

Elektricky vodivé scaffoldy na bázi polypyrrolu a chitosanu

Anna Plíšková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Anna Plíšková
Osobní číslo: T21148
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Elektricky vodivé scaffoldy na bázi polypyrrolu a chitosanu

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Zpracujte literární přehled týkající se vlastností vodivých polymerů se zaměřením především na polyaniline a polypyrrole a jejich využití v tkáňovém inženýrství.

Popište problematiku kultivace buněčných linií na 2D a 3D strukturách.

II. Praktická část:

Připravte elektricky vodivé filmy a koloidy na bázi polypyrrolu a chitosanu.

Připravte 3D strukturu na bázi polypyrrolu a chitosanu.

Otestujte biologické vlastnosti Vámi připraveného scaffoldu.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] HUMPOLICEK P. et al. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 2018, 91, pp 303-310, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.037>.
- [2] BALINT R. et al. Cartmell, "Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering", *Acta Biomater.*, roč. 10, č. 6, s. 2341–2353, čer. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.015.
- [3] STEJSKAL J. and GILBERT R. G. "Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, roč. 74, č. 5, s. 857–867, led. 2002, doi: 10.1351/pac200274050857.
- [4] KAPALCZYŃSKA M. et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*, 2018, 14 (4), pp 910-919, doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [5] DUVAL K. et. al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 2017, 32 (4), pp 266-277, doi: 10.1152/physiol.00036.2016.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kateřina Skopalová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Anna Plíšková

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na vodivé polymery využívané v oblasti tkáňového inženýrství. Vodivé polymery jsou široce studovány díky jejich biokompatibilním a elektrickým vlastnostem. Mohou tak poskytovat vhodný substrát pro buňky a zároveň umožňovat jejich stimulaci elektrickým proudem a řídit tak buněčné procesy. Tato práce byla konkrétně zaměřena na přípravu koloidní roztoků, filmů a 3D struktur (scaffoldů) z polypyrrolu a chitosanu. Pro testování biologických vlastností připravených materiálů byla použita linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 a myší embryonální kmenové buňky ES R1. Oba typy buněčných linií vykazovaly dobrou proliferaci na připravených filmech. Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě proliferace na scaffoldech, kde byla ale proliferace kmenových buněk ES R1 nižší, než tomu bylo u myších fibroblastů. Scaffoldy vytvořené z polypyrrolu a chitosanu se tak jeví jako slibní kandidáti pro využití v tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova: Vodivé polymery, proliferace, koloidní film, koloidní disperze, polypyrrol, chitosan, scaffold

ABSTRACT

The presented bachelor thesis is focused on conductive polymers used in the field of tissue engineering. Conductive polymers are widely studied due to their biocompatible and electrical properties. Thus, they can provide a suitable substrate for cells while allowing their stimulation by electrical current to control cellular processes. This work was specifically focused on the preparation of colloidal solutions, films and 3D structures (scaffolds) from polypyrrole and chitosan. The mouse embryonic fibroblast line NIH/3T3 and mouse embryonic stem cell line ES R1 were used to test the biological properties of the prepared materials. Both cell lines showed good proliferation on the prepared films. Similar results were obtained for proliferation on scaffolds, but the proliferation of ES R1 stem cells was lower than that of mouse fibroblasts. Based on the results, scaffolds formed from polypyrrole and chitosan seem to be promising candidates for use in tissue engineering.

Keywords: Conductive polymers, proliferation, colloidal film, colloidal dispersion, polypyrrole, chitosan, scaffold

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. za její cenné rady a profesionální vedení, vstřícný přístup, podporu a věnovaný čas během celého procesu psaní. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za povzbuzení a motivaci, kterou mi poskytovali.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 REGENERATIVNÍ MEDICÍNA.....	11
2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	12
2.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	13
2.2 BUNĚČNÉ KULTURY	14
3 BIOMATERIÁLY.....	16
3.1 BIODROPATIBILITA	17
3.2 SCAFFOLDY A 3D STRUKTURA	18
4 VODIVÉ POLYMERY.....	20
4.1 HISTORIE.....	20
4.2 VODIVÉ POLYMERY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	21
4.2.1 Polypyrrol.....	22
4.2.2 Polyanilin	23
4.3 SYNTÉZA VODIVÝCH POLYMERŮ	25
4.4 BIODEGRADABILITA VODIVÝCH POLYMERŮ	26
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	28
5 CÍL PRÁCE	29
6 MATERIÁL A METODIKA	30
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	30
6.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	30
6.3 BUNĚČNÉ KULTURY A MÉDIUM	31
7 EXPERIMENT.....	32
7.1 KULTIVACE A PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK	32
7.2 PŘÍPRAVA FILMŮ A KOLOIDŮ.....	32
7.3 PŘÍPRAVA 3D SCAFFOLDŮ.....	34
7.4 SEM ANALÝZA.....	34
7.5 PROLIFERACE A BARVENÍ BUNĚK	35
8 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
8.1 STRUKTURA PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ	36
8.2 PROLIFERACE BUNĚK NA KOLOIDNÍCH FILMECH.....	37
8.3 PROLIFERACE BUNĚK NA SCAFFOLDECH.....	40
ZÁVĚR	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	47

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	51
SEZNAM OBRÁZKŮ	52

ÚVOD

V dnešní době, kdy se neustále rozvíjejí nové technologie a materiály, nabývá výzkum v oblasti vodivých polymerů stále většího významu, zejména s ohledem na jejich potenciál v biomedicíně a tkáňovém inženýrství. Právě tkáňové inženýrství se stalo klíčovým oborem pro rozvíjení biologických principů a metod, který přináší revoluční přístupy k regeneraci a nahrazování poškozených tkání a orgánů. Podstatou úspěchu těchto postupů jsou správně zvolené buňky a materiály, které slouží jako základ pro tvorbu scaffoldů, filmů a koloidních disperzí. Nejčastějším typem buněk, které se využívají v tkáňovém inženýrství jsou buňky kmenové, díky svým vlastnostem jako je sebeobnova a možnost diferenciaci. Materiály pak musí být schopny podporovat buněčný růst, diferenciaci a interakci s buňkami, což vyžaduje specifické vlastnosti. Buněčná terapie, která nevyžaduje použití scaffoldu, představuje inovativní přístup k regeneraci tkání, který se zaměřuje na přímé osazení buněk do postižené oblasti bez externí podpory materiálu. Na druhé straně, tkáňové inženýrství vyžaduje použití scaffoldu jako podpory pro regeneraci tkáně, kde je klíčové, aby scaffold splňoval určité požadavky, jako je propojení mikropórů pro efektivní adhezi a migraci buněk. (Ikada, 2006) Scaffoldy musí být kompatibilní s různými typy buněk specifickými pro danou tkáň a s požadovaným prostředím v lidském těle. Při návrhu scaffoldu je nutné brát ohled na specifické vlastnosti, jako jsou velikost pórů, geometrie a prostorová distribuce, které ovlivňují chování buněk. (Shafiee a Atala, 2017)

Vodivé polymery představují jednu z unikátních tříd materiálů v oblasti tkáňového inženýrství pro jejich schopnost vést elektrický proud a interagovat s biologickým prostředím. V teoretické části je rozvedeno, které nejnámější vodivé polymery nabízejí kombinaci vodivosti, biokompatibility a snadné manipulace, a jsou tak dobrými kandidáty na využití v tkáňovém inženýrství.

Tato bakalářská práce si v praktické části klade za cíl prozkoumat využití polypyrrolu a chitosanu při tvorbě filmů, koloidních disperzí a scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Důraz bude kladen na procesy přípravy těchto struktur a jejich vlastností. Dalším cílem je biologicky testovat tyto materiály, konkrétně jejich schopnost podpory buněčné proliferace. Výsledky byly vyhodnoceny pořízením fotografií z konfokální mikroskopie. Jako buněčné linie byly použity myší embryonální fibroblasty NIH/3T3 a myší embryonální kmenové buňky ESR1.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 REGENERATIVNÍ MEDICÍNA

Regenerativní medicína je definována jako proces náhrady nebo obnovy lidských buněk, tkání nebo orgánů s cílem obnovit jejich funkčnost. (Baptista a Atala, 2016) Jedná se interdisciplinární obor, který závisí na spolupráci s dalšími obory jako je biologie, chemie, inženýrství a medicína. (Salgado *et al.*, 2013)

Pro dosažení obnovy normální funkce buněk, tkání nebo orgánů prostřednictvím jejich nahrazení se využívají různé techniky, jako je terapie kmenovými buňkami, tkáňové inženýrství a genová terapie. (Ip, 2012) Konečným cílem je vyvinout terapie, které mohou opravit nebo nahradit poškozené nebo nemocné tkáně a orgány, a tím zlepšit kvalitu života pacientů a případně snížit potřebu transplantace orgánů. Regenerativní medicína je založena na přirozené schopnosti těla samo se uzdravovat, a jejím cílem je využít tuto schopnost k vytvoření nových léčebných postupů pro širokou škálu onemocnění, od degenerativních chorob až po úrazy. (Baptista a Atala, 2016)

První zmínky o regenerativní medicíně sahají až do starověkých civilizací, kdy napříč staletími šamani, apatykáři a alchymisté usilovali o obnovu tělesných funkcí. Historie regenerativní medicíny se vyznačuje významnými pokroky, od raných postupů čištění ran a transplantace kůže až po novější objevy kmenových buněk a tkáňového inženýrství. (Baptista a Atala, 2016)

Experimentální výzkum a chirurgické pokroky v oblasti transplantace tkání a rekonstrukční chirurgie probíhaly v průběhu 19. a na počátku 20. století. Objasnění biologických procesů, jež měl přínos pro tento obor, sepsal Rudolf Virchow ve své publikaci "Buněčná patologie". Zde popsal, že regenerace tkání je podmíněna buněčnou proliferací. To vedlo ke zkoumání buněčných jevů zodpovědných za hojení tkání a ke kultivaci buněk mimo tělo. Později byl prokázán aktivní růst buněk v kultuře, a tak byly položeny základy klasického tkáňového inženýrství, které je jednou ze součástí regenerativní medicíny. (Baptista a Atala, 2016)

2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství (TI) je obor biomedicínského inženýrství, který spojuje biologii s materiálovým inženýrstvím, a aplikuje inženýrské principy k vytváření tkání nebo buněčných produktů mimo tělo. (McClelland *et al.*, 2012) Toto odvětví využívá znalostí z mnoha biologických, biochemických oborů či strojího inženýrství, polymerních věd a bioreaktorů. (McClelland *et al.*, 2005) Postupné rozšíření a vytváření specializovaných mimotělních systémů pro podporu života, které zahrnuje buňky a tkáňové jednotky, jsou vhodné pro diagnostický screening. Kromě klinických aplikací se využívá také pro testování účinnosti a toxicity léků a provádění základních studií o vývoji tkání a morfogenezi. (Berthiaume, Maguire a Yarmush, 2011)

Pro dosažení funkčního konstruktů (scaffoldu) využitelného v TI je mimo jiné velmi důležitá volba buněčných linií. Často se setkáváme s využitím kmenových buněk díky jejich schopnosti diferencovat. (Salgado *et al.*, 2013) V TI se diferenciací rozumí proces, při kterém jsou buňky nebo tkáně přivedeny k tomu, aby nabyly své specifické, funkční zralosti. Stávají se typem buňky s určitou specializací a tato změna je obvykle nevratnou změnou směrem k určitému funkčnímu stavu. (McClelland *et al.*, 2012) Tento proces má zásadní význam pro úspěšné fungování vytvořené tkáně. Během implantace se mohou živé buňky přesunout do implantátu nebo mohou být před implantací kombinovány s matricí během buněčné kultivace. Takto kultivované buňky pak mohou být izolovány jako plně diferencované buňky tkáně, kterou mají tvořit, nebo mohou být geneticky upraveny tak, aby plnily požadovanou funkci, pokud jsou získány z jiných tkání nebo zdrojů kmenových buněk. (Vacanti a Vacanti, 2014)

Odhalování biologických tajemství prostřednictvím vědeckých zkoumání nemocí a zranění souvisí s objevem a vývojem umělých nebo protetikých materiálů pro náhradu končetin, zubů a dalších tkání, což vede k částečnému obnovení ztracené funkce. Byl také vyvinut koncept využití jedné tkáně jako náhrady jiné. V 16. století popsal Tagliacozzi z italské Boloně ve svém díle náhradu nosu zkonstruovanou ze štěpu předloktí. V 19. století, s vědeckým poznáním teorie nemocí a zavedením sterilních technik, vznikla moderní chirurgie. Zavedení anestezie v polovině 19. století umožnilo rychlý rozvoj mnoha chirurgických technik. (Vacanti a Vacanti, 2014) První léčebné postupy založené na tkáních byly představeny v podobě transplantace kůže. Následně se objevily metody pro uchovávání buněk a tkání, což vedlo k vytvoření alogenních bank kůže, kde se tyto kožní štěpy staly

hotovým produktem. První syntetická náhrada kůže, kterou údajně používalo několik výzkumníků, byla vyvinuta v roce 1962. Nicméně první úspěšné výrobky z oblasti TI byly skutečně realizovány až v letech 1970 až 1980, tedy na přelomu 70. a 80. let 20. století. Je to například první tkáňová kožní konstrukce vyvinutá Howardem Greenem na Harvard Medical School. Jedná se o produkt Epicel, u kterého byla použita inovativní technika pěstování kožního epidermis z kožní biopsie pacienta. Izolované keratinocyty pacienta byly kokultivovány s myšími mezenchymálními buňkami a mohly tak proliferovat. Tento výrobek se využívá k pokrytí pacientů s rozsáhlými kožními popáleninami, kteří nemají dostatek životaschopné kůže pro tradiční autotransplantaci. (Berthiaume, Maguire a Yarmush, 2011)

2.1 Základní principy tkáňového inženýrství

Pro TI je nezbytné vytvořit trojrozměrné prostředí, které je obvykle dosaženo pomocí porézního scaffoldu. Tato struktura musí být navržena tak, aby poskytovala podporu a prostředí pro růst buněk. Kromě scaffoldu jsou nezbytné také vhodné buňky a růstové faktory. Buňky jsou zodpovědné za syntézu nové tkáně, zatímco scaffold poskytuje prostor pro množení buněk a zajišťuje jim podmínky pro optimální funkci. Růstové faktory jsou důležité, protože podporují a stimulují buňky při procesu regenerace nové tkáně, což přispívá k celkovému úspěchu TI. Výběr vhodného zdroje buněk je rovněž klíčovým aspektem TI. Existují tři hlavní typy buněk používaných v této disciplíně: autologní, alogenní a xenogenní. (Aker, 2016) Buňky autologní jsou získané buňky z těla jedince a transplantovány či použity k léčbě téhož jedince, přičemž se minimalizuje riziko imunitní odpovědi nebo odmítnutí. (Bartel, 2015) Alogenní buňky jsou buňky, které jsou získány od jiného jedince, než je příjemce, a jsou použity k léčbě pacienta. V léčbě leukémie a lymfomů se často používají při alogenní transplantaci, kdy jsou buňky získány od vhodného dárce a přeneseny do těla pacienta. Získání těchto buněk může probíhat buď tradičním odběrem z kostní dřeně, nebo preferovanějším odběrem z periferních kmenových buněk, kde jsou buňky filtrovány z krve dárce. (Trebuňová, M. a Šromovská, K., 2018) Xenogenní buňky mohou být izolovány z různých živočišných orgánů a rozšířeny *in vitro*, přičemž si zachovávají vlastnosti původních orgánů. Prase je považováno za jedno z nejvhodnějších zvířecích zdrojů xenogenních buněk, protože se podobá člověku svojí fyziologií, nebo je zde i možnost genetické modifikace buněk. (Huang, Yang a Shyr, 2021) Nicméně xenotransplantace má

řadu omezení, včetně etických a virologických otázek, které je třeba řešit v kontextu regenerativní medicíny a TI.

Bioreaktory, které mechanicky ovlivňují biologické procesy za přísně sledovaných podmínek, jsou další důležitou součástí TI. Jejich použití může zvýšit účinnost buněčných kultur a zkrátit dobu trvání procesu, což má přímý vliv na kvalitu výsledné tkáně. (Akter, 2016)

2.2 Buněčné kultury

Buněčné kultury představují klíčový nástroj v moderní biomedicíně s širokým a praktickým využitím v mnoha oblastech, včetně hodnocení účinnosti a toxicity léčiv, výroby vakcín a biofarmak a v technologii asistované reprodukce. Jejich rostoucí úspěchy a zvyšující se zájem odborné veřejnosti otevřely nové možnosti v oblasti regenerativní medicíny, kde se stávají klíčovým nástrojem pro léčbu poranění, degenerativních onemocnění a dalších zdravotních problémů. Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje úspěch buněčných kultur, je kultivační médium. Kvalita tohoto média má zásadní vliv na životaschopnost a funkčnost buněk, a tím i na výsledky experimentů a terapeutických aplikací. (Yao a Asayama, 2017)

První náznak kultivačních experimentů proběhl v roce 1882, kdy Sydney Ringer vyvinul Ringerův roztok, první vyvážený roztok solí podobný tělním tekutinám, který umožnil udržet žabí srdce v chodu *in vitro*. Tento úspěch vedl k vývoji dalších vyvážených solných roztoků, jako jsou Lockův, Tyrodeův, Krebsova-Ringerova, Geyův, Earleův a Hanksův roztok. Tyto roztoky mají jednoduché složení obsahující anorganické soli, někdy také glukózu jako živinu, a jsou kalibrovány na fyziologické hodnoty pH, osmotického tlaku a koncentrace solí. Umožňují tak úspěšně udržovat tkáň a buňky mimo tělo po krátkou dobu, obvykle do několika dnů. Po úspěchu Ringerova roztoku se výzkumníci začali zaměřovat na udržení buněk v kultivačních zařízeních, ale většina buněk nepřežila. V roce 1907 Ross G. Harrison však úspěšně sledoval mitotické procesy v nervových vláknech žáby po dobu několika týdnů v lymfatické tekutině. Tento pokus je považován za počátek vývoje kultivace živočišných buněk. (Yao a Asayama, 2017)

Buňky jsou jednou ze tří klíčových složek, které se využívají v TI, jako multidisciplinární oblasti zaměřené na rekonstrukci biologických tkání, společně s materiály a bioaktivními faktory. Hrají klíčovou roli při tvorbě ztracené nebo poškozené tkáně, zatímco materiály slouží jako nosiče a lešení, která podporují růst a diferenciaci buněk. Mohou být izolovány

z dárcovské tkáně a poté uchovávány v různých podmínkách. Proces izolace začíná jednoduchým úlomkem tkáně, který se přichytí k růstu buď spontánně, nebo za pomoci mechanických prostředků, plazmatické sraženiny nebo složky extracelulární matrix, jako je kolagen. Tento úlomek vytváří primární explantát, kde buňky migrující ven jsou známy jako výrůstky. Tyto buňky jsou vybírány podle své schopnosti migrovat z explantátu a následně podle jejich schopnosti proliferace. Pokud se vzorek tkáně rozdělí, vznikne suspenze buněk a malých agregátů, které se spojí s pevným substrátem, čímž se vytvoří pevný substrát monovrstvy. Buňky v monovrstvě, které jsou schopné proliferace, jsou pak vybrány při první subkulturaci a mohou dát vzniknout buněčné linii. Tento proces je klíčovým krokem při přípravě buněčných kultur pro použití v TI a dalších biomedicínských aplikacích. (Vunjak-Novakovic a Freshney, 2005)

Rozdělení buněk na různé typy a jejich schopnost kultivace v buněčných kulturách je základem pro výzkum v oblasti biotechnologií a regenerativní medicíny. Jedním z hlavních typů jsou kmenové buňky, které jsou schopny sebeobnovy a diferenciací do různých buněčných typů. Zygota, první forma organismu, je příkladem totipotentních buněk, zatímco pluripotentní embryonální kmenové buňky mají schopnost diferencovat se do všech buněčných typů těla. Dospělé kmenové buňky, jako jsou multipotentní mezenchymální buňky, jsou důležité pro regeneraci tkání. (Segeritz a Vallier, 2017)

Buněčné linie pro kultivaci buněk mohou být jinak rozděleny do tří typů: primární, transformované a samoobnovující se. Primární buňky, jako jsou například fibroblasty z kožních biopsií nebo hepatocyty z explantátů jater. Jsou přímo izolovány z lidské tkáně a často se používají v biomedicínském výzkumu. Transformované buňky mohou být vytvořeny přirozeně nebo genetickou manipulací a poskytují stabilní podmínky pro kultivaci, ale mohou mít také genotypové a fenotypové změny. Samoobnovující se buňky, jako jsou embryonální kmenové buňky nebo indukované pluripotentní buňky, mají schopnost diferencovat se do různých buněčných typů a zůstat dlouhodobě udržitelné v kultuře *in vitro*. (Segeritz a Vallier, 2017)

3 BIOMATERIÁLY

Biomateriály jsou definovány jako materiály určené pro lékařské, zubní, veterinární nebo farmaceutické aplikace, které vstupují do těsného a trvalého kontaktu s biologickým materiálem, zejména tkáněmi. Jejich účelem je optimálně fungovat v tomto prostředí a být kompatibilní s tělesnými tkáněmi, do nichž jsou často implantovány. Charakterizovány jsou tedy jako neživé materiály, které jsou navrženy tak, aby interagovaly s biologickými systémy. Biomateriály mají specifické vlastnosti, včetně chemických, mechanických, fyzikálních a biologických. Požaduje se od nich pevnost, odolnost vůči poškozením, tuhost, optická průhlednost či elektrická vodivost. Při posuzování základních biologických požadavků na biomateriál pro klinické použití je klíčové vzít v úvahu, že biologické požadavky na materiál mohou být různé v závislosti na konkrétní aplikaci. I při použití stejného biomateriálu se mohou biologické požadavky lišit mezi jednotlivými aplikacemi. (Williams, 1987)

Biomateriál, který má být uzpůsoben pro konkrétní účel musí mít, jak již bylo zmíněno, vlastnosti, jež zahrnují chemické, toxikologické, fyziologické, elektrické, morfologické a mechanické charakteristiky. Pro celkové zhodnocení tkáňové kompatibility biomateriálu nebo zdravotnického prostředku *in vivo* je klíčová znalost chemického složení materiálů, včetně podmínek expozice tkání. Důležitými faktory jsou rovněž povaha, stupeň, frekvence a trvání expozice prostředku a jeho složek vůči specifickým tkáním, kde má být použit. (Schmalz, 2009)

V průběhu 60. let 20. století začali inženýři, chemici a biologové úzce spolupracovat s lékaři, s cílem vytvoření standardizovaných postupů nebo metodiky, které by v praxi formalizovaly tvorbu a principy, respektive využití syntetické strategie pro biomateriály. Klíčovým aspektem současné definice biokompatibility se stala myšlenka, že uvolňování toxických látek z biomateriálů negativně ovlivňuje hojení. S rozvojem biologie a materiálových věd začali výzkumníci rychle začleňovat tyto nové myšlenky do vývoje biomateriálů. Hodnocení reakce hostitele na implantované materiály nám poskytuje užitečné informace o současných vlastnostech biomateriálů a zároveň nám pomáhá představit si možnosti budoucího zdokonalení interakce těla s biomateriály. (Ratner a Bryant, 2004)

Schopnost interakce s živými tkáněmi se stala základním rysem všech biomateriálů. Tyto interakce mohou mít jak pozitivní, tak negativní vliv na organismus hostitele a na samotný biomateriál. Imunologické reakce, které mohou nastat, vedou k možnému selhání zařízení,

komplikacím u pacientů, a dokonce k fatálním následkům. Z tohoto důvodu je klíčové, aby biomateriály byly biologicky udržitelné a biokompatibilní. Biomateriály mohou mít různé složení, včetně kovů, keramiky, polymerů, hydrogelů nebo kompozitních materiálů. (Omidi *et al.*, 2017) V oblasti TI patří mezi často využívané, například pro ústní a zubní aplikace, materiály jako čistý titan, jeho slitina Ti6Al4V a oxid zirkoničitý (zirkonium) pro svou biokompatibilitu, biofunkčnost a schopnost osteointegrace. (Duraccio, Mussano and Faga, 2015) Biomateriály, které hrají zásadní roli v léčbě kardiovaskulárních onemocnění zahrnují polyuretan, polyethylentereftalát či expandovaný polytetrafluorethylen pro výrobu protéz srdečních chlopní, cévních protéz, stenty a další zařízení. (He a Benson, 2017)

Jsou však obvykle klasifikovány do tří hlavních kategorií: kovy, keramika a polymery. Mezi těmito kategoriemi mají polymery významné místo, přičemž jejich organická povaha jim poskytuje unikátní vlastnosti, které je odlišují od kovů a keramiky. Polymery jsou známé svou širokou škálou fyzikálních, mechanických a chemických vlastností, což vedlo k rozsáhlému výzkumu, vývoji a aplikacím v oblasti biomateriálů. Mnoho z těchto polymerů bylo původně vyvinuto pro průmyslové účely jako plastové materiály, elastomery a vlákna. Avšak po druhé světové válce si je chirurgové začali přisvojovat pro řešení lékařských potřeb, což vedlo k dalšímu vývoji materiálů specifických pro oblast biomedicíny. Jedním z takových inovativních materiálů je vodivý polymer, který nabízí široké spektrum možností pro aplikace v lékařství a TI. Tyto polymery budou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách, kde se zaměříme na jejich vlastnosti, výhody a možné klinické aplikace. (He a Benson, 2017)

3.1 Biokompatibilita

Biokompatibilita je pojem, který se nejčastěji používá k popisu biologických požadavků na biomateriály používané ve zdravotnickém prostředí. Je to schopnost materiálu fungovat bez vytváření nežádoucích reakcí v tkáních. Definice biokompatibility se vztahuje k tomu, jak dobře materiál interaguje s hostitelským organismem v konkrétním prostředí. Jedná se tedy o schopnost materiálu vyvolat odpovídající biologickou odezvu v dané aplikaci, která je klíčová pro úspěšné dosažení požadovaného výsledku. Odezva může být negativní, vedoucí k selhání aplikovaného biomateriálu, a tudíž jeho použití se jeví jako nevhodné a škodlivé pro organismus. Na druhou stranu při přiměřené reakci hostitele jsou tkáňové reakce pro úspěšné použití biomateriálu nebo zdravotnického prostředku klíčové. (Anderson, 2012)

Biokompatibilita biomateriálů může být vyhodnocena pomocí testů *in vitro* a *in vivo*. Testování je klíčovým krokem při jejich vývoji a hodnocení. Testy *in vitro* se provádějí mimo tělo, často s využitím systémů buněčných kultur, které umožňují posoudit cytotoxicitu, buněčnou adhezi, aktivaci nebo buněčnou smrt. Jejich cílem je simulovat klinickou situaci. Testy *in vivo* se provádějí uvnitř těla živého organismu a jsou klinicky relevantnější než testy *in vitro*. *In vitro* testy se často provádějí jako screeningové testy před hodnocením *in vivo*, protože testy *in vitro* jsou jednodušší a levnější. (Omidi *et al.*, 2017) (Mozafari, 2020)

Jedním z *in vitro* testů biokompatibility je test cytotoxicity, který je často vyžadován regulačními orgány pro implantabilní prostředky. Tento test je považován za základní a umožňuje identifikaci a hodnocení různých úrovní toxicity biologických materiálů, a to od buněčné smrti až po změny buněčné adheze, proliferace a biosyntetické aktivity. (Kirkpatrick a Mittermayer, 1990) Lze ji stanovit hodnocením buněčné morfologie, poškození buněk, růstu buněk nebo měřením buněčné aktivity, konkrétně například MTT testem. Mohou být prováděny také testy genotoxicity, hemokompatibility či dráždivosti. Pro *in vivo* testování mohou být prováděny testy karcinogenity pro genotoxicitu materiálů nebo látek s přítomností genotoxických složek. Tyto studie zkoumají schopnost látek vyvolat karcinogenitu v živých organismech. Vedle toho jsou také prováděny testy senzibility či testy dráždivosti, které posuzují místní zánětlivou reakci tkání po přímém kontaktu se zdravotnickými prostředky nebo jejich výtažky. (De Jong, Carraway a Geertsma, 2020)

3.2 Scaffoldy a 3D struktura

Scaffold je definován jako porézní trojrozměrná struktura, která slouží jako základ nebo lešení pro růst buněk a regeneraci tkání. (Dutta a Dutta, 2009) Jsou považovány za klíčový prvek TI, protože umožňují vytváření tkání z buněk a matrice. Výběr vhodných biomateriálů pro scaffoldy je důležitý, protože musí splňovat určitá kritéria. Hlavním bodem je biokompatibilita. Podpora regenerace tkáně je dalším klíčovým cílem, který zahrnuje schopnost biomateriálu aktivovat a usnadnit proces hojení. Scaffold musí mít také řízenou rychlost degradace, která by měla probíhat v souladu s růstem tkáně, aby byl schopen podpořit růst a diferenciaci buněk. Pro vytvoření stabilní struktury tkáně musí být mechanické vlastnosti scaffoldu podobné vlastnostem tkáně, která je nahrazována. (Salgado *et al.*, 2013)

Scaffolds nacházejí uplatnění při návrhu a výrobě trojrozměrných modelů, v manipulaci s povrchovými ligandy a molekulární architekturou a v interakcích mezi nanočásticemi a buňkami. Využití pórů scaffoldů má zásadní význam při regeneraci různých tkání a orgánů v těle, umožňují migraci buněk, a také zlepšit povrch pro adhezi buněk. Pórovitost scaffoldu je také důležitým parametrem, který určuje difúzi živin a metabolických látek, odpadních látek, migraci buněk a neovaskularizaci. (Ratheesh *et al.*, 2017)

Bioprinting je technologie využívaná k přesnému tisku biologických materiálů s cílem vytvářet 3D struktury, jako jsou tkáně nebo orgány. Tisk orgánů a biofabrikace otevírají široké možnosti pro výrobu 3D živých orgánů s použitím buněčných sféroidů a biokompozitních nanovláken jako stavebních bloků pro regenerativní terapii. Nedostatečná vaskularizace často představuje hlavní technologickou překážku při vytváření 3D orgánů. Možnosti 3D tisku živých tkání se rozšiřují díky využití biomateriálů, které umožňují udržení strukturální integrity a řízenou degradaci scaffoldů po jejich vytištění. Biofabrikace zahrnuje výrobu komplexních živých i neživých biologických produktů ze surovin, jako jsou buňky, molekuly, extracelulární matrice a biomateriály. (Ratheesh *et al.*, 2017)

4 VODIVÉ POLYMERY

Biomateriály, které reagují na okolní podněty a snadno se přizpůsobují okolním podmínkám, jsou velmi žádoucí pro obor tkáňového inženýrství. Vodivé polymery mají požadované vlastnosti a jsou také biokompatibilní a elektroaktivní. Díky takovým materiálům jsme schopni buňky elektricky, elektrochemicky a elektromechanicky stimulovat. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014) Tyto polymery se vykazují vlastní elektrickou vodivostí. Nesou v sobě pozitivní vlastnosti kovů, ke kterým se váže schopnost vést elektrický náboj, mají dobré optické a elektrické vlastnosti a snadno se syntetizují. Nyní existuje více než 25 druhů vodivých polymerů. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014) Vodivé polymery jsou schopny přenášet náboj díky snadnému přesakování elektronů uvnitř polymerních řetězců a mezi nimi. Polymer má konjugovanou páteř, což znamená, že je složen z řady střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb. Tyto vazby obsahují chemicky silné, lokalizované σ -vazby, přičemž dvojně vazby obsahují i méně silné lokalizované π -vazby. P-orbitaly v řadě π -vazeb se překrývají, což umožňuje elektronům snadněji delokalizovat se a volně se pohybovat mezi atomy. Kromě konjugace je pro elektrickou vodivost nezbytná přítomnost nosičů náboje, kteří zprostředkovávají transport náboje v rámci řetězce. Tyto nosiče náboje vytváří proces známý jako dopování, který je analogický s dopováním klasických polovodičů. Polymer se syntetizuje ve své oxidované, vodivé formě, a pouze v přítomnosti molekuly dopantu je stabilizována struktura molekuly a náboj je neutralizován. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014) Oxidací π -konjugovaných řetězců vznikají kladné nosiče náboje, a dochází k zvýšení p-typu. Tyto oxidované formy jsou proto označovány jako tzv. p-dopované, což odpovídá pojmu p-dopované anorganické polovodiče. (Rasmussen, 2020) Je však důležitý rozdíl mezi dopováním anorganických a organických polovodičů. U anorganických polovodičů již stopové koncentrace dopujících látek výrazně ovlivňují elektrické vlastnosti, zatímco u polymerů je potřeba koncentrací v řádech jednotek až desítek procent. (Prokeš, J., Stejskal, J. a Omastová M., 2001)

4.1 Historie

První zmínka o výrobě vodivých polymerů se objevuje již před několika desetiletími, konkrétně z počátku 19. století. Tehdy byly tyto konjugované polymery obvykle považovány za moderní materiály. V šedesátých letech 20. století bylo prokázáno, že některé třídy organických polymerů a příslušných plastů lze vyrobit tak, aby vykazovaly polovodičové chování, s hodnotami vodivosti. Koncem sedmdesátých let 20. století byly

dosaženy hodnoty vodivosti srovnatelné s kovy. Za tento pokrok byla v roce 2000 udělena Nobelova cena za chemii Hideki Shirakawovi, Alanu MacDiarmidovi a Alanu Heegerovi.

Ve 21. století si společnost převážně zakládala na plastech, které jsou velmi snadno dostupné a vyrobitelné. Avšak plasty jako polyethylen či polystyren jsou elektricky izolační a chybělo jim polovodičové chování s hodnotou vodivosti. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014)

V práci Kumara a Sharmy byly prokázány vodivosti některých polymerů. Mezi zástupce vykazující vysokou elektrickou vodivost patří například polyacetylen, který při dopování jodovými parami nebo halogenidy přechodných kovů má dosahující hodnoty vodivosti až $10\ 000\ \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Polyanilin, stabilnější aromatický polymer, dopovaný kyselinou chlorovodíkovou vykazuje elektrickou vodivost kolem $200\ \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Polythiofeny mají elektrickou vodivost $1\ 000\ \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ při dopování BF_4^- a ClO_4^- . Polypyrrol dosahuje vodivosti mezi $500 - 7,5 \times 10^3\ \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, přičemž je dopován obdobně jako polythiofen. (Kumar a Sharma, 1998)

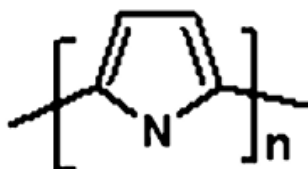
4.2 Vodivé polymery pro tkáňové inženýrství

Konjugované polymery představují specifické polymerní systémy, kde výrazným prvkem je konjugovaná struktura obsahující střídající se dvojně vazby uhlík-uhlík. Tato unikátní struktura přispívá k elektrickým vlastnostem polymerů, zejména nízkoenergetickým optickým přechodům, ionizačním potenciálům a vysoké elektronové afinitě. Z elektrochemického hlediska je klíčovým aspektem konjugovaných polymerů jejich schopnost fungovat jako elektronový vodič. Tato schopnost je dále ovlivňována redoxním přepínáním při specifických potenciálech, provázeným pohybem dopantových iontů do nebo z materiálu v závislosti na čistém náboji polymeru. Tímto způsobem se otevírá možnost účinného elektronického řízení a manipulace s vlastnostmi konjugovaných polymerů. (Ateh, Navsaria a Vadgama, 2006) Konjugované vodivé polymery představují důležité anorganické materiály pro různé aplikace, například i v oblasti termoelektriky, které jsou studovány pro svou elektrickou vodivost. Tyto polymery jsou využívány pro různé aplikace, včetně světelných diod, tranzistorů, senzorů a fotovoltaiických článků. Jejich vlastnosti lze modifikovat prostřednictvím úprav jejich molekulární struktury. Mezi studované konjugované vodivé polymery patří polyacetylen, polypyrrol, polyanilin, polythiofen, poly(2,7-karbazol) a další.

Neutrální konjugované polymery obvykle vykazují polovodičové vlastnosti, ačkoliv některé případy by bylo přesnější popsat jako izolanty. Jejich vodivost však může být zvýšena buď oxidací nebo redukcí, čímž se konjugované polymery stávají skutečně vodivými polymery pouze ve svých neutrálních redoxních stavech. Vzhledem k tomu, že mnoho vodivých polymerů vykazuje hodnoty vodivosti v oblasti kovového chování, byly v roce 1979 klasifikovány do třídy materiálů označovaných jako syntetické kovy. (Rasmussen, 2020)

4.2.1 Polypyrrol

V devadesátých letech se stal polypyrrol (PPy) středem studie jako podklad pro růst buněk v kultivačních modelech *in vitro*. Jeho schopnost podporovat buněčný růst byla spojována s jeho výjimečnými elektrickými vlastnostmi, které mu poskytují výhodu oproti některým jiným polymerním materiálům. Tato vlastnost umožňuje efektivní interakci a komunikaci s buňkami, což z něj činí zajímavý materiál pro různé biologické aplikace. Je to konjugovaný polymer používaný jako nosný substrát pro tkáň a buňky. (Ateh, Navsaria a Vadgama, 2006) Vykazuje mnoho vynikajících vlastností a odpovídá na různé podněty, což ho činí nadějným "chytrým" biomateriálem. Především prokazuje dobrou biokompatibilitu *in vitro* a *in vivo*, chemickou stabilitu vůči vzduchu a vodě a přiměřeně vysokou vodivost za fyziologických podmínek. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014)



Obrázek 1: Polypyrrol (Bhadra *et al.*, 2009)

Ve studii Humpolíčka, Kašpárkové a dalších byla srovnávána biokompatibilita PPy a polyanilinu (PANI) z hlediska cytotoxicity. Cytotoxicita polymerů PANI a PPy byla hodnocena na myších embryonálních buňkách NIH/3T3 a embryonálních kmenových buňkách ESR1 za použití MTT testu. Výsledky ukázaly, že existuje větší rozdíl mezi biokompatibilitou v jejich solné a bazické formě než mezi PANI a PPy jako takovými. PANI i PPy ve formě soli nevykazovali cytotoxický efekt při koncentracích extraktu 5 % a nižších pro obě buněčné linie. Naopak, PPy ve formě báze nevykazoval žádnou cytotoxicitu, dokonce ani při kultivaci obou typů buněk v přítomnosti 50 % extraktu. PANI ve formě báze vyvolával mírnou cytotoxicitu při koncentraci extraktu 50 %. Tyto výsledky ukazují, že

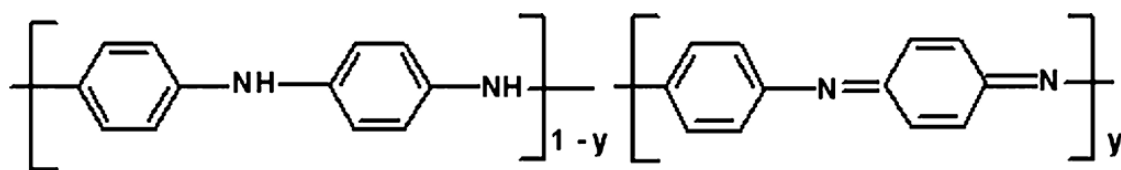
základní formy polymerů PANI a PPy jsou méně cytotoxické než jejich odpovídající soli. (Humpolíček *et al.*, 2018)

Ve studii Wanga a dalších bylo cílem zhodnotit biokompatibilitu PPy s nervovou tkání jak *in vitro*, tak *in vivo*. V rámci tohoto výzkumu byl extrakční roztok prášku PPy testován na různé parametry jako akutní toxicitu, subakutní toxicitu, pyrogenní vlastnosti, životaschopnost buněk, hemolýzu, alergenní potenciál a genotoxicitu. Výsledky ukázaly, že extrakční roztok PPy nevykazoval žádné známky akutní nebo subakutní toxicity, pyrogenních vlastností, hemolýzy, alergenního potenciálu ani genotoxicity, které by mohly vyvolat toxické reakce. Schwannovy buňky přítomné ve výtažku PPy prokázaly, že jsou schopné přežití a proliferace. Konkrétně míra přežití a proliferace Schwannových buněk obsahující 50 % extrakčního roztoku PPy byla vyšší než ve skupině obsahující 50 % fyziologického roztoku. Tato data naznačují, že extrakční roztok PPy nevykazoval cytotoxicitu. (Wang *et al.*, 2004)

Syntéza PPy je snadná a flexibilní při pokojové teplotě v různých rozpouštědlech, včetně vody. Lze ho vyrábět s velkým povrchem, různými stupni pórovitosti a je snadno modifikovatelný pro biomedicínské aplikace přidáním bioaktivních molekul. Reaguje na podněty, což umožňuje dynamickou kontrolu jeho vlastností pomocí elektrického potenciálu. Avšak po syntéze je obtížně zpracovatelný, protože jeho molekulární struktura způsobuje, že není termoplastický, je mechanicky tuhý, křehký a nerozpustný. V současnosti se využívá v různých aplikacích, včetně palivových článků, ochrany proti korozi, počítačových displejů, mikrochirurgických nástrojů, biosenzorů a léčiv, a také jako biomateriál pro inženýrství nervové tkáně, nervové sondy, nervové vodící kanály a krevní kanály. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014)

4.2.2 Polyanilin

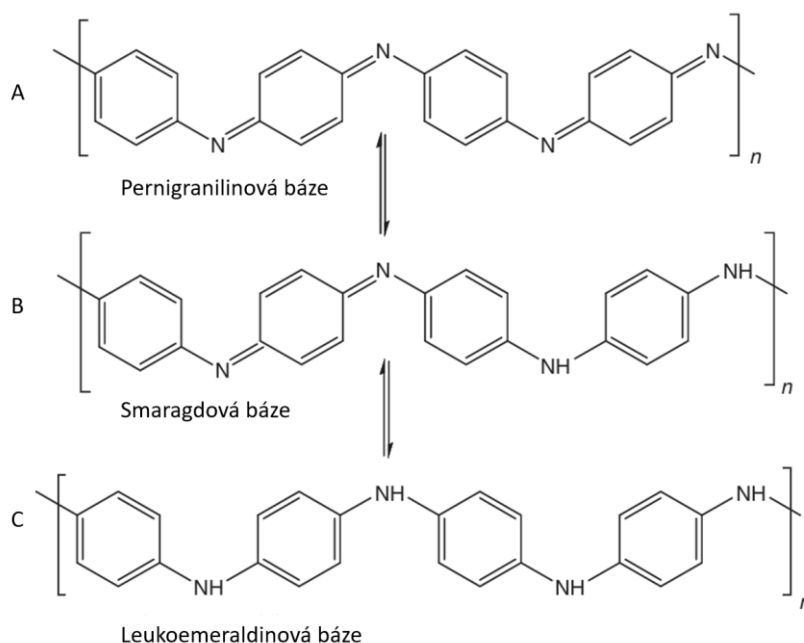
Polyanilin (PANI) je významný vodivý polymer s rozsáhlým využitím v oblasti biotechnologií a medicíny. Je to polymer tvořený z monomerů anilinu, který obsahuje aromatické aminy. Ty mohou vykazovat fyziologickou aktivitu nebo dokonce prokázat škodlivé účinky. Nebezpečný může být právě karcinogenní účinek anilinového dimerního produktu, benzidinu. Samotný PANI je naprosto nerozpustný ve vodním prostředí. (Humpolíček *et al.*, 2012)

Obrázek 2: Polyanilin (Bhadra *et al.*, 2009)

Je to polysulfát, který je schopný kombinovat vodivost a nízkou hustotu spolu s jednoduchou zpracovatelností. Jeho výhodou je snadná syntéza a vysoká ekologická stabilita v životním prostředí. (Boeva a Sergejev, 2014)

Syntéza PANI obvykle probíhá pomocí přímé oxidace anilinu, a to buď vhodným chemickým oxidačním činidlem nebo elektrochemickou oxidací na různých elektrodoch materiálech. První výzkumy v oblasti oxidace aromatických aminů se objevily před více než stoletím a půl. Během oxidace anilinu v síře nebo sírovém roztoku dochází k vytváření černých sraženin na platinové elektrodě za přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. (Bhadra *et al.*, 2009)

V závislosti na oxidačním stavu existují tři základní struktury PANI. Forma plně redukováná - leukoemeraldinová báze, plně oxidovaná forma - pernigranilinová báze a forma napůl oxidovaná a napůl redukováná - smaragdová báze. Tyto struktury ovlivňují elektrické vlastnosti PANI a určují jeho vodivost v různých podmínkách oxidačního stavu. (Bhadra *et al.*, 2009)

Obrázek 3: Redoxní formy polyanilinových bází, (A) Pernigranilinová báze, (B) Smaragdová báze, (C) Leukoemeraldinová báze Upraveno dle Stejskal *et al.*, 2015

Za posledních deset let zažily vodivé polymery, zejména PANI, výrazný nárůst zájmu se zaměřením na vodivost, který se postupně přesunul až k analýze elektrochemického chování a schopnosti reagovat na vnější stimuly s ohledem na vodivost. Je stále častěji používán k aplikaci v různých oblastech, jako je ochrana proti korozi, katalýza organických reakcí, palivové články, superkondenzátory nebo analytické elektrody. Je také schopen vytvářet různé nanostruktury, včetně nanotrubiček a nanovláken, což je zvláště zajímavé v oblasti nanotechnologií. Pro svou elektronovou a protonovou vodivost je PANI zkoumán pro své možnosti v biomedicíně, například v oblasti srdeční a nervové tkáně nebo v nervových sondách. (Humpolicek *et al.*, 2012)

4.3 Syntéza vodivých polymerů

V současnosti existují dvě hlavní metody pro syntézu vodivých polymerů, a to chemická a elektrochemická. V rámci chemické syntézy se monomerový roztok kombinuje s oxidačním činidlem, jako je například chlorid železitý nebo persíran amonný. Tento proces tvoří prášek nebo pevný film polymeru. Výhodou této syntézy je její možnost hromadné výroby ve velkém množství za výhodnou cenu. Chemická polymerace má také tu výhodu, že je schopna vytvářet různé druhy vodivých polymerů, včetně nových variant, které nelze syntetizovat elektrochemickou metodou. Bohužel však vodivost polymerů, získaných chemickou syntézou, tradičně vykazuje nižší úroveň vodivosti než jejich elektrochemicky syntetizované protějšky. Elektrochemická syntéza umožňuje přesnější nastavení podmínek reakce a optimalizaci procesu, což vede k lepší konzistenci a stabilitě vodivosti výsledného polymeru. Další komplikací spojenou s chemickou syntézou je vysoká citlivost vodivosti vytvořeného polymeru na volbu a čistotu rozpouštědla, oxidačního činidla, relativní koncentraci činidel, dobu reakce, teplotu, rychlost míchání atd. To činí chemickou syntézu náročnou a nespolehlivou, s obtížně dosažitelnou opakovatelností vodivosti polymeru. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014)

Elektrochemická polymerace je proces, při kterém je elektrický proud přiváděn na elektrody ponořené do roztoku obsahujícího monomer polymeru, rozpouštědlo a dopující činidlo. Tento postup umožňuje vytvořit tenké vrstvy polymeru s dobře kontrolovatelnou tloušťkou a morfologií. Vlastnosti syntetizovaného filmu jsou ovlivněny různými faktory, jako je proudová hustota, doba depozice, teplota a rozpouštědlo. Elektrochemická polymerace je vhodná pro syntézu vodivých polymerů jako je PPy či PANI, a může být prováděna různými technikami, včetně galvanostatické, potenciostatické a potenciodynamické metody. Každá z

těchto metod umožňuje přesnou kontrolu nad procesem polymerizace a je vhodná pro různé aplikace, včetně výroby biosenzorů. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014) Tato syntéza je obvykle prováděna v jednodukomorové nebo dvouukomorové cele s využitím tříelektrodové konfigurace v nosném elektrolytu. Tato technika nabízí široký výběr kationtů a aniontů pro použití jako dopujících iontů a umožňuje získání volně stojících nebo samonosných filmů s požadovanou tloušťkou a geometrií. (Kumar a Sharma, 1998)

4.4 Biodegradabilita vodivých polymerů

Biodegradabilita hraje důležitou roli v oblasti biomateriálů a TI, kde je nezbytným faktorem při vývoji materiálů pro regeneraci tkání a léčbu pacientů. Je to schopnost materiálů rozkládat se a vstupovat do přírodních biologických cyklů, což je klíčové pro jejich biologickou kompatibilitu a schopnost interagovat s biologickými systémy. Biodegradabilní materiály nabízejí potenciál pro širokou škálu aplikací v biomedicínském inženýrství, od scaffoldů pro tkáňovou regeneraci po nosiče pro kontrolované uvolňování léčiv. V mnoha aplikacích implantátů je potřeba materiál s dlouhodobě stabilními vlastnostmi. (Jadoun, Riaz a Budhiraja, 2021)

Vodivé polymery jako PANI, PPy a polythiofen, spolu s biodegradabilními polymery jako poly(D,L-mléčná kyselina) PDLLA a polykaprolakton, bývají spojovány esterovými vazbami. (Jadoun, Riaz a Budhiraja, 2021) Ačkoliv vodivé polymery jako PPy a polythiofen nejsou samotné obvykle biodegradabilní, tak existuje možnost je takové vytvořit. Jedním z hlavních postupů je vytvoření kompozitu vodivého polymeru s biologicky odbouratelným polymerem, jako jsou právě například polykaprolakton a PDLLA. Tato kombinace umožňuje spojit pozitivní vlastnosti obou polymerů, ale neřeší problém s odstraněním vodivého polymeru z těla po jeho degradaci. Nicméně tato metoda umožňuje řídit vodivost a rychlost degradace volbou poměru obou polymerů. Zjištěno bylo, že i přidání ionizovatelných (kyselina máselná) nebo hydrolyzovatelných (butyrát) postranních skupin na obal PPy zvyšuje jeho degradabilitu. (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014) Proto je tedy náročné navrhnout a připravit ideální elektroaktivní polymer, který splňuje požadavky na biodegradabilitu a biokompatibilitu, aby se minimalizovala možná zánětlivá reakce v hostitelské tkáni po degradaci polymeru. Optimalizace vodivosti při použití co nejnižšího množství vodivých látek je také výzvou. Zároveň je nutné řešit zpracovatelnost vodivých polymerů a minimalizovat použití toxických rozpouštědel, což vyžaduje syntézu hydrofilních a zpracovatelných polymerních materiálů. Ačkoli tato třída biomateriálů

představuje velký potenciál, je třeba řešit další výzvy a možnosti pro jejich další rozvoj v biomedicínských oborech. (Jadoun, Riaz a Budhiraja, 2021)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

- Příprava elektricky vodivých filmů a koloidů z polypyrrolu a chitosanu
- Příprava 3D struktury na bázi polypyrrolu a chitosanu
- Testování biologických vlastností na připravených filmech a scaffoldech

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použité přístroje a pomůcky

- Centrifuga (Eppendorf, ČR)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Japonsko)
- Inkubátor Heracell™ 150i (ThermoFisher Scientific, USA)
- Konfokální mikroskop (Olympus, Japonsko)
- Laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko)
- Rastrovací elektronový mikroskop Phenom Pro (ThermoFisher Scientific, USA)
- Třepačka (Scientific Industries, USA)

6.2 Použité chemikálie

- ActinRed™ 555 (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- Calf Serum (Biosera, Francie)
- Fetal Serum (Gibco, MA, USA)
- Formaldehyd 36–38 % (Penta, ČR)
- Hoechst 33258 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)
- Chitosan (Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid železitý (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, USA)
- Médium DMEM (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)
- Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories GmbH, Rakousko)
- Penicilin/Streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie)
- Pyrrol (Sigma Aldrich, USA)

- Triton™ X-100 (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (Biosera, Francie)

6.3 Buněčné kultury a médium

V tomto experimentu jsme využili dva typy buněčných linií:

1) NIH/3T3 myší embryonální fibroblasty (ATCC® CRL-1658™, American Type Culture Collection, ATCC). Pro kultivaci jsme použili kultivační médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), které obsahovalo antibiotikum 1 % Penicilinu/Streptomycinu a 10 % Calf sera. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru v kultivačních lahvích. Kultivační podmínky zahrnovaly udržovanou teplotu na 37 °C a řízenou atmosféru CO₂, což odpovídá laboratornímu standardu.

2) Myší embryonální kmenové buňky ESR1. Použité kultivační médium DMEM (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) obsahovalo 15 % fetálního telecího séra, 100 U·ml⁻¹ penicilinu, 0,1 mg·ml⁻¹ streptomycinu, 100 mM roztoku neesenciálních aminokyselin a 0,05 mM 2-merkapt ethanolu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 1000 U ml⁻¹ LIF (Gibco, MA, USA).

7 EXPERIMENT

Následující kapitoly popisují jednotlivé kroky experimentu.

7.1 Kultivace a pasážování buněk

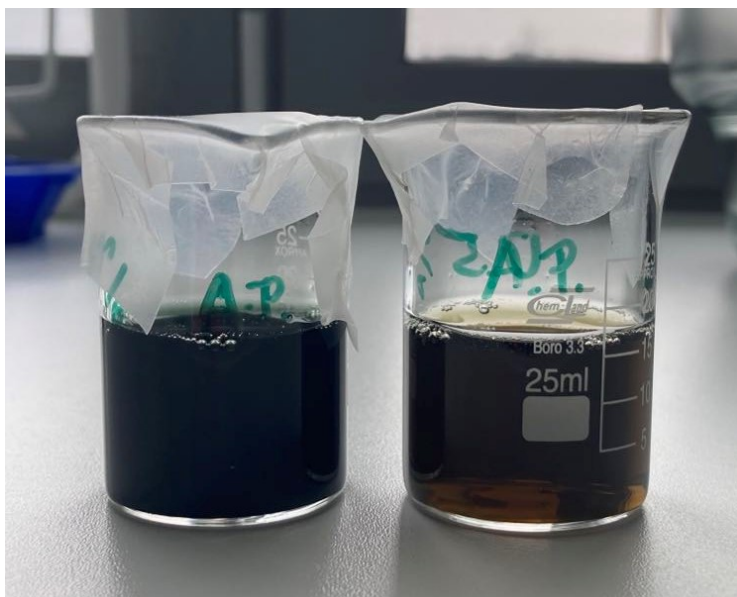
Pro dosažení dlouhodobého přežití buněčné linie je nutno pravidelně provádět subkultivaci buněk. Buňky myších fibroblastů se pasážují jakmile dosáhnou 80% konfluence. Kultivace buněk byla uskutečněna ve speciálně připraveném médiu DMEM, které bylo předem sterilizováno a ohříváno ve vodní lázni na teplotu 37 °C. Pro pasážování buněk, což je proces, který se provádí v sterilním laminárním boxu, byly použity sterilní materiály a pomůcky. Z kultivační nádoby bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty pufrům PBS v množství 0,2 mL·cm⁻² (Fosfátový pufr, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), čímž byly odstraněny nežádoucí zbytky kultivačního média. Po odsátí pufru byl k buňkám přidán trypsin v množství 0,1 mL·cm⁻². Kultivační nádoba byla vložena do inkubátoru do doby, než se buňky uvolnily od povrchu tkáňového plastiku. Uvolněné buňky byly resuspendovány v 7 ml média, odebrány do zkumavky a centrifugovány 3 min a 1100 rpm. Aby byla zajištěna správná konfluence buněk, a jejich použitelnost pro testování, je nezbytné tento postup úspěšné kultivace a množení buněk opakovat vždy když je potřeba.

7.2 Příprava filmů a koloidů

V tomto experimentu byly připravovány filmy a koloidní roztoky na bázi polypyrrolu a chitosanu. Při vytváření filmů na bázi polypyrrolu a chitosanu bylo postupováno systematicky. Nejprve byl připraven roztok chitosanu rozpuštěním v 0,5 % kyselině octové tak, aby jeho výsledná koncentrace v koloidu byla 0,5 % a 1 %. Tento proces probíhal na třepačce (Scientific Industries, USA) při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin, čímž byla zajištěna důkladná homogenizace. Po rozpuštění chitosanu byl roztok přefiltrován, aby byl zbaven nerozpustných částic. Po dokončení této fáze následovala výroba vzorků koloidních disperzí a filmů PPy/Chitosan s různým množstvím chitosanu (0,5 % a 1 %).

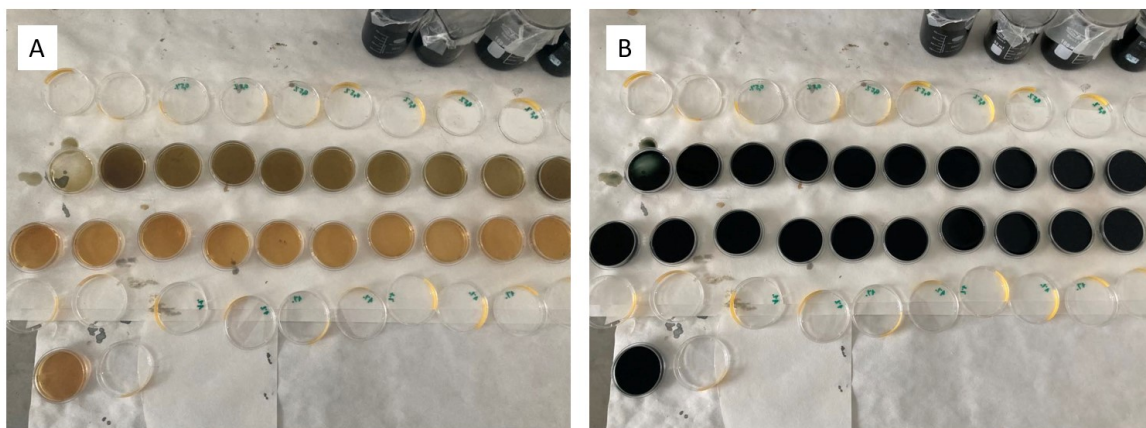
Příprava koloidních disperzí byla provedena rozpuštěním 5 mmol pyrrolu v 25 ml roztoku chitosanu. Tato směs byla zhomogenizována pomocí ultrazvuku, aby bylo zajištěno rovnoměrné rozložení pyrrolu v celém objemu. Pak byl připraven 5 mmol roztok chloridu železitého ve vodě. Polymerace začala smícháním obou roztoků dohromady. Po 10 minutách intenzivního míchání následovala polymerace po dobu 24 hodin. Pro odstranění přebytečných monomerů a nečistot byly koloidní disperze vyčištěny dialýzou pomocí

dialyzační membrány Spectra Por 2. K odstranění konzervačních látek z dialyzační membrány před samotnou dialýzou byla namočená v demineralizované vodě. Koloidní disperze PPy/Chitosan byla přenesena do kádinky s 0,5% roztokem kyseliny octové, a každý den byl roztok vyměňován po dobu 14 dnů. Následovalo dalších 14 dnů, kdy probíhal dialyzační proces, přičemž byla použita ultračistá voda místo kyseliny octové. Na Obrázku 4 jsou vidět koloidní roztoky připravené pro 24hodinovou polymeraci.



Obrázek 4: Ukázka vzorků připravených koloidních disperzí

Příprava filmů probíhala souběžně s procesem přípravy koloidních disperzí. Byly použity tkáňové polystyrenové kultivační misky (TPP, Švýcarsko). Do roztoku chitosanu bylo přidáno 5 mmol pyrrolu a rozpuštěno. Pak byl připraven 5 mmol roztok chloridu železitého ve vodě. Následným přidáním roztoku chloridu železitého, který slouží jako katalyzátor k oxidaci pyrrolu na polypyrrol, do roztoku s pyrrolem a chitosanem se spouští polymerační reakce, která vede k tvorbě komplexního filmu. Po smíchání těchto dvou roztoků musí dojít k rychlé homogenizaci mícháním a následnému vylití obsahu směsi do polystyrenových misek, aby došlo k pokrytí celé plochy polystyrenové misky, a aby polymerace probíhala *in situ*. Tímto způsobem se vytváří síťovitá struktura polypyrrolu, která se spojuje s chitosanem, čímž vzniká pevný, tenký a stabilní film. Proces polymerace trval 24 hodin. Vzniklé filmy (PPy/Chitosan) byly opláchnuty methanolem.



Obrázek 5: Příprava filmů PPy/Chitosan A) před polymerizací, B) plně zpolymerizované

7.3 Příprava 3D scaffoldů

Scaffoldy byly připraveny z polypyrrolových koloidů pomocí lyofilizace. Před lyofilizací byly koloidy přečištěny pomocí dialýzy, aby se odstranily nízkomolekulární částice a nečistoty (viz. Příprava koloidů výše). Přečištěné koloidy byly přeneseny do malých Petriho misek o objemu 3 ml a před lyofilizací byly přes noc zmrazeny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následující den byly zmražené koloidy umístěny na 3 dny do lyofilizační komory. Vytvořené scaffoldy byly neutralizovány v $0,5\text{ mol NaOH}$ a poté několikrát promyty v ultračisté vodě. Na závěr přípravy byly scaffoldy ponořeny do methanolu, který se nechal odpařit při pokojové teplotě, tak byly scaffoldy připraveny k dalšímu biologickému testování.



Obrázek 6: Scaffold po lyofilizaci (1 %CH/PPy)

7.4 SEM analýza

Struktura připraveného scaffoldu byla pozorována pomocí SEM analýzy. Pro měření byl použit stolní rastrovací elektronový mikroskop Phenom Pro (ThermoFisher Scientific, USA)

umožňující zvětšení 20-100000x. Vzorky byly upevněny na hliníkové kolíky pomocí grafitové lepící pásky. Vzhledem k tomu, že je materiál sám o sobě vodivý tak nemusely být upraveny poprašováním. Elektronový mikroskop pracoval při napětí 10 kV.

7.5 Proliferace a barvení buněk

Jedním z cílů této práce bylo zkoumat proliferaci buněk a jejich adhezi na tenkých filmech i na scaffoldech, která byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie, která umožňuje detailní vizualizaci buněčných struktur a procesů. Proliferace buněk je klíčovým procesem pro hojení a obnovu tkání ve tkáňovém inženýrství, při kterém dochází k růstu a dělení buněk. Adheze buněk, což je schopnost buněk přilnout k povrchu a interagovat s okolním prostředím, hraje důležitou roli v tomto procesu, ovlivňující efektivitu a úspěšnost proliferace.

Sledovaná byla proliferace buněk NIH/3T3 a ES R1. Před započítím testování byly misky s filmy sterilizovány pomocí UV záření po dobu 30 minut. Scaffoldy byly sterilizovány ponořením do methanolu po dobu 20 minut a následně z obou stran opět pomocí UV záření. Jako referenční vzorek byl použit neupravený tkáňový plastik. NIH/3T3 buňky byly nasazeny v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml. Proliferace buněk probíhala po dobu 48 hodin. Dalším krokem byla fixace buněk, která byla provedena ponořením buněk do 4 % formaldehydu po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Po fixaci byla buněčná kultura opláchnuta fosfátovým pufrům (PBS) za účelem odstranění přebytečného formaldehydu. Následně byla provedena permeabilizace buněk přidáním 0,5 % Tritonu™ X-100 po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté byla buněčná kultura opláchnuta třikrát PBS a zabarvena barvivy ActinRed™ 555 (1 kapka – dle výrobce) a Hoechst 33258 (v koncentraci $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Vyhodnocení proliferace buněk bylo sledováno pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 a konfokálního mikroskopu (Olympus, Japonsko).

Proliferace embryonálních kmenových buňky ESR1 proběhla obdobně, s rozdílem, že buňky ESR1 byly nasazeny v koncentraci $10\,000$ buněk/cm² a proliferace probíhala po dobu 72 hodin.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

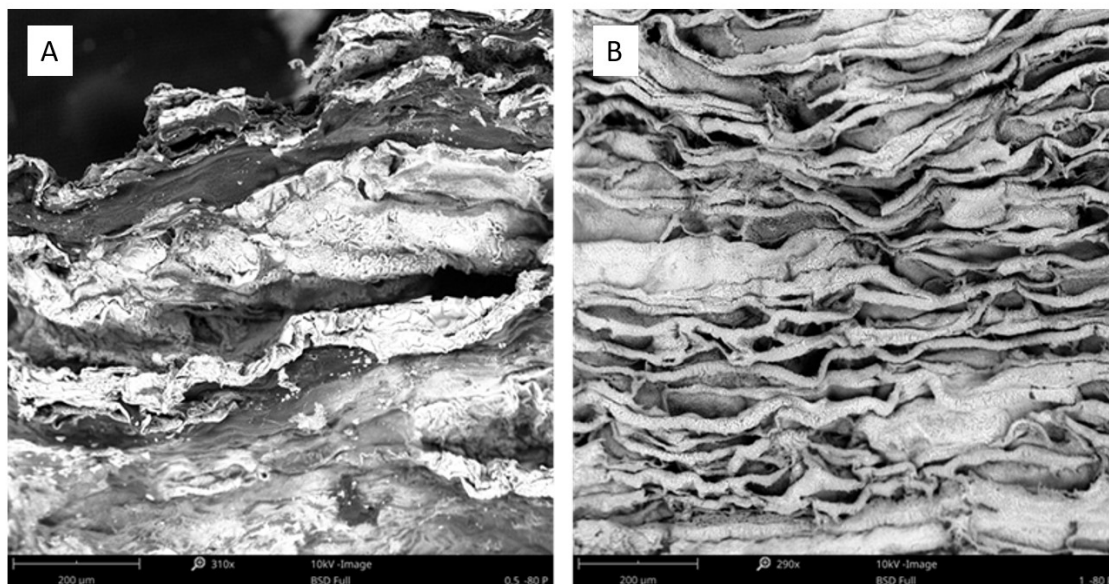
V této kapitole budou shrnuty výsledky experimentu, který byl zaměřen na sledování proliferace buněk na koloidních filmech a scaffoldech, které jsou vytvořené z polypyrrolu a chitosanu. Tyto výsledky budou prezentovány s ohledem na vodivost těchto materiálů a jejich vlivu na schopnost růstu a dělení buněk. Proliferace buněk je klíčovým faktorem při posuzování biokompatibility a potenciálního využití těchto materiálů v regenerativní medicíně a TI. Na základě provedených experimentů byla sledována reakce buněk NIH/3T3 a ESR1 na různé typy koloidních filmů a scaffoldů. Výsledky těchto testů poskytují informace o tom, jak materiály ovlivňují proliferaci buněk.

Experimentální část předložené práce navazuje na výsledky Markéty Zálešákové, která psala diplomovou práci na téma Příprava filmů a koloidů na bázi vodivých polymerů a chitosanu, a úspěšně ji obhájila v roce 2023. Filmy i koloidy měly stejné složení jako v předložené práci. Koloidy byly charakterizovány z hlediska velikosti částí, a byla také sledována jejich cytotoxicita. Dále byla stanovena vodivost koloidních filmů a sledována proliferace buněk NIH/3T3 a ES-R1. Dosažené výsledky stojí za zmínku i zde, neboť biokompatibilita a vodivost jsou velmi důležité parametry pro aplikaci připraveného materiálu v TI. Vodivost filmů byla měřena pomocí čtyřbodové van der Pauwovy metody, přičemž průměrná vodivost vzorků koloidních filmů Chitosan/PPy se pohybovala v podobných hodnotách. Konkrétně vzorek 0,5%CH/PPy vykazoval téměř stejnou vodivost, která činila $0,224 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$, jako vzorek filmu 1%CH/PPy s hodnotou $0,238 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Pomocí MTT testu bylo zjištěno, že v přítomnosti 40 % koloidu u vzorku 0,5 %CH/PPy byla zaznamenána velmi mírná cytotoxicita. Podobně u vzorku 1 %CH/PPy při koncentraci 40 % koloidu byla pozorována také mírná cytotoxicita. (Zálešáková, 2023) Výsledky naznačují, že materiál je vhodným kandidátem pro aplikace v TI. Avšak co se týče testování proliferace na filmech, zcela nám zde chybí 3D struktura, která je pro buňky v organismu přirozená. Proto bylo hlavním cílem v experimentální části předložené práce připravit scaffold, který by buňkám poskytl vhodné prostředí pro jejich proliferaci, a zároveň umožňoval jejich stimulaci prostřednictvím elektrického proudu.

8.1 Struktura připravených vzorků

Struktura připravených 3D scaffoldů byla vyhodnocena pořízením mikrofotografií pomocí SEM analýzy. Na obrázku 7 (A) vidíme strukturu vzorku 0,5%CH/PPy a (B) 0,1%CH/PPy. Z fotek vidíme vrstevnatou strukturu s póry, která dává možnost buňkám proniknout do

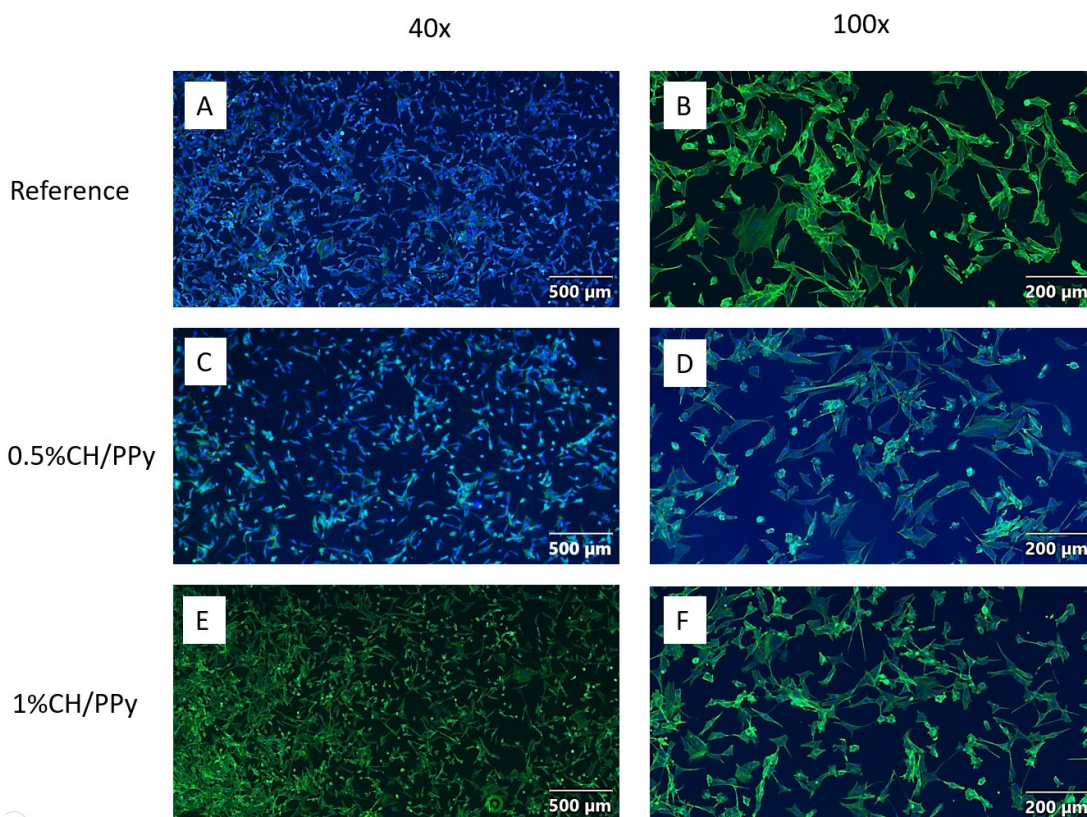
celého objemu materiálu a vytvořit tak vhodný konstrukt buňky-materiál pro případnou náhradu tkáně.



Obrázek 7: Mikrofotografie scaffoldů pořízené pomocí SEM, (A) 0,5%CH/PPy; (B) 0,1%CH/PPy.

8.2 Proliferace buněk na koloidních filmech

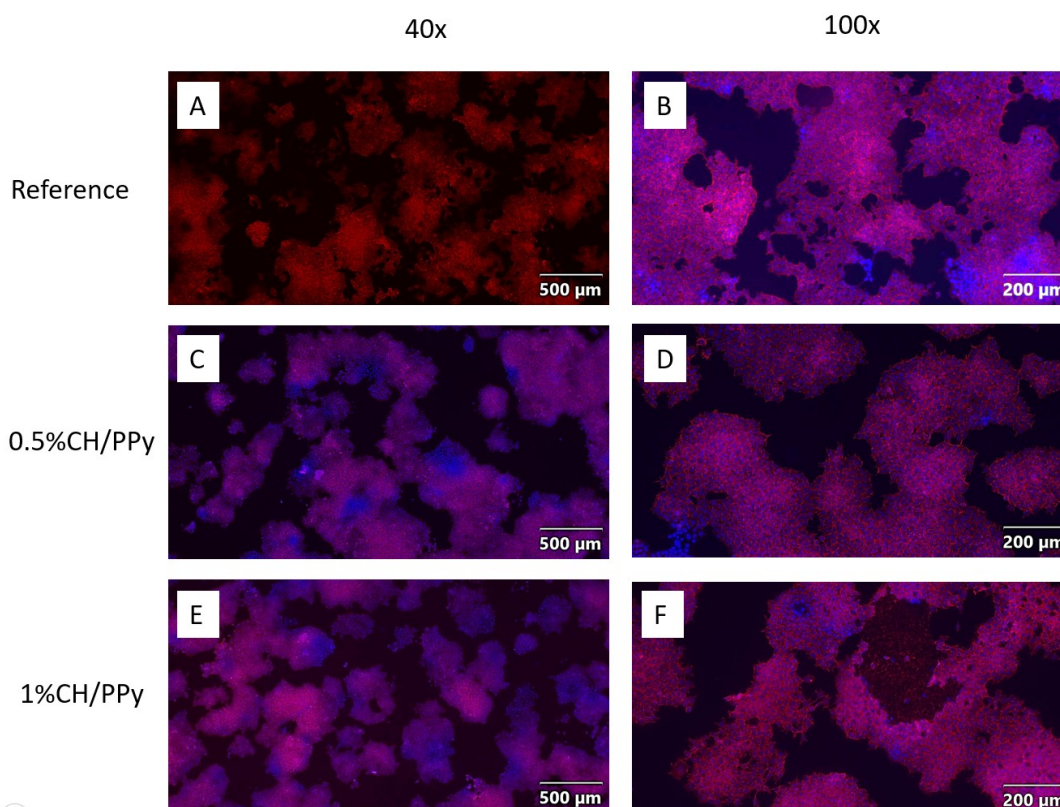
Pro úspěšné využití koloidních filmů v TI je klíčové, aby buňky přilnuly k jejich povrchu a interagovaly s nimi. Přilnutí buněk k povrchu je zásadní pro procesy adheze, migrace a proliferace, které jsou nezbytné pro úspěšnou tkáňovou regeneraci a hojení ran. Schopnost interakce buněk s koloidními filmy byla zkoumána prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Fluorescenční mikroskopie, která umožňuje přesné sledování chování buněk na povrchu koloidních filmů v reálném čase, byla použita pro vyhodnocení morfologie a proliferace buněk NIH/3T3. K porovnání proliferace na připravených filmech byla použita reference (tkáňový plastik). Pro vizualizaci cytoskeletu byly buňky zbarveny barvivem ActinGreenTM 488 ReadyProbesTM, zatímco buněčná jádra byla obarvena barvivem Hoechst 33258.



Obrázek 8: Fotografie buněčné linie NIH/3T3 na povrchu koloidního filmu z fluorescenční mikroskopie: (A) Reference – zvětšení 40x, (B) Reference – zvětšení 100x, (C) 0,5%CH/PPy – zvětšení 40x, (D) 0,5%CH/PPy – zvětšení 100x, (E) 1%CH/PPy – zvětšení 40x, (F) 1%CH/PPy – zvětšení 100x

Na fotografii Obrázek 8E) vzorku filmu 1%CH/PPy můžeme vidět, že buňky byly schopny proliferace a růstu obdobně jako na referenci obrázek 8A). Nicméně, na povrchu se nevyskytovaly buňky v rovnoměrném rozložení, jak tomu bylo u reference. Při pozorování vzorku filmu obrázek 8C) 0,5%CH/PPy bylo zaznamenáno snížené množství buněk a menší proliferace ve srovnání s referenčním vzorkem. Buněčná distribuce na povrchu byla téměř rovnoměrná, místy byl výskyt jader nižší pravděpodobně z důvodu nehomogenního povrchu filmu. Buněčná morfologie vykazovala typické znaky fibroblastů, včetně rozvětveného a protáhlého cytoskeletu a oválného tvaru buněčného jádra. Z toho lze usoudit, že nedošlo k ovlivnění adheze a proliferace buněk na povrchu koloidních filmů.

Byla také posuzována schopnost růstu a proliferace buněčných linií ES-R1 na povrchu koloidních filmů 1%CH/PPy a 0,5%CH/PPy. Porovnání proběhlo s referenčním vzorkem. Byly použity barviva ActinRedTM 555 pro obarvení cytoskeletu a Hoechst 33258 pro barvení buněčných jader. Pro vyhodnocení proliferace byl opět použit fluorescenční mikroskop.



Obrázek 9: Fotografie buněčné linie ES R1 na povrchu koloidního filmu z fluorescenční mikroskopie: (A) Reference – zvětšení 40x, (B) Reference – zvětšení 100x, (C) 0,5%CH/PPy – zvětšení 40x, (D) 0,5%CH/PPy – zvětšení 100x, (E) 1%CH/PPy – zvětšení 40x, (F) 1%CH/PPy – zvětšení 100x

Výsledky sledování proliferace buněk ES R1 na koloidních filmech naznačují, že oba substráty s obsahem chitosanu 0,5 % a 1 % jsou pro kmenové buňky vhodné a podporují jejich růst a proliferaci. Pozitivní reakce buněk na oba typy substrátů dokazují, že oba typy filmů mají potenciál být účinnými substráty pro kultivaci kmenových buněk, a mohou být užitečné pro různé biomedicínské aplikace, které vyžadují podporu buněčného růstu a proliferace. Porovnáme-li v obrázku 8 proliferaci na vzorcích, vidíme, že je téměř shodná jako proliferace kmenových buněk na referenci.

V Diplomové práci Zálešákové byla také zkoumána proliferace buněk na koloidních filmech na bázi polypyrrolu a chitosanu. Buněčná linie NIH/3T3 rostla a proliferovala na filmu 0,5%CH/PPy podobně jako referenční vzorek, avšak byl tam znát malý úbytek buněk. Naopak, proliferace buněk na vzorku 1%CH/PPy byla vyšší než u referenčního vzorku a vzorku 0,5%CH/PPy. Dále byla hodnocena schopnost růstu a proliferace buněčných linií ES-R1 na povrchu vzorků filmu 0,5%CH/PPy a 1%CH/PPy. Buňky vykazovaly různou míru

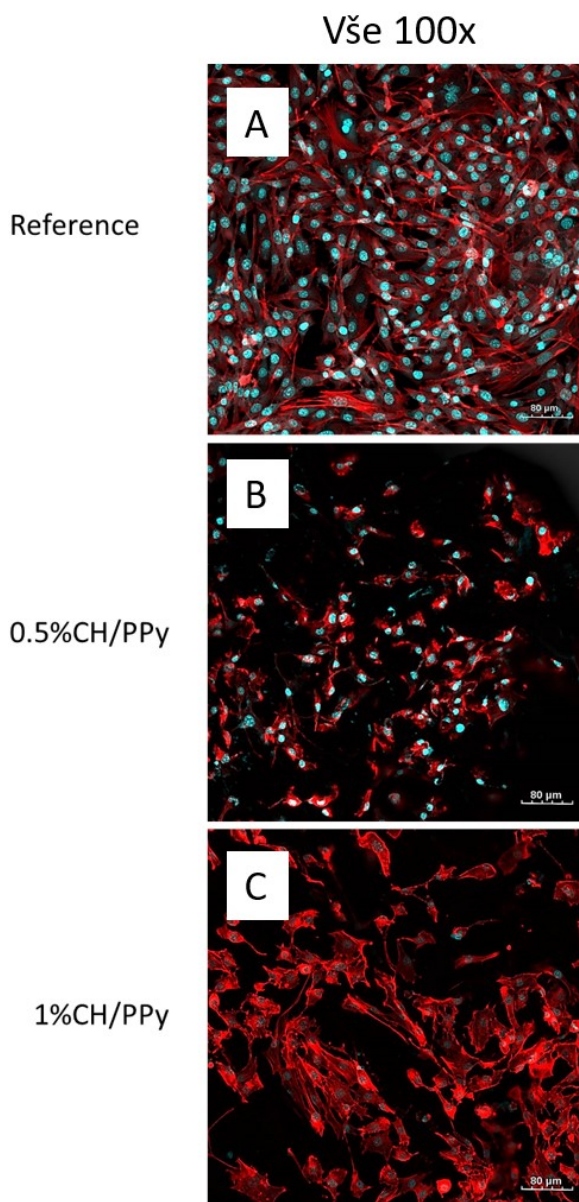
růstu a proliferace v závislosti na přítomnosti želatiny na povrchu filmu. Na vzorcích s přítomností želatiny byla větší proliferace než na vzorcích bez želatiny. Buněčná proliferace u vzorku filmu 1%CH/PPy bez želatiny byla nejnižší. (Zálešáková, 2023) Závěrem lze říci, že obě práce dosáhly srovnatelných výsledků pro buněčnou linii NIH/3T3. V případě buněčné linie ES-R1, jak uvádí Zálešáková ve své diplomové práci, byla zaznamenána větší proliferace na vzorcích potažených želatinou. Na rozdíl od této bakalářské práce, zde želatina nebyla použita. Přestože výsledky nezahrnovaly tuto komponentu, bylo dosaženo srovnatelné úrovně buněčné proliferace, což naznačuje možnost reprodukovatelnosti vytvořených filmů s biokompatibilními vlastnostmi bez dalších povrchových úprav.

V průběhu let byla provedena četná řada studií a výzkumu zaměřených na zkoumání možnosti proliferace buněčných linií na povrchu filmů z polypyrrolu a dalších vodivých polymerů. Vzhledem ke své vodivosti se PPy často používá jako substrát pro elektrosenzitivní buněčné linie, jako jsou například nervové či svalové. Například ve studii Huanga a dalších byla zkoumána možnost využití elektrostimulace pro podporu růstu neuritů a regenerace periferních nervů. Výzkum naznačuje, že vodivé polymery mohou být účinné při podpoře těchto procesů. Byl použit biodegradabilní vodivý kompozit z PPy a chitosanu s cílem elektricky stimulovat Schwannovy buňky, které hrají klíčovou roli v nervové regeneraci. Byla zkoumána tolerance těchto buněk vůči elektrostimulaci a sledována buněčná apoptóza, růst buněk a exprese nervových růstových faktorů (NFG) a neurotrofického faktoru odvozeného od mozku (BDNF). Výsledky naznačují, že elektrická stimulace aplikovaná přes vodivý kompozit výrazně zvyšuje exprese a sekreci NGF a BDNF ve Schwannových buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami bez elektrostimulace. Tato zjištění naznačují, že elektrostimulace může zlepšit účinnost nervové regenerace ve vodivých scaffoldech prostřednictvím zvýšené sekrece neurotrofinů. (Huang *et al.*, 2010)

8.3 Proliferace buněk na scaffoldech

Sledování proliferace buněk na scaffoldech představuje klíčový prvek v TI zaměřeném na regenerativní medicínu. Scaffoldy představují 3D strukturu, která napodobuje extracelulární matrix v tkáních a poskytuje prostor pro adhezi, migraci a růst buněk. Proliferace buněk na scaffoldu je důležitá pro úspěšnou tvorbu nové tkáně a její integritu. Zatímco dvojrozměrné kultivace buněk poskytují omezený pohled na buněčnou interakci, sledování proliferace buněk na scaffoldu umožňuje získat komplexnější pochopení jejich chování v trojrozměrném prostředí. Proliferace buněk na připravených scaffoldech byla vyhodnocena

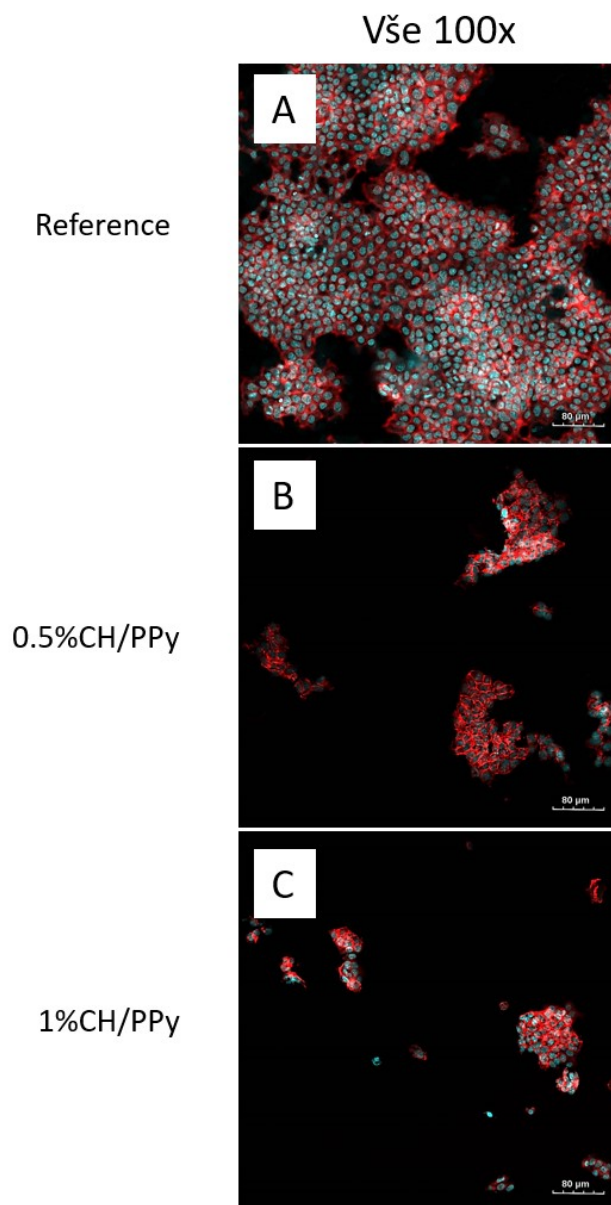
pořízením fotografií na konfokálním mikroskopu, pomocí jehož můžeme detailněji zaznamenat prorůstání buněk i do 3D struktury. Pomocí konfokální mikroskopie byla zkoumána morfologie a proliferace buněčných linií NIH/3T3 a ES-R1 na trojrozměrném povrchu scaffoldu 0,5%CH/PPy a 1%CH/PPy. Pro vizualizaci cytoskeletu byly buňky barveny barvivem ActinRedTM 555 a pro zvýraznění jader buněk bylo použito barvivo Hoechst 33258. Výsledky jsou uvedeny v obrázku 10 a 11.



Obrázek 10: Fotografie buněčné linie NIH/3T3 na povrchu scaffoldu z konfokální mikroskopie: (A) Reference, (B) 0,5%CH/PPy, (C) 1%CH/PPy. Zvětšení fotografií 100x Na fotografii vzorků scaffoldu obrázek 10B) 0,5%CH/PPy byla zaznamenána nejnižší míra proliferace buněk v porovnání s referencí (obrázek 10 A)) i se vzorkem 1%CH/PPy (obrázek

10 C)). Tento výsledek naznačuje, že scaffold s nižším obsahem chitosanu může být nevhodný pro podporu buněčné proliferace NIH/3T3. I na vzorku 1%CH/PPy bylo zaznamenáno menší množství buněk ve srovnání se vzorkem reference, nicméně rozdíl nebyl tak výrazný jako u scaffoldu s nižším obsahem chitosanu. Při zkoumání morfologie buněk na povrchu jednotlivých scaffoldů jsme pozorovali, že buňky na referenčním vzorku (A) byly rozvětvené a tvořily rovnoměrné shluky, které se rozprostíraly rovnoměrně po povrchu tkáňového plastiku. Na vzorku (obrázek 10 B)) 0,5%CH/PPy měly buňky méně rozvinutý a prostorově uspořádaný cytoskelet. Naopak na vzorku 1%CH/PPy byly buňky více rozprostřené a měly morfologii srovnatelnou s buňkami na referenčním podkladu. Utvořené buněčné výběžky se rozprostírají po povrchu scaffoldu a utvářejí tak trojrozměrnou strukturu. Poměrně jednotný tvar buněk na scaffoldu s obsahem 1%CH/PPy by mohl naznačovat, že tento materiál poskytuje vhodnější mikroprostředí pro buněčnou adhezi a proliferaci.

Dále byla vyhodnocena proliferace buněk ES-R1, stejným způsobem jako tomu bylo u buněčné linie NIH/3T3. Výsledky proliferace ES-R1 jsou zobrazeny na obrázku 11.



Obrázek 11: Fotografie buněčné linie ES R1 na povrchu scaffoldu z konfokální mikroskopie: (A) Reference, (B) 0,5%CH/PPy, (C) 1%CH/PPy. Zvětšení fotografií 100x

U proliferace buněk ES R1 na scaffoldu lze pozorovat významné rozdíly mezi scaffoldy s různým obsahem chitosanu. Na referenci (obrázek 11 A)) lze jako obvykle pozorovat dobrou proliferaci buněk, která se projevuje tvorbou velkých shluků buněk kulovitého tvaru. Na scaffoldu je pozorována distribuce buněk, které vytvářejí kompaktní shluky s jasně definovanými hranami. Na scaffoldu (obrázek 11 B)) 0,5%CH/PPy byla pozorována velmi malá proliferace buněk, což naznačuje omezenou schopnost scaffoldu podporovat buněčný růst kmenových buněk. Na tomto scaffoldu byly patrné pouze malé shluky buněk, což svědčí o nedostatečné adhezi a možné nepříznivé interakci buněk s povrchem. Podobné vlastnosti

vykazuje i scaffold (obrázek 11 C) 1%CH/PPy, kde také bylo pozorováno menší množství buněk ve srovnání s referencí. Oba scaffoldy vykazovaly horší schopnost podporovat buněčnou proliferaci kmenových buněk. Co se tvaru buněk týče, na obou scaffoldech byly pozorovány začátky buněčných shluků, ale jejich velikost byla výrazně menší než u referenčních buněk. To naznačuje, že buňky ES R1 měly potíže s adhezí a růstem na povrchu scaffoldů.

Výzkum se v posledních letech posunul stěžejním směrem v oblasti biomateriálů a rozvoji nových technologií pro scaffoldy, které jsou vybaveny specifickými fyzikálními a biologickými funkcemi. Scaffoldy by měly být navrženy tak, aby efektivně interagovaly s buňkami a s prostředím organismu jak před, tak po jejich implantaci. Jejich význam spočívá především v jejich schopnosti podporovat regeneraci a léčbu buněčných tkání, což má zásadní význam zejména v oblasti TI a regenerativní medicíny. Umělé scaffoldy jsou navrženy tak, aby jejich konečným cílem byla obnova ztracených nebo poškozených tkání a orgánů. Vhodně navržené scaffoldy mohou být také zkombinovány s vodivými materiály, které umožňují elektrickou stimulaci buněk a regulaci jejich diferenciaci a proliferaci. Možností je rovněž zakomponovat růstové faktory do 3D struktury scaffoldů, kdy tyto faktory mohou ovlivňovat chování buněk, jako je například jejich specializace na určité typy buněk, proliferace nebo migraci buněk do poškozených oblastí tkání.

Ve studii Eleny Nikolaevny Dresvyaniny bylo cílem vytvoření nového kompozitního scaffoldu, který je založen na chitosanových vláknech s PPy na jejich povrchu a testování biologických vlastností těchto materiálů. Jako buňky byly použity lidské dermální fibroblasty. Životaschopnost a proliferace buněk ve vzorcích byly vyhodnoceny pomocí MTT testu. Buňky kultivované na chitosan-PPy kompozitních maticích vykazují vyšší míru přežití a proliferace než buňky kultivované na čistých chitosanových maticích. Morfologické pozorování naznačuje, že buňky na čistých chitosanových maticích mají nepravidelný tvar a jsou špatně rozloženy, zatímco buňky na kompozitních maticích mají normální morfologii a jsou dobře rozprostřeny po povrchu. Studie také provedla testy elektrické vodivosti a mechanických vlastností (pevnost v tahu, prodloužení při přetržení a modul pružnosti) a zkoumala biokompatibilitu kompozitů chitosan-PPy. Výsledky prokázaly, že kompozitní filmy chitosan-PPy připravené metodou polymerace v methanolu vykazují lepší biokompatibilitu než nemodifikované chitosanové filmy. (Dresvyanina *et al.*, 2022) V předložené práci nebylo bohužel provedeno testování čisté chitosanové matrice, jako tomu bylo ve studii Eleny Nikolaevny Dresvyaniny. Rozhodnutí zaměřit se především

na analýzu biologického chování kompozitních filmů obsahujících PPy a chitosan otevírá cestu pro budoucí výzkum, který by se mohl soustředit právě na tuto oblast. Možnost porovnání biologického chování čisté chitosanové matrice s našimi vyvinutými scaffoldy by mohla poskytnout cenné poznatky pro další zdokonalení a optimalizaci našich materiálů. Takové srovnání by mohlo přispět k lepšímu porozumění vlivu kompozitních složek na biologickou kompatibilitu a vlastnosti biomateriálů.

ZÁVĚR

Je důležité zdůraznit význam tkáňového inženýrství a role scaffoldů v regenerativní medicíně, kdy scaffoldy představují klíčový prvek při tvorbě umělých tkání a orgánů, poskytují podporu a vhodnou trojrozměrnou strukturu pro buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk. Jejich správný výběr a konstrukce jsou zásadní pro úspěšnou regeneraci tkání.

Praktická část této bakalářské práce se zaměřovala na syntézu koloidních filmů a scaffoldů na bázi polypyrrolu a chitosanu jako potenciálních vodivých materiálů pro tkáňové inženýrství. Syntéza koloidních filmů a scaffoldů byla provedena s důrazem na optimalizaci procesu, což vedlo k vytvoření filmů s požadovanými vlastnostmi. Schopnost podporovat proliferaci buněk byla důkladně testována, a výsledky naznačují, že tyto filmy a scaffoldy jsou vhodné pro interakci s buněčnými liniemi NIH/3T3 a ES R1.

Buněčná proliferace na koloidních filmech prokázala schopnost buněk připojit se, růst a množit se na povrchu těchto materiálů, což je klíčovým ukazatelem pro jejich potenciální využití v TI. Dobrá proliferace obou typů buněčných linií na připravených filmech naznačuje, že tyto materiály jsou biokompatibilní a mohou poskytovat vhodné prostředí pro buněčný růst a diferenciaci. Dále byla testována i proliferace buněk na scaffoldech. V tomto případě bylo dosaženo horších výsledků, než když byly jako substráty použity vodivé filmy. Proliferace byla snížena zejména u kmenových buněk ES-R1. Snížení proliferace nemusí nutně souviset s materiálovým složením, ale například s jeho strukturou, kdy každému typu buněk vyhovuje struktura jiná.

Možnosti aplikace těchto vodivých koloidních filmů a scaffoldů jsou rozmanité, a zahrnují jejich využití jako nosičů pro buněčnou terapii, konstrukci biologických senzorů nebo jako součást 3D bioprintingu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Akter, F. (2016) 'Principles of Tissue Engineering', v *Tissue Engineering Made Easy*. Elsevier, pp. 3–16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3>.

Anderson, J.M. (2012) 'Biocompatibility', v *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Elsevier, pp. 363–383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00229-6>.

Ateh, D.D., Navsaria, H.A. and Vadgama, P. (2006) 'Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues', *Journal of The Royal Society Interface*, 3(11), pp. 741–752. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0141>.

Balint, R., Cassidy, N.J. a Cartmell, S.H. (2014) 'Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering', *Acta Biomaterialia*, 10(6), pp. 2341–2353. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>.

Baptista, P.M. a Atala, A. (2016) 'Regenerative Medicine', v *Translating Regenerative Medicine to the Clinic*. Elsevier, pp. 3–7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800548-4.00001-2>.

Bartel, R.L. (2015) 'Stem Cells and Cell Therapy', v *Translational Regenerative Medicine*. Elsevier, pp. 107–112. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00008-6>.

Berthiaume, F., Maguire, T.J. a Yarmush, M.L. (2011) 'Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges', *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1), pp. 403–430. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>.

Bhadra, S. *et al.* (2009) 'Progress in preparation, processing and applications of polyaniline', *Progress in Polymer Science*, 34(8), pp. 783–810. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.003>.

Boeva, Zh.A. a Sergeev, V.G. (2014) 'Polyaniline: Synthesis, properties, and application', *Polymer Science Series C*, 56(1), pp. 144–153. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S1811238214010032>.

De Jong, W.H., Carraway, J.W. a Geertsma, R.E. (2020) 'In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices', v *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*. Elsevier, pp. 123–166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102643-4.00007-0>.

Dresvyanina, E.N. *et al.* (2022) 'Electroactive composites based on chitosan fibers coated with polypyrrole', *Textile Research Journal*, 92(17–18), pp. 2966–2979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/00405175211006217>.

Duraccio, D., Mussano, F. a Faga, M.G. (2015) 'Biomaterials for dental implants: current and future trends', *Journal of Materials Science*, 50(14), pp. 4779–4812. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9056-3>.

Dutta, R.C. a Dutta, A.K. (2009) 'Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications', *Biotechnology Advances*, 27(4), pp. 334–339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.02.002>.

He, W. a Benson, R. (2017) 'Polymeric Biomaterials', v *Applied Plastics Engineering Handbook*. Elsevier, pp. 145–164. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39040-8.00008-0>.

Huang, C.-P., Yang, C.-Y. a Shyr, C.-R. (2021) 'Utilizing Xenogeneic Cells As a Therapeutic Agent for Treating Diseases', *Cell Transplantation*, 30, p. 096368972110119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/09636897211011995>.

Huang, J. *et al.* (2010) 'Electrical regulation of Schwann cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93A(1), pp. 164–174. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32511>.

Humpolicek, P. *et al.* (2012) 'Biocompatibility of polyaniline', *Synthetic Metals*, 162(7–8), pp. 722–727. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2012.02.024>.

Humpolíček, P. *et al.* (2018) 'The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile', *Materials Science and Engineering: C*, 91, pp. 303–310. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.037>.

Ikada, Y. (2006) 'Challenges in tissue engineering', *Journal of The Royal Society Interface*, 3(10), pp. 589–601. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>.

Ip, K.-T. (2012) 'Regenerative Medicine', v *Encyclopedia of Applied Ethics*. Elsevier, pp. 741–747. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373932-2.00048-X>.

Jadoun, S., Riaz, U. a Budhiraja, V. (2021) 'Biodegradable conducting polymeric materials for biomedical applications: a review', *MEDICAL DEVICES & SENSORS*, 4(1), p. e10141. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mds3.10141>.

Kirkpatrick, C.J. a Mittermayer, C. (1990) 'Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1(1), pp. 9–13. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00705347>.

Kumar, D. a Sharma, R.C. (1998) 'Advances in conductive polymers', *European Polymer Journal*, 34(8), pp. 1053–1060. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(97\)00204-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(97)00204-8).

McClelland, R. *et al.* (2005) 'TISSUE ENGINEERING', v *Introduction to Biomedical Engineering*. Elsevier, pp. 313–402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-238662-6.50009-4>.

McClelland, R.E. *et al.* (2012) 'Tissue Engineering', v *Introduction to Biomedical Engineering*. Elsevier, pp. 273–357. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374979-6.00006-X>.

- Mozafari, M. (2020) 'Principles of biocompatibility', v *Handbook of Biomaterials Biocompatibility*. Elsevier, pp. 3–9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102967-1.00001-3>.
- Omidi, M. *et al.* (2017) 'Characterization of biomaterials', v *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*. Elsevier, pp. 97–115. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00007-4>.
- Prokeš, J., Stejskal, J. a Omastová M. (2001) Polyanilin a polypyrrol - dva představitelé vodivých polymerů, *Chemické listy*, 95(8), s. 484-492, Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11104/0084438>
- Rasmussen, S.C. (2020) 'Conjugated and Conducting Organic Polymers: The First 150 Years', *ChemPlusChem*, 85(7), pp. 1412–1429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cplu.202000325>.
- Ratheesh, G. *et al.* (2017) '3D Fabrication of Polymeric Scaffolds for Regenerative Therapy', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(7), pp. 1175–1194. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00370>.
- Ratner, B.D. a Bryant, S.J. (2004) 'Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going', *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6(1), pp. 41–75. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>.
- Salgado, A.J. *et al.* (2013) 'Tissue Engineering and Regenerative Medicine', v *International Review of Neurobiology*. Elsevier, pp. 1–33. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410499-0.00001-0>.
- Schmalz, G. (2009) 'Determination of Biocompatibility', v *Biocompatibility of Dental Materials*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 13–43. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-540-77782-3_2.
- Segeritz, C.-P. a Vallier, L. (2017) 'Cell Culture', v *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier, pp. 151–172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>.
- Shafiee, A. a Atala, A. (2017) 'Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine', *Annual Review of Medicine*, 68(1), pp. 29–40. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-102715-092331>.
- Stejskal, J. *et al.* (2015) 'Conducting Polymers: Polyaniline', v H.F. Mark (ed.) *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 3rd edn. Wiley, pp. 1–44. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst640>.
- Trebuňová, M. a Šromovská, K. (2018) Assessment of Biocompatibility of Materials for Implantology on the Protein Level, *Acta Mechanica Slovaca*, 22(1), s. 34–39. Dostupné z: <https://www.actamechanica.sk/pdfs/ams/2018/01/06.pdf>
- Vacanti, J.P. a Vacanti, C.A. (2014) 'The History and Scope of Tissue Engineering', v *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, pp. 3–8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X>.

Vunjak-Novakovic, G. a Freshney, R.I. (eds) (2005) *Culture of Cells for Tissue Engineering*. 1st edn. Wiley. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471741817>.

Wang, X. *et al.* (2004) 'Evaluation of biocompatibility of polypyrrole *in vitro* and *in vivo*', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 68A(3), pp. 411–422. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20065>.

Williams, D.F. (1987) 'Tissue-biomaterial interactions', *Journal of Materials Science*, 22(10), pp. 3421–3445. Dostupné z t: <https://doi.org/10.1007/BF01161439>.

Yao, T. a Asayama, Y. (2017) 'Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues', *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), pp. 99–117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>.

Zálešáková, M. (2023) Příprava filmů a koloidů na bázi vodivých polymerů a chitosanu, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/53539>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BDNF	Mozkový neurotrofický faktor (Brain – derived neurotrophic factor)
NFG	Růstový faktor nervů (Nerve growth factor)
MTT	(3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
PANI	Polyanilin
PDLLA	Poly(D,L – mléčná kyselina)
PPy	Polypyrrol
TI	Tkáňové inženýrství

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Polypyrrol (Bhadra <i>et al.</i> , 2009)	22
Obrázek 2: Polyanilin (Bhadra <i>et al.</i> , 2009)	24
Obrázek 3: Redoxní formy polyanilinových bází, (A) Pernigranilinová báze, (B) Smaragdová báze, (C) Leukoemeraldinová báze (Stejskal <i>et al.</i> , 2015)	24
Obrázek 4: Ukázka vzorků připravených koloidních disperzí.....	33
Obrázek 5: Příprava filmů PPy/Chitosan A) před polymerizací, B) plně zpolymerizované	34
Obrázek 6: Scaffold po lyofilizaci (1 %CH/PPy).....	34
Obrázek 7: Mikrofotografie scaffoldů pořízené pomocí SEM, (A) 0,5%CH/PPy; (B) 0,1%CH/PPy.....	37
Obrázek 8: Fotografie buněčné linie NIH/3T3 na povrchu koloidního filmu z fluorescenční mikroskopie: (A) Reference – zvětšení 40x, (B) Reference – zvětšení 100x, (C) 0,5%CH/PPy – zvětšení 40x, (D) 0,5%CH/PPy – zvětšení 100x, (E) 1%CH/PPy – zvětšení 40x, (C) 1%CH/PPy – zvětšení 100x.....	38
Obrázek 9: Fotografie buněčné linie ES R1 na povrchu koloidního filmu z fluorescenční mikroskopie: (A) Reference – zvětšení 40x, (B) Reference – zvětšení 100x, (C) 0,5%CH/PPy – zvětšení 40x, (D) 0,5%CH/PPy – zvětšení 100x, (E) 1%CH/PPy – zvětšení 40x, (C) 1%CH/PPy – zvětšení 100x.....	39
Obrázek 10: Fotografie buněčné linie NIH/3T3 na povrchu scaffoldu z konfokální mikroskopie: (A) Reference, (B) 0,5%CH/PPy, (C) 1%CH/PPy. Zvětšení fotografií 100x	41
Obrázek 11: Fotografie buněčné linie ES R1 na povrchu scaffoldu z konfokální mikroskopie: (A) Reference, (B) 0,5%CH/PPy, (C) 1%CH/PPy. Zvětšení fotografií 100x	43