkouškami, které jsou v České republice definovány normou ČSN EN ISO 10993-5. Na tento typ zkoušek byla zaměřena nejen teoretická ale i praktická část, v níž byly otestovány tři různé potenciálně biomimetické materiály, přičemž cílem bylo vypořádat vliv povrchové topografie nanotrubic z TiO_2 a strukturovaného polystyrenu a vliv elektrické vodivosti polyanilinu na buněčnou linii myších fibroblastů kultivovaných za dynamických podmínek. Důvod, proč byly vybrány právě tyto materiály, je takový, že na nich myší fibroblasty doposud nebyly kultivovány vůbec nebo byly kultivovány pouze ve statických podmínkách. Dalším důvodem je jejich plánované propojení v navazující diplomové práci, kdy by mohl být polyanilin využit k vytvoření filmu na strukturovaných površích (např. nanotrubičky z TiO_2 či strukturovaný polystyren, ale i jiné), čímž by se zajistil chemicky jednotný vodivý povrch, přičemž by zůstaly zachovány původní různorodé povrchové nanotopografie strukturovaných substrátů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁL A BIOKOMPATIBILITA

Stejně jako mnoho jiných oborů se i oblast biokompatibility snaží shodnout na obecně přijatelných definicích. Tato snaha o shodu však nebyla vždy úspěšná, a proto se dodnes jednotlivé definice v různých zdrojích značně liší.

Biomateriál označuje jakýkoliv materiál určený k interakci s biologickými systémy uvnitř lidského těla nebo na jeho povrchu. Může být nerozložitelný (nedegradabilní) nebo naopak odbouratelný (degradabilní). (Schmalz et al., 2009)

Biokompatibilita popisuje vlastnost materiálu, která vyvolává vhodnou odezvu hostitele, pokud je aplikován podle určení. Biokompatibilní materiál nemusí být zcela inertní, ve skutečnosti je rozhodující vhodnost reakce hostitele. (Schmalz et al., 2009)

Je důležité si uvědomit, že na biokompatibilitu se můžeme dívat dvojím pohledem:

- I) Klasická koncepce biokompatibility diktuje, že biomateriál by měl být vůči živému organismu inertní, tolerovatelný. Biokompatibilita je v takovém případě určena především uvolňováním látek z materiálu rozpouštěním nebo korozí, přičemž tyto látky by neměly poškozovat buňky nebo indukovat zánět stimulací buněčné syntézy určitých proteinů. Proto jsou základní informace o biokompatibilitě získávány z *in vitro* studií na buněčných kulturách. O jednotlivých způsobech testování toxicity bude psáno podrobněji v následující kapitole.
- II) Stále důležitější slovo získává novější a mnohem významnější přístup k biokompatibilitě, kde se sleduje nejen pasivní ale také aktivní cílový vliv biomateriálu na buněčnou fyziologii (například zvýšení přilnavosti buněk k povrchu biomateriálu, podpoření jejich proliferace, migrace či diferenciací). Takové materiály potom nazýváme bioaktivní. Jejich bioaktivita je zajištěna především speciálními povrchovými úpravami ("biofunkcionalizace" povrchů), kterým bude dále věnována pozornost v kapitole: „Úprava povrchů biomateriálů“. Při vývoji a následném hodnocení bioaktivních materiálů je nutno sledovat vliv mnoha různých faktorů, které jsou dány jednak chemickými vlastnostmi biomateriálu (zejména jeho povrchem), jakož i jeho fyzikálními vlastnostmi jako jsou například topografie, rigidita či povrchová energie. (Schmalz et al., 2009) Toto téma bude podrobněji rozebráno v kapitole: „Vlastnosti biomateriálu ovlivňující interakci mezi buňkami a povrchem“.

Z historického hlediska bylo posouzení biokompatibility biomateriálů a zdravotnických prostředků složitým úkolem. Tato složitost vyplývá ze skutečnosti, že tato medicínská zařízení jsou vyráběna z různých materiálů a mají různé zamýšlené klinické aplikace (od stentů, ortopedických implantátů až po kontaktní čočky), přičemž kontakt s tělem se pohybuje od přechodného styku s kůží či jiným typem tkáně a kontaktu s krví až po trvalou implantaci. (Unadkat et al., 2011; Kammula et al., 2001)

Jedním z prvních kroků při výrobě zdravotnického prostředku je výběr vhodných biokompatibilních materiálů. Jedná se o zásadní krok, protože typy testů vyžadované pro hodnocení zařízení závisí na fyzickém a chemickém charakteru jeho materiálů. Uvažované materiály by neměly (buď přímo, nebo prostřednictvím uvolňování svých složek) vyvolávat nepříznivé lokální nebo systémové účinky, být karcinogenní nebo vyvolávat nepříznivé účinky na reprodukci a vývoj. (Kammula et al., 2001)

1.1 Testování toxicity

Toxicita popisuje schopnost materiálu poškozovat biologický systém chemickými prostředky. U vyšších organismů (zvířata, lidské bytosti) rozlišujeme dva druhy toxicity: lokální toxicita, která se vyznačuje tím, že se nežádoucí účinky objevují pouze v místě aplikace a jejím blízkém okolí, a systémová toxicita, při které se objevují nežádoucí účinky v oblasti vzdálené od místa aplikace. (Schmalz et al., 2009)

Pro vyhodnocení rizika toxického poškození tkání v organismu je používáno velké množství různých zkušebních metod, aby se zajistila základní podmínka biokompatibility materiálů před uvedením na trh. Výsledky těchto hodnocení však závisejí nejen na testovaném materiálu, ale také na použité zkušební metodě. (Schmalz et al., 2009) Tato kapitola popisuje pouze nejzákladnější a nejčastěji používané metody hodnocení toxicity materiálů.

Testování biologického chování materiálů začíná s *in vitro* testy většinou založenými na buněčných kulturách, čímž se obecně zabývají obory jako toxikologie či aplikovaná biologie. Tyto testy jsou schopny určit lokální toxicitu způsobenou testovaným materiálem a jeho uvolňovanými složkami. (Kammula et al., 2001)

Pokud tyto experimenty a zkoumání účinnosti materiálu přinesou slibné výsledky, přistoupí se k dlouhodobějším a náročnějším *in vivo* testům. Experimentální zvířata se obvykle používají k určení systémové toxicity. V dnešní době se však čím dál častěji přistu-

puje k jiným alternativním metodám, které jsou ke zvířatům šetrnější, např. limitní test (OECD, 2017), nebo je zcela vynechávají, např. *in silico* metoda¹ (Passini et al., 2017).

Až úplně posledním krokem tohoto procesu jsou klinické studie. Je třeba mít na paměti mimo jiné i to, že počet subjektů, který přichází do styku s daným materiálem, je často vysoký. Tím se podstatně zvyšuje pravděpodobnost toho, že se u některých pacientů mohou odhalit problémy založené na specifické individuální imunitě. Tento problém je řešen zkušebními metodami používanými u jednotlivých pacientů, kupříkladu alergický test. (Schmalz et al., 2009, Hallab, 2017)

1.1.1 Typy zkoušek na cytotoxicitu *in vitro*

Zaměříme-li se dále na hodnocení *in vitro*, lze stanovit cytotoxicitu materiálu různými způsoby, které se dělí do třech základních kategorií – zkouška přímým stykem, nepřímým stykem a zkouška extraktu. Postupy těchto zkoušek jsou definovány normou ČSN EN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* (Praha, ÚNMZ, 2010).

- I) Zkoušku přímým stykem lze aplikovat na materiály různých tvarů, velikostí a v různých fyzikálních stavech, které mohou být bez úpravy aplikovány do přímého kontaktu s buněčnou linií.
- II) Do kategorie zkoušek nepřímým stykem se řadí například zkouška difúzí agarem nebo zkouška difúzí filtrem. Nevýhodou těchto zkoušek je, že umožňují pouze kvalitativní (nikoliv kvantitativní) hodnocení cytotoxicity. (ČSN EN ISO 10993-5)
- III) Pro zkoušku extraktem je vždy prvním krokem příprava extraktu (nebo také eluátu), který se vytváří uchováváním a protřepáváním materiálu za určité teploty po určitou dobu ve vhodném extrakčním činidle. (Schmalz et al., 2009) Extrakční činidlo se volí podle záměru extrakce, upřednostňováno bývá kultivační médium se sérem pro jeho schopnost podporovat růst buněk a zároveň extrahovat polární i nepolární látky. Tep-

¹ *In silico* znamená „spočteno počítačem, zjištěno počítačovou simulací“. Například lidské *in silico* studie na léčiva prokazují vyšší přesnost než modely zvířat pro předvídání klinické proarrhythmické kardiotoxicity. (Passini et al., 2017)

lota extrakce se často volí (37 ± 1) °C, neboť simuluje klinické použití materiálu. Vzniklý extrakt je poté aplikován na buňky. (ČSN EN ISO 10993-5)

Zvláštní pozornost vyžaduje návrh zkoušek pro vyhodnocování potenciální toxicity polymerů. Například při vytváření extraktu z polymerní látky by teplota extrahování neměla překročit teplotu skelného přechodu, aby se zabránilo změně složení extraktu. (ČSN EN ISO 10993-5) Jedná-li se o hodnocení toxicity reakčních vedlejších produktů, zbytkových monomerů a jiných reagujících chemikálií, v takovém případě není vhodné testování přímým stykem s již polymerizovaným materiálem. (Kammula et al., 2001)

1.1.2 Buněčné kultury pro zkoušky *in vitro*

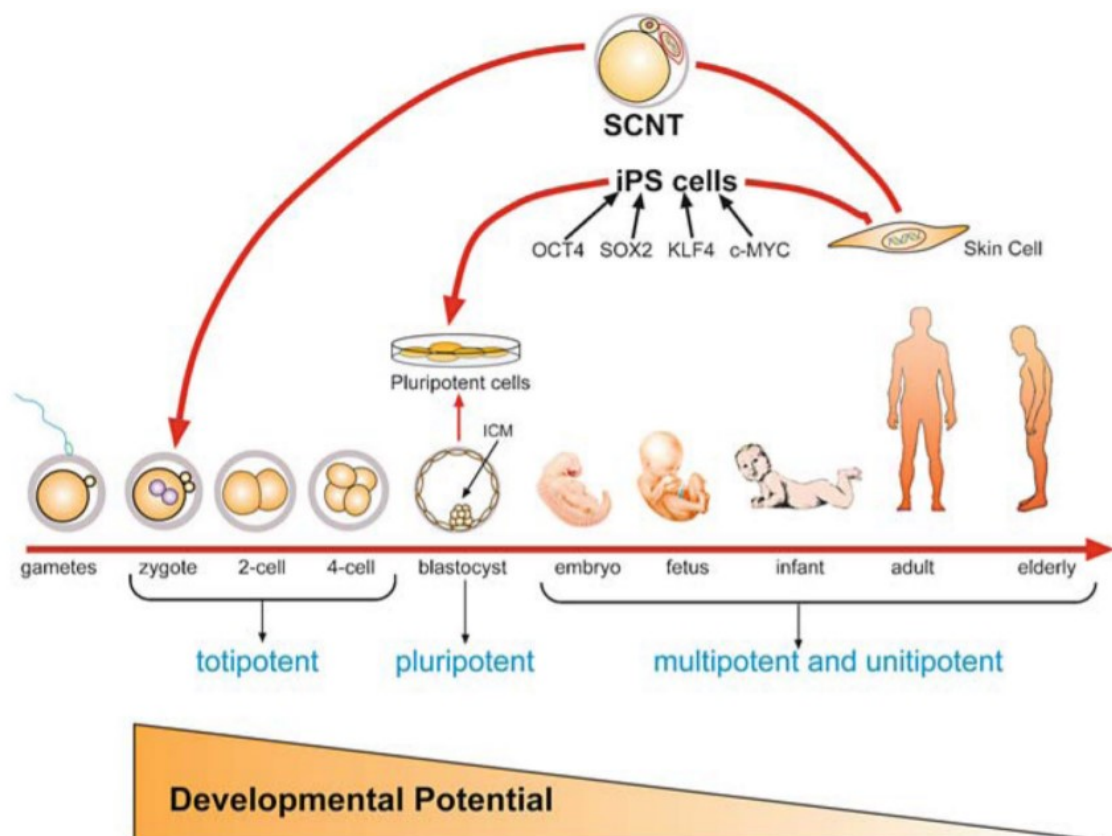
Pro *in vitro* testování biomateriálů se nejčastěji používají buňky izolované ze zvířecích nebo lidských tkání. Čerstvě odebrané diferencované buňky se nazývají primární buňky. (Schmalz et al., 2009) Jejich nevýhodou je smrtelnost, které se předchází takzvanou immortalizací. Ta se provádí například pomocí virových částic (onkogeny) tak, aby si buňky ve výsledku ponechaly charakteristiky původní tkáně, ale přitom je bylo možné udržovat po dlouhou (teoreticky neomezenou) dobu v kultuře. Vznikají tak permanentní buněčné linie. (Schmalz et al., 1999)

In vitro zkoušky lze také aplikovat na buňky, které nejsou diferencované, tedy na buňky kmenové. Ty mohou být dvojího původu - embryonálního (Embryonic Stem Cell, ESC) či adultního (Adult Stem Cell, ASC) a dělí se dle jejich vývojového potenciálu:

- Totipotentní buňky mají schopnost produkovat všechny diferencované buňky v organismu. Tudíž každá jedna totipotentní buňka může dát za vznik celému organismu. Buňky jsou totipotentní pouze v časném embryonálním vývoji – v zygote a následujících čtyřech blastomerech (obr. č. 1).
- Pluripotentní buňky mají potenciál diferencovat se na kteroukoliv ze tří zárodečných vrstev: endoderm, mezoderm či ektoderm. Na rozdíl od totipotentní buňky jediná pluripotentní buňka se nemůže rozvinout do fetálního nebo dospělého jedince.

- Multipotentní a unipotentní (progenitorové) buňky jsou schopné diferencovat se do omezeného počtu buněčných typů. Tato skupina skupiny zahrnuje veškeré dospělé somatické kmenové buňky, např. mezenchymální kmenové buňky (MSC).

Na obrázku 1 lze vidět, jak s vývojem embrya klesá potenciál kmenových buněk od totipotence, přes pluripotenci, multipotenci, unipotenci až k terminálně diferencovaným somatickým buňkám. Vývojový potenciál somatických buněk však může být různými způsoby obnoven, například přenosem jader somatických buněk (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT) či přímým přeprogramováním pomocí genetických manipulací za vzniku takzvaných indukovaných pluripotentních kmenových buněk (induced Pluripotent Stem Cells, iPSC). (Mitalipov et al., 2009)

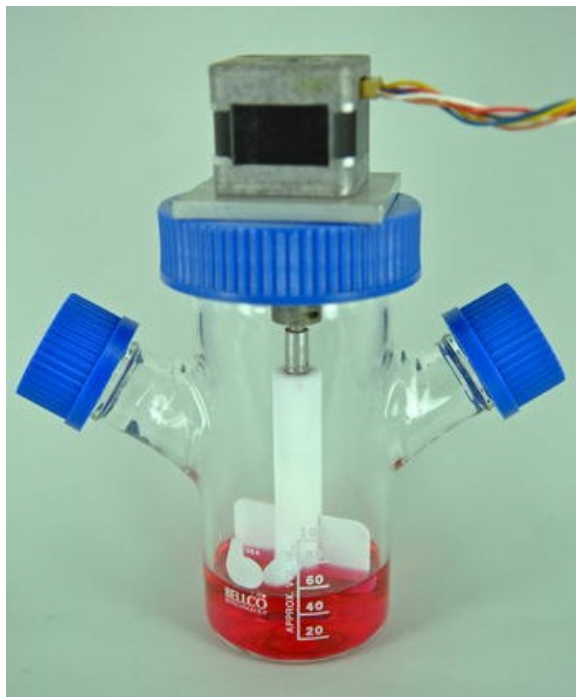


Obr. 1: Schématické zobrazení poklesu vývojového potenciálu kmenových buněk zakončený terminálně diferencovanými somatickými buňkami, jejichž vývojový potenciál lze obnovit do totipotentního stavu (pomocí SCNT) nebo pluripotentního stavu (přímým přeprogramováním). (Mitalipov et al., 2009)

1.1.3 Bioreaktory a trojrozměrné pěstování buněk *in vitro*

Bioreaktory jsou nezbytné především v tkáňovém inženýrství, neboť poskytují dynamické *in vitro* prostředí napodobující *in vivo* podmínky pro růst tkáňových substituentů a navíc také umožňují systematické studium reakcí živých tkání na různé mechanické a biochemické podněty. Za nejdůležitější mechanický podnět působící na buňky v bioreaktorech se považuje fluidní dynamické napětí vyvolané tekutinou proudící přes povrch konstrukce a do porézního prostoru. Mechanická komprese a tlak cyklické hydrostatické tekutiny jsou důležitými regulátory fyziologie buněk. Specifické mechanické zatížení, které bioreaktor přináší, může nejen usnadnit tvorbu tkání, ale také řídit diferenciaci multipotentních kmenových buněk. (Chen et al., 2006)

Jednou z nejstarších a nejrozšířenějších reaktorových systémů je míchaná baňka („spinner flask“, obr. 2). (Gupta et al., 2016) Uvnitř tohoto bioreaktoru vzniká turbulentní tok tekutiny, což zajišťuje dobře promíchané prostředí v okolí buněk a minimalizuje stagnující buněčnou vrstvu na konstrukčním povrchu, avšak nemusí být optimální například při konstrukci chrupavkových tkání, kdy zvýšené napětí související s turbulentním tokem způsobuje tvorbu vnější vláknité kapsle. (Chen et al., 2006)



Obr. 2: Míchaná baňka („spinner flask“) s vnitřním rotorem připojeným ke krokovému motoru. (Gupta et al., 2016)

Proto byly vyvinuty různé bioreaktory s nízkým fluidním namáháním buněk, z nichž nejvíce využívaným (a taktéž i pro účely této bakalářské práce použitým) je rotující stěnový bioreaktor („rotating wall vessel“, obr. 3), který je konfigurován jako válcový nebo prstencový prostor se silikonovou membránou, zajišťující výměnu plynů s prostředím inkubátoru.



Obr. 3: Čtyř-komorový rotující stěnový bioreaktor.
(zdroj fotografie vlastní)

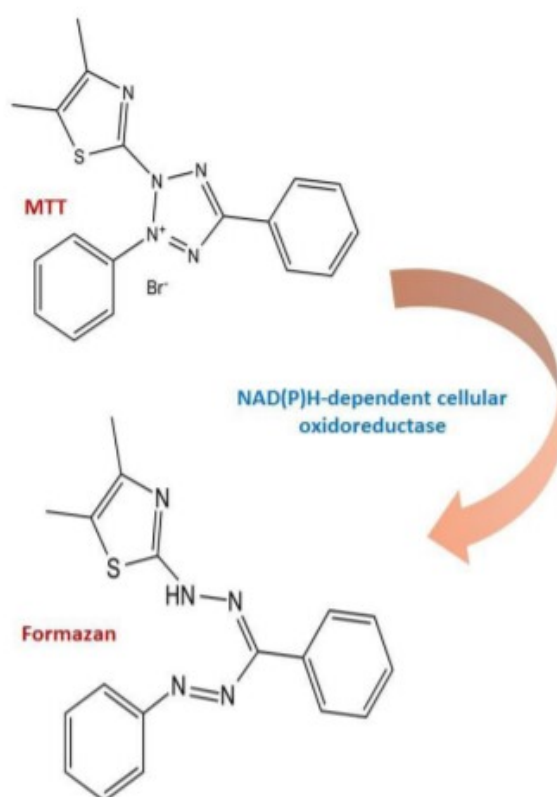
Mezi další bioreaktory často využívané v tkáňovém inženýrství patří například bioreaktor s perfúzním systémem (vhodný pro kultivaci v 3D porézních strukturách) či pulzující průtokový reaktor (simulující kardiovaskulární podmínky). (Chen et al., 2006)

1.1.4 Vyhodnocování zkoušek *in vitro*

Vybrané buněčné kultury jsou tedy podrobeny navržené zkoušce *in vitro*, přičemž inkubace s testovanými materiály či jejich extrakty může probíhat buďto ve statických nebo v dynamických podmínkách. Po určité době inkubace je nutné změny na buňkách kvantifikovat a kvalifikovat.

1.1.4.1 MTT test

Jednou z nejčastěji používaných metod na kvantifikaci buněk je kolorimetrický tzv. MTT test. (Schmalz et al., 2009) MTT je žlutý, ve vodě rozpustný 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, jenž je mitochondriálními enzymy v životaschopných buňkách redukován na nerozpustný formazan (obr. 4). (ČSN EN ISO 10993-5) Po rozpuštění v dimethylsulfoxidu (DMSO) získá formazan modrofialovou barvu s charakteristickou absorpcí při 570 nm. Intenzita zabarvení roztoku se měří fotometricky a je přímo úměrná počtu životaschopných buněk. (Bahuguna et al., 2017)

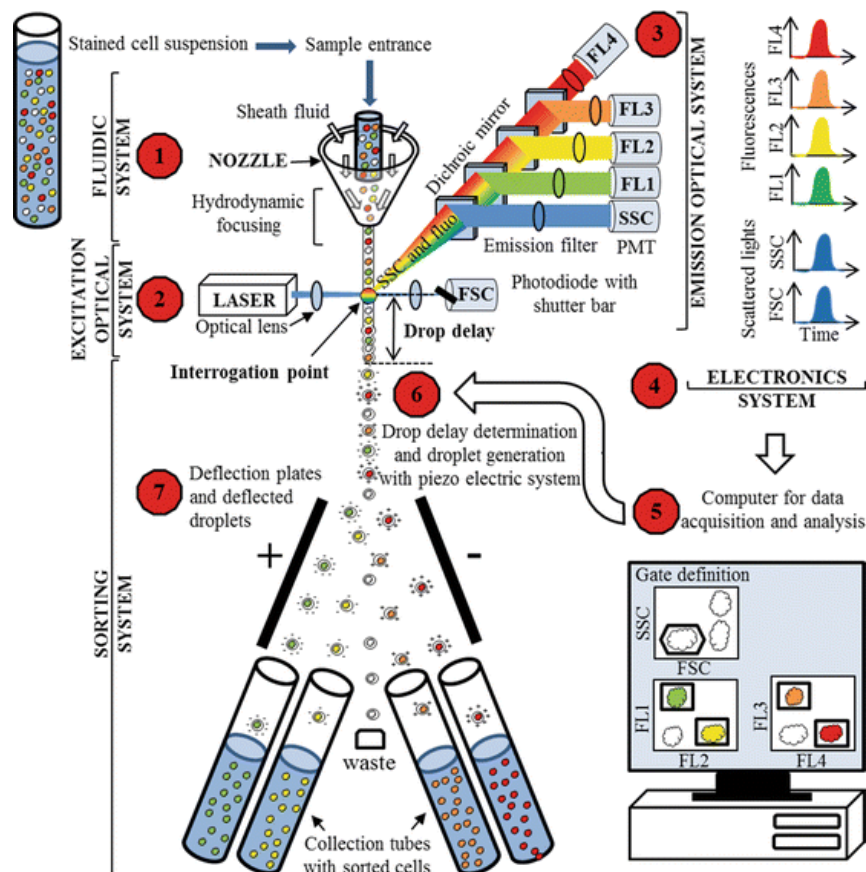


Obr. 4: Chemický vzorec MTT (nahore) a formazanu (dole).
(Bahuguna et al., 2017)

1.1.4.2 Průtoková cytometrie

Průtokový cytometr je přístroj, který je schopný buňky nejen kvantifikovat, ale i částečně kvalifikovat, neboť dokáže změřit kromě počtu buněk také některé fyzikální charakteristiky, kupříkladu velikost buněk či jejich granularitu. Výsledkem je poměrně detailní analýza buněčných kultur a to v krátkém časovém úseku. (Adan et al., 2017)

Systém průtokového cytometru je možné rozdělit do tří částí. První částí je fluidní systém zajišťující hydrodynamické zaostřování. V tomto místě jsou buňky, pro vyšší přesnost navíc obarvené fluorescenčními barvivy, v suspenzi nasávány do tenké kapiláry (obr. 5, část 1). Druhou částí je excitační a emisní optický systém. Buňky prochází jedna po druhé přes laserový paprsek, který je kombinací difúze, odrazu a refrakce rozptýlen do všech směrů. Rozptyl světla v malých úhlech se detekuje v ose laserového paprsku (obr. 5, část 2). Rozptyl světla ve velkých úhlech a fluorescenční světla jsou filtrována pomocí dichroických zrcadel a odpovídajících emisních filtrů (obr. 5, část 3). Třetí částí je elektronický systém, který provádí analýzu pomocí specifického počítačového softwaru. (obr. 5, část 4 a 5). Speciální průtokové cytometry, takzvané sortery, obsahují navíc buněčné třídiče fungující na základě elektrického pole mezi dvěma vychylovacími deskami (obr. 5, část 6 a 7), které nabízejí možnost izolovat subpopulace buněk. (Picot et al., 2012)



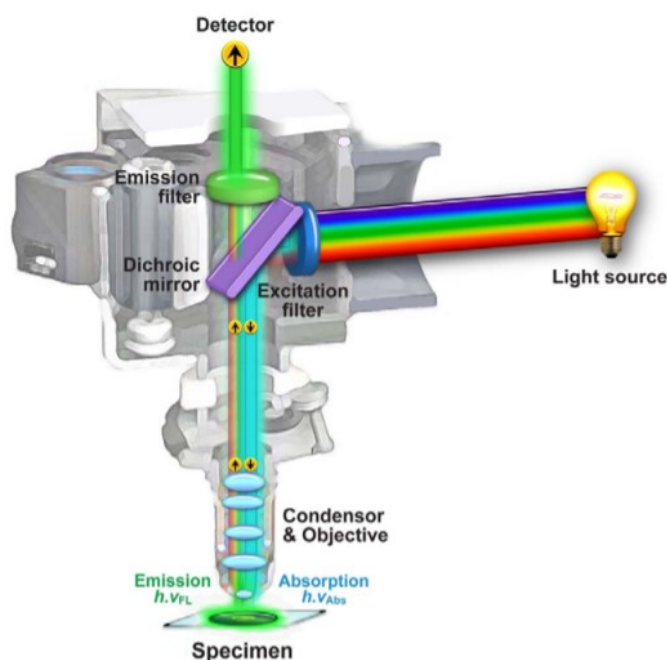
Obr. 5: Schéma výše popsaného principu průtokového cytometru. (Picot et al., 2012)

1.1.4.3 Fluorescenční mikroskopie

K podrobnější kvalifikaci změn, které mohly buňky po provedení zkoušek *in vitro* postihnout, se velmi často používá fluorescenční mikroskop.

Fluorescence je jev, ke kterému dochází po absorpci kvanta excitačního světla, jež způsobí přeskok elektronu na hladinu o vyšší energii. Když se elektron vrací zpět na svoji původní energetickou hladinu, zbývající energii vyzařuje ve formě fotonu s delší vlnovou délkou. (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012)

S prvními fluorescenční mikroskopy (z počátku 20. století) bylo možné pozorovat pouze autofluorescenční biologické vzorky. Zhruba o 20 let později se začala využívat technika sekundární fluorescence, což znamená, že vzorky byly předem systematicky barveny fluorescenčními barvivy pro lepší viditelnost. Pro ještě výraznější fluorescenci přispělo zavedení laseru, jehož monochromatický, koherentní paprsek je schopný vyvinout mnohem větší excitační sílu než jiné zdroje světla. Použitím různých filtrů a dichroických zrcadel (obr. 6) lze následně selektovat jednotlivé signály, tedy oddělovat průchod světla o určitých vlnových délkách. (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012)



Obr. 6: Tok paprsků ve zjednodušeném schématu fluorescenčního mikroskopu s dichroickým zrcadlem. (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012)

2 BIOMIMETIKA

Důležitým předchůdcem biomimetiky byla bionika, definovaná jako věda systémů, které mají nějakou funkci okopírovanou z přírody, nebo které mají charakteristiky přirozených systémů anebo jejich analogů. Specializovaným vědcům, kteří se v rámci bioniky věnovali více biologickému výzkumu nežli technické aplikaci, pojem bionika nestačila, a proto vznikla biomimetika. Toto slovo se poprvé objevilo ve Websterově slovníku v roce 1974, doplněné o následující definici:

Biomimetika – studium formace, struktury nebo funkce biologicky vyrobených látek a materiálů (jako enzymy nebo hedvábí) a biologických mechanismů a procesů (jako syntéza proteinů nebo fotosyntéza), zejména za účelem produkce podobných výrobků pomocí umělých mechanismů, které napodobují mechanismy přírodní. (Harkness, 2001; Vincent et al., 2006)

Biomimetika má dnes velké množství synonym: biomimeze, biomimikry, biognóza, tzv. biologicky inspirovaný design a další podobné fráze, které zjednodušeně znamenají kopírování, adaptaci nebo odvození z biologie. Biomimetika je tedy studium zahrnující praktické využití mechanismů a funkcí biologické vědy v inženýrství, designu, chemii, elektronice a dalších oblastech. Lidé se prakticky věnovali biomimetice již před více než 3000 lety, když se například Číňané pokoušeli vyrobit umělé hedvábí nebo když Leonardo da Vinci studoval létání ptáků pro design některých jeho strojů. (Vincent et al., 2006) Následující seznam zobrazuje pouze zlomek skutečného dopadu a využití biomimetiky:

- Létající kluzák, který vytvořil Ignaz „Igo“ Etrich v roce 1904, byl inspirován semeny *Alsomitra macrocarpa*, jejichž výrůstky fungují jako křídla a díky nim mohou klouzat po velkých vzdálenostech.
- Velcro (tzv. „suchý zip“) je vynález, který se odvíjí od semen lopuchovitých rostlin, které se zachytily na kabátě George de Mestral a na jeho psovi. (Vincent et al., 2006)
- Pozorování, že listy lotosu jsou vždy čisté, i když rostou v bahnitě vodě, vedlo k výrobě Lotusanu, barvy pro samočisticí plochy. (Barthlott et al., 1997)

- Antireflexní povrchy byly objeveny na hmyzích očích (Parker et al., 1998) a na křídlech (Stoddart et al., 2006). Umělá analogie těchto povrchů se nyní využívá na solárních panelech, což vede až k 10 % zlepšení snímání světla. (Vincent et al., 2006)
- Suchá lepicí páska byla inspirována mechanismem na nožičkách gekona obrovského. Ten je založen na vzniku van der Waalsových sil v důsledku místní povrchové topografie, není tedy ovlivněn povrchovou chemií (obr. 7). (Autumn et al., 2001)
- Víry způsobené šupinami na kůži žraloka výrazně snižují tření. Toho je využíváno na trupech plachetnic nebo na vnitřním povrchu trubek určených pro vedení kapalin. (Bechert et al., 2000)
- Křídla některých ptáků (káně, sup, orel) mají dělené konce, což snižuje odpor vzduchu při letu (Tucker, 1993), to je přenášeno na křídla letadel a na podvodní vrtule.
- Mnoho architektů používá jako inspiraci biologii. Například Frei Otto vytváří efektivní lehké konstrukce, které jsou přímo inspirovány stavbou pavučin. (Vincent et al., 2006)



Obr. 7: Gekon obrovský (*Gekko gecko*) přilnutý k hladkému hydrofóbnímu GaAs polovodiči. Silná přilnavost mezi hydrofóbním povrchem prstů gekona a hydrofóbním povrchem GaAs demonstruje, že mechanismem adheze jsou van der Waalsovy síly. (Autumn et al., 2001)

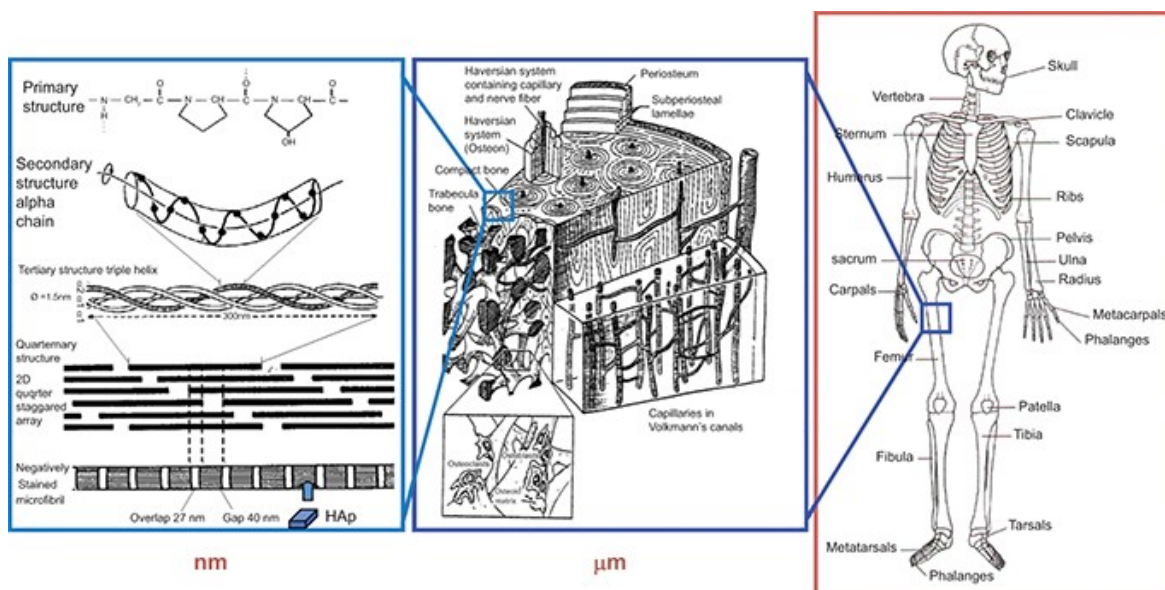
2.1 Biomimetika v tkáňovém inženýrství

V literatuře se můžeme setkat s různými definicemi tkáňového inženýrství, všechny ale ve své podstatě znamenají to stejné:

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární a multidisciplinární obor, který se zaměřuje na vývoj biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci tkání (Ma, 2008). Jinými slovy je to věda o designu a výrobě nových tkání pro funkční obnovu tkání a orgánů v živém organismu. (Schmalz et al., 2009)

Biomateriály mají klíčovou úlohu v tkáňovém inženýrství a regenerační medicíně jako trojrozměrné lešení (tzv. „scaffoldy“) pro signalizační molekuly nebo buňky a také jako syntetické extracelulární matricové prostředí pro regeneraci tkání, podporující přichycení buněk, jejich proliferaci, diferenciaci a tedy vznik nových tkání. Chemické složení, fyzikální struktura a biologicky funkční části jsou proto důležitými atributy biomateriálů pro tkáňové inženýrství. (Ma, 2008, Schmalz et al., 2009)

Biomimetika se v této oblasti uplatňuje právě při navrhování takových scaffoldů, u kterých je vyžadováno, aby aktivně působily na buňky v těle organismu, se kterými přijdou do kontaktu. Je vhodné upravit výrobu scaffoldů podle již nabytých znalostí v oblasti tkáňových struktur, mechanismů a principů. (Ma, 2008) Jelikož se ale u mnoha tkání jedná o složitý hierarchický systém, je nutné jej napodobit na různých rozměrových úrovních – od nanometrů přes mikrometry, milimetry až centimetry. Výsledné scaffoldy by měly odpovídat plánované tkáni na co nejvíce úrovních, neboť právě tato podobnost bude určovat, jak dobře bude fungovat při plnění konfliktních požadavků na bioaktivitu či jiných potřeb, např. propustnosti, difúze. Příkladem takového biologického hierarchického systému může být kost (obr. 8). V případě kostní hmoty je nutné se zaměřit jednak na charakteristiky nano-měřítko (např. typ kolagenu, zesílení, hydroxyapatitová (HAp) stechiometrie), dále na póry v mikro-měřítku, které pomáhají při migraci buněk a vzniku krevních cév v tkáni, ale také na specifickou organizaci v oblasti makro-měřítko (např. osteony, osteoidy a Haversiánské kanály), jež poskytuje mechanickou anizotropii dlouhých kostí (Tamaddon et al., 2013)



Obr. 8: Příklad přírodního hierarchického systému – kost. (Tamaddon et al., 2013)

Pro funkčnost scaffoldů je nutné co nejblíží napodobení vhodných vlastností přirozené extracelulární matrix (ECM) na různých úrovních, nicméně je zbytečné a nepraktické její úplné duplikování. Z pohledu tkáňového inženýrství nemusí být přirozená ECM ve skutečnosti ideálním scaffoldem, neboť je účelem této vědní oblasti zajistit urychlený proces regenerace ve srovnání s přirozeným vývojovým programem. Zralé tkáňové matrici často chybí propojené makro- nebo mikro-porézní struktury, které umožňují rychlou proliferaci a vznik jednotné buněčné populace. Proto jsou pro optimální aplikace v tkáňovém inženýrství nezbytné určité uměle vytvořené vlastnosti scaffoldů jako je právě porozita, mezipórová konektivita a další. Navíc při použití přirozené ECM existují obavy z možného odmítnutí imunitním systémem a přenosu patogenů. (Ma, 2008)

K plnění těchto rozmanitých potřeb tkáňového inženýrství na tvorbu scaffoldů byly zkoumány různé materiály. Budeme-li se nyní věnovat pouze těm majoritním, první volbou pro lékařské implantáty byly vždy kovy, které mají vynikající mechanické vlastnosti (Catledge et al., 2004), jsou však nevhodné pro syntézu degradabilních scaffoldů, právě kvůli jejich nedostatečné rozložitelnosti v biologickém prostředí (Liu et al., 2004). Některé anorganické/keramické materiály, jako je hydroxyapatit (HAp) nebo fosforečnany vápníku, které mají dobrou osteokonduktivitu², jsou také ve své využitelnosti omezeny kvůli vysoké

² Co se týče regenerace kostí, termín **osteokondukční** materiál se používá pro materiály sloužící jako scaffold pro zvětšení preosteoblastů, zatímco **osteoindukční** materiály indukují tvorbu nové kosti diferenciací pluripotentních lokálních buněk pojivové tkáně do buněk tvořících kost. (Schmalz et al., 2009)

křehkosti a špatné zpracovatelnosti ve vysoce porézní struktury. Naproti tomu mají **polymery** velkou flexibilitu konstrukce, protože složení a struktura mohou být přizpůsobeny specifickým potřebám (např. pórovitost, mechanické vlastnosti, biodegradabilita, elektrická vodivost), a proto byly rozsáhle studovány v různých aplikacích tkáňového inženýrství. (Ma, 2008, Liu et al., 2004)

2.1.1 Aplikace biomimetiky na polymerech v tkáňovém inženýrství

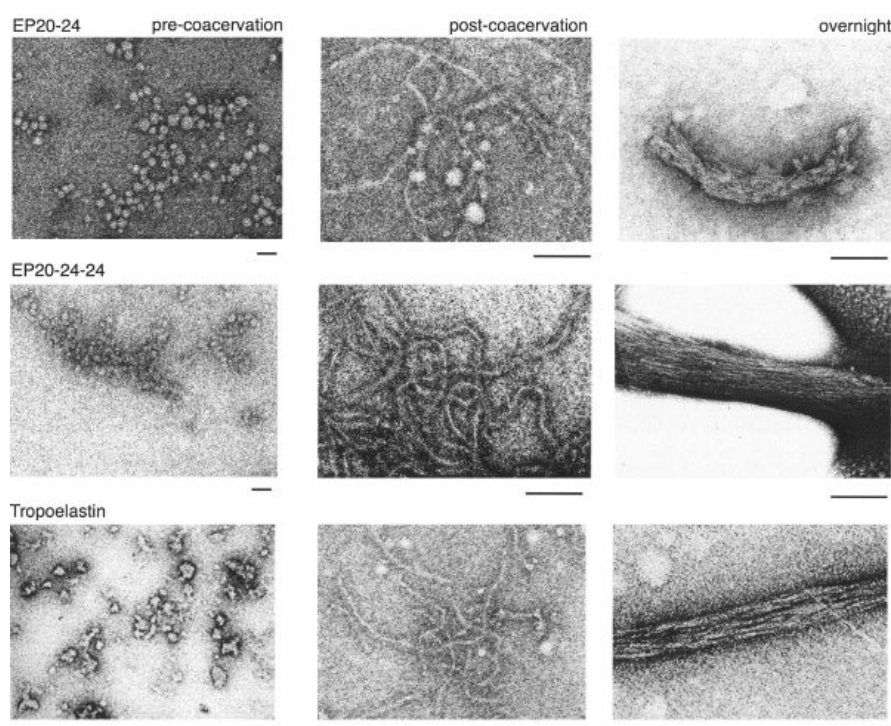
Pro výrobu polymerních scaffoldů se nejčastěji používají lineární alifatické polyestery, jako je kyselina polylactonová (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a jejich kopolymery (PLGA). Tyto polymery jsou využívány především pro jejich biokompatibilitu a výbornou biologickou rozložitelnost. Naproti tomu polyethylenglykol (PEG) nemá potřebnou biodegradabilitu, ale je to biokompatibilní hydrogelový materiál, který má podobné mechanické vlastnosti jako některé měkké tkáně. (Ma, 2008)

Chybějící biodegradabilitu mu lze poskytnout mimo jiné biomimetickou cestou, jejíž předlohou je rozložitelnost kolagenu enzymem kolagenasou. Tento biologický postup se v tkáňovém inženýrství napodobuje syntézou BAB blokových kopolymerů na bázi PEG (blok A) s krátkými oligopeptidy (blok B), které slouží jako štěpné sekvence pro buněčně sekretované specifické enzymy, např. matricové metaloproteasy (MMPs). Takovéto kopolymery zakončené na obou koncích reaktivními skupinami se polymerují za vzniku zesíťovaných degradabilních hydrogelů. (West et al., 1999)

Mnoho tkání, jako jsou srdeční chlopně nebo krevní cévy, mají významné elastomerní vlastnosti. Polymerní scaffold pro tyto tkáně se vytváří jednak z elastických materiálů pocházejících z ECM, ale také ze syntetických polymerů, například poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL), který je vysoce elastický při pokojové i tělesné teplotě, neboť má teplotu skelného přechodu okolo $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nevýhodou PCL je ale příliš pomalá degradace. Dalším využívaným polymerem v cévním a jiném tkáňovém inženýrství je segmentovaný polyuretan (PU)³. Vlivem strukturálních rozdílů jsou zajištěny vhodné mechanické vlastnosti včetně elasticity. Hlavním omezením PU pro biomedicínské aplikace je zapojení více či méně toxických prekurzorů (diisokyanátů) do syntézy. (Petrović et al., 1998, Ma, 2008)

³ Segmentovaný polyuretan (PU) je blokový kopolymer se střídajícími se měkkými a tvrdými bloky. Měkké bloky jsou tvořeny polyoly a zajišťují elasticitu. Tvrdé bloky sestávají z diisokyanátů a krátkých diolů („chain extenders“), kde se vytváří příčné fyzikální vazby. (Petrović et al., 1998)

Kromě použití stávajících polymerních technologií existují také biomimetické přístupy k vývoji elastomerních materiálů. Zkoumanou biologickou předlohou je v tomto případě tropoelastin, rozpustný prekurzor elastinu (nerozpustného elastického proteinu ECM). Tropoelastin se skládá ze střídajících se hydrofobních a hydrofilních peptidových oblastí, které jsou schopné koacervace - vzniku nerozpustných agregátů při zvýšené teplotě. Těchto a dalších poznatků využil Dan Urry pro syntézu polypeptidů podobných elastinu (ELP) využívaných pro tvorbu termoreverzibilních hydrogelů a jiné aplikace v oblasti tkáňového inženýrství (obr. 9). (Bellingham et al., 2003)



Obr. 9: Srovnání struktur dvou ELP (EP20-24 a EP20-24-24) a tropoelastinu před koacervací, 10 min po koacervaci a po inkubaci přes noc při koacervační teplotě. Syntetizované struktury jsou velmi podobné strukturám tvořeným tropoelastinem (obzvláště EP20-24-24, struktury EP20-24 jsou po inkubaci méně kompaktní a organizované). Všechna měřítka představují 100 nm. (Bellingham et al., 2003)

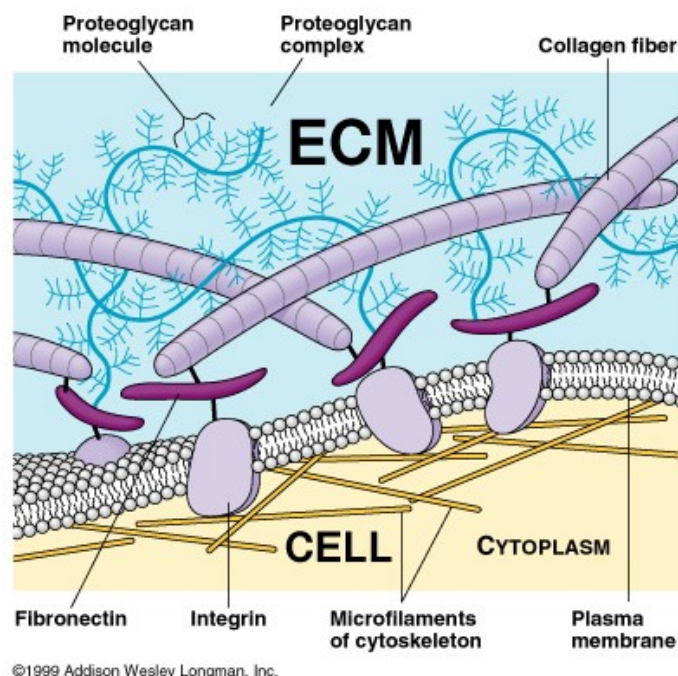
Pro polymerní materiály využívané v tkáňovém inženýrství je jednoznačně důležitá jejich chemická struktura a s ní související toxicita a biokompatibilita, samozřejmě také fyzické a mechanické vlastnosti materiálu, které mohou být velice různorodé a specifické dle požadované aplikace. Změny těchto vlastností mohou mít významné a dalekosáhlé dopady při použití v biomedicínské oblasti. Jedním z nejdůležitějších dopadů je vliv na interakci mezi buňkami a povrchem biomateriálu, jemuž bude věnována následující kapitola.

3 VLASTNOSTI BIOMATERIÁLŮ OVLIVŇUJÍCÍ INTERAKCI MEZI BUŇKAMI A POVRCHEM

Jak již bylo výše zmíněno, biomateriály se využívají pro širokou řadu klinických aplikací. Je nutné si uvědomit, že interakce jakéhokoliv biomateriálu s biologickými tekutinami, buňkami, tkáněmi nebo imunitním systémem začíná vždy na povrchu materiálu. Často tato interakce není optimální a vlastností, které ji ovlivňují, je opravdu mnoho. (Kulkarni et al., 2017; Unadkat et al., 2011)

3.1 Chemické složení povrchu

Funkce buněk je regulována primárně extracelulárními podněty, včetně rozpustných a adhezivních faktorů, které se vážou na receptory buněčného povrchu. (Fu et al., 2010) Buňky jsou v jejich přirozeném prostředí zakotveny vazbami na **adhezivní proteiny** v ECM (především fibronektin a vitronektin). Vazby mezi buňkami a těmito proteiny jsou zajišťovány prostřednictvím integrinů – receptorů v buněčné membráně (obr. 10). (Wilson et al., 2005)



Obr. 10: Schéma zakotvení buněk v jejich přirozeném prostředí. (Imbeau, online)

Nápodobně je buněčné připojení na kultivační povrchy *in vitro* zpravidla zprostředkováno adhezivními bílkovinami obsaženými v kultivačním médiu se sérem⁴. (Curtis et al., 1983) Adheze buněk *in vitro* závisí primárně na množství fibronektinu a vitronektinu, respektive na schopnosti materiálu adsorbovat na povrch tyto proteiny (v aktivním stavu) ze séra. (Wilson et al., 2005) Na povrch materiálu nebo na již adsorbované proteiny se mohou vázat také další složky, např. růstové faktory a jiné signalizační molekuly, které mohou přispívat k proliferaci buněk anebo jejich diferenciaci. (Wilson et al., 2005)

V oblasti tkáňového inženýrství se osvědčily polymery jako náhrada za sklo. Již od roku 1965 se nejhojněji využívá polystyren (PS). Ten je ve svém přirozeném stavu nepolární a pro kultivační účely je nutná modifikace jeho povrchu. (Curtis et al., 1983) Modifikace lze provádět různými způsoby, o nichž bude psáno v následující kapitole: „Úprava povrchů biomateriálů“, nicméně komerčně nejběžnější jsou úpravy vzdušnou plazmou nebo korónovým výbojem, přičemž pozitivní vliv na adhezi proteinů a buněk se připisuje vzniklým karboxylovým skupinám. (Ramsey et al., 1984) V jiné studii však prokázali, že majoritní vliv na finální adhezi buněk mají hydroxylové skupiny, nikoliv karboxylové. (Curtis et al., 1983) Každopádně závěr této tematiky je takový, že oxidovaný PS adsorbuje více adhezivních proteinů ze séra a lépe zachovává jejich bioaktivitu než neošetřený PS, což se odráží vyšším počtem přilnutých buněk. (Wilson et al., 2005)

3.2 Povrchová energie, smáčivost

Jak již bylo výše zmíněno, pro bioaktivitu biomateriálů je důležitá povrchová adsorpce adhezivních proteinů. Přilnavost proteinů je ovlivněna nejen chemickými vlastnostmi materiálu, ale taktéž jeho fyzikálními vlastnostmi – např. povrchovou energií a smáčivostí. (Schmalz et al., 2009)

Povrchová energie a smáčivost jsou základem biomedicínských povrchových věd, neboť vedou k biologické odezvě projevující se specifickými mezifázovými jevy, jako právě zmiňovaná adsorpce proteinů na materiál, dále buněčná adheze či spouštění biologických kaskád, např. koagulace krve. Naměřené hodnoty povrchové energie, či povrchového napětí korelují s hodnotami tzv. smáčecího úhlu – úhlu styku kapky vody s pevným

⁴ K buněčné adhezi může dojít i bez přítomnosti bílkovin v séru, v takovém případě se jedná o nefyziologická rozhraní. Tyto interakce však nejsou žádané, neboť se projevují sníženou buněčnou aktivitou a mohou přispívat ke smrti buněk. (Wilson et al., 2005)

povrchem, jenž charakterizuje smáčivost. Jsou-li smáčecí úhly větší než 65° , hovoříme o hydrofobních površích; jsou-li smáčecí úhly naopak menší než 65° , jedná se o hydrofilní povrchy.

Hydrofobní povrchy podporují adsorpci proteinů (a různých povrchově aktivních činidel) z vody na povrch. Adsorpce je řízena redukcí povrchové energie, přičemž souběžně dochází k nahrazení molekul vody na povrchu adhezivním proteinem (tzv. povrchová dehydratace). Hydrofilní povrchy nepodporují adsorpci tímto mechanismem, neboť je energeticky nepříznivý, lze však předpokládat, že k adsorpci dochází způsobem alternativním. (Vogler, 1998) Například čisté náboje na hydrofilních površích jsou schopny vázat adhezivní proteiny vlivem elektrostatických interakcí. Pozitivita či negativita náboje pak může ovlivnit selektivitu a orientaci navázaných bílkovin. (Wilson et al., 2005)

3.3 Topografie a morfologie

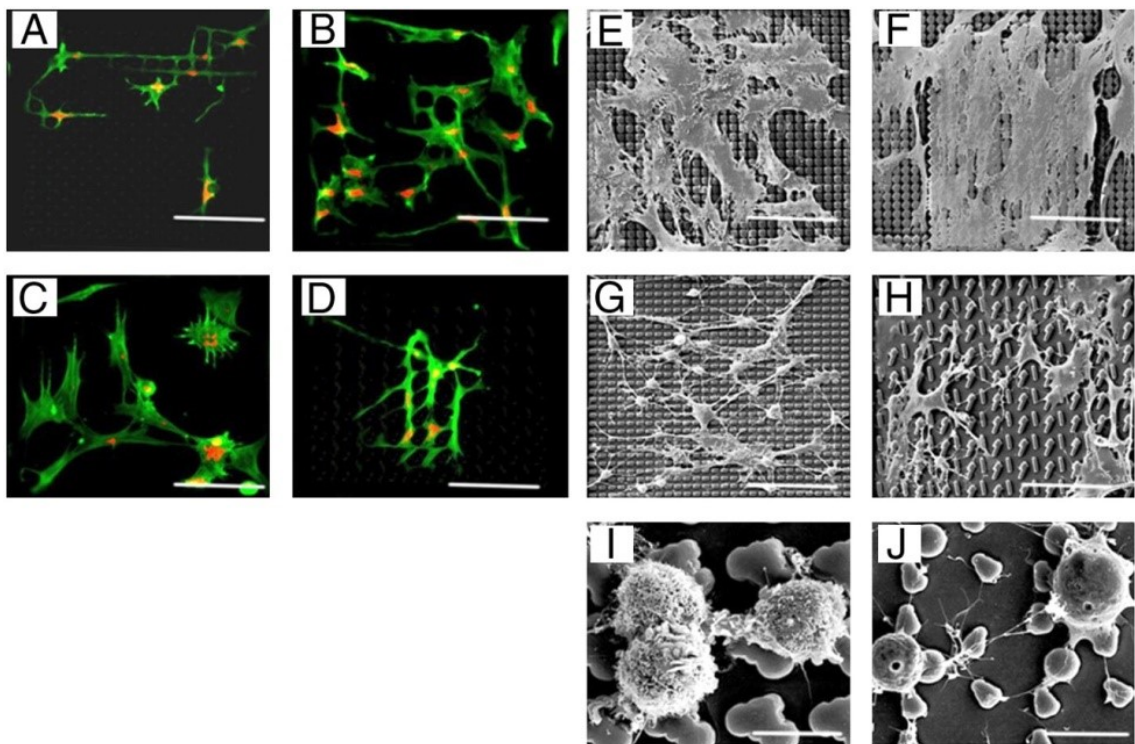
Povrchová topografie⁵ a morfologie⁶ biomateriálů je schopna vyvolat specifické buněčné odezvy. Princip spočívá v tom, že topografie ovlivňuje dostupnost vhodných vazebných míst pro adhezivní proteiny, čímž je ovlivněna jejich povrchová distribuce a to má zásadní vliv na buněčnou adhezi a následné procesy včetně diferenciací. (Wilson et al., 2005) Díky tomu získávají biomateriály s topografickými úpravami takové vlastnosti, které byly původně vyhrazeny pouze pro růstové faktory. Velkou výhodou je, že povrchové úpravy materiálů jsou ekonomicky efektivní způsob, kterým lze přispět ke zlepšení bioaktivity jakéhokoli povrchu používaného v lidském těle. Naopak nevýhodou je složitá a stále neúplně pochopená souhra mezi povrchovou topografií a chováním buněk. (Unadkat et al., 2011)

Jedna z mnoha studií se věnovala vlivu topografie na osteoblasty. Konkrétně porovnávala (nano)vláknité a hladké scaffoldy vyrobené z kyseliny polylactonové (PLA). Vlákňité scaffoldy ve výsledku adsorbovaly větší množství fibronektinu a vitronektinu, což následně zlepšilo adhezi osteoblastů. Tento úspěch byl přiřknut větší povrchové ploše, tedy většímu prostoru pro adsorpci proteinů ze séra. (Wilson et al., 2005)

⁵ **Topografie** popisuje povrchy z kvantitativního pohledu, např. množství a velikost nerovností povrchu. (Maszybrocka et al., 2017)

⁶ **Morfologie** popisuje povrchy z kvalitativního pohledu, např. vzhled povrchu. (Maszybrocka et al., 2017)

Nicméně k potřebnému širokému zmapování této problematiky přispěla studie, která využila matematické algoritmy k návrhu nestranných, náhodných povrchových útvarů. Dle těchto návrhů bylo vyrobeno celkem 2 176 čipů z kyseliny polymléčné (PLA), z nichž každý měl různou topografii. Na těchto čípech byly následně pěstovány lidské mezenchymální kmenové buňky (MSC), které byly těmito povrchovými strukturami indukovány k proliferaci, k osteogenní diferenciaci a vzniku různých morfologických struktur, jak lze vidět na obrázku 11. Na základě výsledků z této studie byly vytvořeny korelace mezi parametry matematických algoritmů a buněčnými odezvami, což poskytlo nové konstrukční kritéria pro tyto konkrétní parametry. (Unadkat et al., 2011)

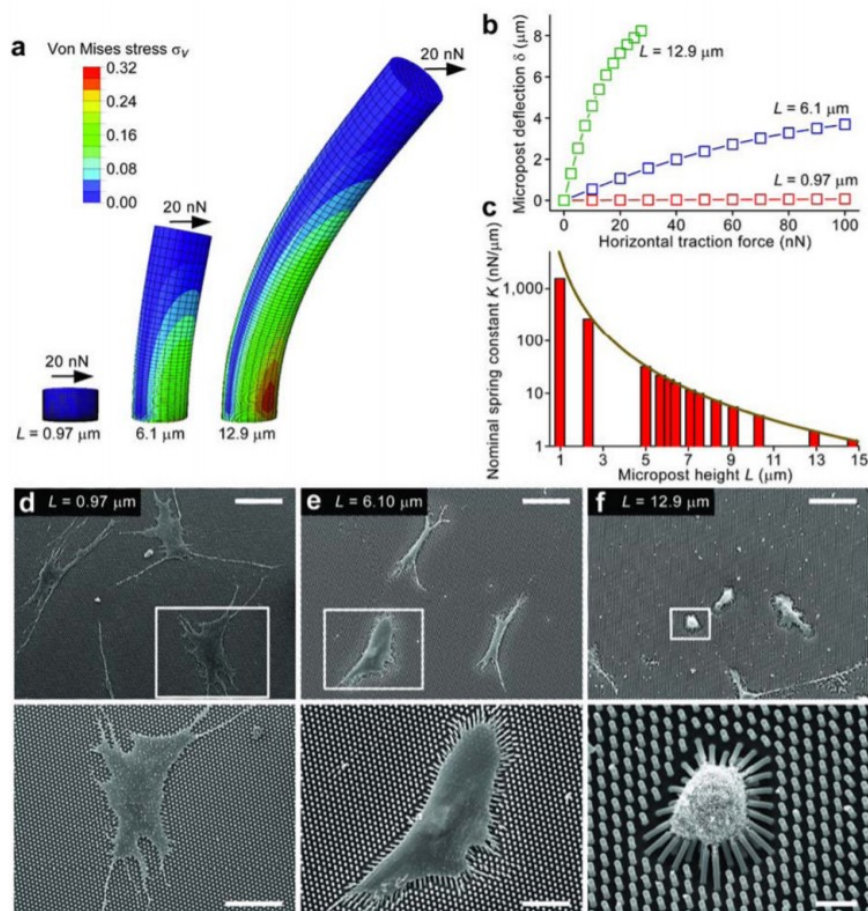


Obr. 11: Morfologie lidských MSC na různých čípech. (A–D): Prodloužené buňky, které vykazují zarovnání podle topografických znaků (fluorescenční mikroskop, zelená – aktin, červená – jádro, měřítko: 90 μm). (E–H): Buňky s různými morfologiemi (rastrovací elektronový mikroskop SEM, měřítko: 90 μm .) (I–J): Morfologie zaoblených buněk na dvou odlišných čípech, které se liší v struktuře buněčné membrány. (SEM, měřítko: 10 μm .) (Unadkat et al., 2011)

3.4 Rigidita

Jak již bylo dříve zmíněno v kapitole: „Biomimetika v tkáňovém inženýrství“, účelem scaffoldů je co nejbližší napodobení vhodných vlastností přirozené ECM. (Ma, 2008) Zaměříme-li se nyní na mechanické vlastnosti ECM, velký vliv má rigidita neboli tuhost. Ta je schopná zprostředkovat buněčnou signalizaci a ovlivnit tak proliferaci, diferenciaci a migraci buněk. V této oblasti mají velkou výhodu polymery, neboť je možné řídit jejich rigiditu velmi výrazně a poměrně jednoduše. (Yang et al., 2011), na rozdíl od scaffoldů, jenž jsou vyráběny z keramiky či kovu, jejich rigidita je pevně daná jejich strukturou. (Pfaff, 2000)

K přesnější definici vlivů rigidity povrchů přispěl výzkum, založený na elastomerních mikropilířích („micromolded elastomeric micropost arrays“) z poly(dimethylsiloxanu) (PDMS), přičemž tyto mikropilíře vykazovaly stejnou geometrii povrchu, ale tři různé výšky L , které specifikovaly míru, do jaké se mikropilíř ohne v reakci na vodorovnou tažnou sílu F (obr 12, část a, b). Tuhost mikropilíře je charakterizována nominální konstantou pružnosti K (obr 12, část c). Na tyto elastomerní mikropilíře byly nasazeny lidské MSC spolu s diferenciacním médiem podporující osteogenezi a adipogenezi. Buňky pěstované na krátkých rigidních mikropilířích měly velkou fokální adhezi (obr. 12, část d) s vysoce organizovanými aktinovými vlákny, v přítomnosti daného média byla zvýhodněna osteogenní diferenciacce. Oproti tomu buňky na měkkých mikropilířích vykazovaly zaoblenou morfologii (obr. 12, část f) s dezorganizovanými aktinovými vlákny a malou fokální adhezí, v přítomnosti média byla zvýšena adipogenní diferenciacce. (Fu et al., 2010)



Obr. 12: a) Elastomerní mikropilře („micromolded elastomeric micropost arrays“) z PDMS s třemi různými výškami L v reakci na vodorovnou tažnou sílu F . b) Závislost výchylky mikropilře δ na vodorovné tažné síle F . c) Závislost nominální konstanty pružnosti K na výšce mikropilře L . d), e), f) Lidské MSC umístěné na mikropilřích o různých délkách. SEM, měřítko: $100 \mu\text{m}$ (horní), $50 \mu\text{m}$ (vlevo dole), $30 \mu\text{m}$ (střed dole) a $10 \mu\text{m}$ (vpravo dole). (Fu et al., 2010)

3.5 Elektrická vodivost

Syntetické vodivé biomateriály představují obrovskou revoluci v biomedicínských polích vzhledem k jejich elektricky vodivým a magnetickým vlastnostem. Tyto materiály pomáhají buňkám vzájemně komunikovat. (Gajendiran et al., 2017) Vodivost je vlastnost, která je důležitá především u takových biomateriálů, jejichž aplikace je plánována v tkáňovém inženýrství srdeční nebo nervové tkáně, proto se přednostně zkoumá interakce vodivých biomateriálů s kardiomyocyty nebo neurocyty, popřípadě vliv vodivých substrátů na kardiomyogenezi či neurogenezi z kmenových buněk. (Humpolíček et al., 2015)

Potenciál polymerů v oblasti vodivých materiálů je prokázán udělením Nobelovy ceny v roce 2000 třem vědcům, Heegerovi, MacDiarmidovi a Shirakawovi, za vynález polymerických vodičů na bázi polyacetylenů. Dalšími organickými vodivými polymery jsou například polyanilin (PANI), polypyrrol (PPy) a poly(3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT). Vodivé vlastnosti organických polymerů pocházejí z přítomnosti konjugovaných π -vazeb podél celé polymerní matrice, které umožňují relativně snadnější delokalizaci elektronů. Vodivost lze snadno měnit konjugací s jinými vodivými materiály. Významnou výhodou vodivých polymerů je také to, že mohou reagovat na externě aplikované elektrické podněty, čímž lze řídit diferenciaci buněk (např. nízké intenzivní přímé elektrické stimuly vyvolaly osteogenní diferenciaci a tvorbu kosti u dospělých psů). Důležitost organických vodivých polymerů je dána taktéž jejich měkkou povahou, která je schopna lépe napodobit ECM a vytvořit tak vhodnější prostředí pro buňky než běžné elektricky vodivé anorganické materiály, jako jsou kovy. (Gajendiran et al., 2017) Další zajímavou oblastí, kde se uplatňují vodivé biomateriály, včetně vodivých polymerů, jsou biosenzory.

Biosenzor je zařízení, které transformuje biochemickou informaci do analyticky užitečného signálu. Senzory obvykle obsahují dvě základní součásti zapojené do série: chemický molekulární systém rozpoznávání (receptor) a fyzikálně-chemický převodník (též detektor, snímač nebo elektroda). (Thévenot et al., 2001)

Hlavním účelem receptoru je poskytnout vysoký stupeň selektivity pro analyzovanou složku. Biosenzory mohou být více či méně selektivní pro různé analyty, kterými mohou být ionty, plyny, protilátky či antigeny, proteiny a jiné různé substráty. Převodníky mohou být různého typu např. elektrochemické, optické, piezoelektrické nebo tepelné. Nejčastěji využívaný je elektrochemický převodník, který poskytuje obousměrný přenos signálu – chemický na elektrický a naopak. (Thévenot et al., 2001) Elektrochemické převodníky musí být vodivé (popřípadě polovodivé) biomateriály. Například některé vodivé polymery mohou působit jako vynikající materiály pro imobilizaci biomolekul. Vhodné jsou taktéž vodivé hydrogely, které se vyznačují jedinečnými vlastnostmi jako bobtnání, vysoká pórovitost, propustnost a hydrofilita. (Gajendiran et al., 2017)

4 ÚPRAVA POVRCHŮ BIOMATERIÁLŮ

Ideální tkáňový scaffold by měl mimikovat ECM a pozitivně interagovat s buňkami, včetně zvýšené adheze, proliferace, migrace a diferenciací. (Ma, 2008) Interakce buněk s povrchem biomateriálů jsou však složité a často ne optimální. Například povrchově neupravené ortopedické implantáty se mohou po implantaci zapouzdřit fibrózní tkání, spíše než aby se přímo vázaly s kostí, což může vést k selhání implantátu. Aby se těmto a dalším selháním přecházelo, věnuje se v dnešní době značné úsilí modifikaci povrchů biomateriálů. (Unadkat et al., 2011)

Obecně lze použít úpravy objemové či povrchové, aby se dosáhlo požadovaných pozitivních buněčných interakcí se scaffoldem. Objemová modifikace polymerních scaffoldů se obvykle provádí kopolymerací nebo připojením funkční skupiny k polymernímu řetězci ještě před samotnou výrobou. Nevýhodou této modifikace je, že většinou mění mechanické vlastnosti a zpracovatelské možnosti konstrukčních materiálů, většinou polymerů, ze kterých mají být scaffoldy vyrobeny. Proto se častěji přistupuje k povrchovým úpravám, které se realizují až po výrobě scaffoldu. (Ma, 2008)

Existuje mnoho metod k modifikaci a biofunkcionalizaci povrchu materiálů. Lze je rozdělit do tří skupin: morfologické, chemické a biologické.

- **Morfologické** modifikace vedou ke změně morfologie a topografie povrchu, což je vhodné kromě mimikování ECM, také pro zvětšení celkového povrchu, zvýšení růstu tkáně a pro specifickou diferenciaci kmenových buněk (Tallawi et al., 2015). Zahrnují změny drsnosti povrchu například pomocí pískování (Meredith et al., 2007) nebo prostřednictvím časově sekvenovaného dávkování směsi dobrých a špatných rozpouštědel na povrch rotujícího polymerního substrátu (např. tkáňový PS), přičemž velikost a hloubka nerovností lze ovlivnit variacemi sekvenování, teplotou či koncentracemi rozpouštědel (Wrzucionko et al., 2017). Mezi morfologické modifikace patří dále tvorba pórovitých nanostruktur na površích biomateriálů, například nanopóry či nanotrubic z oxidu titaničitého (TiO_2) vytvořené elektrochemickou anodizací titanových folií, přičemž přizpůsobením parametrů anodizace (aplikované napětí, doba anodizace a koncentrace chemikálií) lze regulovat délky a průměry vzniklých nanotrubic (Kulkarni et al., 2017).

- **Chemické** modifikace vedou ke změně chemické struktury povrchů. Provádí se např. použitím korónových elektrických výbojů ke zvýšení povrchové energie a adheze tkání, zesíťováním polymerního povrchu ke snížení propustnosti a zvýšení povrchové tvrdosti, naroubováním makromolekul jako je polyethylenglykol pro snížení adsorpce proteinů a adheze buněk (Tallawi et al., 2015), ošetřením amoniakem pomocí tzv. nízkotlaké plazmové úpravy (Nitschke et al., 2002) nebo působením kyseliny chlorovodíkové či koncentrované kyseliny sírové a následným vystavením ultrafialovému světlu, které je běžně využíváno pro sterilizaci, za účelem vytvoření nových funkčních skupin na povrchu polymeru. (Curtis et al., 1983)
- **Biologické** modifikace vedou ke změně biologické aktivity povrchů. Dosahuje se jich kupříkladu adsorpcí nebo chemickou vazbou bioaktivních molekul na povrch polymeru za účelem stimulace specifické buněčné odezvy. (Tallawi et al., 2015) Například potažením titanového povrchu kostními signalizačními morfogenetickými proteiny se zlepší uchycení kostní tkáně k povrchu scaffoldu. (Schmalz et al., 2009)

Speciální způsob úpravy povrchů je použití povlaků a filmů (např. povlaky fosforečnanu vápenatého na bederních implantátech (Habibovic et al., 2002)), které mohou změnit vlastnosti povrchu materiálu téměř jakkoliv. Povlaky lze taktéž aplikovat i na složitější 3D struktury (např. ponořením pórovitého scaffoldu do želatiny v rozpouštědlové směsi – dioxan, voda (Ma, 2008)). Následující podkapitola bude zaměřena na polyanilinové filmy, které lze mimo jiné použít k úpravě povrchů v biomedicínských aplikacích.

4.1 Polyanilinové filmy

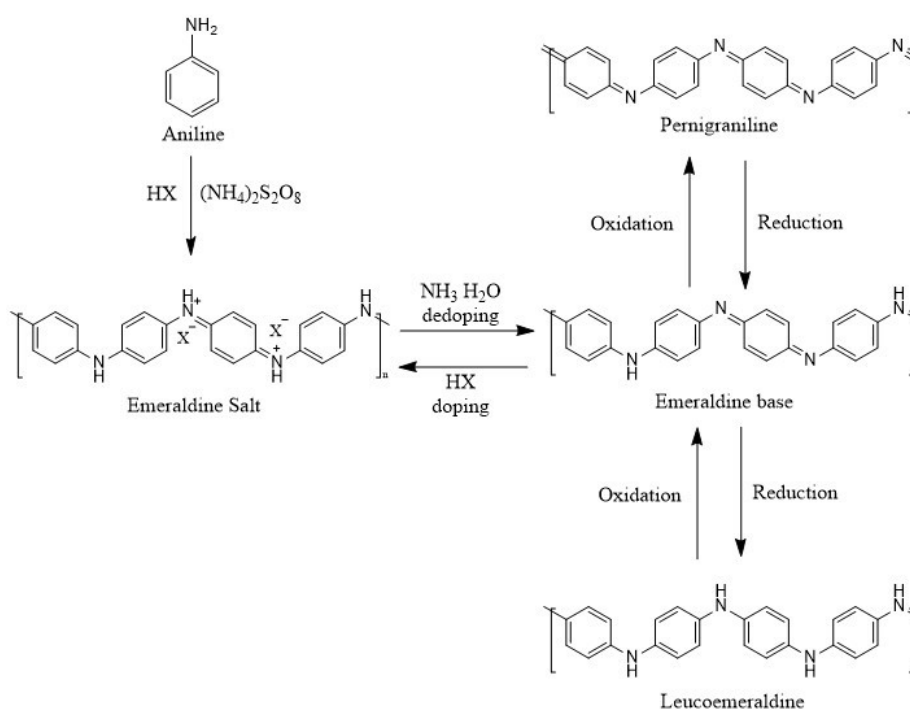
V současné době se věnuje velká pozornost vodivým polymerům, které by mohly být zároveň i biokompatibilní, a jedním z takových polymerů je právě polyanilin (PANI). PANI je velmi populární syntetický polymer především díky své dostupnosti, nízké ceně, snadno ovladatelné elektrické vodivosti, vysoké elektroaktivitě a environmentální stabilitě. (Singh et al., 2017)

Existují různé molekulární struktury PANI v závislosti na redox stavech (obr. 13):

- Pernigranilin (oxidovaná forma)
- Emeraldinová báze a emeraldinová sůl
- Leukoemeraldin (redukovaná forma)

Emeraldinová báze je nejstabilnější struktura, ale ve své základní formě je nevodivá. Proto se zpracovává kyselinami (např. kyselina chlorovodíková, sírová, sulfonová), přičemž dochází k protonizaci atomů dusíku, a tím se nevodivá emeraldinová báze převede na vodivou emeraldinovou sůl. (Gajendiran et al., 2017)

Další významnou výhodou polyanilinu je jeho jednoduchá syntéza (obr. 13). Existuje mnoho různých postupů pro syntézu PANI. Nejčastěji se provádí technikou míchání roztoků, kdy, jak název techniky již napovídá, se míchají dva roztoky: I) roztok anilinu ve vodě s koncentrovanou HCl (možno nahradit roztokem anilin hydrochloridu či anilin chloridu ve vodě) a II) roztok persulfátu amonného ve vodě. Koncentrovaná HCl se využívá k vytvoření kyselého prostředí a persulfát amonný zde působí jako iniciátor polymerace. Tato metodologie má velkou výhodu v tom, že značně usnadňuje aplikaci polyanilinu na různorodé povrchy. Při rozlití zrovna smíchaných roztoků vzniká následnou polymerací biokompatibilní PANI film ve stavu vodivé emeraldinové soli. (Singh et al., 2017)



Obr. 13: Schéma syntézy polyanilinu a jeho různé molekulární struktury. (Wikipedia, online)

PANI vytváří kromě tenkých filmů také šupiny, čímž může měnit topografii původně hladkých povrchů. (Humpolíček et al., 2015) Jedinečné vlastnosti polyanilinu umožňují využívat tento polymer například v biosenzorech a jiné organické elektronice. (Gajendiran et al., 2017) Taktéž lze PANI použít jako antikoroziční činidlo. (Singh et al., 2017)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

V experimentální části této bakalářské práce byla věnována pozornost třem různým potenciálně biomimetickým materiálům – nanotrubic z TiO_2 , strukturovaný tkáňový polystyren a polyanilinové filmy.

Cílem této práce bylo:

- příprava jednoho ze zmíněných materiálů – polyanilinových filmů,
- pozorování vlivu daných materiálů na myší fibroblasty ve statických a dynamických podmínkách kultivace,
- kvalifikace, bude-li to možné i kvantifikace, změn chování dané buněčné linie,
- zhodnocení získaných výsledků

Smyslem této práce bylo doplnit znalosti o vlivu vybraných biomateriálů na myší fibroblasty (především v dynamických podmínkách kultivace), neboť doposud na nich tato buněčná linie nebyla pěstovaná vůbec nebo byla pěstována pouze ve statických podmínkách. Důvodem, proč byly vybrány právě tyto materiály, je plánované propojení v navazující diplomové práci, kdy by byl polyanilin využit k vytvoření filmu na strukturovaných površích (např. nanotrubic z TiO_2 či strukturovaný polystyren, ale i jiné), čímž by se zajistil chemicky jednotný vodivý povrch, přičemž by byly zachovány původní různorodé povrchové nanotopografie strukturovaných substrátů.

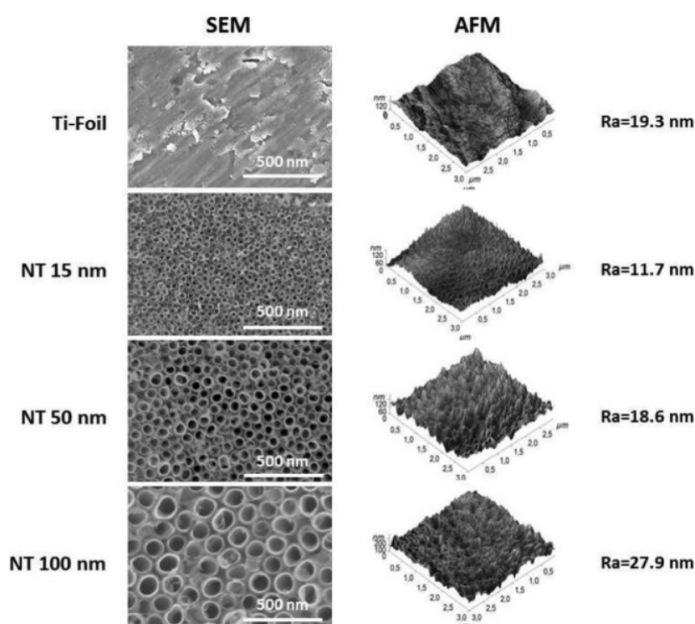
6 MATERIÁL

6.1 Testované povrchy

Testování proběhlo na třech různých potenciálně biomimetických materiálech – nanotrubic (NT) z TiO_2 na titanové fólii, strukturovaný tkáňový polystyren (PS) a polyanilinové (PANI) filmy. Nanotrubičky a strukturovaný polystyren by měly mimikovat povrchovou nanotopografii přirozeného prostředí buněk, zatímco polyanilinové filmy by měly mimikovat jeho elektrickou vodivost.

6.1.1 Titanová fólie a nanotrubičky z oxidu titaničitého

Vzorky titanové fólie (Ti-foil), jež byly použity jako reference, a vzorky nanotrubic (NT) z TiO_2 o různých průměrech (15, 50 a 100 nm) byly připraveny v kooperaci s Jožef Stefan Institut, Lublaň, Slovinsko. Nanotrubičky byly vytvořeny elektrochemickou anodizací titanových fólií v ethylenglykolovém elektrolytu. Různých průměrů nanotrubic bylo dosaženo korigováním parametrů anodizace (aplikované napětí, doba anodizace a koncentrace chemikálií). Povrchovou morfologii testovaných vzorků lze vidět na obrázku 14.

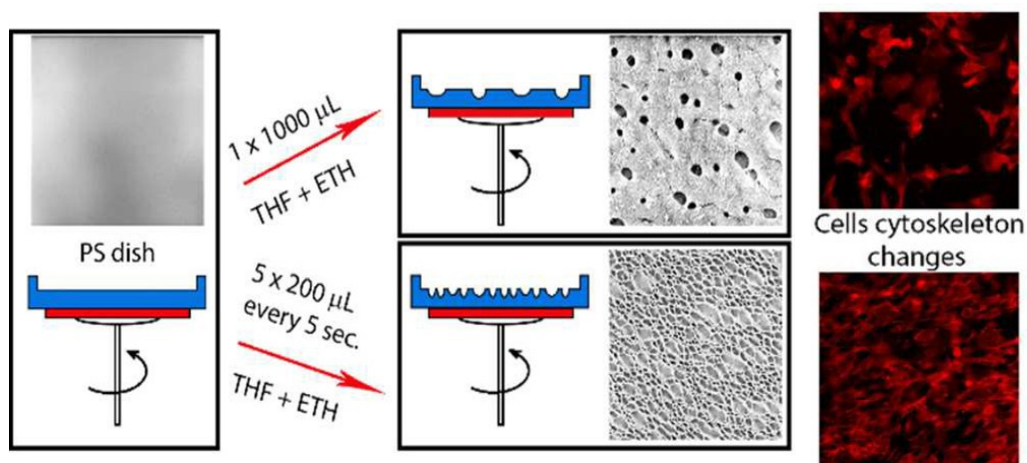


Obr. 14: Povrchová morfologie titanové fólie (Ti-foil) a nanotrubic z TiO_2 (NT) o různých průměrech na snímkách pořizovaných rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM) a mikroskopem atomárních sil (AFM). Vpravo jsou uvedeny průměrné hodnoty drsnosti povrchu (Ra) měřené na pěti oblastech o velikosti $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$. (Kulkarni et al., 2017)

Co se týče historie těchto povrchů, byly u nich již před rokem 2017 testovány biologické vlastnosti ve statických podmínkách s prokaryotickými bakteriálními buňkami (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*), eukaryotickými kmenovými buňkami (ESC, MSC) a taktéž eukaryotickými diferenciovanými buňkami (kardiomyocyty). Hlavním důvodem, proč byly tyto povrchy zvoleny, pro tuto bakalářskou práci, je ten, že jejich biokompatibilitu dosud nikdo nestudoval za dynamických podmínek, tedy v bioreaktoru. Taktéž se dříve nikdo nezabýval jejich interakcí s fibroblasty. S kardiomyocyty sice ano, ale se závěrem, že Ti-foil ani NT z TiO_2 neposkytují požadované vlastnosti, což znamená, že na povrchu byly pozorovány buněčné artefakty, ale buňky nebyly ve svém fyziologickém stavu. (Kulkarni et al., 2017)

6.1.2 Strukturovaný tkáňový polystyren

Vzorky strukturovaného tkáňového polystyrenu (PS) s dvěma různými topografiemi (obr. 15) byly připraveny v kooperaci s Ústavem fyziky a materiálového inženýrství v rámci fakulty technologické na Univerzitě Tomáše Bati, Zlín, Česká republika. Vzorky byly vyrobeny principem časově sekvenovaného dávkování směsi dobrého rozpouštědla (tetrahydrofuran, THF) a špatného rozpouštědla (2-ethoxyethanol, ETH) v objemovém poměru 1,5:8,5 na povrch rotující Petriho misky z tkáňového PS. Velikost a hloubka povrchových nerovností lze regulovat variacemi sekvenování, teplotou či koncentracemi rozpouštědel. Jako referenční povrch byl použit čistý tkáňový PS.



Obr. 15: Povrchová morfologie čistého polystyrenu (PS) a strukturovaných vzorků (nahore č. 1, dole č. 2) na schématu a na snímkách ze SEM ($134 \mu\text{m} \times 134 \mu\text{m}$). Vpravo jsou myši fibroblasty na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení: $100\times$, červená – aktin). (Wrzecionko et al., 2017)

Na těchto površích i na dalších (různě modifikovaných či připravených za jiných podmínek) byla již dříve testována biokompatibilita s myšimi fibroblasty. Nicméně se vždy jednalo o testy ve statických podmínkách, tedy při volném uložení v inkubátoru. (Wrzecionko et al., 2017) Proto i zde by mohla mít tato bakalářská práce, jež je zaměřená na testování v bioreaktoru, svůj přínos.

6.1.3 Polyanilinové filmy

Dalšími materiály, které byly podrobeny testování v dynamických podmínkách bioreaktoru, byly tkáňové polystyrenové (PS) Petriho misky, na nichž byl vytvořen tenký polyanilinový (PANI) film. Tyto vzorky byly připraveny v rámci této bakalářské práce způsobem, který je uveden níže v metodice v podkapitole: „Syntéza polyanilinových filmů“. Jako reference se v tomto případě používaly čisté tkáňové PS Petriho misky.

Na PANI filmech již byly pěstovány různé buněčné kultury ve statických podmínkách, např. ESC, přičemž byl pozorován vliv PANI povrchu na kardiomyogenezi a neurogenezi. (Humpolíček et al., 2015) Nicméně doposud nebyly prezentovány žádné výsledky, které by byly získané za dynamických podmínek *in vitro* testování. Testování biokompatibility těchto filmů v dynamických podmínkách je dalším důležitým krokem ke konečnému uplatnění PANI v biomedicíně a tkáňovém inženýrství. Jeho potenciál spočívá nejen ve schopnosti vodit, ale také v jeho jednoduché a účinné aplikaci na různorodé povrchy. Proto je dalším plánovaným postupem (např. v diplomové práci) aplikace PANI na strukturované povrchy z různých materiálů, čímž by se zajistil chemicky vhodný a jednotný povrch, který by byl navíc vodivý, ale přitom by zůstala zachována specifická nanotopografie strukturovaných substrátů.

6.2 Testovaná buněčná linie

Pro všechny provedené experimenty byla použita buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, USA). Jako základ pro kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), ke kterému bylo přidáno fetální telecí sérum (BioSera, Francie; v množství 10 % z celkového objemu média) a antibiotika – Penicillin/Streptomycin o koncentraci 100 µg/ml (GE Healthcare HyClone, Velká Británie; v množství 1 % z celkového objemu média se sérem). Tato bu-

něčná linie byla kultivována v inkubátoru s řízenou atmosférou (5 % CO₂) při teplotě 37 °C a za konstantní relativní vlhkosti.

6.3 Použité chemikálie

Během experimentu byly použity tyto chemikálie: Anilin hydrochlorid (Lach-Ner, Česká republika), amonium persulfát (Sigma-Aldrich, Rakousko), kyselina chlorovodíková (HCl; Penta chemicals, Česká republika), methanol (Penta chemicals, Česká republika), ethanol (VWR Chemicals, Francie), pufovaný fyziologický roztok – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; BioSera, Francie), trypsin (PAA Laboratories GmbH, Austrálie), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT; Duchefa Biochemie, Nizozemí), dimethylsulfoxid (DMSO; Duchefa Biochemie, Nizozemí), formaldehyd (Penta chemicals, Česká republika), Triton X 100 (Sigma-Aldrich, Rakousko), fluorescenční barviva: ActinRed 555 (Life Technologies, USA), Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Rakousko), SYTO 61 (Life Technologies, USA).

6.4 Použité přístroje a pomůcky

Při provádění experimentu byly používány tyto přístroje: Laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe (Thermo Scientific, USA), centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo), biologický inkubátor HERAcell 150i (Thermo Scientific, USA), čtyř-komorový rotující stěnový bioreaktor (Synthecon, USA, obr. č. 3), fluorescenční inverzní mikroskop s fázovým kontrastem Olympus IX 81 (Olympus, Japonsko) a s fotoaparátem Leica DFC480 (Leica Microsystems, Japonsko), fotometr NanoQuant infinite M200PRO (Tecan, Švýcarsko), průtokový cytometr BD FACSCanto II (BD Biosciences, USA), autokláv Tuttnauer 3870 ELPV (Tuttnauer, USA), systém k produkci ultračisté vody Simplicity UV (Millipore, Francie), vodní lázeň (Memmert, Německo), automatické pipety a mikropipety (Eppendorf, Německo), analytické váhy AS 220.R2 (RADWAG, USA), tkáňový plastik (TPP, Švýcarsko) a další drobné pomůcky biologické laboratoře.

7 METODIKA

7.1 Syntéza polyanilinových filmů

Roztoky anilin hydrochloridu (0,2 M) a amonium persulfátu (0,25 M) v ultračisté vodě byly připraveny a ponechány stát 1 hodinu při laboratorní teplotě z důvodu dobrého rozpuštění zadaných látek a ustálení teplot obou roztoků. Poté byly tyto roztoky smíchány a bez prodlevy rozlity do polystyrenových Petriho misek (s upraveným hydrofilním povrchem vhodným pro tkáňové kultury). Polymerační reakce probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Vzniklé PANI filmy byly pečlivě vypláchnuty 0,2 M HCl a methanolem a byly ponechány přes noc vyschnout opět při laboratorní teplotě.

7.2 Příprava vzorků a bioreaktoru

- Vzorky titanové fólie a nanotrubic z TiO_2 byly nastříhány na čtverce o rozměrech $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ a sterilizovány ponořením nejméně na 1 hodinu do 70 % ethanolu. Poté byly ponechány vysychat v laminárním boxu po dobu 24 hodin.
- Vzorky strukturovaného PS a čistého PS byly nařezány pomocí nahřátého skalpelu na čtverce o velikosti $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ a sterilizovány UV zářením v laminárním boxu po dobu 30 minut z každé strany.
- Z připravených PANI filmů na PS a taktéž z čistého PS byly vyraženy kolečka o průměru 2,5 cm. Tyto vzorky byly sterilizovány UV zářením v laminárním boxu po dobu 30 minut z každé strany.

Komory bioreaktoru byly autoklávovány 20 minut při $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Uchycovací fólie byly nařezány pomocí skalpelu, opláchnuty v 70 % ethanolu a poté byly ponechány vysychat v laminárním boxu po dobu 24 hodin.

7.3 Kultivace myších fibroblastů

Z kultivační nádoby, kde byla buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 pěstována, bylo opatrně odsáto médium. Buňky byly opláchnuty pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) v množství $0,2 \text{ ml/cm}^2$. Poté byl pufr odsát a k buňkám byl následně přidán trypsin v množství $0,1 \text{ ml/cm}^2$, kultivační nádoba s buňkami a trypsinem byla uložena do inkubátoru na dostatečně dlouhou dobu (maximálně 20 minut), aby došlo k uvolnění všech buněk

od povrchu plastiku, což bylo průběžně kontrolováno optickým mikroskopem s fázovým kontrastem. Po kompletním uvolnění buněk bylo do nádoby přidáno médium ve stejném množství jako trypsinu, tedy 0,1 ml/cm². Vzniklý roztok (buňky-médium-trypsin) byl přečerpán do zkumavky, která byla poté uzavřena a vložena do předem vytemperované centrifugy (37 °C, 3 minuty, 1 100 rpm). Vzniklý supernatant byl odsát. Buňky byly naředěny pomocí média na koncentraci 1.10⁵ buněk/ml. Vytvořená buněčná suspenze myších fibroblastů byla aplikována na vysterilizované vzorky (50 µl na čtvercové vzorky: Ti-foil, NT, struktur. PS a čistý PS; 500 µl na kolečka vzorků: PANI na PS a čistý PS). Buňky byly ponechány adherovat k povrchům vzorků v biologickém inkubátoru po dobu 2 hodin. Následně bylo ke každému vzorku přidáno médium (1 ml k čtvercovým vzorkům: Ti-foil, NT, struktur. PS a čistý PS; 1,5 ml ke kolečkám vzorků: PANI na PS a čistý PS), načež se buňky nechaly proliferovat v biologickém inkubátoru dalších 22 hodin. Stav buněk byl průběžně kontrolován pomocí optického mikroskopu s fázovým kontrastem.

Po dostatečném přichycení buněk k povrchu byla polovina vzorků s buňkami vyjmuta z média a opatrně upevněna do uchycovacích fólií. Ty byly poté vloženy do čtyř komor bioreaktoru, přičemž každá komora obsahovala vždy čtyři vzorky a byla doplněna 50 ml média. Bioreaktor byl po sešroubování umístěn do inkubátoru. Rotace byly nastaveny po směru hodinových ručiček s rychlostí 5 rpm. Bioreaktor byl spuštěn vždy po dobu tří dnů. Druhá polovina vzorků s buňkami byla vyjmuta z média a vložena do nového tkáňového plastiku, načež byly ke každému vzorku pipetovány 2 ml čerstvého média. Tato část vzorků byla umístěna v inkubátoru ve statické fázi po stejně dlouhou dobu, tedy tři dny. Po uběhnutí tohoto času byl bioreaktor zastaven, médium odsáto, komory rozšroubovány a vzorky s buňkami byly opatrně vyjmuty z uchycovací fólie a vloženy do tkáňového plastiku (Petriho misek o průměru 3,5 cm) pro účely následujícího testování. Podobně tomu bylo i se vzorky ve statické fázi, ty byly vyjmuty z média a taktéž vloženy do nových Petriho misek o průměru 3,5 cm za účelem následného testování.

7.4 Fluorescenční mikroskopie

K určení morfologie buněk byla využita fluorescenční mikroskopie. Nejdříve byly vzorky s buňkami opláchnuty PBS a po jeho odsátí byly zafixovány, permeabilizovány a nabarveny fluorescenčními barvivy. Fixace byla provedena působením 1 ml 4 % formaldehydu v ultračisté vodě po dobu 15 min, poté byl formaldehyd odsát a buňky opět

opláchnuty pomocí PBS. Permeabilizace buněčné membrány byla zajištěna přidavkem 1 ml 0,5 % Tritonu v PBS, který byl ponechán působit 5 min. Následně byl Triton odsát a buňky byly třikrát opláchnuty PBS. Pro barvení zafixovaných buněk byl nejdříve napipetován 1 ml PBS, do kterého se následně ve tmě přidávaly fluorescenční barviva: ActinRed (1 kapka/ml) a Hoechst (10 μ l/ml). Vzorky byly ponechány 20 minut ve tmě. Během této doby se ActinRed navázal na proteiny obsažené v cytoskeletu buněk a Hoechst prostoupil do jader buněk, kde se navázal na DNA. Po uplynutí této doby byl PBS s barvivou odsát a nahrazen 1 ml čistého PBS. U takto připravených buněk bylo již možné fluorescenčním mikroskopem pozorovat jejich morfologii.

7.5 MTT test

Ke kvantifikaci buněk byl využit MTT test. Vzorky s buňkami byly nejdříve opláchnuty PBS a poté na ně bylo aplikováno v poměru 9:1 médium a roztok MTT v ultračisté vodě (o koncentraci 5 mg/ml). MTT bylo ponecháno působit na buňky po dobu nejméně 4 hodin v biologickém inkubátoru. Médium s přebytečným MTT bylo odsáto, načež byla tato směs nahrazena ve stejném množství dimethylsulfoxidem (DMSO), jehož doba působení byla 15 minut. Hodnoty absorbance byly následně měřeny na fotometru při vlnové délce 570 nm, přičemž referenční vlnová délka byla nastavena na 690 nm.

7.6 Průtoková cytometrie

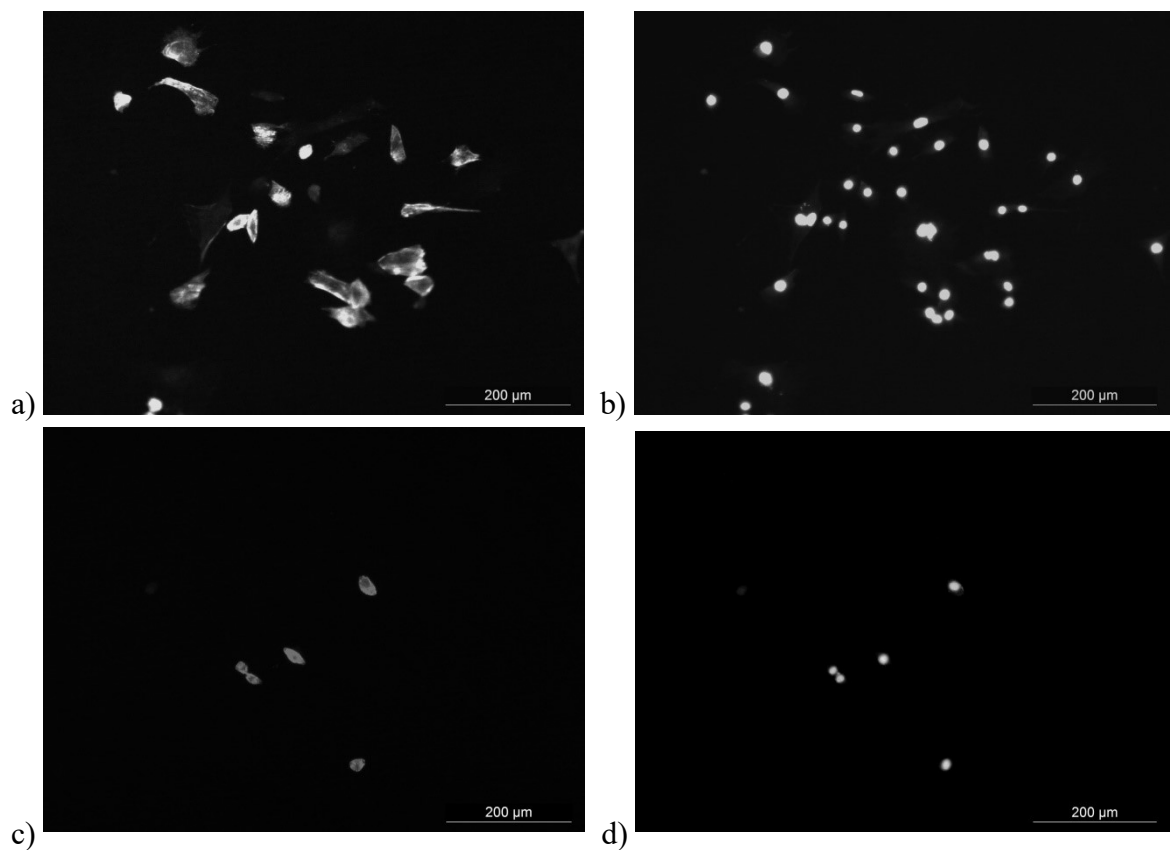
U vzorků, kde nebylo možné použít MTT test, byla ke kvantifikaci využita průtoková cytometrie. Nejdříve byly vzorky s buňkami opláchnuty PBS. Po jeho odsátí na ně byl aplikován 1 ml trypsinu. Vzorky byly uloženy do inkubátoru na dostatečně dlouhou dobu, aby došlo k uvolnění všech buněk od testovaného povrchu, což bylo průběžně kontrolováno optickým mikroskopem s fázovým kontrastem. Po kompletním uvolnění buněk bylo k trypsinu přidáno stejné množství média, tedy 1 ml, a poté ve tmě bylo přikápnuto 20 μ l fluorescenčního barviva SYTO (o koncentraci 5 mM v DMSO), jenž je schopný procházet nepoškozenými membránami, a tak barví pouze živé buňky. Celá tato směs i s uvolněnými buňkami byla přečerpána do zkumavek, které byly postupně vsazovány do průtokového cytometru k provedení měření, jehož rychlost byla 60 μ l/s. Na analýzu naměřených hodnot byl použit software BD FACSDiva (BD Biosciences, USA). Výsledky byly otestovány nepárovými t-testy na hladině významnosti $p \leq 0,05$ nebo $p \leq 0,001$.

8 VÝSLEDKY

Pro lepší přehlednost jsou výsledky z provedených *in vitro* zkoušek rozděleny do tří částí podle testovaného materiálu. Kvantitativní stanovení buněk tvoří minoritní část výsledků, neboť ne vždy bylo možné vybrané testy provést. Majoritní část výsledků je tvořena snímky z fluorescenčního mikroskopu, na nichž jsou zviditelněna vždy vlevo aktinová vlákna (pomocí barviva ActinRed) a vpravo DNA v jádrech (pomocí barviva Hoechst). Zároveň horní fotografie vždy zobrazují buňky kultivované ve statických podmínkách, zatímco na dolních fotografiích jsou buňky kultivované v dynamických podmínkách, tedy v bioreaktoru.

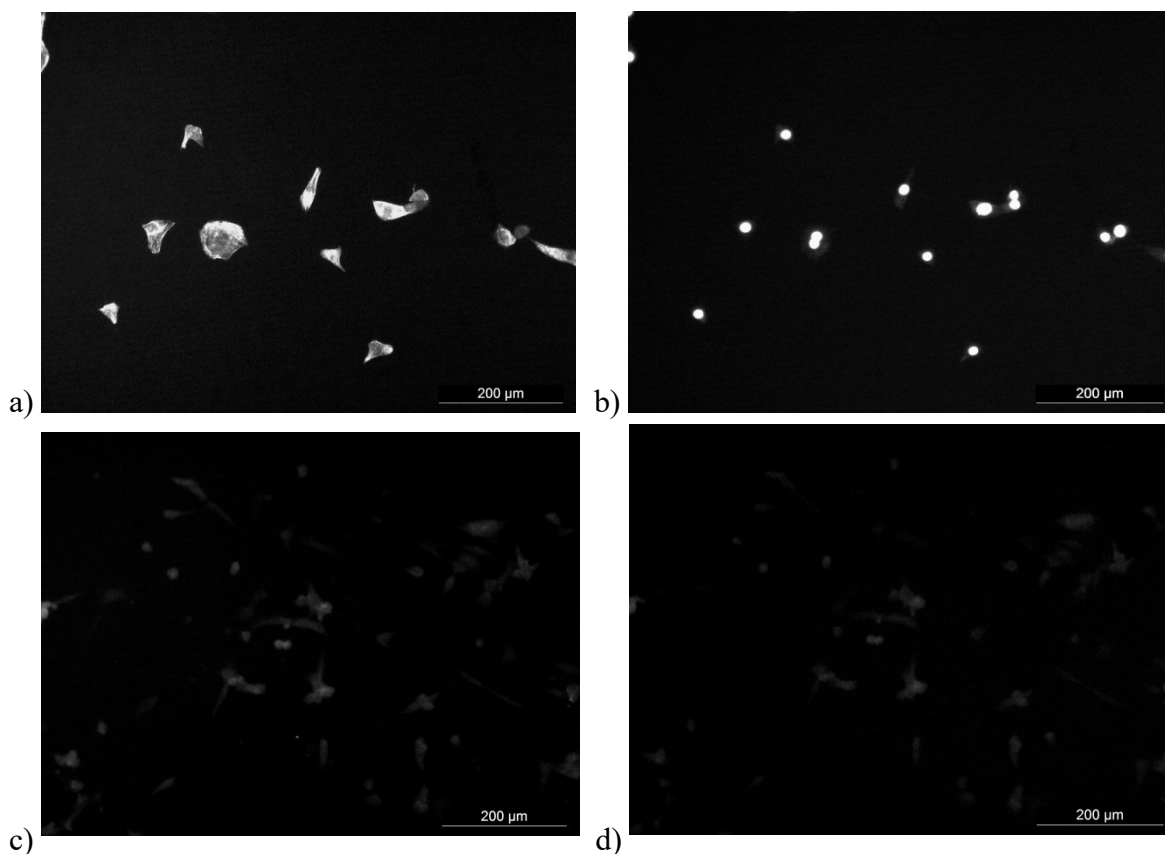
8.1 Výsledky *in vitro* zkoušek na nanotrubicích z oxidu titaničitého

Jelikož všechny pozorované vzorky (včetně reference) měly stejný rozměr kultačního povrchu $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$, bylo původně v plánu provést nejen kvalifikační ale také kvantifikační zhodnocení vlivu povrchové topografie nanotrubic na myší fibroblasty. Nakonec ale bylo zjištěno, že kvantifikaci nelze provést ani MTT testem ani průtokovou cytometrií. Při použití chemikálií MTT a DMSO docházelo ke korozi povrchu, jelikož nanotrubice jsou z oxidu titaničitého, což je redox-aktivní materiál. Tato koroze následně znehodnocovala výsledky MTT testu. K měření průtokovým cytometrem je principiálně nutné, aby byly buňky z povrchu uvolněny a převedeny ve formě suspenze do zkumavky. Zjistilo se ale, že myší fibroblasty mají ke zkoumanému povrchu tak silnou vazbu, že je nelze uvolnit bez poškození, proto nebylo možné průtokovou cytometrii použít.



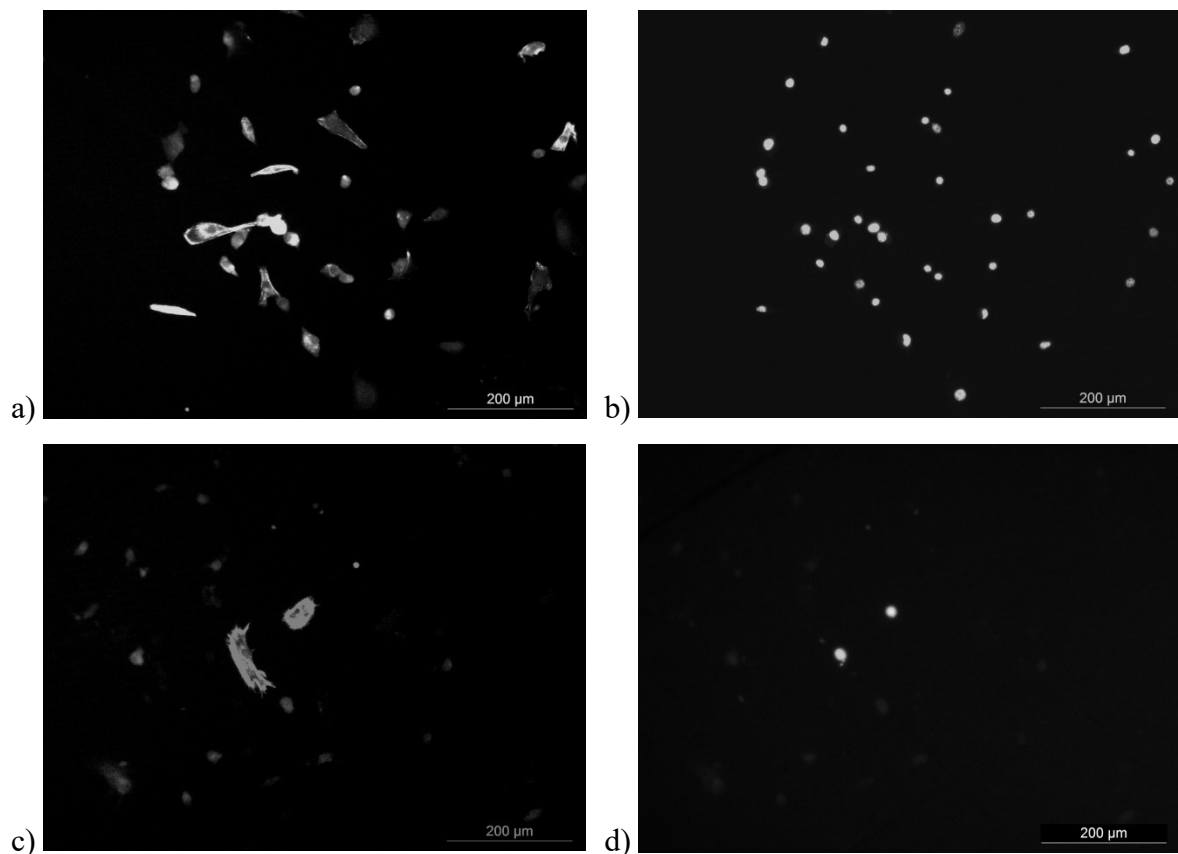
Obr. 16: Morfologie NIH/3T3 na Ti-foil na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze Actin-Red, d) dynamická fáze Hoechst.

Při testování těchto povrchů byla jako reference použita čistá titanová fólie (Ti-foil). Morfologii buněk narostlých na této referenci s hladkým povrchem lze vidět na obrázku 16. Ve statické fázi se zkoumaným myším fibroblastům na tomto povrchu dařilo o něco lépe než v bioreaktoru, kde vlivem dynamického namáhání došlo jednak k poklesu životaschopnosti buněk a také k jejich zakulacení.



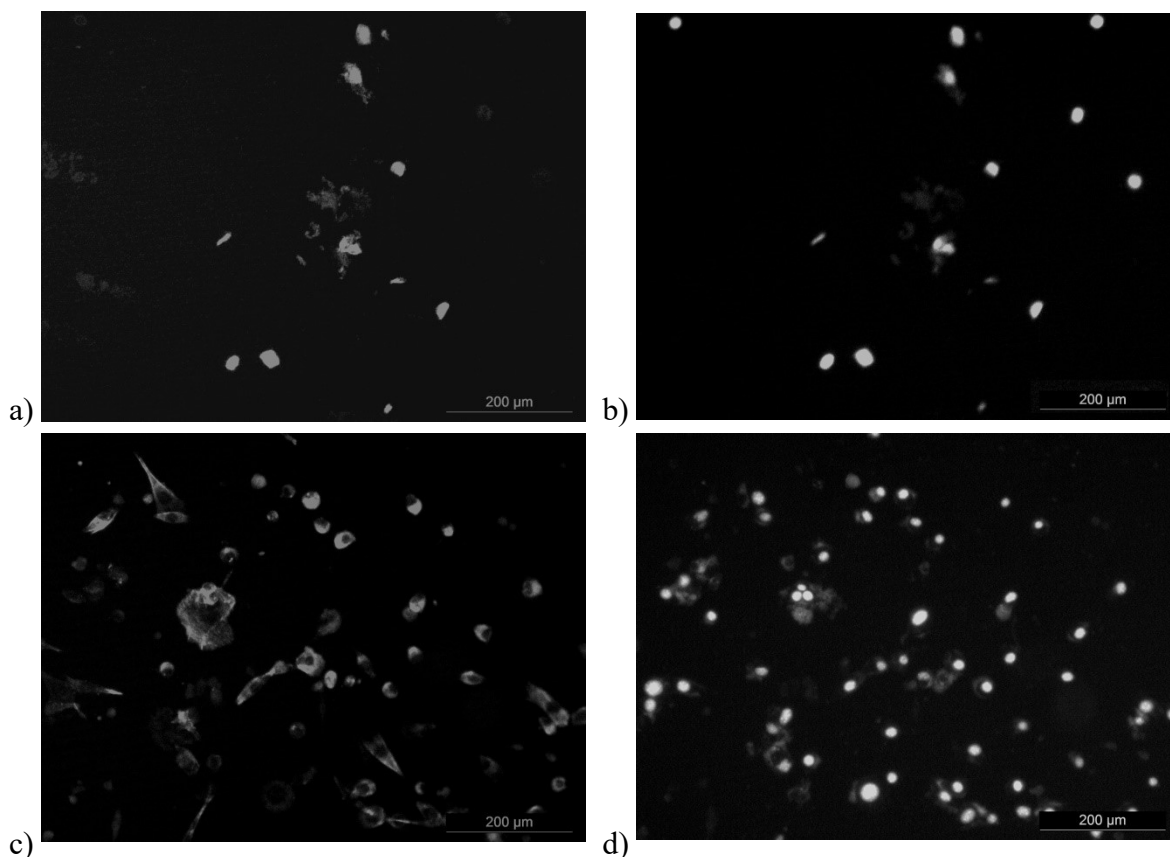
Obr. 17: Morfologie NIH/3T3 na NT 15 nm na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Myší fibroblasty narostlé na nanotrubicích s nejmenším průměrem 15 nm jsou vyfotografovány na obrázku 17. Ve statické fázi se morfologické struktury podobají té na referenční titanové fólii. Nicméně kultivace za dynamických podmínek způsobila, že se buňky vnořily hlouběji do vnitřní struktury nanotrubic, kde je nebylo možné dostatečně dobře nabarvit fluorescenčními barvivy, což značně zhoršovalo pozorování pomocí mikroskopu.



Obr. 18: Morfologie NIH/3T3 na NT 50 nm na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Na obrázku 18 lze vidět morfologii buněk narostlých na nanotrubicích s průměrem 50 nm. Kultivace v dynamických podmínkách opět značně podpořila vnořování buněk do vnitřní struktury nanotrubic. Vnořené buňky jsou velmi špatně viditelné a kopírují kulatý tvar nanotrubic, zatímco buňky na povrchu jsou viditelné dobře a zaujímají protáhlé tvary.

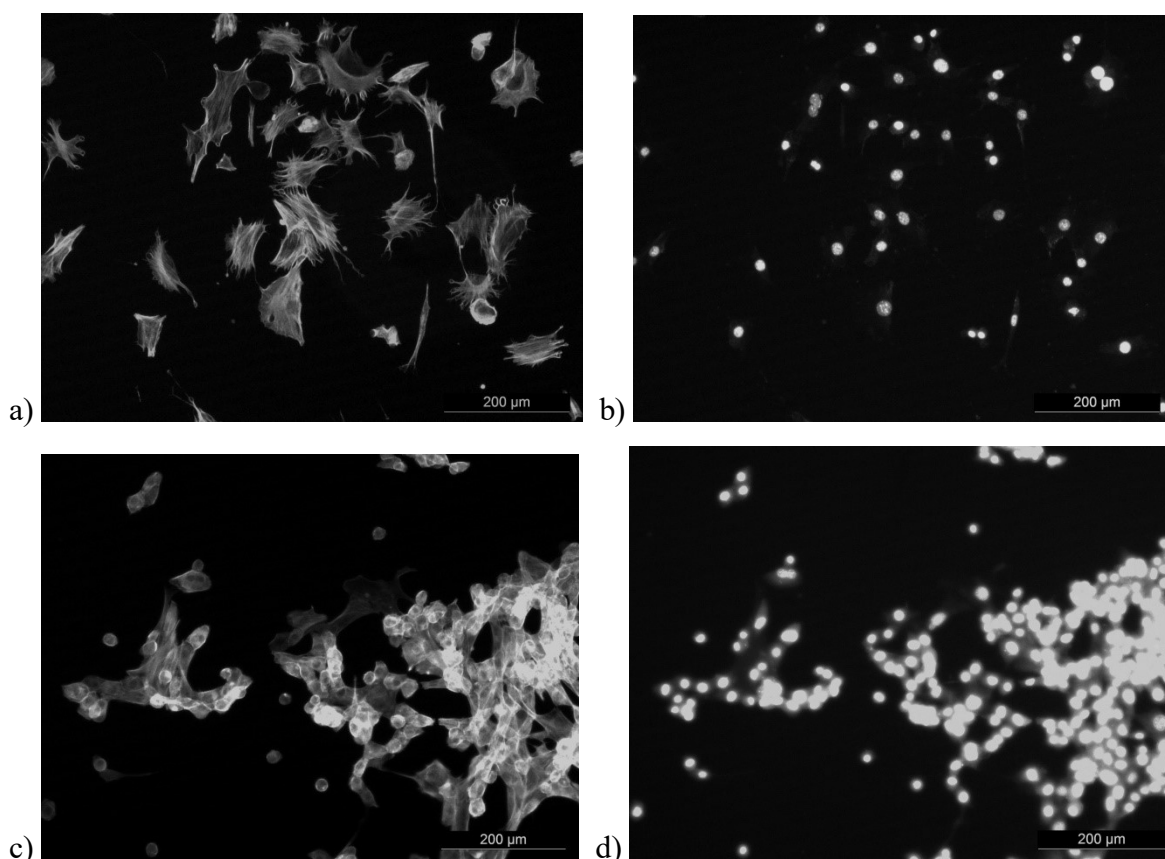


Obr. 19: Morfologie NIH/3T3 na NT 100 nm na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Buňky narostlé na povrchu s nanotrubicemi o průměru 100 nm lze pozorovat na obrázku 19. Zde došlo k největšímu rozdílu mezi kultivací fibroblastů ve statických a v dynamických podmínkách. Buňky více proliferovaly v bioreaktoru, což je na jednu stranu dobrá zpráva, neboť tento způsob *in vitro* zkoušky mnohem lépe napodobuje testování *in vivo*. Na druhou stranu je nutno podotknout, že podle pořízených fotografií je 2D struktura buněk za statických i dynamických podmínek kultivace zakulacená a není přirozeně rozvětvená, což bývá typické při *in vitro* kultivaci myších fibroblastů.

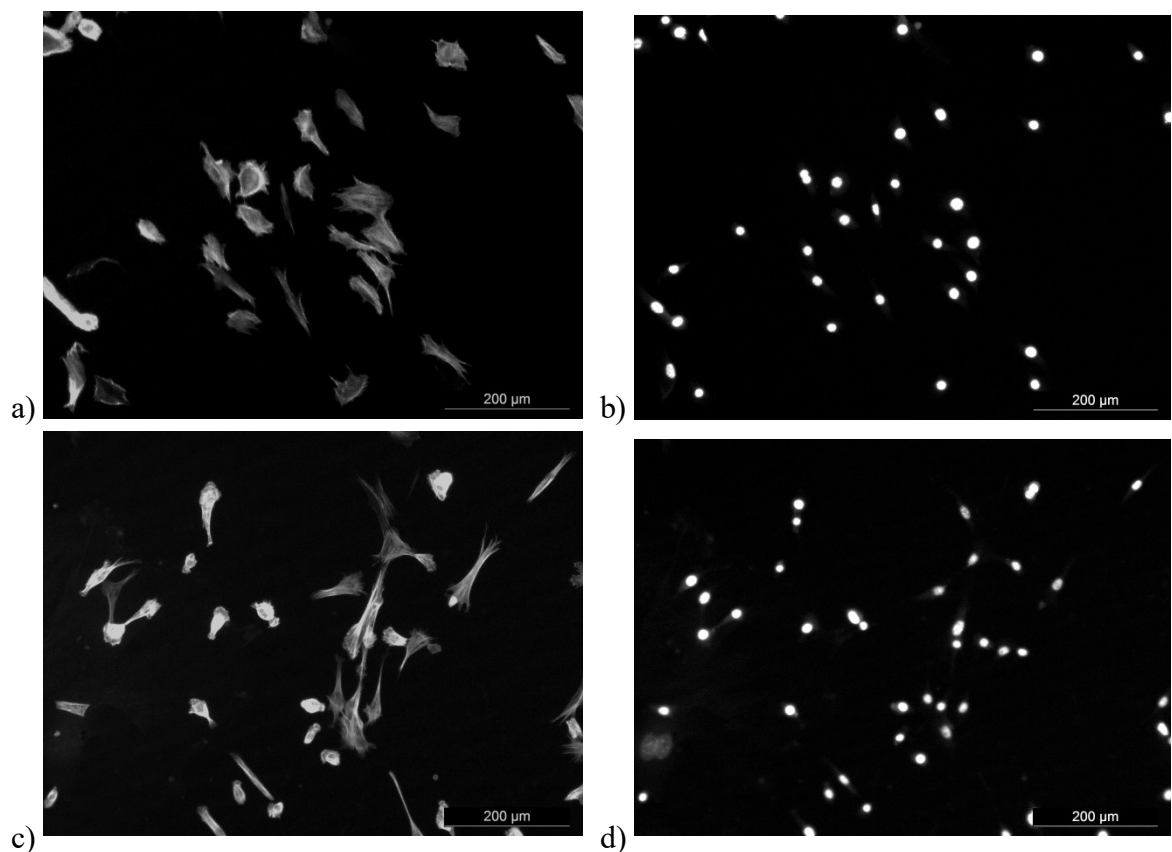
8.2 Výsledky *in vitro* zkoušek na strukturovaném polystyrenu

Původně bylo v plánu provést nejen kvalifikační ale také kvantifikační zhodnocení vlivu povrchové topografie strukturovaného polystyrenu (PS) na myší fibroblasty. Také proto byly všechny pozorované materiály (včetně reference) nařezány na vzorky o stejných rozměrech kultivačního povrchu 1 cm × 1 cm. Bohužel z důvodu nedostatku testovaného materiálu nakonec nebylo možné kvantifikaci buněk provést.



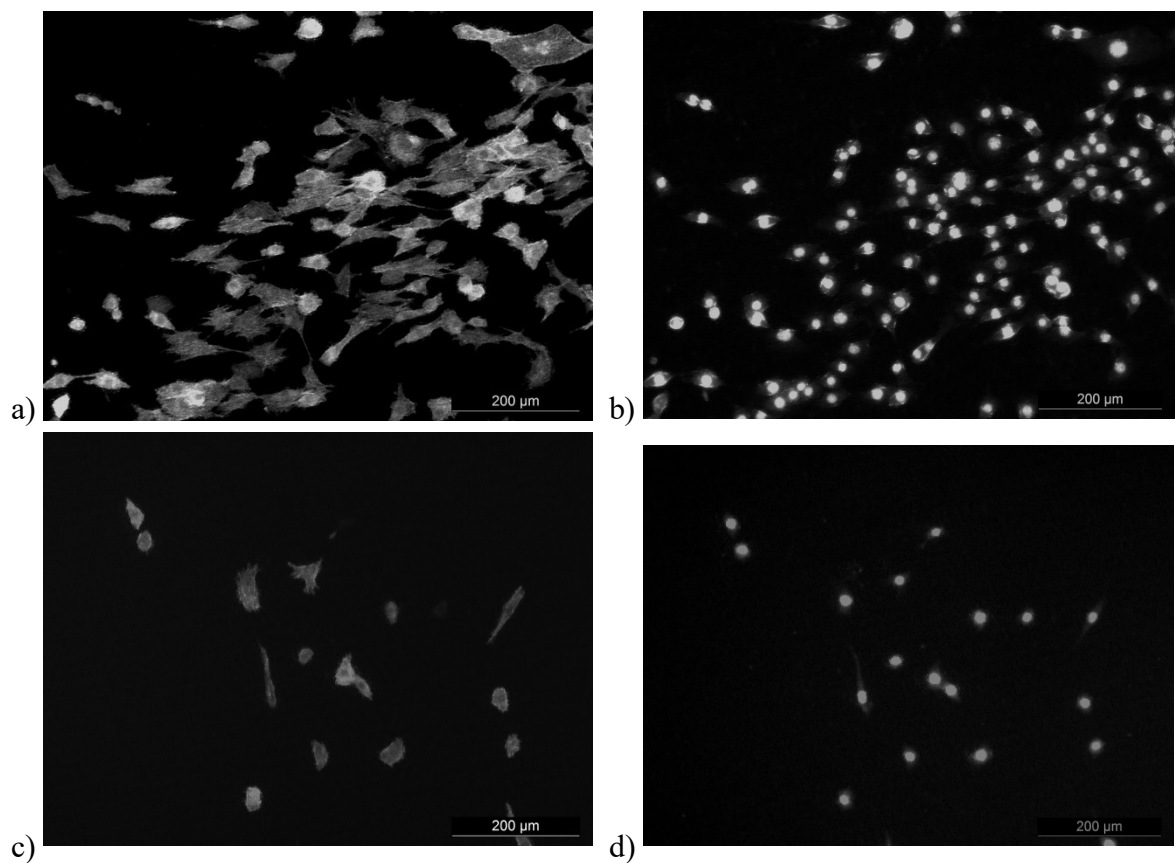
Obr. 20: Morfologie NIH/3T3 na čistém PS na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Při testování těchto materiálů byl zvolen jako referenční povrch čistý tkáňový PS. Buňky narostlé na této referenci lze vidět na obrázku 20. Myší fibroblasty kultivované ve statických podmínkách zaujímají svůj přirozený tvar. Buňky dynamicky namáhané v bioreaktoru mají strukturu podobně protáhlou a dochází ke shlukování buněk.



Obr. 21: Morfologie NIH/3T3 na struktur. PS č. 1 na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Morfologii myších fibroblastů kultivovaných na strukturovaném PS (s označením č. 1) lze vidět na obrázku 21. Ve statické fázi vypadají buňky podobně jako na referenčním povrchu. Kdežto v dynamické fázi zaujímají buňky velmi různorodé tvary, jak kulaté, tak i značně protáhlé.

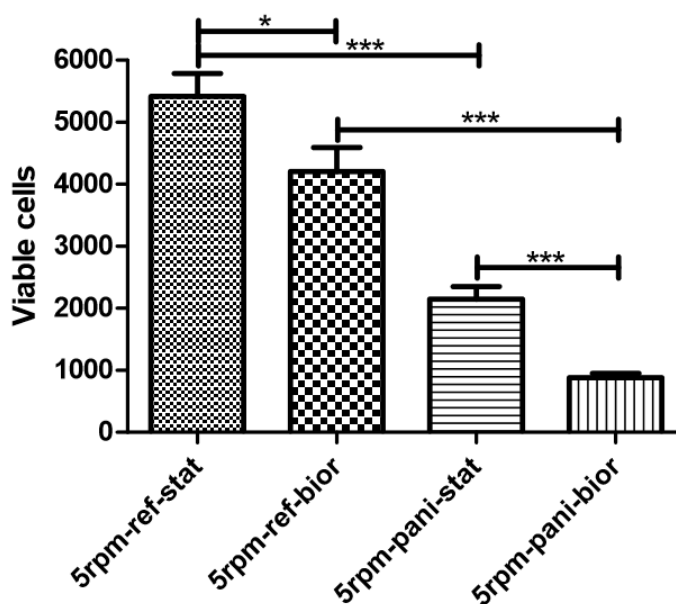


Obr. 22: Morfologie NIH/3T3 na struktur. PS č. 2 na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Morfologii myších fibroblastů kultivovaných na strukturovaném PS (s označením č. 2) lze vidět na obrázku 22. Buňky mají jak v dynamické fázi, tak ve statické fázi zaoblednější tvary ve srovnání s referencí. Rozdíl v podmínkách kultivace se projevil především v množství přeživších buněk. Po kultivaci za dynamických podmínek zůstalo na povrchu adherovaných méně životaschopných buněk.

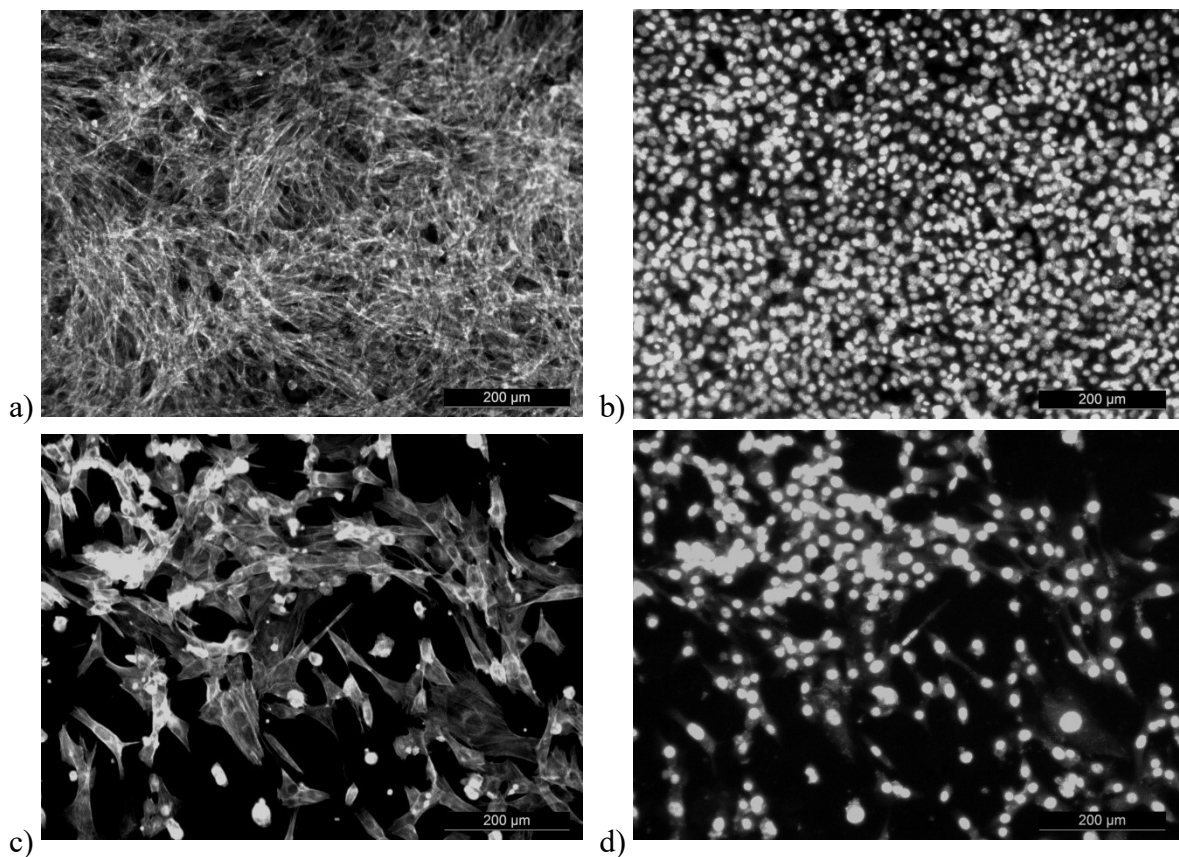
8.3 Výsledky *in vitro* zkoušek na polyanilinových filmech

Kvalifikační hodnocení vlivu vodivého polyanilinového (PANI) povrchu na myší fibroblasty bylo provedeno opět pomocí fluorescenční mikroskopie. Kvantifikace buněk nemohla být provedena MTT testem, neboť používaná chemikálie DMSO rozpouštěla kromě formazanu také syntetizovaný PANI film, jehož barva poté významně ovlivňovala výsledné hodnoty absorbance. Proto byla kvantifikace buněk provedena pomocí průtokové cytometrie. Výsledky byly otestovány nepárovými t-testy, které dokázaly, že průměry naměřených hodnot jsou statisticky průkazně rozdílné na hladině významnosti $p \leq 0,05$ (*), popřípadě $p \leq 0,001$ (***)



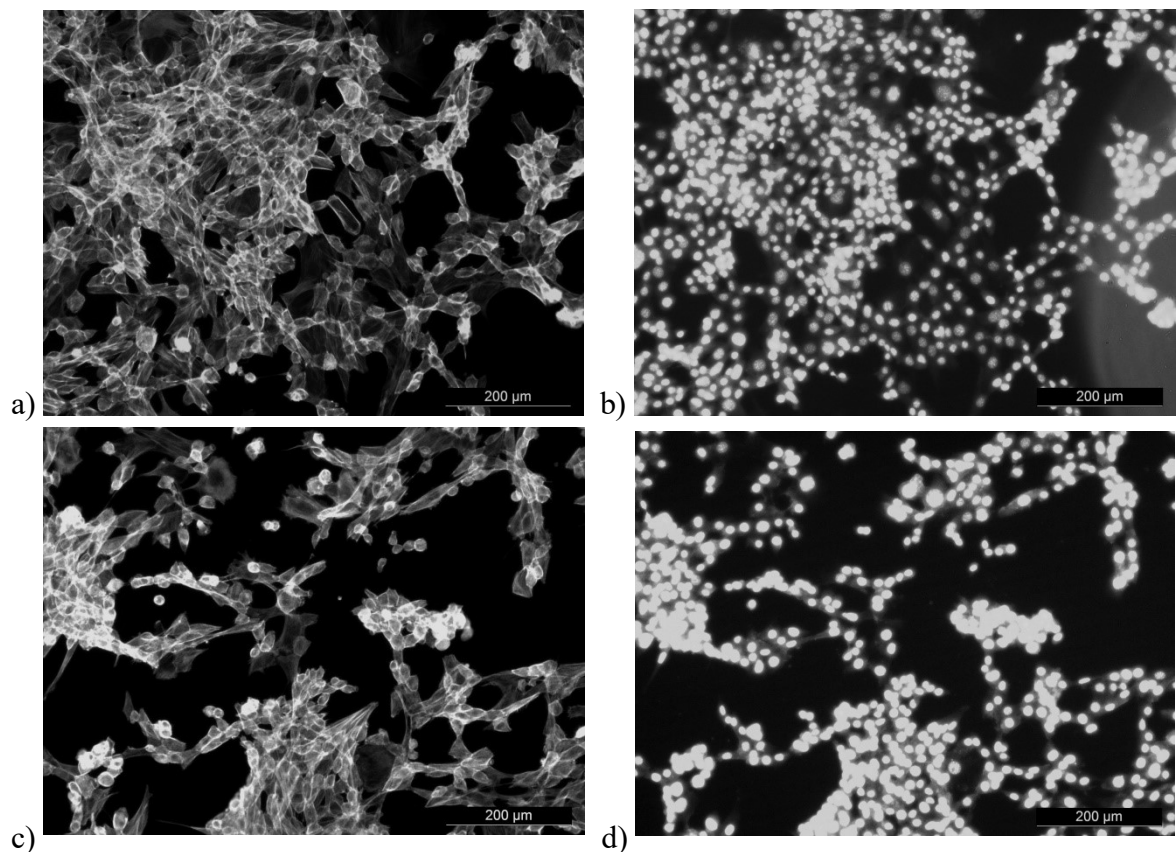
Obr. 23: Průměrný počet životoschopných buněk naměřených průtokovým cytometrem v závislosti na podmínkách kultivace: Referenční tkáňový polystyren (ref), syntetizovaný polyanilinový film (pani), statické podmínky (stat) nebo bioreaktor (bior) s rychlostí 5 rpm. (* - $p \leq 0,05$, *** - $p \leq 0,001$)

Jak lze vidět na obrázku 23, pro pozorované buňky je jednoznačně vhodnější referenční povrch nežli PANI filmy. Pravděpodobně proto, že PANI poskytuje horší povrchové vlastnosti pro růst pozorovaných myších fibroblastů. Co se týče podmínek kultivace, bioreaktor měl viditelně negativní vliv na počet životoschopných buněk, což mohlo být částečně způsobeno většími nároky na uchycení buněk a na jejich přežití a proliferaci, ale také z velké části nedokonale doladěnými podmínkami kultivace v bioreaktoru.



Obr. 24: Morfologie NIH/3T3 na čistém PS na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Při testování biokompatibility polyanilinového filmu byl zvolen jako referenční povrch čistý tkáňový polystyren (PS). Morfologii buněk narostlých na této referenci lze vidět na obrázku 24. Ve statické fázi došlo až k přemnožení buněk, jejichž tvar je přirozeně prodloužený a rozvětvený. V dynamické fázi došlo k již zmiňovanému poklesu počtu životaschopných buněk a také k lehkému zaoblení jednotlivých buněk, ale povětšinou si buňky zachovaly svoji přirozenou morfologickou strukturu.



Obr. 25: Morfologie NIH/3T3 na PANI filmu na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst.

Morfologie myších fibroblastů narostlých na syntetizovaných polyanilinových (PANI) filmech je k vidění na obrázku 25. Lze si všimnout, že tyto buňky mají stále protáhlý, místy zaoblený tvar (a to jak ve statické, tak v dynamické fázi). Je nutné také upozornit na to, že tyto buňky jsou vzájemně propojené a shlukované více, než je tomu běžné.

9 DISKUZE

Prvními testovanými vzorky byly nanotrubičky z oxidu titaničitého (TiO_2) s různými průměry (15, 50 a 100 nm), přičemž jako referenční povrch byla použita hladká titanová fólie. Tyto vzorky byly připraveny v kooperaci s Jožef Stefan Institut, Lublaň, Slovinsko, kde na nich byla již dříve provedena studie Kulkarni et al., 2007, jež se zabývala vlivem materiálů na prokaryotické bakteriální buňky (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*), eukaryotické kmenové buňky (ESC, MSC) a eukaryotické diferenciované buňky (kardiomocyty) za kultivace ve statických podmínkách. Až v této bakalářské práci byl studován vliv povrchové nanotopografie tohoto materiálu na myší fibroblasty, navíc za náročnějších dynamických podmínek kultivace. Pozorování narostlých buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu značně komplikoval fakt, že velká část buněk se vnořila do vnitřních struktur malých nanotrubic, kde je nebylo možné dostatečně dobře nabarvit fluorescenčními barvivy. Při vzájemném porovnání morfologie fibroblastů kultivovaných za statických podmínek na jednotlivých vzorcích, lze říci, že s rostoucím průměrem nanotrubic se struktura fibroblastů postupně zakulacovala a ztrácela tak rozvětvený tvar, který je pro fibroblasty typický při *in vitro* kultivaci. Dynamické fluidní namáhání buněk v bioreaktoru viditelně podpořilo vnořování buněk do strukturovaného povrchu. Za dynamických podmínek bylo pozorovaných nejvíce buněk na nanotrubicích s největším průměrem 100 nm, proto by mohl mít tento povrch na jednu stranu největší potenciál ve skutečném *in vivo* prostředí, ale na druhou stranu i tentokrát měly buňky zakulacenou 2D strukturu. Ve skutečnosti však mohou být buňky protáhlé a různě tvarované napříč nanotrubicemi, což není možné sledovat klasickým fluorescenčním mikroskopem. Podrobnější sledování morfologie buněk ve 3D strukturách by bylo možné pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu, ale pro nedostatek času nebylo možné toto pozorování provést.

Druhým testovaným materiálem byl strukturovaný polystyren s dvěma různými povrchovými topografiemi. Tyto vzorky byly připraveny v kooperaci s Ústavem fyziky a materiálového inženýrství v rámci fakulty technologické na Univerzitě Tomáše Bati, Zlín, Česká republika. Na těchto površích již byla testována biokompatibilita s myšími fibroblasty, o níž se píše ve studii Wrzecionko et al., 2017. Nicméně se opět jednalo o *in vitro* zkoušky pouze ve statických podmínkách, tedy při volném uložení v inkubátoru, kdežto v této bakalářské práci byl pozorován vliv povrchové nanotopografie těchto strukturovaných polystyrenů (a čistého tkáňového polystyrenu jakožto reference) na myší fibrob-

lasty za náročnějších dynamických podmínek kultivace. Fibroblasty kultivované na strukturovaném polystyrenu č. 1 měly obzvláště v dynamické fázi různorodé tvary, jak kulaté, tak i značně protáhlé. Nutno podotknout, že fibroblasty kultivované na stejném povrchu ve zmiňované studii Wrzecionko et al., 2017, vypadaly velmi podobně. Tato morfologická různorodost mohla být způsobena tím, že topografie tohoto vzorku není homogenní (jednotlivé póry se nachází poměrně daleko od sebe), proto se některé buňky mohly uchytit na rovné části povrchu a roztáhnout se, zatímco jiné buňky (zejména při dynamickém namáhání) se mohly vnořit do póru a přizpůsobit se jejich kulatému tvaru. Fibroblasty narostlé na strukturovaném polystyrenu č. 2 zaujaly specificky zaoblenější tvary ve srovnání s referencí. Téměř stejnou morfologii měly i fibroblasty kultivované na stejném povrchu v již zmiňované studii Wrzecionko et al., 2017.

Třetím testovaným materiálem byl polyanilinový (PANI) film, který byl syntetizován na tkáňovém polystyrenu, přičemž čistý tkáňový polystyren sloužil jako reference. PANI filmy byly vyrobeny v rámci této bakalářské práce podle metodiky uvedené výše v podkapitole: „Syntéza polyanilinových filmů“. Na PANI filmech již byly kultivovány různé buněčné kultury, například ve studii Humpolíček et al., 2015, byla pozorována kardiomyogeneze a neurogeneze ESC. Ovšem opět byly veškeré *in vitro* zkoušky prováděny pouze ve statických podmínkách, a proto byl v této bakalářské práci pozorován vliv vodivých PANI filmů na buněčnou linii myších fibroblastů za náročnějších dynamických podmínek. Na PANI filmech jak ve statické, tak v dynamické fázi zaujaly fibroblasty oválný tvar (vhodně protáhlý, ale částečně zaoblený). Je žádoucí také upozornit na to, jak jsou tyto buňky vzájemně propojené a shlukované více, než je tomu u referenčního nevodivého povrchu, kde jsou buňky víceméně rovnoměrně rozprostřené. U PANI filmu byla provedena kromě fluorescenční mikroskopie také průtoková cytometrie. Lze shrnout, že fibroblasty lépe proliferovaly na tkáňovém PS než na PANI filmech. Pravděpodobně proto, že PANI neposkytuje tak dobré povrchové vlastnosti pro růst myších fibroblastů jako tkáňový PS. Co se týče podmínek kultivace, bioreaktor měl viditelně negativní vliv na počet životaschopných buněk. Tento efekt byl částečně očekáváný, neboť lze logicky předpokládat, že dynamické fluidní namáhání v bioreaktoru, jenž připodobňuje *in vivo* prostředí, bude klást větší nároky na uchycení buněk k povrchu a celkově na jejich přežití a proliferaci. Nicméně hlavní příčinou poklesu životaschopnosti buněk byly pravděpodobně nedostatečně doladěné podmínky pěstování buněk v bioreaktoru, např. celková doba kultivace či rychlost otáčení bioreaktoru.

Touto bakalářskou prací však bádání v této oblasti nekončí, naopak začíná. Všem testovaným materiálům bude dále věnována pozornost (např. v nadcházející diplomové práci), neboť je v plánu využít jednoduchou a účinnou aplikaci vodivého polyanilinu na různě strukturované povrchy z rozlišných materiálů. Vytvořením PANI filmu na těchto materiálech by se zajistil chemicky vhodný a jednotný povrch, který by byl navíc vodivý, ale přitom by zůstala zachována specifická nanotopografie strukturovaných substrátů.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypořádání vlivu povrchové nanotopografie dvou potenciálně biomimetických materiálů (nanotrubice z TiO_2 , strukturovaný polystyren) a vlivu elektrické vodivosti jednoho potenciálně biomimetického materiálu (polyanilinový film) na morfologii buněčné linie myších fibroblastů. Bylo zjištěno, že s rostoucím průměrem nanotubic se 2D struktura fibroblastů postupně zakulacuje, čímž fibroblasty ztrácí rozvětvený tvar typický při *in vitro* kultivaci. U strukturovaného polystyrenu závisí morfologie buněk především na vzdálenosti a velikosti jednotlivých pórů. V každém případě kultivace za dynamických podmínek v bioreaktoru viditelně podporuje vnořování buněk do vnitřních struktur testovaných povrchů. Dále je žádoucí upozornit na to, že fibroblasty pěstované na vodivém polyanilinovém filmu jsou vzájemně propojené a shlukované více, než je tomu u referenčního nevodivého tkáňového polystyrenu, kde jsou buňky víceméně rovnoměrně rozprostřené. Nicméně podle výsledků z průtokového cytometru je pro proliferaci myších fibroblastů vhodnější čistý tkáňový polystyren nežli polyanilinový film. I přesto je vhodné se polyanilinovým filmům věnovat nadále, neboť jeho potenciál v tkáňovém inženýrství spočívá nejen ve schopnosti vodit elektrický proud, ale také v jeho jednoduché a účinné aplikaci na různorodé povrchy. Proto je dalším plánovaným postupem (např. v diplomové práci) aplikace polyanilinu na různě strukturované povrchy z rozličných materiálů, čímž by se zajistil chemicky vhodný a jednotný povrch, který by byl navíc vodivý, ale přitom by zůstala zachována specifická nanotopografie strukturovaných substrátů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAN, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A.: *Flow cytometry: basic principles and applications*. Critical Reviews in Bionotechnology, 2017, Vol. 37, pp. 163–176, doi: 10.3109/07388551.2015.1128876

AUTUMN, K., Sitti, M., Liang, Y. A., Peattie, A. M., Hansen, W. R., Sponberg, S., Kenney, T. W., Fearing, R., Israelachvili, J. N., Full, R. J.: *Evidence for van der Waals adhesion in gecko setae*. PNAS, 2001, Vol. 99, pp. 12252–12256, doi: 10.1073/pnas.192252799

BAHUGUNA, A., Khan, I., Bajpai, V. K., Kang, S. C.: *MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug*. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2017, Vol. 12, pp. 115–118, doi: 10.3329/bjp.v12i2.30892

BARTHLOTT, W., Neinhuis, C.: *Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces*. Planta, 1997, Vol. 202, pp. 1–8, doi: 10.1007/s004250050096

BECHERT, D. W., Bruse, M., Hage, W., Meyer, R.: *Fluid mechanics of biological surfaces and their technological application*. Naturwissenschaften, 2000, Vol. 87, pp. 157–171, doi: 10.1007/s001140050696

BELLINGHAM, C. M., Lillie, M. A., Gosline, J. M., Wright, G. M., Starcher, B. C., Bailey, A. J., Woodhouse, K. A., Keeley, F. W.: *Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties*. Biopolymers, 2003, Vol. 70, pp. 445–455, doi: 10.1002/bip.10512

CATLEDGE, S. A., Vohra, Y. K., Bellis, S. L., Sawyer, A. A.: *Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2004, Vol. 4, pp. 986–989, doi: 10.1166/jnn.2004.137

CHEN, H.-C., Hu, Y.-C.: *Bioreactors for tissue engineering*. Biotechnology Letters, 2006, Vol. 28, pp. 1415–1423, doi: 10.1007/s10529-006-9111-x

CURTIS, A. S. G., Forrester, J. V., McInnes, C., Lawrie, F.: *Adhesion of cells to polystyrene surfaces*. The Journal of Cell Biology, 1983, Vol. 97, pp. 1500–1506, doi: 10.1083/jcb.97.5.1500

ČSN EN ISO 10993-5: *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (ÚNMZ), 2010

FU, J., Wang, Y.-K., Yang, M. T., Desai, R. A., Yu, X., Liu, Z., Chen, C. S.: *Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates*. Nature Methods, 2010, Vol. 7, No. 9, pp. 733–736, doi: 10.1038/nmeth.1487

GAJENDIRAN, M., Choi, J., Kim, S. J., Kim, K., Shin, H., Koo, H. J., Kim, K.: *Conductive biomaterials for tissue engineering applications*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2017, Vol. 51, pp. 12–26, doi: 10.1016/j.jiec.2017.02.031

GUPTA, P., Ismadi, M. Z., Verma, P. J., Fouras, A., Jadhav, S., Bellare, J., Hourigan, K.: *Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells*. Cytotechnology, 2016, Vol. 68, pp. 45–59, doi: 10.1007/s10616-014-9750-z

HABIBOVIC, P., Barrere, F., van Blitterswijk, C. A., de Groot, K., Layrolle, P.: *Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants*. Journal of the American Ceramic Society, 2002, Vol. 85, pp. 517–522, doi: 10.1111/j.1151-2916.2002.tb00126.x

HALLAB, N.: *Diagnosis of metal hypersensitivity in orthopedics*. Operative Techniques in Orthopaedics, 2017, Vol. 27, No. 3, pp. 168–177, doi: 10.1053/j.oto.2017.05.005

HARKNESS, J. M.: *A lifetime of connections – Otto Herbert Schmitt, 1913–1998*. Physics in Perspective, 2001, Vol. 4, pp. 456–490

HUMPOLÍČEK, P., Radaszkiewicz, K. A., Kašpárková, V., Stejskal, J., Trchová, M., Kuceková, Z., Vičarová, H., Pacherník, J., Lehocký, M., Minařík, A.: *Stem cell differentiation on conducting polyaniline*. The Royal Society of Chemistry Advances, 2015, Vol. 5, pp. 68796–68805, doi: 10.1039/c5ra12218j

IMBEAU, J.: What is the extra-cellular matrix (ECM) – obrázek [online] dostupné z <http://www.dr-jacques-imbeau.com/extracellularmatrix.html>, [cit. 24. 4. 2018]

ISHIKAWA-ANKERHOLD, H. C., Ankerhold, R., Drummen, G. P. C.: *Advanced fluorescence microscopy techniques – FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. Molecules, 2012, Vol. 17, pp. 4047–4132, doi: 10.3390/molecules17044047

KAMMULA, R. G., Morris, J. M.: *Considerations for the biocompatibility evaluation of medical Devices*. Medical Device & Diagnostic Industry, 2001, MDDI [online] dostupné z <https://www.mddionline.com/considerations-biocompatibility-evaluation-medical-devices>, [cit. 20. 12. 2017]

KULKARNI, M., Junkar, I., Humpolíček, P., Capáková, Z., Radaszkiewicz, K. A., Mikušová, N., Pacherník, J., Lehocký, M., Iglič, A., Hanáčková, M., Mozetič, M.: *Interaction of nanostructured TiO₂ biointerfaces with stem cells and biofilm-forming bacteria*. Materials Science and Engineering: C, 2017, Vol. 77, pp. 500–507, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.174

LIU, X., Ma, P. X.: *Polymeric scaffolds for bone tissue engineering*. Annals of biomedical engineering, 2004, Vol. 32, pp. 477–486, doi: 10.1023/B:ABME.0000017544.36001.8e

MA, P. X.: *Biomimetic materials for tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, Vol. 60, pp. 184–198, doi: 10.1016/j.addr.2007.08.041

MASZYBROCKA, J., Stwora, A., Gapiński, B., Skrabalak, G., Karolus, M.: *Morphology and surface topography of Ti6Al4V lattice structure fabricated by selective laser sintering*. Bulletin of the Polish Academy of Sciences – Technical Sciences, 2017, Vol. 65, pp. 85–92, doi: 10.1515/bpasts-2017-0011

MEREDITH, D. O., Eschbach, L., Riehle, M. O., Curtis, A. S. G., Richards, R. G.: *Microtopography of metal surfaces influence fibroblast growth by modifying cell shape, cytoskeleton, and adhesion*. Journal of Orthopaedic Research, 2007, Vol. 25, pp. 1523–1533, doi: 10.1002/jor.20430

MITALIPOV, S., Wolf, D.: *Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming*. Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology, 2009, Vol. 114, pp. 185–199, doi: 10.1007/10_2008_45

NITSCHKE, M., Schmack, G., Janke, A., Simon, F., Pleul, D. and Werner, C.: *Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): Toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002, Vol. 59, pp. 632–638, doi: 10.1002/jbm.1274

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development: *Test No. 433: Acute inhalation toxicity: Fixed concentration procedure*. OECD, Paris, 2017, 21 p, doi: 10.1787/9789264284166-en

PARKER, A. R., Hegedus, Z., Watts, R. A.: *Solar-absorber type antireflector in the eye of an Eocene fly (45Ma)*. Proceedings of the Royal Society B, 1998, Vol. 265, pp. 811–815, doi: 10.1098/rspb.1998.0364

PASSINI, E., Britton, O. J., Lu, H. R., Rohrbacher, J., Hermans, A. N., Gallacher, D. J., Greig, R. J. H., Bueno-Orovio, A., Rodriguez, B.: *Human in silico drug trials demonstrate higher accuracy than animal models in predicting clinical pro-arrhythmic cardiotoxicity*. Frontiers in Physiology, 2017, Vol. 8, doi: 10.3389/fphys.2017.00668

PETROVIĆ, Z. S., Javni, I., Divjaković, V.: *Structure and physical properties of segmented polyurethane elastomers containing chemical crosslinks in the hard segment*. Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, 1998, Vol. 36, pp. 221–235, doi: 10.1002/(SICI)1099-0488(19980130)36:2<221::AID-POLB3>3.0.CO;2-U

PFAFF, H. G.: *Ceramic component failure and the role of proof testing*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2000, Vol. 379, pp. 29–33

PICOT, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., Boulanger, C. M.: *Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation*. Cytotechnology, 2012, Vol. 64, pp. 109–130, doi: 10.1007/s10616-011-9415-0

RAMSEY, W. S., Hertl, W., Nowlan, E. D., Binkowski N. J.: *Surface treatments and cell attachment*. In Vitro, 1984, Vol. 20, pp. 802–808

SCHMALZ, G., Bindslev, D. A.: *Biocompatibility of dental materials*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 2009, 379 p, doi: 10.1007/978-3-540-77782-3

SCHMALZ, G., Schuster, U., Nützel, K., Schweikl, H.: *An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures*. Journal of Endodontics, 1999, Vol. 25, pp. 24–29, doi: 10.1016/S0099-2399(99)80394-X

SCHUSTER, U., Schmalz, G., Thonemann, B., Mendel, N., Metz, C.: *Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells*. Journal of Endodontics, 2001, Vol. 27, pp. 259–256, doi: 10.1097/00004770-200104000-00004

SINGH, P., Patel, R., Kumari, K., Mehrotra, G. K.: *Au/Ag NPS decorated PANI for electrochemical and biomedical applications*. Journal of Bioequivalence & Bioavailability, 2017, Vol. 9, pp. 377- 384, doi: 10.4172/jbb.1000328

STODDART, P. R., Cadusch, P. J., Boyce, T. M., Erasmus, R. M., Comins, J. D.: *Optical properties of chitin: surface-enhanced Raman scattering substrates based on antireflection structures on cicada wings*. Nanotechnology, 2006, Vol. 17, pp. 680–686, doi: 10.1088/0957-4484/17/3/011

TALLAWI, M., Rosellini, E., Barbani, N., Cascone, M. G., Rai, R., Saint-Pierre, G., Boccaccini A. R.: *Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review*. Journal of the Royal Society Interface, 2015, Vol. 12, doi: 10.1098/rsif.2015.0254

TAMADDON, M., Czernuszka, J.: *The need for hierarchical scaffolds in bone tissue engineering*. Hard Tissue, 2013, Vol. 2, pp. 37, doi: 10.13172/2050-2303-2-4-773

THÉVENOT, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S.: *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosensors and Bioelectronics, 2001, Vol. 16, pp. 121–131, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4

TUCKER, V. A.: *Gliding birds: reduction of induced drag by wing tip slots between the primary feathers*. Journal of Experimental Biology, 1993, Vol. 180, pp. 285–310

UNADKAT, H. V., Hulsman, M., Cornelissen, K., Papenburg, B. J., Truckenmüller, R. K., Carpenter, A. E., Wessling, M., Post, G. F., Uetz, M., Reinders, M. J. T., Stamatialis, D., van Blitterswijk, C. A. de Boer, J.: *An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate*. PNAS, 2011, Vol. 108, No. 40, pp. 16565–16570, doi: 10.1073/pnas.1109861108

VINCENT, J. F. V., Bogatyreva, O. A., Bogatyrev, N. R., Bowyer, A., Pahl A.-K.: *Biometrics: its practice and theory*. Journal of the Royal Society Interface, 2006, Vol. 3, pp. 471–482, doi: 10.1098/rsif.2006.0127

VOGLER, E. A.: *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 1998, Vol. 74, pp. 69–117, doi: 10.1016/S0001-8686(97)00040-7

WEST, J. L., Hubbell, J. A.: *Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration*. *Macromolecules*, 1999, Vol. 32, pp. 241–244, doi: 10.1021/ma981296k

WIKIPEDIA: Polyaniline nanofibers – obrázek [online] dostupné z https://en.wikipedia.org/wiki/Polyaniline_nanofibers#/media/File:Polyaniline_synthesis.jpg, [cit. 29. 4. 2018]

WILSON, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I., Pearcy, M.J.: *Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review*. *Tissue Engineering*, 2005, Vol. 11, pp. 1–18, doi: 10.1089/ten.2005.11.1

WRZECIONKO, E., Minařík, A., Smolka, P., Minařík, M., Humpolíček, P., Rejmontová, P., Mráček, A., Minaříková, M., Gřundělová, L.: *Variations of polymer porous surface structures via the time-sequenced dosing of mixed solvents*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, Vol. 9, pp. 6472–6481, doi: 10.1021/acsami.6b15774

YANG, M. S., Li, L. K.: *Preparation of high-rigidity, high-toughness unplasticized poly(vinyl chloride) for plastic windows profiles reinforced and toughened by nano-CaCO₃*. Sun, D., Sung, W. P., Chen, R.: *Frontiers of Green Building, Materials and Civil Engineering*. Switzerland, Trans Tech Publications LTD, 2011, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.71-78.1237

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFM	Mikroskop atomárních sil
ASC	Adultní kmenová buňka
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
ECM	Extracelulární matrice
ELP	Polypeptidy podobné elastinu
ESC	Embryonální kmenová buňka
ETH	2-ethoxyethanol
GaAs	Arsenid gallitý (arsenid galia)
HAp	Hydroxyapatit
HCl	Kyselina chlorovodíková
iPSC	Indukovaná pluripotentní kmenová buňka
MMPs	Matricové metaloproteasy
MSC	Mezenchymální kmenová buňka
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NT	Nanotrubice
p	Hladina významnosti
PANI	Polyanilin
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCL	Poly(ϵ -kaprolakton)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
PEDOT	Poly(3,4-ethylendioxythiofen)

PEG	Polyethylenglykol
PGA	Kyselina polyglykolová
PLA	Kyselina polymléčná,
PLGA	Kopolymery kyselin polymléčné a polyglykolové
PPy	Polypyrrol
PS	Polystyren
PU	Polyuretan
rpm	Počet otáček za minutu
SCNT	Přenos jader somatických buněk
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop
THF	Tetrahydrofuran
Ti	Titan
TiO ₂	Oxid titaničitý

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Schématické zobrazení poklesu vývojového potenciálu kmenových buněk zakončený terminálně diferencovanými somatickými buňkami, jejichž vývojový potenciál lze obnovit do totipotentního stavu (pomocí SCNT) nebo pluripotentního stavu (přímým přeprogramováním). (Mitalipov et al., 2009)..... 16
- Obr. 2: Míchaná baňka („spinner flask“) s vnitřním rotorem připojeným ke krokovému motoru. (Gupta et al., 2016)..... 17
- Obr. 3: Čtyř-komorový rotující stěnový bioreaktor. (zdroj fotografie vlastní) 18
- Obr. 4: Chemický vzorec MTT (nahore) a formazanu (dole). (Bahuguna et al., 2017) 19
- Obr. 5: Schéma výše popsaného principu průtokového cytometru. (Picot et al., 2012) 20
- Obr. 6: Tok paprsků ve zjednodušeném schématu fluorescenčního mikroskopu s dichroickým zrcadlem. (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012)..... 21
- Obr. 7: Gekon obrovský (Gekko gecko) přilnutý k hladkému hydrofóbnímu GaAs polovodiči. Silná přilnavost mezi hydrofóbním povrchem prstů gekona a hydrofóbním povrchem GaAs demonstruje, že mechanismem adheze jsou van der Waalsovy síly. (Autumn et al., 2001) 23
- Obr. 8: Příklad přírodního hierarchického systému – kost. (Tamaddon et al., 2013) 25
- Obr. 9: Srovnání struktur dvou ELP (EP20-24 a EP20-24-24) a tropoelastinu před koacervací, 10 min po koacervaci a po inkubaci přes noc při koacervační teplotě. Syntetizované struktury jsou velmi podobné strukturám tvořeným tropoelastinem (obzvláště EP20-24-24, struktury EP20-24 jsou po inkubaci méně kompaktní a organizované). Všechna měřítka představují 100 nm. (Bellingham et al., 2003) 27
- Obr. 10: Schéma zakotvení buněk v jejich přirozeném prostředí. (Imbeau, online) 28
- Obr. 11: Morfologie lidských MSC na různých čípech. (A–D): Prodloužené buňky, které vykazují zarovnání podle topografických znaků (fluorescenční mikroskop, zelená – aktin, červená – jádro, měřítko: 90 μm). (E–H): Buňky s různými morfologiemi (rastrovací elektronový mikroskop SEM, měřítko: 90 μm). (I–J): Morfologie zaoblených buněk na dvou odlišných čípech, které se liší v struktuře buněčné membrány. (SEM, měřítko: 10 μm). (Unadkat et al., 2011)..... 31
- Obr. 12: a) Elastomerní mikropilíře („micromolded elastomeric micropost arrays“) z PDMS s třemi různými výškami L v reakci na vodorovnou tažnou sílu F. b)

- Závislost výchylky mikropilíře δ na vodorovné tažné síle F. c) Závislost nominální konstanty pružnosti K na výšce mikropilíře L. d), e), f) Lidské MSC umístěné na mikropilířích o různých délkách. SEM, měřítko: 100 μm (horní), 50 μm (vlevo dole), 30 μm (střed dole) a 10 μm (vpravo dole). (Fu et al., 2010)..... 33
- Obr. 13: Schéma syntézy polyanilinu a jeho různé molekulární struktury. (Wikipedia, online)..... 37
- Obr. 14: Povrchová morfologie titanové fólie (Ti-foil) a nanotrubic z TiO_2 (NT) o různých průměrech na snímkách pořízených rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM) a mikroskopem atomárních sil (AFM). Vpravo jsou uvedeny průměrné hodnoty drsnosti povrchu (Ra) měřené na pěti oblastech o velikosti 3 $\mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$. (Kulkarni et al., 2017) 40
- Obr. 15: Povrchová morfologie čistého polystyrenu (PS) a strukturovaných vzorků (nahore č. 1, dole č. 2) na schématu a na snímkách ze SEM (134 $\mu\text{m} \times 134 \mu\text{m}$). Vpravo jsou myší fibroblasty na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení: 100 \times , červená – aktin). (Wrzecionko et al., 2017) 41
- Obr. 16: Morfologie NIH/3T3 na Ti-foil na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100 \times): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst..... 48
- Obr. 17: Morfologie NIH/3T3 na NT 15 nm na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100 \times): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 49
- Obr. 18: Morfologie NIH/3T3 na NT 50 nm na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100 \times): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 50
- Obr. 19: Morfologie NIH/3T3 na NT 100 nm na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100 \times): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 51
- Obr. 20: Morfologie NIH/3T3 na čistém PS na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100 \times): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 52
- Obr. 21: Morfologie NIH/3T3 na struktur. PS č. 1 na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100 \times): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 53

- Obr. 22: Morfologie NIH/3T3 na struktur. PS č. 2 na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 54
- Obr. 23: Průměrný počet životaschopných buněk naměřených průtokovým cytometrem v závislosti na podmínkách kultivace: Referenční tkáňový polystyren (ref), syntetizovaný polyanilinový film (pani), statické podmínky (stat) nebo bioreaktor (bior) s rychlostí 5 rpm. (* - $p \leq 0,05$, *** - $p \leq 0,001$) 55
- Obr. 24: Morfologie NIH/3T3 na čistém PS na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 56
- Obr. 25: Morfologie NIH/3T3 na PANI filmu na snímkách z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100×): a) statická fáze ActinRed, b) statická fáze Hoechst, c) dynamická fáze ActinRed, d) dynamická fáze Hoechst. 57