

# Scaffoldy pro tkáňové inženýrství

Bc. Kristýna Valášková

---

Diplomová práce  
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Kristýna Valášková  
Osobní číslo: T19861  
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika  
Studijní obor: Biomateriály a kosmetika  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Scaffolds pro tkáňové inženýrství

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, kterého cílem je obnova, či zlepšení vlastností tkání. Toho bývá docíleno pomocí vytvoření tkáňového nosiče, tzv. scaffoldu.

1. Věnujte se problematice tkáňového inženýrství a popisu vhodných vlastností scaffoldů.

#### II. Praktická část

1. Připravte scaffoldy ve formě cryogelů na bázi polymerů. Charakterizujte je jak pomocí materiálových technik, tak z hlediska jejich biologických vlastností.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] MIGLIARESI, C., MOTTA, A. (Eds.). (2014). Scaffolds for tissue engineering: Biological design, materials, and fabrication. CRC Press.
- [2] IKADA, Y. (2011). Tissue engineering: fundamentals and applications. Elsevier.
- [3] KHANG, G. (Ed.). (2017). Handbook of intelligent scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. CRC Press.
- [4] FRESHNEY, R. I. (2015). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2021

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

**Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který aplikuje principy inženýrství a biologických věd na vývoj biologických náhražek, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci tkáně či celého orgánu. Tato specializace se vyvinula z oblasti vývoje biomateriálů a týká se kombinování tkáňových nosičů, buněk a biologicky aktivních molekul do funkčních tkání.

Polymerní scaffoldy mají mnoho různých funkcí v oblasti tkáňového inženýrství. Používají se jako trojrozměrné struktury představující podněty pro organizaci buněk a směrování tvorby požadované tkáně. Scaffoldy jsou navrženy tak, aby ovlivňovaly fyzikální, chemické a biologické prostředí obklopující buněčnou populaci. Bez ohledu na typ tkáně je při navrhování nebo určování vhodnosti scaffoldu pro použití v tkáňovém inženýrství důležitá řada klíčových vlastností: biokompatibilita, biodegradabilita, mechanické a chemické vlastnosti a také samotná struktura scaffoldu.

V této diplomové práci se zaměřujeme na práci s vodivými polymery a návrh vodivých polymerních biomateriálů ve formě kryogelů a jejich následné testování pomocí tkáňových kultur a charakterizaci za účasti materiálových technik. Kryogely jsou lákavým typem scaffoldů, díky své strukturní podobnosti s extracelulární matrix mnoha tkání, mohou být často zpracovány za relativně mírných podmínek a nejsou dodávány invazivním způsobem. Proto jsou kryogely použity jako technické tkáňové náhrady a v řadě dalších aplikací.

**Klíčová slova:** scaffold, kryogely, biokompatibilita, tkáňové inženýrství, vodivé polymery

## **ABSTRACT**

Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ. This specialization evolved from the field of biomaterials development and refers to combining scaffolds, cells, and biologically active molecules into functional tissues.

Polymer scaffolds have many different functions in the field of tissue engineering. They are applied as three-dimensional structures that organize cells and present stimuli to direct the formation of a desired tissue. Tissue engineering scaffolds are designed to affect the physical, chemical and biological environment surrounding the cell population. Regardless of the tissue type, a number of key considerations are important when designing or determining the suitability of a scaffold for use in tissue engineering: biocompatibility, biodegradability, mechanical and chemical properties and also scaffold architecture.

In this diploma thesis we focus on work with conductive polymers and design of conductive polymeric biomaterials in the form of cryogels and their subsequent testing, characterization using tissue cultures and material techniques. Cryogels are an appealing scaffold material because they are structurally similar to the extracellular matrix of many tissues, can often be processed under relatively mild conditions, and may be delivered in a minimally invasive manner. Consequently, cryogels have been utilized as scaffold materials for engineering tissue replacements, and a variety of other applications.

**Keywords:** scaffolds, cryogels, biocompatibility, tissue engineering, conductive polymers

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Zdeně Capákové, Ph. D. z Centra polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za odborné vedení při psaní této diplomové práce, za připomínky, věnovaný čas a přátelský přístup. Poděkování patří také Ing. Martině Kašparové v rámci pomoci během práce v laboratoři a Centru polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za možnost využití jejich laboratoří. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

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

## OBSAH

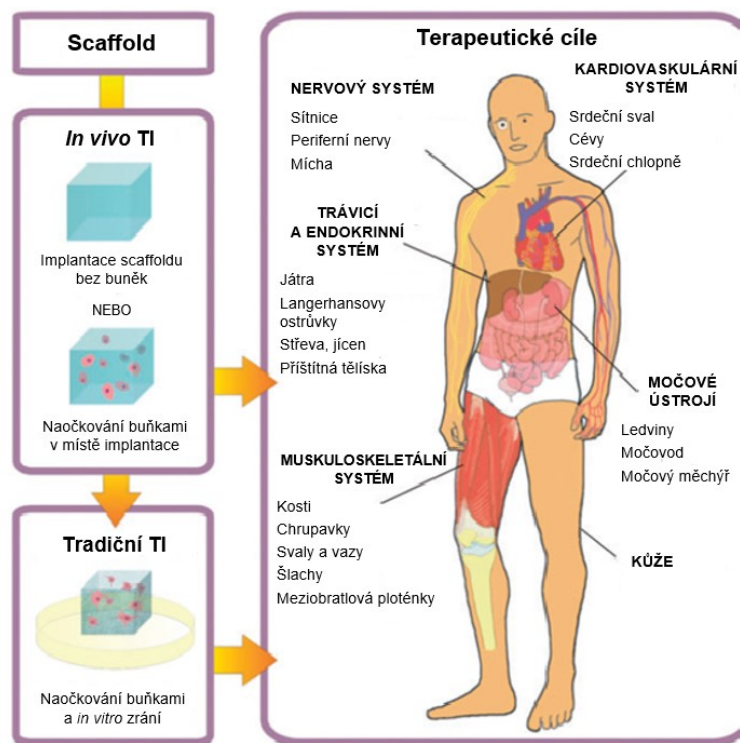
|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>1.1 HISTORIE</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>1.2 PODSTATA TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ</b> .....  | <b>15</b> |
| 1.2.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ .....                                    | 17        |
| 1.2.2 ZDROJE BUNĚK PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ .....                                       | 19        |
| 1.2.2.1 Kmenové buňky .....  | 20        |
| 1.2.3 PROLIFERACE, DIFERENCIACE BUNĚK A JEJICH VYUŽITÍ V TKÁŇOVÉM<br>INŽENÝRSTVÍ ..... | 22        |
| <b>2 SCAFFOLDY A JEJICH VLASTNOSTI</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>2.1 POŽADOVANÉ VLASTNOSTI SCAFFOLDU</b> .....                                       | <b>25</b> |
| 2.1.1 BIODROPATIBILITA .....   | 26        |
| 2.1.2 BIODEGRADABILITA .....   | 29        |
| 2.1.3 MECHANICKÉ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI .....   | 29        |
| 2.1.4 TROJROZMĚRNÁ PORÉZNÍ STRUKTURA .....   | 30        |
| 2.1.5 INTERAKCE BUŇKA – POVRCH SCAFFOLDU .....   | 31        |
| 2.1.6 STERILIZACE A VÝROBA .....   | 34        |
| <b>2.2 BIOMATERIÁLY</b> .....  | <b>35</b> |
| 2.2.1 PŘÍRODNÍ POLYMERY .....  | 37        |
| 2.2.2 SYNTETICKÉ POLYMERY .....  | 38        |
| 2.2.3 BIODKERAMIKA .....   | 40        |
| 2.2.4 KOMPOZITY .....  | 40        |
| <b>3 VODIVÉ POLYMERY</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>3.1 POTENCIÁLNÍ VODIVÉ POLYMERY PRO TKÁŇOVÉ<br/>    INŽENÝRSTVÍ</b> .....           | <b>44</b> |
| 3.1.1 POLYANILIN (PANI).....   | 46        |
| 3.1.2 POLYPYRROL (PPY) .....   | 48        |
| 3.1.3 POLYTHIOFEN (PTH) A DERIVÁTY .....   | 49        |
| <b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>4.2 POUŽITÉ SOUPRAVY, CHEMIKÁLIE A ROZTOKY</b> .....                                | <b>54</b> |
| <b>4.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ</b> .....                                 | <b>55</b> |
| <b>4.4 KRYOGELY</b> .....  | <b>56</b> |
| 4.4.1 SYNTÉZA KRYOGELŮ .....   | 57        |



|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.4.2      | PŘÍPRAVA PANi/PVA KRYOGELŮ.....  | 58         |
| <b>4.5</b> | <b>POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY .....</b>                    | <b>60</b>  |
| 4.5.1      | BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ – CYTOTOXICITA .....                                      | 60         |
| 4.5.2      | MTT TEST .....   | 62         |
| 4.5.3      | TEST PROLIFERACE BUNĚK NA KRYOGELECH .....                                     | 63         |
| <b>5</b>   | <b>VÝSLEDKY.....</b>   | <b>65</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>PANI/PVA KRYOGELY.....</b>  | <b>65</b>  |
| <b>5.2</b> | <b>BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY .....</b>                                 | <b>67</b>  |
| <b>5.3</b> | <b>TEST PROLIFERACE BUNĚK NA VYBRANÝCH VZORCÍCH<br/>PANI/PVA KRYOGELŮ.....</b> | <b>71</b>  |
| <b>6</b>   | <b>DISKUZE.....</b>  | <b>75</b>  |
|            | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>80</b>  |
|            | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>  | <b>82</b>  |
|            | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>                                | <b>98</b>  |
|            | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>  | <b>99</b>  |
|            | <b>SEZNAM TABULEK.....</b>   | <b>101</b> |

## ÚVOD

Tkáňové inženýrství (TI) je rychle se rozvíjející interdisciplinární obor zahrnující vědu o biomateriálech, biologii buněk, interakci buněk a materiálů, charakterizaci materiálu. TI si klade za cíl především generovat náhradní biologické tkáně a případně orgány pro širokou škálu zdravotních stavů zahrnujících především ztrátu či dysfunkci tkáně. Klinický rozsah TI je velký včetně terapeutického potenciálu u mnoha chorob stárnutí a životního stylu převládajícího v západních populacích. TI obvykle zahrnuje implantaci buněk do jisté formy podpůrného strukturálního scaffoldu a tím umožnění buňkám přetvořit scaffold do přirozené tkáně, než je implantován do těla pacienta. V některých případech lze scaffold umístit přímo do těla příjemce, přičemž jako bioreaktor využívá část vlastního těla hostitele (Obrázek č. 1). Bez ohledu na zvolený přístup je pro úspěch implantátu rozhodující samotný scaffold a v mnoha případech aktivně řídí chování buněk (Place *et al.* 2008).



Obrázek č. 1: Tkáňové inženýrství (upraveno podle Place *et al.* 2008)

Současné strategie TI jsou zaměřeny na obnovu patologicky změněných tkání pomocí transplantace buněk v kombinaci s podpůrnými scaffoldy a biomolekulami. Navrhování scaffoldů s optimálními charakteristikami je jedním z klíčových faktorů úspěšného tkáňového inženýrství. Pro jejich aplikaci se spojují různé technologie, aby se vytvořily porézní scaffoldy, s vhodnými mechanickými vlastnostmi napodobující přirozené tkáně, pro

regeneraci tkání/orgánů a také pro řízené a cílené uvolňování bioaktivních látek. V poslední době se kryogely díky svému jedinečnému složení a strukturním podobnostem s přirozenou extracelulární matrix buněk stávají předními kandidáty pro scaffoldy v oblasti tkáňového inženýrství. Jejich vlastnosti struktury – pórovitost, morfologie povrchu, mechanické vlastnosti a řízená velikost kryogelových scaffoldů umožnily nové příležitosti k překonání různých výzev v tkáňovém inženýrství, jako je očkování buněk, buněčná proliferace, vaskularizace, tvorba tkáně. Samotná struktura kryogelů, vytvořených kryogelačními technikami, usnadňuje nejen infiltraci buněk, ale také difúzi živin, kyslíku a metabolických produktů. (Dhandayuthapani *et al.* 2011, El-Sherbiny a Yacoub 2013).

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství (TI) je interdisciplinární oblast výzkumu, která aplikuje principy materiálových a biologických věd na vývoj biologických náhrad. Tyto náhrady, společně v kombinaci s využitím buněk, technických materiálů a vhodných biochemických faktorů, slouží k obnově, udržení nebo zlepšení tkáňových funkcí (Langer a Vacanti 1993).

Tkáně či orgány mohou být poškozeny různými způsoby, jedná se především o následek vážných zranění, vrozených chorob nebo rakoviny. Možnosti léčby zahrnují chirurgický zákrok, vytvoření protézy, transplantaci a lékovou terapii. Plná obnova poškozených tkání však může být obtížná a výsledné tkáně nejsou vždy funkčně nebo esteticky uspokojivé. Taktéž vzniklé poškození tkání může být nevratné a vede k celoživotním problémům pro pacienta. V takových případech může právě transplantace orgánů zachránit život, nicméně tato varianta je však značně omezena nedostatkem dárcovské tkáně (Aker 2016).

TI umožňuje regeneraci vlastních tkání pacienta, tj. obnovu, udržování nebo zlepšení, a tak poskytuje jistý potenciál pro snížení potřeby transplantací dárcovských orgánů. Rovněž snižuje problémy, kterým čelí tradiční transplantace dárcovských orgánů, zahrnující špatnou biokompatibilitu a biofunkčnost nebo odmítnutí imunitním systémem (Griffith a Naughton 2002).

Výzkumy TI jsou zaměřeny na vývoj vylepšených a dokonalejších tkáňových nosičů v rámci regenerativní medicíny a staly se tak důležitou terapeutickou strategií pro současnou i budoucí medicínu. V několika posledních letech se výzkumná součást tkáňového inženýrství změnila z vývoje materiálu tkáňových nosičů, jež působí jako neutrální podpora pro adhezi a růst buněk, k tomu, aby sloužily jako složitější a dynamičtější prostředí pro umělý vývoj tkání. V tomto případě můžeme TI formulovat jako „aplikaci principů a metod regenerativní medicíny a věd k základnímu porozumění vztahů strukturních funkcí v normálních i patologických savčích tkáních a vývoji biologických náhrad za účelem obnovy, udržování nebo zlepšování funkcí“ (Nerem 1991). V současné době je také trendem aplikace tkáňového inženýrství dodávka růstových faktorů, buněk, proteinů, peptidů či enzymů v přírodním polymeru nebo syntetickém scaffoldu jako terapeutická strategie (Singh *et. al.* 2016).

## 1.1 Historie

Přestože je TI dodnes se rozvíjející obor, myšlenka nahrazení tkáně za jinou se datuje až do 16. století., kdy Gasparo Tagliacozzi, profesor chirurgie a anatomie na univerzitě v Bologni, popsal náhradu nosu, kterou vytvořil z chlopně předloktí ve své práci „*De Custorum Chirurgia per Insitionem*“ (Chirurgie defektů implantací), která byla publikována v roce 1597 (O'Brien 2011). V 70. letech proběhla řada experimentů, například tvorba chrupavky pomocí chondrocytů naočkovaných na fragmenty kosti a implantovaných do myši. Tyto experimenty vedly k závěru, že s příchodem inovativních biokompatibilních materiálů by bylo možné vygenerovat novou tkáň nasazením životaschopných buněk na vhodně nakonfigurované tkáňové nosiče (Lanza, Langer a Vacanti 2014). I přes předchozí vědeckou činnost byl termín „tkáňové inženýrství“ oficiálně vytvořen na semináři Národní vědecké nadace až v roce 1988. Tento nový vědecký obor byl vytvořen jako záměr k uplatnění principů a metod inženýrství a biologických věd ve vztahu k základnímu pochopení vztahů mezi strukturou a funkcí v normálních a patologických tkáních savců a rozvoji biologické náhražky pro obnovení, udržení nebo zlepšení tkáňové funkce (Akter 2016). Ačkoli existovalo od 80. let několik studií, kde byly poprvé použity koncepty tkáňového inženýrství, formální popsání této disciplíny je publikováno v práci Langer *et al.* 1993 (Griffith *et al.* 2002). Od té doby počet studií na téma tkáňového inženýrství rychle rostl. Kořeny tkáňového inženýrství, jakožto moderní vědecké disciplíny, věnované výrobě nové tkáně pomocí principů inženýrství v kombinaci s aplikací biologických věd, jsou hluboce usazeny ve článku *Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering. Surgical Technology International* publikovaném v roce 1991 (Vacanti 2006). Největší zájem veřejnosti však způsobila studie z roku 1997 v plastické a rekonstrukční chirurgii od Cao *et al.* V tomto článku je ukázáno, jak úspěšně regenerovat chrupavkovou část ucha tříletého dítěte na zádech laboratorní myši. Tato práce taktéž popsala provedení klasického experimentu tkáňového inženýrství (Blitterswijk a De Boer 2015).

V duchu prozkoumat a definovat potenciál této nové oblasti, byla ve Spojených státech amerických, ale i v Evropě založena řada laboratoří. Mezi první významné snahy patřil například vývoj Pittsburského tkáňové inženýrské iniciativy (PTEI) na začátku 90. let, úsilí o vývoj tkáňového inženýrství na Imperial College organizované britskou společností, jenž založila volnou asociaci Tissue Engineering Society (TES) roku 1994. Toto období poté vyvrcholilo vytvořením TES v Německu, a nakonec v západní Evropě. Společnost byla mezinárodní a během následujícího desetiletí, ve spolupráci s asijskými a evropskými

společnostmi, se TES vyvinula, reorganizovala a do roku 2005 pozměnila název na Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), tj. mezinárodní společností pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu. Společně se založením TES úzce souviselo mít účinný prostředek k výměně vědeckých informací a svobodnému vyjadřování nových myšlenek, proto ve stejný čas vznikl časopis Tissue Engineering, jehož redakční rada byla složena z řady mezinárodně působících lékařů a vědců (Vacanti 2006).

## 1.2 Podstata tkáňového inženýrství

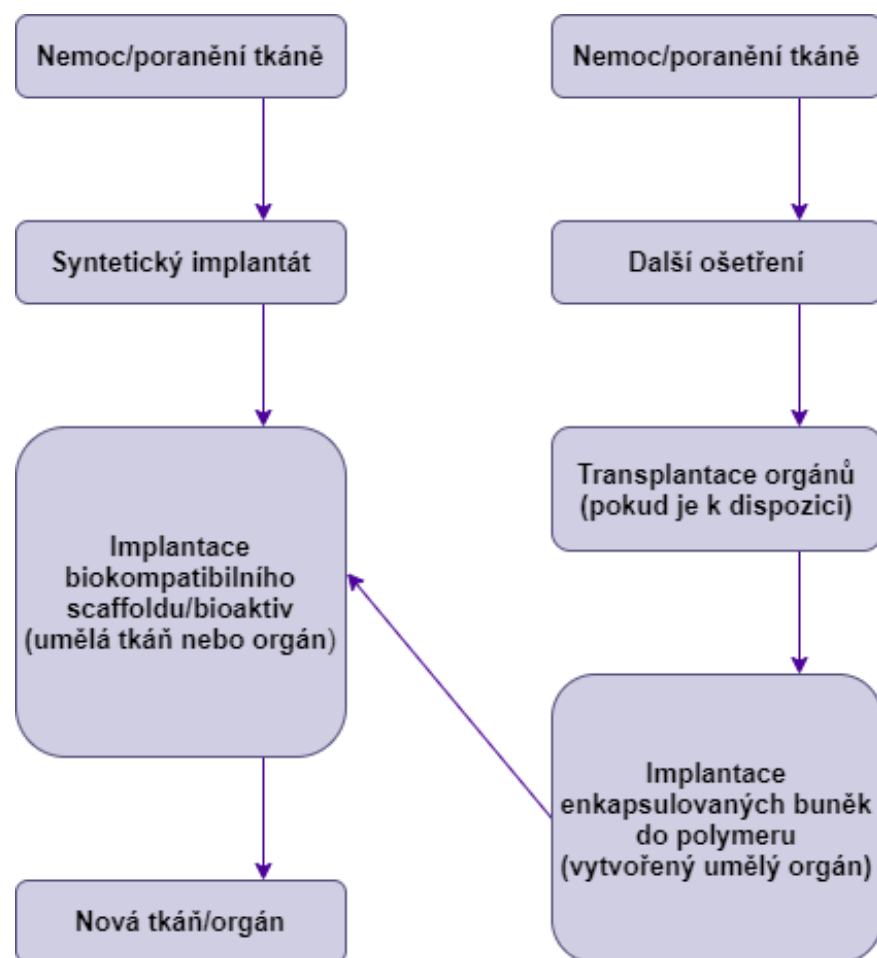
Samotný obor tkáňového inženýrství úzce souvisí s regenerativní medicínou. Regenerativní medicína se, tak jako TI, snaží vyvíjet metody k opětovnému růstu, opravě, nahrazení poškozených nebo nemocných buněk, orgánů či tkání. Tato oblast medicíny však kombinuje TI s dalšími metodami, jako je buněčná či genová terapie. Buněčná terapie využívá buněčný materiál, tedy neporušené živé buňky, k injekci, naočkování a implantování pacientovi do tkání, k obnovení jejich integrity a funkce. TI zahrnuje tři hlavní přístupy a to: použití bioaktivních molekul, jako jsou růstové faktory, které podporují tkáňovou indukci; použití buněk, které reagují na různé signály; a naočkování buněk do trojrozměrných matic – scaffoldů k vytvoření tkáňových konstrukcí, které nahradí ztracené části tkání nebo orgánů (Howard *et al.* 2008). Jejím hlavním cílem je navrhnout inovativní způsoby, jak udržovat tělesné tkáně a orgány řádně funkční a pomoci k dosažení regenerace tkáně pro obnovení normální funkce. Taktéž nabízí alternativu vytvářením struktur napodobujících normální tkáň a přispívá k faktorům, které mohou ovlivnit vývoj buněk a hledat nové diagnostické technologie (Larroche *et al.* 2017).

TI prokázalo výsledky pro regeneraci a nahrazení různých tkání a orgánů, včetně kůže, srdce, ledvin a jater, dokonce i potenciál napravit některé vrozené vady (Dzobo *et al.* 2018). Pro úspěšné nahrazení a zregenerování tkáně je nutné použít vhodný materiál, většinou v kombinaci tkáňových nosičů, tj. scaffold, růstových faktorů a vhodných buněk. Další možností je také schopnost stimulovat regeneraci originální tkáně (Mistry *et al.* 2017). V závislosti na věku pacienta mohou některé strategie tkáňového inženýrství využít a urychlit vlastní přirozený proces hojení těla. Cílem těchto strategií je změnit tkáňové prostředí zavedením exogenního materiálu a biologických faktorů s jediným cílem urychlit a zlepšit proces hojení těla (Mao *et al.* 2015).

Materiály a biomimetika pro tvorbu tkáňových nosičů se používají již několik let a poskytují více než jen podporu jako fyzická struktura. Mohou stimulovat regeneraci samy o sobě, ale

mohou být také použity k distribuci biomolekul, jako jsou růstové faktory, které podporují růst buněk. Biomimetika zahrnuje principy inženýrství, chemie a biologie, aplikované na syntézu materiálů, syntetických systémů nebo strojů, které mají funkce napodobující biologické procesy, což se často využívá právě v oboru tkáňového inženýrství nebo distribuci léčiv v lidském těle. Biomateriál nebo scaffold, který byl původně považován pouze jako nezbytný pro fyzickou podporu buněk, může v dnešní době zahrnovat biologické náhražky nebo biologické signály, aby posílily nebo podpořily regeneraci a funkci tkáně (Dzobo *et al.* 2018).

V tkáňovém inženýrství mohou být použity různé strategie pro výrobu nové tkáně, jako jsou izolované buňky nebo buněčné náhražky, za účelem zajištění požadovaného účinku nebo látek indukujících tkáň umístěných do cílových oblastí či buněk na, popřípadě uvnitř scaffoldu, které mohou být zakořeněny a začleněny do těla (Obrázek č. 2) (Singh *et al.* 2016).



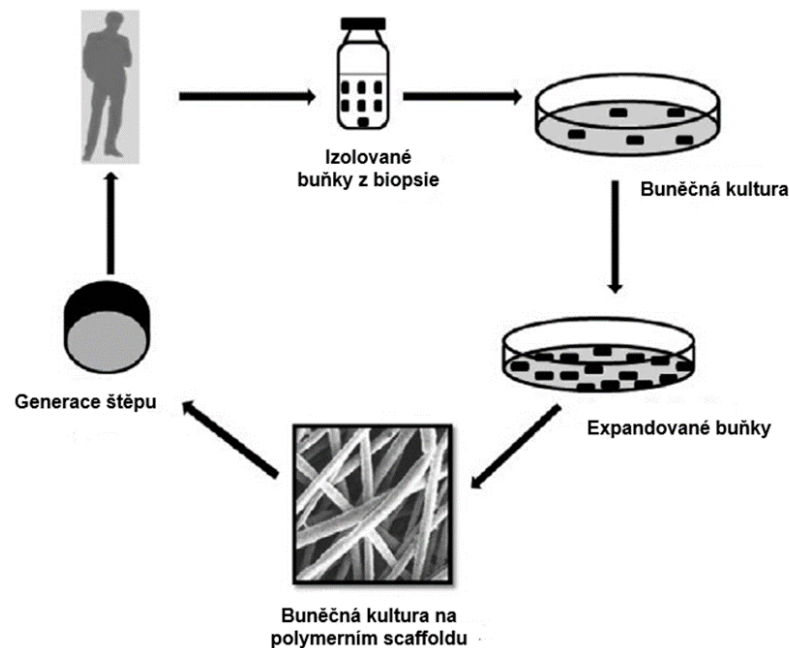
Obrázek č. 2: Vývoj tkáňového inženýrství pro opravu a regeneraci poškozené tkáně nebo orgánů (upraveno podle Singh *et al.* 2016)



### 1.2.1 Základní principy tkáňového inženýrství

Schopnost rekonstituovat tkáňovou funkci terapeutickými přípravky v klinicky významném měřítku má široké spektrum aplikací. Využívají se základní principy věd o živé přírodě a inženýrství pro vývoj biologických náhražek, kdy hlavními cíli jsou tkáně, které jsou náchylné k poškození, onemocnění a degeneraci (Berthiaume, Maguire a Yarmush 2011). Při vývoji strategie tkáňového inženýrství je nezbytné věnovat pozornost čtyřem důležitým složkám (Obrázek č. 3):

1. Buňky. Ty musí být schopny obnovit funkci tkáně. Jsou složkou pro výrobu matrice, ukládání a tvorbu tkáně.
2. Kultivační médium. Růstové prostředí, které by mělo obsahovat všechny nezbytné cytokiny a růstové faktory k podpoře diferenciaci buněk na žádoucí buňky, k proliferaci a růstu, a také k udržení životaschopnosti požadovaných buněk při provádění jejich dané aktivity v tomto druhu tkáně.
3. Porézní matrice – scaffold. Je nezbytné, aby porézní matrice napodobovala tkáňovou extracelulární matrix, ve které se mohou buňky infiltrovat pro regeneraci poškozené tkáně a poskytuje buňkám trojrozměrné místo k pobytu, proliferaci a produkci. Porézní matrice musí mít žádoucí fyzikální a chemické vlastnosti a být vyrobena z biologicky kompatibilních, vstřebatelných a rozložitelných materiálů.
4. Bioreaktor. Prostředí pro tvorbu tkáně, které doplňuje použití scaffoldů. Jedná se o zařízení využívající mechanické metody k ovlivňování biologických procesů. Scaffold je umístěn v bioreaktoru a po nasazení začnou buňky růst, produkovat a ukládat extracelulární matrix. Jsou zde umístěny i další složky, které by měly díky napodobení fyziologických podmínek nabízet ideální prostředí pro množení buněk a usnadnění výroby funkční 3D tkáně (Larroche *et al.* 2017; Liu a Cao 2019).



Obrázek č. 3: Základní principy tkáňového inženýrství  
(upraveno podle Mathew *et al.* 2016)

Základní princip tkáňového inženýrství znázorněný na obrázku lze popsat jako izolaci buněk ze zdroje (alogenního, xenogenního nebo autologního zdroje), expanze buněk v systému buněčné kultury nebo v bioreaktoru (expanze *in vitro*). Takto expandované buňky se poté naočkují na scaffold poskytující strukturální podporu spolu s přidáním správného média (bohatého na živiny a růstové faktory). Zde se buňky diferencují, proliferují a migrují na scaffold a nahrazují staré tkáně vytvářením nových tkání. Výsledkem toho je konstrukt tkáňového inženýrství, který je poté naroubován zpět do pacienta, aby fungoval jako zavedená náhradní tkáň (Mathew *et al.* 2016).

Jak již bylo zmíněno, buňky, prostředí pro růst buněk, tj. scaffold a příslušné růstové faktory jsou klíčové materiály pro TI. Buňka syntetizuje nové tkáně, zatímco scaffold poskytuje vhodné prostředí pro kultivaci buněk, aby mohly účinně plnit svou funkci. Účelem růstových faktorů je usnadnit a podporovat buňky k regeneraci nových tkání. Avšak i při řadě pokusů o regeneraci různých druhů tkání, je do samotného procesu znovuvytvoření stále zapojeno mnoho kritických faktorů, včetně zdroje buněk, konstrukce scaffoldů, výsevu buněk a samotné kultivace, mechanických vlastností konstrukce a vhodné zvířecí modely (Ikada 2006).

### 1.2.2 Zdroje buněk pro tkáňové inženýrství

Zdroj buněk má obrovský vliv na úspěch tkáňového inženýrství. Buňky používané v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství mohou na základě rozdílu dárců tkáně být klasifikovány jako autologní (pacient), alogenní (jiný jedinec) a xenogenní (živočišný původ) (Dzobo *et al.* 2018).

Autologní buňky jsou pro TI nejvhodnější, pokud jejich aktivita zůstává vysoká, zatímco alogenní a xenogenní buňky jsou imunogenní a budou vyžadovat imunosupresivní terapii, pokud se z těchto heterogenních buněk vytvoří nová tkáň. Problémem spojeným s autologními buňkami je obtížnost sběru dostatečného množství buněk, zejména pokud má pacient vyšší věk či byl vážně nemocný. Za předpokladu, že množství odebraných buněk není dostatečné pro klinické ošetření, buňky mohou být rozmnoženy pro získání dostatečného množství. Tento postup však vyžaduje čisté prostředí pro zpracování buněk k eliminaci kontaminace a je časově náročné. Navíc je možná virová infekce, která se může vyskytnout z fetálního telecího séra, které se nejčastěji používá jako doplněk pro kultivační médium.

Alogenní buňky jsou užitečné pro TI, protože alogenní umělá kožní tkáň slouží jako lepší krytí rány než nebiologický materiál, například kvůli sekreci silných růstových faktorů z umělé tkáně.

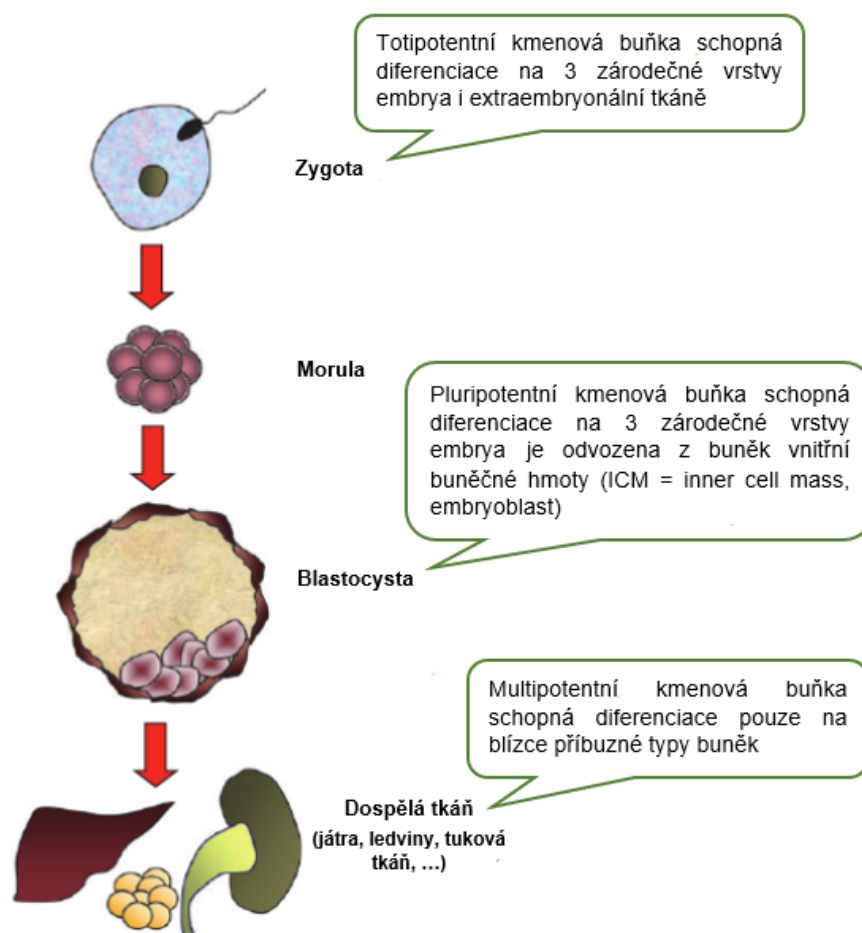
Xenogenní podpůrné buňky byly obvykle využívány k vytvoření epidermální tkáně z keratinocytů, vzhledem k jejich vysoké epidermální růstové aktivitě. Přesto mají tyto buňky také možnost rizika virové infekce (Ikada 2006).

Buňka je jedním z klíčových faktorů, který určuje, jaký typ tkáně bude nakonec vytvořen. V počátečním stádiu výzkumu tkáňového inženýrství byly buňky pro vyšetření obvykle odvozeny ze speciálního typu tkáně, který měl být nahrazen. Například osteoblasty pocházející z okostice byly použity k vytvoření štěpu kostní tkáně v modelu myši a chondrocyty byly použity k vytvoření tkáně chrupavky. Tyto dárcovské buňky se však vyskytují v omezeném množství (Liu a Cao 2019). S pozdějším objevem kmenových buněk, převážně embryonální kmenové buňky i dospělé kmenové buňky stávají zdrojem buněk pro TI. Právě schopnost kmenových buněk expandovat a diferencovat na požadované typy tkáně z nich dělá atraktivní zdroj buněk pro aplikaci v tkáňovém inženýrství bez nutnosti autologní expanze buněčné linie *in vitro* (Petite *et al.* 2002; Shokeir, Harraz a El-Din 2010).

### 1.2.2.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (SCs, anglického Stem Cells) mají, narozdíl od zralých diferencovaných buněk, schopnost proliferace, samoobnovení a potenciálu diferenciace do různých linií, a jsou proto považovány za jeden z optimálních zdrojů buněk pro TI (Goessler, Hormann a Riedel 2005). Kmenové buňky mohou být přímo injikovány do poškozeného místa, nebo kultivovány v kultivační lahvi a následně konjugovány se scaffoldem pro regeneraci rány. Další možností je jejich využití jako součást scaffoldu pro terapeutickým účely (Mathew *et al.* 2016). Podle zdroje lze SCs klasifikovat jako embryonální kmenové buňky (ESCs) nebo dospělé kmenové buňky (ASCs). Byla také vyvinuta důležitá technika pro přeměnu normálních buněk na SCs k vytvoření indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSCs) (Howard *et al.* 2005).

Určení a typ buněk SC lze charakterizovat podle vlastností totipotence, pluripotence a multipotence (Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Typy kmenových buněk (upraveno podle Shokeir, Harraz a El-Din 2010)

Totipotence je pojem vyjadřující schopnost jedné buňky vytvořit jakýkoli typ diferencované buňky v organismu, včetně extraembryonální tkáně. Každá totipotentní buňka obsahuje kompletní genetickou informaci pro celý organismus a má tuto jedinečnou schopnost diferenciaci. Pluripotence je schopnost diferenciaci do mnoha buněčných typů představující všechny tři zárodečné vrstvy, s výjimkou trofoblastu. Pluripotentní jsou rané buňky zárodku ve stadiu blastocysty, tzv. embryonální kmenové buňky. Uměle připravené buňky, které se jim do jisté míry vyrovnají, se označují jako indukované pluripotentní kmenové buňky. Speciálním případem pluripotence je multipotence. Je to schopnost kmenové buňky diferencovat do mnoha buněčných typů omezeně na určitý typ tkáně, případně na určitý orgán (Shokeir, Harraz a El-Din 2010).

Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní buňky, které mají vysokou proliferativní kapacitu a mohou být expandovány během více procesů pasáže ve srovnání s dospělými kmenovými buňkami bez dosažení stárnutí (Wu a Elisseeff 2014).

ESCs buňky jsou získány z oplodněných vajíček *in vitro*. Během vývoje embrya obratlovců je jedna fáze nazývána blastocysta, která obsahuje oblast zvanou vnitřní buněčná hmota (ICM). ICM je zdrojem ESCs, které jsou pluripotentní. ESCs buňka je schopna nepřetržitě se dělit bez diferenciaci po dlouhou dobu v kultuře a je známo, že je schopna vyvinout se na buňky a tkáně tří primárních zárodečných vrstev. ESCs se tedy mohou diferencovat na buňky ektodermu, endodermu nebo mezodermu. Vzhledem ke svému potenciálu prakticky se diferencovat na všechny typy lidských buněk je tedy embryonální kmenová buňka výhodným zdrojem zárodečných buněk pro TI (Liu a Cao 2019; Larroche *et al.* 2007). Používání embryonálních kmenových buněk ve výzkumu bylo předmětem kontroverze kvůli etickým obavám ohledně jejich získání. Tato zranitelnost vůči etickým a politickým tlakům bohužel brání výzkumu využívajícímu embryonální kmenové buňky (Wu a Elisseeff 2014).

Dospělé kmenové buňky (ASCs) jsou alternativou k použití ESC v tkáňovém inženýrství, protože jejich izolace nevyžaduje destrukci embrya. Podle definice jsou ASCs považovány za nediferencované buňky, které sídlí mezi diferencovanými buňkami v tkáni nebo orgánu. ASCs se mohou samy obnovit a jsou schopny rozlišit a vytvářet hlavní specializované typy tkání nebo orgánů. Jejich hlavní úlohou je udržovat stav tkání v případě zranění nebo poškození způsobeného nemocí a podporovat opravu tkání (Tuan, Boland a Tuli 2003). ASCs lze nalézt v mnoha tkáních, včetně mozku, kostní dřeně, periferní krve, krevních cév, kosterního svalu, kůže, zubů, srdce, střeva, jater, epitelu vaječnicků a varlat (Liu a Cao 2019).

Dospělé kmenové buňky lze rozdělit do několika skupin:

1. Hematopoetické kmenové buňky (HSCs), které mohou v těle tvořit všechny typy krevních buněk.
2. Mezenchymální kmenové buňky (MSCs), které jsou schopny diferenciaci na mnoho typů mezenchymálních buněk, např. osteoblasty, chondrocyty a adipocyty. Tyto diferencované buňky jsou schopny opravit nebo regenerovat tkáň kostí, chrupavek nebo tukové tkáně.
3. Tkáňové progenitorové buňky (MAPCs), rozlišující se podle buněčných typů tkání, ve kterých se nacházejí. (Rosenzweig 2003; Liu a Cao 2019).

ASCs mají důležité vlastnosti, díky nimž jsou vhodné pro regenerativní medicínu. Snadno se kultivují *in vitro* a mají vysokou míru proliferace. Hlavním rozdílem ASCs od ESCs je, že jsou multipotentní, a ne pluripotentní jako ESCs. To omezuje použití ASCs, protože diferenciaci těchto buněk je již vázána na specifické buněčné linie (Larroche *et al.* 2007).

V roce 2006 vědci zjistili, že je možné přimět dospělé somatické buňky k návratu zpět do embryonálního stavu genetickým přeprogramováním buněk tak, aby exprimovaly transkripční faktory Oct3/4, Sox 2 a Klf4 (Wu a Elisseeff 2014). Buňky exprimující tyto faktory vykazovaly klíčové charakteristiky pluripotence embryonálních kmenových buněk a prokázaly schopnost diferenciaci na buňky všech tří zárodečných vrstev. Tímto je možné získat tzv. indukované pluripotentní kmenové buňky. iPSCs mají molekulární charakter a morfologii, která se podobá ESCs, a tedy stejně jako u ESCs mohou být vedeny k diferenciaci na požadovaný typ buňky (Takahashi a Yamanaka 2006). Pomocí iPSCs, které tak mohou být použity jako buněčný zdroj, lze předejít etickým problémům souvisejícím se samotným použitím embryonálních kmenových buněk ve výzkumu (Wu a Elisseeff 2014).

### 1.2.3 Proliferace, diferenciaci buněk a jejich využití v tkáňovém inženýrství

Obecně lze účinnost buněčných kultur posuzovat na základě rychlého dosažení konfluency v kultivační nádobě, nebo přímo na scaffoldu. Možným omezením při použití technik regenerativní medicíny založených na kultivaci buněk při nahrazení orgánů je obtížnost růstu specifických typů buněk ve větším množství. Růst buněk, expanze *in vitro* a regenerační kapacita buněk může být složitá (Atala 2007).

Životní cyklus buňky v zásadě sestává z interfáze, která se liší v délce a závislosti na typu buňky a poté relativně konstantní fáze mitózy a cytokineze. Samotná proliferace není

regulována pouze na úrovni orgánů, ale také na tkáňové a buněčné úrovni. Každý typický druh tkáně poté vykazuje různé stupně proliferace.

Při sestavení umělé tkáně v podmínkách *in vitro* je nutné zohlednit přirozené regulační mechanismy pro kontrolu buněčné proliferace. Zvýšené proliferace lze dosáhnout přidáním fetálního séra nebo růstových faktorů do kultivačního média. Díky tomu dochází k rychlejšímu přesunu kultivovaných buněk z jedné mitózy do druhé, aniž by zůstaly v procesu interfáze. Za takových podmínek lze dnes množit většinu typů buněk používaných v tkáňovém inženýrství. Podmínky kultivace jsou udržovány během celého experimentu a buňky jsou nepřetržitě poháněny z jedné mitózy do druhé, aniž by zůstávaly v mezifázi. V takových experimentech je však opomíjeno, že buňky v intaktním orgánu mohou exprimovat pouze specifické funkce, zatímco jsou zastaveny v mezifázi. V závislosti na druhu a orgánu může do buněčného cyklu vstoupit řada diferencovaných typů buněk. To lze pozorovat při přípravě primárních kultur těchto buněk.

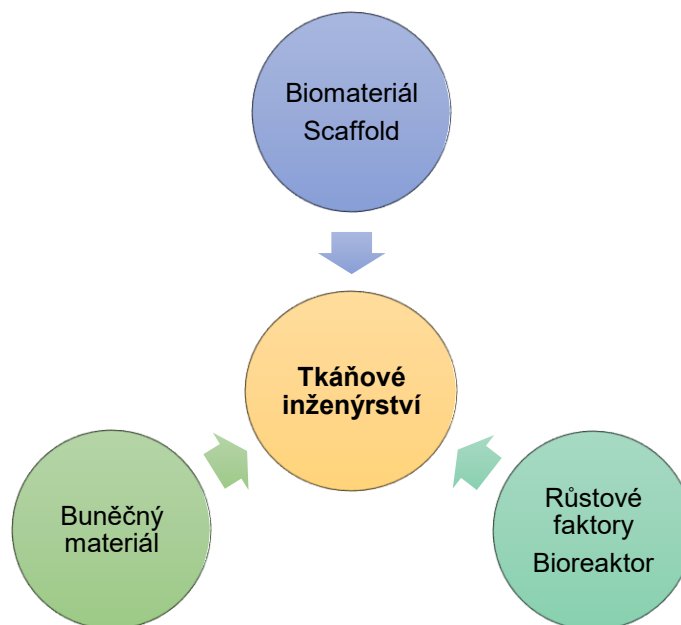
Mitóza a interfáze nejsou paralelní, ale postupné události v buňce. Dělicí se buňka tak může udržovat pouze minimální stupeň tkáňové specifické diferenciaci. Pro umělé generování diferencované tkáně musí po fázi mitózy dojít ke stimulaci, která následuje v přechod od proliferace k diferenciaci a fáze, ve které je diferenciaci udržována (Strehl *et al.* 2002; Minuth *et al.* 1999).

Zrání tkání *in vivo* a koneckonců *in vitro* je komplikovaný děj. Ústředním aspektem ve vývoji funkční tkáně je vzájemná interakce kontroly mitózy a nástupem terminální diferenciaci. Hlavní roli v tomto procesu hrají mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAP kinázy) a proteinové fosfatázy. Proliferaci lze regulovat extracelulární matrix, morfogenními faktory a fyziologickými parametry. Nejsou ale známy morfogenní vlivy iniciující diferenciaci zastavením mitózy či mechanismy řídící vývoj funkčních tkání (Whitmarsh a Davis 2000).

Klíčovou úlohu pro oblast účinného tkáňového inženýrství je prostředí, které umožňuje buňkám fungovat stejně jako v přirozené tkáni. Takové prostředí by mělo napodobovat prostředí *in vivo* mechanickými a chemickými vlastnostmi materiálu. Tkáňový nosič buněk (scaffold) obvykle slouží k následujícím účelům a to: k připojení buněk a jejich možné migrace; k uchování biochemických faktorů; jako porézní prostředí pro přiměřenou difúzi živin, exprimovaných produktů a odpadu a zabezpečuje mechanickou tuhost nebo flexibilitu (Bertiaume, Maguire a Yarmush 2011).

Takový tkáňový nosič tedy funguje jako templát pro tvorbu tkáně a je obvykle naočkován buňkami (příležitostně růstovými faktory), nebo je vystaven biofyzikálním podnětům ve formě bioreaktoru – zařízení nebo systém, který aplikuje různé typy mechanických nebo chemických podnětů na buňky. Tkáňový nosič naočkován buňkami je možné kultivovat *in vitro* pro syntézu tkání a jejich následnou implantaci na nebo přímo do poškozeného místa, kdy je indukována regenerace tkání nebo orgánů *in vivo* (O'Brien 2011).

Ve srovnání s původní biologickou tkání, která zahrnuje koordinaci mezi buňkami, extracelulární matrix a signalizačním systémem, potřebuje systém tkáňového inženýrství také lepší interakci mezi buňkami, scaffoldem a signálními molekulami. Takto vytvořená kombinace tkáňového nosiče, působícího jako templát pro tvorbu tkáně a umožnění migrace, přilnutí a produkce tkáně, implantovaných buněk a buněčných signálů, poskytovaných chemickými a růstovými faktory nebo fyzicky bioreaktorem, je často označována jako triáda tkáňového inženýrství (Obrázek č. 5) (O'Brien 2011; Mathew *et al.* 2016).



Obrázek č. 5: Triáda tkáňového inženýrství (upraveno podle O'Brien 2011)



## 2 SCAFFOLDY A JEJICH VLASTNOSTI

Mezi hlavní část pro triádu tkáňového inženýrství patří tkáňový nosič – scaffold, který poskytuje podporu, imobilizaci buněk v důsledku poréznosti materiálu, umožňuje také udržení a stabilizaci *in vivo*, což je nezbytné pro úspěšnou a účinnou regeneraci tkáně. Scaffoldy mohou sloužit jako samotné buněčné systémy nebo nosiče buněčných systémů a léků (Eltom, Zhong a Muhammad 2019; Zurina *et al.* 2020).

Úspěšná aplikace scaffoldu v tkáňovém inženýrství závisí na mnoha faktorech, mezi něž řadíme biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost nebo odolnost, mechanické a chemické vlastnosti, architekturu scaffoldu či proces výrobní technologie (Bružauskaitė *et al.* 2016). Vytvořené vlastnosti scaffoldu závisí na typu tkáně, jež je potřeba opravit. Jedná se především o rozdělení na tkáně tvrdé a měkké. Taktéž potřebné vlastnosti scaffoldu by měly být navrženy pro konkrétní aplikaci v závislosti na anatomickém umístění, věku pacienta, závažnost traumatu a dalších patologických stavů (Eltom *et al.* 2019).

Přípevnění a migrace buněk je základní součástí tvorby nebo regenerace tkáně a je ovlivňováno intracelulárními signály, vazby intercelulárního a extracelulárního charakteru pro skupiny membránových receptorů integrin – integrin regulující interakce ve formě buňka – buňka nebo buňka – extracelulární matrix (ECM). Lokální a částečná adheze buněk k různým povrchům scaffoldu je důležitá pro iniciaci různých signálů, které dále stimulují buněčnou proliferaci a diferenciaci (Bružauskaitė *et al.* 2016).

### 2.1 Požadované vlastnosti scaffoldu

Scaffold je nedílnou součástí tkáňového inženýrství. Ideální scaffold definujeme jako trojrozměrnou strukturu, poskytující počáteční podporu pro buňky a na jejímž povrchu i uvnitř struktury musí buňky přilnout, proliferovat, diferencovat a produkovat ECM (Agrawal a Ray 2001). Pro správné a pokročilé, sofistikované funkce musí scaffold aktivně interagovat s hostitelskými buňkami, přenášet signály užitečné pro jejich růst a výživu a také by se mělo jednat o systém s více než pouhou mechanickou podporou. Z tohoto důvodu musí tedy scaffold vykazovat velmi specifické vlastnosti související s vlastnostmi tkáně, která má být regenerována (Garg *et al.* 2012). Mezi důležité vlastnosti pro ideální materiál scaffoldu zahrnujeme biokompatibilitu, biodegradabilitu, mechanické vlastnosti a plasticitu materiálu, vhodnou porézní strukturu a také schopnost interakce s buněčným povrchem, aby mohl řádně vykonávat své funkce (Liu a Cao 2019). Vlastnost topografie a chemie povrchu scaffoldu – smáčivost, měkkost, tuhost, drsnost, mikrostruktura – pórovitost, velikost a tvar

pórů, propojení, měrná plocha povrchu a mechanické vlastnosti významně ovlivňují chování buněk v rámci adheze, růstu a diferenciaci a také ovlivňují biologické aktivity scaffoldu používaných pro *in vivo* regenerační aplikace tkání, jako jsou chrupavky, kůže a periferní nervy (Chan a Leong 2011).

### 2.1.1 Biokompatibilita

Scaffold je biokompatibilní, pokud může být implantován do lidského těla, aniž by vyvolal jakoukoli radikální změnu v intenzitě a trvání optimálního procesu hojení ran a zároveň nevyvolal žádnou jinou nežádoucí lokální nebo systémovou reakci v těle příjemce (Mikos *et al.* 1998).

Biokompatibilita je prvním kritériem jakéhokoli scaffoldu pro TI, kterou musí scaffold splňovat. Kromě obecných požadavků na biomateriál, jako je jeho netoxičnost, nekarcinogenní a nezápálivý charakter, musí samotný scaffold podporovat přilnutí buněk, jejich normální funkci a migraci na povrchu a následnou proliferaci a diferenciaci. Scaffold by tedy měl poskytovat podporu během *in vitro* kultivace a *in vivo* implantace.

Se samotnou biokompatibilitou může také souviset i bioaktivita scaffoldu, kdy scaffold může aktivně interagovat s buněčnými složkami nahrazované tkáně tak, aby usnadnily a regulovaly její činnost. Biomateriál může zahrnovat interakci biologických signálů, jako jsou buněčně adhezivní ligandy nebo fyzikální signály – topografie ovlivňující morfologii a zarovnání buněk (Liu a Cao 2019; O'Brien 2011; Chen, Ushida a Tateishi 2002). Tkáňový nosič lze také využít jako dodávací vehikulum nebo rezervoár pro signály exogenního původu stimulující růst, nebo pro urychlení regenerace. V tomto případě však musí být takový biomateriál kompatibilní s biomolekulami a přístupný technice enkapsulaci sloužící k řízenému uvolňování biomolekul se zachovanou biologickou aktivitou. Příkladem mohou být hydrogely, které jsou syntetizovány kovalentním nebo iontovým zesílením a mohou zachycovat proteiny, jež následně lze uvolňovat mechanismem řízeným bobtnáním hydrogelů. (Chan a Leong 2008; Berger *et al.* 2004).

Povaha scaffoldu, tj. jeho složení, povrchový náboj, drsnost, porozita a biodegradabilita, významně ovlivňuje možnou zánětlivou reakci, stejně jako rozsah incize provedené pro implantaci. S tím souvisí také velikost a tvar implantátu. Po implantaci nesmí také konstrukce scaffoldu vyvolat imunitní reakci a vznik zánětlivého procesu, což by mohlo poté způsobit snížení hojení nebo úplné odmítnutí nahrazované části hostitelským tělem. Také samotný materiál (polymer) nebo jeho vedlejší produkty rozkladu nesmí vyvolat toxicitu nebo zánětlivou reakci. Správné biologicky kompatibilní a rozložitelný scaffold umožní

výměnu tkáně, aniž by vyvolal jakoukoli tvorbu vláknitých kapsulí. Biologicky nekompatibilní scaffold je tedy toxický pro hostitelskou tkáň a může způsobit již zmíněné odmítnutí a smrt okolních tkání.

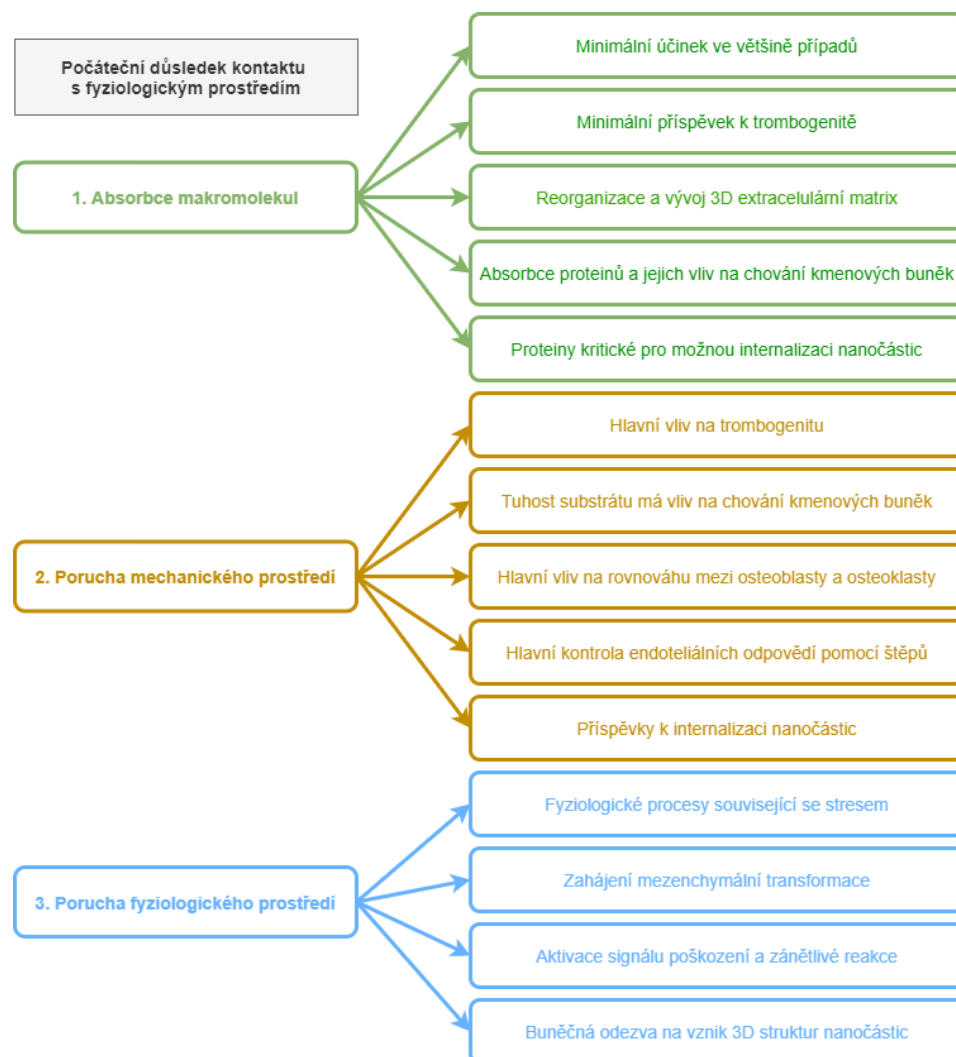
Testy biologické kompatibility, sloužící ke stanovení toxicity/netoxicity scaffoldu, jsou proto povinným předběžným krokem v procesu optimalizace scaffoldu. (O'Brien 2011; Chen, Ushida a Tateishi 2002; Gervaso, Sannino a Peretti 2014).

Samotný pojem biokompatibilita je široce používaný termín, kdy ho poprvé definoval v 80. letech David F. Williams jako „schopnost materiálu vykonat v rámci odpovídající reakce hostitele konkrétní aplikaci“. Nicméně je důležité, aby biokompatibilita byla posuzována z hlediska přesné situace, v níž je biomateriál použit. Schopnost materiálu biokompatibility je tedy spojena s daným typem materiálu a bude se lišit v závislosti na aplikaci. Dva důsledky tohoto tvrzení spočívají v tom, že biokompatibilita není vlastností materiálu, ale biomateriálního – hostitelského systému, a že neexistuje nic jako univerzální biokompatibilní materiál (Williams 2011). V rámci využití u většiny implantovatelných zařízení je třeba minimalizovat interakce mezi nimi a hostitelem a většina testů k určení biologické bezpečnosti produktů je založena na potřebě přiblížit se k chemické a biologické inertnosti. (Ratner 2011).

Biokompatibilita scaffoldu nebo jiné matrice pro tkáňového inženýrství se týká schopnosti fungovat jako jakýsi substrát, který bude podporovat vhodnou buněčnou aktivitu, včetně usnadnění molekulárních a mechanických signalizačních systémů, za účelem optimalizace regenerace tkáně, aniž by došlo k nežádoucím účinkům místní nebo systémové reakce v případném hostiteli (Williams 2008).

Avšak biomateriály používané pro tvorbu scaffoldu nejsou prvotně vnitřně kompatibilní s fyziologickými systémy, ani k tomu nebyly navrženy. Tkáň lidského těla se navíc nevyvíjejí tak, aby se neškodně přizpůsobily biomateriálu. Existuje inherentní nekompatibilita mezi těmito dvěma kompartmenty – biomateriálem a tkání. Nicméně lidské tělo má vynikající detekční mechanismy, které snadno identifikují cizí předměty. Tyto mechanismy se přirozeně vyvinuly, aby se vypořádaly s bakteriemi a viry, ale často jsou schopny odklonit se k jakémukoli syntetickému materiálu, který by mohl vniknout do těla a případnému biologickému stresu, který může při tomto procesu vzniknout. Zavedení biomateriálu do lidského těla obvykle představuje fyziologicky stresující událost a očekává se, že tělo bude mít určitou adaptivní reakci (Williams 2017). Proto možné paradigma biokompatibility vychází z informace, že biomateriál scaffoldu je pevný objekt – imobilní,

chemicky nereaktivní s fyziologickými složkami a časem se mění. V tomto modelu je tkáň obecná – různý rozsah a individuální charakteristika, tvorba buněk a jejich extracelulární matrice. Tkáň sama o sobě však, na rozdíl od většiny forem biomateriálu, poskytuje dynamické prostředí, ve kterém se buňky a jejich ECM v průběhu času mění. V těchto nejjednodušších podmínkách se biokompatibilita systému týká vlivu, který má fyzická přítomnost materiálu na dynamickou odezvu složek tkáně. Tento výchozí bod poskytuje poté prezentaci biomateriálu ve fyziologickém prostředí v různých formách nebo v různých situacích (Obrázek č. 6). Obecné paradigma biologické kompatibility může shrnovat soubor jevů, které tvoří pomyslný rámec biokompatibilních cest, začínající třemi počátečními důsledky kontaktu mezi biomateriálem a fyziologickým prostředím, následují možné příklady obecných účinků v každém z těchto tří počátečních reakcí biomateriál – fyziologické prostředí. Avšak existuje mnoho situací a seznam příkladů, kde se vyskytují interakce mezi různými mechanismy (Williams 2017).



Obrázek č. 6: Obecné paradigma biokompatibility (upraveno podle Williams 2017)

### 2.1.2 Biodegradabilita

Biodegradabilita neboli vhodná biologická rozložitelnost je schopnost scaffoldu po vytvoření tkáně degradovat. Cílem tkáňového inženýrství je umožnit vlastním buňkám těla nahradit implantovaný scaffold nebo jiný konstrukt. Proto scaffold a jiné náhrady nejsou zamýšleny jako trvalé implantáty. Z tohoto důvodu je tedy nutná biologická rozložitelnost, aby bylo umožněno buňkám produkovat vlastní extracelulární matici (Liu a Cao 2019; O'Brien 2011).

Rychlost degradace materiálu scaffoldu by měla odpovídat rychlosti růstu buněk, tvorbě tkáně a také by měla být kontrolovatelná podle požadavků různých typů tkání. To znamená, že scaffold by se měl degradovat tak, aby se nová tkáň umožnilo snadné regenerování a obnovení poškozené oblasti. Scaffold nesmí vymizet příliš rychle, protože musí zaručovat důležitou počáteční mechanickou podporu. Za předpokladu, že je degradace scaffoldu příliš pomalá, může být ohrožena její kolonizace novou tkání. Dokonalý scaffold zůstává tak dlouho, dokud je jeho přítomnost nutná pro kolonizaci buněk, proliferaci a diferenciaci, ale na konci regeneračního procesu musí úplně zmizet (Gervaso, Sannino a Peretti 2014).

Vedlejší produkty této degradace nesmí být toxické a zároveň musí být schopny opustit tělo bez interference s jinými orgány. Pro umožnění degradace s tvorbou tkáně je nutná zánětlivá odpověď spojená s řízenou infúzí buněk, jako jsou makrofágy (Liu a Cao 2019; Brown *et al.* 2009).

### 2.1.3 Mechanické a chemické vlastnosti

Scaffold zajišťuje mechanickou i tvarovou stabilitu defektu tkáně. Mechanické vlastnosti scaffoldu by se měly shodovat s vlastnostmi hostitelské tkáně (Chan a Leong 2008). Je také důležité navrhnout scaffold s takovými mechanickými vlastnostmi, např. napětí a deformace, které napodobují vlastnosti nahrazované tkáně v bezprostředním okolí oblasti defektu (Sultana, Hassan a Mim Mim 2015).

Ideální scaffold by mělo být možné předem vyrobit do určitého tvaru a zároveň zajistit určitou úroveň mechanických vlastností, aby scaffold mohl nahrazovat funkci tkáně před tím, než může být tkáň znovu vytvořena, přeměněna a dostatečně regenerována (Chan a Leong 2008). Přestože dokonalé mechanické vlastnosti podobné vlastnostem cílové tkáně nejsou snadno dosažitelné, scaffold by měl být schopen odolat manipulaci, tlakovému a tahovému zatížení vyskytující se ve fyziologickém prostředí. Pro přesnější určení mechanické vlastnosti scaffoldu musí být věnována pozornost výběru správné mechanické

zkoušky, kdy samotné složení a funkce obnovující se tkáň, poskytuje znaky, jež pomohou určit vhodný test, tj. stlačení nebo tah, tečení nebo namáhání, statické nebo dynamické vlastnosti (Gervaso, Sannino a Peretti 2014; Garg *et al.* 2012).

Většina scaffoldů obvykle sestává z materiálu na bázi polymerů, biokeramiky a hybridních materiálů, ať už přírodních nebo umělých. S možným zdrojem materiálu použitého pro výrobu scaffoldu se mohou vyskytnout problémy související s biokompatibilitou, složením a rozkladnými produkty. Také široká škála materiálů, jež jsou hodnoceny pro výrobu scaffoldu nemusí přímo podporovat buněčný růst v samotném scaffoldu (Eltom, Zhong a Muhammad 2019). Nezbytná chemická vlastnost povrchu scaffoldu podporuje přilnutí buněk, proliferaci a jejich diferenciaci. Je pravděpodobné, že v souvislosti s texturovaným povrchem scaffoldu mohou nastat změny v chování buněk závislé právě na velikosti dané textury (Sultana, Hassan a Mim Mim 2015).

#### 2.1.4 Trojrozměrná porézní struktura

Scaffold definujeme jako trojrozměrnou (3D), porézní a vzájemně propojenou strukturu, která umožňuje jak buněčnou adhezi, tak tok biologické tekutiny pro podporu růstu tkání. Na základě svých funkcí je scaffold charakteristicky vyroben z biokompatibilních a často i biologicky rozložitelných materiálů, jejichž tvar, velikost a geometrie – velikostní a tvarové vzájemné propojení pórů jsou definovány konkrétní aplikací a přizpůsobeny podle patologie (Idaszek *et al.* 2016). Ve skutečnosti je několik specifikací, které musí scaffold splňovat, včetně schopnosti nést zátěž chybějící tkáň, dokud není zcela obnovena, aby se docílilo adhezi buněk a toku živin (Pagano *et al.* 2020).

Samotná architektura scaffoldů používaných pro TI má zásadní význam. Scaffold by měl mít vzájemně propojenou strukturu pórů a vysokou porozitu, aby se zajistila penetrace buněk a dostatečná difúze živin do buněk uvnitř konstruktů a do extracelulární matrix vytvořené těmito buňkami. Porézní propojená struktura taktéž umožňuje difúzi odpadních produktů ze scaffoldu, aby produkty degradace byly schopny opustit tkáň bez interference s okolními tkáněmi a jinými orgány (O'Brien 2011; Ko, Milthorpe a McFarland 2007).

Další klíčovým faktorem je průměrná velikost pórů scaffoldu. Velikost pórů hraje důležitou roli v přežití a diferenciaci buněk. Pór musí být dostatečně velký, aby umožnil buňkám proniknout do scaffoldu a kolonizovat celou trojrozměrnou strukturu. Zároveň nesmí být oblast póru příliš velká, protože je nutné, aby scaffold zajistil dostatečnou specifickou plochu povrchu, nezbytnou k zajištění vazebného místa pro buňky. Ideální

velikost pórů taktéž úzce souvisí s místem regenerace a typem buněk, který mají být použity. Z tohoto hlediska nelze označit jedinou vhodnou velikost pórů pro všechny scaffoldy tkáňového inženýrství (Gervaso, Sannino a Peretti 2016; Mikos *et al.* 1998).

V rámci vzájemného působení buňky primárně interagují se scaffoldem prostřednictvím chemických skupin – ligandů na povrchu materiálu. Například scaffold syntetizovaný z přírodních extracelulárních materiálů, jako je kolagen, tyto ligandy přirozeně vlastní ve formě vazebných sekvencí Arg-Gly-Asp (RGD), zatímco scaffold vyrobený ze syntetických materiálů mohou vyžadovat úmyslné začlenění těchto ligandů skrze adsorpci proteinu. Právě hustota ligandu je ovlivněna specifickou povrchovou plochou, tedy dostupným povrchem póru, ke kterému mohou buňky přilnout. Samotná adsorpce závisí na střední velikosti pórů ve scaffoldu. Dostatečná velikost póru pro migraci buněk do struktury a současná tvorba vysoce specifického povrchu vede k minimální hustotě ligandu, aby se umožnilo účinné vázání kritického počtu buněk na scaffold. Navíc scaffold právě se zmíněnou vhodnou velikostí pórů zlepšuje migraci buněk, absorpci vody a také podporuje vysoký přenos kyslíku v celém scaffoldu (O'Brien 2011, Eltom, Zhong a Muhammad 2019).

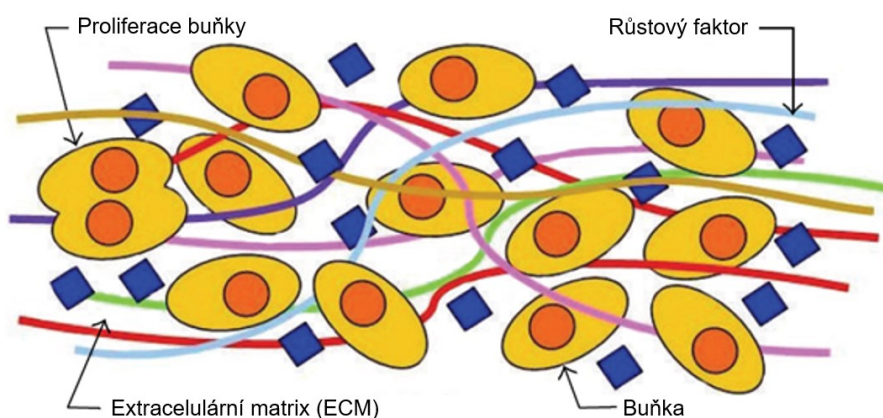
Scaffold by měl poskytovat také dostatečný prostor a objem pro vaskularizaci – vznik krevních cév ve tkáni a její míra prokrvení, tvorbu nové tkáně a remodelaci, aby se usnadnila integrace hostitelské tkáně po implantaci. Biomateriály by tedy měly být zpracovány a vytvořeny s dostatečnou porézní strukturou pro účinný transport živin a metabolitů, aniž by významně narušily mechanickou stabilitu samotného scaffoldu. (Chan a Leong 2008). Biologická tkáň sama o sobě je složitá 3D struktura s jistými mechanickými funkcemi spojenými s charakteristikami transportního systému. Pro oblast tkáňového inženýrství je tedy kritickým místem omezit tuto strukturální složitost a funkci pouze na biologické scaffoldy poskytující buňky, proteiny a geny pro rekonstrukci tkáně. Biomateriály nemohou dostatečně replikovat složitá tkáňová prostředí, včetně daných typů buněk, interagující s různými cytokiny za vzniku extracelulárních matric v samotných buňkách s hierarchickými vlastnostmi a mechanickou funkcí (Meyer *et al.* 2009).

### 2.1.5 Interakce buňka – povrch scaffoldu

Vhodné vlastnosti povrchu pro interakci scaffoldu a buněk jsou důležité pro udržení normálního buněčného fenotypu nebo pro podporu diferenciaci buněk, včetně adheze a růstu buněk (Liu a Cao 2019).

V případě, že buňky ulpívají na povrchu scaffoldu, dochází mezi buňkami a scaffoldem k posloupnosti v rámci fyzikálně-chemických reakcí. Ihned po zavedení konstruktů do organismu nebo po kontaktu s prostředím buněčné kultury dochází k adsorpci proteinů na povrch scaffoldu. Tato adsorpce zprostředkovává buněčnou adhezi poskytuje buňce signály prostřednictvím receptorů buněčné adheze, zejména integrinů. Buňky poté mohou ulpívat na povrchu scaffoldu a uvolňovat aktivní sloučeniny pro signalizaci, ukládání extracelulární matrix, proliferaci a diferenciaci buněk. Interakce mezi buňkami a scaffoldem se nazývá fokální adheze (Chang a Wang 2011).

Z biomedicínského hlediska je buňka základní jednotkou biologického systému a každý organismus sestává z buněk. Toto prostředí je obvykle v rozsahu mikrometrů. Ve skutečnosti jsou však samotnými molekulárními stavebními bloky proteiny, lipidy, sacharidy a nukleové kyseliny, všechny struktury v nanometrovém měřítku (Becker, Kleinsmith a Hardin 2006). Interakce mezi strukturami v buňce zajišťují právě proteiny, které rozhodují o řízení různých buněčných funkcí – proliferace, migrace a produkce ECM (Obrázek č. 7). Navíc jsou to proteiny, které významně ovlivňují fyzikální a chemické procesy a ovlivňují chování buňky v kontaktu s povrchem struktury. To znamená v případě, že biomateriál/scaffold přijde do kontaktu s vnitřním prostředím těla, proteiny se spontánně adsorbují na povrch scaffoldu. To má za následek vytvoření povrchově vázané proteinové vrstvy, která se během následného připojení buněk zprostředkovává mezi povrchem biomateriálu a receptory buněčného povrchu.



Obrázek č. 7: Schéma buněčného prostředí (upraveno podle Le *et al.* 2013)



Kromě toho adsorpce proteinů a adheze buněk je složitý proces ovlivněný mnoha aspekty, mezi něž zahrnujeme chování buněk, vlastnosti povrchu materiálu a faktory prostředí. Vlastnosti povrchu materiálu zahrnují smáčitelnost, povrchový náboj, drsnost a měkkost, chemické složení (Chang a Wang 2011; Le *et al.* 2013).

Smáčitelnost (obecně označovaná jako hydrofobicita/hydrofilnost) je jedním z důležitých parametrů ovlivňujících biologickou odezvu na implantovaný scaffold. Hydrofobicita povrchu může být stanovena měřením kontaktního úhlu prostřednictvím vodní kapky na povrchu. Čím je kontaktní úhel menší, tím je povrch hydrofilnější. Obecně lze říct, že buňky preferují hydrofilní povrch (Goddard a Hotchkiss 2007). Taktéž různá chování buněk související s hydrofobicitou může být zprostředkována absorpcí proteinů, protože smáčivost povrchu modifikuje uspořádání a množství molekul adherovaných buněk. Taktéž ovlivňují adhezi/aktivaci krevních destiček, koagulaci krve nebo adhezi bakterií. Pozorování týkající se účinků smáčivosti povrchu na adhezi proteinů však není konzistentní. Hydrofobní povrchy mají tendenci adsorbovat více proteinů, zatímco hydrofilní povrchy mají tendenci odolávat adsorpci proteinů (Xu a Siedlecki 2007). Buněčná adheze na povrch materiálu vyžaduje řadu cytoplazmatických, transmembrálních a extracelulárních proteinů, které se shromažďují do stabilních kontaktních míst. Chování buněčné adheze je spojeno s adsorpcí na povrch materiálu séra a proteinů ECM. Mnoho proteinů, včetně imunoglobulinů, vitronektinu, fibrinogenu a fibronektinu, se adsorbuje na povrch implantátu ihned po kontaktu s fyziologickými tekutinami a moduluje následné zánětlivé reakce. Pro příklad lze uvést adsorbované adhezivní proteiny zprostředkovávající připojení a aktivaci neutrofilů, makrofágů a dalších zánětlivých buněk (Chang a Wang 2011).

Topografie – drsnost povrchu materiálu je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím přilnavost a chování buněk. Tento faktor má přímý vliv na buněčnou morfologii, proliferaci a fenotypovou expresi. Příkladem může být kultivace buněk na mikroporézních površích, kdy jejich genová exprese stimulovala diferenciaci ve srovnání s buňkami rostoucími na hladkých površích. V závislosti na měřítku nepravidlostí povrchu materiálu lze drsnost povrchu rozdělit na rozměry: makro (100  $\mu\text{m}$ –1 mm), mikro (100 nm–100  $\mu\text{m}$ ) a nano (méně než 100 nm), každá se svým specifickým vlivem. Reakce buněk na drsnost se liší v závislosti na typu buňky. Taktéž vlastnost tuhosti scaffoldu je důležitým faktorem. Uchycení, proliferace a diferenciaci buněk jsou modulovány rigiditou substrátu do stupně závislého na tuhosti substrátu ve vztahu k tuhosti nativní tkáň. Na rozhraní tkáň – scaffold mohou buňky

aktivně modifikovat povrchy implantátů a měnit tuhost mikroprostředí svých nebo jiných buněk (Chang a Wang 2011, Marquez *et al.* 2006).

### 2.1.6 Sterilizace a výroba

Aby se zabránilo jakékoli kontaminaci nebo infekci, musí být scaffold možné sterilizovat. Ideální materiál musí být odolný minimálně na jeden typ sterilizace, aniž by to ovlivnilo jeho vlastnosti. Biologicky rozložitelný scaffold je použit pro široké aplikace v tkáňovém inženýrství, avšak možná kontaminace spojená s používáním scaffoldu *in vivo* různými mikrobiologickými kontaminanty musí být odstraněna pomocí sterilizačních technik jako je teplo, chemikálie, ozáření a další. Sterilizace je proces, při kterém se v daném prostředí usmrtí všechny životaschopné mikroorganismy, včetně bakterií, kvasinek a virů. Při sterilizaci biologicky rozložitelného scaffoldu musí být zvolená taková sterilizační technika, která zachovává strukturální a biochemické vlastnosti scaffoldu a zajistí se tak daný zamýšlený účel i po sterilizaci. Mezi standardní sterilizační techniky používané v klinických podmínkách patří chemická sterilizace za pomoci ethylenoxidu (EtO), ozáření – gama záření, sterilizace teplem, plazma a novější techniky zahrnující lyofilizaci nebo superkritický oxid uhličitý (sCO<sub>2</sub>) (Gilson, Moon a Lee 2007, Dai *et al.* 2016).

Pro výrobu scaffoldu ve větším měřítku pro praktické aplikace je obecně zapotřebí nízkých nákladů a snadnosti výroby (Liu a Cao 2019). Pro klinicky i komerčně dostupnou konkrétní konstrukci scaffoldu je z efektivního hlediska nejideálnější rozšíření výroby z jednoho kusu ve výzkumné laboratoři na malosériovou výrobu. Dalším klíčovým faktorem pro správné provedení možné implantace je dodání produktu a zpřístupnění klinickému lékaři pro transportování, skladování a samotný zákrok. Tím se rozumí, jakým způsobem se bude zacházet s produktem a jak bude uložen tkáňový konstrukt nebo scaffold. Jako výhodnější variantu bereme dostupnost vytvořeného konstruktů bez potřeby dalších chirurgických zákroků, aby se buňky mohly odebrat před implantací pouze několik týdnů ze samotné kultivace *in vitro*. U některých typů tkání to však není možné a je nutné provést celkový proces *in vitro* tkáňového inženýrství (Hollister 2009, O'Brien 2011).

## 2.2 Biomateriály

Jedním z důležitých kroků při výrobě scaffoldu schopného podpořit regeneraci tkáně pro její obnovu, je výběr materiálu. V závislosti na umístění tkáně, která je třeba nahradit v lidském těle, volíme nezbytné vlastnosti pro výrobu scaffoldu (Gervaso, Sannino a Peretti 2014). Na první konferenci Evropské společnosti pro biomateriály (European Society for Biomaterials, ESB) v roce 1976 byl biomateriál definován jako „neživotaschopný materiál používaný v lékařském odvětví, určený k interakci s biologickými systémy“; poté byla definice změněna a současně podle ESB je biomateriál označován jako „materiál určený k propojení s biologickými systémy za účelem vyhodnocení, ošetření, rozšíření nebo nahrazení jakékoli tkáně, orgánu nebo funkce těla“. Biomateriály se tedy posunuly od pouhé interakce s tělem k ovlivňování biologických procesů směrem k regeneraci tkáně (O'Brien 2011).

Pro tvorbu scaffoldu, jako prostředí pro buněčnou kulturu, je používáno mnoho biomateriálů a lze je rozdělit do čtyř hlavních kategorií: přírodní polymery, syntetické polymery, biokeramika a kompozity. Každá třída představuje výhody a nevýhody, které musí být brány v úvahu ve vztahu k aplikaci (Garg *et al.* 2012; Gervaso, Sannino a Peretti 2014).

V současné době existuje více než 100 různých tříd biomateriálů pro klinické použití a další jsou v pokročilém stavu testování pro jejich případné použití. Tyto biomateriály mohou mít široké spektrum chemických, mechanických, fyzikálních a biologických vlastností (Tabulka č. 1), a také jejich morfologie vykazuje široký rozsah využití v hostitelské tkáni (Tabulka č. 2). Rozsah tkáňových oddílů a kompartmentů, se kterými přichází scaffold do styku, mohou být: pevná tkáň nebo orgán *in vivo*, kardiovaskulární systém *in vivo*, nervový systém *in vivo*, smyslové orgány *in vivo*, tubulární systém, vylučovací soustava *in vivo*, kůže a sliznice, nebo *ex vivo* bioreaktor a systém buněčné kultury, mimotělní oběhový systém. K dalším charakteristikám ovlivňujícím použití biomateriálů jsou možné variace, způsobené klinickými dovednostmi a faktory specifickými pro pacienta a to: věk, pohlaví, zdravotní stav, užívané léky, životní styl a další. Možné problémy mohou také nastat během porovnávání údajů testů *in vitro* a na zvířecích modelech, kdy v případě využití u lidí se může očekávat možné nedosažení komplexního popisu mechanismů biokompatibility (Williams 2017).

Tabulka č. 1: Charakteristika a vlastnosti biomateriálů (upraveno podle Williams 2017)

|   |  |
|---|--|
| <b>Chemická povaha biomateriálu</b>   | Kov<br>(čistý kov, slitina, ...)   |
|   | Polymer<br>(syntetický, biopolymer, ...)                                 |
|   | Keramika<br>(oxidy, fosfáty, ...)  |
|   | Uhlíkové struktury<br>(krystalické, amorfnní, nanostrukturované,<br>...) |
|   | Kompozity  |
|   | Upravené biologické komponenty   |
| <b>Mechanické vlastnosti biomateriálu</b>   | Pružný modul   |
|   | Elastický limit  |
|   | Tvrдость   |
|   | Kujnost  |
|   | Síla materiálu   |
| <b>Fyzikální vlastnosti biomateriálu</b>  | Elektrický   |
|   | Opto-elektronický  |
|   | Magnetický   |
| <b>Biologické vlastnosti biomateriálu</b>   | Biostabilita   |
|   | Biodegradabilita   |
|   | Biologická vstřebatelnost  |
|   | Propustnost  |
|   | Cytotoxicita   |
| Seznam shrnuje hlavní skupiny materiálů a vlastností, které mohou ovlivnit biologickou kompatibilitu. |  |

Tabulka č. 2: Morfologie komponent biomateriálů (upraveno podle Williams 2017)

| Možná morfologie tvarů                      |
|---|
| Pevná makroskopická struktura               |
| Pevná struktura s mikroskopickou topografií |
| Pevná struktura s nanometrickou topografií  |
| Pevná struktura s porézním povrchem         |
| Pevná porézní struktura                     |
| Makroskopická síť                           |
| Homogenní gel                               |
| Heterogenní nanostrukturovaný gel           |
| Mikročástice                                |
| Tenká nebo dutá vláknitá membrána           |

### 2.2.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery, jak naznačuje jejich název, jsou odvozeny z přírodních zdrojů. Tyto polymery jsou nejpoužívanějšími materiály pro výrobu scaffoldů především pro jejich biokompatibilní a biodegradabilní charakteristiku. Lze je snadno modifikovat, degradovat, nejsou toxické. Biopolymery také mohou fungovat na biologicky molekulární úrovni, nejen na makroskopické. Mohou i absorbovat *in vivo* enzymy přirozeně se vyskytující v lidském těle (Gervaso, Sannino a Peretti 2014; Oladeji, Lasisi a Sunday 2012). Polymery z přírodních zdrojů jsou užitečné jako biomateriály, vzhledem k jejich podobnosti s jinými polymerními částmi extracelulární matrice v lidském těle. Takové biopolymery mají široké uplatnění jako implantovatelné biomateriály, nosiče nebo scaffold pro TI (Reis *et al.* 2008). Mezi hlavní problémy řadíme imunologickou reakci, kdy imunitní systém těla rozpozná cizí materiál a reaguje na něj. Přírodní materiály mají také vysokou přirozenou variabilitu a jsou strukturálně složitější než běžné materiály, a proto je s nimi manipulace složitější (Oladeji, Lasisi a Sunday 2012).

Přírodní polymery se obvykle skládají z polymerní sítě, která může obsahovat až 99 % obsahu vody. Ve výsledku se obvykle označují jako hydrogely a jejich bobtnavost ve vodě jim umožňuje vystavovat prostředí, které se podobá vysoce hydratovanému stavu přírodních

tkání. Přírodní polymery jsou velmi atraktivní právě pro tvorbu scaffoldu ve formě hydrogelů, i když se vyznačují variací i zhoršenými mechanickými vlastnostmi (Ratner a Bryant 2004).

Přírodní polymery pocházejí hlavně ze živočišných zdrojů, ale jsou využívány rostlinné zdroje. Mezi živočišné polymery můžeme zařadit kolagen, želatinu, hedvábí a chitosan. Potenciální využití polymerů rostlinného původu pro výrobu scaffoldu je celulóza, alginát, agaróza a škrob (Gervaso, Sannino a Peretti 2014).

### 2.2.2 Syntetické polymery

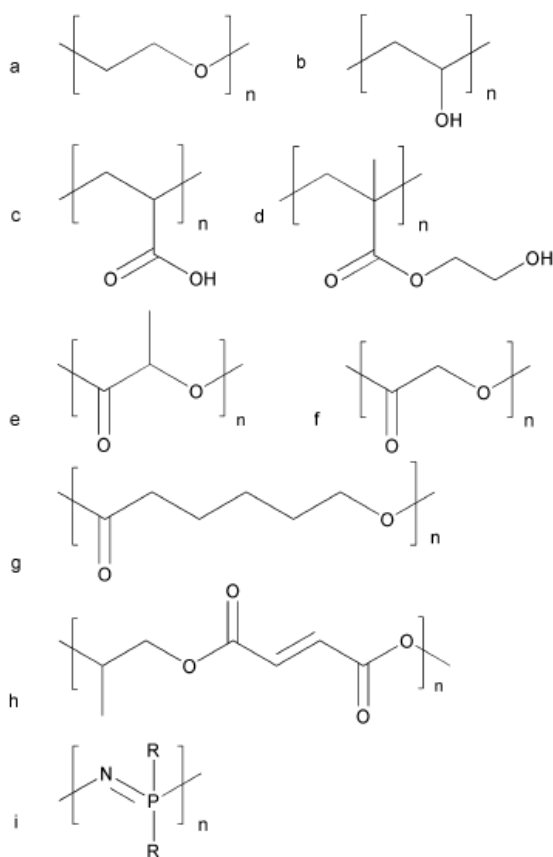
Vzhledem ke své vhodné mechanické pevnosti, reprodukovatelným mechanickým a chemickým vlastnostem a také kontrolovatelné rychlosti biodegradability, jsou syntetické polymery také široce používány při přípravě scaffoldů.

Syntetické polymery lze rozdělit do dvou kategorií a to na: 1. biologicky odbouratelné, jako je kyselina poly(glykolová) (PGA), poly(mléčná) (PLA) a jejich kopolymery, poly(ethylenglykol) (PEG), poly(kaprolakton) (PCL) a 2: biologicky nerozložitelné, kam řadíme polyvinylalkohol (PVA), polyhydroxyethylmethakrylát (PHEMA) a poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPA), polyakrylová kyselina (PAA) (Liu, Holzwarth a Ma 2012). Chemické struktury vybraných syntetických polymerů jsou naznačeny na Obrázku č. 8.

Jak již bylo zmíněno, prvním požadavkem jakéhokoli biomateriálu je biokompatibilita. Syntetické polymery jako je právě PEG nebo PEO s vysokou molekulovou hmotností vykazují tuto vlastnost a mají licenci v rámci institutu Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration). PEG, PEO jsou extrémně hydrofilní polymery s vynikající rozpustností v řadě rozpouštědel a vysokou mobilitou roztoku. Používají se ve velké míře v tkáňovém inženýrství, zejména jako složka hydrogelů díky své schopnosti nasávat vodu. Rovněž se využívá PVA, PAA a její deriváty (PHEMA). Avšak použití nerozložitelných syntetických polymerů je omezeno na permanentní implantáty (chemicky upraveny – zavedení esterových vazeb) nebo na části o nízké střední molární hmotnosti polymeru, aby byla zajištěna eliminace z těla (Place *et al.* 2008).

U skupiny biologicky odbouratelných syntetických polymerů je řada výhod oproti jiným materiálům pro vývoj scaffoldů. Mezi hlavní výhody patří schopnost přizpůsobit mechanické vlastnosti a kinetiku degradace tak, aby vyhovovaly různým aplikacím. Cílem je implantovat scaffold, který může přetrvávat v robustním stavu po dostatečně dlouhou dobu, aby umožnil tvorbu nové tkáně, ale nakonec se rozložil a byl nahrazen tkání.

Syntetické polymery lze vyrobit navíc do různých tvarů s požadovanými morfologickými vlastnostmi včetně pórů, které napomáhají růstu tkáně. Dále mohou být tyto polymery navrženy s chemickými funkčními skupinami, které mohou indukovat růst tkáně (Gunatillake a Adhikari 2003). Polyestery – PLA, PGA, PCL se odbourávají hydrolýzou, a nakonec uvolňují oligomery nebo monomery, které se přivádějí do přirozených metabolických cest. Tyto polymery jsou však hydrofobní, což může být při aplikacích regenerace tkání nevýhodné kvůli špatnému smáčení a nedostatku buněčného připojení a interakce (Place *et al.* 2008).



Obrázek č. 8: Struktury vybraných polymerů běžně používaných v oblasti tkáňového inženýrství – a: poly(ethylenglykol) (PEG), b: poly(vinylalkohol) (PVA), c: poly(kyselina akrylová) (PAA), d: poly(2-hydroxyethylmethakrylát) (PHEMA), e: poly(kyselina mléčná) (PLA), f: poly(kyselina glykolová) (PGA), g: poly(kaprolakton) (PCL), h: poly(propylenfumarát) (PPF), i: poly(fosfazen) R = alkoxy, aryloxy nebo aminoskupiny. (převzato podle Place *et al.* 2008)

### 2.2.3 Biokeramika

Biokeramika je velká třída speciálně navržené keramiky pro opravy a rekonstrukce nemocných nebo poškozených částí těla (Baino, Novajra a Vitale-Brovarone 2015).

V rámci biokompatibility je známo, že žádný cizí materiál umístěný do organismu není zcela kompatibilní. Vyhovujícími látkami jsou pouze takové, které si tělo samo vytváří (autogenní) a jiné látky jsou tedy rozpoznány jako cizí, vyvolávají určitý druh reakce (reakce tkáně hostitele). V rámci takového složení a vlastností se biokeramika řadí mezi biologicky vstřebatelné (vápnek, vápenaté fosforečnany), bioinertní (oxid hlinitý, oxid zirkoničitý), a bioaktivní, povrchově aktivní látky (hydroxyapatit) (Heness a Ben-Nissan 2004; Gervaso, Sannino a Peretti 2014).

Biokeramiku lze vytvořit z pevných keramických tělísek, porézních nebo hustých, tavením surového anorganického materiálu. Často bývá potenciálně využita v rámci velké třídy speciálně navržené keramiky pro opravy a rekonstrukce nemocných nebo poškozených částí těla. Současné formy aplikace v klinickém použití zahrnují pevné části – požívané při rekonstrukci středoušních kůstek nebo jako nosné součásti kloubních protéz, přestavby obličejových a lebečních kostí, prášky a granule pro výplň kostí, povlaky na protézách kovových kloubů, injekční přípravky – kostní cement a porézní scaffoldy využity jako interaktivní materiál pro tělo, kdy pomáhá a podporuje regeneraci tkání (Baino, Novajra a Vitale-Brovarone 2015). Hlavními nevýhodami těchto materiálů jsou však jejich nízká mechanická odolnost a vysoká křehkost naopak pro jejich využití svědčí právě zmíněná vysoká biokompatibilita a dobrá osteoaktivita (Gervaso, Sannino a Peretti 2014).

Je třeba vzít v úvahu biokeramiku pocházející z přírodních produktů a její potenciály. Mezi takovéto typy materiálů můžeme zařadit skořápky, korály, nebo samotné kosti a minerály v půdě (Oladeji, Lasisi a Sunday 2012)

### 2.2.4 Kompozity

Zásadním předpokladem pro úspěšné provedení scaffoldu a jeho využití v regeneraci tkáně je jeho relevantní struktura a vlastnosti pro danou tkáň a mechanická zatížení, kterým bude vystavena *in vivo*. Stejně jako většina keramických materiálů má i biokeramika nevýhodu v nízké lomivé houževnatosti (křehkost), což by mohlo omezit jejich použití v takovýchto aplikacích. Taktéž vysoká tuhost může dále omezovat použití biokeramiky, kde je nutná adekvátní shoda s měkkými tkáněmi.



Kombinací biokeramiky s polymery za vzniku kompozitního scaffoldu můžeme této problematice předejít. Obvykle se biokeramika přidává jako plnivo nebo povlak k polymerní matrici, aby se zlepšily její mechanické vlastnosti – zvýšení pevnosti a tuhosti a účinné zvýšení biologické aktivity (Baino, Novajra a Vitale-Brovarone 2015; Mohamad, Bretcanu a Boccaccini 2008).

### 3 VODIVÉ POLYMERY

Úspěchem v oblasti tkáňového inženýrství je možné dosažení vývoje nových biomateriálů a výrobou funkčních scaffoldů za pomoci kmenových buněk a růstových faktorů. Napodobení vnitřní architektury a fyzikálně-chemických vlastností ECM je důležitým požadavkem pro podporu buněčných aktivit (migrace, proliferace, diferenciaci a regeneraci tkání). S používáním nových materiálů a souvisejících kompozitů je také, jako jedna ze základních kritérií, posuzována biokompatibilita a jiné další vlastnosti použitého biomateriálu. Pro podporu buněčného chování je možné využít tzv. chytré materiály. Jedná se o typ materiálu, jenž má cílené vlastnosti a kontrolovatelné funkce ovlivňující buněčné chování. Tyto materiály jsou rezponzivní – reagují na drobné změny prostředí a přenášení vnější stimuly. Změny, na které mohou být tyto materiály citlivé, je např. změna pH, teplota, redoxní potenciál nebo elektrické pole. Bylo prokázáno, že právě elektrické pole má jistý vliv na buněčnou migraci, proliferaci, diferenciaci nebo orientaci cytoskeletu. Právě díky těmto zjištěním mohou být vodivé materiály vhodným materiálem pro přípravu rezponzivních tkáňových nosičů. Jako vodivé materiály můžeme charakterizovat např. i kovy, jejichž mechanické vlastnosti však nejsou vhodné pro využití u měkkých tkání. Přijatelným kandidátem jsou právě vodivé polymery – snadno zpracovatelné a modifikovatelné. Také, na rozdíl od kovů, vykazují elektronovou a iontovou vodivost a jsou tedy vhodným materiálem v rámci „komunikace“ s biologickými objekty (Van de Velde a Kiekens 2002; Thirivikraman, Boda a Basu 2018; Guo a Ma 2018).

Vodivé polymery (CP) jako organické materiály byly syntetizovány poprvé v polovině 70. let jako nový druh vodivých materiálů s elektrickými a optickými vlastnostmi podobnými kovovým a anorganickým polovodičům. Byly snadněji syntetizovány a vykazovaly lepší zpracovatelnost ve srovnání s tradičními vodivými materiály. Do dnešní doby již existuje více než 25 vodivých polymerních systémů. Spojují pozitivní vlastnosti kovů a konvenčních polymerů – schopnost vést náboj, skvělé elektrické a optické vlastnosti s flexibilitou zpracování a snadnou syntézou. Potenciál vodivých polymerů dokazuje udělení Nobelovy ceny v roce 2000 třem vědcům (Heegerovi, MacDiarmidovi a Shirakawovi) za vynález vodivých polymerů na bázi polyacetyleny (PA). Tato raná práce na vodivých polymerech byla podepřena pozorováním vodivosti PA – vodivého polymeru, jehož vodivost se zvyšuje 10krát více při oxidaci parami jódu. Polyacetylen je však obtížně syntetizován a je nestabilní na vzduchu, proto nebyl vhodný pro širší použití a zájem se zaměřil na další možné vodivé polymery (Sahiner a Demirci 2016; Balint, Cassidy

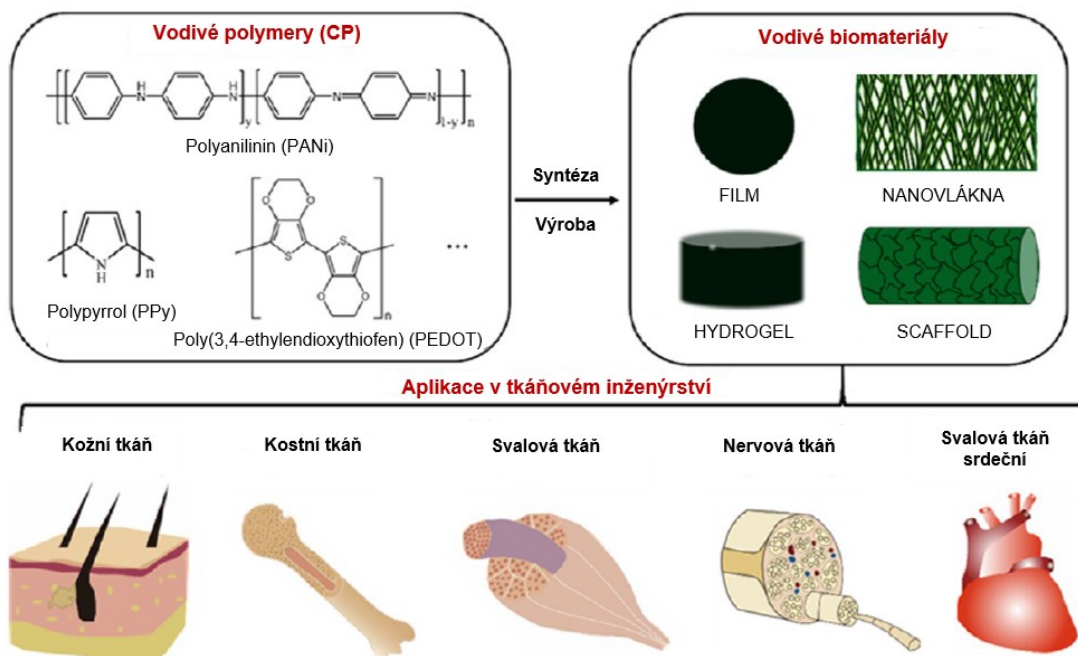
a Cartmell 2014). Vodivé biomateriály na bázi polymerů následně přitahovaly stále více pozornosti vědců. První vodivý substrát na bázi polymerů byl navržen pro regeneraci nervové tkáně, ale tyto materiály mohou také sloužit jako vhodné substráty pro mnoho dalších buněk excitovatelných elektrickým signálem, např. svalové buňky. Bylo popsáno stále více experimentů na regeneraci svalové tkáně pomocí vodivých polymerů a samotné druhy biomateriálů na bázi vodivých polymerů nabízí využití v podobě hydrogelů, filmů nebo 3D scaffoldů (Dong, Ma a Guo 2020).

CP je možné připravit dvěma druhy polymerace a to, chemickou anebo elektrochemickou polymerací. Chemická polymerace probíhá oxidací monomeru a použití vhodného oxidačního činidla – např. při přípravě polypyrolu je běžně používán chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3$ ) nebo při přípravě polyanilinu naopak persíran amonný (APS). Je také známá jako polymerizace *in situ*, kde je často přidáván dopant pro zvýšení vodivosti. Při elektrochemické polymeraci se vede elektrický proud aplikovaný na elektrody a umístěný v roztoku obsahující směs monomeru, rozpouštědla a dopingového činidla. První způsob je vhodný pro výrobu veškerých forem vodivých polymerů. Jednou z nevýhod elektrochemické polymerace je, že finální produkty lze těžko modifikovat, zatímco je stále možné provést kovalentní modifikaci na hlavním řetězci těchto vodivých polymerů (Liang a Goh 2020).

CP jako nová generace organických materiálů vykazují včetně již zmíněné snadné syntézy a flexibility při zpracování, také lepší strukturní kompatibilitu s buňkami a orgány než konvenční elektronové anorganické a kovové materiály. Mezi nejvíce studované CP řadíme polyanilin (PANi), polypyrol (PPy) a polythiofen (PTh) a jejich deriváty a kompozity. Jsou to atraktivní materiály díky své potenciální biokompatibilitě, snadné syntéze, jednoduché modifikaci a schopnosti elektronicky řídit řadu fyzikálních a chemických vlastností podle techniky povrchové funkcionalizace a použití široké škály molekul vhodných k funkcionalizace. Mezi nimi je však PANi jedním z nejpoužívanějších CP, protože je považován za nejvhodnější vodivý polymer na základě jeho základních vlastností – jednoduchá syntéza, zlepšené elektrochemické chování a tepelná, relativní stabilita prostředí (Guo a Ma 2018; Sahiner a Demirci 2016).

Díky těmto výhodným vlastnostem jsou atraktivní v mnoha biomedicínských aplikacích, včetně systémů dodávajících léky, umělých svalů, bioaktivátorů, biosenzorů a tkáňovém inženýrství (Hardy, Lee a Schmidt 2013). CP mohou podporovat buněčnou aktivitu, včetně buněčné adheze, migrace, proliferace, diferenciaci a sekrece proteinů na rozhraní polymer

– tkáň s elektrickou stimulací nebo bez ní. Biomateriály založené na CP jsou obzvláště užitečné při konstrukci elektricky citlivých tkání, jako jsou kosterní svaly, srdeční svaly, nervy, kůže a kosti (Obrázek č. 9) (Guo a Ma 2018).



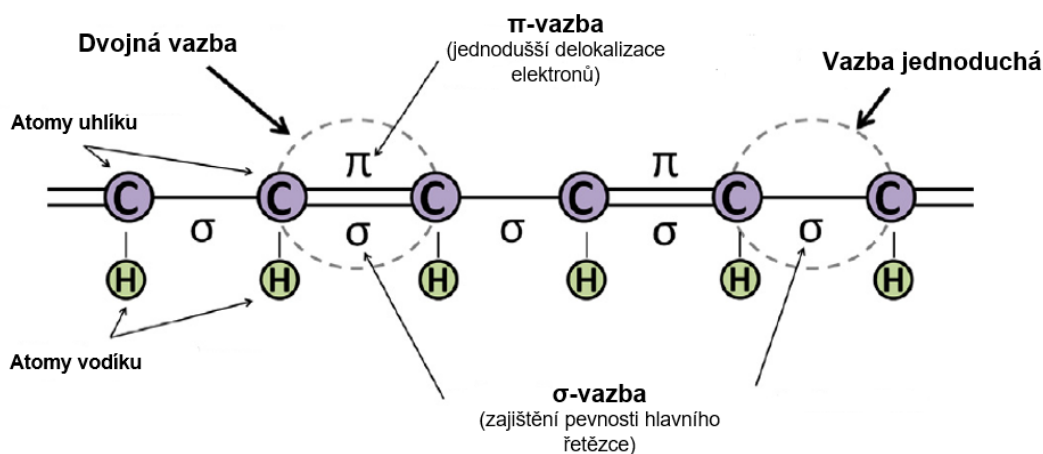
Obrázek č. 9: Vodivé polymery a biomateriály s aplikací v tkáňovém inženýrství (upraveno podle Guo a Ma 2018)

### 3.1 Potenciální vodivé polymery pro tkáňové inženýrství

Organické vodivé biomateriály představují obrovskou revoluci v biomedicínských polích díky svým vynikajícím elektricky vodivým a magnetickým vlastnostem. Polymery jsou obecně izolanty, avšak aby se staly elektricky vodivými, musí mít ve svém hlavním řetězci konjugované  $\pi$ -vazby, které volně drží elektrony a umožňují relativně snadnější delokalizaci elektronů. Polymery s konjugovanými  $\pi$ -vazby jsou třídou materiálů s elektrony drženými v jejich hlavním řetězci a delokalizované  $\pi$ -elektrony se volně pohybují v nenasyceném řetězci a vytvářejí tak možnost vést elektrický náboj.

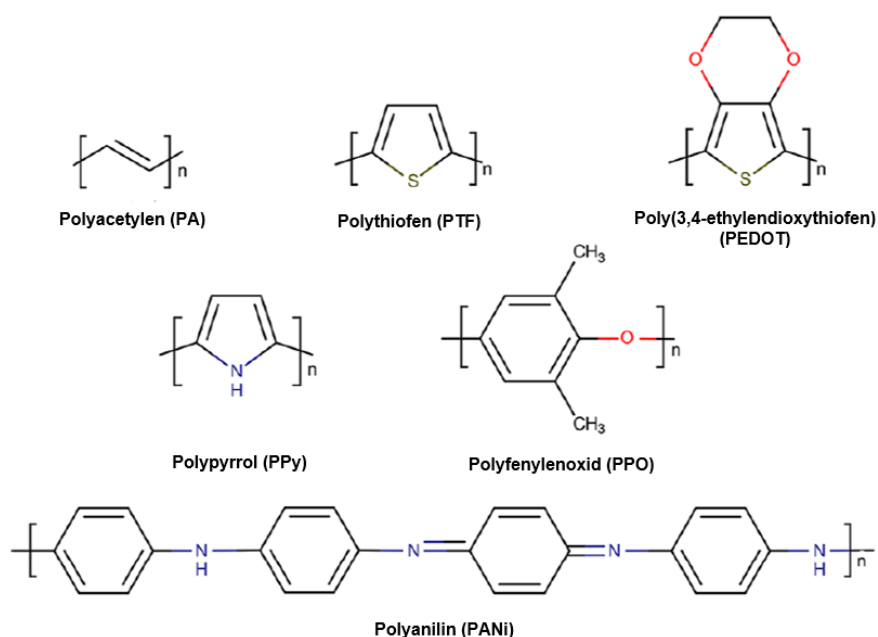
Jednoduše řečeno, vodivé polymery mohou vést náboj díky snadnosti, s jakou elektrony skáčou uvnitř a mezi řetězci polymeru. Vodivost ve skutečnosti vyplývá z kombinace řady faktorů. Jedním je právě konjugovaný hlavní řetězec (Obrázek č. 10). Řetězec je tvořen střídáním jednoduchých a dvojných vazeb, které obsahují chemicky silnou, lokalizovanou  $\sigma$ -vazbu, zatímco dvojná vazba obsahuje navíc méně lokalizovanou  $\pi$ -vazbu. Tyto p-orbitály v řadě  $\pi$ -vazeb se navzájem překrývají, což umožňuje elektronům snadnější delokalizaci,

elektrony nepatří k jedinému atomu, ale ke skupině atomů, a volně se pohybují mezi atomy. Další roli ve vodivosti těchto polymerů hraje dopant. Polymer je syntetizován v oxidované, vodivé formě a pouze v přítomnosti molekuly dopantu (stopa prvku, který se zavádí do chemického materiálu pro změnu jeho původní elektrické/optické vlastnosti), mající negativní náboj, je hlavní řetězec stabilizován a náboj neutralizován. Souběžně s tím dopant zavádí do tohoto systému nosič náboje odstraněním nebo přidáním elektronů z/do polymerního řetězce. Za použití elektrického potenciálu se dopující látky začnou pohybovat dovnitř nebo ven z polymeru v závislosti na polaritě, narušují stabilní řetězec a umožňují průchod náboje polymerem (Balint, Cassidy a Cartmell 2014).



Obrázek č. 10: Zjednodušené schéma konjugovaného hlavního řetězce – střídání jednoduchých a dvojných vazeb (upraveno podle Balint, Cassidy a Cartmell 2014)

CP a jejich chemické struktury znázorněné na Obrázku č. 11 jsou vhodné pro konstrukci scaffoldů v tkáňovém inženýrství pro vývoj lidských tkání/orgánů (Nezataki *et al.* 2018). Vodivé polymery mohou vést jak iontové, tak elektrické náboje a pomáhají vzájemné komunikaci mezi buňkami vytvářením nových vodivých kanálů. Elektronové vlastnosti organických měkkých polymerů lze snadno upravit jejich funkcionalizací nebo konjugací s vodivými materiály a mohou reagovat na externě aplikované elektrické podněty. Díky nastavitelným elektrickým vlastnostem byly tyto vodivé polymery široce využívány jako aktivní substráty pro růst buněk. Měkká povaha organických „chytrých“ polymerů poskytuje lepší mechanickou kompatibilitu a strukturní využitelnost pro znovuobnovení tkáně/orgánu než běžné elektronické anorganické materiály (Gajendiran *et al.* 2017).



Obrázek č. 11: Chemické struktury  $\pi$ -konjugovaných polymerů (upraveno podle Nezataki *et al.* 2018)

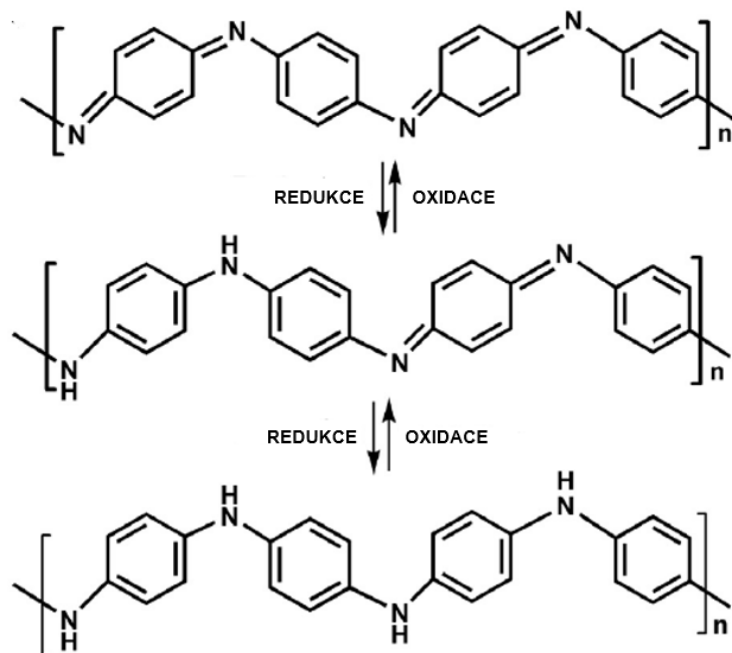
### 3.1.1 Polyanilin (PANI)

Nejvíce zkoumanými vodivými polymery jako slibný materiál jsou polypyrrol (PPy) a polyanilin (PANI). PANi se tvoří polymerací opakujících se jednotek anilinu, jednoho typu aromatického aminu.

PANI lze syntetizovat chemickou i elektrochemickou metodou. Elektrochemická depozice je často upřednostňována, protože vytváří vysoce čistý homogenně distribuovaný povrchový povlak filmu. Vzhledem ke své snadné přípravě a vhodným fyzikálním vlastnostem a stabilitě PANi označujeme jako perspektivní materiál. Vodivý PANi se připravuje oxidativní řetězovou reakcí polymerací anilinu v mírně kyselém prostředí a probíhá s přidávkem různých kyselin, při různém pH a teplotách, dokonce i ve zmrzlé reakční směsi. Takové podmínky se poté projeví na vodivosti, molekulové váze, morfologii a dalších vlastnostech. Tvoří mnoho různých morfologií: tenké filmy, disperzní částice nebo nanoútvary, což dává mnoho možností jeho využití.

PANI se vyskytuje v několika formách (Obrázek č. 12). Existují různé molekulární struktury PANi v závislosti na redoxních stavech a to: pernigranilin (úplně oxidovaná forma), emeraldinová báze (polooxidovaná forma) a leukoemeraldin (úplně redukováná forma). Nejvýznamnější z nich je zelená emeraldinová sůl, brána jako jediná vodivého

charakteru a nejstabilnější. Emeraldinová báze je azurově modrá a lze ji získat působením zásadou na emeraldinovou sůl. Pernigranilin je přeoxydovaná forma PANi. Jeho sůl je modrá a je meziproduktem při polymeraci, báze je fialová. Leukoemeraldin je poté redukovanou formou PANi a je bezbarvý (Gajendiran *et al.* 2017; Stejskal, Kratochvíl a Jenkins 1996).



Obrázek č. 12: Chemická struktura PANi v různých redoxních stavech – shora dolů: pernigranilin, emeraldinová báze a leukoemeraldin (upraveno podle Gajendiran *et al.* 2017)

Výzkum PANi v tkáňovém inženýrství se v posledním desetiletí dramaticky zvýšil kvůli jeho zmíněné snadné syntéze, nízké ceně, stabilitě a nastavitelné vodivosti založené na místním mikroprostředí. Výzkum se zabýval především oblastí regenerace srdce, koster a nervů. PANi má velký potenciál jako chytrý biomateriál, přesto je jeho biokompatibilita stále předmětem studií. Při krátkodobých studiích *in vitro* a *in vivo* byly při použití PANi pozorovány minimální záněty a toxicita, několik skupin prokázalo škodlivý chronický zánět a vláknité zapouzdření scaffoldu implantovaných po delší dobu. Také je známo, že produkt degradace a monomer anilin jsou vysoce karcinogenní. Z tohoto důvodu je nutné provádět výzkum ke stanovení nových metod syntézy, zpracování a výroby pro generování bezpečných a biologicky kompatibilních PANi (Akarawa a DeForest 2017).

### 3.1.2 Polypyrrol (PPy)

Jak již bylo zmíněno dříve, tak i polypyrrol (PPy) je jedním z nejvíce studovaných vodivých polymerů díky mnoha jeho charakteristickým vlastnostem, jako je vysoká elektrická vodivost a chemická stabilita ve vzduchu a rozpouštědlech. Chemická struktura PPy se skládá z opakujících se jednotek aromatických cyklů obsahujících dusík. Monomer pyrrol je rozpustný v mnoha různých druzích organických rozpouštědel a ve vodě, kdežto polymerovaný PPy je nerozpustný díky svému pevnému konjugovanému řetězci, proto je hůře zpracovatelný. Syntéza PPy je relativně snadná, kdy za vzniku PPy se monomerní pyrrol polymeruje elektrochemickými nebo chemickými oxidačními procesy (Gajendiran *et al.* 2017).

PPy lze snadno syntetizovat ve velkém množství při pokojové teplotě v běžných organických rozpouštědlech a ve vodě. Vodivosti PPy filmů lze dosáhnout až  $\sim 10^3 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$  v závislosti na typu a množství dopantu. Jakmile je však syntetizován, není příliš dobře zpracovatelný vzhledem ke své molekulární struktuře, která mu propůjčuje vlastnosti krystalického, mechanicky tuhého, křehkého a nerozpustného materiálu, což činí nemodifikované PPy nevhodné pro biomedicínské aplikace, jako je TI (Kaur *et al.* 2015). Pokud se budeme zaměřovat na konkrétní lékařské aplikace, je nutné PPy modifikovat především v rámci zvýšení biologické aktivity, aby bylo možné začlenit biomolekuly a zlepšit tak kompatibilitu s tkáněmi. Za biologickou modifikaci považujeme takové procesy, které upravují biofunkcionalizaci, drsnost povrchu, hydrofilnost, redoxní stabilitu, buněčnou specificitu a trojrozměrnost (geometrie). K takové modifikaci PPy se obvykle používá fyzická adsorpce a chemická kovalentní vazba požadovaných biomolekul. Fyzikální metoda je jednoduchá, ale adsorbované biomolekuly se vždy disociují a PPy je neaktivní. Proces dopingů může nejen indukovat vodivost PPy, ale také nekovalentně modifikovat PPy pro požadovanou aplikaci. Ve srovnání lze použít kovalentní techniku k vyvolání trvalejší funkcionizace PPy – kovalentní inserce funkčních skupin do hlavního řetězce PPy, lze dosáhnout úpravy vlastností PPy včetně zmíněných (Huang *et al.* 2014).

PPy má mnoho vynikajících vlastností reagujících na podněty, což z něj činí velmi slibný biomateriál. Má také dobrou *in vitro* a *in vivo* biokompatibilitu, chemickou stabilitu (na vzduchu i vodě) a přiměřeně vysokou vodivost za fyziologických podmínek (Balint, Cassidy a Cartmell 2014). PPy je tedy jedním z dobře zdokumentovaných a zkoumaných CP díky své biokompatibilitě, snadné syntéze a povrchové modifikaci, vodivosti a redoxní vlastnostem, schopnosti podporovat přilnutí a proliferaci buněk (Akawara a DeForest 2017).



Může být použit právě v tkáňovém inženýrství, poté jako implantáty, biosenzory a zařízení s molekulární pamětí a bioaktivátorů. Při elektrické stimulaci prochází PPy reverzibilní oxidačně-redukční reakcí, která vede až k 35% změně objemu, a tak se ukázal být účinným nástrojem při kontrolovaném uvolňování jak léčiv, tak růstových faktorů.

PPy má amorfni strukturu a je nerozpustný. Mohl by také modulovat buněčné aktivity, včetně syntézy DNA pomocí ES, migrace a buněčné proliferace v biologickém prostředí (Nezataki *et al.* 2018).

### 3.1.3 Polythiofen (PTh) a deriváty

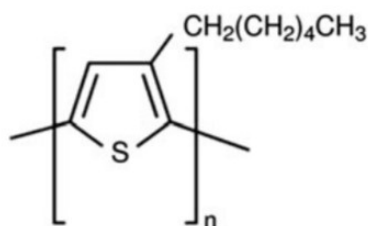
Polythiofeny (PTh) mají podobné vlastnosti jako PPy. PTh a jeho deriváty byly zkoumány pro využití v biomedicíně a biotechnologiích (Kaur *et al.* 2015). Z CP jsou obzvláště důležité deriváty PTh, protože došlo k velkému pokroku při řešení jejich vážných problémů rozpustnosti a zpracovatelnosti. Široce přijímaná strategie k překonání těchto problémů je založena na začlenění substituentů do polohy 3 thiofenového kruhu. Konkrétně bylo zjištěno, že začlenění dlouhých alkylových postranních řetězců zvyšuje rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech, zatímco hydrofilní substituenty produkují PTh rozpustné ve vodě anebo polárních rozpouštědlech (Pérez-Madrigal *et al.* 2012).

Zajímavým konjugovaným polymerem je poly(3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT) jako derivát PTh. PEDOT vzniká polymerací bicyklického monomeru 3,4-ethylendioxythiofenu a je to polymer skládající se z heterocyklických jednotek síry. Ve srovnání s PTh se PEDOT skládá z dioxyethylenové můstkové skupiny napříč polohami 3 a 4 každého heterocyklického kruhu polythiofenu, což poskytuje zlepšenou elektrochemickou stabilitu ve srovnání s PTh. Také zaručuje PEDOTu jeho dobrou elektrickou, chemickou a environmentální stabilitu, lepší vodivost a tepelnou stabilitu, než má PPy (Balint, Cassidy a Cartmell 2014; Gajendiran *et al.* 2017).

Přestože byl PEDOT objeven relativně později ve srovnání s jinými reprezentativními vodivými polymery jako je PPy a PANi, byl aktivně studován kvůli jeho vynikajícím elektrickým vlastnostem a chemické stabilitě. Zejména díky své optické průhlednosti přitahuje PEDOT značný zájem. Jednou z největších překážek při používání PEDOTu je jeho špatná rozpustnost, a proto i špatná zpracovatelnost. Ke zlepšení rozpustnosti se široce používá složená forma PEDOT s polystyrensulfonátem (PSS). Kombinace vodivého materiálu poly(3,4-ethylendioxythiofen) polystyrensulfonát (PEDOT:PSS) je považován za nejúspěšnější derivát PTh, protože vykazuje nízký oxidační potenciál a má tepelnou

a elektrochemickou stabilitu. To lze připsat právě zmíněné struktuře. Nízká impedance PEDOT: PSS vede k efektivnímu přenosu energie s vysokým signálem a nízkou úrovní šumu. PEDOT by také mohl být slibným materiálem pro biomedicínské aplikace. Interakce PEDOTu se živými buňkami a tkáněmi, např. epiteliálními, nervovými buňkami a kortikální tkání prokázaly nízkou cytotoxicitu a dobrou biokompatibilitu. Pokud je použit na přípravu scaffoldu, umožňuje adhezi buněk, proliferaci a signalizaci neuronálních buněk. Dnes se proto PEDOT používá v aplikacích pro biosenzorování a bioinženýrství, např. v nervových elektrodách či nervových štěpech (Akarawa a DeForest 2017).

Dalším zajímavým derivátem PTh je poly(3-hexylthiofen) (P3HT). P3HT má dobrou rozpustnost v organických rozpouštědlech, vynikající stabilitu prostředí a elektrickou vodivost. Přestože je P3HT rozpustný v mnoha rozpouštědlech, má spíše horší mechanické a elektrické vlastnosti spolu se špatnou stabilitou v extrémních podmínkách prostředí. Proto přítomnost alkylové skupiny v jeho struktuře hraje poněkud klíčovou roli při využití aplikací v optoelektronických zařízeních. Jednou ze složek při vývoji P3HT – 3-hexylthiofen je nesymetrický monomer a obecně syntéza polythiofenové skupiny zahrnuje pečlivé řízení její opakující se monomerní jednotky a zejména chování regioregularity polymeru. Kromě toho P3HT také běžně vykazuje slušnou fotoluminiscenci díky svým vysoce nastavitelným vlastnostem za různých podmínek syntézy. Molekulární struktura P3HT je uvedena na Obrázku č. 13 (Ahmad *et al.* 2017).



Obrázek č. 13: Chemická struktura poly(3-hexylthiofenu) (P3HT) (převzato podle Ahmad *et al.* 2017)

P3HT byl použit jako reprezentativní fotoaktivní polymer pro solární články a fotosenzory v organické elektronice kvůli své schopnosti efektivně vyrábět elektřinu absorpcí viditelného světla. Organická fotovoltaika na bázi P3HT byla také použita jako bezdrátové elektrické napájecí jednotky pro aplikace tkáňového inženýrství. P3HT také prokázal vynikající biokompatibilitu v několika studiích s primárními buňkami. Jako jeden

z takových příkladů je možné uvést studii na fotocitlivé polymerní scaffoldy se začleněním P3HT a epidermálního růstového faktoru, které významně zlepšily proliferaci fibroblastů kůže a epidermální diferenciaci kmenových buněk pod světelnou stimulací (Yang *et al.* 2017).

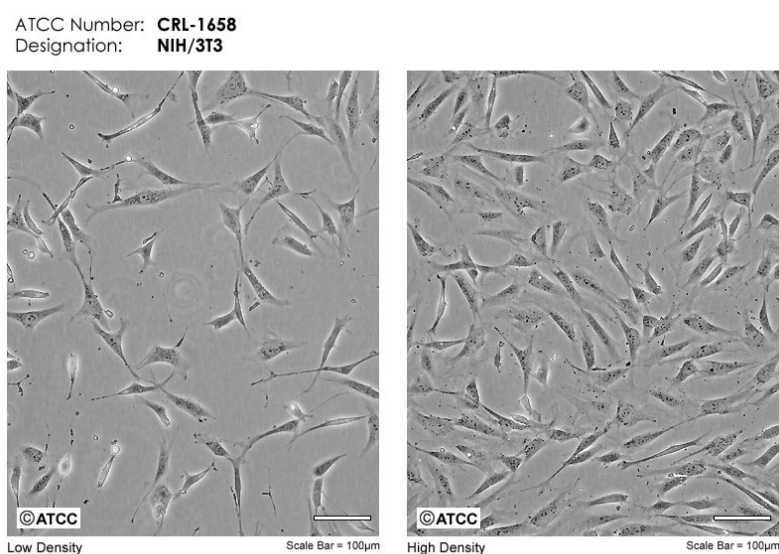
## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pro všechny experimenty probíhající v rámci diplomové práce byla použita adherentní buněčná linie NIH/3T3 odvozená od myších embryonálních fibroblastových buněk (ATCC® CRL-1658™, American Type Culture Collection, ATCC). Buněčná linie NIH/3T3 byla kultivována v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle *Medium*, ThermoFisher Scientific, USA) s přidavkem antibiotik penicilin – streptomycin (Biosera, Francie) a 10% Calf séra (BCS, Biosera, Francie). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích (TPP Trasadigen, Švýcarsko) v inkubátoru Heracell 150i (ThermoFisher Scientific, USA) při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a 5 % CO<sub>2</sub> atmosféře.

K dosažení vysoké životnosti byla provedena pravidelná pasáž buněčné linie. Nejprve byla vyloučena kontaminace pod inverzním světelným mikroskopem (IX51, Olympus, Japonsko). Objem média byl následně odsát z kultivační lahve a buňky promyty 1× fosfátovým pufrům (PBS, Biosera, Francie). Po důkladném propláchnutí buněk byl přidán trypsin (Biosera, Francie) a následovala inkubace. Po uvolnění buněk ode dna kultivační nádoby bylo přidáno kompletní kultivační médium – vznik buněčné suspenze. Následně byla buněčná suspenze vložena do falkony a stočena na centrifuze. Tento proces, v případě úspěšné kultivace a množení buněk, je nutné provést a opakovat 2× týdně pro zajištění správné konfluency buněk a použití pro testování.



Obrázek č. 14: Morfologie buněčné linie NIH/3T3. (převzato z ATCC: The Global Bioresource Center. [online])

## 4.2 Použité soupravy, chemikálie a roztoky

### Použité chemikálie

- ActinRed™ 555 (kat. č.: R37112, Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- Anilinchlorid (kat. č.: 40008–CT0–G0100-1, Lach-Ner, Česká republika)
- Avicel® PH-101 (kat. č.: 11365–1KG, Sigma Aldrich, USA)
- Calf Serum (kat. č.: CA-115/500, Biosera, Francie)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO, kat. č.: 276855–100ML, Sigma Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, kat. č.: LM–S2041/500, BioSera, Francie)
- Formaldehyd 36–38 % (kat. č.: 14150-11000, Penta s. r. o., Česká republika)
- Hoechst 33258 (kat. č.: H3569, Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- Hydrogenuhlíčitán sodný (kat. č.: 15350-3100, Penta s. r. o., Česká republika)
- Chlorid sodný p. a. (kat. č.: A171289/01, mikroCHEM, Slovenská republika)
- Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, kat. č.: 52100021, Gibco™ ThermoFisher Scientific, USA)
- Mowiol® 4-88 (kat. č.: 81382–250G, Sigma Aldrich, USA)
- Mowiol® 18-88 (kat. č.: 81365–250G, Sigma Aldrich, USA)
- MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (kat. č.: M1415.0005, Duchefa Biochemie, Nizozemí)
- Penicilin-Streptomycin Solution 100X (kat. č.: XC-A4122/20, Biosera, Francie)
- Persulfát amonný (APS, kat. č.: A3678–100G, Sigma Aldrich, USA)
- Poly(vinyl)alkohol  $M_w$  89,000–98,000, 99+% hydrolyzed (kat. č.: 341584–500G, Sigma Aldrich, USA)
- Triton™ X–100 (kat. č.: X100-100ML, Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (kat. č.: XC-T1717/100, Biosera, Francie)

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- 0,22  $\mu\text{m}$  stříkačkové filtry (kat. č.: 99722, TPP – Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Centrifuga 5702 R chlazený model pro vzorky závislé na teplotě (Eppendorf, ČR)
- Digestor odtahovaná MERCI G NextGen (MERCÍ s. r. o., ČR)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem (Olympus, Japonsko)
- Inkubátor s příslušenstvím Heracell™ 150i (ThermoFisher Scientific, USA)
- Inverzní mikroskop IX51 (Olympus, Japonsko)
- Laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko)
- Multifunkční modulární reader INFINITE M200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Třepačka Vortex GENIE 2 (Scientific Industries, USA)
- Ultrazvuk Elmasonic S 70 H s ohřevem (Elma, Spolková republika Německo)

## 4.4 Kryogely

Kryogely lze definovat jako třídu hydrogelů, ve kterých dochází k řízené polymeraci při teplotách pod bodem mrazu, čímž se získají makropóry obklopené elastickou propojenou sítí. Jsou to tedy supermakroporózní polymerní gely, jejichž velikost pórů se pohybuje od 1  $\mu\text{m}$  a více a jsou vyráběny procesem kryogelování – využití mrazu a použití ledu jako porogenu. Velikost a počet pórů v matrici jsou důležitými faktory, které mohou zásadně ovlivnit transportní vlastnosti gelu (Memic *et al.* 2019).

Kryogely lze vysledovat již ve 40. letech 20. století, ale k významnému zájmu o ně došlo až v 80. letech. Kryogely způsobily revoluci v oblasti biomedicínského výzkumu. Díky své vysoce propojené a otevřené makroporózní struktuře mají uplatnění v oblasti biomedicíny, biotechnologii a farmacii. Díky sadě jedinečných vlastností kryogelu, včetně trojrozměrné struktury, velkého obsahu vody, značné pórovitosti, vysoké propojitelnosti pórů a konzistence, se velmi podobají nativním měkkým tkáním (Memic *et al.* 2019). Hydrofilní a porézní struktura kryogelu výrazně ovlivňuje buněčnou afinitu a je vhodná pro buněčnou adhezi, jejich mechanická stabilita nabízí použitelnost v procesech *in vivo* – studie tkáňového inženýrství. Kryogely tedy poskytují nezbytnou architekturu pro trojrozměrné uspořádání buněk a morfologii otevřených pórů, které umožňují přísun živin a odstraňování odpadních metabolitů. Taktéž umožňují proces vaskularizace, kdy právě neschopnost podpory růstu cév omezuje úspěch vzniku syntetické tkáně (Henderson *et al.* 2013; Bakhshpour *et al.* 2019).

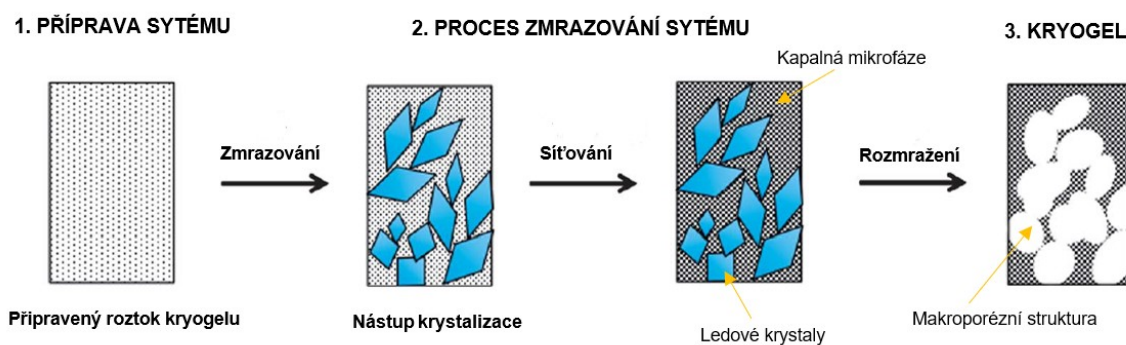
Supermakroporozita kryogelů umožňuje jejich použití bez problémů v procesu difúze s biologickými makromolekulami, lze také použít k čištění makromolekul (proteiny a nukleové kyseliny), k separaci buněčných organel, virů, plazmidů, mikroorganismů a buněk savců (Bakhshpour *et al.* 2019).

Kryogely jsou obvykle konstruovány z přírodních i syntetických polymerů. Materiály pro výrobu kryogelů se vybírají na základě vhodnosti pro ošetřovanou tkáň. Přírodní materiály podporují buněčnou interakci a mají nízkou toxicitu. Jejich potenciálně vysoké náklady a nízká mechanická pevnost se však jeví jako problematické. Syntetické materiály se ukázaly jako slibný materiál při výrobě scaffoldů, i přes mnohdy charakteristické nevýhody, včetně infekce, rejekce, i potenciálně nebezpečných vedlejších produktů degradace (Hixon, Lu a Sell 2017).



#### 4.4.1 Syntéza kryogelů

Kryogelování, tj. gelovatění při teplotách pod bodem mrazu, je jednoduchá metoda, která eliminuje potřebu odstraňování porogenu a vytváří inherentně vzájemně propojené póry ve struktuře scaffoldu. Postup kryogelování sestává z: 1) fázové separace s formováním ledových krystalů, 2) zesíťování a 3) polymerace. Následuje rozmrazení ledových krystalů za vzniku vzájemně propojené porézní kryogelové sítě. Jako porogeny se používají krystaly rozpouštědla (např. vodné médium). Odstranění porogenu se dosáhne pouhým udržováním kryogelu při teplotách nad bodem mrazu rozpouštědla. Gelový roztok se obvykle ochladí na teplotu mezi  $-5$  až  $-20$  °C. Při těchto teplotách velké procento rozpouštědla krystalizuje, část gelového roztoku se však udržuje v kapalně formě. Když rozpouštědlo krystalizuje, hydrogelové složky se koncentrují spíše v kapalných mikrofázích, které obklopují. Po vhodné době procesu gelovatění se kryogel vrátí na laboratorní teplotu. Rozmrazování krystalů rozpouštědla zanechává velké a vzájemně propojené póry – makroporézní struktura (Obrázek č. 15). Ve srovnání s jinými technikami používanými ke generování makroporézních gelů bývá kryogelování časově i materiálově efektivní metoda. Lze také snadno vyladit různé parametry k přizpůsobení kryogelů pro jejich zamýšlené použití. Mezi další výhody kryogelů patří flexibilita jejich přípravy (Henderson *et al.* 2013; Memic *et al.* 2019; Rogers a Bencherif 2019).

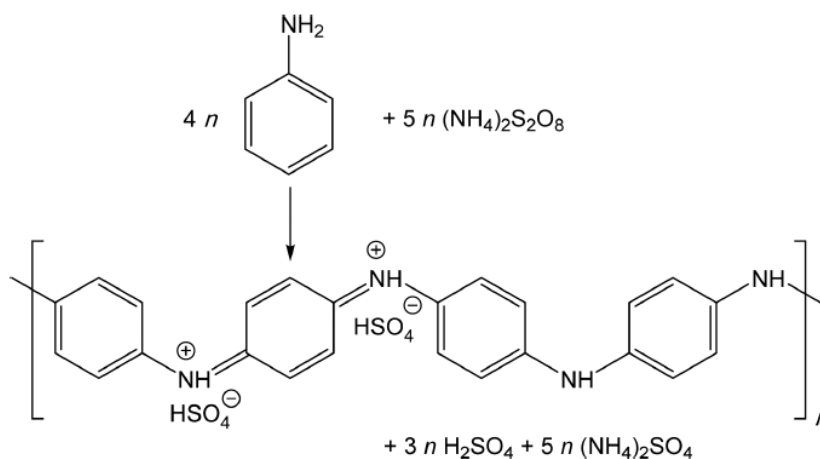


Obrázek č. 15: Kryogelování (upraveno podle Henderson *et al.* 2013)

#### 4.4.2 Příprava PANi/PVA kryogelů

Prvotním krokem pro přípravu kryogelů bylo nutné zvolit 3 typy PVA na základě molekulové hmotnosti a to: Mowiol® 4-88 ( $M_w \sim 31,000$ , Sigma Aldrich, USA), poly(vinyl)alkohol  $M_w$  89,000–98,000, 99+% hydrolyzed (Sigma Aldrich, USA) a Mowiol® 18-88 ( $M_w \sim 130\,000$ , Sigma Aldrich, USA). Z jednotlivých PVA byly vytvořeny 3 roztoky rozpuštěním 5 g příslušného PVA v 50ml odměrné baňce. Rozpuštění se provádělo v ultračisté vodě (UPW). Dále se roztok nechal zahřívat na magnetické míchačce v digestoři při teplotě 60–70 °C po dobu 24 h.

Polyanilin/poly(vinylalkohol) kryogely (PANi/PVA kryogely) byly připraveny oxidací 0,2 M anilin hydrochloridu (AH, Lach-Ner, Česká republika) s 0,25 M persulfátem amonným (APS, Sigma Aldrich, USA) v 5 hm% vodných roztocích poly(vinylalkoholu). Reakční schéma je znázorněno na Obrázku č. 16.



Obrázek č. 16: Reakční schéma oxidace anilinu s persulfátem amonným za vzniku soli polyanilinu (emeraldinová sůl) (převzato z Stejskal *et al.* 2017)

Pro přípravu roztoku PVA+AH byl rozpuštěn anilin chloridu ( $2,59 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) v připraveném roztoku příslušného typu poly(vinylalkoholu) a výsledná koncentrace AH byla 0,2 M. Následně byl připraven roztok 0,25 M persulfátu amonného ( $5,71 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ) v UPW. K tomuto roztoku byl také rozmíchán přídavek látek podporující tvorbu porézní struktury a to 3 možnosti: 2 hm% celulóza Avicel® PH-101 (Sigma Aldrich, USA), 0,9% chlorid sodný p. a. (mikroCHEM, Slovenská republika) a 2 hm% hydrogenuhličitan sodný (Penta s. r. o., Česká republika).

Celkem bylo vytvořeno 12 různých typů kryogelů podle Tabulky č. 3.

Tabulka č. 3: Připravené vzorky kryogelů

| Vzorek kryogelu | Poly(vinylalkohol)                                   | Přídavek                         |
|-----------------|--|----------------------------------|
| 1               | Mowiol® 4-88   | -                                |
| 2               |  | NaCl                             |
| 3               |  | Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> |
| 4               |  | Avicel                           |
| 5               | Poly(vinyl)alkohol<br>(M <sub>w</sub> 89,000–98,000) | -                                |
| 6               |  | NaCl                             |
| 7               |  | Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> |
| 8               |  | Avicel                           |
| 9               | Mowiol® 18-88  | -                                |
| 10              |  | NaCl                             |
| 11              |  | Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> |
| 12              |  | Avicel                           |

Čerstvě připravená směs, která sestávala z roztoků poly(vinylalkohol)/anilin chlorid a persulfát amonný s přídavkem NaCl, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> nebo Avicel, byla nasávána do plastových injekčních stříkaček a rychle vymrazena v ethanolu, který byl zchlazen tekutým dusíkem. Takto připravené vzorky byly uloženy v mrazničce při teplotě -18 °C po dobu 7 dnů k polymeraci. Při procesu polymerace polyanilinu se původně bílé vzorky změnilly na tmavě zelené až černé barvy. Po 7 dnech byly vzorky kryogelů rozmrazeny a odstraněny z injekčních stříkaček. Poté byly promyty vodou a ponechány ve vodě po dobu jednoho týdne, aby se odstranily všechny nízkomolekulární reaktanty či vedlejší produkty. Vytvořené vzorky kryogelů byly ohebné a elastické.

## 4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.5.1 Biologické testování – cytotoxicita

Pro biologické testování *in vitro* bylo zvoleno testování cytotoxicity materiálu podle normy ISO 10993. Samotné testování probíhalo podle části 5 této normy, tj. ISO 10993–5: 2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Posouzení cytotoxicity je možné vyhodnotit pomocí zkoušky extraktem. Extrakce probíhala podle ISO 10993–12: 2012 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály. Extrakční podmínky u této zkoušky jsou založeny na základě standardizovaného přístupu, který je v mnoha ohledech vhodným v rámci použití produktu. Pro testování cytotoxicity je přijatelná extrakce materiálu při  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  po dobu 24 h v kultivačním médiu. Extrakční teploty vyšší než  $37^\circ\text{C}$  mohou nepříznivě ovlivnit chemii nebo stabilitu séra a dalších složek v kultivačním médiu. Testovaný materiál kryogelu spadá do kategorie porézních materiálů nepravidelného tvaru, a proto je zvolen extrakční poměr  $0,1\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Obrázek č. 17) (ISO 10993–12:2012).

| Tloušťka materiálu [mm]  | Extrakční poměr<br>(povrchová plocha nebo hmotnost/objem)<br>$\pm 10\%$ | Formy materiálů                                       |
|--|---|---|
| <0,5   | $6\text{ cm}^2\cdot\text{ml}^{-1}$                                      | Film, fólie, trubičky                                 |
| 0,5–1,0  | $3\text{ cm}^2\cdot\text{ml}^{-1}$                                      | Trubičky, desky, malé tvarované předměty              |
| >1,0   | $3\text{ cm}^2\cdot\text{ml}^{-1}$                                      | Větší tvarované předměty                              |
| >1,0   | $1,25\text{ cm}^2\cdot\text{ml}^{-1}$                                   | Elastomerní uzávěry                                   |
| Nepřavidelně tvarovaná pevná forma                                 | $0,2\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$                                       | Prášek, granule, pěny, neabsorpční tvarované předměty |
| Nepřavidelně tvarovaná porézní forma (materiály s nízkou hustotou) | $0,1\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$                                       | Membrány, textil                                      |

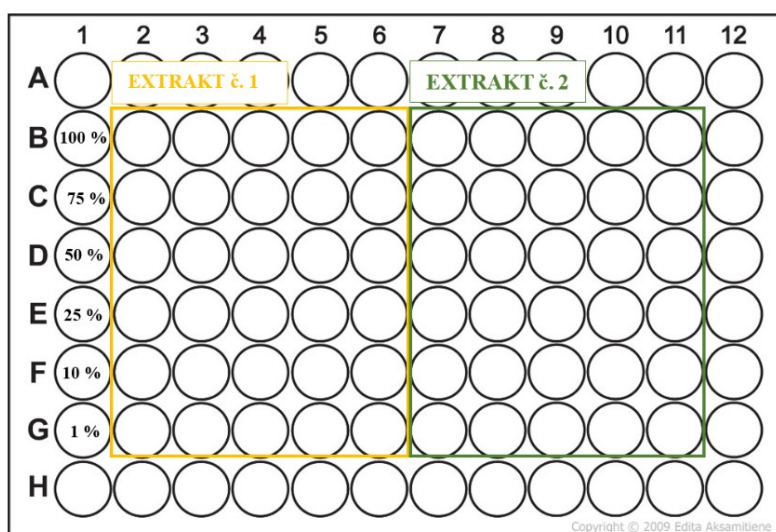
Obrázek č. 17: Standardní povrchové plochy materiálu a objemy extrakce podle normy ISO 10993–12:2012.

Vzorek kryogelu byl před samotnou extrakcí nařezán na drobné kousky pro zlepšení ponoření do extrakčního média, vložen do falkony a zvážen pro provedení vhodného ředění.

Po vytvoření extraktů, které byly inkubovány při  $37^\circ\text{C}$  po dobu 24 h za stálého třepání, se následně provedla jejich aplikace na předem připravené 96jamkové mikrotitrační desky s buněčnou linií NIH/3T3. Nasazení 96jamkových mikrotitračních destiček pro testování cytotoxicity rozumíme pasážování buněčné linie, vytvoření buněčné suspenze v koncentraci

$2 \times 10^5$  buněk v buněčné suspenzi a její následné napipetování 100  $\mu\text{l}$  do každé testované jamky. Takto připravené buňky se nechali po dobu 24 h adherovat v inkubátoru.

Každý extrakt před samotným nanesením na buněčnou linii byl přefiltrován pomocí 0,22  $\mu\text{m}$  filtrů pro zajištění sterility extraktů. Na jednu 96jamkovou mikrotitrační desku byly nanесeny 2 různé extrakty kryogelů v koncentracích 100, 75, 50, 25, 10 a 1 % podle Obrázku č. 18. Jednalo se tedy o napipetování příslušného objemu extraktu a doplnění do objemu 100  $\mu\text{l}$  na každou jamku, tj. koncentrace 75 % - 75  $\mu\text{l}$  extraktu kryogelů a 25  $\mu\text{l}$  kultivačního média.

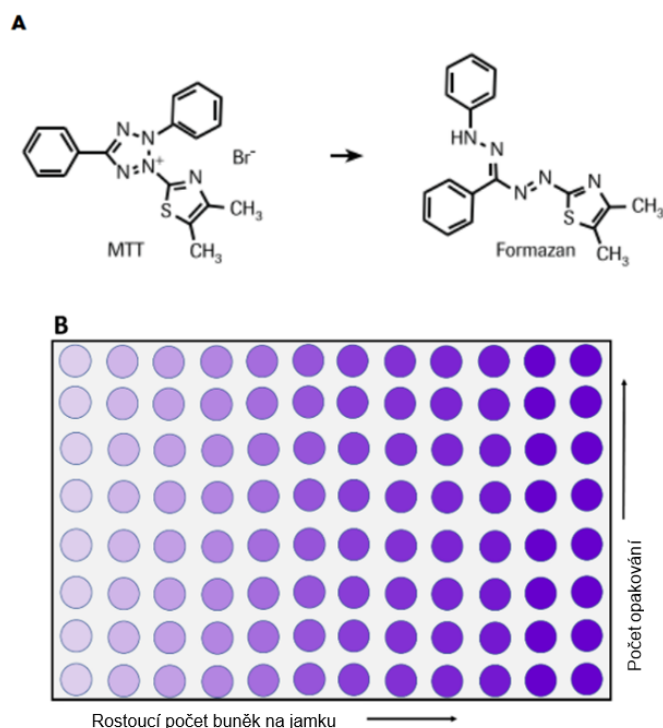


Obrázek č. 18: Schéma nasazení 96jamkové mikrotitrační destičky pro testování

Takto připravené desky s extrakty kryogelů byly uloženy do inkubátoru na 24 h a poté vyhodnoceny na cytotoxicitu pomocí MTT testu.

#### 4.5.2 MTT test

Měření životaschopnosti a proliferace buněk tvoří základ pro četné *in vitro* testy reakce buněčné populace na vnější faktory. MTT test je kolorimetrický test, který měří metabolickou aktivitu buněk a je vhodný pro analyzování jejich proliferace, viability a cytotoxicity materiálu. Test je založen na redukci žluté tetrazoliové soli neboli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid) na purpurové krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami (Obrázek č. 19). Reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk, za vzniku redukčních ekvivalentů jako je NADH a NADPH. Počet živých buněk je tedy indikován množstvím redukováného MTT, kdy výsledný intracelulární fialový formazan může být solubilizován a kvantifikován spektrofotometricky při 570 nm. Čím je roztok tmavší, tím větší je počet životaschopných, metabolicky aktivních buněk (Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation., In vitro testování scaffoldů II., MTT Cell Proliferation Assay. [online]).



Obrázek č. 19: Redukce MTT na formazan pomocí životaschopných buněk v chemické reakci (A) a na 96 jamkové mikrotitrační destičce (B) (převzato z Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation. [online]).

Před provedením MTT testu byla provedena kontrola buněk pod inverzním mikroskopem. V laminárním boxu se poté odsál extrakt kryogelu a bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  kultivačního média a 10  $\mu\text{l}$  roztoku MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemí) do jedné testované jamky, který byl předem zředěn na výslednou koncentraci 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  UPW. Následně se mikrotitrační desky vložily zpět do inkubátoru na dobu 4 h. Po uplynutí inkubace byl odsát obsah jamek, bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  DMSO a vše bylo inkubováno 15 minut. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení při 570 nm pomocí čtečky Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko).

#### 4.5.3 Test proliferace buněk na kryogelech

Pro určení proliferace buněk a jejich prorůstání vzorkem kryogelu bylo provedeno nařezání jednotlivých vzorků na plátek o stejné výšce cca 0,5 cm a byly vloženy do 24jambkové mikrotitrační destičky. Následně se na kryogel nasadily připravené buňky o koncentraci  $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Vše bylo inkubováno po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby se provedla fixace, permeabilizace a barvení buněčné kultury.

Jednalo se o odsátí média a zbytku buněčné kultury z jamek a napipetování 700  $\mu\text{l}$  4% formaldehydu. Po 15 minutách se formaldehyd odsál, vzorek se promyl 700  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru PBS a opět odstranil. Následně bylo ke vzorku přidáno stejné množství 5% Triton X-100 na 5 minut. Objem jamky byl opět odsát a 3 $\times$  promyt PBS. Na závěr bylo napipetováno 700  $\mu\text{l}$  PBS a přidáno barvivo 1 kapka $\cdot\text{ml}^{-1}$  ActinRed<sup>TM</sup> 555 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Hoechst 33258. Nabarvená buněčná kultura na vzorku kryogelu byla ponechána po dobu 30 minut ve tmě (použití alobalu) a vyhodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81.

Aktin je globulární strukturní protein, který polymeruje v dlouhá vlákna zvaná mikrofilamenta (F-aktin). Zabezpečuje skeletální a motilní funkce. Síť aktinových vláken brání deformaci buňky, přenáší tlak, brání difuzi organel, zesiluje plazmatickou membránu a omezuje laterální migraci membránových proteinů (Cytoskelet a molekulární motory: Biologie a patologie, LF MUNI. [online]). Barvení aktinu je velmi užitečné při určování struktury a funkce cytoskeletu v živých i fixovaných buňkách. Cytoskelet je velmi dynamická a labilní struktura v živé buňce, ale může být fixována například formaldehydem před samotným barvením aktinových struktur. Ve fixovaných buňkách lze aktinové struktury vizualizovat pomocí fluorescenčních phalloidinů, aktinových protilátek nebo elektronové mikroskopie. Barvivo ActinRed<sup>TM</sup> 555 se váže pouze na strukturu F-aktinu, a proto má nízké pozadí. Kromě toho se barvení aktinem mezi jednotlivými druhy zřetelně

neliší (Actin Staining Techniques. [online]). ActinRed<sup>TM</sup> 555 je excitován při 540 nm a jeho emisní maximum se nachází při 565 nm. Je velmi často detekován pomocí standardních filtrů TRITC (Rhodamin / DiI / Cy3 / Alexa) (ActinRed<sup>TM</sup> 555 ReadyProbes<sup>®</sup> Reagent Protocol. [online]).

Hoechst 33258 je populární kontrastní barvivo pro barvení nukleových kyselin, které po navázání na dsDNA emituje modrou fluorescenci. Vzhledem k tomu, že barvivo Hoechst 33258 označuje právě DNA, běžně se také používá k vizualizaci jader a mitochondrií. (Hoechst 33258 Staining Dye Solution [online]).

Hoechstovo barvivo může být použito na živých nebo fixovaných buňkách a často se používají jako náhrada za jiné barvivo nukleové kyseliny (DAPI). Klíčovým rozdílem mezi nimi je to, že další ethylová skupina Hoechstova barviva ho činí lipofilnější, a tím lépe prochází neporušenými buněčnými membránami. Toto barvivo je excitováno ultrafialovým světlem při 350 nm a emituje modré fluorescenční světlo kolem emisního maxima při 461 nm (Hoechst 33258, 33342 – Product Information. FluoProbes. [online]).

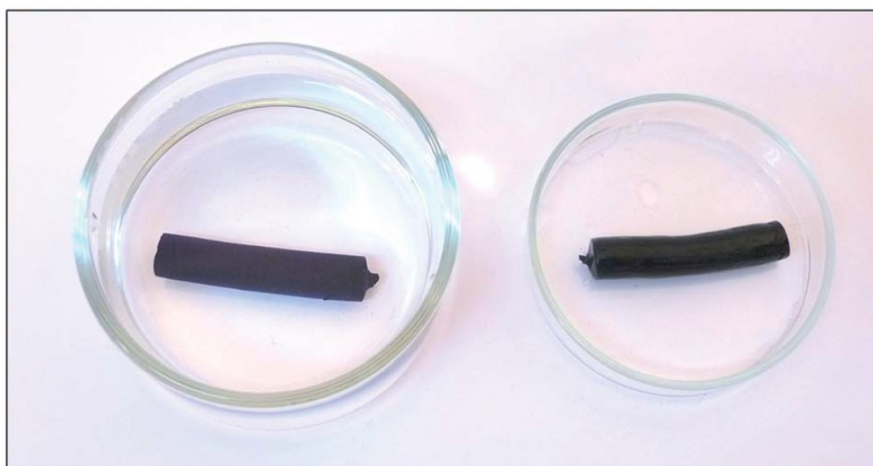


## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 PANi/PVA kryogely

Příprava PANi/PVA kryogelů proběhla procesem kryogelování, přičemž bylo zhotoveno celkem 12 různých typů kryogelů podle Tabulky č. 3, uvedené v kapitole: 4.4.2 Příprava PANi/PVA kryogelů.

Jak již bylo uvedeno k provedení přípravy vzorků PANi/PVA kryogelů byly použity 3 typy PVA o různé molekulové hmotnosti a ke každému vzorku typu PVA přidány 3 přídatné látky a to NaCl, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> a mikrokrystalická celulóza Avicel pro podpoření tvorby pórovité struktury. Pro provedení procesu kryogelování a jejich rozmrazení po 7 dnech, byly vzorky promyty a uloženy ve vodě po dobu jednoho týdne, aby se odstranily všechny nízkomolekulární reaktanty a vedlejší produkty. Výsledné připravené vzorky PANi/PVA kryogelů a jejich konzistence je znázorněna na Obrázku č. 20.



Obrázek č. 20: Vzorek připraveného PANi/PVA kryogelu

Následně byly vzorky prohlédnuty a vybrány ty, jejichž vlastnosti odpovídaly provedení navazující práce a tyto kryogely jsou uvedené v Tabulce č. 4. Připravené kryogely by měly být měkké, elastické a vzhledem k typu polymerace, která se provádí ve zmrazeném vodném médiu, se tak vytvoří houbovitá struktura. Zároveň jejich mechanické vlastnosti umožňují snadnou manipulaci. Některé vzorky však nevykazovaly strukturální charakteristiku kryogelu, po promytí se vzorky rozpadaly a neudržely celistvý a soudržný tvar, proto nebyly vhodné pro následující testování.

Tabulka č. 4: Vybrané vzorky PANi/PVA kryogelů

| Vzorek kryogelu | Poly(vinylalkohol)                                   | Přídavek                         |
|-----------------|--|----------------------------------|
| 1               | Mowiol® 4-88   | -                                |
| 2               |  | NaCl                             |
| 4               |  | Avicel                           |
| 5               | Poly(vinyl)alkohol<br>(M <sub>w</sub> 89,000–98,000) | -                                |
| 6               |  | NaCl                             |
| 7               |  | Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> |
| 8               |  | Avicel                           |
| 12              | Mowiol® 18-88  | Avicel                           |

## 5.2 Biologické testování cytotoxicity

Na základě normy ISO 10993–5: 2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* bylo provedeno testování jako zkušební metody pro hodnocení *in vitro* cytotoxicity. Tato metoda specifikuje inkubaci kultivovaných buněk v kontaktu s extrakty vzorků PANi/PVA kryogelů a je vhodná ke stanovení biologické odpovědi savčích buněk *in vitro* s použitím vhodných biologických parametrů. Vzorky PANi/PVA kryogelů byly připraveny v souladu s normou ISO 10993–12: 2012 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály.

Pro vyhodnocení cytotoxického účinku vzorků PANi/PVA kryogelů na buněčnou kulturu NIH/3T3 byl proveden testovací protokol založen na měření životaschopnosti buněk po kultivaci v kryogelových extraktech (1, 10, 25, 50, 75 a 100 %) prostřednictvím metabolické aktivity – MTT test.

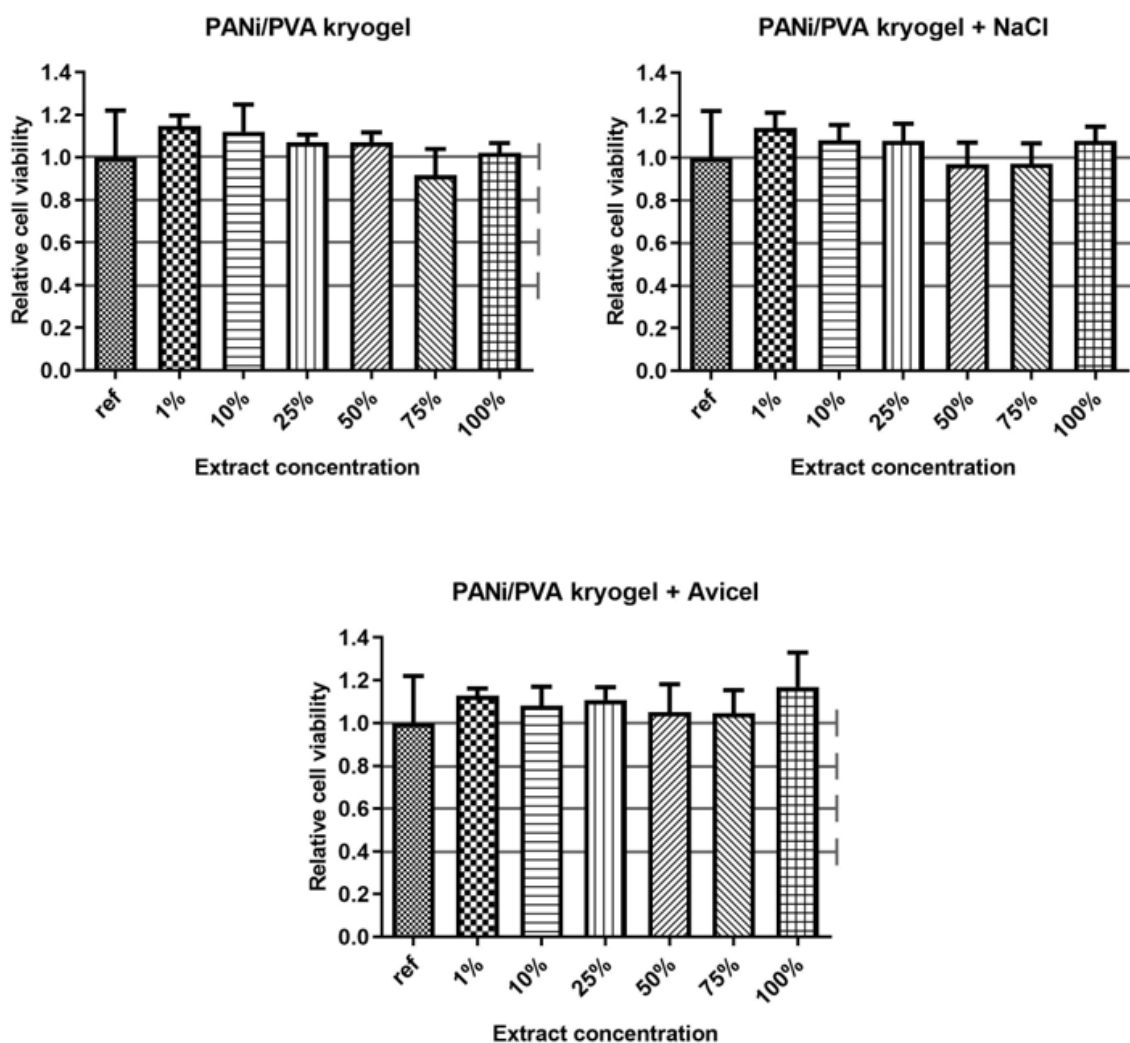
Cytotoxický účinek extraktů vzorků PANi/PVA kryogelů na buňky NIH/3T3 byla prezentována ve srovnání s kultivovanými buňkami NIH/3T3 v kultivačním médiu bez kryogelového extraktu (označený jako reference). Účinky extraktů vzorků PANi/PVA kryogelů na buněčnou kulturu byly testovány krátkodobě. Jedná se o 1denní předkultivaci, 1denní kultivaci s extraktem vzorků kryogelů a poté MTT cytotoxický test.

V rámci vyhodnocení podle normy ISO 10993–5: Cytotoxický MTT test lze cytotoxicitu hodnotit podle stupnice:

|          |                           |
|----------|---------------------------|
| > 0,8:   | bez efektu cytotoxicity   |
| 0,6–0,8: | mírně cytotoxický efekt   |
| 0,4–0,6: | středně cytotoxický efekt |
| < 0,4:   | silně cytotoxický efekt   |

Hodnocení cytotoxicity je velmi důležité pro použité kryogely jako možné scaffoldy. Samotný MTT test se často používá k hodnocení *in vitro* cytotoxicity polymerních složek. Jedná se o rychlou efektivní metodu pro testování mitochondriálního poškození a docela dobře koreluje s buněčnou proliferací. Cytotoxický účinek na životaschopnost buněk je znázorněn na Obrázcích č. 21–23.

Účinky jednotlivých procentuálních PANi/PVA kryogelových extraktů bez/s přidavky NaCl a mikrokrystalické celulózy Avicel na životaschopnost myších embryonálních fibroblastů (NIH/3T3) po 24 hodinách inkubace jsou uvedeny na Obrázku č. 21. V tomto případě byl pro zhotovení kryogelu použit poly(vinylalkohol) o molekulové hmotnosti  $M_w \sim 31\,000$  (Mowiol® 4-88).

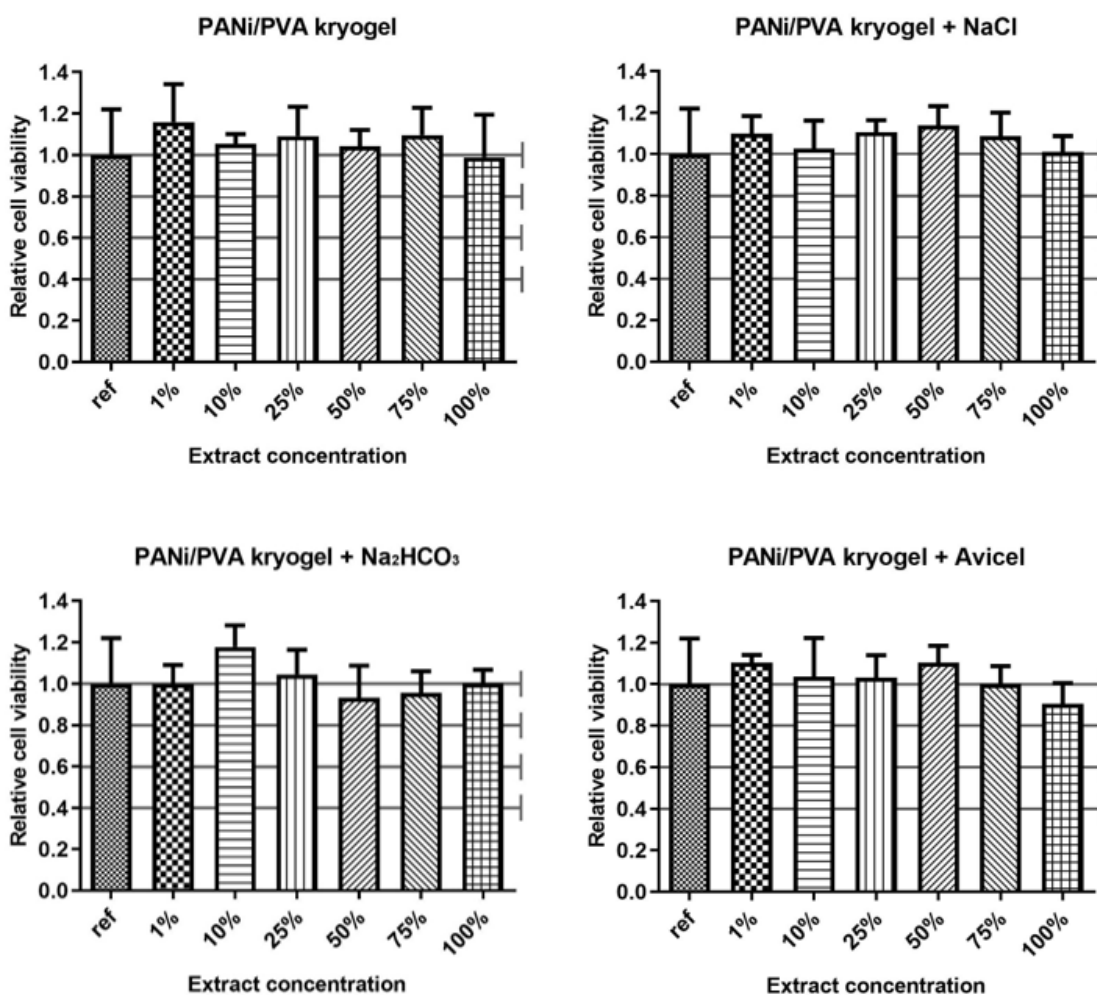


Obrázek č. 21: Životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po expozici extraktů PANi/PVA kryogelů (Mowiol® 4-88) po dobu 24 h

Podle zmíněné normy ISO 10993-5: 2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* jsou vzorky kryogelových extraktů s viabilitou buněk větší než 80 % považovány za necytotoxické. Ve 3 případech vzorků PANi/PVA kryogelů čistého i s přidavky NaCl a mikrokrystalické celulózy Avicel pozorujeme ve všech kryogelových extraktech (1, 10, 25, 50, 75 a 100 %) životaschopnost buněk větší než 80 % v rámci inkubace 24 h a následného vyhodnocení.

V porovnání těchto 3 vzorků PANi/PVA kryogelů můžeme vidět, že značnou viabilitu a nejméně výraznou cytotoxicitu má poté vzorek PANi/PVA kryogel s přidavkem mikrokrystalické celulózy Avicel (hodnoty přibližně 100 %).

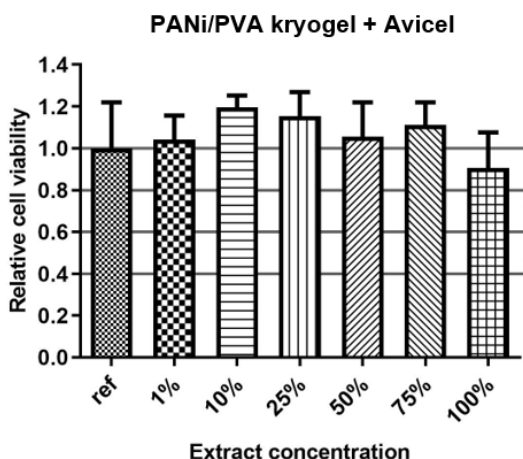
Stanovení cytotoxicity PANi/PVA kryogelových extraktů vůči myším embryonálním fibroblastům pomocí MTT testu bylo provedeno také u vzorků kryogelů vytvořených z poly(vinylalkoholu) o molekulové hmotnosti  $M_w$  89,000–98,000. Výsledky viability buněk NIH/3T3 po 24hodinové kultivaci v přítomnosti extraktů testovaných vzorků kryogelů připravených bez i s přidavky NaCl,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  a mikrokrystalické celulózy Avicel jsou uvedeny na Obrázku č. 22.



Obrázek č. 22: Životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po expozici extraktů PANi/PVA kryogelů (PVA  $M_w$  89,000–98,000) po dobu 24 h

V tomto případě vzorků PANi/PVA kryogelů se povedlo otestovat všechny vytvořené varianty kryogelů. Stanovení cytotoxicity kryogelových extraktů vůči myším embryonálním fibroblastům opět nezaznamenaly významný negativní dopad na buněčnou kulturu, kdy hodnoty cytotoxicity dle stupnice normy ISO: 10993–5: 2009 korelují s efektem kryogelů bez cytotoxicity.

Taktéž bylo provedeno hodnocení vzorků PANi/PVA kryogelů vytvořených typem poly(vinylalkoholu) Mowiol® 18-88 o molekulové hmotnosti  $M_w \sim 130\,000$ . Zde byl však pro testování vybrán pouze typ vzorku s přidavkem mikrokrystalické celulózy Avicel. Tento vzorek vykazoval strukturální charakteristiku kryogelu, nerozpadal se a udržel soudržný tvar. Vzhledem k nízkým mechanickým vlastnostem ostatním vzorků tohoto typu poly(vinylalkoholu) nebylo možné dosáhnout provedení biologického testování cytotoxicity.



Obrázek č. 23: Životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po expozici extraktů PANi/PVA kryogelů (Mowiol® 18-88) po dobu 24 h

Na obrázku č. 23 můžeme vidět výsledky biologického testování cytotoxicity na kryogelových extraktech (1, 10, 25, 50, 75 a 100 %) včetně reference. MTT cytotoxický test byl tedy proveden pouze u kryogelového extraktu s přidavkem celulózy Avicel za účelem zkoumání cytotoxické/necytotoxické odpovědi kryogelů na NIH/3T3 buňky. I v tomto případě byl vzorek PANi/PVA kryogelu shledán jako necytotoxický pro buněčnou linii NIH/3T3.

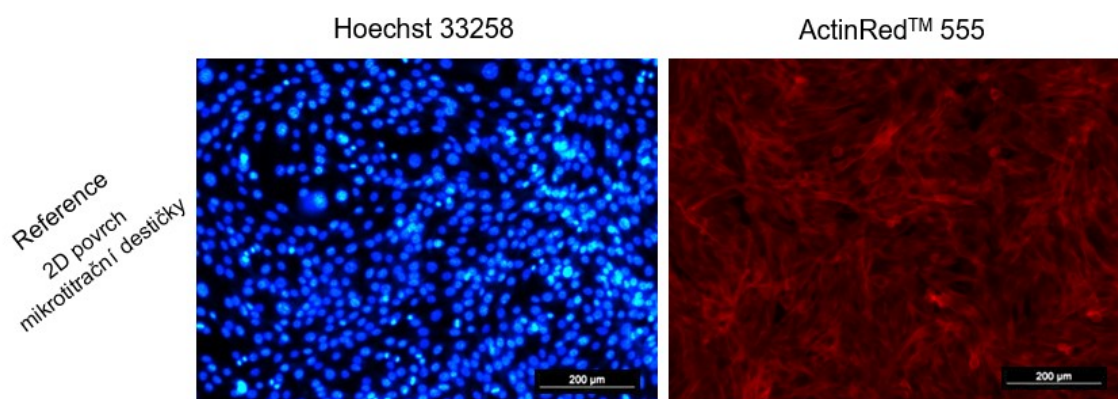
### 5.3 Test proliferace buněk na vybraných vzorcích PANi/PVA kryogelů

Pro aplikaci jakéhokoli scaffoldu – kryogelu ve tkáňovém inženýrství se předpokládá, že bude v kontaktu s buňkami. Samotná adheze buněk na povrchy *in vivo* závisí na adhezi proteinů, což může významně změnit povrchové vlastnosti materiálu. Přesto je hodnocení adheze buněk za podmínek *in vitro* a určení proliferace obecně přijímanou technikou pro hodnocení interakce mezi povrchy a buňkami. Proto byla reakce buněčné linie NIH/3T3 testována na vzorcích PANi/PVA kryogelech v podobě plátků o stejné výšce (0,5 cm) a byly vloženy do 24jamkové mikrotitrační destičky.

Buněčná kultura na vzorcích PANi/PVA kryogelů byla nabarvena fluorescenčními barvivy ActinRed<sup>TM</sup> 555 a Hoechst 33258 pro znatelnou a lepší viditelnost buněčné morfologie a proliferace. Samotné barvivo ActinRed<sup>TM</sup> 555 je použitelné v rámci určování struktury a funkce cytoskeletu a Hoechst 33258 se využívá jako kontrastní barvivo pro barvení nukleových kyselin.

Byla provedena a hodnocena schopnost buněčné linie NIH/3T3 růst a proliferovat na vzorcích PANi/ PVA kryogelů v porovnání s referencí (kontrola). Buněčná kultura NIH/3T3 byla tedy nasazena na PANi/PVA kryogely bez/s přísady NaCl, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> a mikrokrystalické celulózy Avicel po dobu 48 h a po uplynutí doby se provedlo barvení buněčné kultury. Vzorky PANi/PVA kryogelů společně s proliferovanými buňkami byly vyhodnoceny na základě mikrofotografií pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81.

Na obrázku č. 24, naznačující proliferaci v rámci referenčního vzorku, je tradičně buněčná kultura kultivována pro růst *ex vivo* na dvourozměrném povrchu mikrotitrační destičky. Je zde pozorována rovnoměrná distribuce buněk, kdy cytoskelet fibroblastů je typicky rozvětvený, protáhlý a buněčné jádro je oválného tvaru. V takových prostředích jsou buňky mnohdy nuceny přijmout nepřírozené vlastnosti, včetně možné zploštělé morfologie. Vzhledem k tvaru cytoskeletu a jader buněk obklopenými jasně ohraničenými F-aktinovými vlákny (červeně) se však ukázalo barvení pomocí fluorescenčních barviv Hoechst 33258 a ActinRed<sup>TM</sup> 555, že buněčná linie NIH/3T3 kultivované na vzorku reference má příznivé prostředí pro interakci mezi jednotlivými buňkami.



Obrázek č. 24: Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 na vzorku reference na dvourozměrném povrchu mikrotitrační destičky

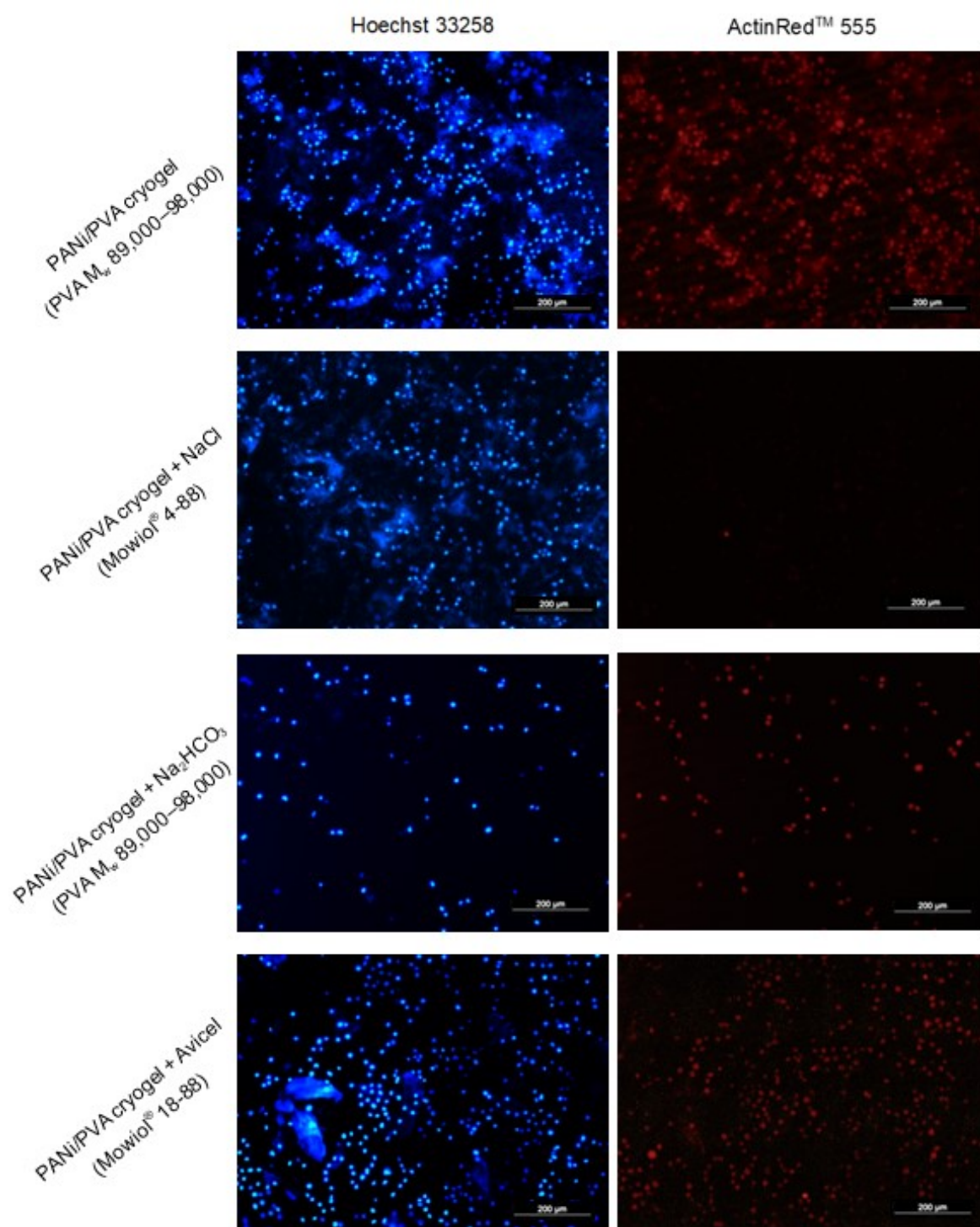
Pro znázornění testování proliferace na vzorcích PANi/PVA kryogelů pomocí kontrastního barvení a fluorescenční mikroskopie byly vybrány vzorky s vhodnou adhezí a migrací buněk. Možná zhoršená kvalita mikrofotografií může být způsobena růstem buněk v odlišných vrstvách struktury kryogelů a nebylo tak možné přesně zaostřit na buňky v určité vrstvě. Kryogely jsou formou materiálu, které se mohou použít k podpoře *ex vivo* trojrozměrného růstu buněk a je zde pozorovatelná možnost migrace a růstu buněk v makroporézní struktuře.

Vybrané mikrofotografie vzorků PANi/PVA kryogelů bez/s přísady NaCl, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> a mikrokrystalické celulózy na Obrázku č. 25 naznačují, že na všech těchto vzorcích byly myší embryonální fibroblasty schopny adhezovat a po dobu 48 h proliferovat na polymerní matici. Buňky si na těchto vzorcích zachovávaly schopnost růstu a proliferace, avšak dochází ke změnám v morfologii fibroblastů, kdy ztrácí svůj typický rozvětvený tvar cytoskeletu. V přítomnosti vzorku PANi/PVA kryogelu s přísadou NaCl (Mowiol® 4-88) byly buňky schopny růst po dobu 48 h, přesto zde není znatelné kontrastní barvení cytoskeletu pomocí ActinRed™ 555. Stejně tak tomu bylo i u vzorku PANi/PVA kryogelu s NaCl (PVA M<sub>w</sub> 89,000–98,000).

Na vybraných příkladech vzorků PANi/PVA kryogelů není výrazný pokles buněk NIH/3T3 a nejedná se tedy o cytotoxický efekt. Vzorky, které nejsou znázorněny na Obrázku č. 25, vykazovaly podobný trend růstu a adherence buněk i v rámci čistého PANi/PVA kryogelu



nebo s přidávkou látek. Bohužel zde nebylo pomocí kontrastního barvení ActinRed™ 555 znázorněn dostatečně cytoskelet či znázorňoval podobnou změnu morfologie.



Obrázek č. 25: Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 na vybraných vzorcích PANi/PVA kryogelů

Celkově u vzorků PANi/PVA kryogelů s přidavkem mikrokrystalické celulózy Avicel bez rozdílu molekulové hmotnosti PVA buňky zachovávají výhodnou tendenci růstu a proliferace. Podobný sklon vykazují i buňky na povrchu PANi/PVA kryogelech bez přidavku látek. O méně intenzivnější počet buněk můžeme pozorovat při kultivaci u PANi/PVA kryogelů obsahující NaCl a poté Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>.

Výsledky testu proliferace buněk NIH/3T3 korelují s výsledky biologického testování cytotoxicity pomocí extraktu.

## 6 DISKUZE

Vodivé polymery, jako je zde použitý polyanilin, nacházejí mnoho uplatnění díky své vodivosti a elektrochemické aktivitě. PANi je také schopen reagovat na různé vnější podněty změnou elektrických či optických vlastností a často je tedy používán jako vodivá složka v různých typech a formách kompozitů.

Makroporézní vodivé materiály na bázi polyanilinu a nosného polymeru poly(vinylalkoholu) jsou vhodnými kandidáty polymerních kryogelů umožňující svou kombinací vlastností poskytnout eminentní rozhraní fází elektronového (elektroda) a iontového přenosu (elektrolyt) mezi biologickými a syntetickými systémy (Liang *et al.* 2015). Výsledkem je poté jejich aplikace do mnoha oblastí biomedicíny a tkáňového inženýrství jako potencionálně vhodné biomateriály.

Syntéza samotného makroporézního kryogelu je zahájena využitím účinku zmrzlého vodného roztoku obsahujícího rozpuštěné látky, kdy rozpuštěné látky jsou vypuzeny z rostoucího ledového krystalu a jsou koncentrovány v kapalně nezamrzlé fázi. Kapalná fáze se tvoří v síti ledových krystalů. Systém obsahující monomery, zesíťovadlo – nosný polymer a iniciátor se nachází v nezamrzlé fázi, v níž probíhá polymerační reakce a dochází ke vzniku polymerního kryogelu. Po rozmrazení ledové krystaly roztají a zůstane makroporézní gelová struktura, kde póry jsou replikou sítě ledových krystalů. Póry jsou tedy vzájemně propojené právě díky tavení spojených krystalů (Kirsebom *et al.* 2010, Stejskal a Bober 2018).

V případě reakční směsi PANi/PVA kryogelu probíhá polymerace PANi v prostředí ethanolu zchlazeném v tekutém dusíku a po rozmrazení se získá makroporézní struktura. Nosný polymer v podobě poly(vinylalkoholu) tvoří síť mezi ledovými krystaly během zmrazování a ta je dále posílena i polyanilinem. PANi se vyrábí v blízkosti nosné polymerní fáze, kde se reaktanty koncentrují. Výsledný PANi kryogel posílený poly(vinylalkoholem) je měkký, pružný houbovitý materiál zelené až černé barvy. To je dáno procesem polymerace polyanilinu, kdy vzniká nejdůležitější forma polyanilinu – polooxidovaná forma emeraldin, jež je zelené barvy a vykazuje charakter elektrické vodivosti.

Poly(vinylalkohol) je hydrofilní polymer, který je díky své vynikající biokompatibilitě oblíbený pro použití v oblasti medicíny. Vytvořené kryogely (hydrogely), za pomoci nosného polymeru jako je PVA, jsou neškodné, transparentní (umožňují snadnou kontrolu procesu hojení) a především jsou schopné účinně absorbovat vodu. Výtěžnost a tvorba

kryogelu silně závisí na typu polymeru PVA a také na počtu cyklů zmrazení/rozmrazení. Podle literatury polymery s nízkou hodnotou molekulové hmotnosti totiž buď špatně tvoří gel (PVA  $M_w \sim 88\,000$ ), nebo netvoří gel vůbec (PVA  $M_w \sim 25\,000$ ). U hodnot molekulových hmotností PVA  $M_w$  130 000–145 000 lze dosáhnout dobré gelové frakce i v rámci jednoho cyklu zmrazení/rozmrazení při tvorbě kryogelu (Stasko *et al.* 2008). V rámci diplomové práce však vznikly poměrně stabilní vzorky i za použití PVA  $M_w \sim 31\,000$  (značka Mowiol® 4-88), a to včetně přísad dalších látek. Byly zde vytvořeny měkké, pružné a kompaktní kryogely pro testování. Stejně tomu tak bylo i v případě o molekulové hmotnosti PVA  $M_w$  89,000–98,000 – všechny vytvořené varianty vzorků kryogelů (bez i s přísadky NaCl,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  a mikrokrystalické celulózy Avicel) vykazovaly dobré mechanické a strukturální charakteristiky. Posledním testovaným typem byl PVA o molekulové hmotnosti  $M_w \sim 130\,000$  (značka Mowiol® 18-88), zde byl vytvořen celistvý kryogel pouze jeden a to PANi/PVA s přísadkou mikrokrystalické celulózy Avicel. Možné změny molekulových hmotností s porovnáním podle Stasko *et al.* 2008 je skutečnost, že v tomto případě se nejedná přímo o PVA gely, nýbrž kombinace dvou polymerních materiálů PANi a PVA, kdy v tomto případě jsou často vybrány právě PVA s nižší molární hmotností kvůli dobré biokompatibilitě a snadné chemické modifikaci.

Kryogely jsou používány v oblasti tkáňového inženýrství i souvisejících biomedicínských oblastech a jejich velikost a struktura pórů jsou důležitým parametrem ve studiu těchto biomateriálů. Velikost pórů hraje důležitou roli, póry musí být dostatečně velké pro proniknutí buněk do kryogelu a jeho kolonizace. Přesná velikost pórů závisí na konkrétním využití biomateriálu, a to především na základě jeho kontaktu s daným typem tkáně. Proto pro ovlivnění velikosti pórů a jejich účelnosti byly zvoleny látky – možné porogeny nebo pěnidla.

Právě chlorid sodný (NaCl) s různými koncentracemi může sloužit jako porogen. Pórovitost a velikost pórů v důsledku použití tohoto porogenu je možné významně zvýšit, což má za následek přežití a diferenciaci buněk. Avšak je vždy vhodné volit jistou koncentraci, protože nadměrné množství NaCl jako porogenu může poškodit samotnou porézní strukturu kryogelů, což může vést k nestabilní struktuře. Koncentrace přísadky NaCl byla zvolena jako koncentrace fyziologického roztoku, tj. 0,9% roztok NaCl. Roztok má osmolaritu přibližně jako plazma a označujeme jej jako izotonické (Li *et al.* 2017).

Pro tvorbu porézní kryogelové struktury a zvýšení porozity je možné také využít metodu pěnové techniky, při které se pomocí pěnicích činidel vytvoří porézní struktura. Obvykle lze

použit dva druhy pěnidel, tj. uhličitanové sloučeniny (uhličitan hořečnatý/vápenatý, hydrogenuhličitan sodný/draselný) a organická rozpouštědla (pentan, 2-methylbutan, hexan) (Kabiri, Omidian a Zohuriaan-Mehr 2003). Organická rozpouštědla však nejsou vhodná pro výrobu scaffoldů vzhledem k jejich cytotoxicitě. Z tohoto důvodu byla jako další látka zvolen necytotoxický  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ . U vzorků PANi/PVA kryogelů byl použita koncentrace 2 hm%  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  pro získání homogenní porézní struktury a látka byla přidána do polymeračního roztoku. V rámci spojení roztoku s  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  docházelo k vývoji plynových bublinek oxidu uhličitého. Bublínky zůstaly ve viskózní směsi roztoku a při ponoření do ethanolu zmrazeného tekutým dusíkem byly zachyceny a následně vytvořily pěnovou strukturu. Pěna vycházela nepřetržitě, pomalu a homogenně. Možná zvýšená tvorba bublinek oxidu uhličitého a tvorba pěny měla však u některých typů vzorků PANi/PVA kryogelů za následek nesoudržný tvar a rozpadavý charakter výsledného kryogelu, byl dochován pouze jeden vzorek: PANi/PVA kryogel (poly(vinyl)alkohol  $M_w$  89,000–98,000).

Kombinace přírodní biomasy (celulóza) s vodivým polymerem (PANi) vznikají kryogely se slibnými vlastnostmi různých aplikací spojených s biologickými a polovodičovými materiály – biosenzory, řízené uvolňování léčiva a další využití oblasti tkáňového inženýrství (Liang *et al.* 2015). Použití celulózy jako plniva v polymerním kompozitním kryogelu získalo velkou pozornost především pro její strukturu kryogelu s homogenní makroporézní strukturou a dobrou mísitelností a také pro mechanické vlastnosti – pevnost a dobrou iontovou vodivost, což ostatně dokazuje možnost biologického testování cytotoxicity a další testy, kdy u všech případů vzorků PANi/PVA kryogelů byly právě kryogely s přídavkem mikrokryalické celulózy Avicel připraveny a vybrány pro práci.

Biokompatibilitu scaffoldů lze hodnotit pomocí *in vitro* testů. *In vitro* testy se provádějí mimo živé tělo, často s využitím systémů buněčných kultur s cílem simulovat klinickou situaci. Tyto testy se provádějí jako screening před hodnocením *in vivo*, vzhledem k jejich jednoduchosti, finančním nákladům a zamezení etických problémů. Testovací systémy *in vitro* zahrnují tři hlavní složky, a to biologický systém, kontakt buňky/materiálu a biologickou odezvu. Prvním testem stanovení biokompatibility materiálu je stanovení jeho cytotoxicity. Jedná se o možný nástroj pro analýzu cytotoxických účinků a biokompatibility biomateriálu a dalších zdravotnických prostředků na živý organismus (Omidi *et al.* 2017). Během posouzení cytotoxicity lze kontakt buňky/materiálu provést prostřednictvím extraktů kryogelů připravených na základě standardizovaného postupu dle normy ISO 10993–12: 2012 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků. Navazující biologické odezvy lze

hodnotit pomocí MTT testu nebo např., morfologickým hodnocením za využití fluorescenční mikroskopie.

Pro biologické testování cytotoxicity a proliferace byla zvolena buněčná linie odvozená od myších embryonálních buněk NIH/3T3. NIH/3T3 je jedna z nejčastěji používaných buněčných linií pro řadu buněčných testů. Struktura buněčné linie je charakterizována jako adherentní monovrstva velkých vřetenovitých buněk a považuje se za jednu z relativně snadno rostoucích buněčných linií (Yang *et al.* 2009).

Grafy na obrázcích č. 21–23 výsledné cytotoxicity MTT testu ukazují, že nebyl pozorován významný rozdíl v aktivitě myších fibroblastů v rámci testovaných kryogelových extraktů (1, 10, 25, 50, 75 a 100 %) včetně reference (kultivace bez kryogelového extraktu). Podle normy ISO 10993-5: 2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* jsou vzorky kryogelových extraktů s viabilitou buněk větší než 80 % shledány bez efektu cytotoxicity. Buňky rostly velmi dobře po 24 hodinách expozice kryogelových extraktů. Kryogely lze proto považovat za necytotoxické.

Pro většinu aplikací tkáňového inženýrství je obecným požadavkem, aby buňky přilnuly ke konkrétnímu použitému biomateriálu. Právě přilnutí buněk silně ovlivňuje buněčnou proliferaci, migraci, diferenciaci, a z hlediska tkáňového inženýrství, produkci extracelulární matrice. Proto jsou důležité takové scaffoldy, která podporují buněčnou adhezi – buňky však nepřilnou přímo k povrchům biomateriálu, ale spíše se vážou prostřednictvím různých adhezních proteinů, které se adsorbují na biomateriál. Použitelnost kryogelů na bázi PVA v tkáňovém inženýrství úzce souvisí s přípravou odpovídajících 3D struktur, ideálně ve formě kombinující vhodné biologické, mechanické a povrchové vlastnosti. Inkorporace vodivého materiálu do scaffoldu přispívá k tvorbě tzv. „chytrého“ responzivního biomateriálu, který je schopen reagovat na extrémní stimuly, v tomto případě elektrickou vodivost. Působení vodivosti má vliv na buněčné vlastnosti jako je diferenciace, proliferace, migrace nebo orientace. Pro podporu cíleného buněčného růstu skrz tkáňový nosič a jeho rychlejší prorůstání buňkami je především inkorporace vodivé složky velmi žádoucí. Samotný vodivý PANi je možno připravit ve formě prášku, koloidu nebo filmu. Pro docílení vzniku trojrozměrné struktury probíhá jeho polymerace za přítomnosti vhodného síťovacího činidla. Díky svým příznivým vlastnostem jsou kryogely v biomedicínských aplikacích stále častější. V rámci diplomové práce byly připraveny kryogely na bázi PVA, které jako součást obsahují vodivý polymer PANi. PANi je obecně považován za polymer

s omezenou biokompatibilitou. Pravděpodobná pozorovaná cytotoxicita PANi může souviset s výskytem nízkomolekulárních nečistot přítomných v polymeru. Oba prekurzory používané pro syntézu PANi, a to peroxydisulfát amonný (APS) a anilin hydrochlorid (AH), jsou rozpustné ve vodě a jejich zbytky se mohou snadno uvolnit z jinak nerozpustného PANi za vystavení fyziologickým podmínkám v těle. Avšak kombinací PANi s biokompatibilním a dobře biologicky odbouratelným PVA lze biomateriály využít pro tkáňové inženýrství (Nuttelman *et al.* 2001, Humpolíček *et al.* 2018).

Vzhledem k tomu, že připravené vzorky PANi/PVA kryogelů mohou být považovány za scaffoldy pro aplikace v tkáňovém inženýrství, bylo za účelem otestování základních parametrů biokompatibility doplněno biologické testování cytotoxicity za pomoci MTT testu zvolena i metoda testování proliferace buněčné linie NIH/3T3 na samotných vzorcích kryogelů. Analýza mikrofotografií z fluorescenční mikroskopie za využití buněčné linie NIH/3T3 na Obrázku č. 25 naznačuje, že buněčná linie dobře adherovala a náhodně se šířila na povrchy i ve strukturách makroporézních kryogelů. Po aplikaci po dobu 48 hodin se myši embryonální fibroblasty zachovaly schopnost růstu – proliferace, přesto docházelo ke změnám tvaru cytoskeletu fibroblastů a ztrácely svůj typický vřetenovitý tvar. Možností pro tyto změny je charakter polymerů tvořící kryogelu, kdy PVA je obecně považován za biokompatibilní materiál, možný pozorovaný mírný dopad extraktů kryogelů PANi/PVA na životaschopnost buněk NIH/3T3 lze přičíst hlavně přítomnosti polymeru PANi. Přesto pozorovatelné biologické vlastnosti v korelaci s výsledky cytotoxicity extraktů odpovídají dobré biokompatibilitě připravených kryogelů.

Důležitým parametrem pro scaffoldy využívané v tkáňovém inženýrství jsou kromě biologických vlastností – cytokompatibility také materiálové vlastnosti, především porozita a charakteristika napodobující živou tkáň. V rámci diplomové práce bylo plánováno také stanovení porozity pomocí skenovací elektronové mikroskopie a reologických vlastností připravených kryogelů. Avšak kvůli probíhající pandemii virové nemoci covid-19 nebylo umožněno tyto testy dokončit. Během manipulace s vzorky kryogelů bylo zaznamenáno, že jsou ohebné, pevné a při stlačení se vracely do původního stavu, dokonce i půl roku od přípravy. Proto je možné konstatovat, že jejich mechanické vlastnosti jsou vhodné pro použití v tkáňovém inženýrství.

## ZÁVĚR

Porozumění vzájemné interakce materiálů a buněk je nezbytné pro vývoj funkčních scaffoldů s požadovanými biologickými vlastnostmi. Rozhodující roli v ovlivnění biologických vlastností jakéhokoli materiálu lze uvést cytokompatibilitu, povrchové a objemové vlastnosti v rámci trojrozměrné struktury scaffoldu.

Kryogely na bázi vodivých polymerů získaly v poslední době značný zájem v oblasti biomedicínských aplikací a tkáňového inženýrství. Kryogely charakterizujeme jako makroporézní hydrogely vytvořené procesem gelování při teplotách pod bodem mrazu a vykazujícími vlastnosti, díky nimž jsou příznivější v aplikacích než tradiční hydrogely. Jedná se o mechanické a optické vlastnosti, vlastní struktura vytvořeného scaffoldu a snadná tvorba ve srovnání s jinými technikami tvorby makropórů. V případě propojené makroporézní struktury je důležité poskytnutí jistého prostředí, které umožňuje vnitřní migraci buněk, přísun živin a odstraňování odpadních metabolitů, růst povrchově adherovaných buněk do samotného biologického scaffoldu. Kryogely navíc vykazují zvýšenou mechanickou stabilitu ve srovnání s tradičními hydrogely.

Supermakroporézní kryogely na bázi PANi/PVA jsou dobrými kandidáty pro aplikace tkáňového inženýrství díky vysokému obsahu vody, relativní netoxičnosti, pružnosti a transportním vlastnostem, které napodobují biologické tkáně. Syntéza PANi/PVA kryogelů s vnitřní vodivostí může nabídnout materiály reagující na vliv externího elektrického pole a tím podporující buněčnou aktivitu potřebnou pro scaffoldy tkáňového inženýrství.

K hodnocení potenciálního využití kryogelů v oblastech tkáňového inženýrství lze navrhnout experimentální metody hodnocení biologické aktivity *in vitro*. V praktické části byla provedena příprava PANi/PVA kryogelů s vybranými typy PVA (Mowiol® 4-88, Mowiol® 18-88 a poly(vinyl)alkohol  $M_w$  89,000–98,000, 99+% hydrolyzed) a přídatnými látkami (NaCl,  $Na_2HCO_3$  a mikrokrytalická celulóza Avicel). Vodivé polymerní kryogely PANi/PVA byly připraveny polymerací PANi v prostředí ethanolu zchlazeném v tekutém dusíku. Vyrobené PANi kryogely v kombinaci s nosným polymerem PVA získaly mechanickou pevnost a typickou trojrozměrnou porézní strukturu měkkého, pružného materiálu zelené až černé barvy s dobrými mechanickými vlastnostmi. Porovnáním vytvořených PANi/PVA kryogelů byly vybrány a upřesněny vzorky kryogelů pro



následující provedení biologického testování cytotoxicity a proliferace. Vybrané vzorky kryogelů byly při manipulaci ohebné, pevné a při stlačení se vracely do původního stavu.

Na základě výsledků MTT testu cytotoxicity bez ohledu na koncentraci extraktu (1, 10, 25, 50, 75 a 100 %), i v rámci zvolených typů PVA k tvorbě vzorků kryogelů, lze dojít k závěru, že PANi/PVA kryogely čisté i modifikované NaCl, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> nebo mikrokrystalické celulózy Avicel nejsou charakterizovány cytotoxicitou pro testovaný typ buněk NIH/3T3. Vyšší procento životaschopnosti buněk z testu MTT bylo způsobeno kratší inkubační dobou, která snižuje koncentrace toxických složek. Tyto výsledky podporují vlastnosti scaffoldů a to, že PANi/PVA kryogely čisté nebo s přísadami jsou necytotoxické. Dále tyto kryogely adekvátně podporují růst buňky bez buněčné toxicity i jejich proliferaci.

Samotné pochopení interakce mezi buňkami a kryogelem je zásadním předpokladem pro úspěšné použití jakéhokoli materiálu v oblasti moderní medicíny. Kryogely mají příznivý profil biologického scaffoldu, což je zařazuje mezi další platformy tkáňového inženýrství. Taktéž mechanické vlastnosti kryogelů jako je jejich ohebnost, pružnost, a opětovné navrácení tvaru po stlačení, naznačují, že kryogely vhodné pro použití v tkáňovém inženýrství. Proto se budoucí výzkum v této oblasti může zaměřit na syntézu kryogelů z široké škály vodivých polymerních materiálů a jejich testování v různých biomedicínských aplikacích.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. Actin Staining Techniques. [online] [navštíveno 2020-09-01]. Dostupné z: <https://www.cytoskeleton.com/actin-staining-techniques>
2. ActinRed™ 555 ReadyProbes® Reagent Protocol. [online] [navštíveno 2020-09-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/actin-red-555-readyprobes-protocol.html>
3. ActinRed™ 555 stain. [online] [navštíveno 2020-09-01]. Dostupné z: <http://www.abpbio.com/product/actinred-555-stain/>
4. AGRAWAL, C. M. and R. B. RAY, 2001. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 55(2), 141–150 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::aid-jbm1000>3.0.co;2-j. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4636%28200105%2955%3A2%3C141%3A%3AAID-JBM1000%3E3.0.CO%3B2-J>
5. AHMAD, Zubair *et al.* Poly(3-Hexylthiophene) (P3HT), Poly(Gamma-Benzyl-L-Glutamate) (PBLG) and Poly(Methyl Methacrylate) (PMMA) as Energy Harvesting Materials In: DEEPALEKSHMI, Ponnamma *et al.* 2017. *Smart Polymer Nanocomposites. Energy Harvesting, Self-Healing and Shape Memory Applications*. ©2017 Springer International Publishings. s. 95-118. Chapter 95. DOI: 10.1007/978-3-319-50424-7. ISBN 978-3-319-50424-7. Dostupné z: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-50424-7>
6. AKARAWA, Christopher K. a Cole A. DEFOREST. Polymer Design and Development In: VISHWAKARMA, Ajaykumar a Jeffrey M. KARP, 2017. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*. ©2017 Elsevier Inc., s. 295-314. Chapter 19. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802734-9.00019-6>. ISBN 978-0-12-802734-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027349000196?via%3Di> hub
7. AKTER, Farhana, 2016. *Tissue engineering made easy. 1st Edition* [online]. London Academic Press. [cit. 2020-03-10]. ISBN 0128053615. DOI: 10.1016/B978-0-12-805361-4.00001-1. Dostupné z:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128053614000011>
8. ASTI, Annalia and Luciana GIOGLIO, 2014. Natural and synthetic biodegradable polymers: Different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *The International journal of artificial organs* [online]. 37(3), 197-205 [cit. 2020-11-06]. DOI 10.5301/ijao.5000307. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.5301/ijao.5000307>
  9. ATALA, Aanthony, 2007. Engineering tissues, organs and cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 1, 83–96 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1002/term.18. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.18>
  10. BAINO, Francesco, NOVAJRA Giorgia and Chiara VITALE-BROVARONE, 2015. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online] 3, 202 [cit. 2020-08-28]. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00202. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26734605/>
  11. BAKHSHPOUR, Monireh *et al.*, 2019. Biomedical Application of Polymeric Cryogels. *Applied Science* [online]. 9(3) 553 [cit. 2021-02-15]. DOI: 10.3390/app9030553. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/330952634\\_Biomedical\\_Applications\\_of\\_Polymeric\\_Cryogels](https://www.researchgate.net/publication/330952634_Biomedical_Applications_of_Polymeric_Cryogels)
  12. BALINT, Richard, CASSIDY Nigel J. a Sarah H. CARTMELL, 2014. Conductive Polymers: Towards and smart biomaterial for Tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. 10(6): 2341–53 [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706114000671>
  13. BECKER, Wayne M., KLEINSMITH Lewis J. and Jeff HARDIN, 2006. *The World of the Cell 6th Edition*. Pearson Benjamin Cummings. ISBN-13: 9780805346800
  14. BERGER, J. *et al.*, 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 57(1), 19–34. [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1016/s0939-6411(03)00161-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641103001619>

15. BERTIAUME, F., MAGUIRE T. J., YARMUSH M. L., 2011. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual Reviews of Chemical and Biomolecular Engineering* [online]. 2(1), 403–430 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22432625/>
16. BLITTERSWIJK, Van Clemens and Jan DE BOER, 2015. *Tissue Engineering 2nd Edition*. London: Academic Press. ISBN: 9780124201453.
17. BROWN, Bryan N. *et al.*, 2009. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* [online]. 30(8), 1482–1491. [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.040. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19121538/>
18. BRUŽAUSKAITĒ, Ieva *et al.*, 2016. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology* [online]. 68(3), 355–369 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1007/s10616-015-9895-4. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26091616/>
19. Cytoskelet a molekulární motory: Biologie a patologie, LF MUNI. [online] [navštíveno 2020-09-01]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2012/DSMBz01/um/Cytoskelet\\_a\\_molekularni\\_motor\\_y\\_-\\_Svoboda.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2012/DSMBz01/um/Cytoskelet_a_molekularni_motor_y_-_Svoboda.pdf)
20. ČSN EN ISO 10993-5. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků, Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Česká technická norma (ČSN) 2010. 40 s. Třídící znak: 855220
21. ČSN EN ISO 10993-12. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály*. Česká technická norma (ČSN) 2012. 28 s. Třídící znak: 855220
22. DAI, ZHENG *et al.*, Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1177/2041731416648810. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731416648810>

23. DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran *et al.*, 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymeric Science* [online]. 19 pages [cit. 2021-02-23]. DOI: 10.1155/2011/290602. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>
24. DONG, Ruonan, MA Peter X. a Baolin GUO, 2020. Conductive biomaterials for muscle Tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 229 [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119584. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31704468/>
25. DONOSO, M. G. *et al.*, 2007. On the relationship between common amplitude surface roughness parameters and surface area: Implications for the study of cell-material interactions. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 59(3), 245-251. [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2006.09.01. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/348368777\\_Design\\_and\\_evaluation\\_of\\_synthetic\\_bacterial\\_consortia\\_for\\_optimized\\_phenanthrene\\_degradation\\_through\\_the\\_integration\\_of\\_genomics\\_and\\_shotgun\\_proteomics](https://www.researchgate.net/publication/348368777_Design_and_evaluation_of_synthetic_bacterial_consortia_for_optimized_phenanthrene_degradation_through_the_integration_of_genomics_and_shotgun_proteomics)
26. DZOBO, Kevin *et al.*, 2018. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells International. Hindawi* [online]. 1-24 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1155/2018/2495848. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/2495848/>
27. EL-SHERBY, M. Ibrahim a Magdi H. YACOUB, 2013. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science & Practise* [online]. 2013(3), 316–342 [cit. 2021-02-23]. DOI: 10.5339/gcsp.2013.38. Dostupné z: <https://www.qscience.com/content/journals/10.5339/gcsp.2013.38>
28. ELTOM, Abdalla, ZHONG Gaoyan a Ameen MUHAMMAD, 2019. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 13 pages [cit. 2020-04-10]. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/amse/2019/3429527/>
29. GAJENDIRAN, Mani *et al.*, 2017. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 133(46) [cit. 2020-11-07]. DOI: [online]. 51, 12-26 [cit. 2020-11-07]. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.44137>. Dostupné z:

- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.44137>
30. GARG, Tarun *et al.*, 2012. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 29(1), 1–63 [cit. 2020-05-10]. DOI:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v29.i1.10. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22356721/>
  31. GERVASO, Francesca, SANNINO Alessandro a Giuseppe M. PERETTI, 2014. The biomaterialist's task: scaffold biomaterials and fabrication technologies. *Joints*. [online]. 1(3), 130–137 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.11138/jts/2013.1.3.130. Dostupné z: <https://www.thiemeconnect.com/products/ejournals/abstract/10.11138/jts/2013.1.3.130>
  32. GILSON, Khang, MOON Suk Kim a Hai Bang LEE, 2007. *Manual in Biomedical Research: Volume 4. A Manual for Biomaterials/Scaffold Fabrication Technology* [online]. World Scientific Publishing. [cit. 2020-08-03]. ISBN: 9789812705952 DOI: <https://doi.org/10.1142/6408>. Dostupné z: <https://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/6408>
  33. GODDARD, J.M. a J. H. HOTCHKISS, 2007. Polymer Surface Modification for the Attachment of Bioactive Compounds. *Progress in Polymer Science* [online] 32, 698–725 [cit. 2020-06-23]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670007000512?via%3Dihub>
  34. GOESSLER, Ulrich Reinhart, HORMANN Karl a Frank RIEDEL, 2005. Tissue Engineering with Adult Stem Cells in Reconstructive Surgery (Review). *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 15: 899–905 [cit. 2020-03-15]. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.15.6.899>. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.15.6.899>
  35. GREEN, R. A. a J. A. GODING. Biosynthetic conductive polymer composites for tissue-engineering biomedical devices. In: POOLE-WAREN, Laura, MARTENS Penny a Rylie GREEN, 2016. *Biosynthetic Polymers for Medical Applications. 1<sup>st</sup> Edition*. © Woodhead Publishing, s. 277-298. Chapter 11. ISBN 9781782421139.
  36. GRIFFITH Linda G. a Gail NAUGHTON, 2002 Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* [online]. 295(5557), 1009–1014 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1126/science.1069210. Dostupné z:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11834815/>
37. GUNATILLAKE, Pathiraja A. a Raju ADHIKARI, 2003. Biodegradable synthetic polymers for Tissue engineering. *European Cells and Materials* [online]. 5, 1–16 [cit. 2020-11-07]. Dostupné z: <https://www.ecmjournal.org/papers/vol005/pdf/v005a01.pdf>
38. GUO, Baolin a Peter X. Ma, 2018. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* [online]. 19(6), 1764–1782 [cit. 2020-11-10]. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00276>. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.8b00276>
39. HARDY, John G., LEE Jae Y. a Christine E. SCHMIDT, 2013. Biomimetic conducting polymer based Tissue scaffolds. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 24(5), 847–854 [cit. 2020-11-10]. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.03.011. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23578463/>
40. HENDERSON, M. Timothy *et al.*, 2013. Cryogels for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 1(21) 2682–2695 [cit. 2021-02-15]. DOI: 10.1039/C3TB20280A. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/tb/c3tb20280a#!divAbstract>
41. HENESS, G. a B. BEN-NISSAN, 2004. Innovative Bioceramics. *Materials Forum* [online]. 27, 104–114 [cit. 2020-08-26]. Dostupné z: <https://opus.lib.uts.edu.au/bitstream/10453/5698/1/2004001146.pdf>
42. HIXON R. Katherine, LU Tracy a Scott A. SELL, 2017. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 62 29–41 [cit. 2021-02-15]. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.08.033. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28851666/>
43. Hoechst 33258 Staining Dye Solution. [online] [navštíveno 2020-09-01]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/hoechst-33258-staining-dye-solution-ab228550.html>
44. Hoechst 33258, 33342 – Product Information. FluoProbes. [online] [navštíveno 2020-09-01]. Dostupné z: <https://www.interchim.fr/ft/6/61248A.pdf>
45. HOLLISTER Scott J., 2009. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication* [online]. 1(1), 012002 [cit. 2020-06-10]. DOI:10.1088/1758-5082/1/1/012001. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811095/>

46. HOWARD Daniel, *et al.*, 2008. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy* [online]. 213(1), 66–72 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18422523/>
47. HUANG Zhong-Bing *et al.*, 2014 Conducting polypyrrole in Tissue Engineering Applications. *Frontiers of Materials Science* [online]. 8(1), 39–45 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.1007/s11706-014-0238-8. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11706-014-0238-8>
48. HUMPOLÍČEK Petr *et al.*, 2018. Polyaniline cryogels: Biocompatibility of novel conducting macroporous material. *Scientific Reports* [online]. 8 135 [cit. 2021-02-16]. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18290-1>. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-18290-1>
49. CHAN B. P. a K. W. LEONG, 2008 Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* [online]. 17(4), 467-479 [cit. 2020-04-10]. DOI:10.1007/s00586-008-0745-3. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00586-008-0745-3>
50. CHANG Hsin-I. a Yiwei WANG, 2010. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. [online] [navštíveno 2020-08-20]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering-cells-and-biomaterials/cell-responses-to-surface-and-architecture-of-tissue-engineering-scaffolds>
51. CHEN G., USHIDA T. a T. TATEISHI, 2002. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2(2), 67–77 [cit. 2020-08-03]. DOI: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1616-5195%2820020201%292%3A2%3C67%3A%3AAID-MABI67%3E3.0.CO%3B2-F>
52. IDASZEK Joanna, *et al.*, 2016. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. *Applied Surface Science* [online] 338, 762–774 [cit. 2020-06-02]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.03.038. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169433216304743>



53. IKADA Yoshito, 2006. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface* [online]. 3(10), 589–601 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1098/rsif.2006.0124. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2006.0124>
54. In vitro testování scaffoldů II [online] [navštíveno 2020-08-28]. Dostupné z: [https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5431/mod\\_resource/content/1/CV\\_4%2B5\\_ZS20152016.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5431/mod_resource/content/1/CV_4%2B5_ZS20152016.pdf)
55. KABIRI, K, H. OMIDIAN a M. J. ZOHURIAAN-MEHR, 2003. Novel approach to highly porous superabsorbent hydrogels: synergistic effect of porogens on porosity and swelling rate. *Polymer International* [online] 52(7), 1158–1164 [cit. 2021-03-11]. DOI: <https://doi.org/10.1002/pi.1218>. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.1218>
56. KAUR, Gagan *et al.*, 2015. Electrically conductive polymers and composites for biomedical Applications. *RSC Advances* [online]. 5(47) [cit. 2020-11-18]. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA01851J>. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/RA/C5RA01851J#!divAbstract>
57. KIRSEBOM, Harald *et al.*, 2010. Modulating the Porosity of Cryogels by Influencing the Nonfrozen Liquid Phase through the Addition of Inert Solutes. *Langmuir* [online]. 26(20) 16129–16133 [cit. 2021-03-11]. DOI: <https://doi.org/10.1021/la102917c>. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la102917c>
58. KO, Henry C., MILTHORPE Bruce K. a Clive D. McFARLAND, 2007. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *European Cells & Materials* [online] 14, 1–19 [cit. 2020-06-02]. DOI: 10.22203/ecm.v014a01. Dostupné z: <https://www.ecmjournal.org/papers/vol014/pdf/v014a01.pdf>
59. LANGER, R. a J. P. VACANTI, 1993. Tissue engineering. *Science* [online]. 260 (5110), 920–926 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1126/science.8493529. Dostupné z: <https://science.sciencemag.org/content/260/5110/920>
60. LANZA, Robert, LANGER Robert a Joseph VACANTI, 2014. *Principles of tissue engineering. 4<sup>th</sup> Edition*. Amsterdam: © Academic Press 2014. ISBN 9780123983589.
61. LARROCHE, Christian *et al.*, 2017. Current developments in biotechnology and bioengineering. *1<sup>st</sup> Edition*. Amsterdam: © Elsevier. ISBN 0444636633.

62. LE, Xuan *et al.*, 2013. Engineering A Biocompatible Scaffold with either Micrometre or Nanometre Scale Surface Topography for Promoting Protein Adsorption and Cellular Response. *International Journal of Biomaterials* [online] [cit. 2020-08-10]. DOI: 10.1155/2013/782549.  
Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2013/782549/>
63. LI, Jia-Horng *et al.* 2017. Porous Tubular PVA Hydrogels: Preparation and Assessment. *DEStech Transactions on Engineering and Technology Research* [online]. 2(2) 4591–4604 [cit. 2020-11-19]. DOI: 10.12783/dtetr/apetc2017/11433.  
Dostupné z:  
[https://www.researchgate.net/publication/326793838\\_Porous\\_Tubular\\_PVA\\_Hydrogels\\_Preparation\\_and\\_Assessment](https://www.researchgate.net/publication/326793838_Porous_Tubular_PVA_Hydrogels_Preparation_and_Assessment)
64. LIANG, Yeshe a James Cho-Hong GOH, 2020. Polypyrrole-incorporated Conducting Constructs for Tissue Engineering Applications: A review. *Bioelectricity* [online]. [cit. 2021-03-11]. DOI: <https://doi.org/10.1089/bioe.2020.0010>. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bioe.2020.0010>
65. LIANG, Xiangtao *et al.*, 2015. Preparation of cellulose-based conductive hydrogels with ionic liquid. *Reactive and Functional Polymers*. [online]. 86 1–6 [cit. 2021-03-11]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.11.002>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381514814002235?via%3Dihub>
66. LIU, W. a Y. CAO. Tissue-Engineering Technology for Tissue Repair and Regeneration. In: MOO-YOUNG, Murray 2011. *Comprehensive biotechnology*. 2<sup>nd</sup> Edition. © Pergamon 2011. ISBN 9780444538550.
67. LIU, Xiaohua, HOLZWARTH Jeremy M. a Peter X. MA, 2012. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience* [online]. 12(7), 911-919 [cit. 2020-11-07]. DOI: 10.1002/mabi.201100466. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22396193/>
68. MAO, S. Angelo a David J. MOONEY, 2015. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *PNAS. Engineering of Biology and Medicine* [online]. 112(47), 14452-14459 [cit. 2020-03-12]. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>. Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/112/47/14452>

69. MARQUEZ, J. Pablo *et al.*, 2006. Erratum: Cellular and matrix contributions to tissue construct stiffness increase with cellular concentration. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 34(9), 1475-1482 [cit. 2020-07-03]. DOI:10.1007/s10439-006-9160-2). 35. 10.1007/s10439-006-9215-4. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10439-006-9215-4>
70. MATHEW, Ansuja P. Tissue Engineering: Principles recent trends and the future In: KALARIKKAL, Nandakumar *et al.*, 2016. *Nanomedicine and Tissue Engineering. State of the Art and Recent Trends*. ©2016 Apple Academic Press, Chapter 2. ISBN 9781771881180 DOI: 10.1201/b19867-3. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/312553713\\_Tissue\\_Engineering\\_Principles\\_Recent\\_Trends\\_and\\_the\\_Future\\_State\\_of\\_the\\_Art\\_and\\_Recent\\_Trends](https://www.researchgate.net/publication/312553713_Tissue_Engineering_Principles_Recent_Trends_and_the_Future_State_of_the_Art_and_Recent_Trends)
71. MEMIC, Adnan *et al.*, 2019. Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Application. *Advanced Therapeutics* [online]. 2(4) [cit. 2021-02-15]. DOI: <https://doi.org/10.1002/adtp.201800114>. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adtp.201800114>
72. MEYER, U. *et al.*, 2009. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Springer, Berlin Germany, ISBN: 978-3-540-77754-0
73. MIKHALOVSKY, S. V. *et al.* Biomaterials/Cryogel. In: MOO-YOUNG, Murray, 2011. *Comprehensive Biotechnology. Second Edition*. ©2011 Elsevier B.V., pages: 11–22, Chapter 5.03. ISBN: 978-0-08-088504-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00432-3>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049004323?via%3DiHub>
74. MIKOS, A. G. *et al.*, 1998. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 33(1-2), 111–139 [cit. 2020-05-13]. DOI:10.1016/s0169-409x(98)00023-4. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10837656/>
75. MINUTH, W. *et al.* 1999. Modulation of cell differentiation in perfusion culture. *Experimental Nephrology* [online]. 7(5-6), 394-406 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1159/000020637. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10559637/>

76. MISTRY, Hema *et al.*, 2017. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment* [online]. 21(6), 1–294 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.3310/hta21060. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28244303/>
77. MOHAMAD, Yunnos D., BRETCANU Oana a Aldo R. BOCCACCINI, 2008. Polymerbioceramic composites for tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science* [online]. 43, 4433–4442. [cit. 2020-10-19]. DOI:10.1007/s10853-008-2552-y. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-008-2552-y>
78. MTT Cell Proliferation Assay. ATCC® 30-1010K [online] [navštíveno 2020-08-28]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/~media/da5285a1f52c414e864c966fd78c9a79.ashx>
79. NEREM, Robert M., 1991. Cellular engineering. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 19, 529–545 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1007/bf02367396. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1741530/>
80. NUTTELMAN, R. Charles *et al.*, 2001. Attachment of fibronectin to poly(vinylalcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation and migration. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 57(2), 217–223 [cit. 2021-03-18]. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200111\)57:2<217::AID-JBM1161>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200111)57:2<217::AID-JBM1161>3.0.CO;2-I). Dostupné z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4636\(200111\)57:2%3C217::AID-JBM1161%3E3.0.CO%3B2-I](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4636(200111)57:2%3C217::AID-JBM1161%3E3.0.CO%3B2-I)
81. O'BRIEN, F. J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materialstoday* [online]. 14(3), 88–95 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X>
82. OLADEJI, O. Ige., LASISI E. Umoru a Aribo SUNDAY, 2012. Natural Products: A Minefield of Biomaterials. *ISRN Materials Science HINDAWI* [online] [cit. 2020-08-26]. DOI: <https://doi.org/10.5402/2012/983062>. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/983062/>
83. OMIDI, Meisam *et al.* Characterization of biomaterials. In: TAYEBI, Lobat a Keyvan MOHARAMZADEH, 2017. *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering. 1<sup>st</sup> Edition*. ©Woodhead Publishing 2018 Chapter 7. ISBN: 9780081009673 DOI: 10.1016/B978-0-08-100961-1.00007-4. Dostupné z:

- [https://www.researchgate.net/publication/319452819\\_Characterization\\_of\\_biomaterials](https://www.researchgate.net/publication/319452819_Characterization_of_biomaterials)
84. PAGANO, Claudia *et al.*, 2020. Relationships between size and mechanical properties of scaffold-like structures. *Mechanics of Advanced Materials and Structures* [online] [cit. 2020-05-14]. DOI: 1-6. 10.1080/15376494.2019.1709675. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15376494.2019.1709675>
85. PERÉZ-MADRIGAL, Maria M *et al.*, 2012. Bioactive and electroactive response of flexible polythiophene:polyester nanomembranes for Tissue engineering. *Polymer Chemistry* [online]. 8 [cit. 2020-11-19]. DOI: 10.1039/C2PY00584K. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/PY/C2PY00584K#!divAbstract>
86. PETITE, Herve *et al.*, 2002. Tissue-engineered Bone Regeneration. *Nature Biotechnology* [online]. 18, 959–963 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1038/79449. Dostupné z: [https://www.nature.com/articles/nbt0900\\_959](https://www.nature.com/articles/nbt0900_959)
87. PINTO, M. F. R. Alexandra, V. B. OLIVEIRA a D. S. FALCAO. Experimental methods of characterization. In: PINTO, M. F. R. Alexandra, V. B. OLIVEIRA a D. S. FALCAO, 2018. *Direct Alcohol Fuel Cells for Portable Applications. Fundamental, Engineering and Advances. 1<sup>st</sup> Edition.* ©Academic Press 2018 s. 113–155 Chapter 4. ISBN 9780128118498
88. PLACE, Esly S. *et al.*, 2009. Synthetic polymer scaffolds for Tissue engineering. *Chemical Society Reviews* [online]. 38(4), 1139-51 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1039/b811392k. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/cs/b811392k#!divAbstract>
89. Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation. [online] [navštíveno 2020-08-28]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>
90. RATNER, Buddy D, 2011. The biocompatibility manifesto; Biocompatibility for the twenty-first century. *Journal of Cardiovascular Translational Research* [online]. 4, 523-527 [cit. 2020-05-13]. DOI:10.1007/s12265-011-9287-x. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12265-011-9287-x>
91. RATNER, Buddy D. a Stephanie J. BRYANT, 2004. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]

- 6(1), 41–75 [cit. 2020-08-10]. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15255762/>
92. REIS, Rui L. *et al.*, 2008. *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications 1<sup>st</sup> Edition*. ©Woodhead Publishing. ISBN: 9781845692643
93. ROGERS, J. Zachary a Sidi A. BENCHERIF, 2019. Cryogelation and Cryogels. *Gels MDPI* [online]. 5(4) 46 [cit. 2021-02-16]. DOI: 10.3390/gels5040046. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31816989/>
94. ROSENZWEIG, Aanthony, 2003. Endothelial Progenitor Cells. *The New England Journal of Medicine* [online]. 348, 581–582 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1056/NEJMp020175. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12584365/>
95. SAHINER, Nurettin a Sahin DEMIRCI, 2016. *In situ* preparation of polyaniline within neutral, anionic, and cationic superporous cryogel networks as conductive, semi-interpenetrating polymer network cryogel composite systems. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 133(46) [cit. 2020-11-07]. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.44137>. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.44137>
96. SHOKEIR, A. A., HARRAZ A. M. a A. B. EL-DIN, 2010. Tissue engineering and stem cells: basic principles and Applications in urology. *International Journal of Urology* [online]. 17(12), 964-973 [cit. 2021-02-10]. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2010.02643.x. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1442-2042.2010.02643.x>
97. SINGH, R. Manju, PATEL Satish a Deependra SINGH. Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering. In: GRUMEZESCU M. Alexandru, 2016. *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering. Applications of Nanobiomaterials*. ©2016 Elsevier Inc. All, pages: 231-260, Chapter 9. ISBN: 978-0-323-42865-1 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42865-1.00009-X>. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032342865100009X>
98. STASKO, Jolanta *et al.* 2008. Poly(vinylalkohol) hydrogels. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* [online]. 58(1) [cit. 2021-03-11]. DOI: 10.3176/proc.2009.1.11. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/242145697\\_Polyvinyl\\_alcohol\\_hydrogels](https://www.researchgate.net/publication/242145697_Polyvinyl_alcohol_hydrogels)

99. STEJSKAL, Jaroslav *et al.*, 2017. Polyaniline Cryogels Supported with Poly(vinyl alcohol): Soft and Conducting. *Macromolecules* [online]. 50(3) 972–978 [cit. 2021-02-16]. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b02526>. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.6b02526>
100. STEJSKAL, Jaroslav a Patrycja BOBER, 2018. Conducting polymer colloids, hydrogels and cryogels: common start to various destinations. *Colloids & Polymer Science* [online]. 296(5) 989–994 [cit. 2021-03-11]. DOI: 10.1007/s00396-018-4303-1. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/323765281\\_Conducting\\_polymer\\_colloids\\_hydrogels\\_and\\_cryogels\\_common\\_start\\_to\\_various\\_destinations](https://www.researchgate.net/publication/323765281_Conducting_polymer_colloids_hydrogels_and_cryogels_common_start_to_various_destinations)
101. STEJSKAL, Jaroslav, KRATOCHVÍL Pavel a Aubrey D. JENKINS, 1996. The formation of polyaniline and the nature of its structures. *Polymer* [online]. 37(2), 367–369 [cit. 2020-11-18]. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)81113-X](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)81113-X). Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003238619681113X?via%3Dihub>
102. STREHL, Raimund *et al.*, 2002. Proliferating Cells versus Differentiated Cells in Tissue Engineering. *Tissue Engineering* [online]. 8(1), 37–42 [cit. 2020-04-06]. DOI: <http://doi.org/10.1089/107632702753503036>. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632702753503036>
103. SULTANA, Nanzin, HASSAN Mohd Izzat a Lim MIM MIM, 2015. *Composite synthetic scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*. New York: Springer Brief in Materials. ISBN 9783319097541.
104. TAKAHASHI, Kazutoshi a Shinya YAMANAKA, 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* [online]. 126(4), 663–676 [cit. 2020-03-15]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009767>
105. TUAN, Rocky S., BOLAND Genevieve a Richard TULI, 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based Tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 5(1), 32–45 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1186/ar614. Dostupné z: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar614>

106. THRIVIKRAMAN, Greesma, BODA K. Sunil a Bikramjit BASU, 2018. Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: A tissue engineering perspective. *Biomaterials* [online]. 150, 60–86 [cit. 2021-04-26]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.003>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961217306300>
107. VACANTI, Charles A, 2006. History of Tissue Engineering and glimpse into its future. *Tissue Engineering* [online]. 12(5), 1137–1142 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1089/ten.2006.12.1137. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.2006.12.1137>
108. VACANTI, Charles A, 2006. The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine* [online]. 10(3), 569–576 [cit. 2020-03-10]. DOI:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x>
109. VAN DE VELDE, Kathleen a Paul KIEKENS, 2002. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their Applications. *Polymer Testing* [online]. 21(4): 433–442 [cit. 2020-11-09]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00107-6). Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142941801001076?via%3DiHub>
110. WHITMARSH, A. J. a R. J. DAVIS, 2000. A central control for cell growth. *Nature* [online]. 403(67), 255-256 [cit. 2021-02-10]. DOI: 10.1038/35002220. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/35002220>
111. WILLIAMS, David F, 2011. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* [online]. 35(38), 10009-14 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.035 Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25263686/>
112. WILLIAMS, David F., 2008. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 29(20), 2941–2953 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440630/>
113. WILLIAMS, David F., 2017. Biocompatibility Pathways: Biomaterials – Induced Sterile Inflammation, Mechanotransduction and Principle of Biocompatibility Control.



- ACS Biomaterials Science and Engineering* [online]. 3(1), 2–35. [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00607. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsbiomaterials.6b00607>
114. WU, Iwen a Jennifer ELISSEEFF, 2014. Biomaterials and Tissue Engineering for Soft Tissue Reconstruction. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* [online]. 235-241 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-396983-5.00015-6. Dostupné z: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/biomaterials-and-tissue-engineering-for-soft-tissue-reconstructio-5>
115. XU, Li-Chong a Christopher A. SIEDLECKI, 2007. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* [online]. 28(22), 3273–3283 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.032. Dostupní z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17466368/>
116. YANG, Kisuk *et al.* 2017. Photoactive Poly(3-hexylthiophene) Nanoweb for Optoelectrical Stimulation to Enhance Neurogenesis of Human Stem Cells. *Theranostics* [online]. 7(18) 4591–4604 [cit. 2020-11-19]. DOI: 10.7150/thno.20169. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29158847/>
117. YANG Xiaomin *et al.* 2009. Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/w-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze-thawing. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 79(5) 606–611 [cit. 2021-03-11]. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2009.12.017. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0969806X09005763>
118. ZHOU Weilie *et al.* Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). In: ZHOU Weilie a Zhong Lin WANG, 2006. *Scanning Microscopy for Nanotechnology. Techniques and Applications*. ©Springer-Verlag New York s. 1–40 Chapter 1. ISBN 978-0-387-33325-0. DOI: 10.1007/978-0-387-39620-0\_1. Dostupné z: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-39620-0\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-39620-0_1)
119. ZURINA Irina M., *et al.*, 2020. Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach. *Acta Biomaterialia* [online]. 113(1), 63-83 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.06.016. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706120303378>

**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ**

|       |   |
|-------|---|
| AH    | anilin chlorid  |
| APS   | persulfát amonný (peroxodisíran amonný)                                 |
| ASCs  | dospělé kmenové buňky (Adult Stem Cells)                                |
| CP    | vodivé polymery (Conductive Polymers)                                   |
| ECM   | extracelulární matrix (Extracellular Matrix)                            |
| ESCs  | embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells)                        |
| ICM   | vnitřní buněčná hmota (embryoblast; Inner Cell Mass)                    |
| MTT   | (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)             |
| iPSCs | indukované pluripotentní kmenové buňky (Induced Pluripotent Stem Cells) |
| PA    | polyacetylen  |
| PANi  | polyanilin  |
| PEDOT | poly(3,4-ethylendioxythiofen)   |
| PTh   | polythiofen   |
| PPy   | polypyrrol  |
| PVA   | poly(vinylalkohol)  |
| P3HT  | poly(3-hexylthiofen)  |
| SCs   | kmenové buňky (Stem Cells)  |
| TI    | tkáňové inženýrství (Tissue Engineering)                                |
| UPW   | ultračistá voda (Ultrapure Water)                                       |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|   |    |
|---|----|
| Obrázek č. 1: Tkáňové inženýrství (upraveno podle Place <i>et al.</i> 2008) .....   | 10 |
| Obrázek č. 2: Vývoj tkáňového inženýrství pro opravu a regeneraci poškozené tkáně nebo orgánů (upraveno podle Singh <i>et al.</i> 2016).....  | 16 |
| Obrázek č. 3: Základní principy tkáňového inženýrství .....   | 18 |
| Obrázek č. 4: Typy kmenových buněk (upraveno podle Shokeir, Harraz a El-Din 2010)..   | 20 |
| Obrázek č. 5: Triáda tkáňového inženýrství (upraveno podle O'Brien 2011).....   | 24 |
| Obrázek č. 6: Obecné paradigma biokompatibility (upraveno podle Williams 2017) .....  | 28 |
| Obrázek č. 7: Schéma buněčného prostředí (upraveno podle Le <i>et al.</i> 2013) .....   | 32 |
| Obrázek č. 8: Struktury vybraných polymerů běžně používaných v oblasti tkáňového inženýrství – a: poly(ethylenglykol) (PEG), b: poly(vinylalkohol) (PVA), c: poly(kyselina akrylová) (PAA), d: poly(2-hydroxyethylmethakrylát) (PHEMA), e: poly(kyselina mléčná) (PLA), f: poly(kyselina glykolová) (PGA), g: poly(kaprolakton) (PCL), h: poly(propylenfumarát) (PPF), i: poly(fosfazen) R = alkoxy, aryloxy nebo aminoskupiny. (převzato podle Place <i>et al.</i> 2008) ..... | 39 |
| Obrázek č. 9: Vodivé polymery a biomateriály s aplikací v tkáňovém inženýrství (upraveno podle Guo a Ma 2018) .....   | 44 |
| Obrázek č. 10: Zjednodušené schéma konjugovaného hlavního řetězce – střídání jednoduchých a dvojných vazeb (upraveno podle Balint, Cassidy a Cartmell 2014) .....   | 45 |
| Obrázek č. 11: Chemické struktury $\pi$ -konjugovaných polymerů (upraveno podle Nezataki <i>et al.</i> 2018).....   | 46 |
| Obrázek č. 12: Chemická struktura PANi v různých redoxních stavech – shora dolů: pernigranilin, emeraldinová báze a leukoemeraldin (upraveno podle Gajendiran <i>et al.</i> 2017) .....   | 47 |
| Obrázek č. 13: Chemická struktura poly(3-hexylthiofenu) (P3HT) (převzato podle Ahmad <i>et al.</i> 2017) .....  | 50 |
| Obrázek č. 14: Morfologie buněčné linie NIH/3T3. (převzato z ATCC: The Global Bioresource Center. [online]) .....   | 53 |
| Obrázek č. 15: Kryogelování (upraveno podle Henderson <i>et al.</i> 2013) .....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázek č. 16: Reakční schéma oxidace anilinu s persulfátem amonným za vzniku soli polyanilinu (emeraldinová sůl) (převzato z Stejskal <i>et al.</i> 2017) .....   | 58 |
| Obrázek č. 17: Standardní povrchové plochy materiálu a objemy extrakce podle normy ISO 10993–12:2012. ....   | 60 |
| Obrázek č. 18: Schéma nasazení 96 jamkové mikrotitrační destičky pro testování.....  | 61 |
| Obrázek č. 19: Redukce MTT na formazan pomocí životaschopných buněk v chemické reakci (A) a na 96 jamkové mikrotitrační destičce (B) (převzato z Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation. [online]). .... | 62 |
| Obrázek č. 20: Vzorek připraveného PANi/PVA kryogelu.....  | 65 |
| Obrázek č. 21: Životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po expozici extraktů PANi/PVA kryogelů (Mowiol® 4-88) po dobu 24 h.....   | 68 |
| Obrázek č. 22: Životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po expozici extraktů PANi/PVA kryogelů (PVA Mw 89,000–98,000) po dobu 24 h .....  | 69 |
| Obrázek č. 23: Životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po expozici extraktů PANi/PVA kryogelů (Mowiol® 18-88) po dobu 24 h.....  | 70 |
| Obrázek č. 24: Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 na vzorku reference na dvourozměrném povrchu mikrotitrační destičky .....   | 72 |
| Obrázek č. 25: Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 na vybraných vzorcích PANi/PVA kryogelů .....   | 73 |

**SEZNAM TABULEK**

|  |    |
|--|----|
| Tabulka č. 1: Charakteristika a vlastnosti biomateriálů (upraveno podle Williams 2017).. | 36 |
| Tabulka č. 2: Morfologie komponent biomateriálů (upraveno podle Williams 2017).....      | 37 |
| Tabulka č. 3: Připravené vzorky kryogelů.....  | 59 |
| Tabulka č. 4: Vybrané vzorky PANi/PVA kryogelů .....                                     | 66 |

