

Biologické vlastnosti scaffoldů

Bc. Klára Pacolová

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Pacolová**
Osobní číslo: **T15264**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biologické vlastnosti scaffoldů**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými studiemi o vztahu povrchových a objemových vlastností materiálů k adhezi, proliferaci a diferenciaci eukaryotických buněk. Zaměří se na materiály, technologii výroby a problematiku tvorby biomimetických scaffoldů. V návaznosti na takto získané informace naplánuje a provede sérii experimentů za účelem stanovení biologických vlastností scaffoldů. Studentka se detailně seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**
Centrum polymerních materiálů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2017**

Ve Zlíně dne 1. března 2017


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




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

Příjmení a jméno: PACOLOVÁ KLÁRAObor: PMT- FM

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 9. 5. 2017Pacolová

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

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

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

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

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

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

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní díla:

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo seznámit se s problematikou interakce buněk s různými materiály. V praktické části pak stanovit antibakteriální vlastnosti a cytotoxicitu scaffoldů složených z PVA a kraft ligninu. Antibakteriální aktivita byla testována pomocí kmenů *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* metodou zalévání do agaru. Cytotoxicita scaffoldu byla stanovena přímým kontaktem a testem cytotoxicity extraktů. Kromě cytotoxicity byla stanovena také schopnost buněk linie NIH/3T3 růst a proliferovat v celém objemu scaffoldu a to za využití kutlivace v bioreaktoru. Výsledky ukazují, že výsledné biologické vlastnosti scaffoldů jsou závislé na množství přidaného kraft ligninu do matrice PVA, přičemž jako nejvhodnější se jeví množství kraft ligninu pod 5% v matrici PVA.

Klíčová slova: Scaffold, PVA, kraft lignin, buňky NIH/3T3, bakteriální kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, antibakteriální aktivita, cytotoxicita, proliferace.

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis was to get acquainted with problems of cell interaction with different materials. In the practical part are determined antibacterial properties and cytotoxicity of scaffolds composed of PVA and kraft lignin. Antibacterial activity was tested using the strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by immersion into agar. The scaffold cytotoxicity was determined by direct contact and a cytotoxicity assay of the extracts. In addition to cytotoxicity, the ability of NIH/3T3 line cells to grow and proliferate throughout the scaffold volume was determined using cavitation in the bioreactor. The results show that the resulting biological properties of the scaffolds are dependent on the amount of added kraft lignin in the PVA matrix, while as the most appropriate is amount of the kraft lignin less than 5% in the PVA matrix.

Keywords: Scaffold, PVA, kraft lignin, cell NIH/3T3, bacterial strain *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, antibacterial activity, cytotoxicity, proliferation.

Děkuji doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost při konzultacích a ochotu při řešení různých situacích. Také děkuji Mgr. Petře Rejmontové za čas, milé jednání a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě děkuji paní Ing. Daniele Veselé za pomoc při testování antibakteriální aktivity. Dále děkuji rodičům za podporu ve studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 REGENERATIVNÍ MEDICÍNA	12
1.1 HISTORIE RM	13
1.2 KMENOVÉ BUŇKY	14
1.3 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX	16
1.3.1 SLOŽENÍ ECM.....	17
1.3.2 KOLAGEN	17
1.3.3 GLYKOPROTEINY.....	18
1.3.4 GLYKOSAMINOGLYKANY (GAGs)	21
RŮSTOVÉ FAKTORY (GFs)	21
1.3.5 ZDROJE PRO TVORBU TKÁŇOVÉHO LEŠENÍ	22
2 SCAFFOLD (TKÁŇOVÉ LEŠENÍ)	23
2.1 DESIGN SCAFFOLDU	23
2.2 VHODNÉ MATERIÁLY	24
2.2.1 PŘÍRODNÍ	24
2.2.2 SYNTETICKÉ	25
2.3 MODIFIKACE POLYMERŮ	26
2.3.1 MODIFIKACE POVRCHU BIOAKTIVNÍMI MOLEKULAMI.....	27
2.3.2 VÝROBA HYBRIDNÍCH A KOMPOZITNÍCH MATERIÁLŮ	28
2.3.3 TOPOGRAFICKÉ MODIFIKACE.....	28
2.4 VÝROBA	28
2.4.1 PŘEDEM VYROBENÝ SCAFFOLD	30
2.4.2 DECELULARIZOVANÝ SCAFFOLD	30
2.4.3 SCAFFOLD PŘIPRAVENÝ BUNĚČNOU SEKRECIÍ ECM.....	32
2.4.4 SCAFFOLD Z HYDROGELOVÉ MATRICE.....	33
2.4.5 VÝROBA VLÁKEN	33
2.4.6 SHRNUTÍ TECHNIK PŘÍPRAVY SCAFFOLDŮ	33
2.5 STERILIZACE	35
2.5.1 FYZIKÁLNÍ METODY STERILIZACE	35
2.6 KULTIVACE BUNĚK V BIOREAKTORU	36
2.6.1 BIOREAKTORY PRO VÝROBU CHRUPAVČITÉ TKÁNĚ	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
3 PŘÍPRAVA VZORKŮ:	41
3.1 KRAFT LIGNIN	41
4 METODIKA A MĚŘENÍ	42
4.1 TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY SCAFFOLDŮ	42

4.1.1	POUŽITÉ BAKTERIE.....	42
4.1.2	PŘÍSTROJE	42
4.1.3	CHEMIKÁLIE.....	42
4.1.4	DESIGN EXPERIMENTU.....	42
4.1.5	POSTUP ZKOUŠKY	43
4.2	STANOVENÍ CYTOTOXICITY	43
4.2.1	POUŽITÉ BUŇKY	43
4.2.2	PŘÍSTROJE	44
4.2.3	CHEMIKÁLIE.....	44
4.2.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	44
4.2.5	CYTOTOXICITA PŘÍMÝM KONTAKTEM	45
4.2.6	CYTOTOXICITA EXTRAKTŮ.....	45
4.3	KULTIVACE BUNĚK V BIOREAKTORU	45
4.3.1	POUŽITÉ BUŇKY	46
4.3.2	PŘÍSTROJE	46
4.3.3	CHEMIKÁLIE.....	46
4.3.4	POSTUP ZKOUŠKY.....	46
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
5.1	TEST ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY	48
5.2	STANOVENÍ CYTOTOXICITY	51
5.2.1	STANOVENÍ CYTOTOXICITY PŘÍMÝM KONTAKTEM	51
5.2.2	CYTOTOXICITA EXTRAKTU.....	52
5.3	KULTIVACE BUNĚK V BIOREAKTORU	55
6	ZÁVĚR.....	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK.....	73

ÚVOD

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na specifickou oblast regenerativní medicíny a to na vývoj tkáňového lešení (scaffoldu). Regenerativní medicína (RM) je vědní obor, který vyvíjí metody, jak regenerovat, opravovat, anebo nahrazovat poškozené nebo nemocné buňky, orgány či tkáně. RM lze definovat pomocí již vzniklých vědních oborů jako je tkáňové inženýrství, buněčná transplantace, buněčná biologie, biomechanika, protektika, nanotechnologie a biochemie. RM se zabývá také oblastí samoléčby, na rozdíl od tkáňového inženýrství, které si klade za cíl spojit syntetickou nebo přírodní matici s buňkami, extracelulární matrix (ECM) a dalšími růstovými faktory tak, aby vznikla nová tkáň, která roste nezávisle na organismu. Matrice by měla vytvořit mikroprostředí, které umožňuje buňkám proliferaci, diferenciaci a sekreci ECM. Proto je nutné navrhnout scaffold tak, aby fyzikální a chemické signály, přítomné v tkáňovém lešení vhodně vyvolávaly specifickou odpověď buněk. Při výrobě scaffoldu je nutné zvolit vhodný materiál, který může být jak přírodní, tak i syntetický, nebo v kombinaci. Aby se scaffold podobal co nejvěrohodněji původní tkáni je nutné povrch modifikovat. Toho lze dosáhnout několika způsoby.

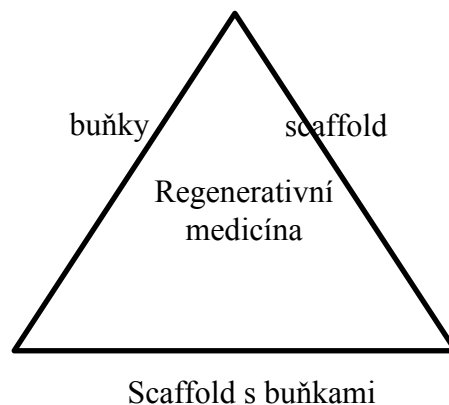
V praktické části jsem se zaměřila na testování antibakteriální aktivity pěti dodaných scaffoldů. Scaffoldy se lišily v koncentraci kraft ligninu. Testy probíhaly paralelně u dvou kmenů bakterií *E. coli* a *S. aureus*. Dalším zvoleným testem bylo stanovení cytotoxicity přímým kontaktem a stanovení cytotoxicity extraktů. Postup experimentu byl dle ISO 10 993-5 na myších embryonálních fibroblastech NIH/3T3. Závěrečným testem bylo sledování proliferace buněk homogenně adherovaných v celém objemu scaffoldu. Výsledky prokázaly, že biokompatibilní scaffold je složený z 1 – 5% kraft ligninu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 REGENERATIVNÍ MEDICÍNA

Dle časopisu Nature je regenerativní medicínu (RM) možno definovat jako „obor medicíny, který vyvíjí metody k znovuoobnovení, opravě, či náhradě poškozených buněk, orgánů nebo tkání. Regenerativní medicína zahrnuje přípravu a užití kmenových buněk, prostřednictvím metod tkáňového inženýrství“ (*www.nature.com*). Regenerativní medicína byla na přelomu tisíciletí (r.1999) spojována především se jménem William Haseltine, který přesněji popsal nově vznikající vědní obor. Regenerativní medicínu definoval prostřednictvím již vzniklých vědních oborů jako je tkáňové inženýrství, buněčná transplantace, buněčná biologie, biomechanika, protetika, nanotechnologie a biochemie (SAMPOGNA, G., S. Y. GURAYA a A. FORGIONE, 2015). Ve své práci *The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society* popsal, jak se jednotlivé obory ovlivňují a pomáhají nám prohlubovat znalosti v RM. Hlavní rozvoj je spojen s embryonálními kmenovými buňkami, které mají jedinečnou schopnost diferencovat se do všech typů buněk (HASELTINE W. A., 2001).

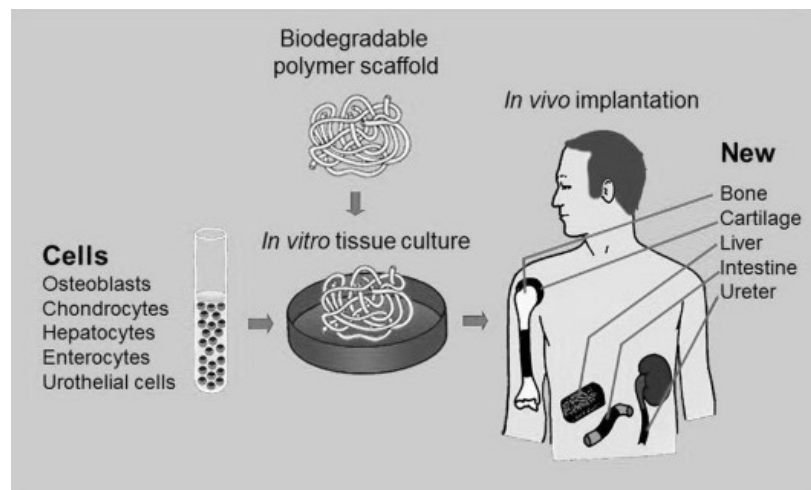
Léčba pomocí RM se volí v případě, že byla daná tkáň poškozena mechanicky, při úrazu, v důsledku nemoci nebo má tkáň již vrozenou vadu (MAIENSCHEIN, J., 2011). V podstatě existují tři různé postupy k dosažení požadovaných výsledků v RM. První postup je na bázi buněčné terapie, druhá cesta je použití syntetického nebo biologického materiálu, který podporuje růst buněk a třetí cesta je implantace scaffoldu osazeného buňkami, viz obrázek níže (COLOMBO, F. et al., 2016). Použití buněčné terapie v RM se zkoumá jako možnost náhrady buněk, které jsou znehodnoceny díky různým onemocněním, jako je např. Parkinsonova nemoc, ischemická mrtvice, cukrovka nebo infarkt (BADYLAK, S. F, 2004).



Obrázek 1 Strategie regenerativní medicíny

Jak již bylo zmíněno výše, RM zahrnuje několik vědních oborů. V diplomové práci se blíže zaměřím na obor tkáňové inženýrství.

Tkáňové inženýrství (TE) bývá v literatuře často považováno jako synonymum k RM. To však není úplně správné, jelikož RM se zabývá také oblastí samoléčby, na rozdíl od TE, které si klade za cíl spojit syntetickou nebo přírodní matici s buňkami, extracelulární maticí (ECM) a dalšími růstovými faktory tak, aby vznikla nová tkáň, která roste nezávisle na organismu (SINGH, R. et al., 2016). Matrice by měla vytvořit mikroprostředí, které umožňuje buňkám proliferaci, diferenciaci a sekreci ECM. Proto je nutné navrhnout scaffold tak, aby fyzikální a chemické signály, přítomné v tkáňovém lešení vhodně vyvolávaly specifickou odpověď buněk. Rychlý rozvoj nanotechnologií během posledních deseti let vede k vytvoření nových perspektiv a posunu vpřed v oblasti TE (HUSSEIN, K. H. et al., 2016). V dnešní době se usiluje o vytvoření nanomateriálu, který by napodoboval nativní ECM a podporoval adhezi různých typů buněk (KINGSLEY P. D. et al., 2013). Tento materiál má tedy sloužit v TE jako lešení pro buňky různých tkání, např. kůže, kosti, cév, srdce, rohovky, pro nervový systém a další tkáně. Přesné požadavky závisí na typu tkáně, která má být obnovena. Jedním z cílů je také využít nanomateriál při léčbě poranění míchy a jiných vážných zranění a onemocnění (GAJENDYRAN, M. et al., 2017).



Obrázek 2 Princip tkáňového inženýrství (LANGER R. a J. VACANTI, 2016)

1.1 Historie RM

Úvaha o historii není jen o tom, že minulost poznáme, ale ještě důležitější je, že se ji snažíme pochopit. Výzkum RM zřejmě nezačal z ničeho nic. Proto se logicky nedá určit přesné datum vzniku RM. Pokud půjdeme hlouběji do minulosti, narazíme na Aristotela, který se zabýval regenerací ocásků u ještěrek a hadů (ARISTOTLE a A. PLATT, 2001).

Experimentálně se přišlo na to, že organismus má poměrně dobrou schopnost reagovat na měnící se podmínky a účinně se regenerovat (HOLLINGER, J. O., et al., 2017).

Důležitým bodem v časném vývoji RM byl souběžný vývoj umělých biomateriálů. V polovině roku 1960 se začaly uskutečňovat první pokusy o výrobu umělé kůže (BURKE, J. F et al., 1981). V roce 1970 bylo úsilí zkonstruovat implantáty se specifickým povrchem zabraňujícím srážení krve. Jednalo se o povrchy založené na heparinu. V témž roce se zahájila řada experimentů, při kterých se nanosly chondrocyty na fragmenty kosti a implantovaly se do myši. Postupem času se pozornost upřela k testování toxicity a biokompatibility různých organických polymerů, které se používají na výrobu implantátů a při vývoji nových gelů (COLOMBO, F. et al., 2016). Významný milník nastává u Haralda Otty, který jako první zkonstruoval tkáňové lešení. Použil techniku decelularizace orgánu tak, aby jeho skelet zůstal neporušený. Skelet se poté osadil znovu buňkami v bioreaktoru (VACANTI, J. a CH. A. VACANTI, 2014).

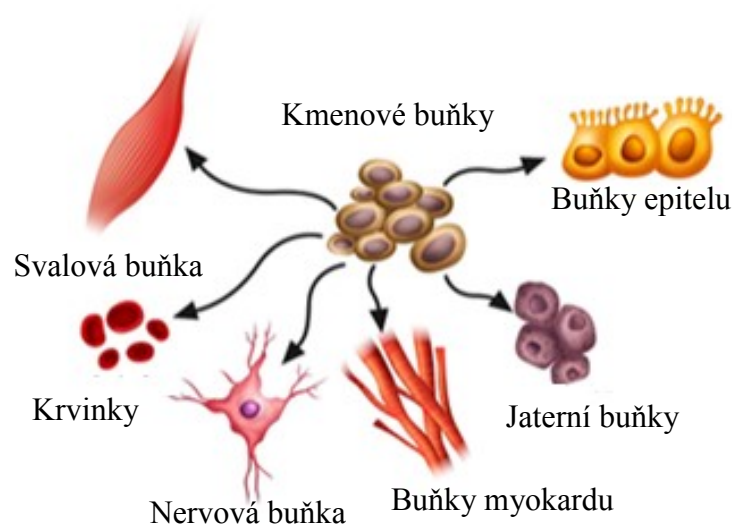
Tabulka 1 Historický přehled důležitých momentů v regenerativní medicíně
(STARZL, T., 2000)

rok	Objev
1968	První buněčná transplantace a to transplantace kostní dřevě
1978	Objev kmenových buněk z lidské pupečnickové krve
1981	První tkáňová transplantace; transplantace kůže
1996	První naklonovaná ovce ze somatických buněk dospělého jedince; ovce Dolly
1998	Izolace lidských embryonálních kmenových buněk
1999	První laboratorně vypěstovaný orgán
2004	Implantace prvních uměle vytvořených trubicových orgánů (močový měchýř)
2007	Objev kmenových buněk v plodové vodě a v placentě
2009	Vznik prvního decelularizovaného orgánu

1.2 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou unikátní tím, že se mohou diferencovat a růst do požadovaných typů tkání. Vykazují schopnost se samy obnovovat, a udržovat vnitřní homeostázu organismu (SHOKEIR, A. A. et al., 2010).

Existuje celá řada typů kmenových buněk. Totipotence je schopnost buňky dělit se a diferencovat do všech buněk v organismu včetně embryonální tkáně (STRONG, A. L., 2017). Pluripotence je schopnost buňky diferencovat do všech třech zárodečných listů. Jedná se o embryonální kmenové buňky. Multipotentní buňky diferencují do omezených typů buněk, např. krvetvorné kmenové buňky se mohou diferencovat do všech krevních buněk: erytrocytů, krevních destiček, lymfatických buněk. Pokud buňky diferencují do jednoho buněčného typu např. prekursorové buňky mluvíme o unipotenci (SAMPOGNA, G., S. Y. GURAYA a A. FORGIONE, 2015).



Obrázek 3 Diferenciace kmenové buňky

(Převzato z <https://www.cryo-cell.com/cord-blood/about-stem-cells>)

Kmenové buňky mohou být získány ze čtyř zdrojů:

- A) Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou buňky multipotentní, které mohou dát vznik různým buněčným typům. Ne však všem typům. Pouze oplozené vajíčko tj. zygota má plnou schopnost diferenciaci tzv. totipotenci (DYLEVSKÝ, I., 2007). Embryonální kmenové buňky se získávají z vnitřní buněčné masy savčích blastocyst, což vyžaduje destrukci embrya. V mnoha zemích je tento způsob získání kmenových buněk nepřijatelný, hlavně z etických důvodů (DAMDIMOPOULOU, P. et al., 2016).

B) Gestační tkáň je neomezený zdroj kmenových buněk, je k němu snadný přístup a jsou na ni kladené minimální etické a právní otázky. Proto buňky gestační tkáně nabízí ideální rovnováhu mezi kvalitou a etikou. Kmenové buňky lze získat z pupečnickové krve, placenty a amnionu což je zárodečný vak (LOUKOGEORGAKIS, S. P. a P. DE COPPI, 2016). Kmenové buňky z pupečnickové krve se mohou rozlišovat do adipogenní, osteogenní, chondrogenní a kardiomyogenní linie. Placenta je eticky bezproblémová. Kmenové buňky odvozené z placenty mohou diferencovat do linií mezenchymálních tkání, včetně osteoblastů a adipocytů. Buňky amnionu se získávají z amniotické epitelové buňky a mohou diferencovat do neuronových linií (DAMIEN, P. a D. S. ALLAN, 2015).

Dospělé tkáně mohou být zdrojem např. mezenchymálních buněk (MSC), které jsou schopné za určitých podmínek diferencovat do různých buněčných linií včetně osteoblastů, chondrocytů a tukových buněk (AVRIL, P., et al, 2016).

1.3 Extracelulární matrix

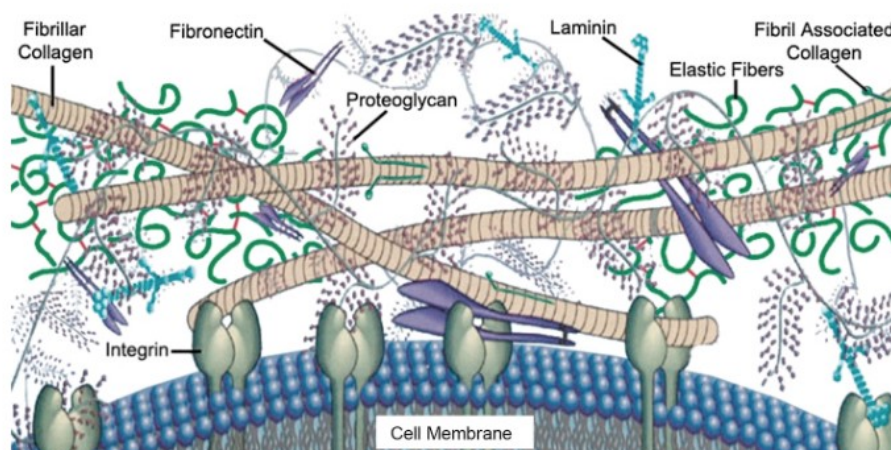
Jelikož hraje v regenerativní medicíně klíčovou roli prostředí, bude extracelulární matrix, věnována celá kapitola.

Extracelulární matrix (ECM) je mezibuněčná hmota, která je produkovaná buňkami. Složení a struktura ECM má mimo jiné vliv na výsledný fenotyp buněk. Jedná se především o biochemické prostředí, koncentraci kyslíku, pH, genovou expresi a faktor působení mechanické síly, kterými se řídí osud buňky. ECM má vliv na chování buněk, ulpívání buněk, migraci, proliferaci a trojrozměrné prostorové uspořádání (MECHAM, R. P., 2011). ECM představuje dynamickou rovnováhu mezi buňkami, tkáněmi a orgány, jelikož slouží jako tzv. informační cesta. Většina procesů vyplývá z interakce matrice s buněčnými receptory. Receptory se dají rozdělit do třech základních skupin, které odpovídají různým vývojovým procesům. První proces je buněčná adheze nebo uvolnění, které jsou zprostředkované receptory katheriny nebo integriny (KARAMANOS, N. K., 2012). Během migrace buněk zprostředkovává ECM interakce integrinů a proteoglykanových receptorů s prvky cytoskeletu. Druhý proces je exprese specifických genů v průběhu diferenciaci. Integrinové receptory zahrnují reakci komponentů bazální membrány s rozpustnými faktory. Třetím pochodem je morfogeneze epitelárních orgánů. Morfogeneze zahrnuje buněč-

nou smrt a průchod enzymů, integrinů, proteoglykanů a rozpustných faktorů přes receptory (MARTINS-GREEN, M. a M. J. BISSELL, 1995).

1.3.1 Složení ECM

Nativní ECM je složitý systém skládající se ze strukturních a funkčních proteinů, glykosaminoglykany, glykoproteiny (BADYLAK, S. F, 2004). V další části se proto zaměřím na jednotlivé komponenty nativní ECM a jejich význam.



Obrázek 4 Kompoziční uspořádání ECM (AMODT, J. M. a D. W. GRAINGER, 2016)

1.3.2 Kolagen

Kolagen je nejrozšířenější protein v lidském těle a tvoří základní složkou tkání, jako jsou šlachy, kosti, kůže a cévy. Kolagen je široce požíván v lékařství, v potravinářství a v tkáňovém inženýrství v důsledku dobré biologické aktivity a nízké imunogenicity. Jeho nedostatky jako např. nízká tepelná stabilita se dají eliminovat tím, že se kolagen sloučí s jinou látkou. Nejčastěji bývá slučován zejména s biopolymery, jako jsou fibroin, kyselina hyauronová a chondroitin sulfát. Přidáním fibroinu se zvýší souřezový modul kolagenových gelů od 1 kPa až do 10 kPa, přičemž se zlepší biokompatibilita a obsah vody v kolagenové membráně. Naopak tepelná stabilita a schopnost bobtnat zlepšuje přítomnost kyseliny hyauronové. Chondroitin sulfát v kombinaci s kolagenem výrazněji podporuje proliferaci chondrocytů oproti čistému kolagenu (DUAN, L. et al., 2016). Kolagen zajišťuje mechanickou stabilitu, pružnost a pevnost.

Molekuly kolagenu jsou produkovány buňkami a samy se organizují do hierarchických struktur, které tvoří kolagenové tkáně. Nejprve vznikají molekuly protokolagenu,

z tzv. pro α - řetězců, které jsou syntetizovány v ribozomech endoplazmatického retikula fibroblastů připojených na membráně. Protokolagen se díky prokolagenpeptidázám přeměňuje na kolagen. Základní složkou kolagenu je tropokolagen, což je vláknitá molekula skládající se ze tří spirálovitě stočených řetězců aminokyselin. Struktura kolagenu je tedy trojšroubovice, kde se střídají sekvence (Gly - X- Y)_n (CHANG, S. W. a M. J. BUEHLER, 2014). Podle úpravy spirál tropokolagenu a zastoupení jednotlivých aminokyselin rozlišujeme až 19 typů kolagenu. Jednotlivé typy se od sebe také liší prostorovým uspořádáním řetězce. A to na fibrilární a kolagen tvořící síť (DYLEVSKÝ, I., 2009).

Kolagen typu I je řazen do fibrilárního typu. V těle je hojně zastoupen a to až z 80-90% veškerého kolagenu. Jedná se o vlákna s velkým průměrem, která jsou mechanicky velmi pevná. Vyskytuje se jak ve volné pojivové tkáni, tak i v kostech, šlachách, rohovce, dentinu a v ligamentech (SCHWARZ, R. I., 2015).

Kolagen typu II je tvořen tenčími vlákny a není tak hojně rozšířen, nicméně je nepostradatelnou složkou chrupavek a je také k nalezení v pupečníku a meziobratlových ploténkách.

Kolagen typu III má velmi tenká vlákna. Kolagen typu III se většinou vyskytuje spolu s kolagenem typu I a nachází se v prostřední vrstvě kůže - ve škáře, dále se nachází v interstinálním traktu a v krevních cévách. Bazální membránu tvoří kolagen typu IV a kolagen typu VII a VIII. (FÖLDI, M. a E. FÖLDI, 2014). Na rozdíl od jiných konstrukčních materiálů patří kolagen mezi tzv. inteligentní materiály, které mají schopnost přizpůsobit své vlastnosti na mechanické podněty tak, že změní svou strukturu. Při tvorbě kolagení tkáně a její remodelace je důležité mechanické zatížení. Fyzická aktivita ovlivňuje jak syntézu, tak i degradaci kolagenu (CHANG, S. W. a M. J. BUEHLER, 2014).

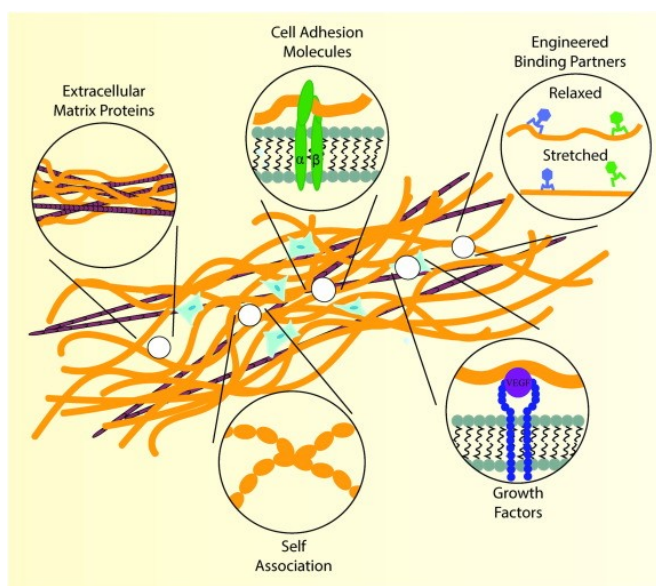
1.3.3 Glykoproteiny

Glykoproteiny jsou proteiny s navázanými sacharidy, přičemž se sacharidy na proteiny vážou glykosidovou vazbou. Do skupiny glykoproteinů řadíme fibronectin a laminin.

1.3.3.1 Fibronectin (FN)

Fibronectin patří mezi další neméně důležité kompartmenty ECM. FN je syntetizován jako monomer, který se velmi rychle dimerizuje v drsném endoplazmatickém retikulu. V roztoku tvoří kompaktní dimer, který nepodléhá shlukování fibril, zatímco v tkáních se přirozeně shlukuje. Dimer je složen ze dvou podjednotek o velikosti 250 kDa, které jsou vzájemně propojeny párem disulfidických vazeb. (LABAT-ROBERT, J., 2012).

Jednotlivé struktury fibronektinu ovlivňují jiné biologické funkce. Např. kvarterní struktura je důležitá pro stabilizaci FN do neaktivní konformace při oběhu krevní plazmy. Změny v sekundární a terciální struktuře mají velký vliv na vaznost integrinů. FN bývá často označován jako mozaikový protein (ZERN, M. a L. Reid, 1993). Při organizaci ECM hraje důležitou roli právě fibronektin, jelikož má určité domény s vazebnými místy, na které se vážou molekuly kolagenu, fibrinu, heparinu a signální molekuly. Vazebná místa jsou důležitá při adhezi, diferenciaci buněk, při opsonizaci buněk a při hojení ran. FN je důležitý v počáteční interakci mezi buňkami endotelu a scaffoldem (BHOWMICK, S. et al., 2017). FN je přítomný ve tkáních, kde je v nerozpustné formě syntetizován fibroblasty, epiteliárními buňkami a dalšími diferencovanými buněčnými typy. Také je obsažen v amniové tekutině, cerebrospinální tekutině, v lymfě, v plazmě a v intersticiální tekutině. Jeho charakteristická vlastnost je, že se ukládá zvláště v místech zranění a zánětu (ZADÁK, Z., 2002). Existuje celá řada izoform FN. Z jediného genu, sestaveného alternativním sestřihem primárního transkriptu, se vytvoří až 20 různých variant FN. K sestřihu mRNA dochází ve dvou oblastech EIIIA a EIIIB, kde jsou exony buď zahrnuty, nebo vynechány během celého procesu transkripce. Během vývoje organismu je četnost míst EIIIA a EIIIB zvýšená, naopak v dospělosti se jejich četnost snižuje. V praxi to znamená, že s přibývajícím věkem se schopnost hojit rány snižuje, v důsledku ubývání faktoru EIIIA a EIIIB (LABAT-ROBERT, J., 2012).

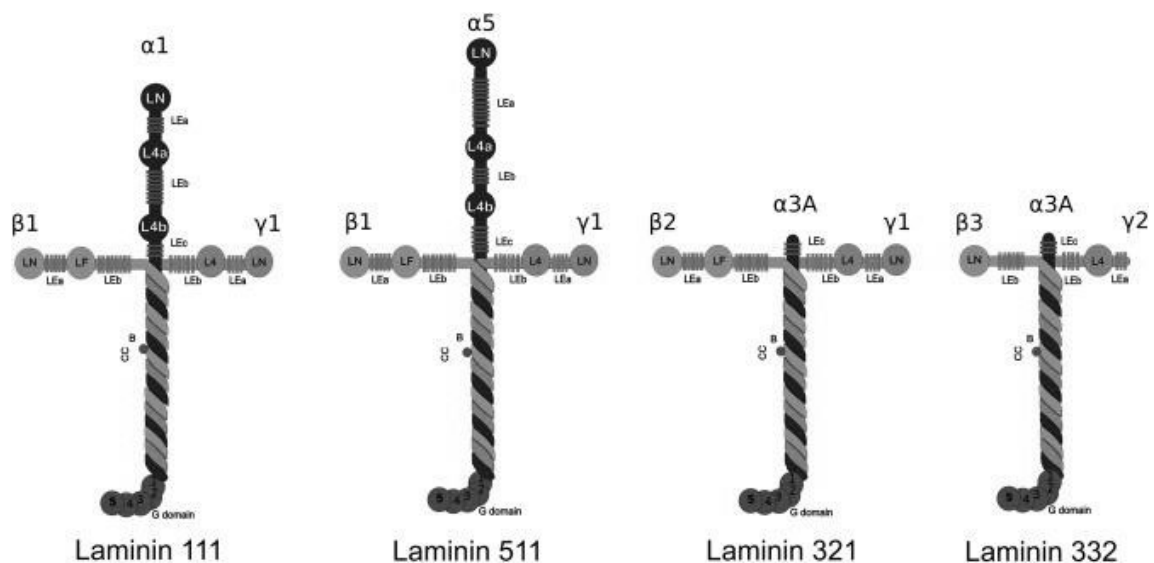


Obrázek 5 Kompozitní materiál složený z fibronektinu (oranžová) a kolagenu (fialová) s buňkami (modrá). FN konformace řídí chování buněk prostřednictvím adhezních molekul, jako jsou integriny (zelená). Buněčné chování je také řízeno

prostřednictvím interakcí s růstovými faktory (fialová) (ZOLLINGER, A. J. a M. L. SMITH, 2016)

1.3.3.2 Laminin

Molekulová hmotnost lamininu je 400 – 900 kDa. Lamininová molekula je tvořena heterotrimerem, který je složen ze třech podjednotek α , β , a γ . Každý řetězec existuje v několika isoformách a je kódován jiným genem. Nyní známe nejméně 18 lamininových isoform, které jsou kombinací 5 α , 3 β a 3 γ řetězce. Všechny řetězce jsou glykosylovány a u některých řetězců bylo prokázáno, že mají glykosaminoglykanové postranní řetězce (AUMAILLEY, M. et al., 2005). Laminin I byl objeven jako první v roce 1979. Tradičně, je každý heterotrimer očíslován podle pořadí, v jakém byl objeven. Například laminin 1 se nyní označuje jako laminin 111, protože se skládá z $\alpha 1$, $\beta 1$ a $\gamma 1$ řetězce (FLOREA, F. et al., 2016). Analýzou rotačního stínování bylo dokázáno, že molekuly lamininu tvoří křížovou strukturu, strukturu T a Y. Tyto řetězce mají homologní doménovou strukturu. Distribuce isoform lamininu je tkáňově specifická. Liší se v prostoru i v čase a je většinou určena expresí α řetězce. $\alpha 1$ řetězec je exprimován v časném embryonálním stádiu, přičemž v dospělém organismu má omezenou expresi především v reprodukčních orgánech, ledvinách, játrech a očích. $\alpha 2$ řetězec je převážně exprimován neuromuskulárním systémem, zatímco řetězec $\alpha 3$ je exprimován v epitelu (PERRIN, A., J. ROUSSEAU a J. P. TREMBLAY, 2017).

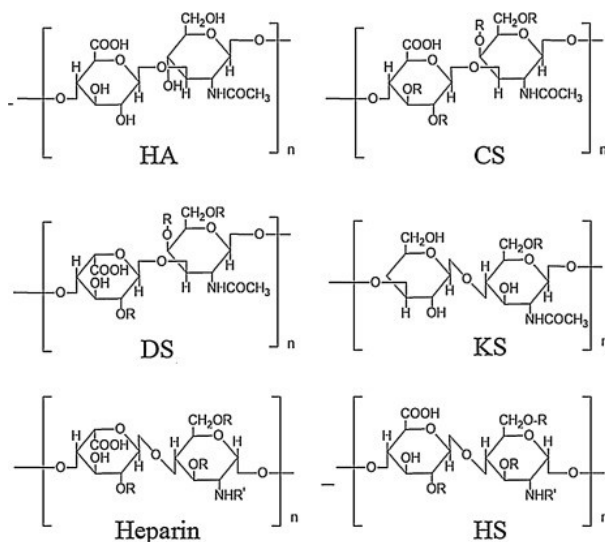


Obrázek 6 Strukturální rozdíly lamininu (FLOREA, F. et al., 2016)

Lamininové molekuly jsou výlučně rozpustné ve vodě. Přes interakci laminin-receptor se kumulují v základních membránách, kde díky vápníku polymerují. Genetická nepřítomnost několika isoform lamininu vede k vážným vývojovým vadám nebo ke smrti (FLOREA, F. et al., 2016).

1.3.4 Glykosaminoglykany (GAGs)

Mnoho fyziologických funkcí závisí na správné lokalizaci proteinů. Roztříděné informace jsou obsažené přímo v aminokyselinové sekvenci nebo v posttranslační modifikaci. Na rozdíl od N- a O- vázaných glykanů jsou GAGs dlouhé, nerozvětvené řetězce skládající se ze dvou střídajících se monosacharidů D- glukosaminu nebo galaktsaminu a zbytkem kyseliny uronové viz obrázek. Glykosaminoglykany mohou být rozděleny do dvou hlavních tříd, jedna obsahuje kyselinu hyauronovou (HA) a druhá se skládá z chondroitin sulfátu (CS), dermatan sulfátu (DS), keratan sulfátu (KS), heparinu a sulfátu heparinu (HS). GAGs mají velký potenciál v klinické aplikaci jako např. složka antikoagulační, protinádorová a protizánětlivá (GHATAK, S. et al., 2015). Délka řetězců je variabilní. Obvykle je molekulová hmotnost v rozmezí 6 - 34 kDa. Což je asi 40 - 120 disacharidů. Rozdílné sacharidy umožňují specifické interakce s různými ligandy, čímž se reguluje buněčná signalizace, migrace a diferenciací (MIHOV, D. a M. SPIESS, 2015).



Obrázek 7 Struktura a syntéza glykosaminoglykanového řetězce (GHATAK, S. et al., 2015)

Růstové faktory (GFs)

Růstové faktory jsou důležité morfogenetické proteiny, které se používají ke stimulaci buněčné proliferace, diferenciací a sekrece ECM. Jsou tedy nezbytné pro regenerační pro-

cesy. Růstové faktory jsou přirozeně vylučovány z buněk, kde přímo reagují s povrchovými receptory ECM. Ačkoli je jejich terapeutický potenciál velmi výrazný v regenerativních postupech, je nutné brát v potaz jistá omezení týkající se špatné stability proteinu a nízké rekombinaci při expresi (MITCHELL, A. C. et al., 2016). To, jaký růstový faktor zvolíme, závisí na 1) typu použitých buněk (pluripotentních nebo diferencovaných) 2) na chování, které se indukuje (diferenciace, proliferace, ukládání ECM nebo krvetvorba) 3) na typu scaffoldu (chrupavky, šlachy, kosti). Jedním z nejvíce omezujícím aspektem je chemická a fyzikální stabilita (DEL MERCATO, L. et al., 2016).

1.3.5 Zdroje pro tvorbu tkáňového lešení

Pro účely TE se dá ECM rozlišit podle původu. Jednak mohou být zdrojem přírodní materiály, zde se nejčastěji využívá skopová zvěř, prasata nebo hlodavci. Tedy, ECM použita ze stejného druhu se nazývá alogenní, zatímco ECM použita z jiného druhu se nazývá xenogenní. Problémem je však fakt, na který upozorňuje ve své práci např. tým pod vedením Riedera, který zkoumal možnou imunitní odpověď organismu na alogenní i xenogenní materiály. Ve svých experimentech došel k závěru, že ani histologicky dobře decelularizovaná tkáň ani zesíťovaná struktura xenogenního organismu neeliminuje imunitní odpověď příjemce. Také se domnívá, že reakce na imunitní odpověď závisí na druhu použité tkáně. Z výsledků vyplývá, že nezesíťovaný xenogenní materiál není vhodný k aplikaci (RIEDER, E., A. STEINACHER-NIGISCH a G. WEIGEL, 2016). Zesíťovaná ECM se používá za účelem zvýšení pevnosti a zpomalení degradace *in vivo*. ECM lešení mohou modulovat hojení ran a obnovu tkáně, tak, že nemusí docházet k zjizvení (BADYLAK, S. F, 2004).

2 SCAFFOLD (TKÁŇOVÉ LEŠENÍ)

2.1 Design scaffoldu

Scaffold neboli tkáňové lešení slouží pro počáteční oporu při adhezi buněk, jejich proliferaci, diferenciaci a sekreci ECM s cílem obnovit poškozenou tkáň. Právě ECM zajišťuje strukturální integritu tkáně. Scaffold slouží také jako nosič pro buňky, růstové faktory nebo jiné biomolekulární signály. Je důležité, aby scaffold napodoboval strukturu a vlastnosti cílové tkáně co nejdříve (CHEN, F. M. a X. LIU, 2016). Tkáňové lešení se dá vytvořit jak ze syntetických materiálů, tak i z přírodních a také jejich kombinací. Výrobní techniky se liší s ohledem na požadavky scaffoldu. Rozdíly ve výrobě budou zmíněny v samostatné kapitole. Bez ohledu na to, jakou tkáň bude scaffold nahrazovat existuje řada požadavků, které musí být splněny.

Ideální lešení by mělo mít dostatečně velkou síť pórů v těsném kontaktu, aby byla zajištěna migrace buněk a jejich adheze do pórů skeletu, tak aby se mohla utvořit homogenní tkáň (O'BRIEN, F. J., 2011). Jestliže je velikost pórů menší než 1 μm , dochází k interakci a adsorpci proteinů. Pokud je velikost pórů v intervalu od 1 μm – 20 μm začíná počáteční růst buněk. Buněčná proliferace a migrace probíhá při 20 μm – 100 μm . Buněčný růst pokračuje při zvětšování pórů do intervalu 100 μm - 1000 μm . Nad 1000 μm jsou póry důležité pro zachování tvaru a funkčnosti implantátu (DUTTA, R. C. et al., 2017).

Lešení by také mělo obsahovat kanálky, jimiž se zajistí cirkulace kyslíku a živin a naopak umožní odvod odpadních produktů. Dále pak je nezbytná biokompatibilita. Lešení by mělo vyvolat vhodnou biologickou odpověď, tak aby se zabránilo nežádoucí reakci okolní tkáně. Dále pak odpovídající mechanická pevnost a možná biodegradace (SÁNCHEZ, P., J. L. PEDRAZ a G. ORIVE, 2017). Při biologické degradaci je důležité, aby se zvolený materiál rozkládal na menší netoxické látky, aniž by ovlivňovaly okolní tkáň. (LIU, C, Z. XIA aj. T. CZERNUSZKA, 2007). Konečné požadavky na scaffold závisí na konkrétním účelu použití. Z tohoto důvodu musí být tkáňové lešení sestavené tak, aby byly zachovány chemické a fyzikální signály, jako v živém systému, aby buňky specificky reagovaly na daný signál.

Klíčový faktor, který ovlivňuje osud buňky je topografie scaffoldu. Tedy definovaná drsnost, velikost, tvar a vzájemné propojení pórů a vláken a také orientace vláken. Dalším klíčovým faktorem, který ovlivňuje osud buňky je mechanická vlastnost scaffoldu. Engler a kol., ve své studii popsali, že mezenchymální kmenové buňky adherované na gelovém

podkladu o modulu pružnosti v rozmezí 0,1 kPa do 40 kPa rozpoznají tuhost substrátu a přenášejí ji do svého fenotypu a do další buněčné linie (IDASZEK, J. et al., 2016).

2.2 Vhodné materiály

K výrobě a realizaci scaffoldů se využívají biomateriály. Jsou to látky přirozeně se vyskytující nebo synteticky vytvořené. Jejich přesná definice je z roku 1976 a to: „Biomateriál, je definovaný jako neživotaschopný materiál používaný k zdravotnickým účelům. Je určen pro interakci s biologickým systémem“. Dále se postupem času definice upravila tak, že biomateriál je prostředek sloužící k léčbě tkání, orgánů nebo celého těla (O'BRIEN, F. J., 2011).

Kritéria pro výběr biomateriálů jsou na základě jejich struktury, molekulové hmotnosti, rozpustnosti, hydrofilnosti nebo hydrofobnosti a povrchové energie. Materiály na výstavbu scaffoldu mohou být trvalé nebo biologicky odbouratelné v závislosti na použití (DHANDAYUTHAPANI, B. et al., 2011). Biomateriály se rozvíjí tak, aby byly kompaktní s živými systémy s buňkami *in vitro* i *in vivo* (CHEN, F. M. a X. LIU, 2016). Jako první se začaly používat zlaté a slonovinové kraniální výztuže. O mnoho set let později nahradily slonovinu a zlato polymerní materiály. Ze začátku hlavně polymethylmetakrylát (PMMA) (BERGMANN, C. P. a STUMPF, 2013).

2.2.1 Přírodní

Přírodní materiály zvolené pro aplikaci v tkáňovém lešení jsou buď sloučeniny nativní ECM, nebo polymery získané z jiných biologických systémů (WANG, L. et al., 2013). V mnoha případech se volí na výstavbu scaffoldu právě přírodní materiály, jelikož vykazují podobné chování jako ECM, jsou biokompatibilní a lépe interagují s buňkami (PORZIONATO, A. et al., 2015). Během několika posledních let se stalo více polymerů dostupných pro aplikace v tkáňovém inženýrství (RANA, D. et al., 2015). V klinické praxi se jako první začaly používat biologicky odbouratelné polymery (DHANDAYUTHAPANI, B. et al., 2011).

Přírodní polymery lze klasifikovat do tří skupin a to 1) proteiny, kde patří kolagen, želatina, fibrinogen, elastin, keratin, aktin a myosin (HE, Y. a F. LU, 2016); 2) polysacharidy tj. celulóza, amyloza, dextran, chitin a glykosaminoglykany (PARK, H. J., S. J. YU a K YANG, 2014) a 3) polynukleotidy (DNA, RNA) (RATNER, B. D., 1996).

2.2.2 Syntetické

Syntetické biomateriály mají určitou výhodu, jelikož se dají snáze kontrolovat fyzikální a mechanické vlastnosti a mohou být použity pro výstavbu jak měkkých, tak i tvrdých tkání (DHANDAYUTHAPANI, B. et al., 2011). Další neméně důležitá výhoda je jejich cena. Syntetické lešení jsou mnohem levnější a mohou se tak vyrábět ve velkém množství a skladovat se delší dobu.

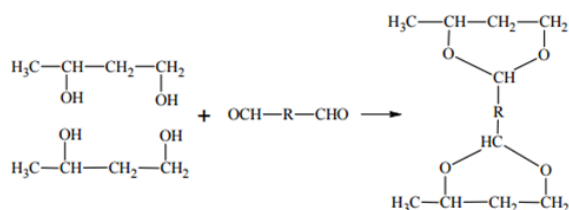
Syntetické materiály vykazují předvídatelné a reprodukovatelné mechanické a fyzikální vlastnosti jako je např. pevnost v tahu, modul pružnosti a rychlost degradace. Do této skupiny lze zařadit PLA, PGA, PLGA a jejich kopolymery (WEI, G. a P. X. MA, 2014).

Největší problém u syntetických materiálů je spojen s biokompatibilitou. Buňky mohou mít problém s uchycením a růstem, proto se povrch materiálu upravuje buď laserem, nebo se na něj nanáší povlak z přírodní látky, většinou se jedná o kolagen. S rozvojem kompozitních materiálů roste i jejich uplatnění právě v tkáňovém inženýrství (MAITZ, M. F., 2015).

2.2.2.1 Polyvinyl alkohol PVA

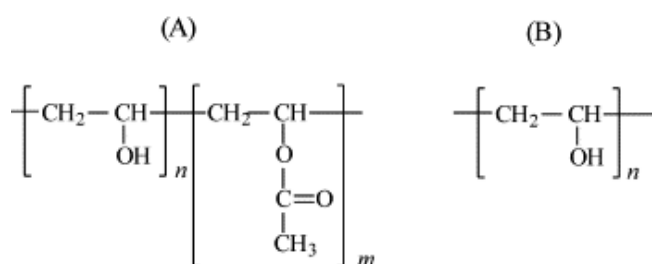
PVA je syntetický polymer, který se začal používat od roku 1930 a našel uplatnění v celé řadě průmyslových, zdravotních a potravinářských aplikacích. Svým chováním v mnohém připomíná želatinu, proto se používá např. jako ochranný koloid pro suspenzní polymerace nebo jako zahušřovadlo pro nátěrové hmoty, také k výrobě lepidel, či v potravinářství pro přípravu ovocného želé (DUCHÁČEK, V., 2006). Také se vyskytuje při výrobě kontaktních čoček (HYON, S. H., 1994), při výrobě ortopedických pomůcek a také při výrobě obvazů. PVA je ve vodě rozpustný, obsahuje-li však více než 5% vinylacetátových jednotek. Ve vodě se rozpouští až při teplotě vyšší než 65 °C. Rozpustnost také klesá s rostoucí molekulovou hmotností polymeru. Dále je PVA netoxický, biologicky kompatibilní a biologicky odbouratelný.

PVA se nedá připravit běžnou reakcí, neboť svůj monomer nemá. V takovém případě se využívá reakce polymeranalogické, kde je výchozí složka vinylacetát. Při polymeraci probíhá další reakce a to polyvinylalkohol s glutaraldehyd. Jako síťovací činidlo používá formaldehyd nebo acetaldehyd spolu s γ zářením. Tím, že je zavedeno síťovadlo je nutné zvážit jeho toxicitu (YE, M., P. MOHANTY a G. GHOSH, 2014).



Obrázek 8 PVA + glutaraldehyd \rightarrow vznik sítě (YE, M., P. MOHANTY a G. GHOSH, 2014)

Kromě chemického síťování lze použít také metodu fyzikální, která spočívá v opakovaném zmrazování a rozmrazování, při kterém se zavádí vodíkové vazby, nastává krystalizace, oddělení fází a následné síťování. Fyzikální metoda je často upřednostňována, jelikož se nemusí řešit otázka toxicity chemických síťovadel. Kromě toho vykazují fyzikálně zesíťované gely PVA větší mechanickou pevnost a tuhost, která je důsledkem přítomnosti mikrokystalů (HASSAN, CH. M. a N. A. PEPPAS, 2000). Fyzikální charakteristiky PVA závisí na použité metodě hydrolyzy. Jestli se jedná o částečnou hydrolyzu nebo celkovou hydrolyzu (VERSTRAETE, G., W. DE JAEGHERE a J. VERCRUYSSSE, 2017). Změnou délky původního polyvinylacetátu a stupněm hydrolyzy alkalické nebo kyselé se mění molekulová hmotnost (20.000 – 400.000), rozpustnost, pružnost, pevnost v tahu a přilnavost.



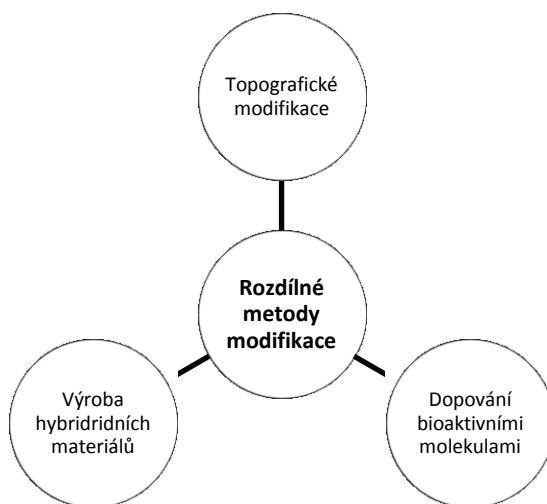
Obrázek 9 Struktura PVA A) částečně hydrolyzovaný B) plně hydrolyzovaný

2.3 Modifikace polymerů

V posledních několika desetiletích se polymerní materiály rozšiřují do všech průmyslových odvětví a používají se v mnoha inovačních procesech. Jejich povrchové vlastnosti se upravují tak, aby vyhovovaly konkrétní aplikaci bez ovlivnění jejich vlastností v celém objemu. Povrchová úprava se často používá k vytvoření plochy s výrazně odlišnými vlastnostmi než má polymerní matrice (JASSO – GASTINEL, C. F., 2017). Vzhledem k tomu,

že jsou polymerní povrchy nereaktivní, vyžaduje se chemická změna povrchové vrstvy. Změna povrchu probíhá tak, že se generují vysokoenergetické částice, jako jsou radikály, ionty a molekuly excitující elektrony. Většinou se používá plazma, plamen, UV záření, laser, X- ray záření, iontový paprsek a působení koróny (SHARMA et al., 2002).

I když vodivé polymery nabízí mnoho výhod oproti jiným materiálům, je nutné brát v potaz problém s aplikací v tkáňovém inženýrství (GUIMARD, N. K. et al., 2007). V dnešní době je tendence spojit vodivost a biokompatibilitu polymerů. Metoda přípravy spočívá v dopingu biologickými přísadami nebo začlenění biologicky aktivních molekul pro zvýšení adheze buněk a lepší proliferaci (WARGO, S. L., T. R. KUMAR a A. J. RUSSELL, 2006).



Obrázek 10 Různé metody modifikace vodivých polymerů

2.3.1 Modifikace povrchu bioaktivními molekulami

V současné době se volí především jako přísady bílkoviny ECM. Nejčastěji se dopují vodivé polymery bioaktivními molekulami jako např. heparinem, dextrasulfátem, kyselinou hyauronovou, chitosanem, kolagenem, růstovými faktory, kyselinou oligodeoxyguanylovou a ATP. Nicméně dopování molekul má určitá omezení jako je např. pokles vodivosti (NICKELS, J. D. a CH. E. SCHMIDT, 2013). Gelmi et al. ukázal, že dopování polymeru bioaktivními molekulami může mít vliv na fyzikální vlastnosti celého kompozitu, především na povrchovou drsnost. Drsnost závisí na druhu dopovací molekuly (GELMI, A., M. J. HIGGINS a G. G. WALLACE, 2010).

2.3.2 Výroba hybridních a kompozitních materiálů

Kompozitní materiál, je strukturně složený ze dvou nebo více samostatných částí. Definice se nevztahuje na molekulární úroveň, tudíž homogenní lešení složené pouze z kopolymerů není považované za kompozit. Většinou je spojitost hybridních a kompozitních materiálů s regenerací kosti. Bylo prokázáno, že některé bioaktivní skla mají potenciál pro podporu regenerace kosti v kombinaci s čistou biokeramikou (PEREIRA, M. M., J. R. JONES a L. L. HENCH, 2013). Polymery PLA a PCL jsou považovány za neosteokonduktivní tzn. že, nezprostředkovávají strukturní oporu pro infiltraci a regeneraci kosti (WANG, M., 2003). Do polymeru se často zavádí keramika ze dvou důvodů a to, aby se vytvořilo lešení osteokonduktivní a aby došlo k celkovému posílení scaffoldu. Existují dva přístupy pro výrobu polymerního kompozitního lešení. První způsob spočívá ve vložení částic biokeramiky do matrice a druhý způsob umožňuje potahovat scaffold vrstvou apatitu (HUANG J. a S. BEST, 2014).

2.3.3 Topografické modifikace

Klíčovým faktorem, který ovlivňuje osud buňky je také topografie povrchu scaffoldu. U povrchu můžeme stanovovat smáčivost, funkční skupiny, povrchový náboj a hustotu (ITO, Y., 1999). Kunzler et al. Studoval proliferaci krysích osteoblastů a lidských fibroblastů a došel k názoru, že proliferace osteoblastů se výrazně zvyšuje s rostoucí drsností povrchu. Naopak fibroblasty reagovaly na zvyšující se drsnost negativně (KUNZLER, T. P., 2007). Dále bylo zjištěno, že optimální úhel smáčení je pro fibroblasty v intervalu 60° - 80° (WASHBURN, N. R., 2004).

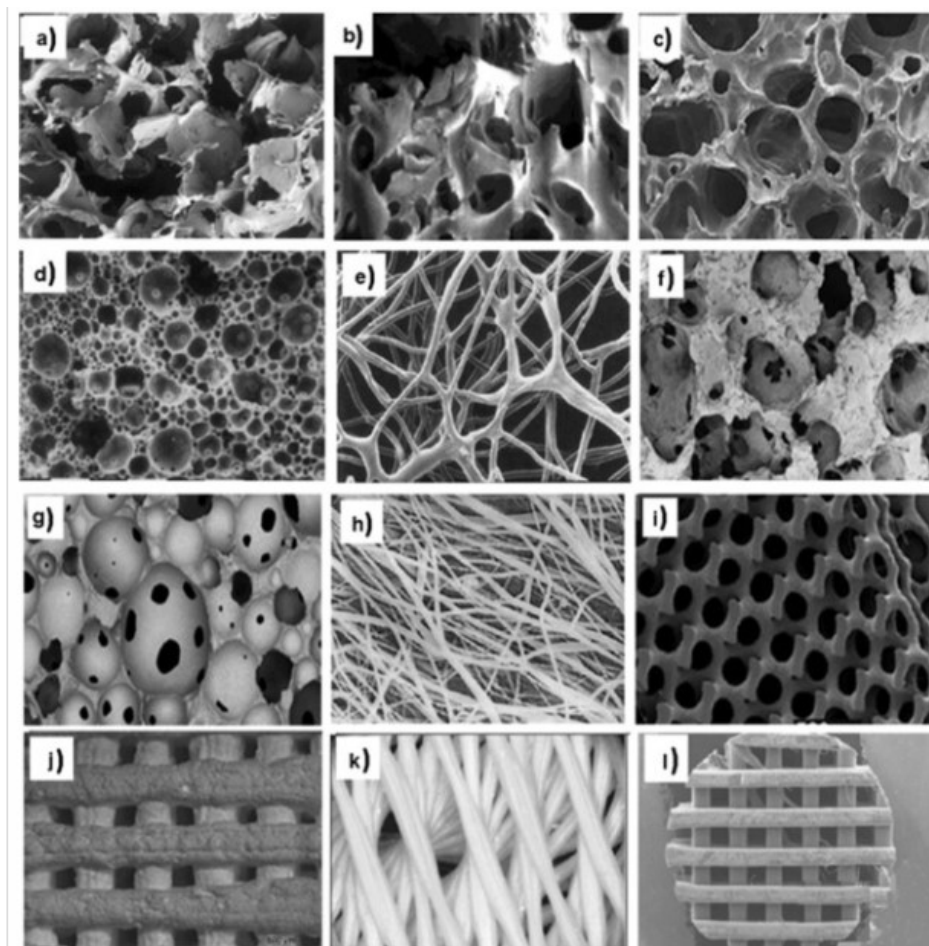
Mechanické vlastnosti také ovlivňují osud buňky. Engler sledoval vliv hustoty ligandu a tuhost polyakrylamidových gelů, které byly navíc potaženy kolagenem, a přišel na to, že se počet kontaktních míst k adhezi zvyšuje s tuhostí matrice a hustotou ligandu. Engler se svými spolupracovníky zkoumal diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk (MSCs) na gelovém podkladu o modulu pružnosti 0,1 kPa – 40 kPa a dospěl k závěru, že MSC cítí tuhost substrátu a přenášejí informaci do fenotypu (ENGLER, A. J., 2006).

2.4 Výroba

Jak již bylo zmíněno několikrát výše, materiál, ze kterého se bude vyrábět scaffold se volí tak, aby co nejlépe vystihovat původní složení tkáně. Ideální materiál je ten, který se

postupně resorbuje a je nahrazován regenerovanou tkání (LANGER R. a J. VACANTI, 2016). Kvalita a reprodukovatelnost z hlediska fyzikálních a funkčních vlastností jsou další požadavky na výběr materiálu. Stejně tak, jako je důležitý výběr materiálu, je stejně důležité zvolit vhodnou metodu zpracování. Každá metoda má své výhody, ale zároveň i nedostatky.

Mezi konvenční metody patří např. částicové loužení, rapid prototyping, vytlačování, lisování, 3D tisk, stereolitografie, selektivní laserové spékání, vstřikování, elektrostatické zvláknování (LEE, K. Y. et al., 2009), gelace, lyofilizace, slinování, fotopolymerace a lepení vláken (BARBETTA, A. et al., 2010).



Obrázek 11 Typy struktur scaffoldů SEM mikroskopie (DUTTA, R. C. et al., 2017)

- a) PLGA hybridní lešení připravené částicovým loužením
- b) Scaffold z hedvábí připravený loužením soli a napěňováním plynem
- c) PLA scaffold připraven pomocí superkritického CO₂ při tlaku 240 barů a teplotě 35°C.
- d) 15% PLLA pěna připravená pomocí termicky indukované fázové separace

- e) PGA scaffold vyrobený pomocí tepelného spojování vláken
- f) Spongiozní matrice
- g) Scaffold připravený zpěňováním
- h) 7,3 % PLLA scaffold připravený elektrostatickým zvlákňováním
- i) PDLA scaffold zkonstruovaný pomocí stereolitografie
- j) Scaffold CaSiO_3 připraven 3D tiskem
- k) Porézní lešení připravené pomocí modelové depozice tavením
- l) PCL scaffold vyrobený metodou Bioplotter

2.4.1 Předem vyrobený scaffold

Jedná se o nejčastěji využívaný způsob výroby scaffoldů. Výhoda této přípravy spočívá v tom, že si můžeme zvolit materiál, který se nejlépe přibližuje reálné tkáni, kterou chceme nahradit (IVIGLIA, G. Et al., 2016).

Samotná technologie výroby tohoto typu scaffoldu zahrnuje tři způsoby výroby. Při prvním postupu se vytváří póry v materiálu a to buď působením plynu, jako je oxid uhličitý, kapaliny, nejčastěji se jedná o vodu, anebo pevné látky např. parafin (YU, J. Z. et al., 2017). Směsi jsou zpracovány a podle povahy použité látky se porogenující látky odstraní sublimací, odpařením nebo tavením. Po odstranění vzniká struktura porézní. Druhá metoda při výrobě požadované struktury zahrnuje proces, kdy se materiál formuje do předem určené 3D struktury. Používají se techniky jako laserové slinování, stereofotografie a 3D tisk. Pevnost materiálu vzniká jeho slepováním nebo zesítováním (ASADI-EYDIVAND, M. et al., 2016). Třetí kategorií je spojování netkáné či tkané struktury vláken působením lepidla nebo tepelné energie, čímž se získá porézní síť. Největší výhodou celé technologie je její přesnost. Proto se takto vytvořený scaffold nejvíce blíží svými fyzikálně - chemickými vlastnostmi ECM cílových tkání. Nejvíce se tedy hodí pro přípravu tkání, které mají mít nosnou funkci (STRATTON, S. et al., 2016). Nicméně, takto vyrobený scaffold má i nevýhody. Hlavní nevýhoda je ta, že nasazení buněk na povrch je časově dosti náročné a penetrace buněk do lešení je značně omezená, což vede k nehomogenní distribuci buněk (ATALA, A. a R. P. LANZA, 2001).

2.4.2 Decelularizovaný scaffold

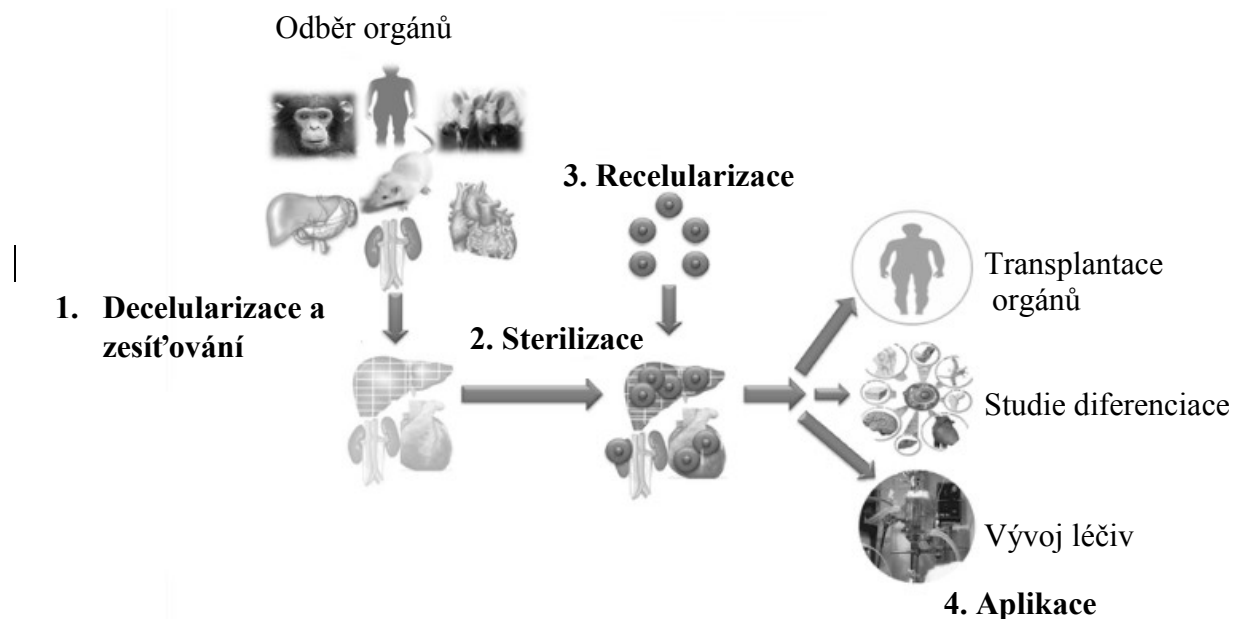
Tato metoda je založena na principu odstranění buněk z ECM. První pokusy vyrobit takto decelularizovaný scaffold byly po roce 1970. Počáteční experimenty se prováděly na játrech, plicích a ledvinách (HUSSEIN, K. H. et al., 2016).

Výhodou decelularizovaného scaffoldu je jeho struktura a složení, které nejlépe simuluje nativní scaffold. Při decelularizaci se odstraňují alogenní nebo xenogenní buněčné

antigeny z tkání, aby složení ECM zůstalo stejné (BADYLAK, S., D. FREYTES a T. GILBERT, 2009).

Samotné odstraňování buněk se děje pomocí fyzikálních, chemických a enzymatických metod (CHEN, K., X. LIN a Q. ZHANG, 2015). Buněčné membrány se začínají rozpadat při fyzikálních procesech, jako je např. opakování cyklů zmrazení a rozmrazení nebo pomocí iontových reakcí nebo použitím hypotonických, či hypertonických roztoků, tlaku, míchání a ultrazvuku. Zmrazení se používá často pro decelularizaci šlachové, vazivové a nervové tkáně. Rychlým zmrazením tkáně, vzniknou intracelulární ledové krystalky, které naruší buněčné membrány a způsobí buněčnou lýzu. Rychlost změny teploty musí být pečlivě kontrolována, aby nedošlo k poškození scaffoldu (FAULK, D. M., J. D. WILDEMANN a S. F. BADYLAK, 2015). Při enzymatické reakci se působí nejčastěji trypsinem, nukleázou, kolagenázou, alfa galaktosidázou, fosfolipázou, lipázou, dispázou a thermolysinem. Chemické ošetření zahrnuje použití alkoholů jako např. ethanol, isopropanol, glycerol a methanol. Ty se používají k odstranění lipidů z tkáně dehydratací a následnou lýzou buněk (GILBERT, T., T. SELLARO a S. BADYLAK, 2006). Mezi hlavní nevýhody alkoholů patří schopnost působit na tkáň fixačně, sráží proteiny a poškozují strukturu ECM. Další chemické metody využívají kyselin, zásad, iontových a neiontových detergentů (HUSSEIN, K. H. et al., 2016).

Problém může nastat při nedokonalém odebrání všech buněčných složek. Zbylé buňky by mohly po implantaci vyvolávat imunitní reakce (HUSSEIN, K. H. et al., 2016), (BADYLAK, S., D. FREYTES a T. GILBERT, 2009). Aby se zamezilo imunitní reakci organismu, je nutné působit na decelularizovaný scaffold kyselinami nebo zásadami. Účinně rozpouští cytoplazmatické složky buněk a odstraňují zbylé nukleové části tím, že katalyzují hydrolytické degradace biomolekul. Většinou se používá kyselina peroctová, kyselina octová, kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a zásada hydroxid amonný. Po odstranění buněk z ECM nastává další fáze a to sterilizace připraveného scaffoldu. Sterilizace je považována za nezbytný krok při navrhování scaffoldu. Musíme brát v potaz fakt, že sterilizací nesmí změnit mechanické ani biologické vlastnosti skeletu. Často se využívá ke sterilizaci kyselina peroctová (PAA), mírně kyselá elektrolyzovaná vody (SAEW), gamma záření, elektronový paprsek (EBI) a superkritický CO₂. Ideální sterilizační činidlo by mělo být bezpečné, jednoduché na použití a vykazovat dobré antiseptické účinky (SIRITIENTONG, T., T. SRICHANA a P. ARAMWIT, 2011).



Obrázek 12 Schéma průběhu vzniku decelularizovaného scaffoldu, recelularizace a potenciální aplikace (upraveno podle HUSSEIN, K. H. et al., 2016).

2.4.3 Scaffold připravený buněčnou sekrecí ECM

Jedná se o techniku, kdy buňky vylučují svoji vlastní ECM. Scaffold se dá aplikovat např. na rohovku, myokard a v preklinických studiích. Touto metodou mohou vznikat buňky epitelu a endotelu. Podstata metody je, že buňky tvoří velmi těsné spoje mezi sebou navzájem a vylučují ECM. Díky této metodě se dá předejít kumulaci buněk a špatné dispergaci. Bohužel se obtížně konstruuje tlustší tkáň nad 30 μm (HINDERER, S., S. L. LAYLAND a K. SCHENKE-LAYLAND, 2016).

2.4.4 Scaffold z hydrogelové matrice

Zapouzdření je proces, při kterém jsou živé buňky obklopeny většinou hydrogely. Hydrogel je zesíťován kovalentně či iontově a je ve vodě rozpustný. K tvorbě hydrogelu se používají přírodní i syntetické materiály schopné tvorby hydrogelu nebo polymerace a jsou kompatibilní s živými buňkami. Zesíťování je důležité pro životaschopnost buňky. Požaduje se, aby byl hydrogel propustný pro živiny, tedy pro kyslík, glukózu a dále pro metabolity jako oxid uhličitý a kyselinu mléčnou. Zároveň by hydrogel měl zabránit kontaktu zapouzdřené buňky s protilátkami a antigeny, aby nedošlo k imunitní reakci. Využívá se nejčastěji alginátu a agarózy, ze syntetických materiálů polyvinyl alkoholu (PVA) nebo polyethylen-glykolu (PEG) (VARAPRASAD, K., K. et al., 2015).

2.4.5 Výroba vláken

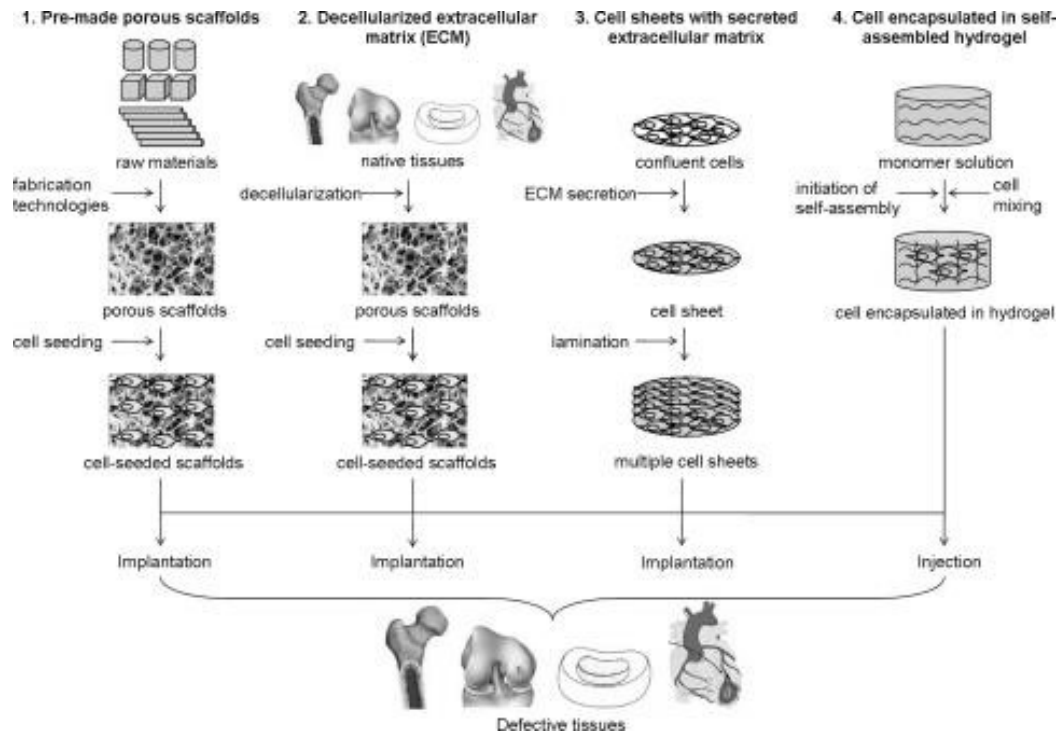
Většina vláken sloužících v regenerativní medicíně se vyrábí elektronovým zvlákněním. Jedná se o metodu, při které můžeme kontrolovat vlastnosti výsledných vláken a je vhodná pro širokou škálu přírodních i syntetických materiálů, ale také pro kov nebo keramiku (CHEN, H., R. et al., 2013).

Zatímco nanovlákna jsou vhodné k použití jako lešení pouze v rozměrech 2D, jelikož póry uvnitř struktury jsou příliš malé na podporu růstu buněk. Proto je cílem této elektronové metody zvětšení pórů uvnitř pletiva. Většinou se používají biologicky odbouratelné polymery především PLGA, PVA, kolagen a chitosan (GAO, L. et al., 2016). Také se často materiály mezi sebou kombinují. Jako např. PVA s chitosanem. PVA má výborné fyzikálně chemické a biologické vlastnosti a chitosan působí velmi pozitivně na regeneraci nervové tkáně (WU, J. a Y. HONG, 2016).

Dalším typem vláken, která se ukázala jako účinná v regenerativní medicíně, jsou vlákna vyrobená z peptidů. Vlákna se tvoří spontánně přes interakce hydrofobních a hydrofilních částí peptidového řetězce. Na jednotlivé funkční skupiny lze navázat receptory nebo růstové hormony (CHEN, H., R. et al., 2013).

2.4.6 Shrnutí technik přípravy scaffoldů

V následujícím obrázku a tabulce jsou shrnuty všechny techniky přípravy scaffoldů, které byly popsány výše.



Obrázek 13 Různé techniky přípravy scaffoldů (CHAN, B. P. a K. W. LEONG, 2008)

Tabulka 2 Shrnutí vlastností jednotlivých typů scaffoldu (CHAN, B. P. a K. W. LEONG, 2008)

Typ scaffoldu	Předem vyrobený	Decelularizace ECM	Sekrece ECM	Hydrogelová matrice
Výchozí materiál	Přírodní nebo syntetické materiály	Allogenní nebo xenogenní tkáň	buňky	Přírodní nebo syntetické materiály schopné tvořit hydrogel
Transfer do organismu	Implantace	Implantace	Implantace	Vstřík
Výhody	Velká škála materiálů	Nejlépe simuluje přírodní scaffold	Nejvíce biokompatibilní	Způsob dopravy
Nevýhody	Časově náročný, nehomogenita	Nehomogenita, obtížnost odstranění všech buněk	Potřeba více vrstev	Jen pro měkou tkáň
Aplikace	Široká škála použití	Nosné tkáně	Epiteliální a endoteliální tkáň	Měkká tkáň

2.5 Sterilizace

Kritickým atributem implantovaných zdravotnických preparátů je jejich sterilita. Centrum pro kontrolu nemocí (Center for Disease Control) definuje sterilizaci jako proces, který ničí nebo eliminuje všechny formy mikrobiálního života, zatímco dezinfekce pouze odstraňuje patogenní mikroorganismy s výjimkou bakteriálních spor. Sterilní zdravotnické prostředky lze získat aseptickou výrobou nebo terminální sterilizací. Nicméně, terminální sterilizace se upřednostňuje před aseptickým zpracováním (REDIGUIERI, C. et al., 2016). Použitá metoda sterilizace se volí tak, aby se po sterilizaci zachovaly strukturní i biochemické vlastnosti scaffoldu. V dnešní době je téma sterilizace velmi aktuální v souvislosti s biodegradovatelným scaffoldem (SIRITIEN TONG, T., T. SRICHANA a P. ARAMWIT, 2011). Zatím byly prováděné experimenty s ethylenoxidem a gama zářením neúspěšné. Tyto neúspěchy jsou způsobené větší citlivostí scaffoldu vzhledem k jeho chemické povaze. Nejnovější studie zkouší biodegradovatelný scaffold podrobit cyklu sušení a vymrazování pomocí superkritického CO₂ (DAI, Z. et al., 2016).

2.5.1 Fyzikální metody sterilizace

Mezi fyzikální metody sterilizace scaffoldů patří autoklávování, sterilizace suchým teplem, γ záření, UV záření, ozón a plasma. Mezi chemické metody řadíme působení ethylenoxidu.

2.5.1.1 Autokláv

Hojně rozšířenou metodou je použití ohřáté páry pod tlakem. Typický sterilizační cyklus probíhá při teplotě 121°C po dobu alespoň 15 – 20 minut nebo při teplotě 132°C po dobu 4 minut. Výhodou je to, že je autokláv bez chemických procesů. Nevýhodou je že nelze použít na všechny materiály. Musíme brát také v potaz tloušťku a pórovitost scaffoldu. Porézní materiály potřebují speciální parametry procesu, jako je například předfáze ve vakuu, kde se odstraní z pórů vzduch. Důležitý parametr je bod tání materiálu. Nevhodný materiál je např. polykaprolakton (PCL), jelikož se jeho bod tání pohybuje okolo 60°C. Na druhé straně, polyethylentereftalát (PET) s bodem tání kolem 175 °C nebo kyselina poly-L – mléčná (PLLA) s bodem tání nad 250 °C. Ovšem u PLLA nastává při zvýšené teplotě separace řetězců (REDIGUIERI, C. et al., 2016).

2.5.1.2 Sterilizace suchým teplem

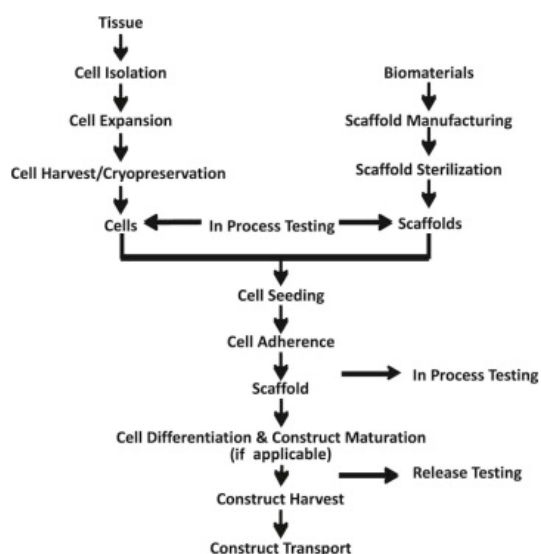
Sterilizace suchým teplem se aplikuje na kapaliny neobsahující vodu nebo suché práškové materiály. Standardní podmínky pro sterilizaci suchým teplem jsou 170°C po dobu 60 minut, 160°C po dobu 120 minut, nebo 150°C po dobu 150 minut. Při sterilizaci suchým teplem u PLLA se ukázala pomocí analýzy FTIR a DSC modifikace polymerního řetězce (HOFMANN, S. K. et al., 2014).

2.5.1.3 Plasma

Sterilizace plazmou patří mezi nové metody, které se používají ke sterilizaci biologicky rozložitelných scaffoldech. Tím, že se jedná o plyn, nabízí plasma mnoho výhod. Jako je např. nízká teplota aplikace a zlepšení buněčné interakce způsobené modifikací povrchu. Plasma má schopnost zničit spory, endospory a vegetativní bakterie. Úspěšné pokusy byly provedeny na scaffoldu z PLGA, kdy se použil výkonu 100 W inertního plazmatu argonu s vysokofrekvenčním výbojem po dobu 4 minut. Po překročení stanovené doby dochází k významnému porušení trojrozměrné struktury (DAI, Z. et al., 2016).

2.6 Kultivace buněk v bioreaktoru

Vzhledem ke složitosti tkáně, připravené pomocí metod tkáňového inženýrství, jsou právě bioreaktory klíčem k překlenutí hranice, mezi dvojrozměrnou buněčnou strukturou a trojrozměrnou strukturou. Napodobováním mikroprostředí *in vivo* se buňky mohou uspořádat do prostorově organizovaných funkčních celků, jako je tomu v živém organismu (EAKER, S. et al. 2017).



Obrázek 14 Nezbytné kroky pro implantaci požadované tkáně (EAKER, S. et al. 2017)

Bioreaktory hrají důležitou roli v TE, jelikož jsou schopné umožnit kultivaci savčích buněk i uvnitř struktury scaffoldu. (TAKEBE, T., S. KOBAYASHI a H. KAN, 2012). Podmínky, které můžeme modifikovat, jsou pH, teplota, tlak, koncentrace kyslíku, mechanické síly a podobně (YOON, H. H. et al., 2012). Také bioreaktory poskytují biochemické a fyzikální regulační signály, které jsou potřebné pro buněčnou proliferaci, diferenciaci a k sekreci ECM (WANG, Z. et al., 2014).

Existuje několik vhodných postupů pro výběr bioreaktoru. Za prvé, by měl být rychle a snadno sestavitelný. Další neméně důležitý bod je, aby byl dokonale sterilní. Materiály použité v bioreaktoru nesmí být toxické.

Podle uchycení buněk se bioreaktory dělí na submerzní a imobilizované. V submerzních bioreaktorech jsou buňky volně rozmístěny v kapalině, zatímco v imobilizovaném bioreaktoru jsou buňky ukotvené v pevné struktuře (EAKER, S. et al. 2017).

2.6.1 Bioreaktory pro výrobu chrupavčité tkáně

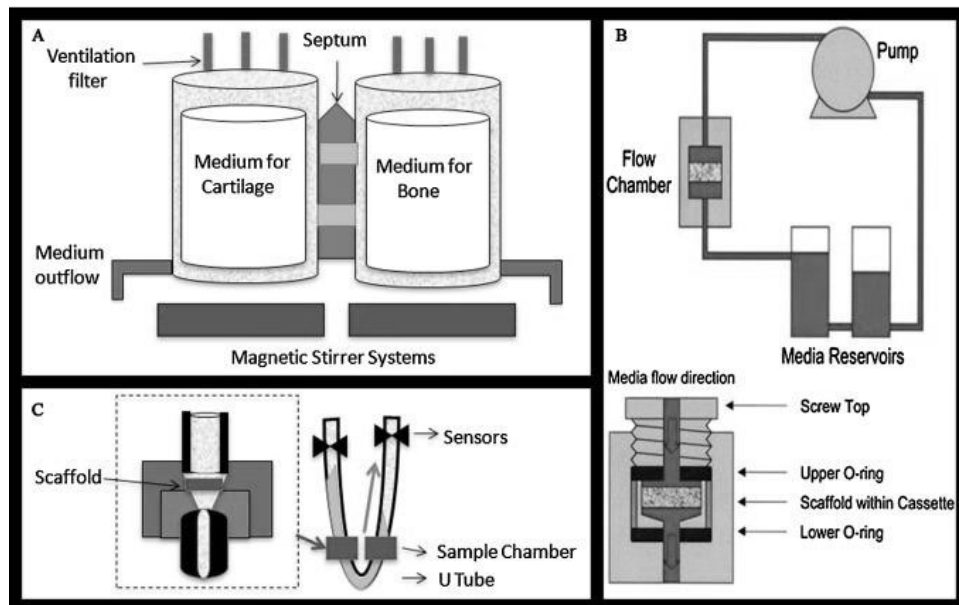
Pro přirozený vývoj lidské chrupavky je nutné na buňky neustále aplikovat mechanickou sílu, aby se podmínky *in vitro* přiblížily co nejvíce procesům *in vivo*. Mechanická síla podporuje proliferaci a diferenciaci chondrocytů (MARLOVITS, S et al., 2003).

2.6.1.1 Bioreaktory pro vyvolání smykové síly

Bioreaktory pro vyvolání smykové síly jsou široce používány pro tvorbu chrupavek. Jsou běžně tvořeny rotujícími nádobami a rotačními baňkami. Míchání je zajištěno v dvojité komoře. Buňky BMSCs diferencují do chondrocytů asi po 3 týdnech kultivace v rotačním bioreaktoru (STOFFEL, M. et al., 2012).

2.6.1.2 Bioreaktory indukující perfuzi

Bylo zjištěno, že perfuzní bioreaktory zlepšují retenci ECM. Např. při zvýšení průtoku vody z $0,075 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ na $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ se zvýšilo procento GAG zachovaných v ECM. Chondrocyty pěstované v perfuzním bioreaktoru podle Yoona et al. nejlépe připomínají nativní chrupavku (YOON, H. H. et al., 2012). Pro tvorbu chrupavčité tkáně se dají ještě použít bioreaktory indukující hydrostatický tlak a bioreaktory indukující kompresi (CANDIANI et al., 2008).



Obrázek 15 A) Dvojitá komora, každá komora obsahuje médium a kanál pro cyrkulaci O_2 . Bioreaktor je schopen tvořit dvoufázové osteochondrální štěpy. B) Bioreaktor s komorou utěsněnou O kroužky a šroubovacím uzávěrem. Médium se čerpá z první nádrže přes průtokové komory a poté zpět do zásobníku. C) Obousměrný bioreaktor – buněčná suspenze osciluje mezi dvěma skleněnými sloupy do komory ke vzorku (ZHAO, J. et al., 2016).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

V rámci praktické části byla provedena řada testů stanovujících biologické vlastnosti scaffoldů, konkrétně scaffoldů složených z PVA a kraft ligninu. Nejprve byly provedeny testy antibakteriálních vlastností připravených scaffoldů a to pomocí dvou kmenů bakterií *E. coli* a *S. aureus*. Následně byla testována cytotoxicita pomocí buněčné linie NIH/3T3 a to jednak přímým kontaktem, tak i pomocí testu cytotoxicity extraktů. Posledním testem pak byla kultivace buněk vně i na povrchu scaffoldů a to za využití bioreaktoru, konkrétně rotačního bioreaktoru. Kombinace výše uvedených testů umožňuje prvotní náhled na potencionální využití scaffoldů v oblasti regenerativní medicíny.

3 PŘÍPRAVA VZORKŮ:

Vzorky byly připraveny paní Ing. Adrianou Gregorovou, Ph.D. v rámci spolupráce s Johannes Kepler University Linz. Ve všech testech bylo použito 5 vzorků scaffoldů o různém složení, které je definováno v tabulce č. 3.

Tabulka 3 Složení vzorků

Označení vzorku	Složení
A2C	PVA + 1% kraft lignin
A3C	PVA + 5% kraft lignin
A4C	PVA + 10% kraft lignin
A5C	PVA + 15% kraft lignin
A6C	PVA + 20% kraft lignin

Informace o PVA jsou popsány v teoretické části v kapitole 2.2.2.1, proto níže uvádím popis kraft ligninu.

3.1 Kraft Lignin

Lignin je komplexní molekula složená z polyfenolů. Struktura a vlastnosti závisí na samotné rostlině, ze které se odebírá, v jakých podmínkách roste a na metodě zpracování. Hlavní prekurzory ligninu jsou tři monomery fenylypropanoidu. Lignin se používá jako stabilizátor pro plasty a také se dá použít jako kompatibilizátor mezi přírodními vlákny a polymerní matricí. Několik autorů zjistilo, že lignin má také velký potenciál k výrobě polyuretanů na bázi ligninu za použití ligninových hydroxylových skupin (DA SILVA, S. et al., 2017).

Kraft lignin je hned po celulóse nejrozšířenější přírodní polymer. Nachází se ve všech vyšších rostlinách v buněčné stěně. Tradičně se lignin získává ze dřeva řadou technických procesů jako je sulfátové a sulfitové rozvláknování (GELLERSTEDT, G., 2015). Zabraňuje kumulaci velkých aglomerátů, které mají za následek nestejnou strukturu scaffoldu (MILCZAREK, G., 2010).

4 METODIKA A MĚŘENÍ

Na vzorcích scaffoldu se testovala antibakteriální aktivita, stanovovala se cytotoxicita a kultivace buněk v bioreaktoru.

4.1 Testování antibakteriální aktivity scaffoldů

Antibakteriální vlastnosti jsou v současné době velmi studovanou problematikou u veškerých biomateriálů a to s ohledem na možnost eliminace rizika nosokomiálních infekcí.

4.1.1 Použité bakterie

Pro zjištění antibakteriální aktivity byly použity dva bakteriální kmeny a to bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 4516 (ATCC; American Type Culture Collection 6538) a *Escherichia coli* CCM 4517 (ATCC; American Type Culture Collection 8739).

4.1.2 Přístroje

Pro experiment byly použity následující pomůcky a zařízení: Biologický inkubátor INE 400 Memmert 531, laminární box s řízenou cirkulací vzduchu Thermo Electron LED GmbH (Germany), optický mikroskop (Olympus CKX 41), autokláv tuttner typ 3150 ELV, minitřepačka MS1 Laboratory Equipment (USA), stolní digitální váhy Denver Summit SI- 4002 (Germany), vodní lázeň Memmert a počítač kolonií Count Plus Schütt Labortechnik (Germany).

4.1.3 Chemikálie

Demineralizovaná voda, Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar) HiMedia Laboratories (India), lecitin 3 g/l, polysorbát 30 g/l, NaCl, 70% ethanol.

4.1.4 Design experimentu

Podstata zkoušky spočívá v nanesení definovaného počtu bakterií do agarové půdy spolu s testovaným vzorkem. Vzorek je upraven tak, aby jeho kontaktní plocha s bakteriemi / povrchem agaru byla co možná největší. Takto připravený vzorek je vložen na 24h do inkubátoru při 35°C. Po uplynulé době se stanoví velikost inhibiční zóny.

4.1.5 Postup zkoušky

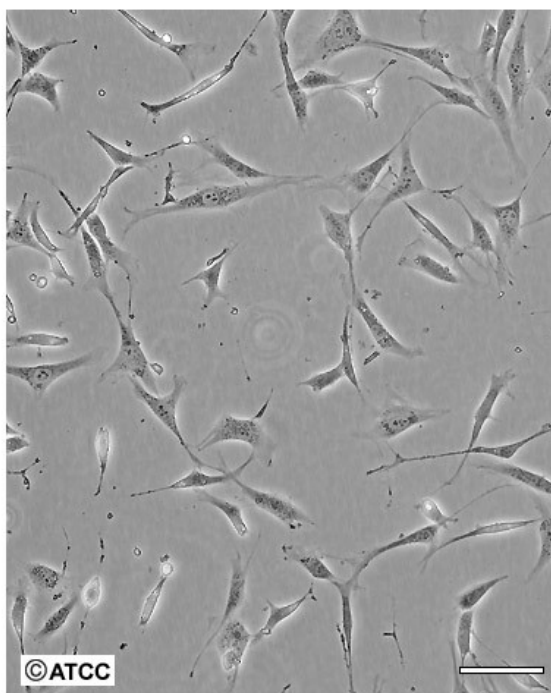
Prvním krokem bylo určit požadované množství bakterií tak, aby nebyla překročena koncentrace bakterií v intervalu $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ CFU/ml. Petriho misky, které byly použity, měly průměr 9 cm. Do každé misky se přidal 1 ml připravené bakteriální suspenze a 15 – 20 ml rozehřáté agarové půdy vhodné pro kultivaci bakterií. Agarová půda se při zalévání používá při teplotě 45 °C. Pro každou zkoušku se použijí 2 paralelní Petriho misky pro přesnější vyhodnocení. Do připravené agarové půdy se vložil vzorek scaffoldu, který byl upraven tak, aby zaujímal s naočkovanou půdou co největší plochu. Testované vzorky se nechaly v inkubátoru po dobu 24 h při 35°C. Poté se stanovil nárůst bakteriálních kolonií.

4.2 Stanovení cytotoxicity

Cytotoxicita je jeden ze základních parametrů definujících reakci eukaryotických buněk při kontaktu s materiálem. Dle mezinárodních standardů se dá testovat dvěma způsoby, cytotoxicita přímým kontaktem anebo cytotoxicita extraktů.

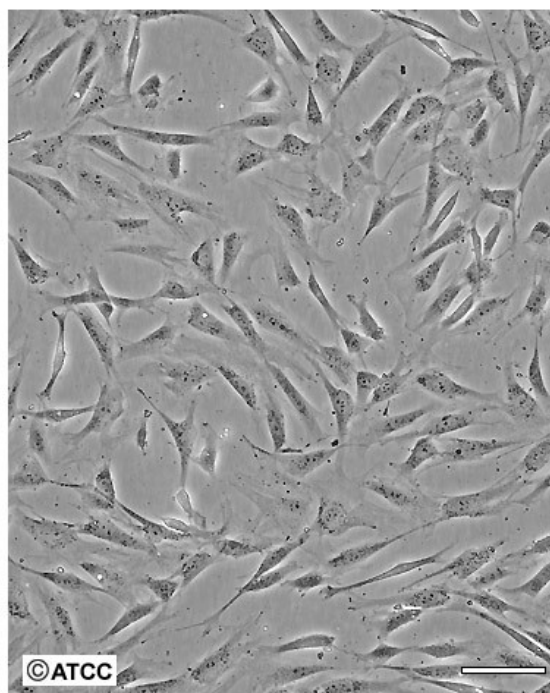
4.2.1 Použité buňky

K testování se používaly myší embryonální fibroblasty buněčné linie ATCC CRL – 1658 NIH/3T3. Jako kultivační médium bylo použito DMEM obsahující 10% bovinní sérum a 100 U ml^{-1} penicilinu se streptomycinem.

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

Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Obrázek 16 Oficiální fotka buněk od dodavatele

4.2.2 Přístroje

Mikroskop Olympus s fázovým kontrastem (Olympus IX81, Japonsko), průtokovým cytometrem BD FACSanto (BD Biosciences, Canada), laminární box s řízenou cirkulací vzduchu Thermo Electron LED GmbH (Germany), třepačka (PSU – 20i, USA).

4.2.3 Chemikálie

70% ethanol, ultračistá voda Milli Q, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), bovinní sérum (BioSera, Francie), penicilin a streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie), fluorescenční barvivo SYTO, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X (PBS).

4.2.4 Příprava vzorků

Podstata testu je stanovit možnou cytotoxicitu scaffoldu. Stanovuje se jak cytotoxicita v přímém kontaktu, tak i zkouška na cytotoxicitu extraktů. V případě testu cytotoxicity

extraktů je nezbytné připravit vhodný extrakt. V našem případě byl extrakční poměr (plocha povrchu nebo hmotnost/objemu) stanoven dle ISO 10 993-5 na 0,2 g/ml.

Scaffold pro testování cytotoxicity přímým kontaktem byl upraven tak, aby velikost každého vzorku byla kolem 0,5 cm.

Před zahájením experimentu se vzorky vydezinfikovaly 70% ethanolem. V ethanolu byly vzorky ponechány po dobu 12h. Po vyjmutí se nechaly promývat ultračistou vodou Milli Q po dobu 48 hodin, přičemž voda byla měněna každých 12 hodin.

4.2.5 Cytotoxicita přímým kontaktem

Postup testování na cytotoxicitu přímým kontaktem se provádí dle ISO 10 993-5. Buňky byly nasazeny v koncentraci 10^5 buněk na ml. Po uchycení buněk na povrch kultivační misky byl přidán připravený vzorek a probíhala kultivace v inkubátoru po dobu 3 dnů. Proliferace buněk se sledovala za použití inverzního mikroskopu s fázovým kontrastem. Dále byla stanovena reference pro porovnání výsledků.

4.2.6 Cytotoxicita extraktů

Test byl proveden podle ISO 10 993-5 a vzorky byly extrahovány podle ISO 10993-12. Což bylo 0,2 g vzorku na ml kultivačního média. Extrakce probíhala při 37 ± 1 ° C za nepřetržitého třepání po dobu 24 ± 1 h. Jednotlivé extrakty, byly následně filtrovány přes filtr o velikosti pórů 0,22 μ m. Extrakty byly použity během 24h. Výchozí extrakty (100%) byly zředěny v kultivačním médiu, díky čemuž se získala série ředění s koncentracemi 75%, 50%, 25%, 10% a 5%. Na referenci byly použité buňky kultivované v přítomnosti čistého média. Ke stanovení cytotoxicity po jednodenní kultivaci buněk v extraktu byly životaschopné buňky počítány průtokovým cytometrem BD FACSAnto (BD Biosciences, Canada) za použití fluorescenčního barviva SYTO. Nejdříve došlo k odsátí extraktů a k promytí buněk PBS. Adherované buňky byly uvolněny za použití trypsinu a následně barveny SYTO v konečné koncentraci 30 nM v PBS. Takto připravené buňky byly uchovány ve tmě po dobu 30 minut. Všechny testy byly vyhodnoceny čtyřikrát a k odstranění odlehlých hodnot byl použit Dixonův Q test. Také byla zkoumána morfologie buněk za použití fázového kontrastního mikroskopu Olympus (Olympus IX81, Japonsko).

4.3 Kultivace buněk v bioreaktoru

K testování proliferace buněk jsou použity vzorky pěti scaffoldů z PVA, lišících se v koncentraci kraft ligninu.

4.3.1 Použité buňky

Myší embryonální fibroblasty ATCC CRL - 1658 NIH/ 3T3

4.3.2 Přístroje

Bioreaktor (Synthecon Incorporated, Texas), mikroskop Olympus s fázovým kontrastem (Olympus IX81, Japonsko), průtokový cytometr BD FACSAnto (BD Biosciences, Canada), laminární box s řízenou cirkulací vzduchu Thermo Electron LED GmbH (Germany).

4.3.3 Chemikálie

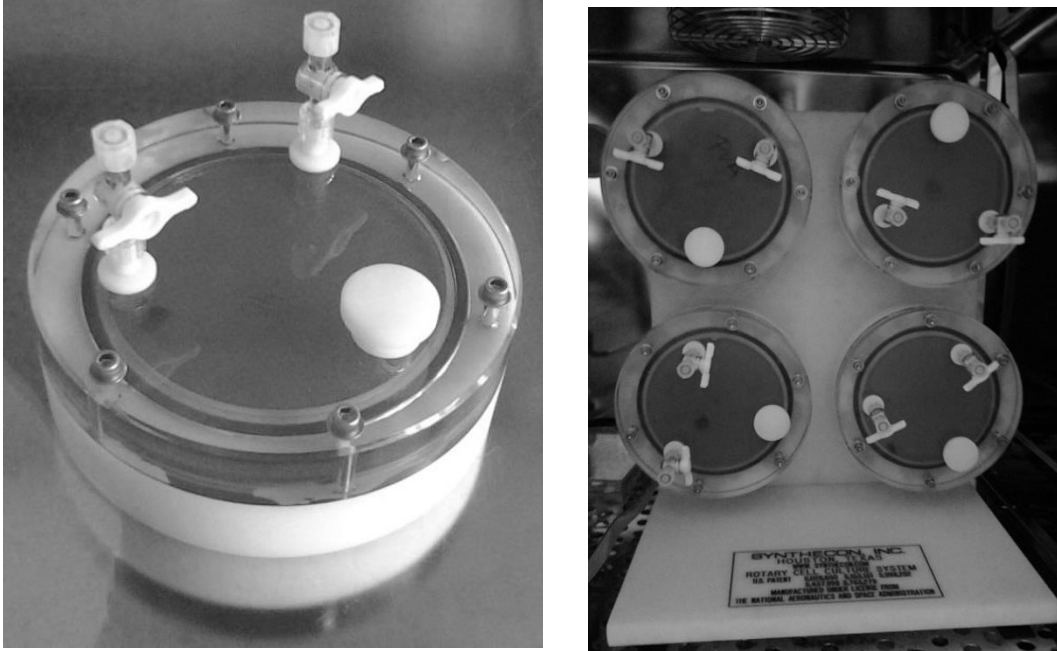
70% ethanol, ultračistá voda Milli Q, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), bovinní sérum (BioSera, Francie), penicilin a streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie), fluorescenční barvivo SYTO, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X (PBS), 4% paraformaldehyd, 0,5% triton X-100, Hoechst a ActinRed

4.3.4 Postup zkoušky

Buňky NIH 3T3 o koncentraci 10^6 se injekčně vpravily do struktury scaffoldu, tak aby byly rozmístěné ve vnitřní struktuře co možná nejvíce homogenně. Následně byly buňky rozmístěny po celém povrchu scaffoldu. Buňky se adherovaly po dobu 2h, poté bylo ke vzorku přidáno médium. Systém byl uchováván v inkubátoru při 30°C a 5% CO₂ po dobu 72h, přičemž se dle potřeby vyměňovalo médium.

Před vložením do bioreaktoru byla nutná jeho sterilizace. Jednotlivé díly byly sterilizovány samostatně v autoklávových sáčcích. Sterilizace probíhala v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut. Po proběhlé sterilizaci se bioreaktor zkompletuje a do přesného středu rotující komůrky se vloží vzorek spolu s médiem. Bioreaktor se uvedl do provozu při nastavení 15,6 RPM. V průběhu kultivace se každý týden měnilo médium. Vzorky jsou ponechány v bioreaktoru po dobu 14 dní. Po ukončení kultivace se vzorky vyjmuly a následně se fixovaly a permeabilizovaly. Postup byl následující. 4% paraformaldehyd se injekčně vpravil dovnitř vzorku a celý vzorek se do 4% paraformaldehydu ponořil na 30 minut. Po uplynulé době se vyjmuté vzorky opláchly PBS, jak injekčně, tak i celý povrch vzorku. Dále byl do vzorku injekčně vpraven 0,5% triton X-100 a celý vzorek byl v něm ponořen na 15 minut. Vzorky byly propláchnuty 3X PBS jak injekčně, tak i na povrchu. Samotné barvení buněk trvalo 30 minut, přičemž byl připraven roztok ze 7 ml PBS spolu se 2 kapkami ActinRed a 140 µl barvy Hoechst. Roztok byl vpraven do celého objemu vzorku, i na

povrch. Po 30 minutách se vzorky vyjmuly a propláchly PBS. V posledním kroku se buňky nafotily.



Obrázek 17 Vlevo: Rotující komůrka se vzorkem v prostředí média

Vpravo: Rotující systém umístěný v inkubátoru.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Test antibakteriální aktivity

Vyhodnocení výsledků antibakteriální aktivity proběhlo po 24h od zahájení pokusu. Pro názornou ukázkou byly experimentální výsledky fotodokumentovány.

Vzorek A2C



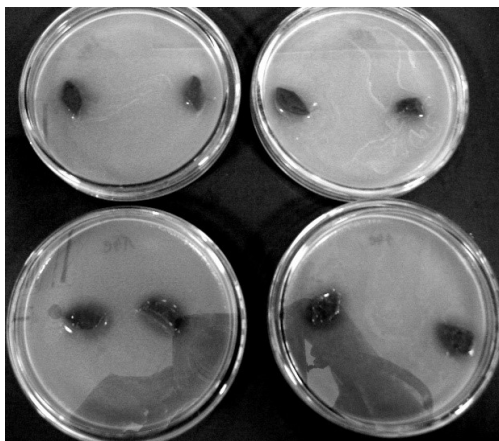
Nahoře: *S. aureus* Dole: *E. coli*

Vzorek A3C



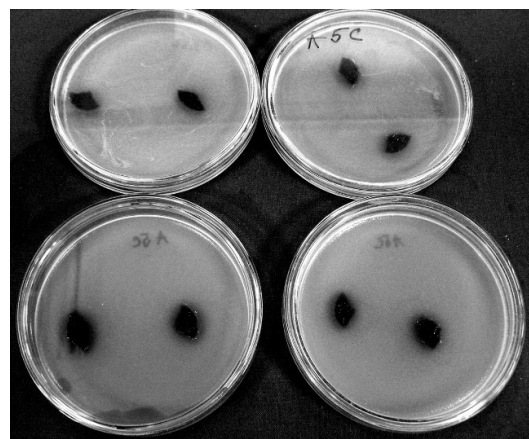
Nahoře: *S. aureus* Dole: *E. coli*

Vzorek A4C



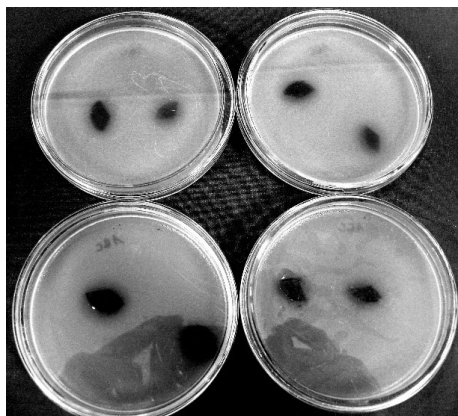
Nahoře: *S. aureus* Dole: *E. coli*

Vzorek A5C



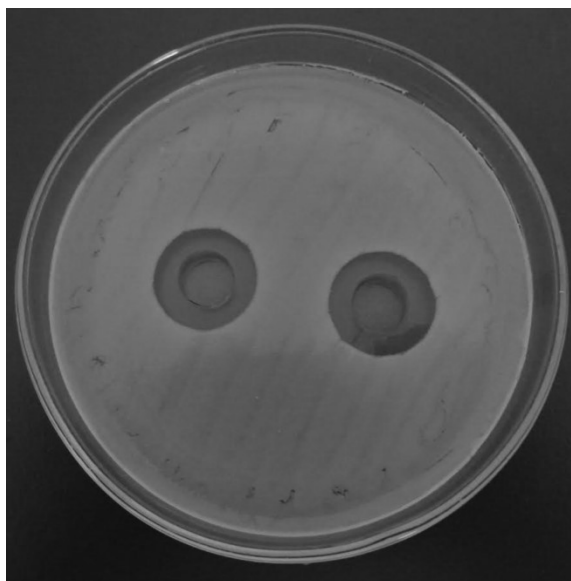
Nahoře: *S. aureus* Dole: *E. coli*

Vzorek A6C



Nahoře: *S. aureus* Dole: *E. coli*

Interpretace výsledků antibakteriální zkoušky se uvádí pomocí písmen A, B, C, které klasifikují změnu při průběhu testu. Písmeno A znamená, že velikost inhibiční zóny je větší nebo rovno 1 mm, což značí dobrý antibakteriální efekt. Písmeno B označuje interval velikosti inhibiční zóny od 0 mm do 1 mm a jedná se o tzv. limit antibakteriální účinnosti. Efekt se projevuje tak, že nemusí být inhibiční zóna viditelná, pouze dojde k poklesu počtu kolonií. Zatímco písmeno C vykazuje nedostatečný efekt. Nedochozí k žádné změně, naopak může počet bakteriálních kolonií ještě narůst.



Obrázek 18 Ukázka inhibičního pásma odpovídající písmenu A na kapalném vzorku (ilustrační obrázek)

Výsledky testů prováděné na vzorcích A2C, A3C, A4C, A5C a A6C lze ohodnotit písmenem C, což znamená, že se kolem vzorků nevytvořilo žádné inhibiční pásmo a ani nedošlo k poklesu počtu kolonií.

Jelikož byly vzorky PVA plněny různou koncentrací kraft ligninu vykazují odlišnou strukturu. Čím je koncentrace kraft ligninu větší, tím scaffold vykazuje lepší mechanické vlastnosti. To ve své práci potvrzuje i O. Gordobil, který se zabýval chováním kraft ligninu v PLA matrici.

X. Dong se zabývá antibakteriální a antioxidační aktivitou kraft ligninu, ve své studii dokládá výsledky o jeho dobré antibakteriální aktivitě. Proto jsme při testování předpokládaly, že scaffoldy s větší koncentrací kraft ligninu budou vykazovat také antibakteriální vlastnosti. To se bohužel nepotvrdilo. Thomas et al., 2013 uvádí, že antibakteriální aktivita závisí na struktuře kraft ligninu, na koncentraci a na původu vzorku. Při jeho experimen-

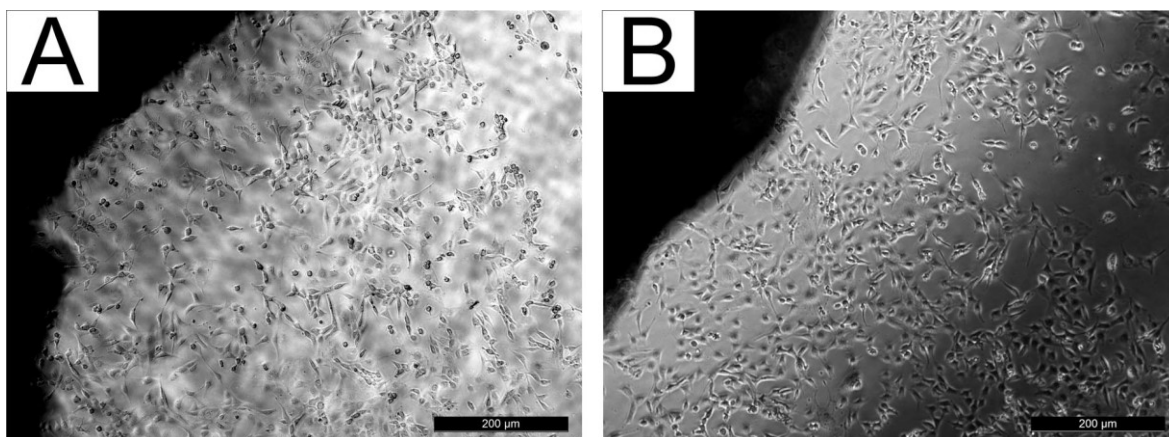
tech konstatoval úbytek kolonií bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichie coli* a *Pseudomonas aeruginosa* až při koncentraci 50% kraft ligninu. Jelikož naše testované vzorky obsahovaly maximální koncentraci kraft ligninu pouze 20% není antibakteriální aktivita zřejmá. Řešení lze najít u Klapiszewski et al., který zavádí do matrice PVA s kraft ligninem nanočástice stříbra o velikosti menší než 100 nm. S poklesem rozměru nanočástic stříbra vzrůstá jeho antibakteriální aktivita. Protože závisí i na tvaru nanočástic, na inhibici kmene *E. coli* se volí tvar deskový např. od tvaru tyčového.

5.2 Stanovení cytotoxicity

Předmětem testování bylo stanovení cytotoxicity přímým kontaktem tak také stanovení cytotoxicity různých koncentrací extraktů.

5.2.1 Stanovení cytotoxicity přímým kontaktem

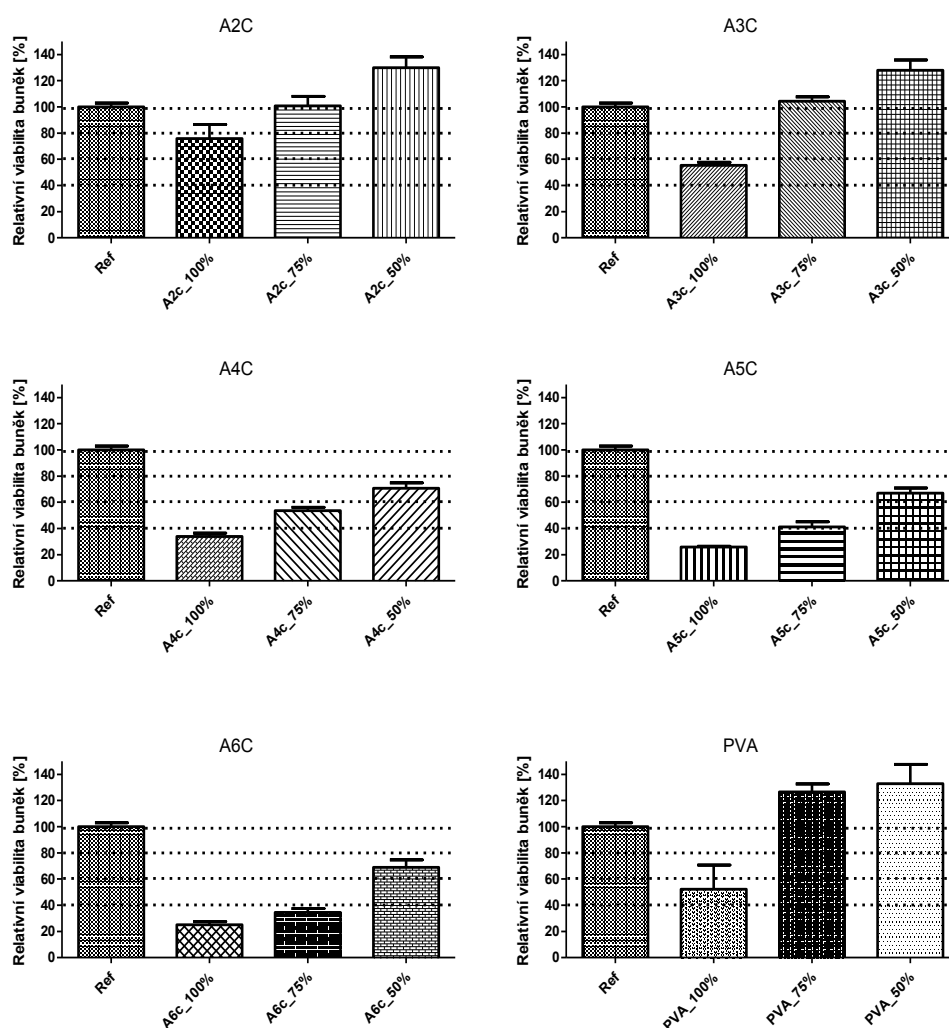
Testování cytotoxicity scaffoldů z PVA a kraft ligninu nebylo dosud studováno. Z tohoto důvodu byla nejdříve provedena běžná metoda pro stanovení cytotoxicity scaffoldů v přímém kontaktu. K tomuto účelu byla použita buněčná linie NIH 3T3, běžně používaná pro testování cytotoxicity *in vitro*. Na obrázku 19 jsou vyfocené vzorky A2C a A6C. Buňky byly schopné proliferovat za přítomnosti všech vzorků a nebyly zaznamenány žádné morfologické změny v porovnání s referencí. Ze získaných výsledků lze říci, že testované vzorky nevykazují toxicitu.



Obrázek 19 Buňky NIH/3T3 v prostředí vzorku A) A2C a B) A6C

5.2.2 Cytotoxicita extraktu

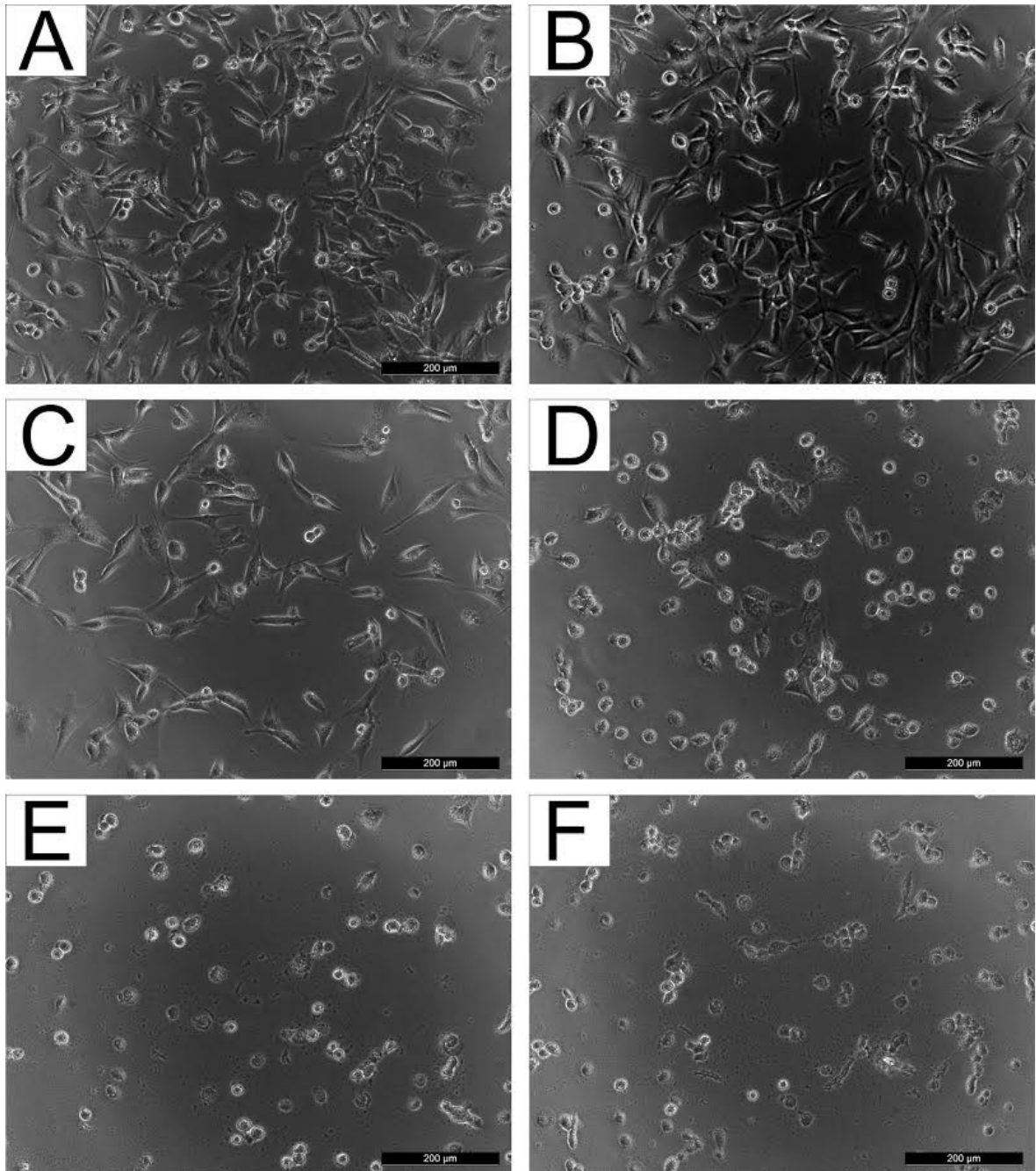
Pro kvantitativní vyhodnocení cytotoxicity byl použit test cytotoxicity extraktů vzorků scaffoldu pomocí průtokové cytometrie a barvením SYTO. Biokompatibilita samotného PVA byla již předmětem studie Kumara et al. 2017. Pokud jde o cytotoxicitu extraktů, byla pozorována závislost cytotoxicity na procentuálním zastoupení kraft ligninu v testovaných vzorcích. Z naměřených výsledků vyplývá, že čím nižší je procentuální zastoupení kraft ligninu, tím je cytotoxický účinek nižší. Vzhledem k tomu, že kraft lignin nebyl doposud dostatečně zkoumán, je nutné výsledky porovnat s výzkumem ligninu obecně. Také víme skutečnost, že kopolymery na bázi ligninu jsou vnímány jako toxické (Kai et al., 2016), je nutné uvést, že lignin může mít negativní vliv na životaschopnost buněk. Kai et al., ve své práci uvedl, že optimální koncentrace ligninu v nanovláčkách PLLA/PLA je 6 hmotnostních procent. To se také potvrdilo v našem experimentu. Scaffoldy A2C a A3C obsahující 1% kraft ligninu a 5% kraft ligninu vykazují očekávanou životaschopnost buněk, zatímco u scaffoldů obsahujících více než 5% kraft ligninu dochází k poklesu životaschopných buněk. Výsledky jsou zpracované v grafu níže. Přičemž, relativní viabilita buněk značí procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí.



Obrázek 20 Cytotoxicita extraktů vzorků scaffoldu o různé koncentraci, prezentována jako průměrný počet životaschopných buněk \pm standartní odchylka. Přerušované čáry zdůrazňují kritickou životaschopnost, která se hodnotí podle požadavků normy EN ISO 10993-5, kde životaschopnost $>80\%$ nepředstavuje toxicitu, $80\% - 60\%$ vykazuje mírnou cytotoxicitu, $60\% - 40\%$ vykazuje střední cytotoxicitu a pod 40% se jedná o silnou cytotoxicitu.

100% koncentrace extraktu se v závislosti na růstu koncentrace kraft ligninu ve vzorcích chová více cytotoxicky. U vzorků A2C a A3C se již 75% koncentrace extraktu blíží referenční hodnotě, zatímco u vzorků A4C, A5C a A6C vykazuje střední cytotoxicitu. 50% koncentrace extraktu u vzorků A2C a A3C podporuje proliferaci buněk, zatímco u vzorků s větším obsahem kraft ligninu představuje mírnou cytotoxicitu.

Při testování se ověřovaly všechny připravené koncentrace extraktů, tedy 100%, 75%, 50%, 25%, 10% a 5%. Výsledky se po koncentraci 50% nelišily, proto jsou v grafech zaznamenány hodnoty jen do 50%.

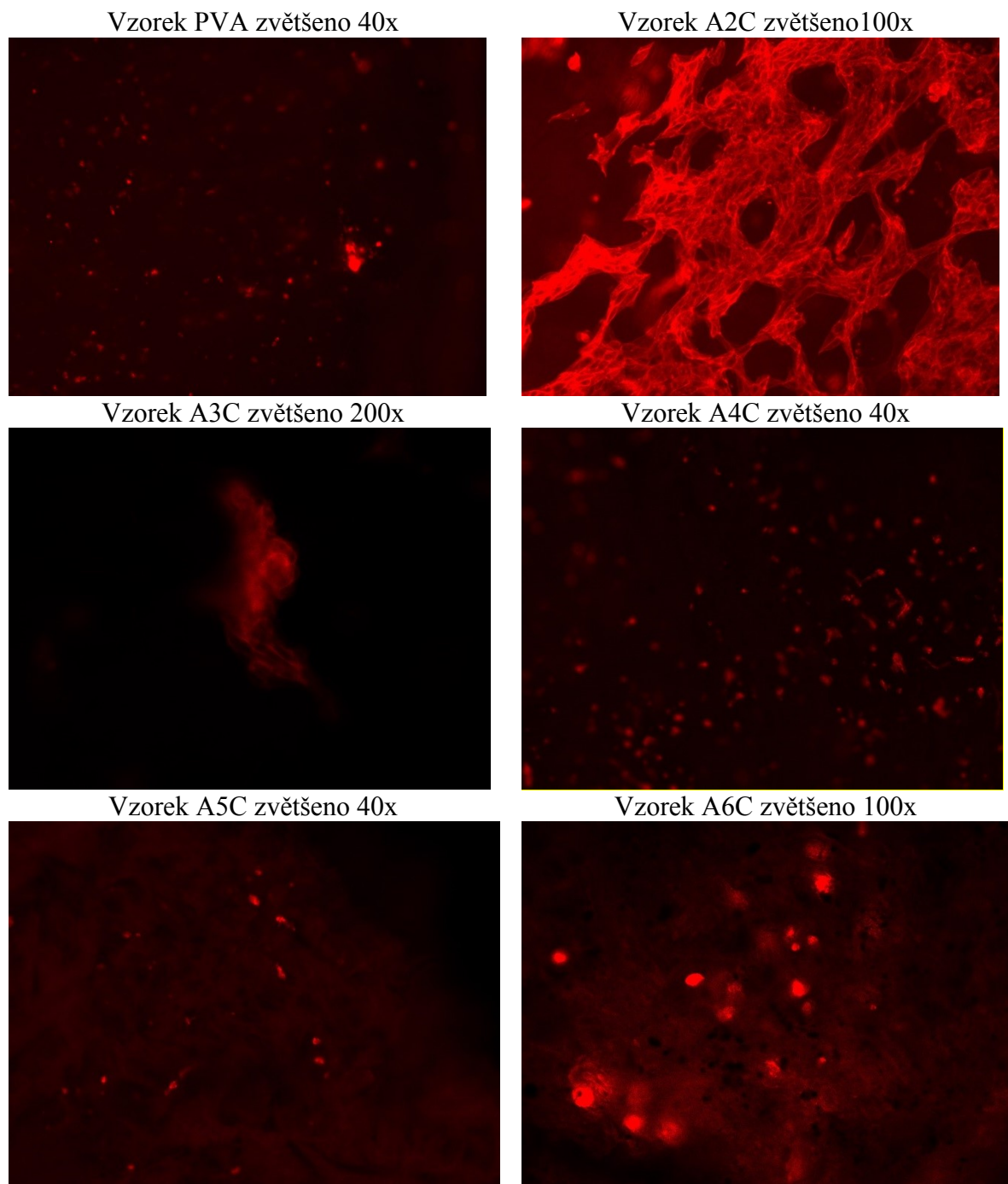


Obrázek 21 Buňky NIH/ 3T3 kultivované v přítomnosti 75% extraktu A) PVA, B) A2C, C) A3C, D) A4C, E) A5C, F) A6C

Z fotodokumentace je vidět, že při větší koncentraci kraft ligninu buňky podléhají cytotoxicitě. Nejlépe proliferují buňky v přítomnosti vzorku A2C a A3C. Nejhuře pak vzorky A5C a A6C.

5.3 Kultivace buněk v bioreaktoru

Buňky NIH 3T3 byly homogenně vpraveny do celého objemu vzorku i na povrch. Po 14 dnech v bioreaktoru se jednotlivé vzorky scaffoldů nakrájeli pomocí mikrotomu a nafotily.



Obrázek 22 Buňky NIH 3T3 nabarvené actinem

Z experimentálních dat vyplývá, že scaffold čistě z PVA je biokompatibilní. Buňky rostou homogenně v celém objemu vzorku. Při větším zvětšení lze u scaffoldu A2C také pozorovat homogenní strukturu. Buňky proliferují a také lze tvrdit, že je scaffold biokompatibilní. Vzorek A3C tvoří spíše klastry než homogenní rozmístění buněk. Jeho použitelnost už je sporná. Vzorky A4C, A5C a A6C nejsou vhodné pro použití, neboť dochází k nehomogenní struktuře a celkový počet buněk se s rostoucí koncentrací kraft ligninu snižuje. Jelikož nebyl kraft lignin spolu s matricí PVA blíže popsán vycházíme v hodnocení již ze zmíněných faktů a to těch, že s rostoucí koncentrací kraft ligninu ve vzorku sice rostou mechanické vlastnosti scaffoldu, ale zároveň dochází k nehomogenní struktuře, což není žádaná vlastnost.

6 ZÁVĚR

V teoretické části jsem se zaměřila na dvě velké kapitoly a to na regenerativní medicínu, která spojuje znalosti jak tkáňového inženýrství, tak poznatky biomechaniky, buněčné transplantace, protetiky, nanotechnologie a biochemie a na scaffold, neboli tkáňové lešení. V úvodu teoretické části je popsán historický vývoj regenerativní medicíny začínající Aristotelem, který se zabýval regenerací ocásků u ještěrek a hadů a pokračující k Haraldu Ottovi, který jako první zkonstruoval tkáňové lešení prostřednictvím decelularizace orgánu. Aby byla daná struktura scaffoldu funkční je nutno ji osadit buňkami. Existuje několik typů kmenových buněk. Podle schopnosti diferenciacce se dělí na totipotentní, pluripotentní multipotentní a unipotentní. Jelikož hraje v regenerativní medicíně klíčovou roli prostředí, je extracelulární matrix (ECM) věnována celá kapitola. Abychom mohli vyrobit funkční scaffold je nutné znát fungování ECM v živém organismu. Proto je v mé práci zařazena kapitola týkající se složení ECM. Jako hlavní složka je kolagen, dále pak obsahuje glykoproteiny, fibronectin, laminin glykosaminoglykany a růstové faktory. V druhé kapitole jsem se zaměřila na scaffold jakožto tkáňové lešení. Popsala jsem určitá kritéria, která musí splňovat a vhodné materiály na výrobu. Materiály na výstavbu scaffoldu se dělí na přírodní a na syntetické. Do syntetických materiálů řadíme také polyvinyl alkohol, který byl předmětem praktické části. Materiály se do jisté míry dají modifikovat, tak aby byly zajištěny potřebné modifikace. Metody pro modifikaci se týkají povrchu materiálu, výrobou hybridních materiálů a dopování materiálů bioaktivními molekulami. V následující kapitole jsem se zaměřila na výrobu scaffoldu. Podle typu výroby se scaffoldy dělí na předem vyrobené, decelularizované, scaffoldy připravené buněčnou sekrecí ECM, na scaffoldy z hydrogelové matrice. A na scaffoldy z vláken. Aby byl vyrobený scaffold funkční je nutná jeho sterilizace. Použité metody mohou být fyzikální anebo chemické. Poslední fází je kultivace buněk na vyrobený a sterilizovaný scaffold. Kultivace probíhá v bioreaktorech, které se také dále dělí podle typu požadované tkáně.

V praktické části jsem od paní Ing. Gregorové, Ph.D. v rámci spolupráce měla k testování pět scaffoldů. Jednotlivé scaffoldy se od sebe lišily složením. Vzorek A2C obsahoval matici PVA a 1% kraft ligninu, vzorek A3C obsahoval matici PVA a 5% kraft ligninu. Třetím vzorkem byl A4C s obsahem 10% kraft ligninu. Vzorek A5C obsahoval 15% kraft ligninu a A6C 20% kraft ligninu. Prvním testem byla zkouška antibakteriální aktivity, jelikož se předpokládalo, že kraft lignin vykazuje antibakteriální aktivitu. Při testu se používaly bakteriální kmeny *E. coli* a *S. aureus*. Antibakteriální aktivita se neprokázala

díky malému množství kraft ligninu ve vzorcích. Jako druhý pokus se zvolila zkouška cytotoxicity přímým kontaktem a cytotoxicita extraktů. Cytotoxicita metodou přímého kontaktu se nepotvrdila a edy buňky byly schopné proliferace za přítomnosti všech vzorků i bez změny v morfologii. U cytotoxicity extraktů se ukázalo, že vzorek s nejmenším procentem kraft ligninu vyhovuje nejlépe a nevykazuje žádnou cytotoxicitu. S rostoucí koncentrací kraft ligninu ve vzorku cytotoxicita roste. Poslední zkouška je kultivace buněk v bioreaktoru. Ve výsledku se jako nejvíce kompatibilní vzorek jeví A2C, který obsahuje jen 1% kraft ligninu. Experimentální data jsou zaznamenány v přehledných grafech a každý experiment je také fotodokumentován pro lepší interpretaci výsledků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AMODT, J. M. a D. W. GRAINGER, 2016. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* [online]. Vol. **86**, pp. 68-82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.003. ISSN 01429612.
2. ARISTOTLE. a A. PLATT, 2001. *On the generation of animals: 305 BC*. Blacksburg, VA: Virginia Tech.
3. ASADI-EYDIVAND, M. et al., 2016. Optimal design of a 3D-printed scaffold using intelligent evolutionary algorithms. *Applied Soft Computing* [online]. Vol. **39**, pp. 36-47. DOI: 10.1016/j.asoc.2015.11.011. ISSN 15684946.
4. ATALA, A. a R. P. LANZA, 2001. *Methods of tissue engineering*. San Diego, CA: Academic Press. ISBN 01-243-6636-8.
5. AUMAILLEY, M. et al., 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology* [online]. Vol. **24**, issue 5, pp. 326-332. DOI: 10.1016/j.matbio.2005.05.006. ISSN 0945053x.
6. AVRIL, P., et al, 2016. Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. *Journal of Bone Oncology* [online]. Vol. **5**, issue 1, pp. 5-14. DOI: 10.1016/j.jbo.2015.11.002. ISSN 22121374.
7. BADYLAK, S. F, 2004. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* [online]. Vol **12**, issue 3-4, pp. 367-377. DOI: 10.1016/j.trim.2003.12.016. ISSN 09663274.
8. BADYLAK, S., D. FREYTES a T. GILBERT, 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. Vol. 5, issue1, pp. 1-13. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.09.013. ISSN 17427061.
9. BALINT, R. et al., 2014. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. Vol. 10, issue 6, pp. 2341-2353. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015. ISSN 17427061.
10. BARBETTA, A. et al., 2010. Porous gelatin hydrogels by gas-in-liquid foam templating. *Soft Matter* [online]. Vol. 6, issue 8, p. 1785. DOI: 10.1039/b920049e. ISSN 1744-683x.
11. BERENDIEN J. P., 2009. *Design strategies for tissue engineering scaffolds*. Enschede: University of Twente, ISBN 9789490122393.

12. BERGMANN, C. P. a STUMPF, 2013. *Dental ceramics*. New York: Springer. ISBN 9783642382239.
13. BHOWMICK, S. et al., 2017. Biomimetic electrospun scaffolds from main extracellular matrix components for skin tissue engineering application – The role of chondroitin sulfate and sulfated hyaluronan. *Materials Science and Engineering: C* [online]. Vol. **79**, pp. 15-22. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.005. ISSN 09284931.
14. BOOTHROYD, P. a X. N. PHAM, 2000. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies. ISBN 0-88936-904-6
15. BURKE, J. F et al., 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of Surgery*. Vol. 4, pp. 413- 428. PMCID: PMC1345315
16. CANDIANI et al., 2008. Chondrocyte response to high regimens of cyclic hydrostatic pressure in 3-dimensional engineered constructs. Vol. 31, issue 6, pp. 490-500. PMID: 18609501
17. COLOMBO, F. et al., 2016. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* [online]. DOI: 10.1016/j.jmau.2016.05.002. ISSN 2213879x.
18. DAI, L., 2004. *Intelligent macromolecules for smart devices*. London: Springer. ISBN 9781852338497.
19. DAI, Z. et al., 2016. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. Vol. 7. DOI: 10.1177/2041731416648810. ISSN 2041-7314.
20. DAMDIMOPOULOU, P. et al., 2016. Human embryonic stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. Vol. **31**, pp. 2-12. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2015.08.010. ISSN 15216934.
21. DAMIEN, P. a D. S. ALLAN, 2015. Regenerative Therapy and Immune Modulation Using Umbilical Cord Blood–Derived Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. Vol. 21, issue 9, pp. 1545-1554. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.05.022. ISSN 10838791.
22. DANIE KINGSLEY, J. et al., 2013. Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *Journal of Pharmacy Research* [online]. Vol. 7, issue 2, pp. 200-204. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.02.021. ISSN 09746943.

23. DA SILVA, S. et al., 2017. Kraft lignin-based polyols by microwave: Optimizing reaction conditions. *Journal of Wood Chemistry and Technology* [online]. DOI: 10.1080/02773813.2017.1303513. ISSN 0277-3813.
24. DEL MERCATO, L. et al., 2016. Design and characterization of microcapsules-integrated collagen matrixes as multifunctional three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. Vol. 62, pp. 209-221. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.05.009. ISSN 17516161.
25. DEMERLIS, C. C a D. R SCHONEKER, 2003. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* [online]. Vol. 41, issue 3, pp. 319-326. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00258-2. ISSN 02786915.
26. DHANDAYUTHAPANI, B. et al., 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online]. pp. 1-19. DOI: 10.1155/2011/290602. ISSN 1687-9422.
27. DUAN, L. et al., 2016. Interaction study of collagen and sericin in blending solution. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Vol. 93, pp. 468-475. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.003. ISSN 01418130.
28. DUCHÁČEK, V., 2006. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-7080-617-6.
29. DUTTA, R. C. et al., 2017. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnology Advances* [online]. Vol. 35, issue 2, pp. 240-250. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.01.001. ISSN 07349750.
30. DYLEVSKÝ, I., 2007. *Obecná kineziologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1649-7.
31. DYLEVSKÝ, I., 2009. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, pp. 47-48. ISBN 978-80-247-3240-4.
32. ENGLER, A. J., 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* [online]. Vol. 126, issue 4, pp. 677-689. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044. ISSN 00928674.
33. EAKER, S. et al., 2017. Bioreactors for cell therapies: Current status and future advances. *Cytotherapy* [online]. Vol. 19, issue 1, pp. 9-18. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.09.011. ISSN 14653249.
34. FAULK, D. M., J. D. WILDEMANN a S. F. BADYLAK, 2015. Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* [online]. Vol. 5, issue 1, pp. 69-80. DOI: 10.1016/j.jceh.2014.03.043. ISSN 09736883.

35. FLOREA, F. et al., 2016. Autoimmunity against laminins. *Clinical Immunology* [online]. Vol. 170, pp. 39-52. DOI: 10.1016/j.clim.2016.07.021. ISSN 15216616.
36. FÖLDI, M. a E. FÖLDI, 2014. *Lymfologie*. Přeložil Jan SARLON. Praha: Grada, pp. 282-283 ISBN 978-80-247-4300-4.
37. GAO, L. et al., 2016. Coherence loss of partially mode-locked fibre laser. *Scientific Reports* [online]. Vol. 6, issue 1. DOI: 10.1038/srep24995. ISSN 2045-2322.
38. GAJENDIRAN, M., 2017. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. Vol. 51, pp. 12-26. DOI: 10.1016/j.jiec.2017.02.031. ISSN 1226086x.
39. GELLERSTEDT, G., 2015. Softwood kraft lignin: Raw material for the future. *Industrial Crops and Products* [online]. Vol. 77, pp. 845-854. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.09.040. ISSN 09266690.
40. GELMI, A., M. J. HIGGINS a G. G. WALLACE, 2010; Physical surface and electromechanical properties of doped polypyrrole biomaterials. *Biomaterials* Vol. 31, pp. 1974 – 1983. DOI: org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.040
41. GHASEMI-MOBARAKEH, L. et al., 2011. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. Vol. 5, issue 4, pp.17-35. DOI: 10.1002/term.383. ISSN 19326254.
42. GHATAK, S. et al., 2015. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2015, 2015, 1-20. DOI: 10.1155/2015/834893. ISSN 1687-8876.
43. GILBERT, T., T. SELLARO a S. BADYLAK, 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* [online]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014. ISSN 01429612.
44. GORDOBIL, O. et al., 2015. Kraft lignin as filler in PLA to improve ductility and thermal properties. *Industrial Crops and Products* [online]. Vol. 72, pp. 46-53. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.01.055. ISSN 09266690.
45. GUIMARD, N. K. et al., 2007. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*. Vol. 32 Issue 8-9, pp.876-921. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012. ISSN 00796700.
46. HASSAN, CH. M. a N. A. PEPPAS, 2000. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites* [online].

- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 37. DOI: 10.1007/3-540-46414-X_2. ISBN 978-3-540-67313-2.
47. HASELTINE W. A., 2001. The emergence of regenerative medicine: a new field and a new society. *J. Regen. Med.* Vol .2, issue 4, p.17. doi:10.1089/152489001753309652.
48. HE, Y. a F. LU, 2016. Development of Synthetic and Natural Materials for Tissue Engineering Applications Using Adipose Stem Cells. *Stem Cells International* [online]. Pp.1-12. DOI: 10.1155/2016/5786257. ISSN 1687-966x.
49. HINDERER, S., S. L. LAYLAND a K. SCHENKE-LAYLAND, 2016. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. Vol. 97, pp. 260-269. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.019
50. HODDE, J. a R. RECORD, 2002. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix. *Biomaterials*. USA, Vol. 3, pp. 1841-1848. PMID: 11950054.
51. HOLLINGER, J. O. et al., 2017. Bone Tissue Engineering: Growth Factors and Cytokines. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* [online]. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10205-X. ISBN 9780128035818
52. HOFMANN, S. K. et al., 2014. Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. *Acta Biomaterialia* [online]. Vol. 10, issue 1, pp. 308-317. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.035. ISSN 17427061
53. HUANG J. a S. BEST, 2014. Ceramic biomaterials for tissue engineering DOI: 10.1533/9780857097163.1.3
54. HUSSEIN, K. H. et al., 2016. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering*. Vol. 67, pp. 766-778 [cit. 2016-08-24]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.068. ISSN 09284931.
55. HYON, S. H., 1994. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. Vol. 5, issue 5, pp. 397-406. DOI: 10.1163/156856294X00103. ISSN 0920-5063.
56. CHANG, S. W. a M. J. BUEHLER, 2014. Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today* [online]. Vol. 17, issue 2, pp. 70-76. DOI: 10.1016/j.mattod.2014.01.019. ISSN 13697021.

57. CHEN, F. M. a X. LIU, 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. Vol. 53, pp, 86-168. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004. ISSN 00796700.
58. CHEN, H., R. et al., 2013. Fabrication of nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomaterials in Tissue Engineering* [online]. Elsevier, p. 158. DOI: 10.1533/9780857097231.1.158. ISBN 9780857095961.
59. CHEN, K., X. LIN a Q. ZHANG, 2015. Decellularized periosteum as a potential biologic scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. Vol. 19, pp. 46-55. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.02.020. ISSN 17427061.
60. IDASZEK, J. et al., 2016. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. *Applied Surface Science* [online]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.03.038. ISSN 01694332.
61. *International society for stem cell research* [online]. USA: Old Orchard Road [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/stem-cell-facts.pdf?sfvrsn=4>
62. ITO, Y., 1999. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials* [online]. Vol. 20, issue 23-24, pp. 2333-2342. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00162-3. ISSN 01429612.
63. IVIGLIA, G. Et al., 2016. Engineered porous scaffolds for periprosthetic infection prevention. *Materials Science and Engineering: C* [online]. Vol. 68, pp. 701-715. DOI: 10.1016/j.msec.2016.06.050. ISSN 09284931.
64. JASSO-GASTINEL, C. F., 2017. *Modification of polymer properties*. ISBN 978-0-323-44353-1.
65. KAI, D. et al., 2016. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chem* [online]. Vol. 18, issue 5, pp. 1175-1200. DOI: 10.1039/C5GC02616D. ISSN 1463-9262.
66. KARAMANOS, N. K., 2012. *Extracellular matrix: pathobiology and signaling*. Berlin: Walter de Gruyter. ISBN 9783110258769.
67. KINGSLEY, P. D., et al., 2013. Ontogeny of erythroid gene expression. *Blood* [online]. Vol. 121, issue 6, pp. 5-13. DOI: 10.1182/blood-2012-04-422394. ISSN 0006-4971.
68. KLAPISZEWSKI, Ł., T. RZEMIENIECKI a M. KRAWCZYK, 2015. Kraft lignin/silica-AgNPs as a functional material with antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Vol. 130, pp. 1-10. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.012. ISSN 0927-7765.

- terfaces* [online]. Vol. 134, pp. 220-228. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.056. ISSN 09277765.
69. KUNZLER, T. P., 2007. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* [online]. Vol. 28, issue 13, pp. 2175-2182. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.019. ISSN 01429612.
70. LABAT-ROBERT, J., 2012. Cell–Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. *Pathologie Biologie* [online]. Vol. 60, issue 1., pp. 15-19. DOI: 10.1016/j.patbio.2011.10.003. ISSN 03698114.
71. LANGER, R. a J. VACANTI, 2016. Advances in tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. Vol. 51, issue 1, pp. 8-12. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022. ISSN 00223468.
72. LEE, K. Y. et al., 2009. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. Vol. 61, Issue 12, pp. 1020-1032. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.006. ISSN 0169409x.
73. LIU, C., Z. XIA a J.T. CZERNUSZKA, 2007. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. Vol. 85, issue 7, pp. 1051-1064. DOI: 10.1205/cherd06196. ISSN 02638762.
74. LOUKOGEORGAKIS, S. P. a P. DE COPPI, 2016. Stem cells from amniotic fluid – Potential for regenerative medicine. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. Vol. 31, pp. 45-57. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2015.08.009. ISSN 15216934.
75. LÓPEZ-ÁLVAREZ, M., 2013. Bio-inspired Ceramics: Promising Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Procedia Engineering* [online]. Vol. 59, pp. 51-58. DOI: 10.1016/j.proeng.2013.05.093. ISSN 18777058.
76. MAIENSCHN, J., 2011. Regenerative medicine's historical roots in regeneration, transplantation, and translation. *Developmental Biology* [online]. Vol. 358, issue 2, pp. 278-284. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.06.014. ISSN 00121606.
77. MAITZ, M. F., 2015. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* [online]. Vol. 1, issue 3, pp.161-176. DOI: 10.1016/j.bsbt.2015.08.002. ISSN 24054518.
78. MARLOVITS, S. et al., 2003. Chondrogenesis of Aged Human Articular Cartilage in a Scaffold-Free Bioreactor. *Tissue Engineering* [online]. Vol. 9, issue 6, pp. 1215-1226. DOI: 10.1089/10763270360728125. ISSN 1076-3279.

79. MARTINS-GREEN, M. a M. J. BISSELL, 1995. Cell-ECM interactions in development. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*. Vol. 6, pp. 149-159.
80. MECHAM, R. P., 2011. *The extracellular matrix: an overview*. New York: Springer Verlag. Biology of extracellular matrix. ISBN 9783642165559.
81. MIHOV, D. a M. SPIESS, 2015. Glycosaminoglycans: Sorting determinants in intracellular protein traffic. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. Vol. 68, pp. 87-91. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.08.019. ISSN 13572725.
82. MILCZAREK, G., 2010. Kraft lignin as dispersing agent for carbon nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol 638, issue 1, pp. 178-181. DOI: 10.1016/j.jelechem.2009.10.002. ISSN 15726657.
83. MITCHELL, A. C. et al., 2016. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia* [online]. Vol. 30, pp. 1-12. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.11.007. ISSN 17427061.
84. NASROLLAHZADEH, N. a D. P. PIOLETTI, 2016. Experimental method to characterize the strain dependent permeability of tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomechanics* [online]. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.09.021. ISSN 00219290.
85. *Nature Biotechnology* [online]. Vol. 18, Issue IT56-IT58. DOI: 10.1038/80103. ISSN 10870156.
86. NICKELS, J. D. a CH. E. SCHMIDT, 2013. Surface modification of the conducting polymer, polypyrrole, via affinity peptide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. Vol. 101, issue 5, pp. 1464-1471. DOI: 10.1002/jbm.a.34435. ISSN 15493296.
87. O'BRIEN, F. J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. Vol. 14, issue 3, pp. 88-95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X. ISSN 13697021.
88. PARK, H. J., S. J. YU a K YANG, 2014. Paper-based bioactive scaffolds for stem cell-mediated bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. Vol. 35, issue 37, pp. 9811-9823. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.09.002. ISSN 01429612.
89. PEREIRA, M. M., J. R. JONES a L. L. HENCH, 2013. Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol-gel method for bone tissue engineering. *Advances in Applied Ceramics* [online]. Vol. 104, issue1, pp. 35-42. DOI: 10.1179/174367605225011034. ISSN 1743-6753.

90. PERRIN, A., J. ROUSSEAU a J. P. TREMBLAY, 2017. Increased Expression of Laminin Subunit Alpha 1 Chain by dCas9-VP160. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* [online]. Vol. 6, pp. 68-79. DOI: 10.1016/j.omtn.2016.11.004. ISSN 21622531.
91. PORZIONATO, A. et al., 2015. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. Vol. 16, issue 7, pp.14808-1483. DOI: 10.3390/ijms160714808. ISSN 1422-0067.
92. RANA, D. et al., 2015. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. DOI: 10.1002/term.2061
93. RATNER, B. D., 1996. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press. ISBN 0125824602.
94. RODRIGUES, C. A. V. et al., 2011. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology Advances* [online]. Vol. 29, issue 6, pp. 815-829. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.009. ISSN 07349750.
95. RAVICHANDRAN, R. et al., 2010. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. Vol.7, issue 5, pp. S559-S579. DOI: 10.1098/rsif.2010.0120.focus. ISSN 1742-5689.
96. RAVINDRA, K., 2015. Satyendra Singh, B. C. Yadav. Vol. 2, Issue 11. DOI: 10.17148/IARJSET.2015.21123
97. REDIGUIERI, C. et al., 2016. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. Vol. 82, pp. 181-195 [cit. 2016-08-12]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016. ISSN 00143057.
98. RIEDER, E., A. STEINACHER-NIGISCH a G. WEIGEL, 2016. Human immune-cell response towards diverse xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. *International Journal of Surgery* [online].DOI: 10.1016/j.ijso.2016.06.042. ISSN 17439191.
99. SAMPOGNA, G., S. Y. GURAYA a A. FORGIONE, 2015. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* [online]. Vol. 3, issue 3, pp. 101-107. DOI: 10.1016/j.jmau.2015.05.002. ISSN 2213879x.
100. SÁNCHEZ, P., J. L. PEDRAZ a G. ORIVE, 2017. Biologically active and biomimetic dual gelatin scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Vol. 98, pp. 486-494. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.092. ISSN 01418130.

101. SHARMA et al., 2002. Modification of Surface Properties of Polymeric Materials, Journal of the Arkansas Academy of Science, Vol. 56. Dostupné z: <http://scholarworks.uark.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1650&context=jaas>
102. SHOKEIR, A. A. et al., 2010. Tissue engineering and stem cells: Basic principles and applications in urology. *International Journal of Urology* [online]. Vol. 17, issue 12, pp. 964-973. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2010.02643.x. ISSN 09198172.
103. SCHWARZ, R. I., 2015. Collagen I and the fibroblast: High protein expression requires a new paradigm of post-transcriptional, feedback regulation. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. Vol. 3, pp. 38-44. DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.07.007. ISSN 24055808.
104. SINGH, R. et al., 2016. Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* [online]. Vol. 153, pp. 455-462 [cit. 2016-08-10]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.118. ISSN 01448617.
105. SIRITIENTONG, T., T. SRICHANA a P. ARAMWIT, 2011. The Effect of Sterilization Methods on the Physical Properties of Silk Sericin Scaffolds. *AAPS PharmSciTech* [online]. Vol. 12, issue 2, pp. 771-781. DOI: 10.1208/s12249-011-9641-y. ISSN 1530-9932.
106. STRATTON, S. et al., 2016. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials* [online]. Vol. 1, issue 2, pp. 93-108. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001. ISSN 2452199x.
107. STRONG, A. L., M.W. NEUMEISTER a B. LEVI, 2017. Stem Cells and Tissue Engineering. *Clinics in Plastic Surgery* [online]. DOI: 10.1016/j.cps.2017.02.020. ISSN 00941298.
108. STOFFEL, M. et al., 2012. Bioreactor cultivation and remodelling simulation for cartilage replacement material. *Medical Engineering & Physics* [online]. Vol. 34, issue 1, pp. 56-63 [cit. 2017-05-06]. DOI: 10.1016/j.medengphy.2011.06.018. ISSN 13504533.
109. TAKEBE, T., S. KOBAYASHI a H. KAN, 2012. Human Elastic Cartilage Engineering from Cartilage Progenitor Cells Using Rotating Wall Vessel Bioreactor. *Transplantation Proceedings* [online]. Vol. 44, issue 4, pp. 1158-1161. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.03.038. ISSN 00411345.
110. THOMAS, S., A. P. MATHEW a P. M. VISAKH, 2013. *Advances in natural polymers: composites and nanocomposites*. Advanced structured materials, Vol. 18. ISBN 978-3-642-20940-6.
111. VACANTI, J. a CH. A. VACANTI, 2014. The History and Scope of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering* [online]. Elsevier, p. 3. DOI: 10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X. ISBN 9780123983589.

112. VARAPRASAD, K., K. et al., 2015. Cell Encapsulation in Polymeric Self-Assembled Hydrogels. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* [online]. Elsevier, p. 149. DOI: 10.1016/B978-0-323-32889-0.00010-8. ISBN 9780323328890.
113. VERSTRAETE, G., W. DE JAEGHERE a J. VERCRUYSSSE, 2017. The use of partially hydrolysed polyvinyl alcohol for the production of high drug-loaded sustained release pellets via extrusion-spheronisation and coating: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Vol. 517, issue1-2, pp. 88-95. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.067. ISSN 03785173.
114. WANG, L. et al., 2013. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. Vol. 9, Issue 1, pp. 8921-8931. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.06.035. ISSN 17427061.
115. WANG, M., 2003. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* [online]. Vol. 24, issue 13, pp. 2133-2151. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00037-1. ISSN 01429612.
116. WANG, Z. et al., 2014. Membrane cleaning in membrane bioreactors: A review. *Journal of Membrane Science* [online]. Vol. 468, pp. 276-307. DOI: 10.1016/j.memsci.2014.05.060. ISSN 03767388.
117. WARGO, S. L., T. R. KUMAR a A. J. RUSSELLRussell, 2006. Tissue engineering and the challenges within. *Cell Transplant.* Vol. 15, issue 1, pp. 11-5. DOI: 10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7
118. WASHBURN, N. R., 2004. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials* [online]. Vol. 25, issue 7-8, pp. 1215-1224. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.043. ISSN 01429612.
119. WEI, G. a P. X. MA, 2014. Polymeric biomaterials for tissue engineering. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers* [online]. Elsevier, p. 35. DOI: 10.1533/9780857097163.1.35. ISBN 9780857097125.
120. WU, J. a Y. HONG, 2016. Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration. *Bioactive Materials* [online]. Vol. 1, issue 1, pp. 56-64, DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.07.001. ISSN 2452199x.
121. YE, M., P. MOHANTY a G. GHOSH, 2014. Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: Impact of process variables. *Materials Science and Engineering: C* [online]. Vol. 42, pp. 289-294. DOI: 10.1016/j.msec.2014.05.029. ISSN 09284931.

122. YOON, H. H. et al., 2012. Enhanced Cartilage Formation via Three-Dimensional Cell Engineering of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* [online]. Vol. **18**, issue 19-20, pp. 1949-1956. DOI: 10.1089/ten.tea.2011.0647. ISSN 1937-3341.
123. YU, J. Z. et al., 2017. Biomimetic scaffolds with three-dimensional undulated microtopographies. *Biomaterials* [online]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.014. ISSN 01429612.
124. ZADÁK, Z., 2002. *Výživa v intenzivní péči*. Praha: Grada, p. 204. ISBN 80-247-0320-3.
125. ZERN, M. a L. Reid, 1993. *Extracellular Matrix*. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=ctA9yylFzyMC&printsec=frontcover&dq=extracellular+matrix&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjS3JLE-6_SAhWEkSwKHXOEBwEQ6AEIIDAB#v=onepage&q=extracellular%20matrix&f=false
126. ZHAO, J. et al., 2016. Bioreactors for tissue engineering: An update. *Biochemical Engineering Journal* [online]. Vol. **109**, pp. 268-281. DOI: 10.1016/j.bej.2016.01.018. ISSN 1369703x.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

RM	Regenerativní medicína
TE	Tkáňové inženýrství
ECM	Extracelulární matrix
PVA	Polyvinyl alkohol
ESC	Embryonální kmenové buňky
FN	Fibronektin
HA	Kyselina hyauronová
CS	Chondroitin sulfát
DS	Dermatan sulfát
KS	Keratan sulfát
HS	Sulfát heparinu
PLA	Kyselina mléčná
PGA	Kyselina polyglykolová
PLGA	Kopolymer kyseliny glykolové a mléčné
PAA	Kyselina peroctová
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylentereftalát
PLLA	Kyselina poly – L –mléčná
GAG	glykosaminoglykan

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Strategie regenerativní medicíny.....	12
Obrázek 2 Princip tkáňového inženýrství (LANGER R. a J. VACANTI, 2016)	13
Obrázek 3 Diferenciace kmenové buňky.....	15
Obrázek 4 Kompoziční uspořádání ECM (AMODT, J. M. a D. W. GRAINGER, 2016).....	17
Obrázek 5 Kompozitní materiál složený z fibronektinu (oranžová) a kolagenu (fialová) s buňkami (modrá). FN konformace řídí chování buněk prostřednictvím adhezních molekul, jako jsou integriny (zelená). Buněčné chování je také řízeno prostřednictvím interakcí s růstovými faktory (fialová) (ZOLLINGER, A. J. a M. L. SMITH, 2016)	19
Obrázek 6 Strukturní rozdíly lamininu (FLOREA, F. et al., 2016).....	20
Obrázek 7 Struktura a syntéza glykosaminoglykanového řetězce (GHATAK, S. et al., 2015).....	21
Obrázek 8 PVA + glutaraldehyd -> vznik sítě (YE, M., P. MOHANTY a G. GHOSH, 2014).....	26
Obrázek 9 Struktura PVA A) částečně hydrolyzovaný B) plně hydrolyzovaný	26
Obrázek 10 Různé metody modifikace vodivých polymerů	27
Obrázek 11 Typy struktur scaffoldů SEM mikroskopie (DUTTA, R. C. et al., 2017).....	29
Obrázek 12 Schéma průběhu vzniku decelularizovaného scaffoldu, recelularizace a potenciální aplikace (upraveno podle HUSSEIN, K. H. et al., 2016).....	32
Obrázek 13 Různé techniky přípravy scaffoldů (CHAN, B. P. a K. W. LEONG, 2008).....	34
Obrázek 14 Nezbytné kroky pro implantaci požadované tkáně (EAKER, S. et al. 2017).....	37
Obrázek 15 A) Dvojitá komora, každá komora obsahuje médium a kanál pro cyrkulaci O ₂ . Biorekator je schopen tvořit dvoufázové osteochondrální štěpy. B) Bioreaktor s komorou utěsněnou O kroužky a šroubovacím uzávěrem. Médium se čerpá z první nádrže přes průtokové komory a poté zpět do zásobníku. C) Obousměrný bioreaktor – buněčná suspenze osciluje mezi dvěma skleněnými sloupy do komory ke vzorku (ZHAO, J. et al., 2016).	38
Obrázek 16 Oficiální fotka buněk od dodavatele	44
Obrázek 17 Vlevo: Rotující komůrka se vzorkem v prostředí média.....	47
Obrázek 18 Ukázka inhibičního pásma odpovídající písmenu A na kapalném vzorku (ilustrační obrázek).....	50
Obrázek 19 Buňky NIH/3T3 v prostředí vzorku A) A2C a B) A6C	51
Obrázek 20 Cytotoxicita extraktů vzorků scaffoldu o různé koncentraci, prezentována jako průměrný počet životaschopných buněk ± standartní odchylka. Přerušované čáry zdůrazňují kritickou životaschopnost, která se hodnotí podle požadavků normy EN ISO 10993-5, kde životaschopnost >80% nepředstavuje toxicitu, 80% – 60% vykazuje mírnou cytotoxicitu, 60% – 40% vykazuje střední cytotoxicitu a pod 40% se jedná o silnou cytotoxicitu.....	53
Obrázek 21 Buňky NIH/ 3T3 kultivované v přítomnosti 75% extraktu A) PVA, B) A2C, C)A3C, D) A4C, E) A5C, F) A6C.....	54
Obrázek 22 Buňky NIH 3T3 nabarvené actinem.....	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Historický přehled důležitých momentů v regenerativní medicíně (STARZL, T., 2000).....	14
Tabulka 2 Shrnutí vlastností jednotlivých typů scaffoldu	34
Tabulka 3 Složení vzorků	41

