

Biologické vlastnosti scaffoldů studovaných pomocí bioreaktorů

Bc. Martina Kašparová

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Kašparová**

Osobní číslo: **T17293**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství polymerů**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biologické vlastnosti scaffoldů studovaných pomocí bioreaktorů**

Zásady pro vypracování:

Scaffoldy jsou využívány jako nosná matrice pro kultivaci eukaryotických buněk, které mohou být vyrobeny z biopolymerů, syntetických polymerů, ale také např. keramiky. Stanovení biologických vlastností je vázáno na simulaci in vivo podmínek, např. pomocí využití bioreaktorů. Cílem práce bude příprava polymerních scaffoldů a scaffoldů založených na keramice povrchově upravených polymerními látkami. Připravené materiály budou následně charakterizovány z hlediska biologických vlastností.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zdenka Capáková, PhD.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2019**

Ve Zlíně dne 18. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno:

Obor:

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

.....

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 nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či 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). Odírá-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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo prozkoumat keramický materiál vyrobený pomocí technologie PIM jako potenciální materiál pro tvorbu scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Teoretická část práce se zabývá scaffoldy, možnostmi jejich výroby a materiály, které jsou vhodné pro jejich výrobu. Dále jsou zde popsány možné metody pro modifikaci povrchu scaffoldů a možnosti jejich kultivace s tkáňovými kulturami v bioreaktorech. Praktická část práce je zaměřena na stanovení cytokompatibility keramického materiálu, modifikaci jeho povrchu a proliferaci buněk na povrchu materiálu. Série testování byla zakončena dynamickou kultivací keramického scaffoldu v bioreaktoru.

Klíčová slova:

Biomateriál, scaffold, PIM technologie, keramika, modifikace povrchu, dynamická kultivace, bioreaktor, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

Main goal of this thesis is to determine whether the ceramic material manufactured using PIM technology is suitable as a scaffold for tissue engineering. Theoretical part is dealing with materials and procedures for preparation of the scaffolds. This is followed by description of different surface modifications and options for cultivation of tissue cultures on the scaffolds in bioreactors. The experimental part is focused on determination of cytocompatibility, surface modification and investigation of cell proliferation on surface of the material. Tests were finished by dynamic cultivation of ceramic scaffold in bioreactor.

Keywords:

Biomaterials, scaffold, PIM technology, ceramic, surface modification, dynamic systems for cultivation, bioreactors, tissue engineering

Velice ráda bych poděkovala své vedoucí práce Ing. Zdeně Capákové, Ph.D za profesionální vedení, odborné rady a pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří svou pomocí přispěli ke vzniku této diplomové práce. Tato práce byla podpořena z projektu IGA/CPS/2019/004.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 SCAFFOLDY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	12
1.1 POŽADAVKY NA SCAFFOLDY	13
1.1.1 Biokompatibilita.....	13
1.1.2 Biodegradabilita	14
1.2 MORFOLOGICKÁ STRUKTURA SCAFFOLDŮ.....	14
1.3 ADHEZE BUNĚK	15
1.4 TECHNOLOGIE VÝROBY SCAFFOLDŮ	17
1.4.1 Odlévání	17
1.4.2 Gas-foaming	18
1.4.3 Termálně indukovaná fázová separace	19
1.4.4 3D tisk	20
1.4.5 Metoda replikace polymerní houby (polymer sponge replication method)	20
1.4.6 PIM.....	21
2 BIOMATERIÁLY.....	23
2.1 PŘÍRODNÍ BIOMATERIÁLY (PŘÍRODNÍ POLYMERY).....	24
2.1.1 Biomateriály proteinového původu.....	24
2.1.1.1 Kolagen.....	25
2.1.1.2 Hedvábí.....	25
2.1.2 Biomateriály polysacharidového původu.....	26
2.1.2.1 Hyaluronan - kyselina hyaluronová (HA)	27
2.1.2.2 Alginát	27
2.1.2.3 Chitosan	29
2.2 SYNTETICKÉ BIOMATERIÁLY	30
2.2.1 Polymerní biomateriály (syntetické polymery).....	30
2.2.2 Keramické biomateriály	31
2.2.3 Scaffolds tvořené kovy	32
2.3 POVRCH BIOMATERIÁLŮ.....	33
2.4 MODIFIKACE POVRCHU	33
2.4.1 Fyzikální a chemické metody.....	34
2.4.2 Technologie potahování povrchu	34
2.4.2.1 Fyzikální adsorpce proteinů ECM na biomateriály	35
3 KULTIVACE V BIOREAKTORU	37
3.1 BIOREAKTOR	38
3.2 SAZENÍ BUNĚK NA SCAFFOLD	38
3.3 PROCESNÍ PODMÍNKY KULTIVACE OVLIVŇUJÍCÍ RŮST A MORFOLOGII BUNĚK	39
3.3.1 pH.....	39
3.3.2 Teplota.....	39
3.3.3 Rozpuštěný kyslík	39

3.3.4	Koncentrace oxidu uhličitého (CO ₂).....	40
3.4	TYPY BIOREAKTORŮ.....	40
3.4.1	Perfuzní bioreaktor (Perfusion Systems)	40
3.4.2	Nádoby umožňující míchání (Stirred Vessels) – Spinner flasks.....	41
3.4.3	Rotační bioreaktor (Rotating Wall Vessel).....	41
II	PRAKTICKÁ ČÁST	42
4	TESTOVÁNÍ CYTOKOMPATIBILITY PIM KERAMIKY.....	43
4.1	POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE, MATERIÁL.....	43
4.2	KULTIVACE NIH/3T3.....	44
4.3	CYTOTOXICITA PIM MATERIÁLU	45
4.3.1	Test MTT	45
4.4	MODIFIKACE POVRCHU	46
4.4.1	Polyanilinový film bez stabilizátorů (PANI)	46
4.4.2	Polyanilinový film s hyaluronátem sodným (PANI+SH).....	46
4.4.3	Polyanilinový film s chitosanem (PANI+CHIT)	47
4.4.4	Polyanilinový film s alginátem sodným (PANI+ALG.S.).....	47
4.5	STERILIZACE VZORKŮ	47
4.6	BUNĚČNÁ PROLIFERACE NA POLYMERNÍCH FILMECH	48
4.6.1	Fixace a barvení jaderné DNA a aktinových vláken.....	48
4.7	CYTOTOXICITA V PŘÍMÉM KONTAKTU	48
4.8	OSAZENÍ SCAFFOLDŮ BUŇKAMI.....	49
4.9	BARVENÍ DNA BUNĚK BEZ FIXACE	49
4.10	BIOREAKTOR	49
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
5.1	VÝSLEDKY CYTOTOXICITY	51
5.2	VÝSLEDKY BUNĚČNÉ PROLIFERACE NA POLYMERNÍCH FILMECH.....	53
5.3	MODIFIKOVANÝ POVRCH.....	56
5.3.1	Laserová skenovací konfokální mikroskopie.....	56
5.4	CYTOTOXICITA V PŘÍMÉM KONTAKTU	59
5.5	VÝSLEDKY OSAZENÍ SCAFFOLDU BUŇKAMI (BUNĚČNÁ PROLIFERACE).....	60
5.5.1	PIM keramika s modifikovaným povrchem.....	60
5.5.2	PIM keramika bez povrchových úprav	62
5.6	VÝSLEDKY DYNAMICKÉ KULTIVACE V BIOREAKTORU	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK.....	79

ÚVOD

Z důvodu rozvoje v oblasti medicíny se stále vyvíjí nové a lepší materiály pro tvorbu náhrad, implantátů nebo scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Obor tkáňového inženýrství je zaměřený na vývoj biologických náhrad, jejichž cílem je obnovit, udržet nebo zlepšit funkci tkáně [1]. Tato práce se zabývá scaffoldy, což jsou umělé implantační konstrukce, které podporují a řídí růst buněk žádoucí tkáně [2]. Podpoření růstu tkáně, je možné vybráním vhodného materiálu pro tvorbu scaffoldu, proto je materiál vybírán s ohledem na místo aplikace v hostitelské tkáni. S rostoucím spektrem použitelných materiálů pro tvorbu scaffoldů, se rozšiřuje i oblast možných metod pro jejich výrobu. Různými technikami lze získat scaffoldy s jedinečnými fyzikálními, chemickými, mechanickými a biologickými vlastnostmi. Jednou z možností přípravy scaffoldů je technologie Powder Injction Molding. Tato technologie by mohla být přínosná v rámci personalizované medicíny, protože umožňuje vyrábět produkty s vysokou precizností. Je možné získat implantáty v různých tvarech s definovanou velikostí pórů i celkovou porozitou. Všechny tyto faktory, mohou mít vliv na přijetí implantátu. Protože se většina biologických reakcí odehrává na rozhraní mezi biologickým systémem a povrchem implantátu, jsou velmi důležité povrchové vlastnosti implantátu. Jsou to jedny z hlavních faktorů pro aplikovatelnost scaffoldů v reálném systému. Aby byla zvýšena šance na přijetí implantátu je možné jeho povrch modifikovat. Účelem povrchových úprav je modifikovat povrch materiálu s cílem získání požadovaných vlastností.

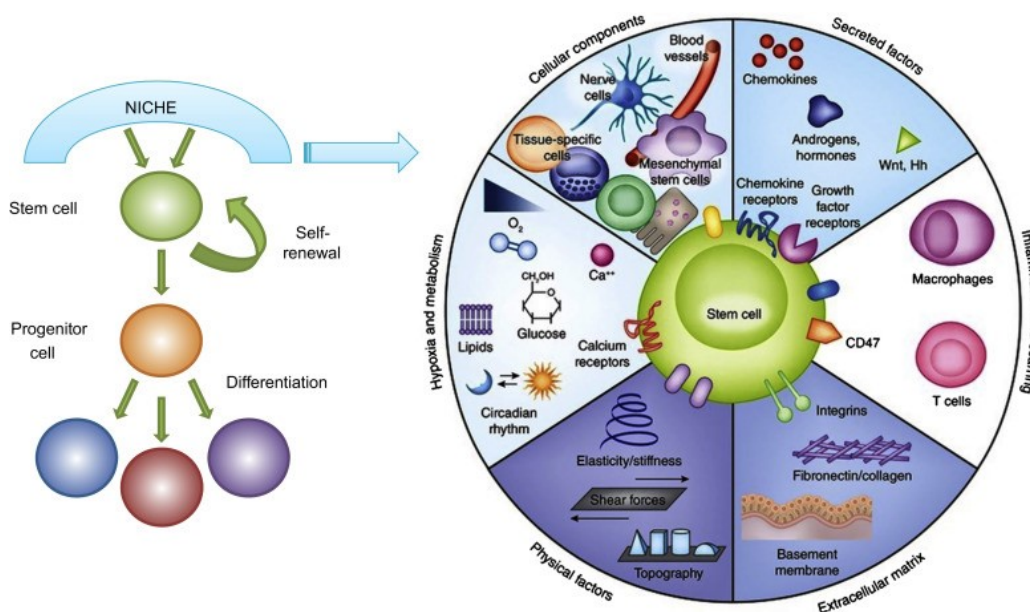
V rámci praktické části práce je nejdříve popsána cytokompatibilita keramického materiálu vyrobeného pomocí technologie PIM. Stanovení cytokompatibility závisí na cytotoxicitě materiálů, dále na adhezi buněk k materiálu a též na buněčné proliferaci. Pro zvýšení adheze a proliferace buněk je vhodné povrchy materiálů modifikovat. Série testování je zakončena kultivací za dynamických podmínek v bioreaktoru.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SCAFFOLDY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

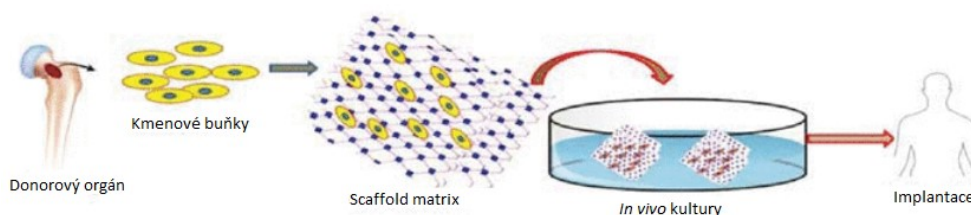
Tkáňové inženýrství je obor zaměřený na vývoj biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci některé tkáně [1].

Scaffold je umělá implantační konstrukce pro regeneraci tkání *in vivo* [2]. Tedy jsou to struktury, které podporují a řídí růst buněk žádoucí tkáně v kultivačním médiu [3]. Hlavní funkcí scaffoldu je poskytnout dočasnou podporu pro tkáňovou strukturu [4]. Pro podpoření tkáňové a orgánové struktury a pro regulaci základních buněčných funkcí (buněčná proliferace, růst) je vhodné, aby scaffold co nejlépe napodobil přírodní extracelulární matrix (natural extracellular matrix). Pod pojmem extracelulární matrix (ECM) si lze představit složitý komplex mnoha proteinů a polysacharidů, které vzájemně vytváří síť v tkáních [5]. Tato komplexní síť se skládá z proteinů vláknité struktury s vysokou molekulovou hmotností, jako je například kolagen, laminin a fibronectin. Polysacharidová složka je sekretována a organizována samotnými buňkami. Její přesné složení se pro jednotlivé tkáně liší [6]. Molekuly, ze kterých se ECM skládá, především proteiny, poskytují mechanickou pevnost, která je potřebná pro správnou funkci tkání a také slouží jako prostředek pro výměnu informací mezi sousedními buňkami a mezi buňkami a samotou ECM [7]. Hlavní funkcí ECM je poskytnout buňkám strukturní podporu, ale může sloužit také jako fyzikální bariéra nebo jako selektivní filtr pro některé rozpustné molekuly. ECM funguje jako struktura pro udržení tkání a orgánů, ale reguluje také mnoho aspektů chování buněk a to včetně proliferace buněk a růstu, přežití a změny tvaru buněk, migrace a diferenciací [5].



Obr. 1 Niche kmenových buněk (Stem cell niche), převzato z [8]

Volba vhodného materiálu pro implantát se řídí především podmínkami, které musí scaffoldy splňovat pro bezpečné použití implantátu. Musí být biokompatibilní a v závislosti na použití někdy i biodegradabilní, tedy nemají vyvolat žádnou zánětlivou, cytotoxickou ani imunologickou odpověď [4]. Velký význam pro následující interakci buněk, jako je proliferace, diferenciaci, migrace a další, má interakce mezi povrchem biomateriálu a buňkami. Důležitými faktory je také topografie, 3D geometrie, mechanické a fyzikální vlastnosti a chemické složení [9].



Obr. 2 Ilustrace funkce a práce se scaffoldem, upraveno z [3]

1.1 Požadavky na scaffoldy

1.1.1 Biokompatibilita

Ideální materiál pro opravu tkáňového poškození a pro jeho regeneraci musí být biokompatibilní [4]. Zpočátku se koncept biokompatibility primárně odvolával na požadavky dlouhodobých implantačních materiálů, a proto se jednalo o materiály, které vykazovaly minimální reaktivnost s biologickými systémy. Následně se definice rozšířila o požadavek bioaktivity [9]. Obecně je tedy důležité, aby byl materiál netoxický a neimunogenní. To znamená, že nesmí vyvolat žádnou nežádoucí reakci (zánětlivost, cytotoxicita, karcinogenita, mutagenita, ...) [10] S dalším vývojem definice biomateriálu a jeho klinického využití došlo k novému porozumění, že by biomateriál měl fungovat s odpovídající reakcí hostitele a přitom nevyvolávat žádné nežádoucí lokální nebo systémové účinky v rámci hostitele [9; 11].

Takže biokompatibilitu lze chápat jako schopnost materiálu vyvolat vhodnou biologickou odpověď pro danou aplikaci v těle [12]. Jedná se o kompatibilitu s živou tkání, nebo s živým systémem s tím, že materiál není toxický, škodlivý, nebo fyziologicky reaktivní a není příčinou imunologického odmítnutí. Buňky musí být schopné adherovat k danému materiálu, migrovat na povrch a postupně scaffoldem prorůstat a proliferovat, ve speciálních případech i diferenciovat [13].

1.1.2 Biodegradabilita

Ideálem tkáňového inženýrství je, aby implantovaný konstrukční materiál byl v průběhu času nahrazen buňkami [13]. Některé scaffoldy nejsou určeny jako trvalé implantáty a proto je biologická rozložitelnost dalším důležitým kritériem pro volbu materiálu, ze kterého bude scaffold vytvořen [14]. Kontrolují se parametry jako je molekulová hmotnost, doba a rychlost biodegradace [10].

V případě, kdy se implantovaný materiál vkládá do těla za účelem dočasné podpory (šicí materiál, některé scaffoldy pro buňky, které regenerují tkáň ...), se vyžaduje, aby byl materiál rozložitelný. Očekává se jeho degradace v určeném čase a všechny jeho produkty získané degradací musí být netoxické [15].

1.2 Morfologická struktura scaffoldů

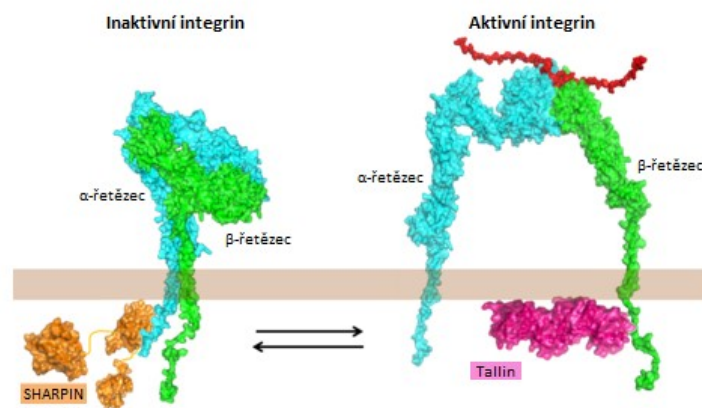
Porézní materiály by se daly klasifikovat do několika skupin z hlediska struktury pórů. Struktura pórů je jedním ze zásadních faktorů při vývoji scaffoldu pro tkáňové inženýrství. Póry scaffoldů mohou být propojené, tedy otevřené póry. Nebo mohou být póry uzavřené, to znamená nepropojené. Další možností je kombinace těchto dvou variant [16]. Volba struktury pórů závisí především na účelu použití. Scaffoldy by měly mít vzájemně propojenou strukturu pórů a celkově vysokou pórovitost, aby byla zajištěna buněčná penetrace a dostatečně velká difúze živin do buněk uvnitř scaffoldu. Velice důležité je, aby struktura konstrukčního materiálu umožňovala také difuzi odpadních a degradačních látek ze scaffoldu, které jsou schopné opustit tělo bez zásahu do okolních tkání a jiných orgánů [13]. Velikost pórů není neomezená, existují hranice minimální i maximální velikosti pórů [17]. Ta je rozdílná v závislosti na aplikaci scaffoldu, ale i na jeho materiálu. Maximální hranice pórů závisí na materiálu, a tedy na jeho optimálních mechanických vlastnostech pro danou aplikaci. Studie porézních implantátů pro kostní aplikace ukazuje, že minimální velikost pórů pro významný růst kostí je 75–100 μm , přičemž optimální rozsah je v rozmezí 100–135 μm [18]. Průměrná velikost pórů scaffoldu určeného pro regeneraci chrupavky je v rozmezí 100–500 μm [19]. Vždy se volí kompromis mezi pórovitostí a mechanickými vlastnostmi, tedy vysoká pórovitost (například 90 %) poskytuje pro prorůstání buněk dovnitř materiálu velký objem pórů, a umožňuje tak tvorbu velkého množství extracelulární matrix (ECM), ale zároveň snižuje mechanické vlastnosti [16]. V případě příliš malých pórů je omezená migrace buněk a dochází k vytvoření „kapsle“ na okrajích scaffoldu. To způsobí sníženou difuzi živin a odpadních produktů a to vede ke vzniku ne-

krotických oblastí ve scaffoldu. Pokud jsou póry příliš velké, snižuje se povrchová plocha, a tak i adheze buněk [17]. Makro-póry ovlivňují tkáňovou funkci, například póry, které dosahují rozměrů větších, než 300 μm , jsou používány pro růst kostí. Mikro-póry menší než 50 μm mají vliv na buněčnou funkci. Průměrná velikost buňky se pohybuje v rozmezí od 10 – 100 μm v závislosti na jejich fyziologickém stavu, diferenciaci atd. Nano-pórovitost určuje architekturu pórů v nano-měřítku (1–1000 nm) [16]. Mechanické vlastnosti porézních scaffoldů závisí na průměru pórů a celkové pórovitosti. Kdy větší póry a celková propojenost pórů koreluje s nižší mechanickou pevností v důsledku vyššího objemu prázdného prostoru [20].

1.3 Adheze buněk

Buněčné interakce s ECM a se sousedními buňkami důsledně ovlivňuje řadu signálních drah ovlivňujících přežití a diferenciaci [21]. Aby scaffold úspěšně zlepšil tkáňovou regeneraci, musí být buňky schopny použít jejich povrchové transmembránové adhezivní receptory k vytvoření spoje. Buněčná adheze (adhezivní interakce) může představovat adhezi buněk k povrchu, ale i buněk mezi sebou. Uskutečňuje se prostřednictvím adhezivních proteinů buňky. Tyto adhezivní proteiny jsou též známy jako adheriny. Jedná se o skupinu proteinů tvořenou především imunoglobuliny, integriny, selektiny a kadheriny (integrin, selectin a cadherin families) [22]. Adhezivní molekuly zajišťují spojení buňky k povrchu, ale i propojení mezi cytoskeletem a ECM (tento druh adheze zajišťují integriny) [23].

Jednou z nejběžnějších rodin adhezivních proteinů jsou integriny. Skládají se ze dvou podjednotek, které jsou vázány nekovalentní vazbou. Podjednotky bývají označovány jako α a β a dokáží vytvořit přibližně 24 různých integrinových heterodimerů [24]. V závislosti na kombinaci podjednotek můžou integriny zajišťovat spojení ICAM (intercellular adhesion molecule), VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1) [23], tedy navázat se na receptory na jiných buňkách. Většina integrinů se dokáže vázat na komponenty ECM jako je kolagen, fibronectin, laminin, fibrinogen, krevní proteiny a další [25]. Transmembránový protein integrin je tvořen několika podjednotkami. Skládá se z globulární hlavy, kde se vyskytuje vazebné místo pro ligand, stopky (stalk) a z krátkého cytoplazmatického regionu, který je tvořen přibližně 40 – 60 aminokyselinami. Integriny se mohou vyskytovat ve třech stavech. S nízkou afinitou (neaktivní), s vysokou afinitou a s vázaným ligandem (aktivní). Jednotlivé stavy jsou určovány konformačními změnami v oblasti hlavy proteinu [23].



Obr. 3 Přechod z neaktivního integrinu na aktivní formu vyžaduje oddělení integrinových „nohou“. Vazba Talinu na podjednotku β -integrinu podporuje konformaci otevřeného (aktivního) integrinu s vysokou afinitou pro extracelulární ligandy. Kdežto vazba SHARPIN na podjednotku α -integrinu udržuje integrin v neaktivním stavu, upraveno z [26]

Skupina kadherinů (cadherins) představuje opět transmembránové proteiny. K jejich navázání potřebují Ca^{2+} [27]. Zprostředkují homeotypickou adhezi buňka-buňka, kde vystupují jako ligand i receptor. Jsou charakteristické tím, že ve své struktuře obsahují alespoň dvě po sobě jdoucí extracelulární domény typické pro kadheriny, známé jako kadherinové repetic. Obsahují i 110 aminokyselin se zachovaným vazebným místem pro vápník. Některé kadheriny mají až 34 kadherinových repetic, ale u většiny se vyskytuje pouze čtyři až pět repetic [23]. Lokalizují se na specifických místech v plazmatické membráně a interagují s podobnými kadheriny na sousedních buňkách [27]

Buňky v *in vitro* podmínkách rozpoznají cizí povrch a jsou schopny se připevnit pomocí vrstvy adsorbovaných proteinů. Molekuly fibronektinu, kolagenu, lamininu a vitronektinu, které se vyskytují v kultivačním médiu doplněném o sérum, se spontánně formují do tenkého filmu na povrchu kultivační nádoby nebo na povrchu biomateriálu [28]. Stejný proces adsorpce nastává i v případě implantace biomateriálu do těla. Jakmile jsou biomateriály obklopeny biologickým prostředím, dochází k povrchovému navázání proteinů přirozeně se vyskytujících v tomto prostředí [24]. Receptory na povrchu buněk jsou schopny rozpoznat specifické aminokyselinové sekvence, které jsou přítomny na ECM molekulách a dokážou se na tyto aktivní místa navázat. Stupeň adheze je ovlivněn homogenitou a množstvím adsorbovaných proteinů společně s množstvím těchto aktivních vazebných míst a jejich dostupností. Na adsorbovanou vrstvu proteinů mají vliv především povrchové

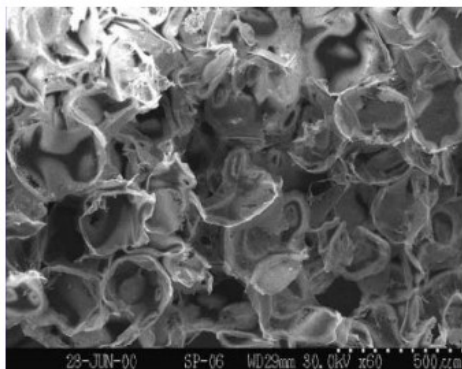
vlastnosti implantovaného materiálu, tedy chemické a fyzikální vlastnosti povrchu materiálu [28]. Determinující faktor v úrovni adheze buněk k povrchu je drsnost, hydrofilita a chemie povrchu (funkční skupiny). Adsorpce proteinů je rychlejší než migrace buněk na cizí povrch, proto se předpokládá, že počáteční adsorbovaná proteinová vrstva je rozhodujícím faktorem rychlosti buněčné adheze [22].

1.4 Technologie výroby schaffoldů

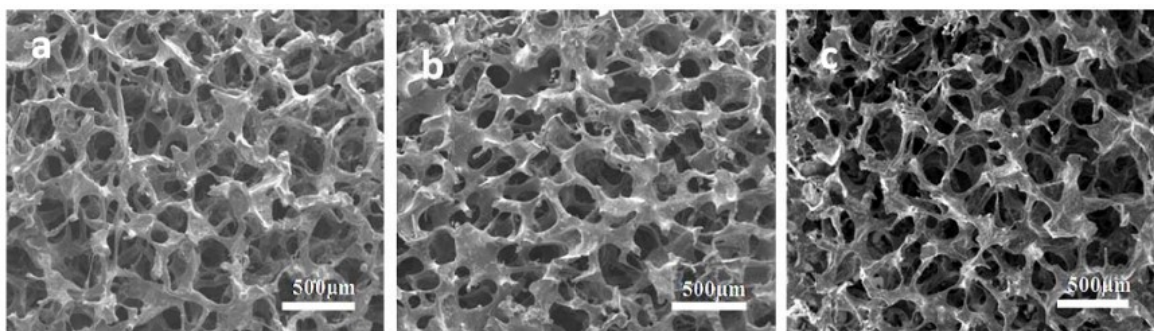
Aby byl scaffold klinicky a komerčně akceptovatelný, měl by být samozřejmě také nákladově výhodný [13]. Zvolení techniky pro výrobu syntetických polymerních konstrukcí závisí nejen na vlastnostech polymeru, ale i na jeho zamýšlené aplikaci. Zpracování polymerů do požadovaného tvaru 3D matrice se může provádět hned několika způsoby [29]. Existuje řada výrobních technik pro scaffoldy, kdy každá technika má své výhody a omezení. Různými technikami se získají scaffoldy s jedinečnými fyzikálními, chemickými, mechanickými a biologickými vlastnostmi [30]. V následující kapitole budou popsány některé z možných metod přípravy scaffoldů.

1.4.1 Odlévání

Jednou z možností výroby, která se využívá například při výrobě chitosanových scaffoldů, je odlévání. Při tomto způsobu výroby se nejprve rozpustí polymer v organickém rozpouštědle. Do takto připraveného roztoku se přimíchají částice se specifickými rozměry [31]. Tyto částice se nazývají porogeny a jejich velikost ovlivňuje výslednou velikost pórů. Často se používají porogeny jako je například sůl, glukóza nebo želatina, a to především kvůli jejich biokompatibilitě a snadnému odstranění, protože se jedná o částice ve vodě rozpustné [30]. Vzhledem k různým hustotám porogenů a polymerních roztoků je obtížné dosáhnout rovnoměrné distribuce částic v celém objemu scaffoldu [32]. Pro zlepšení poréznosti a distribuce pórů lze využít pro dispergaci porogenů ultrazvukovou disperzi nebo centrifugaci roztoku polymeru [33]. Roztok s porogenem se nalije do formy, která bude určovat tvar scaffoldu a umožní odpaření rozpouštědla. Poté následuje ponoření kompozitního materiálu do rozpouštědla, které rozpustí částice, takto vznikne porézní struktura konstrukčního materiálu. Tato technologie je poměrně jednoduchá, avšak nelze u ní kontrolovat propojenost pórů, navíc takto získané scaffoldy mají poměrně nízké mechanické vlastnosti [31].



Obr. 4 Průřez polymerním (PLGA) scaffoldem získaným pomocí technologie odlévání s využitím procesu solné fúze, převzato z [32]



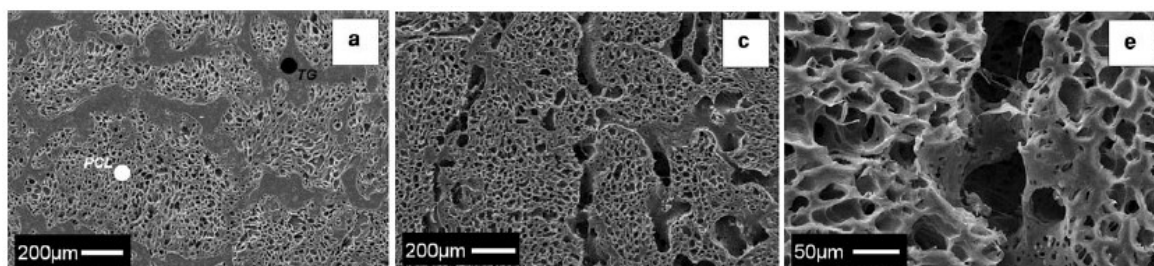
Obr. 5 SEM fotografie polyurethanového scaffoldu připraveného odléváním rozpouštědla s vyluhováním částic s distribucí porogenu pomocí centrifugace, převzato z [33]

1.4.2 Gas-foaming

Abychom se vyhnuli používání toxických organických rozpouštědel a pevných částic, lze použít procesu plynového zpěňování (gas-foaming). Důležité u této techniky je dobré nasycení plynu (např. oxidu uhličitého) v polymeru za pomoci přetlaku. Po snížení tlaku na atmosferický tlak dochází ke vzniku plynových bublin CO_2 , které polymer zpění [31]. Při této metodě funguje jako porogen plyn, který po začlenění nevyžaduje další odstranění [30]. Velikost póru lze usměrnit reakční dobou, teplotou a typem biopolymeru [31]. Příkladem, kdy bylo použito této technologie, můžou být pevné disky PLGA (kopolymer kyseliny mléčné a glykolové), připraveny buď lisováním, nebo odléváním s rozpouštědlem, které byly vystaveny vysokému tlaku CO_2 (5,5 MPa při teplotě 25 °C), tím byl polymer plynem nasycen. Po vytvoření termodynamické nestability byl snížen tlak plynu na úroveň tlaku okolního prostředí, to způsobilo nukleaci a expanzi plynových bublin CO_2

v polymeru. Tímto postupem byla získána matrice PLGA s porézností dosahující až 93% [29].

V článku *Salerno et al. (2009)* byla popsána výroba scaffoldu pomocí kombinace plynového zpěňování a vyluhováním porogenu. Byla použita kombinace poly (ϵ -kaprolactonu) (PCL) a termoplastické želatiny (TG) jako poromeru, která byla z napěněné směsi odstraněna selektivní polymerní extrakcí. Jako nadouvadlo při procesu pění plynem byla použita směs N_2/CO_2 . Změna polymerní kompozice anebo procesních parametrů pěního plynu může ovlivňovat tvorbu pórů. Například je-li použita příliš vysoká pěnívá teplota, PCL nebude krystalizovat a bude docházet k hroucení scaffoldu [34].



Obr. 6 SEM fotografie PCL/TG napěněné směsi, (a) před odstraněním TG, (c,e) po odstranění TG, upraveno z [34]

1.4.3 Termálně indukovaná fázová separace

Další možností přípravy porézního scaffoldu je fázová separace, která se může uskutečnit prostřednictvím chemických změn nebo změn tepelných jako termálně indukovaná fázová separace (thermally induced phase separation) [35]. Při této metodě se dosahuje fázové separace homogenního polymerního roztoku podchlazením polymerního rozpouštědla. To vede k tuhnutí kapalných částí, tedy ke vzniku krystalů rozpouštědla a k vzniku oblastí s vysokým a nízkým obsahem polymeru. Krystaly rozpouštědla jsou odstraněny vakuovou sublimací. Výslednou pórovitost lze ovlivnit volbou polymeru a jeho koncentrací [31]. Na výsledné velikosti a struktuře pórů má vliv i změna podmínek mrznutí, která může změnit strukturu ledového krystalu [36]. Na začátku je polymer rozpuštěn v rozpouštědle, tím může být fenol, naftalen a jiné. Dalším krokem může být přidání bioaktivní látky do polymeru a rozpouštědla za vzniku disperze. Oddělení fáze kapalina-kapalina je vyvoláno snížením teploty roztoku. Výsledný scaffold s bioaktivními molekulami je získán sublimací ztuhlého rozpouštědla. Z výše zmíněných příkladů rozpouštědel má fenol nižší teplotu tání, a může

se proto jevit vhodnější. Je však polárnější než naftalen, a tak možnou nevýhodou je, že může interagovat s bílkovinami, a oslabit tak vodíkovou vazbu ve struktuře bílkoviny. To může vést ke ztrátě aktivity proteinu. Na druhou stranu lze fenol použít pro zachycení malých molekul léků a krátkých peptidů [29]. U scaffoldu vyrobeného touto metodou je obtížné ovládnutí velikosti pórů a též reprodukovatelnost scaffoldů je sporná kvůli náhodnosti při tvorbě a sublimaci krystalů ledu [30].

1.4.4 3D tisk

Technologie rapid prototyping využívá pro tvorbu komplexních 3D struktur, scaffoldů, CAD (computer-aided design) modely. V tomto modelu mohou být definovány charakteristiky jako je porozita, propojenost pórů, jejich velikost a distribuce. 3D tisk je jedním typem technologie, která se řadí pod rapid prototyping [30].

Bioprinting je technologie, která je někde mezi buněčnou biologii, materiálovou vědou a inženýrstvím. Tato technologie umožňuje vytištění scaffoldů z různých biomateriálů spolu s živými buňkami do ideálního komplexního uspořádání pro zhotovení tkání. Bioprintingem lze získat scaffoldy různých tvarů, velikostí a rozlišení [37].

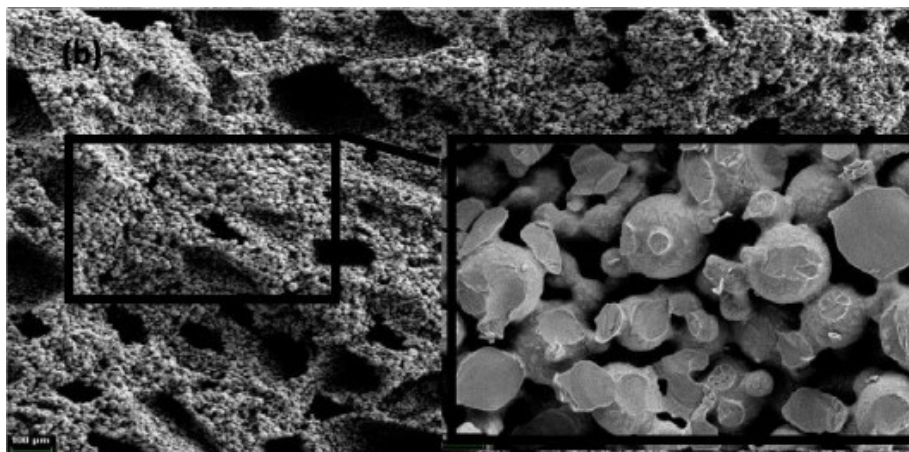
Schopnost vytisknout komponenty extracelulární matrice ve třech rozměrech umožňuje sestavení jednoduchých biologických tkání. Vytisknout funkční pevné orgány je náročné. Proto se pro scaffoldy tvrdých tkání vyrábí pouze prekurzor pro chtěný orgán, který je použit jako nosná matrice pro následnou organogenezi *in vivo*. Studie *3D Bioprinting of Developmentally Inspired Templates for Whole Bone Organ Engineering* se zabývala vývojem chrupavky. Tato chrupavka se skládala z kmenových buněk v nosném gama ozářovaném alginátovém bioinkoustu obsahujícím adhezni peptidy Arg-Gly-Asp. Tato šablona chrupavky byla dále zesílena sítí tištěných polykaprolaktonových vláken [38].

1.4.5 Metoda replikace polymerní houby (polymer sponge replication method)

Při této metodě je namáčena polymerní houba (většinou z polyurethanu) do keramické suspenze, kde je ponechána po dobu 48 hodin, aby došlo k usazení suspenze. Takto připravený polotovar se vysuší a poté sintruje vysokou teplotou (až 1300 °C). Při tomto procesu dojde k vypálení polymerní houby a zůstane pouze replikovaná keramická část. Výsledkem je scaffold s propojenými póry [39].

1.4.6 PIM

Práškové vstřikování (PIM – Powder Injection Molding) je výrobní proces, který je téměř shodný s vstřikováním termoplastů. Technologie se obvykle používá pro komplexní, vysoce kvalitní lékařské a zubní komponenty [40]. Před procesem je kovový (MIM) nebo keramický (CIM) prášek smíchan s polymerním pojivem [41]. Takto připravená směs je vstříknuta za vysokého tlaku pomocí vstřikovací jednotky do formy [42]. Výsledkem tohoto kroku je tzv. zelené těleso, které je nezbytné dále upravit. Po ochlazení je výrobek, zelený produkt, vyjmut z formy a přenesen do pece k vypálení polymeru. Dojde k odstranění pojiva z keramického materiálu, to se provádí v pecích při teplotě zhruba 450 °C a výsledkem je výrobek, nazývaný hnědý produkt, s minimálním objemem polymerního pojiva. Posledním krokem je vysokoteplotní slinování v pecích při teplotách (do 2000 °C), odpovídajících použitému druhu prášku [43]. Ve studii *S. N. Abd Aziz et al. (2015)* byla uvedena CIM technologie (Ceramic Injection Molding), kdy byl použit keramický prášek hydroxyapatitu s pojivem z palmového stearinu polyethylenu, a byl tak získán porézní scaffold s přijatelnými mechanickými vlastnostmi. V tomto článku byly zkoumány mechanické vlastnosti scaffoldů při různých teplotách slinování. Byl měřen Youngův modul a tvrdost [44]. Dalším příkladem studie, kdy bylo využito technologie PIM, je článek od *M. R. Raza et al. (2015)*, ve kterém byla popsána příprava porézního kompozitu z titanu v kombinaci s hydroxyapatitem (Ti/HAp). Do směsi Ti/HAp byly přidány částice NaCl, které udržují místo pro budoucí póry (space holder). Jako pojivový systém bylo použito polymerní pojivo na bázi polyethylenglykolu (PEG), které bylo ze zeleného tělesa odstraněno ve dvou krocích. Prvním krokem bylo extrahování PEG vodou. Druhým krokem bylo odstranění zbytkového PEG pojiva, proto byla tělesa zahřata na 500 °C v argonové atmosféře. Poté byla tělesa sintrována. V této studii byly optimalizovány parametry extrakce PEG i slinování. Získané porézní struktury by bylo možné využít například v biomedicinských aplikacích, ale bylo by potřeba provést stanovení biokompatibility a provedení testů *in vitro* a *in vivo* [45].

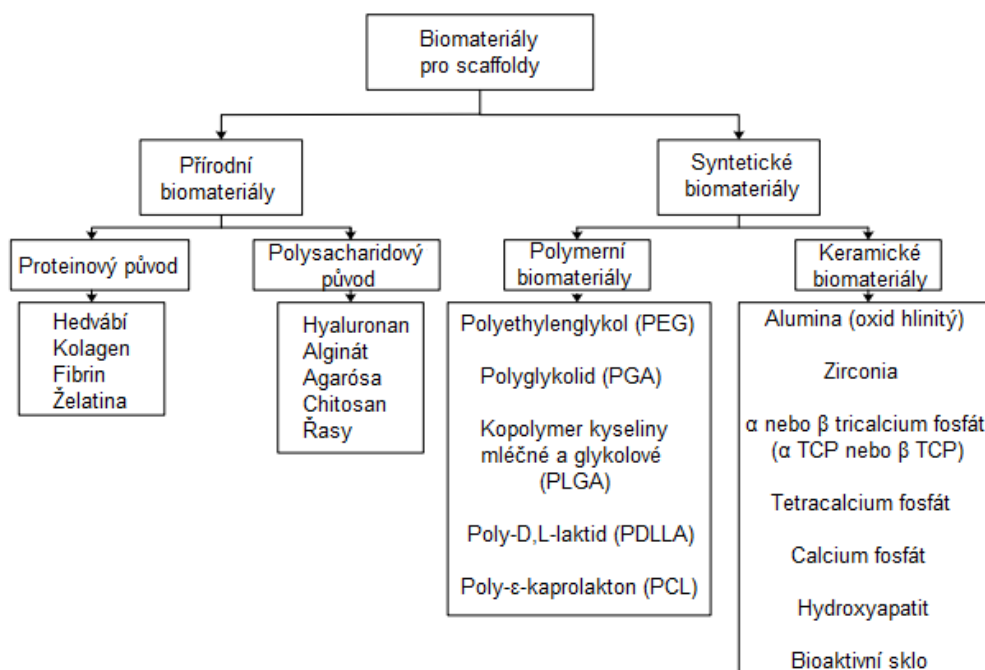


Obr. 7 FEMSEM fotografie kompozitu Ti/HAp sintrovaného při 1300 °C po dobu 5 h,
upraveno z [45]

2 BIOMATERIÁLY

Jako biomateriál označujeme veškeré materiály, které se používají v medicíně a dochází u nich ke kontaktu s biologickým systémem. I když jsou biomateriály používány především pro lékařské aplikace, využívají se také pro růst buněčných kultur v klinických laboratořích [15]. Biomateriály se obvykle dělí do tří kategorií, kovy, keramika a polymery [46].

Pojem biomateriál je široký, proto budou v následující kapitole rozebrány materiály, které se používají především pro tvorbu scaffoldů. Volba materiálu záleží v první řadě na aplikaci scaffoldu. Jednou z nejvíce využívaných skupin pro tvorbu scaffoldů jsou polymery. Za prvé, protože se snadno zpracovávají do požadovaného tvaru s vhodnou morfologií pórů. Za druhé, polymery mají dobré mechanické vlastnosti, tedy lze mít polymer s vysokou houževnatostí, dobrými tahovými vlastnostmi atd. Další výhodou je možnost měnit molekulovou hmotnost změnou délky řetězce polymeru [47]. Polymerní materiály mají řadu jedinečných vlastností, díky kterým jsou užitečné pro použití v široké škále medicínálních aplikací. Polymery se využívají například v ortopedii, zubním lékařství, jako náhrada měkkých i tvrdých tkání [15].



Obr. 8 Biomateriály používané pro tvorbu scaffoldů, upraveno z [39]

2.1 Přírodní biomateriály (přírodní polymery)

Pod přírodní biomateriály spadají materiály, které jsou například proteinového nebo třeba polysacharidového původu. Jedná se tedy o přírodní polymery, které využívají výhody lepší buněčné biokompatibility než mají například polymery syntetické. Přírodní biopolymer, jako je kolagen, fibrinogen nebo hyaluronan, může poskytnout biochemické podněty pro podporu buněčné adheze nebo diferenciaci. Hlavní nevýhodou přírodních biopolymerů izolovaných z přírodních zdrojů je jejich hůře definovatelné složení a také náchylnost k biologické kontaminaci. Tím, že jejich složení může být proměnlivé, se problematickým stává také jejich reprodukovatelnost [46]. Přírodní polymery jsou často obtížně zpracovatelné, např. z důvodu nehomogenity materiálu z různých zdrojů, a jsou s nimi také spojena rizika přenosu patogenů [16]. Další potenciální nevýhodou jsou omezené možnosti pro manipulaci s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Přírodní biopolymery jsou biologicky rozložitelné a jejich biodegradace se uskutečňuje prostřednictvím enzymů [46]. Různé přírodní biopolymery, jako je například chitosan, kolagen nebo želatina, byly studovány jako vhodné materiály pro tvorbu chrupavkových scaffoldů [30].

2.1.1 Biomateriály proteinového původu

V přírodě se vyskytuje množství různých proteinů, ale všechny se skládají z dvaceti aminokyselin. Proteiny vznikají polykondenzační reakcí aminokyselin za vzniku peptidové vazby. Sterická struktura proteinu a jeho funkce závisí například na pořadí aminokyselin. U proteinů se rozlišuje primární, sekundární, terciární a kvarterní struktura. Primární struktura je vyjádřena sekvencí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Sekundární strukturu označuje lokální prostorové uspořádání atomů hlavního řetězce polypeptidu [16]. Rozlišujeme ji na α -helix a β -skládaný list. Terciární struktura je spojena s trojrozměrnou strukturou celého peptidu. Hydrofobní části řetězce mají tendenci se sbalit do středu molekuly a tvoří tím celkový tvar proteinu. Je jí dosaženo různými intermolekulárními interakcemi, jako je vodíkový můstek nebo disulfidový můstek. Molekuly proteinu se mohou dále asociovat a vytvářet tak větší sestavy, které se označují jako kvarterní struktury [48]. To v případě, že jsou proteiny tvořeny více než jednou podjednotkou, tedy více než jedním polypeptidovým řetězcem [16].

Proteiny mají buď lineární, nebo globulární konformaci. Lineární proteiny se nacházejí například v pojivové tkáni zvířat. Polypeptidové řetězce jsou uspořádány paralelně, a tvoří tak dlouhá vlákna. Vlákennité proteiny mají vysokou mechanickou pevnost a jsou nerozpust-

né ve vodném prostředí. Mezi takovéto proteiny se řadí kolagen a keratin. Globulární proteiny tvoří kompaktní konformace. Tyto proteiny se ve vodném prostředí rozpouštějí a účastní se transportních procesů uvnitř buňky [48].

Z přírodních polymerů, které jsou proteinového původu, se pro tvorbu scaffoldů využívá například kolagenu, fibrinu, a hedvábí.

2.1.1.1 Kolagen

O využití kolagenu v biomedicíně a tkáňovém inženýrství existuje řada studií. Je jedním z materiálů, který se používá pro tvorbu scaffoldů pro měkké tkáně, zejména protože se ve velkém množství vyskytuje v ECM pojivových tkání. Je bioaktivní a má vlastnosti podporující buněčnou adhezi [46]. Nevýhodou kolagenu a všech proteinů získávaných ze zvířat je jejich potenciální imunogenita. Kolagen se skládá z pěti tropokolagenových molekul. Tropokolagen je složen z trojitě pravotočivé šroubovice, která je tvořena třemi polypeptidovými řetězci, které jsou vzájemně stabilizovány vodíkovými můstky [16]. Přírodní polymery, které se skládají z kolagenu a kolagen-glykosaminoglykanů, mají výhodu, že kolagen, který matrice obsahuje, může být rozpoznán buněčnými enzymy a může být degradován a remodelován, aby poskytoval prostor pro rostoucí tkáň. Scaffoldy, které jsou takto tvořené, mohou stimulovat novou produkci kolagenu transplantovanými buňkami [49]. Jelikož kost obsahuje kolagen typu I. a chrupavka kolagen typu II., je kolagen pro tvorbu scaffoldů vhodný [9]. Nezesíťované matrice tvořené kolagenem mohou časem ztrácet tvar a mají sklon k rychlejší degradaci (ta je způsobena kontaktem s tělními kapalinami, případně s buněčným médiem), proto se kolagenové matrice síťují pomocí dialdehydů nebo karbodiimidů. Síťování vede ke zlepšení mechanických vlastností [49].

2.1.1.2 Hedvábí

Dalším z přírodních polymerů, který se může používat pro regenerativní medicínu, je hedvábí. Jedná se o vlákno, které je produkováno některými druhy hmyzu, především larvami motýlů řádu Lepidoptera, například bourcem morušovým (*Bombyx mori*) nebo různými druhy pavoukoců. Skládá se hlavně z bílkovin a menšího množství polysacharidů a lipidů [50]. Strukturně je hedvábí produkované hmyzem tvořeno dvěma hlavními druhy proteinů, sekretinem a fibroinem [31]. Fibroin tvoří vláknitou část hedvábného vlákna. Tyto vlákna fibroinu jsou obklopena povlakem ze sekretinu a jsou díky jeho adhezivní povaze držena pohromadě. Sekretin je ve vodě rozpustný protein, který tvoří přibližně 25 % hmotnosti

[50]. Pro biomedicinské aplikace se používá převážně hedvábný fibroin získaný od *B. mori*. Hedvábí je stále častěji využíváno ve formě vláken, netkané textilie, filmů, scaffoldů a gelů [31]. Používá se jako chirurgické šití nebo také jako biokompatibilní membrány propustné pro kyslík [29]. V tkáňovém inženýrství ho lze využít například pro zpevnění želatinových scaffoldů, což vede k vyšší pevnosti v tahu a ohybu [10]. V oblasti tkáňového inženýrství se hedvábný fibroin využívá kvůli jeho výborné biokompatibilitě, vysoké pevnosti, pomalé rychlosti degradace a minimální zánětlivé odpovědi [50]. Ve studii *Y. Zhang et al., (2010)* byl zkoumán vliv různé koncentrace hedvábného proteinu fibroinu na trojrozměrnou mikrostrukturu pórů scaffoldu. Scaffoldy pro tuto práci byly připraveny technikou termální fázové separace. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací fibroinového proteinu se zmenšuje velikost pórů. Pomocí konfokální mikroskopie byla potvrzena migrace buněk ve scaffoldech. Dále bylo zjištěno, že porézní scaffoldy tvořené hedvábným proteinem fibroinem s optimální porozitou můžou usnadnit osteogenní diferenciaci a indukovat tvorbu nových kostí [51].

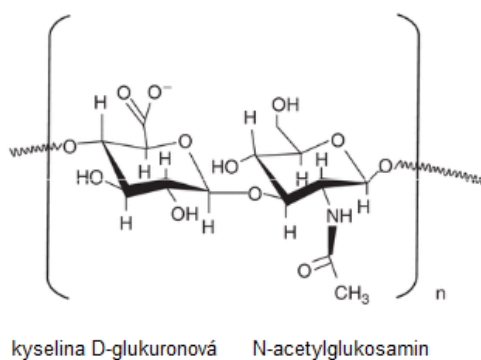
2.1.2 Biomateriály polysacharidového původu

Polysacharidy představují důležitou složku živé hmoty a vykazují vynikající vlastnosti jako je biokompatibilita, bioaktivita a biologická rozložitelnost. Zájem o polysacharidy jako biomateriály stále roste a to nejen z hlediska jejich biologické odbouratelnosti a šetrnosti k životnímu prostředí. Jsou snadno zpracovatelné a cenově výhodnější než syntetické polymery. Jejich využití je možné v oblasti farmacie, biomedicíně, potravinových doplňcích a kosmetice. Jsou to přirozeně obnovitelné materiály a mají široké spektrum fyzikálních vlastností [52]. Nevýhodou polysacharidů je ovšem nízká mechanická pevnost ve srovnání se syntetickými materiály.

Polysacharidy jsou kondenzační polymery. Jsou tvořeny z opakujících se jednotek, monosacharidů nebo disacharidů, které jsou spojeny prostřednictvím glykosidických vazeb. Monosacharidem může být aldosa nebo ketosa [16]. Vzhledem k přítomnosti mnoha hydroxylových skupin v molekule mají polysacharidy tendenci k tvorbě inter- a intramolekulárních vodíkových můstků. Tyto vazby pak mohou být příčinou snížené rozpustnosti nebo tvorby agregátů. Polysacharidy lze získávat biosyntézou pomocí rostlin, živočichů a mikrobiálních zdrojů. Z této skupiny polymerů se některé považují za potenciálně vhodný materiál pro biomedicinské aplikace, zejména chitosan, alginát, kyselina hyaluronová, dextran, želatina, škrob a některé další [52; 53].

2.1.2.1 Hyaluronan - kyselina hyaluronová (HA)

Hyaluronan, také známý jako sodná sůl kyseliny hyaluronové (HA), je jedinečnou makromolekulou s velkým příslibem pro tkáňové inženýrství. Vyskytuje se v epiteliálních, nervových a pojivových tkáních [52]. Hyaluronan je přítomen v ECM tkáni, a proto vykazuje vysokou biokompatibilitu. Rovněž je to polysacharid, který podporuje buněčnou proliferaci a migraci [31]. Je to přirozeně se vyskytující polysacharid v těle. Hyaluronan lze extrahovat z živočišných zdrojů, ale je také vyráběn ve velkém množství bakteriemi *Streptococcus zooepidemicus* a *Streptococcus equiwit*, s dobrým výtěžkem a vysokou čistotou. U bakteriální extrakce je HA izolována ve formě sodné soli [53]. Hyaluronan je kopolymer složený z opakujících se monomerních jednotek kyseliny β -(1,4)-D-glukuronové a β -(1,3)-N-acetyl-D-glukosaminu [52]. Sestává se tedy z glykosaminoglykanu (GAG), jenž je tvořen opakujícími disacharidovými jednotkami [54]. V závislosti na aplikaci se používá HA v různých koncentracích a molekulových hmotnostech. Lze jí využít také pro modifikaci povrchu [53]. Nemodifikovaná HA byla klinicky použita v různých aplikacích, například pro léčbu poškozených kloubů. V regenerativní medicíně nachází HA využití ve formě vláken, filmů a hydrogelů [54]. Když se váže na povrch scaffoldu, potřebuje tento ve vodě rozpustný polymer přídavek dalších komponent, které umožní zesíťování. HA lze využít i pro vychytávání volných radikálů [31].

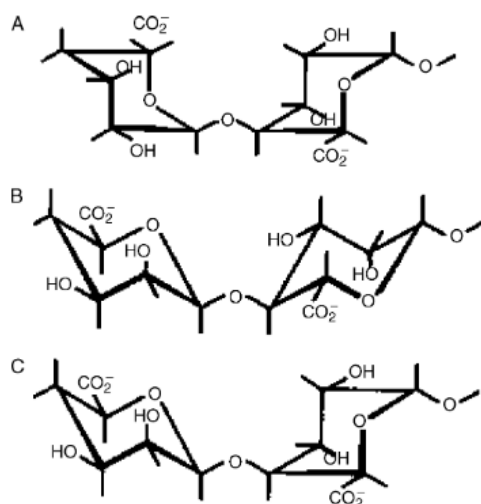


Obr. 9 Chemická struktura hyaluronanu, upraveno z [16]

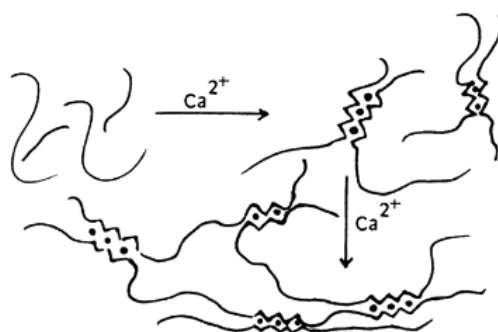
2.1.2.2 Alginát

Další volbou pro regenerativní medicínu je alginát. Alginát je lineární přírodní polymer, který je získáván především z hnědých mořských řas (Pheaphyta). Je to blokový kopolymer skládající se z kyseliny α -L-guluronové (G) a β -D-manuronové (M) [16]. Alginát je formován třemi typy bloků. První možnost je alternující M a G blok, což je nejvíce flexi-

bilní část řetězce. Další možností je blok GG a blok MM [53]. Sít'ování alginátu se odehrává iontově pomocí bivalentních kationtů (jako je například Ca^{2+}) ve vodném roztoku. Gelace a zesít'ování polymeru se uskutečňuje výměnou sodných iontů z guluronové kyseliny s bivalentními kationty [16].



Obr. 10 Chemická struktura opakujících se jednotek alginátu: (A) L-glukuronová kyselina (G); (B) D-manuronová kyselina (M); (C) alternující L-glukuronová kyselina a D-manuronová kyselina (GM), převzato z [53]



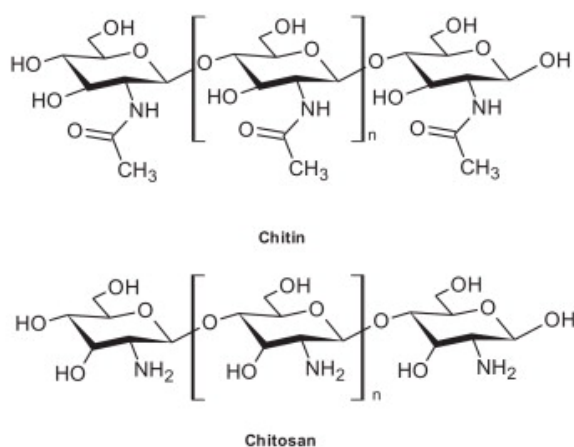
Obr. 11 Schématické sít'ování alginátu v přítomnosti Ca^{2+} , převzato z [53]

Alginát je pro biomedicínské aplikace využíván především kvůli jeho nízké toxicitě, dobré biokompatibilitě, biodegradibilitě a díky snadnému procesu gelace. Je schopen snadného formování do hydrogelu v přítomnosti vápenatých iontů [52]. Alginát je jednou z možností pro výrobu scaffoldů pro měkké tkáně. Tento polysacharid se také používá jako nosič léčiv a jako materiál pro buněčnou enkapsulaci [46]. Jeho strukturní podobnost

s glykosaminoglykany nabízí aktivní místa pro navázání jiných molekul a zvyšuje buněčnou adhezi [31]. Snadno dostupná je sůl alginátu sodného, nebo přímo alginát sodný [54].

2.1.2.3 Chitosan

Chitosan je derivát chitinu, což je druhý nejrozšířenější přírodní polysacharid vyskytující se převážně ve skořápkách korýšů a v buněčné stěně hub. Chemicky je chitin tvořen molekulami glukosaminu spojenými prostřednictvím vazby $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidové vazby [55].



Obr. 12 Struktura chitinu a chitosanu, převzato z [55]

Jedná se tedy o kopolymer glukosaminových a N-acetylglukosaminových jednotek. Poměr těchto segmentů určuje vlastnosti jako je například rozpustnost a rozložitelnost [16]. Chitosan obsahuje chemicky reaktivní funkční skupiny. V glukosaminových jednotkách chitosanového řetězce jsou přítomny primární aminové a primární sekundární hydroxylové skupiny [55]. Tyto skupiny mohou mít největší přínos jako modifikační místa. Z hlediska chemické modifikace se může jednat o nukleofilní substituci aminoskupin a hydroxylových skupin. Další možností je roubování malých molekul nebo polymerních řetězců na chitosan [20]. Chitosan může být modifikován různými funkčními skupinami, a lze tak řídit jeho hydrofobní, aniontové a kationtové vlastnosti. Chitosan má také antibakteriální a hemostatické vlastnosti. Stupeň deacetylace v opakujících se jednotkách určuje fyzikální vlastnosti chitosanu, včetně jeho rozpustnosti ve vodném prostředí a míry degradace různými enzymy [46].

Jelikož se chitosan vyznačuje vhodnou biokompatibilitou, bioaktivitou, netoxicitou i dobrými biodegradačními vlastnostmi, jeví se jako vhodný biomateriál pro biomedicinské

aplikace. Největší potenciál pro využití chitosanu v oblasti scaffoldů představuje jeho schopnost napomáhat regeneraci tkání. Chitosan byl také zkoumán jako nosič léčiv a různých růstových faktorů [20]. Další možností využití chitosanu by mohly být senzory, buněčné zobrazování nebo při léčbě a diagnostice některých onemocnění jako je například rakovina [56].

2.2 Syntetické biomateriály

V následující podkapitole budou popsány syntetické biomateriály, kde jsou zařazeny materiály keramické, kovové a syntetické polymerní biomateriály.

2.2.1 Polymerní biomateriály (syntetické polymery)

V oblasti tkáňového inženýrství se pro vývoj scaffoldů využívají jednak polymery přírodní, ale i syntetické polymery. Výhodou syntetických polymerů mohou být jejich mechanické vlastnosti, které mohou být přizpůsobeny na základě aplikace [39]. Syntetické polymery mají široký rozsah fyzikálně-chemických vlastností. U tohoto typu biomateriálů lze upravovat vlastnosti jako je míra biodegradace, mechanická pevnost, rovnováha hydrofobnosti a hydrofilnosti [46]. Výhodou syntetických polymerů je možnost výroby ve velkém množství a také možnost delší doby skladování. Lze je snadno zpracovat do různých tvarů a formy.

Do skupiny biodegradabilních syntetických polymerů lze zařadit lineární alifatické polyestery jako je kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a jejich kopolymer (PLGA). K degradaci těchto polymerů dochází hydrolýzou esterových vazeb hlavního řetězce. Jelikož jejich produkty odbourávání (kyselina mléčná a glykolová) jsou součástí Krebsova metabolického cyklu, jsou tyto polymery resorbovány *in vivo* [16].

Tab. 1 Vlastnosti vybraných syntetických polymerních biomateriálů používaných v tkáňovém inženýrství, upraveno z [16]

Degradabilní polymer		Biokompatibilita	Aplikace v tkáňovém inženýrství
Kyselina polymléčná	PLA	(Enzymatická) hydrolýza	
Kyselina polyglykolová	PGA	Produkty degradace v metabolické dráze	Kůže, chrupavka, kost, vazy, šlachy, cévy, nervy, močový měchýř, játra
Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové	PLGA	Lokalizovaný zánět	
poly- ϵ -kaprolakton	PCL	Hydrolýza Minimální zánět	Kůže, chrupavka, kost, vazy, šlachy, cévy, nervy
Polyfosfoestery	PPEs	Hydrolýza Minimální reakce cizích těles Minimální zánět	Chrupavka, kost, nervy, játra
Polyanhydridy	PAs	Hydrolýza Minimální reakce cizích těles Minimální zánět	Kost
Polyethylenglykol diakrylát	PEGDA	Hydrolýza Minimální reakce cizích těles	Kůže, cévy, nervy

2.2.2 Keramické biomateriály

Keramické materiály se vyznačují vysokou tepelnou a chemickou stabilitou, pevností v tlaku a trvanlivostí. Na základě odezvy tkáně lze biokeramiku rozdělit do tří hlavních kategorií. První kategorii tvoří téměř inertní keramika, tím může být oxid hlinitý a oxid zirkoničitý. Dále máme skupinu bioaktivní, kam řadíme bioaktivní sklo, a poslední skupinou je resorbovatelná keramika, kterou představuje hydroxyapatit (HAp), α a β tricalcium fosfát (α -, β -TCP) [39]. Například kombinace HAp a TCP se využívá pro regeneraci kostí. Přínosem keramických matic je jejich vysoká mechanická tuhost (vysoký Youngův modul) a nízká elasticita. Dále díky podobné struktuře minerální fáze nativní kosti s keramickým scaffoldem je zde výborná kompatibilita s lidskou tkání [13]. Z anorganických absorbovatelných materiálů se pro kostní scaffoldy nejčastěji používá keramika z fosforečnanu vápenatého (jako například HAp). Fosforečnany vápenaté jsou biokompatibilní, bez bílkovin a mají minimální imunologickou a systémovou toxicitu.

U těchto scaffoldů používaných pro kosti bylo zjištěno, že modifikace povrchu lamininem nebo fibronektinem zvýší buněčnou adhezi [54].

2.2.3 Scaffoldy tvořené kovy

Kovy jsou anorganické materiály vázané nesměrovými kovovými vazbami s vysoce mobilními elektrony. Jsou to krystalické materiály, které jsou schopny vytvořit mnoho variant krystalických struktur [57]. Hlavní nevýhodou kovových scaffoldů je nedostatek biologického rozpoznání povrchu buňkami. Překonání této zábrany se uskutečňuje pomocí povrchových úprav. Dalším omezením kovových biomateriálů je možné uvolnění toxických iontů nebo částic vzniklých díky korozi nebo opotřebení. Tyto částice mohou vést k zánětlivým a alergickým reakcím [58].

V oblasti stomatologie a ortopedie se zvyšuje zájem o mnoho různých slitin, jako jsou například slitiny na bázi kobaltu, slitiny hořčíku, titan a jeho slitiny nebo nerezová ocel. Tyto materiály mají dobrou biokompatibilitu, mechanickou pevnost a odolnost proti korozi [39].

Tab. 2 Příklad aplikací kovových scaffoldů, upraveno z [39]

Materiál	Aplikace
Titan a jeho slitiny	Maxilofaciální, orální, kardiovaskulární chirurgie, kyčelní implantáty
Slitiny kobaltu	Umělé kloubní implantáty
Slitiny hořčíku	Bioresorbovatelné scaffoldy, regenerace kostí
Nerezová ocel	Dentální implantáty

Kromě hojně využívaných kovových biomateriálů jako je titan, existují studie, jež poukazují na potenciální využití méně častých materiálů, kterými jsou například tantal nebo hořčík a jeho slitiny. Porézní tantal je konstrukční materiál, jenž má dostatečnou pevnost, vysokou objemovou pórovitost dosahující až 80 % a plně propojené póry. Tantal je zatím v počátečním stádiu vývoje, ale počáteční klinické studie a preklinické studie podporují jeho použití jako alternativu k tradičním ortopedickým implantátům [58].

Hořčík a jeho slitiny jsou využívány pro chirurgické aplikace. Tyto slitiny mají velký potenciál zejména z toho důvodu, že jsou plně bioresorbovatelné a nevyvolávají žádné nežádoucí systémové ani zánětlivé odezvy. Dalším přínosem těchto slitin je, že podporují růst

kostí a pozitivně ovlivňují navázání buněk. Materiál se jeví jako slibný pro některé aplikace, jako je například regenerace trabekulární kosti [58].

2.3 Povrch biomateriálů

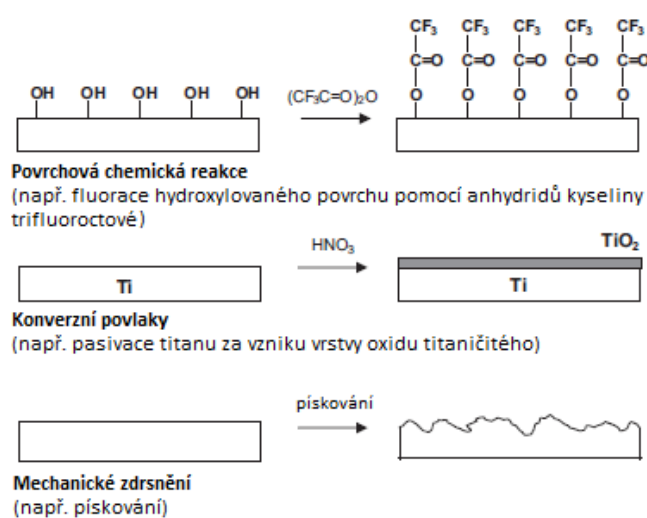
Přijetí nebo selhání implantovaných biomateriálů závisí především na fyzikálních a chemických vlastnostech jejich povrchu. Zda bude implantovaný materiál tolerován nebo odmítnut záleží na povrchových vlastnostech, které určují interakce mezi materiálem a prostředím [15].

2.4 Modifikace povrchu

Většina biologických reakcí se odehrává na rozhraní mezi biologickým systémem a povrchem implantátu (biointerface) [59]. Povrchové vlastnosti scaffoldu jsou jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují jeho aplikovatelnost v reálném systému. V tkáňovém inženýrství může chemická a fyzikální charakteristika povrchu biomateriálu ovlivnit buněčné funkce, například proliferaci nebo migraci [60]. Proto je výhodné nalézt metody modifikace povrchu s cílem získání požadovaných vlastností. Hlavním účelem povrchových úprav je modifikovat vrchní vrstvu materiálu. Modifikací se na povrch mohou navázat některé funkční skupiny, které především zlepšují bariérové vlastnosti, smáčitelnost, náboj, adhezi k jiným materiálům nebo interakce k biologickému prostředí. Aby došlo ke zlepšení interakce s biologickým prostředím, mění se chemické složení povrchu a tím se zvýší adsorpce proteinů ze séra nebo plazmy [61]. Metody pro úpravy povrchů lze dělit několika způsoby. Jednou možností je dělení do dvou kategorií: (1) chemické nebo fyzikální změny atomů, sloučenin nebo molekul na existujícím povrchu materiálu nebo (2) překrytí stávajícího povrchu povlakem z odlišného materiálu od podkladového nosiče [29]. Změny pokrytí povrchu zahrnují nekovalentní a kovalentní povlaky, roubování (včetně navázání biomolekul) a depozici tenkého filmu. S aplikací se specifické požadavky na modifikaci povrchu liší, ale pro většinu aplikací je žádoucí modifikovat tenkou povrchovou vrstvu. Tlustší povlaky často negativně ovlivňují mechanické vlastnosti materiálu. Modifikace povrchů biomateriálů představuje možnost k získání biologické funkčnosti na rozhraní materiál-tkáň a možnost modulace biologické reakce bez změny vlastností materiálu [62]. Povrchová modifikace pomocí polymerních materiálů je jednou ze slibných cest.

2.4.1 Fyzikální a chemické metody

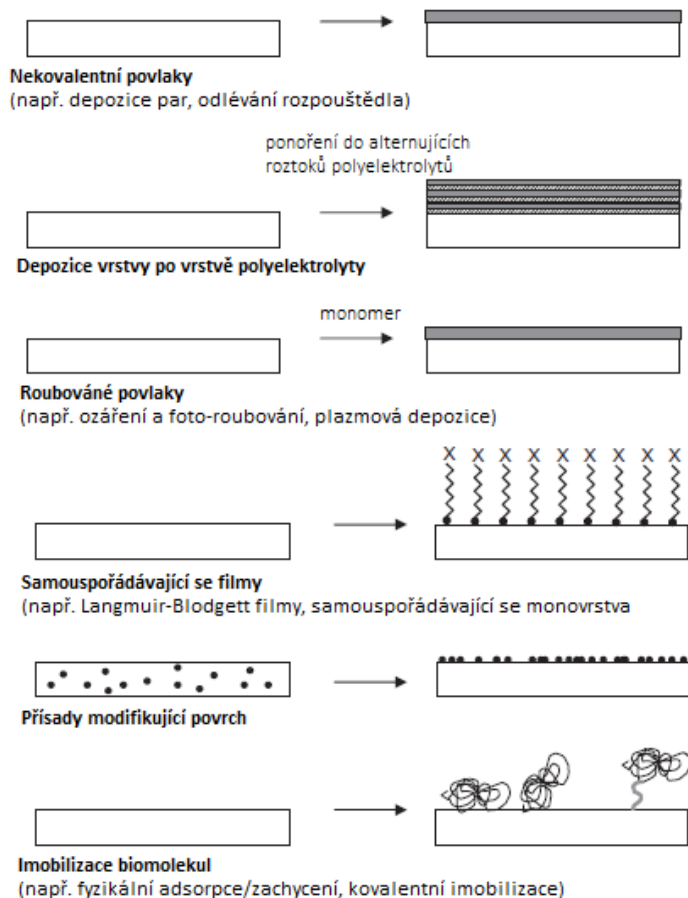
Do které skupiny se bude řadit daná metoda modifikace povrchu, záleží na tom, jak proces ovlivňuje povrch. U fyzikálních metod ve většině případů zůstává chemické složení povrchu neměnné. Fyzikálními metodami může změnit drsnost povrchu, velikost zrn atd. Tyto metody využívají např. laseru či tepelnou úpravu. K nejstarším metodám fyzikální modifikace patří leštění a broušení povrchu. Dalším procesem může být tepelná úprava. Naopak pro chemické modifikace jsou typické změny v chemickém složení povrchu materiálu [63]. Úprava povrchů biomateriálů se může uskutečňovat pomocí UV, leptání povrchu, roubováním nebo změnou či zesíťováním povrchových skupin [62].



Obr. 13 Schematické znázornění běžných fyzikálně-chemických povrchových modifikací biomateriálů, upraveno z [62]

2.4.2 Technologie potahování povrchu

Do této kategorie povrchových úprav spadají nejčastější aditivní procesy, které umožňují tvorbu povrchových vrstev. Povrchová vrstva může být vázána buď kovalentně, nebo fyzikálně spojena [63]. Aby byl povlak vhodný, musí splňovat některé požadavky, jako je například přilnavost k podkladu a musí mít mechanické a funkční vlastnosti, to může být například odolnost proti poškrábání a opotřebení, antibakteriální nebo antistatické vlastnosti aj. Determinující podmínkou může být zejména teplota nanášení povlaku, která musí být vhodná i pro materiál scaffoldu. U polymerních scaffoldů může docházet s vysokou teplotou ke změně mechanických vlastností v důsledku nežádoucích jevů, jako je například deformace nebo chemická degradace [64]



Obr. 14 Schematické znázornění běžných povlakových technologií pro povrchové úpravy,
upraveno z [62]

2.4.2.1 Fyzikální adsorpce proteinů ECM na biomateriály

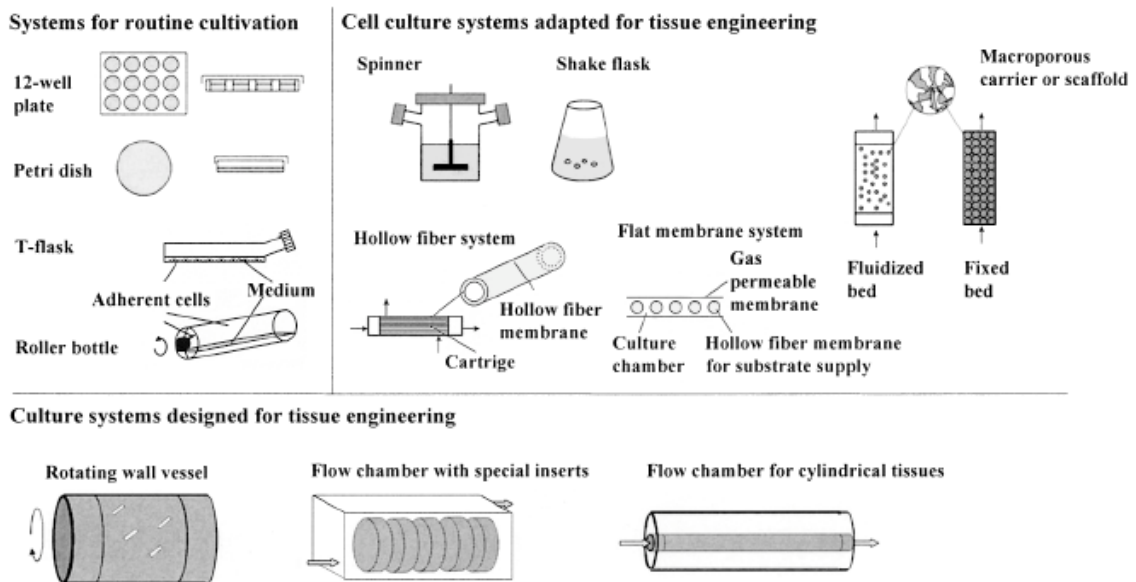
Adsorpce proteinů může být podpořena nebo znemožněna řadou entalpických a entropických změn uvnitř systému povrch-voda-protein. Těmito změnami může být (částečná) dehydratace proteinu a povrchu sorbentu, redistribuce nabitých skupin v rozhraní a konformační změny proteinové molekuly [65]. Do vzniku pokrytí povrchu v první monovrstvě platí, že adsorpce se zvyšuje s časem a s koncentrací proteinů v roztoku. K poklesu rychlosti adsorpce dochází s klesajícím počtem vazebných míst a postupně se rychlost adsorpce stává více závislá na afinitě proteinu [62].

Nejdůležitějším aspektem pro bioaktivaci povrchu je zachování biologické aktivity proteinu po připojení k bioinertnímu povrchu. Po adsorpci prochází některé proteiny konformačními změnami od nativní formy k denaturovaným stavům [65]. Denaturovaný protein mění dostupné vazebné sekvence pro adhezivní integriny, a tím ovlivňuje schopnost buněk adherovat k biomateriálu. Ke změnám konformace proteinu může docházet kvůli povrchovým

vlastnostem biomateriálu, jako je například hydrofobicita, elektrický náboj, topografie atd. [66]. Pro adsorpci nejsou vhodné povrchy, které jsou příliš hydrofobní (kontaktní úhel pro vodu $> 30^\circ$) ani vysoce hydrofilní (kontaktní úhel pro vodu $< 150^\circ$). Je to především z důvodu, že u vysoce hydrofobních povrchů dochází k těsnému navázání proteinů z vodného roztoku. Těsná vazba může způsobit denaturovanou strukturu proteinu a tím se sníží celková bioaktivita [67]. Také nejsou vhodné povrchy, které vykazují vysokou hydrofilitu, neboť mohou vylučovat molekuly bílkovin, a inhibovat tak adsorpci

3 KULTIVACE V BIOREAKTORU

Vhodná metoda kultivace pro buněčné kultury je volena podle toho, zda jsou, či nejsou buňky adherentní k povrchu [68]. Pro kultivaci buněk můžeme využít několika různých technik. Ke kultivaci 2D struktur se využívá statická kultivační technika *in vitro*, která má jistá omezení. Hlavní nevýhodou této metody je kumulace odpadních látek. Zasazení buněk do 3D matrice při statické kultivaci nezajišťuje rovnoměrné rozmístění buněk a to zejména kvůli omezenému přísunu živin a difuze kyslíku do vnitřního prostředí scaffoldu [29]. Proto se pro kultivaci 3D struktur používá dynamická kultivace, která napodobuje *in vivo* podmínky. Touto metodou lze množit kmenové buňky pro transplantaci, získat 3D struktury vhodné pro implantaci. Pomocí bioreaktoru lze simulovat interakce, které se běžně odehrávají v *in vivo* systému, jako jsou interakce buňka-buňka, ale i buňka-prostředí. Účelem bioreaktoru je zajistit proliferaci a diferenciaci buněk stejně jako v *in vivo* prostředí. V tkáňovém inženýrství se bioreaktory používají pro řízenou a reprodukovatelnou proliferaci buněk a tkání [69]. V následující kapitole budou ponechány některé názvy bioreaktorů v anglickém jazyce, protože ekvivalenty v českém jazyce jsou téměř nevyužívány.



Obr. 15 Buněčné kultivační systémy používané v tkáňovém inženýrství, převzato z [70]

Na obrázku 15 je znázorněn přehled kultivačních systémů a bioreaktorů používaných pro kultivaci buněk. Pro jednovrstvou kulturu adherentních buněk byly vyvinuty kultivační systémy, jako jsou T-lahve, Petriho misky a vícejamkové destičky. Tyto systémy jsou

levné a umožňují snadné použití a sterilní manipulační postupy. Je u nich potřeba individuálního zacházení, například při výměně média, a není u nich možno kontrolovat parametry prostředí, jako je pH, koncentrace kyslíku, teplota [70].

3.1 Bioreaktor

Kultivace eukaryotických buněk uvnitř scaffoldů vyžaduje buď techniky založené na experimentálním uspořádání využívající *in vivo*, nebo využití speciálního přístrojového vybavení umožňujícího kultivaci v dynamických podmínkách, především bioreaktory [71]. Bioreaktory byly vyvinuty jako reakce na omezení statické kultivace [72]. Bioreaktory, které se používají v tkáňovém inženýrství, lze považovat za prostor, kde mohou probíhat biologické reakce. Proto je důležité, aby bioreaktor zajistil vhodné prostředí (biosféru) a tyto biologické reakce se v něm mohly odehrávat [71]. Bioreaktor by měl splňovat alespoň jednu z následujících funkcí: vytvořit prostředí, které umožňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci jako v *in vivo* podmínkách; vytvořit prostorově jednotnou distribuci buněk uvnitř 3D scaffoldu; udržovat žádoucí koncentraci živin; poskytnout účinný přenos hmoty do tkáně; vystavit tkáň fyzikálním stimulům [69]. Hlavním úkolem bioreaktoru je řízení biologických podmínek, jako je pH, teplota, tlak, koncentrace živin, odvod odpadních produktů, rychlost průtoku média a dalších podmínek [16; 68]. Je potřeba pamatovat, že kultivační a tkáňově specifické parametry se v čase mění [69].

3.2 Sazení buněk na scaffold

V první řadě je potřeba scaffold osadit buňkami. Sazení buněk může být oddělenou operací, kdy se buňky naadherují na scaffold a poté se osazený scaffold zavede do bioreaktoru. Nebo druhou variantou může být sazení buněk na scaffold, který je umístěn v cele bioreaktoru [69]. Významný vliv na konečnou strukturu scaffoldu má již počáteční hustota a distribuce buněk. U porézních scaffoldů nebo u velkých skeletů je proces distribuce buněk obtížný a reprodukovatelnost náročná. Nejčastější technika setí buněk je tzv. statické sazení (static seeding). Jedná se o napipetování koncentrované buněčné suspenze na scaffold [16]. Ačkoli je to nejběžněji používaná technika, několik studií uvedlo nízkou účinnost a nerovnoměrnou distribuci buněk v rámci scaffoldu. Vyšší účinnosti a rovnoměrnějšího rozmístění buněk bylo dosaženo, kdy byl scaffold (v tomto případě v podobě netkané textilie) osazen v stirred-flask bioreaktoru [73].

3.3 Procesní podmínky kultivace ovlivňující růst a morfologii buněk

Přísun živin a plynů do vznikající tkáně je jedním z limitujících faktorů pro tvorbu scaffoldů [69]. Tkáně a orgány těla jsou vystaveny vysoce komplexnímu biomechanickému prostředí s dynamickým napětím, průtokem tekutin a hydrostatickým tlakem. Ve snaze uspíšet tvorbu funkční tkáně pomocí bioreaktorů byly vyvinuty bioreaktory, které dokáží řídit jeden nebo více fyzikálních stimulů. Tímto stimulem může být dynamická komprese, která zvýší produkce ECM u chrupavek. Jinými stimuly lze zlepšit strukturní organizaci buněk/tkáni, podpořit přímou buněčnou diferenciaci anebo posílit specifickou tkáňovou funkci [16].

3.3.1 pH

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst buněk je pH prostředí, ve kterém se buňky nacházejí. Jedním z důvodů proč je pH tolik důležité je, že ovlivňuje enzymovou aktivitu [74]. Nastavení hodnoty pH závisí především na dosažení rovnováhy mezi optimálním pH pro růst buněk a pro produkci bílkovin [75]. V bioreaktorech se pH měří pomocí sond, které jsou umístěny v boční stěně přes sterilní spojovací port. Díky tomuto uložení je umožněn přímý kontakt pH elektrody s kultivačním médiem. Ta v médiu měří volné H^+ ionty [76].

3.3.2 Teplota

Živé organismy jsou citlivé i na teplotu, kdy, stejně jako u pH, se optimální teplota pro růst buněk může lišit od teploty vhodné k produkci bílkovin. Při překročení tepelného rozsahu dochází k tepelné smrti buněk [76].

3.3.3 Rozpuštěný kyslík

U kultivace aerobních buněk je samozřejmě další velmi důležitou podmínkou přístup kyslíku. Součástí bioreaktoru jsou galvanické, případně polarografické sondy, které většinou měří parciální tlak rozpuštěného kyslíku v médiu (přímá koncentrace O_2 se měří méně). Plynný kyslík je do média přiváděn rozprašováním vzduchu nebo O_2 přímo do reaktorové nádoby. Sondy jsou v místě, kde dochází k dobrému míchání kultivačního média a kde v blízkosti nejsou pevné látky, které by mohly měření narušovat [76].

3.3.4 Koncentrace oxidu uhličitého (CO₂)

Stejně jako u kyslíku, se parciálním tlakem oxidu uhličitého rozumí míra rozpuštěného CO₂. Aby byla udržena minimální hladina CO₂, bývá v malém měřítku přidáván do oblasti nad buněčnou kulturou. Když je koncentrace oxidu uhličitého příliš velká, snižuje se rychlost přenosu hmoty a to může vést v důsledku buněčného dýchání k hromadění parciálního tlaku C v médiu. To vše může nepříznivě ovlivnit buněčný metabolismus, například snížením vnitřního pH buněk [77]. Pro měření parciálního tlaku CO₂ mohou být použity analyzátory krevních plynů. Ovšem pro přesný odečet je nezbytná pečlivá manipulace se vzorkem. I malá produkce kyseliny buňkami může ovlivnit výsledek nesprávného odhadu na základě pH [76]. Další poměrně novou metodou měření jsou párou sterilizované sondy pCO₂, které fungují jako modifikovaná pH elektroda [77].

3.4 Typy bioreaktorů

Vzhledem ke specifčnosti tkání a jejich kultivačním požadavkům existuje více typů bioreaktorů, aby bylo možno co nejpřesněji napodobit podmínky *in vivo* v dané tkáni. Na bioreaktory jsou kladeny různé specifické podmínky, jako je tvar, velikost, dynamika tekutin, smykové napětí atd [74]. Pokud jde o klasifikaci tkáňových bioreaktorů, lze reaktory rozlišit podle hlavních provozních režimů na perfuzní reaktory (Perfusion Systems), nádoby umožňující míchání (Stirred Vessels) a rotační reaktory (Rotating Wall Vessel) [69]. Protože nebyly zavedeny české ekvivalenty, které by byly komunitou akceptovány, jsou názvy uvedeny v anglickém jazyce. Typickými bioreaktory běžně používanými v tkáňovém inženýrství jsou stirred (batch nebo continuous) vessels, packed bed, luized bed a membrane reactors [78].

3.4.1 Perfuzní bioreaktor (Perfusion Systems)

U statické kultivace může docházet ke špatné migraci buněk do vnitřního prostředí scaffoldu. Na povrchu scaffoldu se vytvoří buněčná skořápka, a nedojde tedy k požadované rovnoměrné distribuci. U perfuzních systémů může být slabý buněčný růst překonán [79]. Stálý průtok média skrz póry a okolo scaffoldu usnadňuje transport živin k buňkám uvnitř scaffoldu [69]. Tím dochází k orientaci buněk ve směru toku média, což je pro některé tkáně nežádoucí. Například u kloubní chrupavky je důležitá orientace povrchových buněk kolmo na tok [79].

3.4.2 Nádoby umožňující míchání (Stirred Vessels) – Spinner flasks

Z bioreaktorů typu Stirred Vessels jsou nejznámější Spinner Flasks. Jedno z nejvíce rozšířených použití bioreaktoru tohoto typu je dynamické setí scaffoldů. Scaffold je umístěn do kultivačního média, které obsahuje buňky [69]. Bioreaktor typu Spinner Flask byl navrhnut tak, aby produkoval hydrostatické síly, které napomáhají hromadnému transportu. Skládá se z válcové skleněné nádoby a míchacího prvku, který zajišťuje míchání kultivačního média. Míchacím prvkem může být například magnetické míchadlo. Tento systém napomáhá rovnoměrné buněčné distribuci. Používá se zejména pro kostní scaffoldy. Míchání média může způsobit turbulentní proudy [80].

3.4.3 Rotační bioreaktor (Rotating Wall Vessel)

Hlavním účelem rotačního pohybu bioreaktorů je zvýšení rovnoměrné distribuce buněk, usnadnění transportu živin a odpadních látek. Nevýhodou bioreaktorů tohoto typu je turbulentní proudění, které může mít za následek vysoké smykové napětí, které by mohlo poškodit buňky [54]. Ačkoli je smykové napětí nezbytné pro modulaci některých mechanických vlastností tkáňových scaffoldů, vysoké smykové napětí může vést ke tvorbě nežádoucích kapslí obklopujících tkáň [79].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

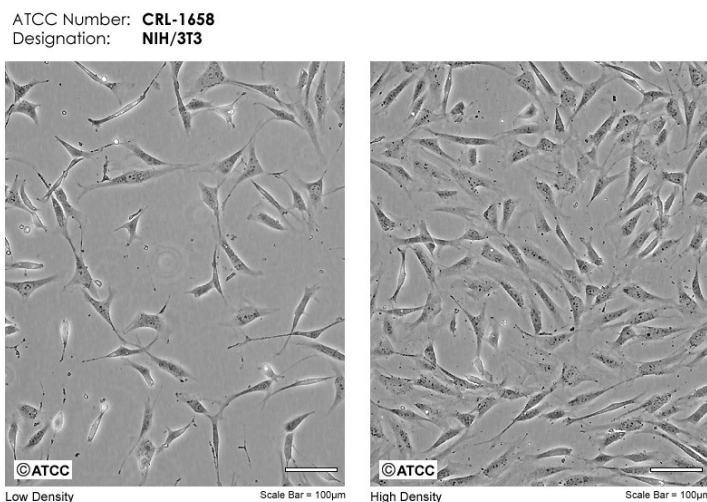
4 TESTOVÁNÍ CYTOKOMPATIBILITY PIM KERAMIKY

Testování bylo zaměřeno na keramický materiál, který byl vyroben pomocí PIM technologie. Výhodou PIM technologie je vysoká preciznost, která umožňuje vyrábět různé tvary implantátů. Tato technologie má potenciál pro využití v rámci personalizované medicíny. Cílem praktické části bylo otestování cytotoxicity keramického materiálu vyrobeného pomocí technologie PIM, s potenciálním využitím jako scaffold pro tkáňové inženýrství. Dále byla v rámci experimentální části provedena modifikace povrchů pomocí vodivých polymerů s využitím biopolymerů jako stabilizátorů filmů.

Podle normy ISO 10993-5 lze testovat cytotoxicitu materiálů několika způsoby. První možností je provedení testování pomocí extraktu materiálu. Další eventualitou jsou zkoušky přímým kontaktem nebo zkoušky nepřímým kontaktem. V rámci testů cytotoxicity nejdříve probíhalo stanovení cytotoxicity extraktu vytvořeného z PIM keramiky podle ISO 10993-5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Extrakt pro toto testování byl vyroben podle stejné normy z části 12: Příprava vzorků a referenční materiály (ISO normy ČSN EN ISO 10993-12). U vzorků s modifikovaným povrchem byla provedena zkouška přímým kontaktem. Dále byla testována schopnost buněk adherovat a růst na PIM keramice. Série testování byla zakončena dynamickou kultivací scaffoldů v bioreaktoru.

4.1 Použitá buněčná linie, materiál

Pro testování biologických vlastností scaffoldů byla použita buněčná linie NIH/3T3 (ATCC CRL-16658TM), což je linie adherentních myších embryonálních fibroblastů. Kultivační médium pro tuto buněčnou linii se skládá z DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biosera) s obsahem 10 % Calf Sera (Biosera) a s 1 % Penicilinu/Streptomycinu (Biosera). Pro kultivaci byly použity lahve a misky z tkáňového polystyrenu značky TPP. Kultivace probíhala za stálých podmínek v inkubátoru (Heracell 150i, Thermo Scientific) při 37 °C, s koncentrací CO₂ 5 %, za stálé relativní vlhkosti 90 %.



Obr. 16 Buněčná linie NIH/3T3, převzato z [81]

Pro testování byl použit materiál, který byl vyroben v Ústavu výrobního inženýrství FT UTB. Keramické vzorky byly vyrobeny pomocí technologie PIM. Vzorky se lišily jednak velikostí pórů, ale také obsahem jednotlivých složek, ze kterých byl materiál vyroben. Směs se skládala z keramického prášku (Al_2O_3), pojivového systému (Licomont EK583) a z KCl, který plnil funkci space holderu. Koncentrace jednotlivých složek jsou uvedené v tab 3.

Tab. 3 Objemové složení směsi, převzato z [82]

Objemové složení směsi [obj. %]			
	Pojivový systém (Licomont EK583)	Keramický prášek (Al_2O_3)	Space holder (KCl)
Směs	40	40	40
	10	10	10
	50	50	50
	40	40	40

4.2 Kultivace NIH/3T3

Použitá buněčná linie myších fibroblastů (NIH/3T3) byla před pasážováním buněk zkontrolována pomocí mikroskopu. Z kultivační nádoby (T-lahev, T75, TPP) bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty pomocí fosfátového pufru (PBS, Biosera), který vypláchne a odstraní zbytky kultivačního média. PBS bylo odsáto a k buňkám v kultivační nádobě byl

přidán trypsin (Biosera), který uvolní naadherované buňky. Jedná se o enzymatické oddělení buněk od povrchu kultivační nádoby. Dochází k přerušení interakcí mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a tkáňovým plastikiem. Kultivační nádoba byla umístěna do inkubátoru, přibližně na 5-10 minut. Během této doby, byly buňky kontrolovány pod mikroskopem. Po uvolnění buněk bylo přidáno pro neutralizaci trypsinu stejné množství média. Obsah kultivační nádoby byl převeden do zkumavky. Zkumavka s roztokem buněk, trypsinu a média byla vložena do předem vyhřáté centrifugy na 37°C. Centrifugace trvala po dobu tří minut při otáčkách 1100 rpm. Po odstředění byly buňky usazeny na dně zkumavky a roztok nad buňkami byl odsát. Pomocí média došlo k naředění buněk na požadovanou koncentraci.

4.3 Cytotoxicita PIM materiálu

Cytokompatibilita materiálu byla stanovena pomocí testování cytotoxicity extraktu dle ISO 10993-5 a dále pomocí buněčné adheze a proliferace na povrchu testovaného materiálu. Buňky, které byly testovány na cytotoxicitu extraktu z keramického materiálu vyrobeného pomocí technologie Powder Injection Molding, byly nejprve zpasážovány. Dále byly vysazeny v koncentraci 10^5 buněk na 1 ml kultivačního média do 96 jamkových destiček, které byly následně předkultivované po dobu 24 h. Extrakt z materiálu byl vyroben podle ISO normy ČSN EN ISO 10993-12, kdy extrakční poměr byl 0,2 g vzorku (vyrobeného vstříkáním) na 1 ml kultivačního média. Zkumavky s připraveným extraktem byly vloženy do třepačky, kde byly protřepávány po dobu 24 h při teplotě 37 °C. Poté bylo extrakční médium vysterilizované pomocí stříkačkového mikrofiltru s velikostí porů 0,22 μm . Takto zhotovený extrakt byl přidáván k buňkám nasazeným v platu v různých koncentracích ve čtyřech opakováních. Extrakt byl k buňkám přidáván v koncentracích 1, 10, 25, 50, 75 a 100 %. V jedné z 96 jamkových destiček bylo pouze vyměněno médium a buňky byly ponechány jako reference. Po 24 hodinách byly pomocí mikroskopu Olympus IX81 pořízeny mikrofotografie buněk. Cytotoxicita testovaného extraktu byla vyhodnocena pomocí testu MTT.

4.3.1 Test MTT

Pomocí testu MTT lze vyhodnotit viabilitu buněk na základě spektrofotometrie. Test je založen na schopnosti živých organismů s aktivním metabolismem přeměnit rozpustnou thiazolovou sůl na nerozpustné fialové krystalky formazanu. U mrtvých buněk zaniká

schopnost přeměny MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu) na formazan, takže tvorba barvy je vhodný ukazatel pro zjištění viability buněk.

U buněk, na kterých byl testován extrakt, bylo nejprve vyměněno médium. Do nového média bylo do jednotlivých jamek napipetováno 0,5 mg/ml MTT (Duchefa Biochemie). Roztok MTT působil po dobu čtyř hodin a poté byl obsah jamek odsát. Dále bylo k buňkám přidáno DMSO (Dimethylsulfoxid, Duchefa Biochemie). Toto organické rozpouštědlo rozpustí purpurové krystalky formazanu. Po uplynutí patnácti minut byla změřena absorbance při 570 nm pomocí přístroje Infinite M200 (Tecan). Jako referenční vlnová délka bylo nastaveno 690 nm. Srovnání výsledků bylo provedeno s buňkami kultivovanými v čistém médiu bez extraktu. Výsledky jsou uvedeny jako snížení viability buněk v relativní buněčné viabilitě ve srovnání s referenčními buňkami. Reference odpovídá 100% buněčné viabilitě a byla nastavena na hodnotu 1.

4.4 Modifikace povrchu

Pro modifikaci povrchu keramického scaffoldu byly zvoleny čtyři typy filmů. Všechny filmy byly na bázi polyanilinu (PANI). Část vzorků byla pokryta čistým PANI bez stabilizátorů. Dále byly připraveny vzorky s filmy z PANI v kombinaci s chitosanem (CHIT), hyaluronátem sodným (SH) nebo alginátem sodným (ALG. S.). Pro výrobu stabilizovaných filmů byly vybrány biopolymerní stabilizátory, u kterých se dalo očekávat, že příznivě podpoří buněčnou fyziologii. Modifikované povrchy vzorků PIM keramiky byly vyfoceny pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu. Tytéž filmy byly připraveny stejným postupem do kultivačních misek.

4.4.1 Polyanilinový film bez stabilizátorů (PANI)

Pro výrobu PANI filmů byl použit 0,2 M anilín hydrochlorid (AH, Lach-Ner) a 0,25 M peroxodisíran amonný (APS, Sigma Aldrich). Roztoky AH a APS a reakční směs byla nalita na vzorky a polystyrenové misky. Polymerece probíhala po dobu 1 hodiny. Poté byly pokryté vzorky promyty 0,2 M HCl a opláchnuty methanolem.

4.4.2 Polyanilinový film s hyaluronátem sodným (PANI+SH)

Pro přípravu filmů PANI SH bylo použito AH 0,2 M, APS 0,1 M a SH 1 %. Byl připraven roztok hyaluronátu sodného (Contipro) v demineralizované vodě. Aby došlo k dokonalému rozpuštění SH, byla zkumavka s roztokem přes noc protřepávána na třepačce při teplotě

55°C. Do tohoto roztoku hyaluronátu sodného byl přidán AH, do něj byl nalit roztok APS, který byl připraven rozpuštěním APS v demineralizované vodě. Reakční směs PANI SH byla přelita přes vzorky PIM keramiky a na polystyrenové misky. Vše bylo ponecháno polymerovat po dobu 4 hodin. Následovalo promytí 0,2 M HCl a opláchnutí methanolem.

4.4.3 Polyanilinový film s chitosanem (PANI+CHIT)

Filmy PANI CHIT byly připraveny z AH 0,2 M, APS 0,01 M a 2 % CHIT. První den proběhla příprava chitosanového roztoku. Chitosan (Sigma Aldrich) v 1 M HCl byl umístěn na třepačku při teplotě 55 °C a byl přes noc rozpuštěn. Byla provedena filtrace chitosanového roztoku přes Büchnerovu nálevku. Do získaného chitosanového roztoku byl přidán AH a zároveň byl v demineralizované vodě rozpuštěn APS. Oxidační činidlo, tedy APS, byl přilít do roztoku AH s CHIT. Vzniklý roztok byl dále přelit přes vzorky keramiky a na polystyrenové misky. Reakční směs byla ponechána polymerovat po dobu 12 hodin. Poté byly pokryté vzorky promyty 0,2 M HCl a opláchnuty methanolem.

4.4.4 Polyanilinový film s alginátem sodným (PANI+ALG.S.)

Čtvrtý typ filmů byl PANI s ALG. S. Tyto filmy se skládaly z AH 0,2 M, APS 0,25 M a 2 % ALG. S. Byl připraven roztok alginátu sodného (IPL, Ing. Petr Lukeš), kdy zkumavka s ALG. S. a demineralizovanou vodou byla přes noc umístěna na třepačku a protřepávána při teplotě 37 °C. Dále následovala příprava PANI SH koloid. Do získaného roztoku alginátu sodného byl přidán AH a zároveň byl v demineralizované vodě rozpuštěn APS. Poté byl APS přilít do roztoku AH s ALG. S. Vzorky PIM keramiky byly přelity reakční směsí a byly ponechány polymerovat po dobu 4 hodin. Následovalo promytí 0,2 M HCl a opláchnutí methanolem.

4.5 Sterilizace vzorků

Před kontaktem buněk se vzorkem bylo nutné provést sterilizaci vzorků. Vzorky, u kterých byl modifikován povrch, byly po dobu 4 hodin ponořeny do 70% ethanolu, poté byly přes noc ponořeny do ultra čisté vody (UPW). Další den byly vzorky přesunuty do kultivačního média.

Sterilizace vzorků PIM keramiky bez upraveného povrchu probíhala v sušárně, kde byly vzorky umístěny po dobu 4 hodin při teplotě 160 °C.

4.6 Buněčná proliferace na polymerních filmech

Na kultivační misky o průměru 4 cm byly připraveny polymerní filmy PANI bez stabilizátorů i se stabilizátory. Od každého typu filmu byly připraveny misky v čtyřech opakováních. Před nasazením buněk byla provedena sterilizace pod UV světlem po dobu 30 minut. Do misek s připravenými polymerními filmy a prázdných kultivačních misek (reference) bylo přidáno médium s buňkami o koncentraci 10^5 buněk na 1 ml média. Misky byly umístěny do inkubátoru s kontrolovanými podmínkami (37 °C a 5 % CO₂). Po dvou dnech růstu byly buňky zafixovány a byla obarvena jejich jaderná DNA spolu s aktinovými vlákny.

4.6.1 Fixace a barvení jaderné DNA a aktinových vláken

Prvním krokem při fixaci buněk je odsátí stávajícího obsahu misek. Poté byl přidán na patnáct minut 4% formaldehyd (PENTA chemicals). Po odsátí formaldehydu byly misky propláchnuty PBS. Dále byl k buňkám nasazených v miskách přidán 0,5% Triton X-100 (Sigma Aldrich), který byl po pěti minutách odsát. Následovalo promytí PBS, které se opakovalo třikrát. Všechny následující kroky probíhaly za zhasnutého světla. Do nového PBS bylo přidáno barvivo Hoechst (Sigma Aldrich) v koncentraci 10 µg/ml, které barví jadernou DNA, a zároveň byla přidána 1 kapka na ml barviva ActinRedTM 555 (Invitrogen) pro obarvení aktinových vláken buněčného cytoskeletu. Po třiceti minutách, kdy byly misky uchovány v inkubátoru ve tmě, bylo vyměněno PBS a byly pořízeny mikrofotografie morfologie buněk. K focení byl použit fluorescenční inverzní mikroskop s fázovým kontrastem, Olympus IX81 (Japonsko).

4.7 Cytotoxicita v přímém kontaktu

Vzorky s modifikovaným povrchem o přibližně stejné velikosti byly po sterilizaci testovány na zkoušku cytotoxicity v přímém kontaktu. Vzorky byly vloženy doprostřed misek s předkultivovanými buňkami o koncentraci 10^5 buněk na 1 ml kultivačního média. Po dvou dnech kultivace byly buňky zafixovány. Fixace probíhala stejně jako je popsáno v kapitole 4.6.1 Fixace a barvení jaderné DNA a aktinových vláken. Buňky v okolí vzorků byly po zafixování nafoceny pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus IX81).

4.8 Osazení scaffoldů buňkami

Osazení scaffoldu buňkami probíhalo za statických podmínek. Buňky byly pomocí trypsinu odděleny od povrchu kultivační nádoby, odstředěny a naředěny kultivačním médiem na požadovanou koncentraci. Scaffoldy byly umístěny na 24 jamková plata. Na každý scaffold bylo nanášeno 100 μl média s buňkami v koncentraci 10^7 buněk na 1 ml média. Po hodině, kdy probíhala adheze buněk na povrch, byly vzorky přelity médiem. Scaffoldy osazené buňkami byly ponechány proliferovat po dobu dvou dnů v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO_2 .

4.9 Barvení DNA buněk bez fixace

Po dvou dnech proliferace byla obarvena DNA buněk pomocí Hoechst. Při barvení pomocí fluorescenční látky Hoechst, je důležité pracovat ve tmě, aby nedocházelo k vysvícení. Do každé jamky se stávajícím médiem bylo přidáno 10 μl Hoechst (Sigma Aldrich). Destičky se vzorky byly umístěny na 30 minut do inkubátoru. Poté byl odsát obsah jamek a přidáno nové médium. Z takto připravených scaffoldů s obarvenou DNA byly pořízeny mikrofotografie přímého kontaktu vzorku s buňkami a povrchu vzorků porostlého buňkami. Fotografie byly pořízeny pomocí invertovaného fázového kontrastního mikroskopu.

4.10 Bioreaktor

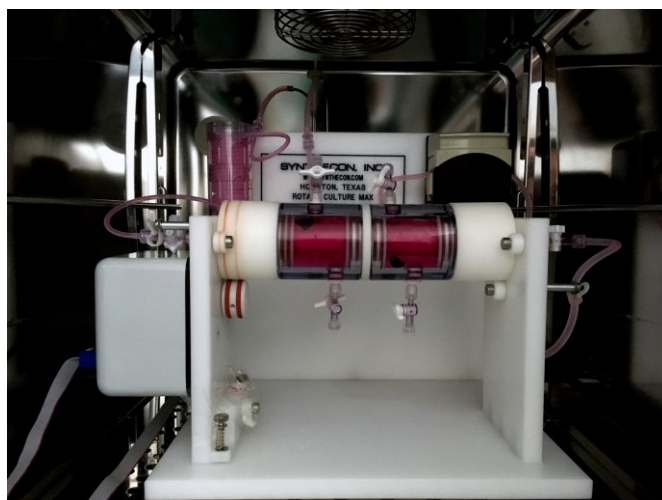
Před spuštěním bioreaktoru byly jednotlivé součásti bioreaktoru vysterilizovány v parním autoklávu. Sterilizace kohoutů, špuntů a šroubů byla provedena pomocí 70% ethanolu, ve kterém byly ponořeny přes noc.

Před osazením scaffoldu buňkami, byly vzorky keramiky s nemodifikovaným povrchem vysterilizovány. Do bioreaktoru byly vloženy buňkami osazené vzorky PIM keramiky. Z vyrobených vzorků byly vybrány scaffoldy s 30 obj. % KCl. Byly testovány vzorky s velikostí pórů (125–250) μm i s pórovitostí vyšší než 250 μm .

Nejdříve byl sestaven bioreaktor a poté byla médiem naplněna zásobní lahev. Každý vzorek osazený buňkami byl opatrně vložen do jedné cely. Poté byly komory naplněny pomocí injekčních stříkaček kultivačním médiem. Dvě stříkačky byly vsunuty do kohoutů první komory. Jednou stříkačkou bylo přidáváno médium a druhou stříkačkou byly nasávány vzduchové bubliny. Obdobně byla naplněna druhá cela. Poté byly naplněny přívody ke komorám. Po uzavření kohoutů byly odsáty zbytky média z přívodu kohoutu.



Obr. 17 Plnění komor bioreaktoru médiem



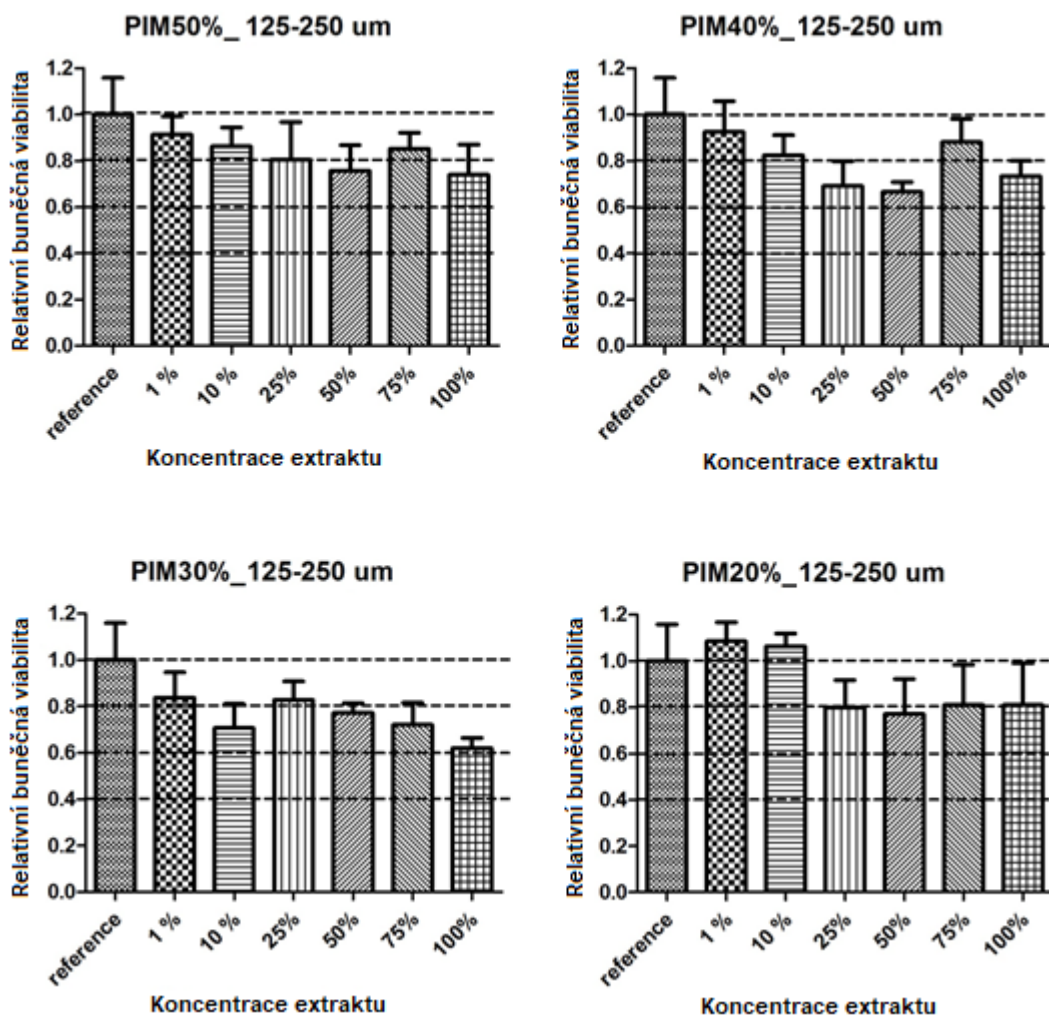
Obr. 18 Sestavený rotační bioreaktor umístěný v inkubátoru

Bioreaktor se vzorky byl umístěn do inkubátoru (37 °C a 5 % CO₂). Rychlost otáček byla nastavena na 9,6 rpm a pumpa na 256 rpm. Dynamická kultivace probíhala po dobu čtrnácti dnů. Poté byl bioreaktor opatrně rozebrán a z komor byly pinzetou vyjmuty vzorky. Keramické scaffolds byly přesunuty do kultivačních destiček, kde probíhala fixace a následné barvení jaderné DNA pomocí barviva Hoechst (Sigma Aldrich). Fixace i barvení probíhalo stejně jako v kapitole 4.5.1 Fixace a barvení jaderné DNA a aktinových vláken.

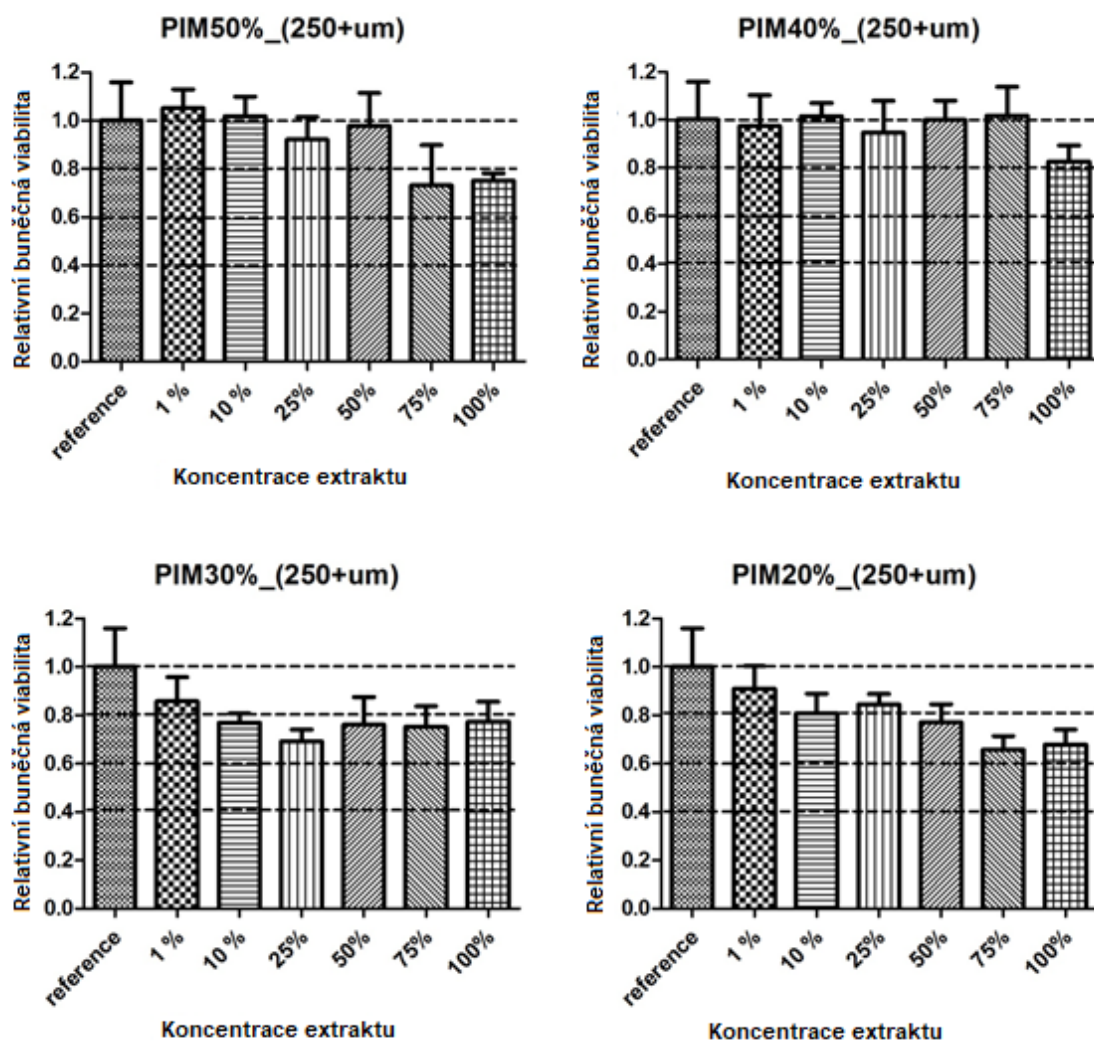
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky cytotoxicity

Prvním testem při stanovení biokompatibility materiálu bylo stanovení cytotoxicity. Byl testován extrakt keramických vzorků, vyrobených technologií PIM. Vyhodnocení cytotoxicity extraktů bylo provedeno pomocí metody MTT



Obr. 19 Graf relativní buněčné viability v závislosti na koncentraci extraktu PIM keramiky s velikostí pórů v rozmezí 125–250 μm s 20 %, 30 %, 40 % nebo 50 % KCl



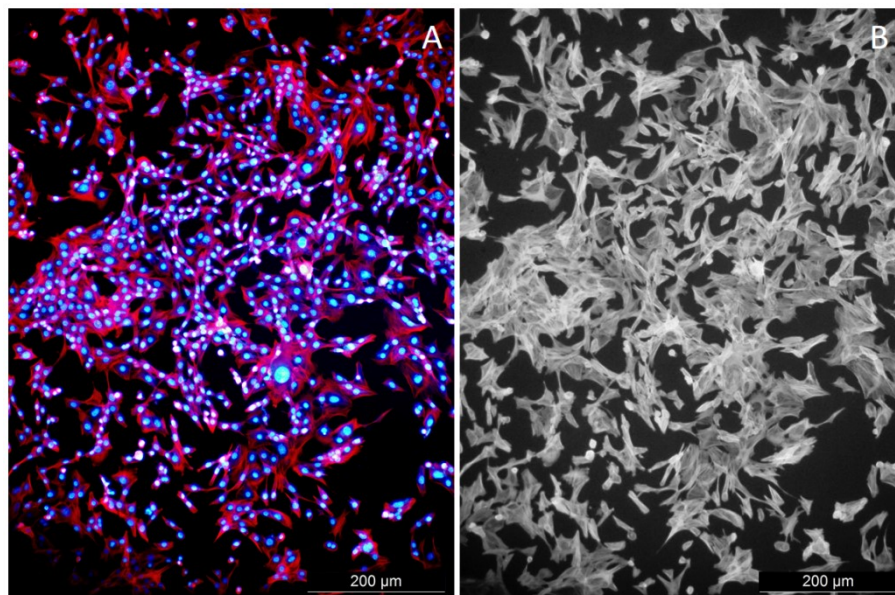
Obr. 20 Graf relativní buněčné viability v závislosti na koncentraci extraktu PIM keramiky s velikostí pórů 250 µm a větší s 20 %, 30 %, 40 % nebo 50 % KCl

Hodnota relativní buněčné viability 1 odpovídá 100 %, tedy viabilitě rovnající se referenci. Podle normy ISO 10993-5 je extrakt považován za necytotoxický, když hodnoty relativní buněčné viability jsou nad 0,8. V rozmezí 0,6–0,8 je extrakt mírně cytotoxický a od 0,4 do 0,6 je extrakt klasifikován jako středně cytotoxický. Pod hodnotou 0,4 relativní buněčné viability vykazuje extrakt závažnou cytotoxicitu. Extrakt byl u všech vzorků vyhodnocen jako necytotoxický, nebo byl shledán jen mírně cytotoxickým. Ani u nejvyšší koncentrace extraktu neklesla hodnota relativní buněčné viability pod hodnotu 0,6. Na obr. 17 jsou grafy cytotoxicity pro extrakt keramiky s velikostí pórů v rozmezí 125–250 µm a s různým obsahem KCl. Na těchto grafech lze vidět, že buňky byly schopny růstu i ve 100% extraktu, avšak pro extrakty z keramiky, která obsahovala 30–50 obj. % KCl, je u 100% extraktů

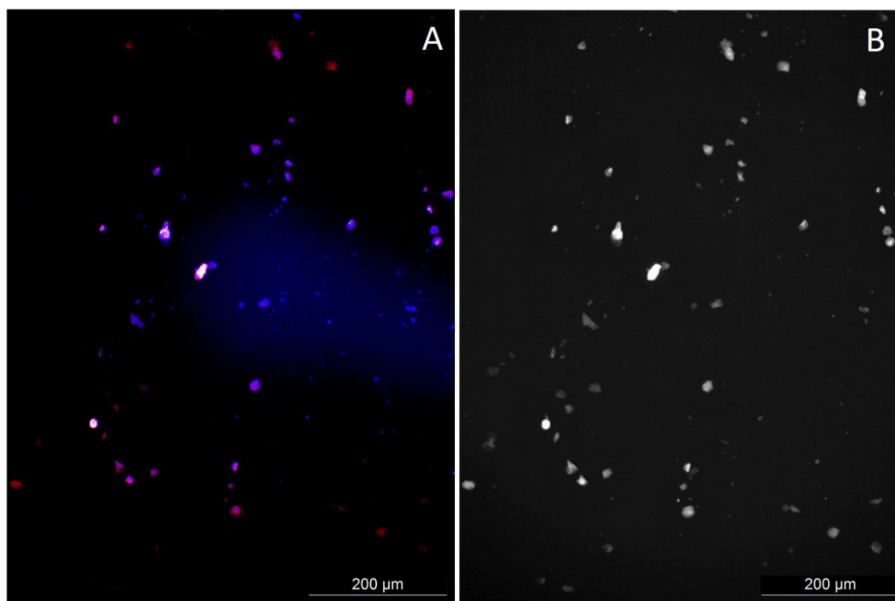
vyhodnocena mírná cytotoxicita. U extraktu z keramiky s objemem space holderu KCl 20 % byl 100% extrakt těsně nad hranicí 0,8 relativní buněčné viability a je tedy považován za necytotoxický.

5.2 Výsledky buněčné proliferace na polymerních filmech

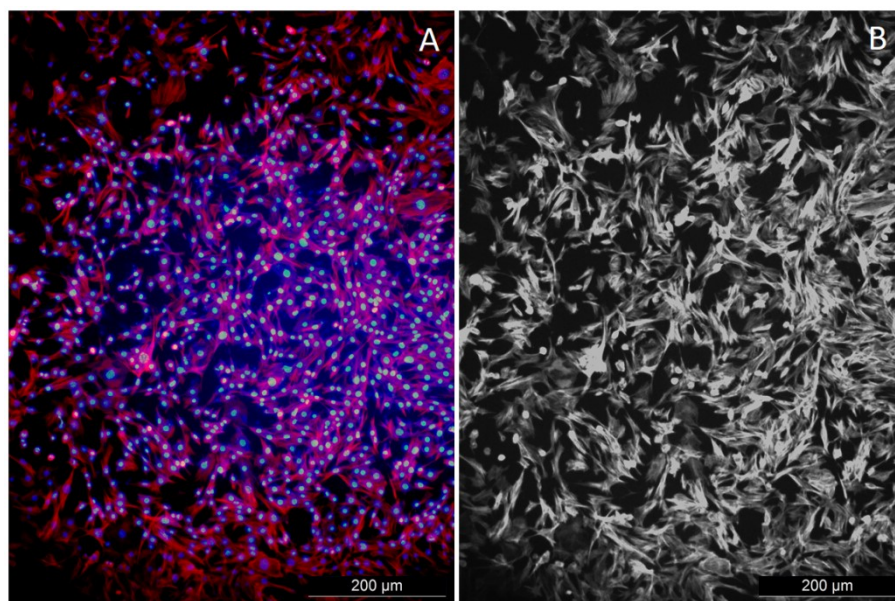
Po dvou dnech proliferace byla obarvena jaderná DNA a aktinová vlákna buněčného cytoskeletu a byly pořízeny mikrofotografie pomocí invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem.



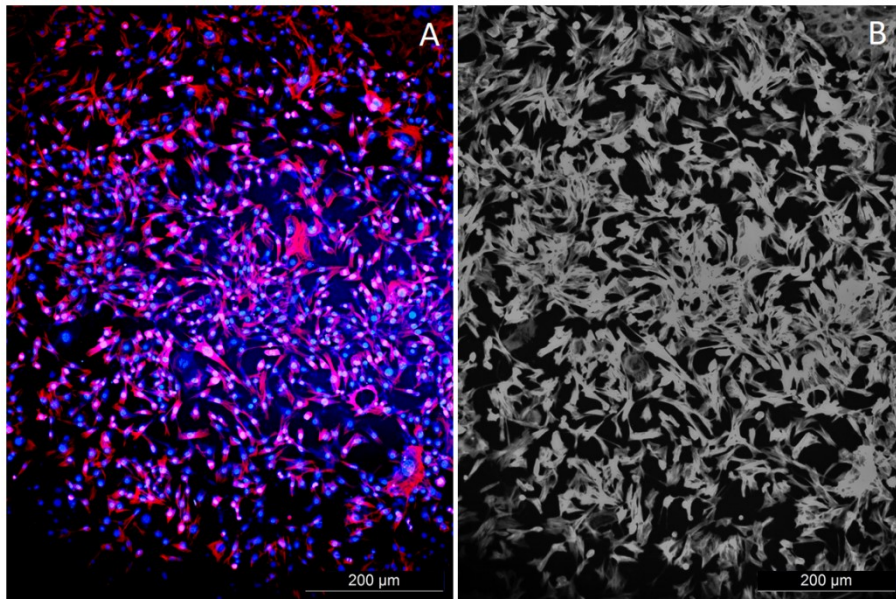
Obr. 21 Reference NIH/3T3 na tkáňovém plastiku, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna



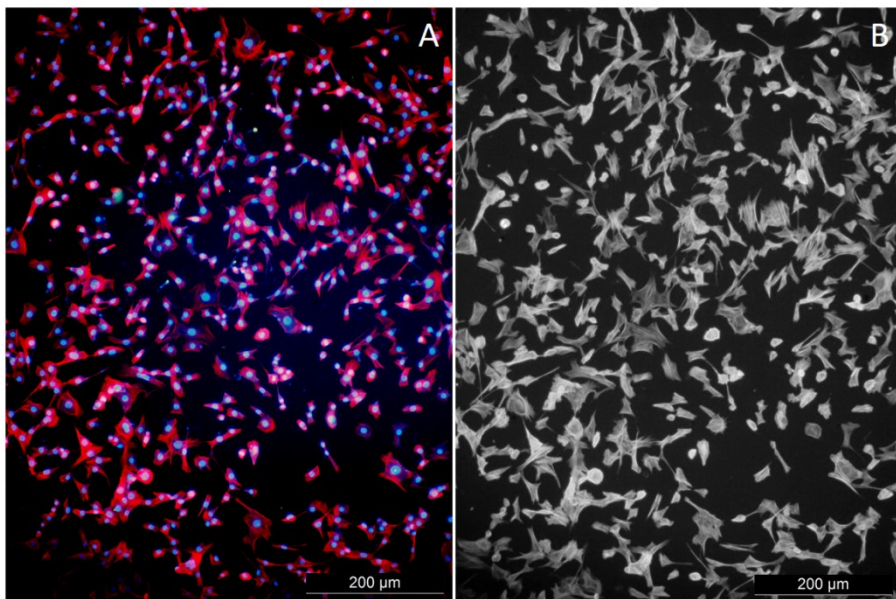
Obr. 22 Obr. 23 NIH/3T3 na PANI filmu, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna



Obr. 24 NIH/3T3 na PANI filmu stabilizovaném SH, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna



Obr. 25 NIH/3T3 na PANI filmu stabilizovaném CHIT, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna



Obr. 26 NIH/3T3 na PANI filmu stabilizovaném ALG.S., (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna

Na obr. 21 je zobrazena reference buněk, která byla kultivována na tkáňovém plastiku bez modifikovaného povrchu polyanilinovým filmem. U snímků reference můžeme pozorovat, že se buňky začaly shlukovat. Na obrázcích 22 až 26 pak lze vidět buněčnou proliferaci

myších fibroblastů na polyanilinových filmech bez stabilizátorů i se stabilizátory. Jako stabilizátory byly použity biopolymery jako je hyaluronát sodný, chitosan a alginát sodný. Vlevo na obrázcích (A) jsou mikrofotografie, na nichž je dobře vidět obarvená buněčná jaderná DNA a červeně obarvená aktinová vlákna buněčného cytoskeletu. Vpravo na obrázcích (B) jsou pro lepší zobrazení morfologie snímky jen aktinových vláken. Na obr. 22 jsou snímky PANI filmu, kde můžeme pozorovat, že buňky v tomto prostředí nebyly schopné proliferace. Neschopnost buněk adherovat a proliferovat na PANI filmu může být způsobena vedlejšími nízkomolekulárními produkty, které mohou vznikat při syntéze. Ve studii *Kašpárková et al. (2019)* je uvedeno, že cytotoxicita polyanilinu je dána především přítomností zbytků persíranu amonného a nízkomolekulárních polárních látek [83]. Na obr. 23 vidíme buněčnou proliferaci na povrchu pokrytém PANI filmem stabilizovaným hyaluronátem sodným. Snímky povrchu s SH podporují fakt, že SH podporuje buněčnou proliferaci. Aktinová vlákna na obr. 23 (B) jsou v porovnání s vlákny referenčních buněk více vláknitá. Míra proliferace na PANI filmu stabilizovaném pomocí chitosanu (obr. 24) je obdobná jako na PANI SH filmu stejně jako morfologie aktinových vláken. Buněk na povrchu, který byl modifikován PANI filmem stabilizovaným alginátem sodným (obr. 26), je v porovnání s PANI filmy stabilizovanými SH nebo CHIT, méně. V kapitole 2.1.2.2 Alginát je zmíněno, že alginát podporuje buněčnou adhezi. Na obr. 26 lze pozorovat malé kulaté buňky. Tyto buňky se naadherovaly na povrch, ale neproliferovaly.

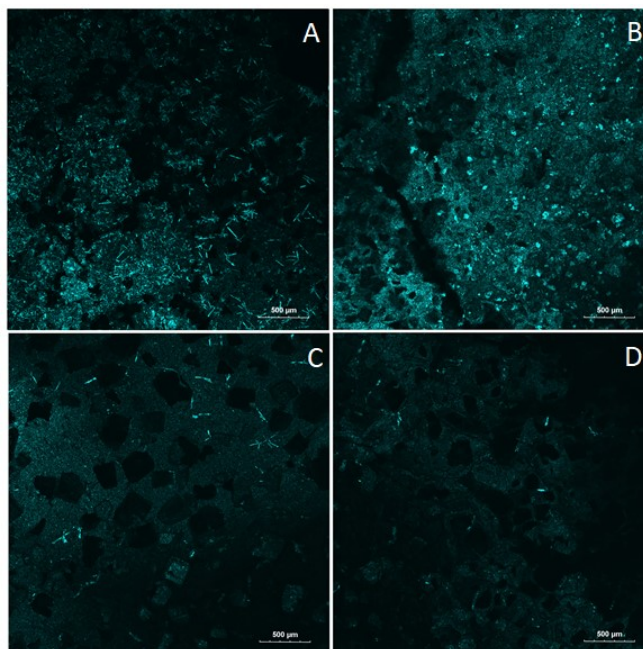
5.3 Modifikovaný povrch

U všech typů keramických vzorků byl modifikován povrch polyanilinovým filmem s přidavkem vybraných biopolymerů. Celkem bylo 64 typů vzorků, každý vzorek byl zhotoven ve dvou opakováních. Pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie byly pořízeny fotografie povrchů. V první řadě bylo u modifikovaných povrchů provedeno testování cytotoxicity prostřednictvím zkoušky přímým kontaktem. Na takto upravených površích byla dále testována buněčná proliferace. V následující kapitole jsou uvedeny pouze vybrané snímky povrchů, na shodných typech vzorků je dále ukázána i buněčná proliferace.

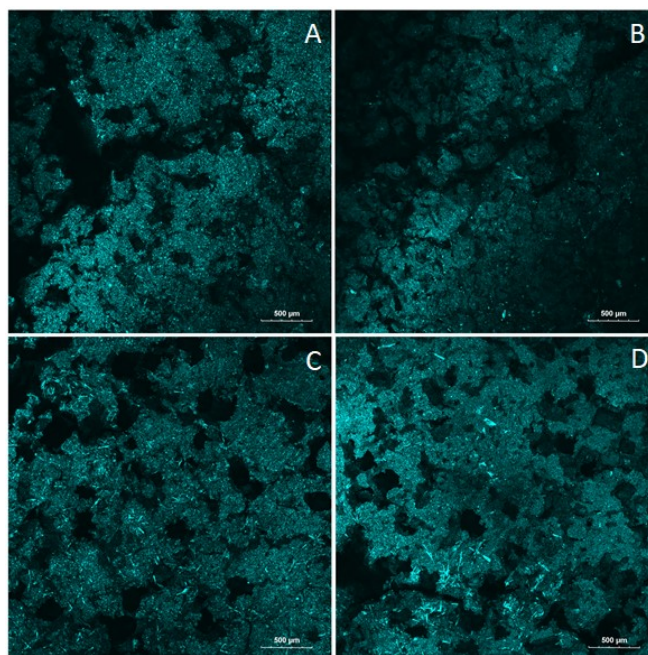
5.3.1 Laserová skenovací konfokální mikroskopie

Na následujících obrázcích jsou snímky modifikovaných povrchů PIM keramiky, které byly pořízeny laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem. Rozložení snímků na obrázcích 27 až 30 je následovné. Na snímcích (A) je zobrazena keramika s póry většími

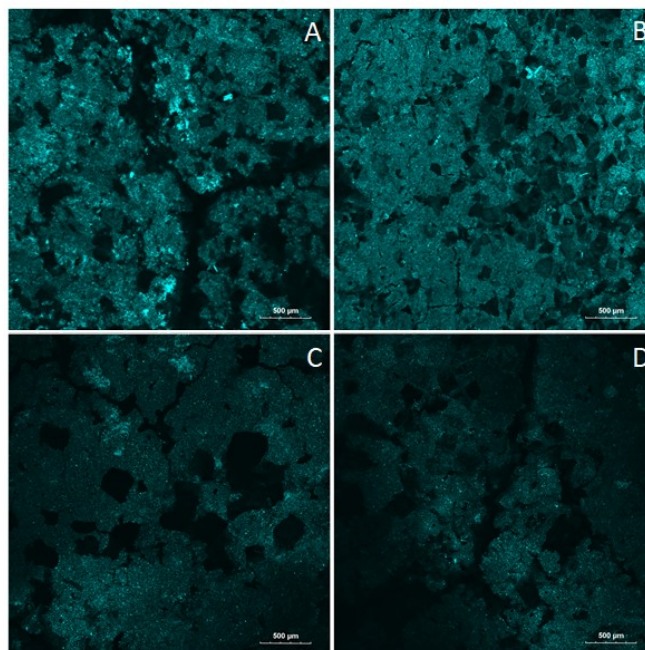
než 250 μm a s 30 obj. % KCl (space holder), na snímcích (B) je keramika s póry většími než 250 μm a s 40 obj. % KCl, (C) velikost pórů keramiky je v rozmezí 125–250 μm a 30 obj. % KCl, (D) velikost pórů v rozmezí 125–250 μm a 40 obj. % KCl.



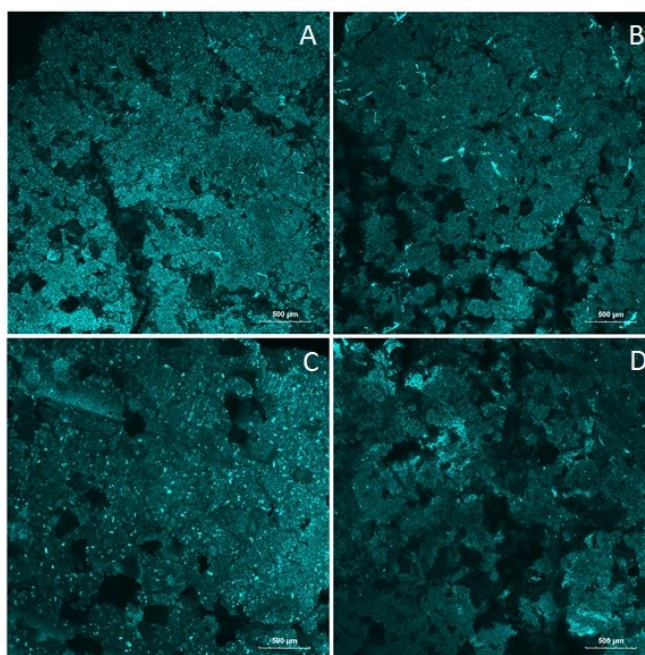
Obr. 27 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem (PANI)



Obr. 28 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem stabilizovaným pomocí hyaluronátu sodného (PANI+SH)



Obr. 29 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem stabilizovaným pomocí chitosanu (PANI+CHIT)

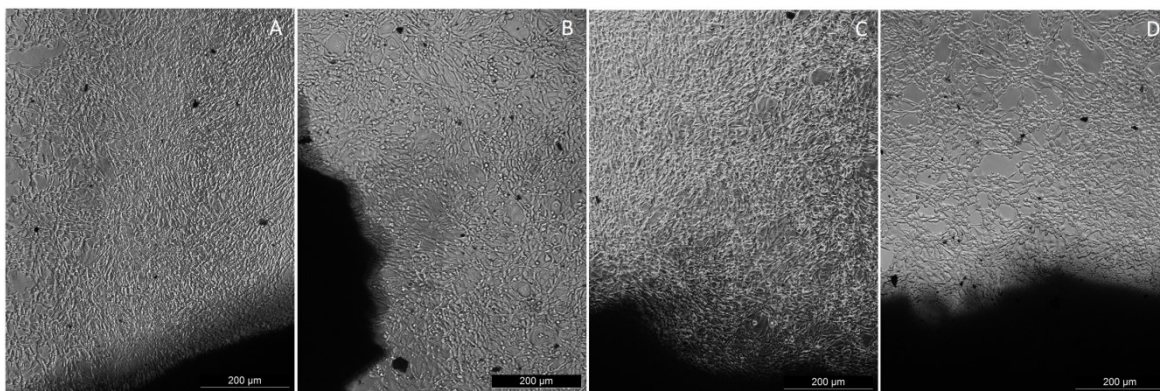


Obr. 30 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem stabilizovaným pomocí alginátu sodného (PANI+ALG.S.)

Na snímcích z laserového skenovacího konfokálního mikroskopu, které jsou na obr. 23 lze vidět polyanilinem modifikovaný povrch keramického vzorku. Na obrázcích lze vidět světlé krystalky, které pravděpodobně mohou být způsobeny vykrytalizováním jednoho z reaktantů, nebo by se mohlo jednat o nízkomolekulární nečistoty. Polymerní film je po celém povrchu vzorku. Distribuce pórů na obr. 23 (A, B) není rovnoměrná a póry jsou více propojené než u menší velikosti pórů (C, D). Na obr. 28 (A, B), kde mají póry velikost vyšší než 250 μm , lze opět vidět vyšší propojenost pórů.

5.4 Cytotoxicita v přímém kontaktu

Jelikož výsledek testů cytotoxicity přímého kontaktu byl u všech typů vzorků stejný, jsou na následujícím obrázku ukázány pouze vybrané vzorky. Na snímku (A) je keramika potažená PANI filmem s velikostí pórů větší než 250 μm a s obsahem space holderu KCl 50 obj. %. (B) keramika potažená PANI filmem stabilizovaným SH a póry většími než 250 μm a s obsahem KCl 40 obj. %. (C) keramika potažená PANI filmem stabilizovaným CHIT a póry v rozmezí 125–250 μm a s obsahem KCl 30 obj. %. (D) keramika potažená PANI filmem stabilizovaným ALG. S. a póry v rozmezí 125–250 μm a s obsahem KCl 20 obj. %.



Obr. 31 Testování cytotoxicity pomocí přímého kontaktu vzorku s buňkami, (A) povrch modifikovaný PANI filmem, (B) PANI SH, (C) PANI CHIT, (D) PANI ALG. S.

Na obr. 31 jsou snímky z kultivace buněčné linie myších fibroblastů v přímém kontaktu se vzorky PIM keramiky s modifikovaným povrchem pomocí PANI filmů. Ze snímků lze vidět, že buňky byly schopny v přímém kontaktu se vzorkem růst. Vzhledem k tomu, že

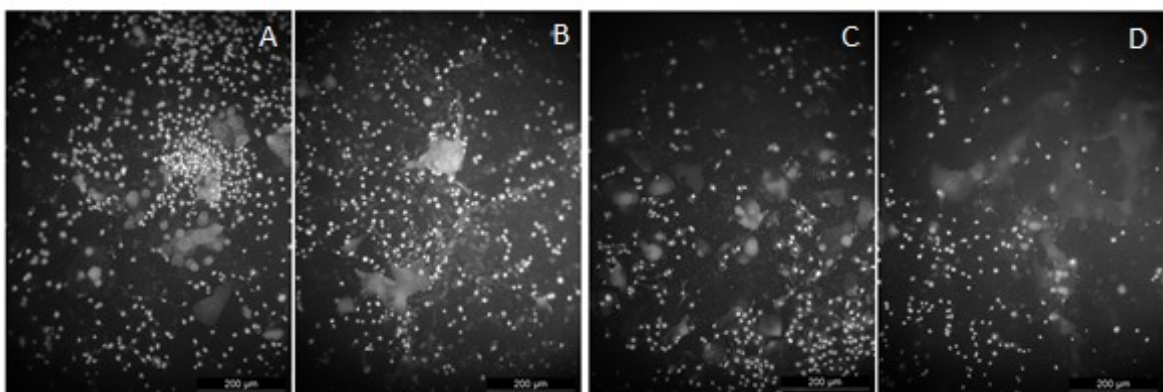
průměrná doba zdvojení populace u myších fibroblastů NIH/3T3 je přibližně 24 hodin, je možné říci, že buňky byly schopny i proliferace.

5.5 Výsledky osazení scaffoldu buňkami (buněčná proliferace)

Interakce buněk s povrchem materiálu závisí především na fyzikálních a chemických vlastnostech jejich povrchu. Zda bude implantovaný materiál tolerován nebo odmítnut záleží na povrchových vlastnostech, které určují interakce mezi materiálem a prostředím.

5.5.1 PIM keramika s modifikovaným povrchem

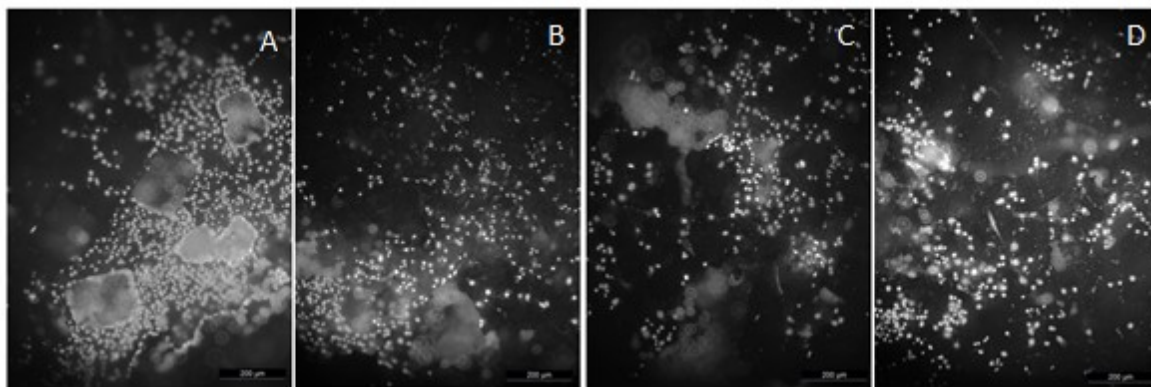
Bylo připraveno celkem 64 různých vzorků, každý po dvou opakováních. Jelikož bylo vzorků mnoho, jsou v následující podkapitole vybrány pouze některé fotografie buněčné proliferace. Mikrofotografie byly pořízeny pomocí invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem, Olympus IX81. Na obrázcích 31 až 34 jsou zobrazeny fotografie buněčné proliferace na keramických scaffoldech s modifikovanými povrchy. Na snímcích (A) je keramika s póry většími než 250 μm a s 30 obj. % KCl (space holder). (B) keramika s póry většími než 250 μm a 40 obj. % KCl, (C) velikost pórů v rozmezí 125–250 μm a 30 obj. % KCl, (D) velikost pórů v rozmezí 125–250 μm a 40 obj. % KCl



Obr. 32 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem bez stabilizátorů (PANI) s obarvenou jadernou DNA buněk

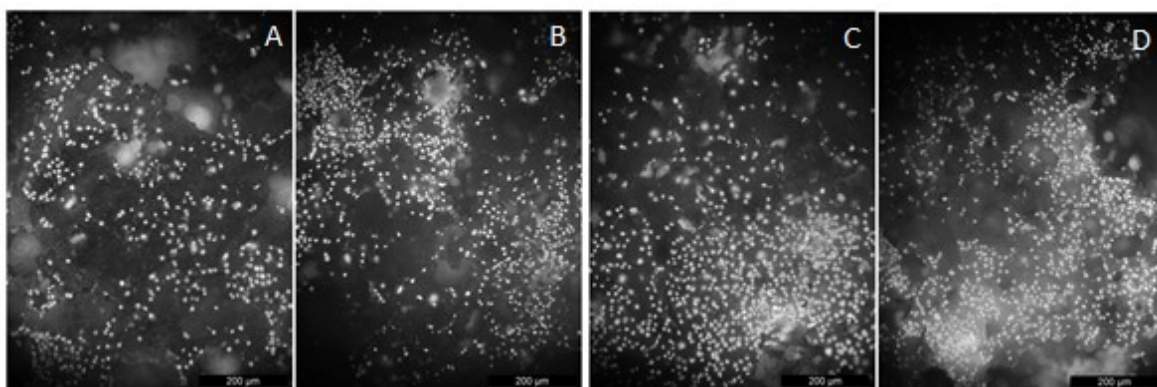
Na obr. 32 jsou mikrofotografie keramického scaffoldu s modifikovaným povrchem polyanilinovým filmem. Ve srovnání s buněčnou proliferací na samotných filmech jsou buňky schopny růst na modifikovaném povrchu scaffoldu. Avšak oproti ostatním modifikovaným

vzorkům, kdy byly pro výrobu filmů použity stabilizátory, je míra buněčné proliferace nižší u vzorků s PANI filmem bez stabilizátorů. Z fotografií je dále patrné, že adherovalo a proliferovalo více buněk na scaffoldech, které mají velikost pórů vyšší než 250 μm (A,B).



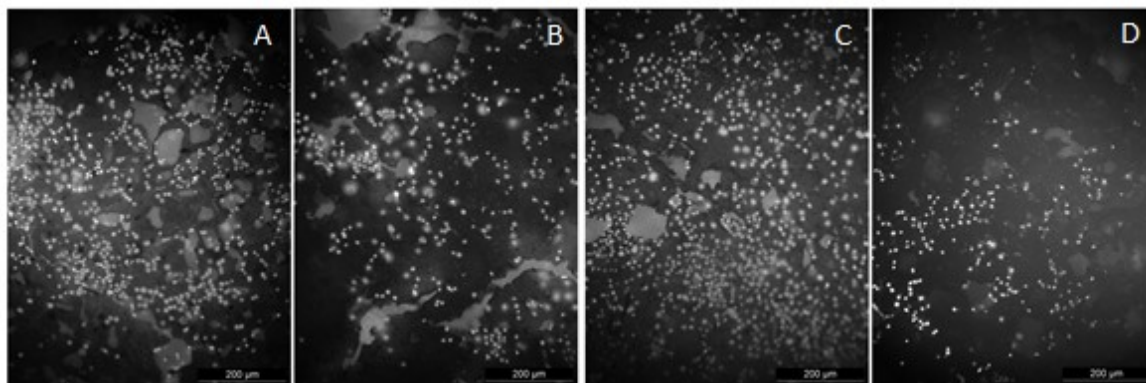
Obr. 33 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem stabilizovaným hyaluronátem sodným (PANI+SH) s obarvenou jadernou DNA buněk

Na obr. 33 je ukázána buněčná proliferace myších fibroblastů na keramickém povrchu modifikovaném PANI filmem stabilizovaným SH. Na snímku (A) lze vidět buňky okolo pórů v keramice a také lze pozorovat, jak tyto póry prosvítají světlou barvou. Z toho lze tedy říci, že buňky byly schopné migrace póry do vnitřní struktury scaffoldu. Při porovnání množství buněk na tomto konkrétním příkladu, lze konstatovat, že více buněk se nachází na scaffoldech s většími póry.



Obr. 34 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem stabilizovaným chitosanem (PANI+CHIT) s obarvenou jadernou DNA buněk

Na snímcích na obr. 34 je vidět, že na scaffoldech s velikostí pórů 125–250 μm (C, D), lze pozorovat více buněk než na snímcích (A, B). Opět lze pozorovat světlejší oblasti na snímcích, které pravděpodobně značí migraci buněk dovnitř pórů. Na snímcích 34 C, D není distribuce rovnoměrná, což by mohlo být způsobeno statickým typem sítě.

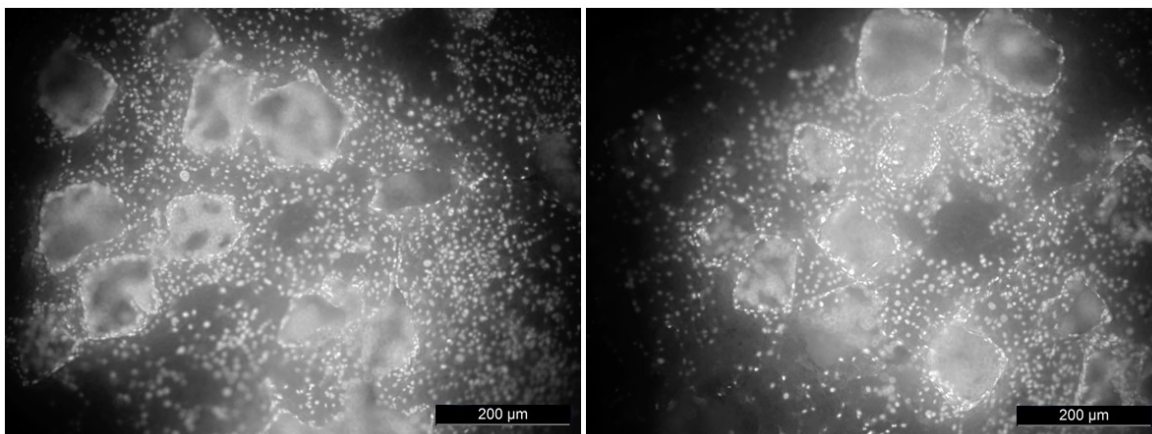


Obr. 35 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem stabilizovaným alginátem sodným (PANI+ALG.S.) s obarvenou jadernou DNA buněk

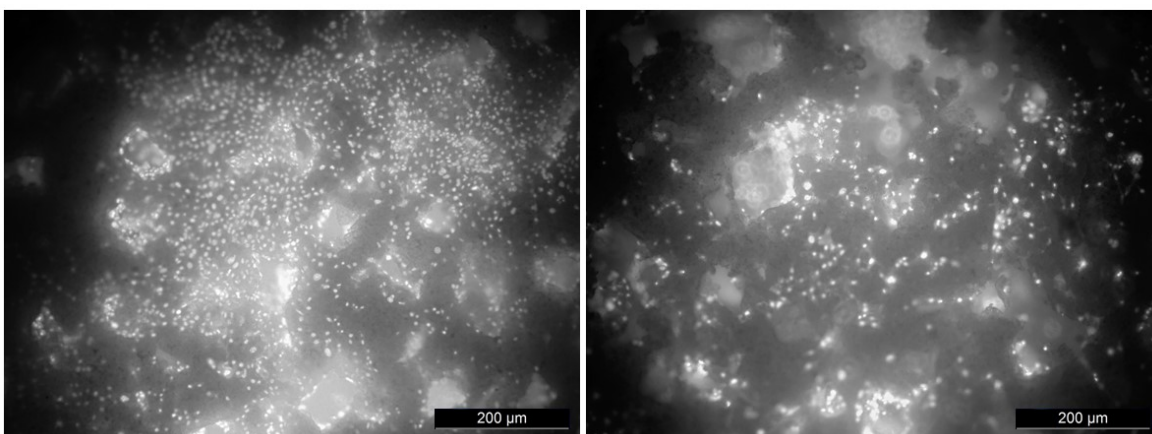
Na obr. 35 jsou uvedeny snímky keramického scaffoldu s modifikovaným povrchem pomocí PANI filmu stabilizovaného ALG.S. Na snímcích 35 A, C, kde je keramika ve které byl obsah space holderu KCl 30 obj. %, je možné pozorovat vyšší buněčnou proliferaci oproti snímkům 35 B, D.

5.5.2 PIM keramika bez povrchových úprav

Buňky byly po třiceti minutách prvotní adheze přelity médiem a poté byly buňky, které se nestačily naadherovat, spláchnuty pomocí média do kultivační misky. Po třech dnech statické kultivace byla bez fixace obarvena jaderná DNA buněk pomocí barviva Hoechst a byly pořízeny snímky povrchu vzorků. Lze tedy říci, že buňky linie NIH/3T3 byly schopny adheze i následné proliferace na testovaném vzorku. Takto osazené scaffoldy byly dále přesunuty do komor bioreaktoru, kde probíhala dynamická kultivace po dobu čtrnácti dní.



Obr. 36 Mikrofotografie povrchu keramického scaffoldu, vyrobeného technologií PIM, s velikostí pórů větší než 250 µm a s 30 obj. % KCl (space holder), osazeného buňkami s obarvenou jadernou DNA (na obr. světlé tečky)



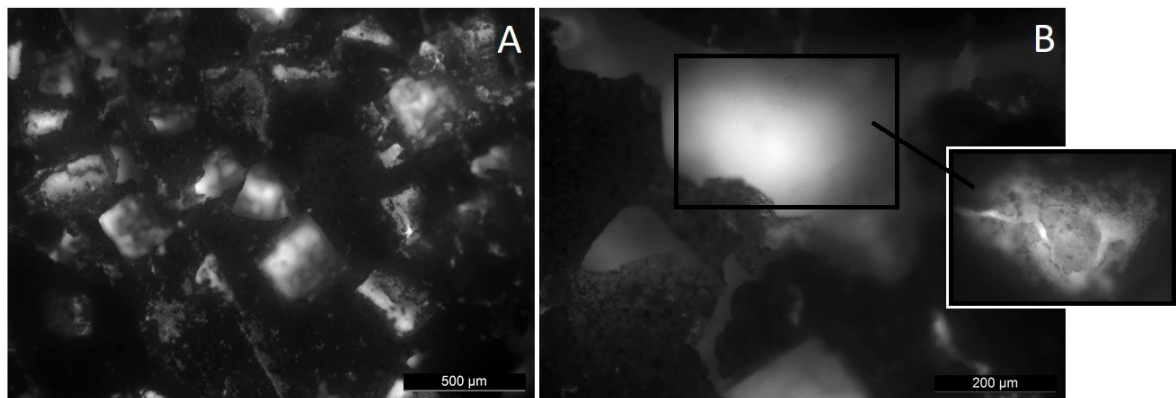
Obr. 37 Mikrofotografie povrchu keramického scaffoldu, vyrobeného technologií PIM, s velikostí pórů v rozmezí od 125 µm do 250 µm a s 30 obj. % KCl (space holder), osazeného buňkami s obarvenou jadernou DNA (na obr. světlé tečky)

Z mikrofotografií na obr. 36 lze vidět osazený povrch keramického scaffoldu. Světlé tečky, které jsou na snímcích, jsou obarvená jádra buněk. Osazení scaffoldu je téměř rovnoměrné na obou snímcích. Lze také vidět póry v keramice, které svítí, z toho se dá usuzovat, že buňky byly schopny migrovat póry do vnitřní části scaffoldu. Na obr. 37 lze vidět fotografie pórovitého keramického povrchu osazeného buňkami. V porovnání se snímky na obr. 36, je na tomto obrázku méně buněk a jejich distribuce není rovnoměrná. Opět ale můžeme pozorovat světlé póry, které dokazují migraci buněk dovnitř keramické struktury.

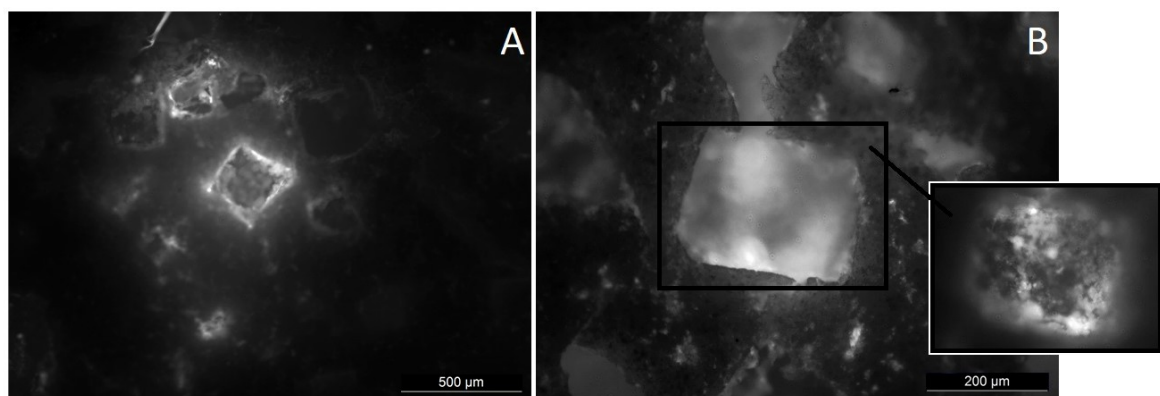
Vzorky, které jsou na obr. 36 a 37, byly přesunuty do bioreaktoru, kde probíhala dynamická kultivace.

5.6 Výsledky dynamické kultivace v bioreaktoru

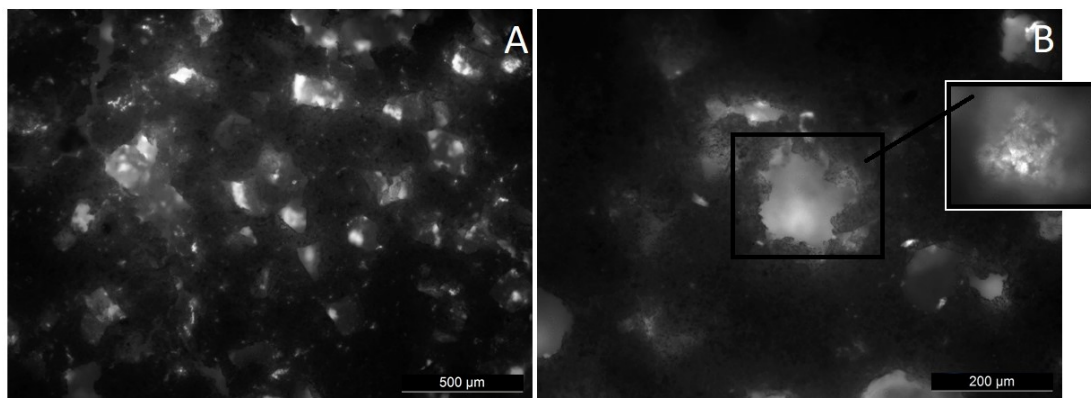
Pro porovnání jsou v následující kapitole ukázány i snímky ze statické kultivace vzorků, která probíhala současně s dynamickou kultivací.



Obr. 38 PIM keramika bez povrchových úprav s velikostí pórů 250 μm a více, osazena NIH/3T3 s obarvenou jadernou DNA, statická kultivace po dobu 14 dní



Obr. 39 PIM keramika bez povrchových úprav s velikostí pórů 250 μm a více, osazena NIH/3T3 s obarvenou jadernou DNA, dynamická kultivace v bioreaktoru po dobu 14 dní



Obr. 40 PIM keramika bez povrchových úprav s velikostí pórů 250 µm a více, osazena NIH/3T3 s obarvenou jadernou DNA, dynamická kultivace v bioreaktoru po dobu 14 dní

Na obrázcích 38 až 40 jsou uvedeny fotografie povrchu keramického scaffoldu osazeného buňkami s obarvenou jadernou DNA po kultivaci, která probíhala po dobu čtrnácti dnů. Na obr. 38 jsou snímky ze statické kultivace. Na snímku 38 A je zobrazen povrch scaffoldu, kde jsou vidět keramické póry, které mají světlejší barvu. Na obr. 38, kde jsou zobrazeny vzorky při statické kultivaci po dobu čtrnácti dnů, je na povrchu vzorků vidět méně buněk, než lze vidět na obrázcích 36 a 37, kde je zobrazen povrch keramických scaffoldů po kultivaci za statických podmínek po dobu tří dnů. Jelikož se jedná o ty samé vzorky, je to pravděpodobně z důvodu, že buňky měly tendenci migrovat do středu scaffoldu. Ve srovnání s dynamickou kultivací, jsou buňky u statické kultivace více u povrchu, a proto svítí póry více než na obrázcích 39 a 40. U dynamické kultivace bylo obtížnější pořídit fotografie buněk na povrchu scaffoldu. Mohlo by to být způsobeno rychlou cirkulací média v rotačním bioreaktoru. Tedy buňky mohly mít vlivem smykového napětí větší tendenci migrovat do vnitřní struktury scaffoldu či naopak kvůli smykovému stresu byly z povrchu odstraněny. Nicméně ze snímků na obrázcích 39 a 40 lze říci, že buňky byly schopny osadit scaffold. Pro ověření přítomnosti buněk ve vnitřní struktuře keramiky bylo potřeba vzorky rozlomit. Protože nebyly k dispozici prostředky, kterými by mohl být proveden rovný řez keramiky, byly vzorky po zafixování opatrně rozbity a střed scaffoldu byl zkontrolován pod mikroskopem. Fotografie rozlomené keramiky zde nejsou uvedeny, protože povrch nebyl rovný a snímky nebylo možno normálním invertovaným mikroskopem s fázovým kontrastem pořídit ostré. Lze ovšem konstatovat, že střed scaffoldu byl buňkami osazen.

ZÁVĚR

Teoretická část práce se zabývala literární rešerší se zaměřením na scaffoldy pro tkáňové inženýrství. Na začátku práce byl nejdříve definován pojem scaffold. V navazující kapitole byly probrány požadavky na scaffoldy, jako je biokompatibilita a biodegradabilita. Další část práce byla zaměřena na morfologickou strukturu scaffoldů. Jeden úsek se zabývá technologiemi výroby scaffoldů. Jelikož se scaffoldy po implantaci nachází v přímém kontaktu s lidskou tkání, je velmi důležitý materiál, ze kterého bude scaffold zhotoven. A proto byla značná část práce zaměřena na biomateriály. V tomto segmentu práce byly nejdříve biomateriály rozděleny do několika kategorií. Každá kategorie byla stručně popsána a bylo vybráno pár zástupců biomateriálů z každé kategorie. Další úsek práce byl věnován povrchu biomateriálů a jejich možné modifikaci, protože hlavní roli k přijetí scaffoldu okolní hostitelskou tkání hraje interakce mezi materiálem a prostředím. V poslední pasáži teoretické části byla rozebrána dynamická kultivace pomocí bioreaktorů.

Praktická část práce byla zaměřena na testování keramického materiálu vyrobeného pomocí technologie PIM. Nejprve byl proveden test cytotoxicity extraktu. Z materiálu byl vyroben extrakt, který se zkoumal v různých koncentracích na buněčné linii myších fibroblastů. Vyhodnocení cytotoxicity bylo stanoveno na základě buněčné viability pomocí testu MTT. Všechny extrakty byly vyhodnoceny jako netoxické, případně mírně toxické. Dále byla provedena modifikace keramického povrchu pomocí polyanilinových filmů. Některé z polyanilinových filmů byly stabilizovány pomocí biopolymerů, jako je hyaluronát sodný, chitosan nebo alginát sodný. Před testováním cytotoxicity pomocí zkoušky přímým kontaktem s modifikovanými vzorky, byla nejdříve otestována buněčná proliferace na samostatných polyanilinových filmech. Buňkám se na polyanilinových filmech se stabilizátory povedlo adherovat a byly schopny i proliferovat. Ovšem u PANI filmu bez stabilizátorů nebyly buňky schopné adheze. Poté byl proveden test přímého kontaktu. Tento test ukázal, že buňky jsou schopny růst v blízkosti keramických vzorků s modifikovaným povrchem. Dále bylo provedeno testování buněčné proliferace na povrchu modifikovaných vzorků. Toto testování ukázalo, že buňky byly schopny buněčné adheze i proliferace na všech modifikovaných površích. Avšak na vzorcích, které byly modifikovány PANI filmem bez stabilizátorů, bylo méně buněk než na vzorcích, kde byl povrch potažen PANI filmem se stabilizátory. Jako poslední testování probíhala dynamická kultivace keramických vzorků bez povrchových úprav v bioreaktoru za podmínek simulujících *in vivo* prostředí. Výsledkem kultivace v bioreaktoru je, že buňky byly schopny keramický scaffold osadit.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] EBNESAJJAD S. *Handbook of biopolymers and biodegradable plastics: properties, processing and applications*. Waltham, MA: Elsevier/William Andrew, 2013. PDL handbook series. ISBN 14-557-2834-9.
- [2] MIESZAWSKA A.J. a D.L. KAPLAN. Smart biomaterials - regulating cell behavior through signaling molecules. *BMC Biology*. 2010, **8**(59). DOI: 10.1186/1741-7007-8-59. ISSN 1741-7007.
- [3] GRUMEZESCU A. *Engineering of nanobiomaterials: applications of nanobiomaterials*. Boston, MA: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-41532-3.
- [4] CHEUNG H.-Y., K.-T. LAU, T.-P. LU a D HUI. A critical review on polymer: based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites*. 2007, **38**, 291–300.
- [5] DALEY W., S. PETERS a M. LARSEN. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*. 2008, **121**(3), 255–264. DOI: 10.1242/jcs.006064. ISSN 0021-9533.
- [6] TIMPL R. Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology*. 1996, **8**, 618–624.
- [7] LEE S., A. ATALA a J. YOO. *In situ tissue regeneration: host cell recruitment and biomaterial design*. USA: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-802225-2.
- [8] LANZA R. P. a A. ATALA. *Essentials of stem cell biology*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. ISBN 978-012-4095-038.
- [9] AMBROSIO L. *Biomedical composites*. 2nd edition. Duxford: Elsevier/Woodhead Publishing, 2017. Woodhead Publishing series in biomaterials. ISBN 978-0-08-100752-5.
- [10] GRUMEZESCU A. *Nanobiomaterials in soft tissue engineering: applications of nanobiomaterials*. Amsterdam: William Andrew, 2016. Applications of nanobiomaterials, v. 5. ISBN 978-0-323-42865-1.
- [11] CHEN Q. a G. THOUAS. *Biomaterials: a basic introduction*. 1st ed. Boca Raton:

- CRC press, 2014. ISBN 978-1-4822-2769-7.
- [12] PERROTTI V. *Biocompatibility of Dental Biomaterials*. 1st ed. United Kingdom: A volume in Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 2017, 1–7. ISBN 978-0-08-100943-7.
- [13] O'BRIEN F. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materialstoday*. 2011, **3**(14), 88–95.
- [14] BABENSEE J., J. ANDERSON, L. MCINTIRE a A. MIKOS. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998, **33**, 111–139.
- [15] RATNER B., S. HOFFMAN, F.J. SCHOE, a J.E. LEMON. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [16] VAN BLITTERSWIJK C. *Tissue engineering*. 1st ed. London: Academic, 2008. ISBN 978-012-3708-694.
- [17] MURPHYA C., M. HAUGHB a F. O'BRIEN. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010, **3**(31), 461-466.
- [18] KARAGEORGIU V. a D. KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005, **26**(27), 5474-5491. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002. ISSN 01429612.
- [19] TAKEMOTO M., S. FUJIBAYASHI, B. OTSUKI, T. MATSUSHITA, T. KOKUBO a T. NAKAMURA. 3-D Analysis of Pore Structure of Porous Biomaterials Using Micro Focus X-Ray Computed Tomography. *Key Engineering Materials*. 2006, **309–311**, 1095–1098. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.1095. ISSN 1662-9795.
- [20] JENNINGS J. a J. BUMGARDNER. *Chitosan Based Biomaterials, Volume 2: Tissue Engineering and Therapeutics*. 2nd ed. Boston: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-08-100228-5.
- [21] JULIANO R.L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily

- members. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 2002, **42**, 283–323.
- [22] GRIESSER H. *Thin film coatings for biomaterials and biomedical applications*. Amsterdam: Elsevier, Woodhead Publishing, 2016. ISBN 978-1-78242-453-6.
- [23] KRAMER I. *Signal transduction*. 3rd ed. Boston: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-394803-8.
- [24] JABBARI E. a A. KHADEMHOSEINI. *Biologically-responsive hybrid biomaterials: a reference for material scientists and bioengineers*. Hackensack, NJ: World Scientific, 2010. ISBN 978-981-4295-67-3.
- [25] VAN DER FLIER A. a A. SONNENBERG. Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*. 2001, **305**(3), 285–298. DOI: 10.1007/s004410100417. ISSN 0302-766X.
- [26] DE FRANCESCHI N., E. PEUHU, M. PARSONS et. al. Mutually Exclusive Roles of SHARPIN in Integrin Inactivation and NF- κ B Signaling. *PLOS ONE*. 2015, **10**(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0143423. ISSN 1932-6203.
- [27] MCQUEEN C. A., J. BOND a K. RAMOS. *Comprehensive Toxicology: Volumes 1–14*. 2nd ed. United Kingdom: Elsevier, 2010. ISBN 978-0-08-046868-6.
- [28] TANG L., Y. WU a R.B. TIMMONS. Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research banner*. 1998, **42**(1), 156–163.
- [29] RATNER B. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 978-0-12-582463-7.
- [30] WEBSTER T. *Nanomedicine: technologies and applications*. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2012. Woodhead Publishing series in biomaterials, no. 49. ISBN 978-0-85709-233-5.
- [31] KUMBAR S., C. LAURENCIN a M. DENG. *Natural and synthetic biomedical polymers*. 1st ed. Burlington, MA: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-396983-5.
- [32] MURPHY W., R. DENNIS, J. KILENY a D. MOONEY. Salt Fusion: An Approach to Improve Pore Interconnectivity within Tissue Engineering Scaffolds. *Tissue*

- engineering*. 2002, **8**(1), 43–52.
- [33] MIAO X., D. LIU, X. WEI, G. CHADWICK, F. YAN a C. FRIIS. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. *Materials Science and Engineering: C*. 2010, **30**(1), 78–85. DOI: 10.1016/j.msec.2009.09.002. ISSN 09284931.
- [34] SALERNO A., M. OLIVIERO, E. DI MAIO, S. IANNACE a P. NETTI. Design of porous polymeric scaffolds by gas foaming of heterogeneous blends. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009, **20**(10), 2043–2051. DOI: 10.1007/s10856-009-3767-4. ISSN 0957-4530.
- [35] GAHARWAR A. *Nanomaterials in tissue engineering: fabrication and applications*. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2013. Woodhead Publishing series in biomaterials, no. 56. ISBN 978-0-85709-596-1.
- [36] HAUGH M., C. MURPHY a F. O'BRIEN. Novel Freeze-Drying Methods to Produce a Range of Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds with Tailored Mean Pore Sizes. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2010, **16**(5), 887–894. DOI: 10.1089/ten.tec.2009.0422. ISSN 1937-3384.
- [37] LEE J. a W. YEONG. Design and Printing Strategies in 3D Bioprinting of Cell-Hydrogels: A Review. *Advanced Healthcare Materials*. 2016, **5**(22), 2856–2865. DOI: 10.1002/adhm.201600435. ISSN 21922640.
- [38] DALY A., G. CUNNIFFE, B. SATHY, O. JEON, E. ALSBERG a D. KELLY. 3D Bioprinting of Developmentally Inspired Templates for Whole Bone Organ Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 2016, **5**(18), 2353–2362. DOI: 10.1002/adhm.201600182. ISSN 21922640.
- [39] DEB P., A. DEOGHARE, A. BORAH, E. BARUA a S. LALA. Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Materials Today: Proceedings*. 2018, **5**(5), 12909-12919.
- [40] OBERG E. *Machinery's Handbook*. 30th ed. Connecticut: Industrial Press, 2016. ISBN 978-0-8311-3091-6.
- [41] FRANCIS L. *Materials processing: a unified approach to processing of metals*,

- ceramics and polymers*. Waltham, MA: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-385132-1.
- [42] BIRON M. *Thermoplastics and thermoplastic composites*. 2nd ed. Waltham, MA: William Andrew, 2013. PDL handbook series. ISBN 978-1-4557-7898-0.
- [43] OSSWALD T. *International plastics handbook: the resource for plastics engineers*. 1st ed. Cincinnati: Hanser, 2006. ISBN 978-344-6229-051.
- [44] ABD A. S., M. A. BAKAR a I. M. HUSSAIN. Effect of Single Based Binder Palm Stearin on Sintered Properties of Hydroxyapatite Scaffold. *Applied Mechanics and Materials*. 2015, **763**, 36-40. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.763.36. ISSN 1662-7482.
- [45] RAZA M., A. SULONG, N. MUHAMAD, M. AKHTAR a J. RAJABI. Effects of binder system and processing parameters on formability of porous Ti/HA composite through powder injection molding. *Materials & Design*. 2015, **87**, 386–392.
- [46] MILNE I., R. RITCHIE a B. KARIHALOO. *Comprehensive structural integrity: Volumes 1–10*. Boston: Elsevier, 2003. ISBN 978-0-08-043749-1.
- [47] HENCH L. a J. JONES. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. Cambridge: Woodhead, 2005. ISBN 18-557-3737-X.
- [48] WILLIAMS P. *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials: Polysaccharides, Proteins and Polyesters*. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2011. ISBN 978-1-84973-245-1.
- [49] FAKIROV S. a D. BHATTACHARYYA. *Handbook of engineering biopolymers: homopolymers, blends, and composites*. Cincinnati, Ohio: Hanser Gardner, 2007. ISBN 978-1-56990-405-3.
- [50] BHATTACHARJEE P., B. KUNDU, D. NASKAR, H. KIM, T. MAITI, D. BHATTACHARYA a S. KUNDU. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta Biomaterialia*. 2017, **63**, 1-17. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.09.027. ISSN 17427061.
- [51] ZHANG Y., W. FAN, Z. MA, C. WU, W. FANG, G. LIU a Y. XIAO. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. *Acta Biomaterialia*. 2010, **6**(8), 3021–

3028. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.030. ISSN 17427061.
- [52] THOMAS S., P. BALAKRISHNAN a M.S. SREEKALA. *Fundamental Biomaterials: Polymers*. Cambridge, United Kingdom: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-08-102194-1.
- [53] RINAUDO M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*. 2008, **57**(3), 397–430. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103.
- [54] MA P. *Biomaterials and regenerative medicine*. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-1-107-01209-7.
- [55] SHUKLA S., A. MISHRA, O. AROTIBA a B.B. MAMBA. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, **59**, 46–58.
- [56] NARAYAN R. *Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications*. 1st ed.: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-08-100716-7.
- [57] TEMENOFF J. a A. MIKOS. *Biomaterials: the Intersection of biology and materials science*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 2008. ISBN 01-300-9710-1.
- [58] ALVAREZ K. a H. NAKAJIMA. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials*. 2009, **2**(3), 790–832. DOI: 10.3390/ma2030790. ISSN 1996-1944.
- [59] CASTNER D.G. a B. RATNER. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*. 2002, **500**(1–3), 28–60.
- [60] JIAO Y.-P. a F.-Z. CUI. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical Materials*. 2007, **2**, 24–37.
- [61] WANG S., W. CUI a J. BEI. Bulk and surface modifications of polylactide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, **381**(3), 547–556.
- [62] ATALA A., R. LANZA, J. A. THOMSON a R. NEREM. *Principles of regenerative medicine*. 2nd ed. Boston: Elsevier, 2011. ISBN 978-012-3814-227.
- [63] PRAKASH S. a J. YEOM. *Nanofluidics and microfluidics: systems and applications*. Waltham: Elsevier, 2014. ISBN 978-1-4377-4469-9.

- [64] JASSO-GASTINEL C.F, a J.M. KENNY. *Modification of polymer properties*. Boston: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-44353-1.
- [65] WILSON C.J., R.E. CLEGG, D.I. LEAVESLEY a M. PEARCY. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue engineering*. 2005, **11**(12), 1–18.
- [66] GARCÍA A., M. VEGA, D. BOETTIGER a J. BRUGGE. Modulation of Cell Proliferation and Differentiation through Substrate-dependent Changes in Fibronectin Conformation. *Molecular Biology of the Cell*. 1999, **10**(3), 785–798. DOI: 10.1091/mbc.10.3.785. ISSN 1059-1524.
- [67] MARTÍNEZ E., J. HERNÁNDEZ, M. MACHADO, J. MANO, J. RIBELLES, M. PRADAS a M. SÁNCHEZ. Human Chondrocyte Morphology, Its Dedifferentiation, and Fibronectin Conformation on Different PLLA Microtopographies. *Tissue Engineering Part A*. 2008, **14**(10), 1751–1762. DOI: 10.1089/ten.tea.2007.0270. ISSN 1937-3341.
- [68] VOGEL H. a C. TODARO. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*. 3rd ed. Westwood, N.J., U.S.A.: Noyes Publications, 1997. ISBN 08-155-1407-7.
- [69] CHAUDHURI J. a M. AL-RUBEAI. *Bioreactors for tissue engineering: Principles, Design and Operation*. London: Springer, 2005. ISBN 14-020-3740-6.
- [70] PÖRTNER R., S. NAGEL-HEYER, C. GOEPFERT, P. ADAMIETZ a N. MEENEN. Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005, **100**(3), 235–245. DOI: 10.1263/jbb.100.235. ISSN 13891723.
- [71] MANDENIUS C.F. *Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications*. Germany: Wiley-VCH, 2016. ISBN 978-3-527-33768-2.
- [72] LECLERC M. a R. GAUVIN. *Functional materials for energy, sustainable development and biomedical sciences*. Boston: de Gruyter, 2014. ISBN 978-3-11-030781-8.
- [73] MARTIN I., D. WENDT a M. HEBERER. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 2004, **22**(2), 80–86. DOI:

- 10.1016/j.tibtech.2003.12.001. ISSN 01677799.
- [74] JUNKER B.H. a H.Y. WANG. Bioprocess monitoring and computer control: Key roots of the current PAT initiative. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, **95**(2), 226–261. DOI: 10.1002/bit.21087. ISSN 0006-3592.
- [75] SHULER M. a F. KARGI. *Bioprocess engineering: basic concepts*. 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2002. ISBN 01-308-1908-5.
- [76] BALTZ R.H., J. DAVIES a A. DEMAIN. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. ISBN 978-1-55581-512-7.
- [77] PATTISON R., J. SWAMY, B. MENDENHALL a B. HWANG. Measurement and Control of Dissolved Carbon Dioxide in Mammalian Cell Culture Processes Using an in Situ Fiber Optic Chemical Sensor. *Biotechnology Progress*. 2000, **16**(5), 769–774. DOI: 10.1021/bp000089.
- [78] ANNESINI M., L. MARRELLI, V. PIEMONTE a L. TURCHETTI. *Artificial organ engineering*. London: Springer, 2017. ISBN 978-1-4471-6442-5.
- [79] CHEN H. C. a Y. C. HU. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology Letters*. 2006, **28**(18), 1415–1423. DOI: 10.1007/s10529-006-9111-x. ISSN 0141-5492.
- [80] AHMED S., V. M. CHAUHAN, A. M. GHAEMMAGHAMI a J. W. AYLOTT. New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. *Biotechnology Letters*. 2019, **41**(1), 1–25. DOI: 10.1007/s10529-018-2611-7. ISSN 0141-5492.
- [81] NIH/3T3: ATCC® CRL-1658™. In: *ATCC*. Manassas: ATCC, 2016 [cit. 2019-03-04].
- [82] NIAČEJVSKÝ D. *Porézní keramické struktury PIM technologií*. UTB Fakulta Technologická, Zlín, 2018. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [83] KAŠPÁRKOVÁ V., P. HUMPOLÍČEK, J. STEJSKAL, Z. CAPÁKOVÁ, P. BOBER, K. SKOPALOVÁ a M. LEHOCKÝ. Exploring the Critical Factors Limiting Polyaniline Biocompatibility. *Polymers*. 2019, **11**(2), 362. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym11020362>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AH	Anilín hydrochlorid
ALG.S.	Alginát sodný
APS	Peroxodisíran amonný (Ammonium persulfate)
ECM	Extracelulární matrix
HA	Kyselina hyaluronová
HAp	Hydroxyapatit
CHIT	Chitosan
PANI	Polyanilin
PCL	Poly(ϵ -kaprolacton)
PLGA	Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
SH	Hyaluronát sodný
TG	Termoplastická želatina
PIM	Powder Injection Molding (práškové vstřikování)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Niche kmenových buněk (Stem cell niche), převzato z [8].....	12
Obr. 2 Ilustrace funkce a práce se scaffoldem, upraveno z [3].....	13
Obr. 3 Přechod z neaktivního integrinu na aktivní formu vyžaduje oddělení integrinových „nohou“. Vazba Talinu na podjednotku β -integrinu podporuje konformaci otevřeného (aktivního) integrinu s vysokou afinitou pro extracelulární ligandy. Kdežto vazba SHARPIN na podjednotku α -integrinu udržuje integrin v neaktivním stavu, upraveno z [26].....	16
Obr. 4 Průřez polymerním (PLGA) scaffoldem získaným pomocí technologie odlévání s využitím procesu solné fúze, převzato z [32]	18
Obr. 5 SEM fotografie polyurethanového scaffoldu připraveného odléváním rozpouštědla s vyluhováním částic s distribucí porogenu pomocí centrifugace, převzato z [33].....	18
Obr. 6 SEM fotografie PCL/TG napěněné směsi, (a) před odstraněním TG, (c,e) po odstranění TG, upraveno z [34].....	19
Obr. 7 FEMSEM fotografie kompozitu Ti/HAp sintrovaného při 1300 °C po dobu 5 h, upraveno z [45].....	22
Obr. 8 Biomateriály používané pro tvorbu scaffoldů, upraveno z [39].....	23
Obr. 9 Chemická struktura hyaluronanu, upraveno z [16]	27
Obr. 10 Chemická struktura opakujících se jednotek alginátu: (A) L-glukuronová kyselina (G); (B) D-manuronová kyselina (M); (C) alternující L-glukuronová kyselina a D-manuronová kyselina (GM), převzato z [53].....	28
Obr. 11 Schématické síťování alginátu v přítomnosti Ca^{2+} , převzato z [53].....	28
Obr. 12 Struktura chininu a chitosanu, převzato z [55].....	29
Obr. 13 Schematické znázornění běžných fyzikálně-chemických povrchových modifikací biomateriálů, upraveno z [62].....	34
Obr. 14 Schematické znázornění běžných povlakových technologií pro povrchové úpravy, upraveno z [62].....	35
Obr. 15 Buněčné kultivační systémy používané v tkáňovém inženýrství, převzato z [70].....	37
Obr. 16 Buněčná linie NIH/3T3, převzato z [81]	44
Obr. 17 Plnění komor bioreaktoru médiem	50
Obr. 18 Sestavený rotační bioreaktor umístěný v inkubátoru	50

Obr. 19 Graf relativní buněčné viability v závislosti na koncentraci extraktu PIM keramiky s velikostí pórů v rozmezí 125–250 μm s 20 %, 30 %, 40 % nebo 50 % KCl.....	51
Obr. 20 Graf relativní buněčné viability v závislosti na koncentraci extraktu PIM keramiky s velikostí pórů 250 μm a větší s 20 %, 30 %, 40 % nebo 50 % KCl.....	52
Obr. 21 Reference NIH/3T3 na tkáňovém plastiku, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna	53
Obr. 22 Obr. 23 NIH/3T3 na PANI filmu, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna	54
Obr. 24 NIH/3T3 na PANI filmu stabilizovaném SH, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna	54
Obr. 25 NIH/3T3 na PANI filmu stabilizovaném CHIT, (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna	55
Obr. 26 NIH/3T3 na PANI filmu stabilizovaném ALG.S., (A) buněčná jaderná DNA (modrá barva) a aktinová vlákna (červená barva), (B) aktinová vlákna	55
Obr. 27 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem (PANI).....	57
Obr. 28 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem stabilizovaným pomocí hyaluronátu sodného (PANI+SH).....	57
Obr. 29 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem stabilizovaným pomocí chitosanu (PANI+CHIT).....	58
Obr. 30 Modifikovaný povrch keramického scaffoldu polyanilinovým filmem stabilizovaným pomocí alginátu sodného (PANI+ALG.S.).....	58
Obr. 31 Testování cytotoxicity pomocí přímého kontaktu vzorku s buňkami, (A) povrch modifikovaný PANI filmem, (B) PANI SH, (C) PANI CHIT, (D) PANI ALG. S.....	59
Obr. 32 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem bez stabilizátorů (PANI) s obarvenou jadernou DNA buněk	60
Obr. 33 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem stabilizovaným hyaluronátem sodným (PANI+SH) s obarvenou jadernou DNA buněk	61
Obr. 34 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem stabilizovaným chitosanem (PANI+CHIT) s obarvenou jadernou DNA buněk.....	61
Obr. 35 PIM keramika potažená polyanilinovým filmem stabilizovaným alginátem sodným (PANI+ALG.S.) s obarvenou jadernou DNA buněk.....	62

- Obr. 36 Mikrofotografie povrchu keramického scaffoldu, vyrobeného technologií PIM, s velikostí pórů větší než 250 μm a s 30 obj. % KCl (space holder), osazeného buňkami s obarvenou jadernou DNA (na obr. světlé tečky) 63
- Obr. 37 Mikrofotografie povrchu keramického scaffoldu, vyrobeného technologií PIM, s velikostí pórů v rozmezí od 125 μm do 250 μm a s 30 obj. % KCl (space holder), osazeného buňkami s obarvenou jadernou DNA (na obr. světlé tečky)..... 63
- Obr. 38 PIM keramika bez povrchových úprav s velikostí pórů 250 μm a více, osazena NIH/3T3 s obarvenou jadernou DNA, statická kultivace po dobu 14 dní..... 64
- Obr. 39 PIM keramika bez povrchových úprav s velikostí pórů 250 μm a více, osazena NIH/3T3 s obarvenou jadernou DNA, dynamická kultivace v bioreaktoru po dobu 14 dní 64
- Obr. 40 PIM keramika bez povrchových úprav s velikostí pórů 250 μm a více, osazena NIH/3T3 s obarvenou jadernou DNA, dynamická kultivace v bioreaktoru po dobu 14 dní 65

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Vlastnosti vybraných syntetických polymerních biomateriálů používaných v tkáňovém inženýrství, upraveno z [16]	31
Tab. 2 Příklad aplikací kovových scaffoldů, upraveno z [39]	32
Tab. 3 Objemové složení směsi, převzato z [82]	44