

# Vliv povrchových vlastností materiálu na proliferaci buněk

Bc. Tereza Rusz

---

Diplomová práce  
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Rusz**  
Osobní číslo: **T21699**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Vliv povrchových vlastností na proliferaci buněk**

## Zásady pro vypracování

Využívání scaffoldů jako náhrad tkání či orgánů v tkáňovém inženýrství vyžaduje vytvoření podmínek a prostředí co nejpodobnější organismu. Před zavedením použitých scaffoldů v praxi je potřeba znát vlastnosti použitého materiálu a také jeho interakce s buňkami. Povrchové vlastnosti materiálu jsou jedním z mnoha důležitých faktorů. Povrch materiálu ovlivňuje jak samotnou adhezi buněk, tak jejich následný růst. Pomocí topografie povrchů je možno také diferencovat kmenové buňky do různých buněčných směrů.

**Teoretická část** – zaměřte se na získání znalostí co se týče interakcí buněk s materiály, dále zpracujte literární přehled na toto téma.

**Praktická část** – seznamte se s kultivací běžných buněčných linií, následné dovednosti využijte při testování biologických vlastností povrchových vlastností materiálů.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [2] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.
- [3] DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4.
- [4] ROSYTAL, S. Nový přehled biologie. Praha: Scientia, 2003. ISBN 10: 80-7183-268-5.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Kateřina Skopalová**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

L.S.

---

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

---

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

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, který využívá několik strategií pro regeneraci dysfunkční tkáně nebo její nahrazení. Nejběžnějším způsobem je využití matrice pro regeneraci tkáně neboli „scaffoldu“. Pro výrobu scaffoldů se v dnešní době používá řada biomateriálů, ať už se jedná o materiály přírodního nebo syntetického původu. Jelikož implantovaný materiál přichází do těsného kontaktu s buňkami je nutné znát souvislosti vztahující se k interakce buněk s materiály. Praktická část této diplomové práce se zaměřuje na studium vlivu povrchových vlastností biomateriálů na buněčnou adhezi a proliferaci. V experimentu byl testován vliv polylaktidu (PLA) na myší embryonální fibroblasty a myší embryonální kmenové buňky. Cytotoxicita materiálu byla nejprve testována v nepřímém kontaktu, kdy byla pomocí MTT testu stanovena buněčná viabilita v přítomnosti různých koncentrací extraktu materiálu. Dále pak byla studována schopnost proliferace buněk na materiálu. PLA jako běžně využívaný materiál v tkáňovém inženýrství nevykazoval cytotoxické účinky a buňky, zejména fibroblasty, byly schopny adheze a následného množení.

Klíčová slova: tkáňové inženýrství, biomateriály, scaffoldy, kmenové buňky, proliferace

## **ABSTRACT**

Tissue engineering is a multidisciplinary field of science that uses several strategies to regenerate dysfunctional tissue or to replace it. The most common approach is the use of matrix for tissue regeneration also known as "scaffold". Various biomaterials are used nowadays for the production of scaffolds, whether they are of natural or synthetic origin. Since the implanted material comes in close contact with cells, it is necessary to know the context of cell-material interaction. The practical part of this thesis focuses on the influence of surface properties of biomaterials on cell adhesion and proliferation. In an experiment, the effect of polylactide (PLA) on somatic and stem cells was tested. The cytotoxicity of the material was first tested in indirect contact, where cell viability was determined in the presence of different concentrations of the material extract using the MTT assay. Next, the ability of cells to proliferate on the material was studied. PLA, a commonly used material in tissue engineering, did not show cytotoxic effects, and cells, especially fibroblasts, could adhere and subsequently proliferate.

Keywords: tissue engineering, biomaterials, scaffolds, stem cells, proliferation

Tímto bych chtěla velmi poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. z Centra polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za odborné vedení této diplomové práce, za připomínky, poskytnuté rady, revize a věnovaný čas

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

## OBSAH

ÚVOD .....	9
<b>I. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 HISTORIE .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 STRATEGIE.....</b>	<b>13</b>
<b>2 BIOMATERIÁLY .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 KLASIFIKACE .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Kovy.....	17
2.1.2 Biokeramika.....	17
2.1.3 Polymery.....	18
2.1.3.1 Přírodní polymery .....	18
2.1.3.2 Syntetické polymery.....	19
2.1.3.3 Vodivé polymery.....	19
<b>2.2 BIOKOMPATIBILITA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 BIODEGRADACE A BIORESORBCE.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Biodegradabilní biomateriály .....	22
<b>3 BUŇKY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 KMENOVÉ BUŇKY .....</b>	<b>24</b>
<b>4 INTERAKCE BUNĚK S BIOMATERIÁLY .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 VLIV POVRCHOVÝCH VLASTNOSTÍ BIOMATERIÁLU NA         BUNĚČNOU ODEZVU .....</b>	<b>28</b>
4.1.1 Hydrofilita a hydrofobicita .....	28
4.1.2 Povrchový náboj .....	29
4.1.3 Topografie .....	30
4.1.3.1 Drsnost.....	30
4.1.3.2 Povrchový vzor .....	31
<b>4.2 VLIV GEOMETRIE BIOMATERIÁLU NA BUNĚČNOU ODEZVU .....</b>	<b>32</b>
4.2.1 Trojrozměrná struktura.....	32
4.2.2 Porézní struktura .....	33
<b>4.3 VLIV MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ BIOMATERIÁLU NA         BUNĚČNOU ODEZVU .....</b>	<b>34</b>
4.3.1 Tuhost povrchu .....	34
<b>II. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
<b>5 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>37</b>
<b>6 MATERIÁLY A METODY.....</b>	<b>38</b>
<b>6.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....</b>	<b>38</b>
6.1.1 Myší fibroblasty.....	38
6.1.2 Kmenové buňky.....	38
<b>6.2 STRUKTURA POLYLAKTIDU.....</b>	<b>39</b>
<b>6.3 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY .....</b>	<b>40</b>

6.3.1	Test cytotoxicity – MTT test .....	40
6.3.2	Test proliferace buněk na PLA .....	43
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>45</b>
7.1	TEST CYTOTOXICITY PLA EXTRAKTU.....	45
7.2	TEST PROLIFERACE BUNĚK NA PLA.....	46
<b>8</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>51</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>72</b>



## ÚVOD

Poškození tkání nebo orgánů může být způsobeno jako následek vážných zdravotních komplikací ať už jde o chronická onemocnění včetně onkologických diagnóz nebo jako trvalé následky vážného zranění. Přestože některé tkáně mají schopnost samo regenerace, v některých případech je nutné použít možnosti léčby pro obnovení nebo udržení funkce poškozené tkáně. Poškozené buňky ztrácejí schopnost replikace a dochází tak k poškození fyziologické funkce tkáně, co může vést k úplnému selhání orgánu. Léčba poškozené tkáně závisí na druhu a rozsahu poškození. Jednou z možností je zamezení působení toxické látky na orgán, jak je tomu například u jaterní tkáně v období abstinence. Mezi další možnosti léčby patří využití možnosti buněčné terapie nebo chirurgická transplantace dysfunkčního orgánu. Přestože transplantace může pacientovi zachránit život, nese s sebou riziko odmítnutí cizí tkáně a řadu dalších komplikací. Tento přístup je rovněž omezen nedostatkem dárců orgánů a jejich vhodností pro příjemce. Plná obnova funkce tkáně ale může být v některých případech obtížná a neúspěšná. Poškození tkáně tak může mít tragické následky pro pacienta spojenou s celoživotní chronickou dysfunkcí, vedoucí k úplnému selhání orgánu. Vědci se proto zaměřují na výzkum nových technik reparace tkání a zaměřují se na nové alternativní přístupy léčby [1, 2]. To vedlo rovněž k rozvoji oboru zvaného tkáňové inženýrství (TI), které je oblastí regenerativní medicíny. Tento obor se zaměřuje na vývoj a rekonstrukci složitých umělých struktur, které po implantaci do poškozené oblasti mohou obnovit integritu a funkčnost poškozených tkání [3]. Materiály používané v tkáňovém inženýrství se označují souhrnně jako biomateriály [4].

Pojem „biomateriál“ byl poprvé definován v roce 1986 jako „neživotaschopný materiál používaný v lékařském zařízení, jehož účelem je interakce s biologickými systémy“. V té době byly biomateriály z velké části používány v lékařských zařízeních k léčbě nebo nahrazení jakýchkoli tkání, orgánů těla, aniž by způsobily jakoukoli nepříznivou reakci na živé tkáně. Potřeba předefinovat tento pojem vyplynula ze skutečnosti, že „neživotaschopný“ popis již nebyl relevantní, a také pro to, že biomateriály byly používány v mnoha jiných aplikacích, než jsou implantovaná zařízení, včetně systémů pro podávání léků, zobrazovací kontrastní činidla a konstrukty TI. Definice biomateriálu, který dosáhl konsensu na konferenci v roce 2018 je následující: „Materiál navržený tak, aby nabyl formy, která může prostřednictvím interakcí s živými systémy řídit průběh jakéhokoli terapeutického nebo diagnostického postupu“. Bylo dohodnuto, že tento termín je

synonymem pro „biomedicinský materiál“ [4]. Současné aplikace TI zahrnují použití široké škály biomateriálů jako jsou syntetické a přírodní polymery, anorganické biomateriály (kovy, keramika) [5].

Pro umělou výrobu tkáně *in vitro* se používají speciálně navržené biomateriály, ve formě trojrozměrného porézního lešení, takzvaného „scaffoldu“. Návrh scaffoldu vyžaduje použití vhodných buněk a růstových faktorů, které společně tvoří „triádu“ TI. Každá složka triády je individuálně důležitá a pochopení jejich interakcí je klíčové pro úspěšnou aplikaci v TI. Buňky jsou schopny syntetizovat extracelulární matrix (ECM), která časem zcela nahradí scaffold v případě, že je biodegradabilní. Růstové faktory ovlivňují buněčný růst a diferenciaci. Scaffold slouží jako transportní zařízení buněk nebo růstových faktorů, poskytuje mechanickou stabilitu a zajišťuje vhodné prostředí pro buněčný růst a proliferaci [1, 3]. Struktura a mechanické vlastnosti materiálu jsou důležitými parametry pro schopnost imobilizace buněk na povrchu scaffoldu. Povrchové vlastnosti materiálu umožňují přichycení a ukotvení buněk a pórovitá struktura umožňuje buněčný růst, migraci a efektivní transport tekutin a živin. Mikroporézní struktura je důležitá zejména pro buněčné vrůstání a interakce mezi buňkami a matricí, zatímco makroporozita je důležitá pro zásobení buněk živinami a odstraňováním odpadu buněčného metabolismu [6].

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

TI je multidisciplinární obor uplatňující poznatky a technologie z oblasti biologie, buněčné biologie, medicíny, chemie a materiálového inženýrství [7, 8]. Tato moderní vědní disciplína se věnuje manipulaci s živými tkáněmi, které lze potencionálně kombinovat s protetickými materiály. Dále se zaměřuje na vývoj nových samostatných tkání nebo tkání v kombinaci s vhodnými biologickými látkami nebo biomateriály [9].

Dysfunkce tkáně může nastat jako důsledek vrozené vady, traumat nebo onemocnění. Organismus je schopen do jisté míry opravit poškozenou tkáň díky reparačním systémům. Pro podporu regenerace je v dnešní době využíváno mnoho přístupů léčby. V některých případech je nutné poškozenou tkáň nahradit transplantací. Z důvodu nedostatku dárců orgánů a možné imunologické reakci po transplantaci dárcovského orgánu, jsou vědci a lékaři motivováni vyvinout bezpečné a spolehlivé zdroje tkání a orgánů pro transplantaci. Obory vědy využívající inženýrské a biologické principy ke tvorbě a regeneraci tkání, orgánů jsou TI a regenerativní medicína [10].

TI je součástí oboru zvaného regenerativní medicína. Zahrnuje konstrukci tkáně *in vitro*. Podstatou TI je studium a vývoj biokompatibilních náhrad, díky kombinaci využití buněk, technických materiálů a biochemických faktorů [11, 12, 13]. TI se dále specializuje na vývoj specializovaných mimotělních systémů pro podporu života (např. umělá játra a ledviny) a také tkáňové jednotky, které lze použít pro diagnostický screening. Kromě toho se TI zaměřuje na testování účinnosti a toxikologii léčiv a také základní studie vývoje tkání a jejich morfogeneze [8]. Regenerativní medicína se týká nástrojů, které pomáhají tělu znovu vypěstovat poškozenou tkáň *in vivo* u pacienta. Základem regenerativní medicíny je pochopení morfogeneze a přirozených, inherentní samoopravných mechanismů tkání. Zahrnuje použití kmenových buněk, genové terapie, rozpustných bioaktivních molekul a věnuje se studiu buněk a tkání. Jelikož se oba obory (tkáňové inženýrství a regenerativní medicína) navzájem doplňují, jsou společně označovány pod zkratkou „TERM“ (tissue engineering and regenerative medicine) [13].

## 1.1 HISTORIE

Historie TI sahá do začátku 70. let 20. století, kde bylo provedeno několik experimentů náhrady tkáně. Jedním z nich byla snaha dětského chirurga T. W. Greena o vytvoření nové chrupavky pomocí králičích chondrocytů nasazených na odvápněné fragmenty kostí.

Konstrukt s buňkami byl následně implantován laboratorním myším [14]. Přesto, že experiment nevedl k očekávaným výsledkům, myšlenka využití matrice s buněčnou kulturou vedla k nové metodologii experimentálních technik regenerace tkání. O několik let později Dr. John Burke pracoval na vytvoření nové kožní tkáně pomocí kolagenové matrice, která podporovala růst dermálních fibroblastů buněk naočkováním těchto buněk na kolagenové gely. Dalším experimentem byl pokus Dr. Howarda Greena o přenesení keratinocytové tkáně na popáleniny pacientů. Společně tyto pokusy, a mnoho dalších, daly základ nové vědní disciplíně pod názvem TI [9].

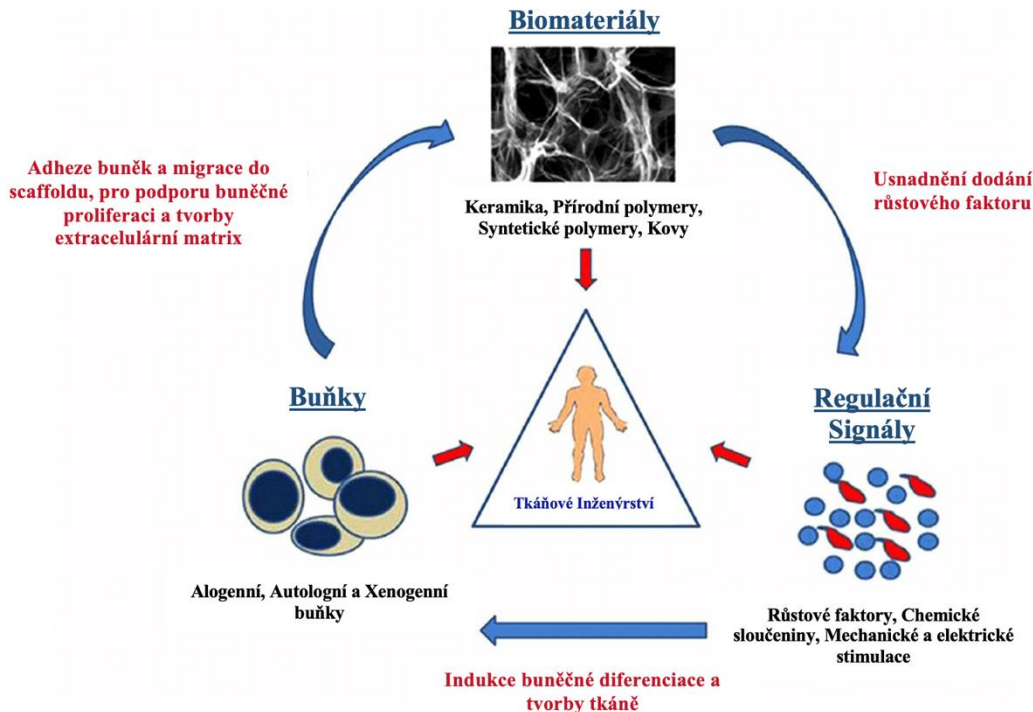
Termín „tkáňové inženýrství“ ve smyslu aplikace pro regeneraci tkáně byl poprvé použit v roce 1988 [1, 15] na workshopu Národní vědecké nadace - National Science Foundation (NSF). Do té doby se tento termín aplikoval pouze na použití protetických zařízení a chirurgických manipulací s tkáněmi [9]. Tuto definici později formálně popsali Langer a Vacanti v roce 1993 [12]. Ve své práci (Langer a Vacanti 1993) popisují koncept TI a označují ho jako multidisciplinární obor, který uplatňuje principy inženýrství materiálů a přírodních věd k rozvoji náhrad tkání [8].

S vidinou potenciálních aplikací vznikla v Evropě a Spojených státech řada laboratorních středisek zaměřujících se na výzkum v oblasti TI. Mezi významná střediska patřil vývoj Pittsburské iniciativy tkáňového inženýrství – Pittsburgh Tissue Engineering Initiative (PTEI), založený na začátku 90. let Peterem Johnsonem nebo Cardiovascular Tissue Engineering Initiative v Georgii a další. V Evropě, Dr. Julia Polak, patoložka a biologka se zaměřením na kmenové buňky, stála v čele v oblasti TI na Imperial College a byla zakladatelkou Evropské společnosti tkáňového inženýrství (ETES). Tato společnost si později vytvořila volné spojení se Společností tkáňového inženýrství (TES, Tissue Engineering Society), která byla založena v roce 1994 v Bostonu. K TES se postupně připojovala další evropská a asijská sdružení, co vedlo k vytvoření konsolidované společnosti – Mezinárodní společnost tkáňového inženýrství a regenerativní medicínu (TERMIS) v roce 2005 [9].

## 1.2 Strategie

Pro správný a efektivní průběh procesu regenerace tkání jsou důležité tři vzájemně na sobě závislé prvky, které společně tvoří takzvanou „triádu tkáňového inženýrství“. Jedná se o scaffold (nosič, substrát), buňky pěstované v prostředí *in vitro* a signální molekuly nejčastěji v podobě růstových faktorů [16, 17, 18] Jednotlivé prvky a jejich kombinace jsou

zásadní pro úspěch aplikací TI [13], z toho důvodu je nutné přizpůsobit komponenty triády TI pro specifické aplikace, co vyžaduje pochopení jejich vzájemné interakce [1].



**Obrázek 1** Triáda tkáňového inženýrství, upraveno dle Murphy et al., 2013.

Koncept léčby poraněných tkání pomocí implantace izolovaných buněk je v současnosti považován za buněčnou terapii. Růstové faktory patří do skupiny látek, které se podílí na podpoře buněčného růstu, proliferace, diferenciace. Dále ovlivňují buněčné přežití, migraci a stimulují buňky ke tvorbě nové tkáně. Buňky nebo růstové faktory mohou být umístěny na matrici, která je následně implantována do místa poranění [17]. Současné pokroky v TI zahrnují vývoj ve všech prvcích triády [13]. Přesto, že se platformy buněk a signálních molekul během posledních desetiletí vyvinuly, stupeň úspěchu metod TI je stále velmi závislý na materiálových vlastnostech scaffoldu. Z toho důvodu se vědci stále více zaměřují na studium buněčných interakcí se scaffoldy (viz kapitola Interakce buněk s biomateriály) a jejich následné využití pro biologické aplikace [17].

Strategie regenerace tkáně s využitím scaffoldů zahrnuje několik dějů, které po sobě následují. Nejprve dochází k odběru části tkáně neboli biopsii, po které následuje izolace buněk spočívající v jejich uvolnění z přirozené matrice. Následuje *in vitro* expanze buněčné kultury v bioreaktoru. Expandované buňky se následně *in vitro* naočkují na scaffold, který

buňkám poskytuje strukturální podporu. Tkáňový konstrukt je společně s buňkami umístěn do sterilní komory bioreaktoru. Přidáním vhodného kultivačního média, bohatého na živiny a růstové faktory dochází ke stimulaci buněčných dějů zahrnující adhezi, proliferaci a diferenciaci [16, 18].

Scaffoldy TI jsou vyráběny ze speciálních materiálů, které se souhrnně označují jako „biomateriály“ [2]. Ty mají v oblasti TI a regenerativní medicíny velký význam. Již po staletí se používají pro různé aplikace, jako například výměna nitroočních čoček a zubní výplně. Pokroky v buněčné a molekulární biologii, chemii, materiálové vědě a inženýrství dnes poskytují mnohem širší příležitosti pro klinické aplikace [20]. Příkladem je právě zmíněná výroba porézních scaffoldů se specifickými požadovanými vlastnostmi, které mohou být tvarem přizpůsobeny pacientovi a místu poranění [2].

## 2 BIOMATERIÁLY

V TI se jako biomateriály označují materiály syntetického a přírodního původu, které jsou používány pro propojení s biologickými systémy za účelem léčby nebo nahrazení jakékoli tkáně, orgánu nebo funkce těla [21, 22].

Biomateriály mají mnoho jedinečných vlastností, které mu umožňují interakci s živým systémem zahrnujícím tkáně, buňky atd. Vědci navrhli mnoho definic a popisů pro biomateriály, které se v průběhu let měnily [22]. Termín „biomateriál“ byl Evropskou společností pro biomateriály v roce 1987 definován jako „neživotaschopný materiál používaný v lékařském zařízení, jehož účelem je interakce s biologickými systémy“ [23]. Skutečnost, že popis „neživotaschopný“ byl později uznán jako nerelevantní, bylo potřeba biomateriál předefinovat. Kromě toho došlo k rozšíření aplikací biomateriálů, které se začaly používat jako systémy na dodání léků, zobrazovací kontrastní činidla a konstrukty TI [4]. V roce 1999 byl biomateriál definován jako „materiál určený k propojení s biologickými systémy za účelem hodnocení, léčby, rozšíření nebo náhrady jakékoli tkáně, orgánu nebo funkce těla“ [23]. Jiná definice z roku 2018 označuje biomateriál, jako „materiál navržený tak, aby samotný nebo jako součást komplexního systému, který prostřednictvím interakcí s živými systémy řídil průběh jakéhokoli terapeutického nebo diagnostického postupu, v humánní nebo veterinární medicíně“ [4, 22]. Přesto, že definice biomateriálu se v průběhu let měnila, cílem všech výzkumů bylo zhotovení funkčního biomateriálu, který je podobný nativní tkáni. Dalším kritériem byla implantace do organismu, aniž by došlo k poškození tkáně, nebo nepřívětivé reakci hostitelského organismu. Dnes existuje řada biomateriálů pro odlišné klinické aplikace TI. Použití těchto biomateriálů by mělo být pro danou aplikaci specifické, jelikož biomateriál, který je úspěšný v jedné aplikaci, nemusí v jiné uspět [20]. Výběr nejvhodnějšího kandidáta pro určitou aplikaci je složitým procesem [24]. Aplikacím biomateriálu v klinické praxi musí předcházet několik studií jako je správný technický návrh a testování *in vitro* (buněčné kultury) a *in vivo* (na zvířatech a na lidech) [21].

Pro klinické aplikace dnes existuje více než sto různých tříd biomateriálů. Další biomateriály jsou v pokročilém stavu testování pro jejich potenciální aplikace. Široké spektrum chemických, fyzikálních, mechanických, biologických nebo morfologických vlastností biomateriálů vykazuje velký rozsah využití v tkáních hostitelských organismů. Jedná se o pevnou tkáň nebo orgány *in vivo*, nervový systém *in vivo*, kardiovaskulární systém



*in vivo*, smyslové orgány *in vivo*, vylučovací soustava *in vivo*, turbulární systém, kůže a sliznice. Dále *ex vivo* systém buněčné kultury nebo mimotělní oběhový systém [25].

## 2.1 Klasifikace biomateriálů

Biomateriály jsou v TI nejčastěji klasifikovány z hlediska původu. Z tohoto hlediska lze rozlišit syntetické a přírodní biomateriály. Syntetické biomateriály jsou dále klasifikovány jako polymery, kompozity, kovy a keramika. Biomateriály přírodního původu jsou dále klasifikovány jako polysacharidy (chitosan, kyselina hyaluronová – HA, alginát), nebo proteinového původu (kolagen, hedvábí). Některé biomedicínské scaffoldy jsou připravovány kombinací přírodních a syntetických biomateriálů, což zlepšuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti [26].

Pro výběr vhodného polymeru pro TI je důležité pochopit vliv polymerních materiálů na životaschopnost, růst a funkci buněk, které jsou v těsném kontaktu s materiálem [27].

### 2.1.1 Kovy

Kovy jsou pro strategie TI vhodnými biomateriály díky jejich dobrým mechanickým vlastnostem, které jim umožňují být v zatížení, aniž by docházelo k jejich deformaci. Přestože mechanické vlastnosti umožňují kovům být vhodnými kandidáty pro výrobu scaffoldu, jejich snížená buněčná adheze k povrchu je omezuje v použití. Kovové implantáty mohou navíc uvolňovat toxické ionty nebo částice. Dalším omezením je, že při kontaktu s biologickými tekutinami v místě implantace může docházet ke korozi materiálu, který může narušit jejich funkci. [28] Používanými kovy v TI jsou například nerezová ocel, slitiny kobaltu a titanu, které se uplatňují v ortopedii a zubní lékařství [28, 29].

### 2.1.2 Biokeramika

Pojmem biokeramika lze označit skupinu keramických materiálů, které jsou uplatněny v oblastech biomedicíny a regenerativní medicíny, a to k rekonstrukci poškozených tkání těla [30]. Biokeramické materiály jsou tvrdé, křehké a jsou charakterizovány iontovými a kovalentními vazbami mezi atomy kovů a nekovových prvků [31]. Řadíme je mezi anorganické sloučeniny přírodního nebo syntetického původu [28]. Mechanické vlastnosti se vyznačují tvrdým povrchem, vysokou tuhostí, nízkou elasticitou a tepelnou roztažností, to vše v [30] závislosti na typech atomů a na různých krystalických strukturách. Zejména mikrostruktura a výsledné vlastnosti jsou silně ovlivněny výrobním procesem (např. čistota

prášku, trvání tepelných kroků a maximální teplota, která je typicky vyšší ve srovnání s ostatními třídami biomateriálů) [31].

Dle chování ve fyziologickém prostředí jsou kategorizovány do tří skupin: bioresorbovatelné, bioinertní a bioaktivní. Mezi bioresorbovatelné biokeramické materiály patří vápník nebo vápenaté fosforečnany. Ty podléhají *in vivo* degradaci rozpuštěním v tělních tekutinách. Bioinertní keramika je zcela inertní vůči biologickému prostředí (oxid hlinitý, oxid zirkoničitý). Bioaktivní keramika je schopná tvorby chemické vazby s živou tkání. Přesto, že se vyznačuje vysokou biokompatibilitou a bioaktivitou, její použití v aplikacích TI je omezené kvůli její křehkosti a pomalé degradaci. Uplatnění nacházejí v ortopedii při regeneraci kostní tkáně, díky osteokonduktivním vlastnostem a podporou osteogenní diferenciaci [2, 30, 31, 32].

### 2.1.3 Polymery

Polymery jsou tvořeny řetězcem opakujících se funkčních jednotek (monomerů), [31] a jako biomateriály se používají více než 50 let [18]. Obecně mají nižší modul pružnosti a nižší hustotu než předchozí dvě materiálové třídy (kovy, keramika). Jejich vlastnosti závisí na délkách řetězců a příčných vazbách. Vazby mezi řetězci mohou být slabé povahy v případě termoplastických polymerů nebo kovalentní povahy v případě termosetových polymerů. Elastomery mají jak slabé, tak kovalentní vazby, které přispívají k jejich pružnosti [31]. V TI a regenerativní medicíně se polymery používají díky obrovské rozmanitosti vlastností, jako je biodegradace a různé mechanické vlastnosti [5]. Biomedicínské polymery se rozdělují do dvou základních skupin: polymery přírodního původu (biopolymery) a syntetické polymery [28]. Kromě toho se v TI využívá skupina speciálních polymerů s vodivými vlastnostmi.

#### 2.1.3.1 Přírodní polymery

Přírozně odvozené polymerní materiály jako je kolagen, fibrin, fibroin, glykosaminoglykany (GAG), chitosan, algináty a škrob, mohou být přímo extrahovány z rostlin, zvířat, lidských tkání nebo z nich odvozeny [6]. Jedná se zejména o proteiny a polysacharidy. Mezi nejčastěji používané přírodní polymery v TI pro regeneraci tkání *in situ* patří chitosan, celulóza, kolagen a elastin [2, 18]. Přírodní polymery, odvozené z polysacharidů a proteinů mají vynikající biokompatibilní vlastnosti [2, 6]. Degradace a

absorpce přírodních polymerů je *in vivo* zprostředkována enzymy, které se přirozeně vyskytují v organismu [32].

Při použití přírodních biomateriálů však existují určité nedostatky. Jedná se například o relativně špatné mechanické vlastnosti omezující jejich použití v anatomických místech s náročným mechanickým zatížením, jako je regenerace tvrdých tkání. Za účelem zlepšení těchto vlastností se přírodní polymery často kombinují se syntetickými a tímto vzniknou hybridní biomateriály, které bez kompromisů využívají výhod obou tříd polymerů [2].

### 2.1.3.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery jsou vysokomolekulární sloučeniny složené z řady monomerních jednotek. Na základě své struktury mohou být lineární, rozvětvené nebo zesítěné. Vzhledem k jejich termomechanickým vlastnostem rozlišujeme termoplastické nebo termosetové polymerní materiály [28]. Syntetické polymerní biomateriály pro použití při regeneraci tkání *in situ* jsou založeny na degradovatelných polymerech. Vyráběny jsou pomocí různých přístupů za účelem výroby struktur se zlepšenými fyzikálními, chemickými a mechanickými vlastnostmi, jako je tuhost, degradace a poréznost [2]. Jako lešení v TI se používají především kvůli jejich vysoké všestrannosti, vlastnostem, reprodukovatelnosti a dobré zpracovatelnosti [6]. Díky těmto vlastnostem lze ze syntetických polymerů vyrobit specifické scaffoldy pro konkrétní aplikaci, které odpovídají cílové anatomii a fyzikálně-chemickým vlastnostem poraněné tkáně [2, 5].

Syntetické polymery lze rozdělit do dvou tříd jako biologicky odbouratelné (kyselina poly(glykolová), kyselina poly(mléčná) a kopolymery, polykaprolakton, polydioxanon a polyuretany) a biologicky nerozložitelné (polyvinyl alkohol, polyhydroxyethylmethakrylát a poly(N-isopropylakrylamid) [32]. Přesto, že syntetické polymery lze snadno zpracovat, jsou v porovnání s přírodními polymery méně biokompatibilní a nejsou bioaktivní [6]. Často jsou proto kombinovány s přírodními polymery pro zvýšení hydrofilních vlastností spojených s lepší adhezí buněk na povrch biomateriálu [5].

### 2.1.3.3 Vodivé polymery

Vodivé polymery jsou souhrnně označovány jako CP (conducting polymers). Jejich elektrické vlastnosti připomínají kovy a anorganické polovodiče se zachováním snadné syntézy a flexibility při zpracování. Za normálních okolností jsou polymery nevodivé. Vodivými se polymery stávají díky dopingovému procesu, který zavádí do polymeru náboje.

Neustálý pohyb dvojných vazeb za účelem stabilizace nábojů v sousedních atomech způsobuje jejich přeskokování přeskakují mezi řetězci a činí tak polymer vodivým [33, 34]. Měkká povaha organických vodivých polymerů poskytuje lepší mechanickou kompatibilitu a strukturální laditelnost s buňkami a orgány než běžné elektronické anorganické a kovové materiály. CP jsou nejen biokompatibilní, ale mohou také podporovat buněčné aktivity, včetně buněčné adheze, migrace, proliferace, diferenciací a sekrece proteinů na rozhraní polymer-tkáň s nebo bez elektrické stimulace. Biomateriály založené na CP jsou zvláště užitečné při konstrukci elektricky citlivých tkání, jako jsou kosterní svaly, srdeční svaly, nervy, kůže a kosti. Biomateriály obsahující CP mohou významně zvýšit buněčnou adhezi a proliferaci řady buněk, jako například fibroblastů, myoblastů, srdečních buněk, primárních kardiomyocytů a mezenchymálních kmenových buněk [33].

Mezi příklady vodivých polymerů patří polyanilin (PANI), polypyrrol (PPY) a polythiofen a jejich deriváty a kompozity, které jsou atraktivní díky dobré biokompatibilitě, snadné syntéze a schopnosti elektronicky řídit řadu fyzikálních a chemických vlastností. Tyto výhodné vlastnosti je činí atraktivními v mnoha biomedicínských aplikacích, včetně systémů pro podávání léků, umělých svalů, biosenzorů a aplikacích TERM pro regeneraci kostní, nervové, srdeční tkáně a hojení ran kůže a kosterních svalů [33].

## 2.2 Biokompatibilita

Biomateriál, který přichází do kontaktu s živým organismem musí splňovat řadu důležitých kritérií, z nichž jedním z nejdůležitějších je biokompatibilita [18]. V průběhu let byla definice biokompatibility obměňována. V roce 1987 byla vydána definice biokompatibility, ke které se dospělo na základně konference v Chesteru ve Spojeném království ve snaze harmonizovat terminologii v oblasti biomateriálů a zdravotnických prostředků. Tato definice označovala biokompatibilitu jako „schopnost materiálu fungovat s vhodnou odezvou hostitele v konkrétní aplikaci“ [4, 35, 25, 36]. Nejnovější definice biokompatibility v souvislosti s biomateriály je následující: „Biokompatibilita se týká schopnosti biomateriálu vykonávat svou požadovanou funkci s ohledem na léčebnou terapii, aniž by u příjemce nebo příjemce této terapie vyvolával jakékoli nežádoucí místní nebo systémové účinky, ale generoval nejvhodnější prospěšnou buněčnou nebo tkáňovou odezvu v konkrétní situaci a optimalizaci klinicky relevantního výkonu této terapie.“ [22].

Biokompatibilita je jedním z nejdůležitějších faktorů, které odlišují biomateriál od jakéhokoli jiného materiálu [22, 36]. Nezávisí pouze na samotném materiálu, ale především

na systému materiál-hostitel [25, 31]. Ukázalo se, že existuje mnoho různých způsobů, jak mohou materiály a tkáně interagovat. Hledání biomateriálů, které jsou schopny zajistit nejlepší výsledky v regenerativní medicíně, bylo založeno na získání znalostí a porozumění těchto interakcí. Tyto interakce budou dále diskutovány v kapitole 4 „Interakce buněk s biomateriály“ [25].

Pro hodnocení biokompatibility materiálu je nutné provést řadu testů v závislosti na aplikaci. Nejčastější testy biokompatibility zahrnují tři typy biologických testů: test *in vitro*, testy *in vivo* a klinické testy. Běžným přístupem pro hodnocení biologického chování materiálu je začít jednoduchými *in vitro* testy. Pokud výsledky těchto testů přinesou slibná zjištění, následuje komplexnější studie na experimentálních zvířatech (*in vivo*). Posledním krokem celého procesu testování jsou klinické zkoušky. Při testech jsou kromě příznivé tkáňové odpovědi a klinicky relevantní účinnosti biomateriálu sledovány parametry zahrnující cytotoxicitu, genotoxicitu, mutagenitu, karcinogenitu a imunogenitu. [30].

### 2.3 Biodegradace a bioresorpce

Některé biomateriály jsou biologicky odbouratelné a díky schopnosti biodegradace se v tkáních rozkládají. Slovo „biodegradace“ je přesněji definováno jako jev, kdy dochází k degradaci materiálu nebo jeho rozpuštění ve vodném prostředí [37]. Cílem TI je umožnit buňkám organismu, aby časem nahradily implantované lešení nebo konstrukt TI tvorbou vlastní extracelulárního matrix (ECM) [19].

Zásadním parametrem pro úspěšnou regeneraci tkáně *in situ* je rychlost degradace biomateriálu [2]. Tato rychlost musí odpovídat rychlosti regenerace tkáně. Obecně nesmí být degradace biomateriálů příliš rychlá, jelikož musí zaručit důležitou počáteční mechanickou podporu tkáně. Na druhé straně, pokud je však degradace skeletu příliš pomalá, jeho kolonizace novou tkání by mohla být ohrožena. Dokonalá biomateriálová matrice zůstává v organismu tak dlouho, dokud je nezbytná pro kolonizaci buněk, proliferaci a diferenciaci [32]. Při rozkladu biomateriálu dochází k uvolnění produktů rozkladu materiálu do okolního prostředí v těle. Jako samotný biomateriál, produkty degradace rovněž nesmí být toxické a musí být schopny opustit organismus [4].

Bioresorbovatelné materiály jsou po degradaci resorbovány tkáněmi. Tyto materiály se vyznačují pomalou degradací nebo rozkladem a uvolňují svou hmotu v mikro nebo nano formách do okolního prostředí. Poté dochází k jejich absorpci tekutinami přítomnými v

organismu. Tyto materiály se v průběhu času zcela rozpustí v tělesné tekutině [38]. Biomateriály, které po implantaci do lidského těla neprocházejí dezintegrací a nejsou resorbovány tkáněmi lidského těla, jsou známy jako neresorbovatelné materiály [4].

Příkladem použití biodegradabilních materiálů jsou vstřebatelné chirurgické šicí nitě, využívané za účelem držení rány pohromadě. Když se rána zacelí dochází ke vstřebání materiálu bez nutného mechanického odstranění. Další aplikací těchto materiálu je podpora růstu přirozené tkáně. Určité obvazy na rány a keramické materiály pro augmentaci kostí podporují tkáň, aby do nich vrůstala tím, že poskytují vhodnou matici. Biodegradabilní materiály rovněž nacházejí uplatnění v medikamentózní terapii, kdy je možné chemicky vázat určité léky na biologicky odbouratelný materiál. Po implantaci těchto materiálů dochází k uvolnění léčiva do organismu degradací materiálu, a tímto je dosaženo dlouhodobého lokálního uvolňování léčiv po předvídatelnou dobu. Příkladová studie Farto-Vaamonde et al., 2019, se zaměřila na využití 3D tištěných PLA scaffoldů jako nosiče léku prednisolonu a dexamethasonu pro aplikace regenerace kostní tkáně [39].

Mezi příklady biodegradabilních materiálu patří polylaktid (PLA), polyglykol (PGL), polykaprolakton (PCL) a přirozeně se vyskytující materiály jako kolagen, alginát, agaróza, deriváty kyseliny hyaluronové, chitosan, hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý. Kromě biologicky odbouratelných scaffoldů existují také nebiodegradovatelná řešení zkoumané pro účely TI. Tyto materiály mohou být použity za účelem opravy kostí a chrupavek, srdce, jater a svalů [39, 40].

### 2.3.1 Biodegradabilní biomateriály

Biodegradační a bioresorpční vlastnosti mají například některé syntetické nebo přírodní polymery. Existují dva způsoby, kterými dochází k degradaci nebo rozpuštění biomateriálu v místě implantace. Prvním způsobem je hydrolyza nebo enzymatické štěpení hlavního řetězce a snížení tak molekulové hmotnosti materiálu. Druhým způsobem je chemické zasíťování materiálu za vzniku ve vodě nerozpustného hydrogelu. Tato vazba je následně degradována na ve vodě rozpustné fragmenty a dochází tak k bioresorpci biomateriálu v místě implantace [37].

V TI se díky biodegradačním schopnostem běžně používají syntetické lineární alifatické syntetické polyestery, jako PLA, PGA a jejich kopolymer poly(laktid-ko-glykolová) kyselina neboli PLGA, které jsou schválené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (anglicky Food and Drug Administration, FDA). Produkty jejich degradace (kyselina mléčná a

glykolová) získané hydrolyzou jsou za normálních podmínek přítomny v metabolických drahách lidského těla. Obměnou jejich molekulové hmotnosti a v případě PLGA také kopolymerního poměru, lze rychlost biodegradace a mechanické vlastnosti upravit na míru [41]. Kopolymer PLGA byl poprvé dostupný v roce 1974 jako biodegradabilní chirurgická šicí niť pod obchodním názvem Vicryl v roce 1974. Ve vodném prostředí se PLGA rozkládá hydrolyticky, přičemž doba celkové degradace na PLA a PGA je ve směsi 50 : 50 přibližně 8 týdnů [40, 42]. Kyselina polyglykolová (PGA) je jednoduchým, lineárním, alifatickým polyesterem, který byl poprvé použit jako biologicky odbouratelný steh [40]. Základním produktem degradace PGA je kyselina glykolová, která může být tělem metabolizována a vylučována v moči [43]. Rychlost degradace byla studována *in vitro*, přičemž po 8 týdnech zůstalo pouze 30 % polymeru [40]. Studie Reed a Gilding 1981 prokazuje, že PLA stehy ztratí 50 % své hmotnosti po přibližně 14 týdnech při pH 7 a 37 °C [44]. Produkty degradace PLA jsou monomerní nebo oligomerní jednotky kyseliny mléčné, které mohou být metabolizovány neurony v mozku, oxidovány na pyruvát v buňkách srdce, svalů a mozku a přeměněny na glukózu glukoneogenezí v játrech [43]. Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) je pomalu degradující polymer. PCL scaffoldy jsou atraktivní z dlouhodobého hlediska, protože se degradují 2 roky [40]. Hlavním degradačním produktem PCL je kyselina kapronová, která je dále metabolizována [43].

### 3 BUŇKY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

Strategie TI využívají přímé inokulace samotných buněk do poškozeného místa, nebo v kombinaci s biomateriálovým scaffoldem [16].

Dle původů jsou děleny na autologní (od stejného pacienta), alogenní (jiný pacient), xenogenní (živočišný původ) [10]. Množství odebraných buněk nemusí být vždy vystačující pro klinickou aplikaci. V takovém případě jsou buňky rozmnožovány ve sterilním prostředí tak, aby při manipulaci s buňkami nedošlo k jejich kontaminaci. Tento postup je však časově náročný a případná kontaminace se může vyskytnout z jiného zdroje, jako například kultivačního média nebo fetálního telecího séra, které je do média přidáváno [45].

Použití autologních buněk je preferovanou možností. Tyto buňky jsou odebrány pacientovi a následně po komplementaci se scaffoldem transplantovány zpět. Jelikož se jedná o buňky tělu vlastní, riziko specifické imunitní odpovědi po transplantaci je velmi nízké. Ne vždy je ale možné tuto variantu využít. U nemocných nebo starších pacientů se přiklání k alternativním zdrojům buněk, buď jako jiný lidský nebo zvířecí dárce [46]. Alogenní buňky jsou v TI užitečné díky dobrým schopnostem krytí rány oproti materiálu, který není biologického původu, jelikož mají schopnost sekrece silných růstových faktorů a přispívají tak k rychlejšímu hojení rány [45]. Xenogenní buňky, jakožto buňky živočišného původu, mohou být použity v regenerativní medicíně [10]. Díky jejich epidermální růstové aktivitě se tyto buňky využívají ke tvorbě epidermální tkáně z keratinocytů. Použití alogenních a xenogenních buněk v TI, na rozdíl od autologních buněk, vyžaduje imunosupresivní terapii, jelikož jsou imunogenní [45].

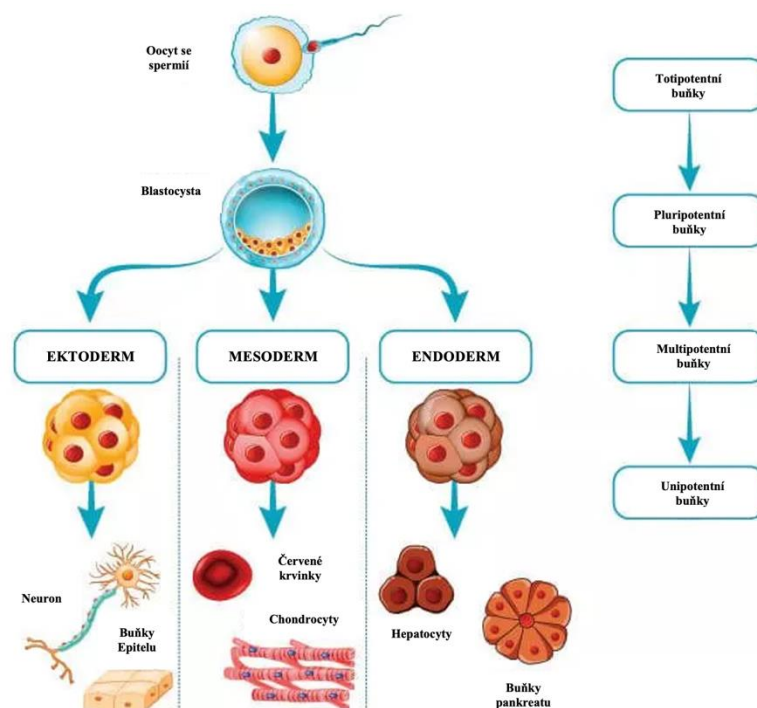
#### 3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (SC, Stem Cells), jsou perspektivní jako terapeutické nástroje v regenerativní medicíně, které mají neomezenou schopnost sebeobnovy a proliferace. Označují se jako „nediferencovaný“ buněčný typ [47]. Vlivem specifických biologických signálů generovanými například růstovými faktory, redoxním potenciálem nebo magnetoelektrickou stimulací je lze přimět k diferenciaci na různé typy somatických buněk (fibroblasty, osteocyty, buňky hladké svaloviny, kardiomyocyty). Díky tomu se mohou působit jako zdroj zásobních buněk pro různé tkáně/orgány [4, 47, 48]. SC lze dělit z několika hledisek. Na základě zdroje rozlišujeme tři kategorie SC – embryonální kmenové buňky (ESC), indukované pluripotentní buňky (iPSC) a dospělé kmenové buňky (ASC). Všechny kategorie kmenových buněk mají zásadní roli v regeneraci tkání. [29]. ESC jsou



buňky odvozené z vnitřní buněčné hmoty blastocysty a mají neomezenou schopnost diferenciaci na spektrum somatických buněk pocházejících ze tří zárodečných vrstev (endoderm, ektoderm a mezoderm). Využívání ESC se potýká s řadou etických problémů. Vhodnou alternativou k ESC jsou indukované pluripotentní buňky, které jsou odvozeny ze somatických pluripotentních buněk. Indukované pluripotentní buňky mají podobné vlastnosti jako ESC. Dospělé kmenové buňky (ASC), kam řadíme např. mezenchymální kmenové buňky (MSC), jsou z hlediska etiky vhodnější, mají ale sníženou schopnost diferenciaci. Kromě toho postup izolace těchto buněk může být složitější [47].

Na základě diferenciačního potenciálu lze rozlišovat buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a progenitorové (unipotentní) buňky. Totipotentní buňky mají schopnost diferenciaci do libovolných buněk v těle, včetně embryonální tkáně. Pluripotentní buňky mohou být zdrojem všech typů buněk. Do této skupiny patří ESC. Pluripotentní buňky jsou rané buňky zárodku ve stadiu blastocysty a mají schopnost diferenciaci do každé ze tří zárodečných vrstev, kromě trofoblastu. Buňky multipotentní pak mají schopnost diferenciaci do dalších typů buněk ale již v omezené míře. Unipotentní buňky diferencují do pouze jednoho typu buněk [29, 49].



**Obrázek 2** Diferenční potenciál kmenových buněk, upraveno dle Knapp, 2021 [50].

Pro úspěšné TI založené na SC a jejich diferenciaci do předem navržených buněčných linií by měly být vytvořeny vhodné podmínky pro posílení aktivit SC [47]. Zda se SC změní na diferencovanou buňku závisí na mikroprostředí neboli tak zvaného „niche“, ve kterém se buňka nachází [29]. Niche SC se obvykle skládá z okolních buněk (kmenových i stromálních buněk), signálních molekul, architektury matrice a dalších faktorů prostředí. Prostředí poskytuje buňkám mechanické, chemické a topologické podněty a iniciuje řadu složitých biochemických a biofyzikálních signálů [48, 51]. Mnoho studií a recenzí zdůrazňuje význam niche SC při modulaci jejich chování, včetně buněčné adheze, migrace, proliferace/apoptózy nebo diferenciaci do konkrétní buněčné linie) [47].

Lepší pochopení funkce a mechanismů niche SC umožňuje nahlédnout do optimálního lokálního mikroprostředí, které podporuje endogenní SC nebo exogenně aplikované SC, a tím usnadnit jejich integraci a diferenciaci v místě implantace. Za fyziologických podmínek niche SC udržuje dospělé SC v nediferenčním nebo klidovém stavu. Avšak po poranění tkáně dochází k přenosu signálů přicházejících z mikroprostředí, které vedou SC k podpoře sebeobnovy a diferenciaci vedoucích k opravě tkáně. Tyto signály regulují niche SC podporou interakce buňka – buňka, buňka – molekuly (proteiny a další složky ECM) a fyzikálně – chemickou povahu prostředí (pH, iontové síly, metabolity) [48].

## 4 INTERAKCE BUNĚK S BIOMATERIÁLY

Scaffolds by měly podporovat správnou buněčnou interakci, migraci, diferenciaci a proliferaci a nezpůsobovat nežádoucí imunitní reakci hostitele. Jejich vlastnosti by měly být podobné vlastnostem ECM tkáně pro dokonalou a kompletní regeneraci. Nicméně funkčnost scaffoldu závisí na několika parametrech, zahrnujících druh buněčné linie, podkladový materiál, povrchové vlastnosti a strukturu scaffoldu [52].

Interakce mezi povrchem biomateriálu a buňkami jsou zprostředkovány pomocí bílkovin neboli adhezních proteinů podobně, jak je tomu při interakci buněk s přirozenou ECM. Mezi adhezní proteiny zajišťující spojení buněk s biomateriálem patří fibronectin, vitronectin, kolagen nebo laminin. Jedná se o glykoproteiny, které mohou být adsorbovány na povrch materiálu z okolního prostředí, tzn. buněčného kultivačního média *in vitro* nebo tělesné tekutiny *in vivo* [27, 53, 54]. Přístup proteinu pevnému povrchu biomateriálu může být ovlivněn transportem proteinu, jeho velikostí a koncentračními gradienty [55]. Proteiny adsorbované na povrch implantovaného materiálu vytvoří proteinovou vrstvu, která je pro buňky rozpoznatelná a jsou schopny s ní interagovat. [56].

Adhezní proteiny obsahují specifické aminokyselinové sekvence, které slouží jako ligandy pro adhezní receptory buněk. Mezi specifické sekvence patří například RGD sekvence, která je přítomna ve většině adhezních proteinů (např. fibronectin). Jedná se o tripeptid arginin-glycin-kyselina asparagová (Arg-Gly-Asp). Buňky jsou schopny tyto sekvence rozpoznat pomocí integrinových receptorů buněčné membrány. Z toho důvodu musí být RGD sekvence ve správné konformaci, aby byly přístupné pro vazbu integrinů membrány buněk. Kromě RDG sekvence existují další sekvence aminokyselin, které bývají specifické pro daný buněčný typ. RGD sekvence je „univerzální“ a často je používána k modifikaci povrchu biomateriálu TI a cílem zlepšení adheze buněk [27, 54, 57, 58, 59].

V TI je buněčná adheze k povrchu rozhodující, jelikož adheze buněk předchází dalšímu chování buněk, jako je šíření, migrace a diferenciaci. Po buněčné adhezi následuje vytvoření pevných spojů mezi buňkami a tkáňovým nosičem prostřednictvím vazby integrinů s adsorbovanými proteiny na povrchu biomateriálu [27]. Cytoplasmatická doména integrinu se váže na talin, následně na vinculin. Prostřednictvím vazby s  $\alpha$ -aktininem je vinculin spojen s aktinovými vlákny, která jsou propojená s jádrem buňky. Po vytvoření pevné vazby mezi adhezními proteiny a integrinovými receptory dochází k takzvané „fokální adhezi“. Kromě funkce kotvy buňky s okolním prostředím slouží fokální adheze k přenosu signálu

oběma směry. K signalizačním molekulám patří kinázy, jako například fokální adhezní kináza (FAK), vázaná na integrin kináza (ILK), mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK). Tyto kinázy mohou regulovat přežití, růst, morfologii, pohyb a diferenciaci buněk v reakci na nové prostředí po kontaktu s biomateriálem [53, 54, 57].

Sledování interakcí mezi buňkami a biomateriály hraje významnou roli v proliferaci a diferenciaci buněk v rámci skeletu. Aby došlo k úspěšné adsorpci proteinů a adhezi buněk na povrch scaffoldu musí biomateriál splňovat určité vlastnosti [16].

## 4.1 Vliv povrchových vlastností biomateriálu na buněčnou odezvu

Povrchové charakteristiky hrají důležitou roli v rozsahu buněčné adheze a proliferace na povrchu scaffoldu [2]. Důležitými parametry určující povrchové vlastnosti je topografie, smáčivost, drsnost, vzorkování a náboj [60]. Manipulací s povrchovými vlastnostmi implantátů lze řízeně ovlivnit počáteční připojení buněk [61].

### 4.1.1 Hydrofilita a hydrofobicita

Smáčivost povrchu (hydrofilita/hydrofobicita) je jedním z parametrů, které ovlivňují biologickou odezvu biomateriálu [60]. Smáčivost povrchů je určena interakcí pevné látky a kapaliny: ty závisí na takzvaném kontaktním úhlu  $\theta$  na styčné ploše. Čím je kontaktní úhel menší, tím je povrch materiálu více hydrofilní. Se zvětšujícím se kontaktním úhlem se zvyšuje i hydrofobicita povrchu materiálu [62]. Pokud je kontaktní úhel  $\theta$  menší než  $90^\circ$ , jedná se o povrch s hydrofilními vlastnostmi. Pokud je tento úhel větší než  $90^\circ$ , povrch je považován za hydrofobní. Super-hydrofilní povrchy se vyznačují kontaktním úhlem  $\theta$  blízko  $0^\circ$ . Naopak super-hydrofobní povrchy mají kontaktní úhel  $\theta$  větší než  $150^\circ$ .

Smáčivost povrchu ovlivňuje adsorpci proteinů a buněčnou adhezi na povrch biomateriálu, které jsou vyšší u hydrofilních povrchů [60, 63]. Hydrofilní povrchy vážou adhezní proteiny, které podporují buněčnou adhezi [63]. Jestliže je materiál příliš hydrofobní proteiny zprostředkovávající buněčnou adhezi jsou na povrch vázány v denaturovaném a rigidním stavu. Proto specifické aminokyselinové sekvence v jeho molekule jsou pro tyto receptory buď nedostupné, nebo dostupné pouze omezeně [58]. Studie Wei et al., 2007 se zaměřila na vliv stupně smáčivosti povrchu biomateriálu na adhezi fibroblastů. S využitím hexamethyldisiloxanových scaffoldů bylo vytvořeno několik povrchů se širokým rozsahem smáčivosti od  $106^\circ$  (hydrofobicita) až po téměř  $0^\circ$  (superhydrofilita). Hydrofilní povrchy se

vykazovaly větším šířením fibroblastových buněk ve srovnání s hydrofobními povrchy. Významný rozdíl v proliferaci buněk v reakci na hydrofobní a hydrofilní povrch nebyl prokázán. Tato studie rovněž uvádí, že stupeň smáčivosti povrchu má vliv na adsorbci různých typů adhezních proteinů. Například fibronectinový protein lépe adsorboval na hydrofilních površích, zatímco albumin byl lépe adsorbován na hydrofobních površích [61].

Optimální buněčná adheze je na mírně hydrofilních površích. Vysoce hydrofilní povrch omezuje nebo zcela znemožňuje přichycení a následnou proliferaci buněk, jelikož adhezní proteiny jsou na tyto povrchy navázány relativně slabými silami. V pozdějších kultivačních intervalech může dojít k příliš vysoké adsorbci buněk vedoucí k oddělení adhezních proteinů společně s buněčnou kulturou [58]. Shin et al., 2008, pozorovali nejvyšší přilnavost a životaschopnost lidských MSC na polyethylenových (PE) lešeních se středně smáčitelnými povrchy (kontaktní úhly kolem  $57^\circ$  nebo  $65^\circ$ ) ve srovnání s PE lešením s hydrofilními nebo hydrofobními povrchy (kontaktní úhly  $48^\circ$  a  $97^\circ$ , v tomto pořadí). Kromě toho MSC odhalily zploštělou a zaoblenou morfologii na hydrofilních a hydrofobních površích [61].

Některé biomateriály používané v TI a medicíně mohou mít příliš hydrofobní charakter, a proto nemohou zajistit dostatečnou buněčnou kolonizaci. Takové povrchy lze proto učinit hydrofilnějšími za pomoci fyzikálních metod, jako je například ozáření ionty, plazmou nebo ultrafialovým světlem. Dále je možné povrch upravit chemickými způsoby, co zahrnuje leptání povrchu za použití kyselin a hydroxidů [58].

#### 4.1.2 Povrchový náboj

Povrchový náboj může regulovat adsorbci proteinu a přímo ovlivňovat vazbu integrinu, čímž moduluje buněčnou adhezi [55, 62]. Povrchy materiálu mohou mít neutrální, kladný nebo záporný náboj. Toho je dosaženo pomocí různých mechanismů, jako je adsorpce iontů (přítomnost iontové složky v médiu), disociace povrchových chemických skupin nebo účinkem vnějšího elektrického pole ve vodných roztocích [61]. Stejně náboje mají tendenci se odpuzovat. Proto je na povrch biomateriálu zvýšená adsorpce molekul a iontů s opačným nábojem [64].

Současná literatura naznačuje, že kladně nabitě povrchy materiálu zvyšují buněčnou adsorbci díky elektrostatickým interakcím s negativním nábojem buněčné membrány [61]. Například dle Dos Santos et al., 2017, gely 2-hydroxyethylmethakrylátu s pozitivním

povrchovým nábojem podporují lepší adhezi a šíření fibroblastů a osteoblastů ve srovnání s negativními nebo neutrálními náboji [60].

Důležitá je rovněž hustota náboje. Se zvyšující se hustotou náboje, je pozorována lepší buněčná adheze, afinita, diferenciací a proliferace [55, 65]. Konečné účinky povrchového náboje na buněčné odpovědi závisí na složení biomateriálu, typu buněk a tkáňovém mikroprostředí [61].

### 4.1.3 Topografie

Topografie povrchu materiálu je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím chování buněk [62]. Nejdůležitějším aspektem topografie povrchu je drsnost, která udává texturu povrchu materiálu [61].

#### 4.1.3.1 Drsnost

Drsnost je určena povrchovými výstupky nebo prohlubní materiálu [61]. Různé kontaktní plochy hladkého a drsného povrchu s molekulami a buňkami modulují biologickou odezvu tkání v kontaktu s implantátem, poskytnutím podnětů pro buněčnou adhezi, orientaci, migraci a produkce ECM [60, 62, 66]. Adheze buněk je dle buněčného typu závislá na různé drsnosti. Například osteoblastové buňky preferují drsnější povrch, periodontální fibroblastové buňky se lépe přichytí k hladším povrchům a epiteliální buňky přilnou k hladkým povrchům [61].

Drsnost povrchu lze rozdělit do několika různých stupňů: makroskopická (nerovnost dosahuje rozměrů 100  $\mu\text{m}$  – 1 mm a více), mikroskopická (100 nm – 100  $\mu\text{m}$ ) a nanometrová (méně než 100 nm) [56, 66]. Makroskopická drsnost je vhodná pro upevnění implantátu ve tkáni, jelikož má malý vliv na chování buněčné adheze. Buňky mají mezi makroskopickými nepravidelnostmi dostatek prostoru pro šíření a růst. Studie ukazují, že buňky pěstované na makro drsném povrchu jsou stimulovány k diferenciaci na základě výsledků genové exprese [55]. Například Yang et al., 2016 zjistili, že drsný povrch vede k osteogenní diferenciaci MSC exprese specifického osteogenního markeru – alkalické fosfatázy. Makrodrsná topografie je tak účinným faktorem v regeneraci kostní tkáně pro adhezi a stimulaci osteoblastů [55].

Adheze buněk na materiály s drsností v mikroměřítku není tak příznivá, jelikož plocha pro adhezi buněk je omezena reliéfem povrchu materiálu, který zahrnuje průměr, výšku a rozteč mikrotopografických znaků. Nanodrsnost je považována za nejbližší přirozené morfologii

tkání a je ideálním faktorem, který má pozitivní vliv na buněčnou adhezi, růst a zrání buněk. Například u lidských žilních endoteliálních buněk může zvýšení drsnosti povrchu biomateriálu v nanometrovém měřítku zvýšit adhezi a růst buněk [66].

#### 4.1.3.2 *Povrchový vzor*

Kromě drsnosti povrchu biomateriálu přispívají specifické topografické vzory na povrchu biomateriálu k řízení chování buněk směrem k regeneraci tkáně [42]. Biologické tkáně se vyznačují různými morfologickými rysy jako jsou vlákna, póry, sloupky nebo důlky [61]. Tyto povrchové vzory lze vytvořit v mikroměřítku nebo v nanoměřítku, přičemž každý vzor ovlivňuje chování buněk označované jako „kontaktní vedení“ [42, 61, 66]. Mikrovzorkování povrchu ovlivňuje polohu buňky, růst, morfologii a reorganizaci cytoskeletu. Nanovzorkování povrchu může zvýšit povrchovou energii a ovlivnit adsorpci proteinů, migraci buněk, šíření, proliferaci, expresi genů a případně tkáňové integrace s implantátem [61].

Povrchové vzory mohou být orientovány v jednom směru nebo jako geometrické útvary bez jakékoli zjevné symetrie [67]. Z hlediska symetrie jsou povrchové vzory klasifikovány jako anizotropní a izotropní. Anizotropní povrchový vzor označuje směrově závislé a systematicky orientované vzory jako drážky nebo hřebeny. Izotropní povrch nemá směrovou orientaci vzoru a obsahuje topografické vzory jako jsou sloupy, výstupky, výběžky, důlky a kruhové, čtvercové, trojúhelníkové tvary [61]. V regenerativní medicíně mohou být povrchy anizotropních biomateriálů preferovány pro vývoj konstruktů TI [67]. Geometrická orientace vzoru v jednom směru představuje morfologii a funkci více připomínající nativní tkáň ve srovnání s jejich izotropními protějšky [47]. Většina tkání v organismu má určitý stupeň anizotropie, jelikož mají strukturu založenou na kolagenových vláknech systematicky orientovaných v jednom směru (tkáň myokardu, svalů, krevních cév, kostní tkáně). Schopnost napodobit tyto anizotropní vlastnosti má prvořadý význam v oblasti TI díky schopnosti modulace buněčné adheze, diferenciaci a proliferaci [68]. Důležitost zarovnání buněk a ECM na vzorovaných površích v tkáňovém inženýrství byla prokázána u mnoha různých typů buněk, jako jsou osteoblasty, srdeční buňky, růst neuritů, svalové buňky, epitelální buňky rohovky, fibroblasty, a vaskulární buňky [69].

SC reagují a přizpůsobují se orientované struktuře prostřednictvím kontaktního vedení. To odkazuje vnímání buněk k dobře definované geometrii ECM, která následně řídí jejich tvar, pohyblivost a diferenciaci [47]. Například v srdečním TI, s vysoce organizovaným



nativním ECM a buněčným uspořádáním, vyžadují materiály pro TI správnou orientaci nasazených buněk a produkované ECM. Různé studie prokázaly účinnost povrchového vzorování při vývoji biomateriálů pro svalovou a kardiovaskulární regeneraci. Konkrétně bylo prokázáno, že 3D tištěný želatinový hydrogel obsahující mikrokanálky podporuje zarovnání lidských MSC a diferenciaci na kardiomyocyty spolu se spontánními a synchronizovanými kontrakcemi. Zejména mikrokanály způsobily zvýšení sarkomer (základní funkční a strukturální jednotka myofibril) v kardiomyocytech a v kombinaci s vodivým poly(pyrrolem) vykazovaly známky elektrické vazby mezi buňkami [42].

Kromě orientované struktury má na diferenciaci SC do určitého buněčného typu vliv výška, měřítko a geometrie povrchových vzorů. Ukázalo se například, že výška nanoprvků je relevantní při indukci diferenciaci SC. Studie Song et al., 2016 uvádí, že 560 nm vysoké topografické hřebeny zvyšují diferenciaci pluripotentních kmenových buněk na neurony [70]. Studie Abagnale et al., 2015 se zaměřila na vliv mikrovzorů na *in vitro* diferenciaci MSC na různých drážkových/hřebenových strukturách. Výsledek studie prokázal, že tyto struktury ovlivňovaly šíření buněk a orientaci lidských MSC, což se projevilo i ve fokálních adhezích, morfologii a velikosti. Celkově povrchové vzory jasně zvýšily diferenciaci MSC směrem ke specifickým liniím: 15  $\mu\text{m}$  hřebeny zvýšily adipogenní diferenciaci, zatímco 2  $\mu\text{m}$  hřebeny zvýšily osteogenní diferenciaci. Nano-vzory s periodicitou 650 nm zvýšily diferenciaci směrem k osteogenním i adipogenním liniím [71]. Dále Yang et al., 2014 prokázali, že kombinace nanopórů a mikrodrážek byla schopna vyvolat diferenciaci nervových buněk do neuronů [42].

## 4.2 Vliv geometrie biomateriálu na buněčnou odezvu

Spolu s povrchovými vlastnostmi biomateriálu je geometrické uspořádání struktury další vlastností, která podmiňuje buněčné chování a následnou regeneraci tkáně [19, 42]. Geometrie biomateriálu určuje mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti materiálu, jako je propustnost a proudění tekutiny skrz biomateriál a ovlivňuje zadržování buněk v rámci lešení. Správný výběr geometrie scaffoldu je velmi důležitý při napodobení struktury a funkce přirozené ECM [61, 72].

### 4.2.1 Trojrozměrná struktura

Obecně jsou typy buněčných kultur vysvětlovány jako 2D nebo 3D buněčné kultury z hlediska rozměru buněčného růstu. Rozdíly v buněčné funkci 2D a 3D přístupů jsou dány způsobem, jak buňky reagují na své mikroprostředí. 2D buněčný růst na rovinném povrchu



kultivačních láhví se jeví jako monovrstva, a obvykle zahrnuje jeden typ buněk. Jedna část buněk je ukotvena se substrátem a zbývající část buněk je vystavena kultivačnímu médiu. Kromě toho je kontakt se sousedními buňkami omezen pouze na adhezní plochu, kterou navzájem sdílejí. Z toho důvodu se 2D modely buněčného růstu používají zejména ve výzkumu pro jednodušší pozorování buněk [59]. Klasické 2D buněčné kultury nenapodobují přirozené prostředí tkání, kde buňky adherují, proliferují a diferencují ve složitých 3D mikroprostředích [59, 73].

Scaffoldy jsou důležitým nástrojem pro poskytování 3D prostředí buňkám, jak *in vitro*, tak *in vivo*. Tyto trojrozměrné struktury poskytují ideální platformu pro komunikaci buňka-buňka a buňka-materiál [59].

#### 4.2.2 Porézní struktura

Poréznost, propojení pórů a velikost pórů jsou velmi důležitými parametry biomateriálů. Všechny tři vlastnosti umožňují buněčnou penetraci, vaskularizaci, adekvátní difuzi živin a kyslíku do buněk v rámci konstruktů [16, 19, 28, 56]. Poréznost znamená procento objemu dutin v materiálech [62]. Rozsah poréznosti závisí na typu použitého biomateriálu a na tom, zda zvýšení poréznosti může vést ke snížení mechanických vlastností [74].

Nejběžněji se ke tvorbě porézní struktury biomateriálů používají následující techniky: plynové plnění, louhování solí, separace fází, slinování a lyofilizace [28].

Dle velikosti se póry dělí na makropóry (>50  $\mu\text{m}$ ) a mikropóry (<50 nm). Velikost pórů je klíčový prvek pro účinnost buněčné penetrace a migrace do struktury biomateriálu. Makro a mikro architektura pórů skeletu kriticky ovlivňuje přežití buněk a povrchovou adhezi, ale také buněčnou proliferaci, diferenciaci a expresi specifických genů [28]. Makropóry jsou schopny určovat buněčný růst a kolonizaci, zatímco mikropóry buněčnou adhezi a resorbovatelnost biomateriálu kontrolovatelnou rychlostí [61]. Pokud jsou póry struktury příliš malé, dochází k omezení buněčné penetrace do scaffoldu. Velké póry umožňují snadnější migraci a rovnoměrnou distribuci buněk ve struktuře biomateriálu [75]. Nadměrná velikost pórů může snižovat kontaktní poměr mezi buňkami a podporovat tak buněčný růst ve 2D organizaci namísto 3D [76].

Konstrukty se správnou porézností a homogenními propojenými póry prokázaly slibné výsledky pro účely TERM. Porézní síť v lešení může napodobovat nativní architekturu ECM umožňující buňkám interakci s jejich mikroprostředím. Je třeba poznamenat, že velikost pórů a geometrie se v lidských tkáních liší. Z toho důvodu by pórovitost a architektura pórů

měly být navrženy na základě cílových tkání a anatomických míst [61]. Například bylo zjištěno, že póry o velikosti 200–400  $\mu\text{m}$  jsou účinné pro tvorbu kostní tkáně [28]. Studie Kuboki et al., 2009 se zabývala vlivem velikostí pórů za účelem tvorby kostní tkáně s pomocí hydroxyapatitových skeletů s kostními morfogenetickými proteiny. Póry s menším průměrem než 90 – 120  $\mu\text{m}$  indukovaly tvorbu chrupavky s následnou tvorbou kostí tkáně, zatím co póry s průměrem 350  $\mu\text{m}$  indukovaly přímou tvorbu kosti [76, 77]. Póry o velikosti 50–200  $\mu\text{m}$  jsou vhodné pro růst buněk hladkého svalstva. Lešení s velikostí pórů mezi 10–44 a 44–75  $\mu\text{m}$  umožňují akomodaci pouze vazivové tkáně. Velikost pórů potřebná pro indukci regenerace dermis a periférních nervů je 20–120  $\mu\text{m}$  a 5–10  $\mu\text{m}$  [76].

### 4.3 Vliv mechanických vlastností biomateriálu na buněčnou odezvu

Mechanické vlastnosti biomateriálů jsou velmi důležité pro aplikaci v klinické praxi při regeneraci tkáně. Ovlivňují degradabilitu biomateriálu a jeho interakci s buňkami, co v konečném důsledku určuje reparační efekt biomateriálu [78]. Mechanické vlastnosti by měly být přizpůsobeny aplikaci pro kterou je biomateriál navrhován [16]. V ideálním případě by pro úspěšnou regeneraci tkáně měly být shodné nebo příbuzné s vlastnostmi tkáně v místě implantace [16, 19, 32]. Z praktického hlediska je vhodné, aby byl materiál dostatečně pevný pro umožnění chirurgické manipulace během implantace [19].

Mechanické vlastnosti určují odezvu biomateriálu za různých silových podmínek, které jsou charakterizovány napětím a deformacemi v materiálu, které jsou výsledkem posunů v defektech. Biomateriál s nedostatečnými mechanickými vlastnostmi nemůže poskytnout dostatečnou mechanickou podporu. Informace o mechanických vlastnostech biomateriálu, jako je modul pružnosti nebo mez kluzu, získáme pomocí mechanických zkoušek (zkouška tahem, kompresní test, stres-relaxace nebo namáhání materiálu). Výsledky měření poskytují informace o tuhosti, deformovatelnosti a pevnosti materiálu [16, 78].

#### 4.3.1 Tuhost povrchu

Tuhost udává schopnost materiálu odolávat deformaci způsobené vnější silou a je nepostradatelnou součástí mechanických vlastností ECM a syntetických biomateriálů [47]. Tuhé materiály se používají v aplikacích, kde je nutné, aby si zachovaly svou mechanickou funkci a nedošlo k jejich opotřebení. Tyto biomateriály jsou například používané jako nosné protézy kyčlí a kolen. U takových defektů tkání, kde není kritickou vlastností nosnost nemusí

být biomateriály tak pevné. V tomto případě jsou vhodnými kandidáty biomateriály, které podléhají degradaci [41].

Funkční tkáně mají pozoruhodně rozdílnou tuhost, od nejměkčí mozkové tkáně po nejtvrďší kost. [47]. Adheze, proliferace a diferenciací buněk do určité míry závisí na tuhosti substrátu. Kromě toho jsou buňky schopny modulovat povrch biomateriálu na rozhraní mezi tkání a implantátem a měnit tak tuhost svého vlastního nebo jiného buněčného mikroprostředí.

Některé studie naznačují, že v neuronální regeneraci počáteční měkký substrát podporuje axonální elongaci. Následné vytvrzení matrice může podpořit růst více primárních dendritů neuronů, a tím posílit synaptogenezi. Na druhou stranu měkké substráty mohou modifikovat buněčnou morfologii a inhibovat proliferaci SC [55, 62]. Například zvýšení mechanické tuhosti matrice hedvábného fibroinu podporuje lidské embryonální mezenchymální SC (hEMC) k diferenciaci do osteogenní linie [79].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍLE PRÁCE

- Cytotoxicita PLA extraktu na myší embryonální fibroblastové buňky NIH/3T3
- Cytotoxicita PLA extraktu na myší embryonální kmenové buňky ES R1
- Vyhodnocení vlivu topografie povrchu na proliferaci buněčné linie NIH/3T3
- Vyhodnocení vlivu topografie povrchu na proliferaci buněčné linie ES R1

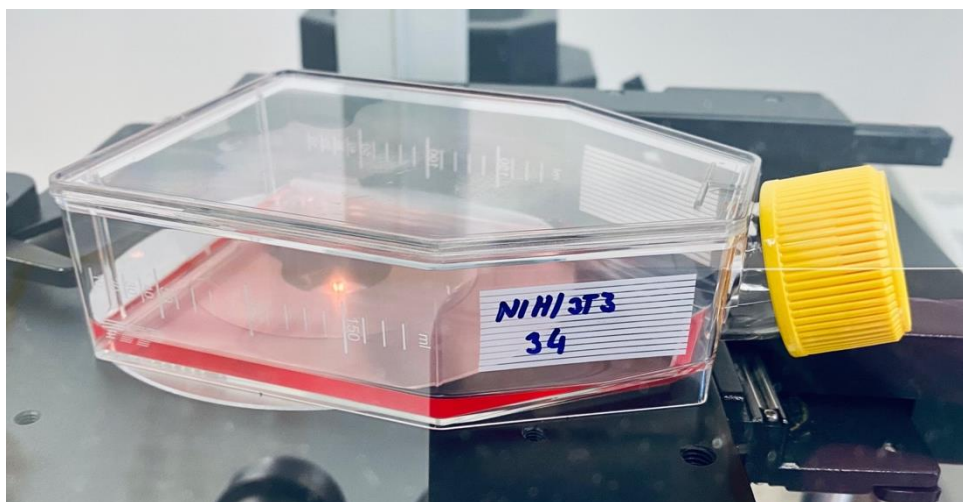
## 6 MATERIÁLY A METODY

### 6.1 Biologický materiál

Pro experiment v rámci diplomové práce byly použity dvě buněčné linie – myší embryonální fibroblastové buňky NIH/3T3 a myší embryonální kmenové buňky ES-R1.

#### 6.1.1 Myší fibroblasty

Buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) byla získaná od American Type Culture Collection, ATCC. Kultivace probíhala v DMEM kultivačním médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher Scientific, USA) s přidavkem 10 % Calf séra (BCS, Biosera, Francie) a 1 % antibiotik penicilin – streptomycin (Biosera, Francie). NIH/3T3 buněčná linie je adherentní a byla kultivovaná v T75 kultivačních láhvích (TPP Trasadigen, Švýcarsko) v inkubátoru Heracell 150i (ThermoFisher Scientific, USA) při teplotě 37 °C, 95 % vlhkosti a 5 % CO<sub>2</sub> atmosféře.



**Obrázek 3** Kultivační láhev s NIH/3T3 buněčnou linií.

#### 6.1.2 Kmenové buňky

Myší embryonální kmenové buňky (ES-R1) byly kultivovány na petriho miskách pro tkáňové kultury. Kultivace kmenových buněk probíhá standardně na tkáňovém plastiku potaženém 0,1 % želatinou pro zlepšení adheze. Pro kultivaci bylo použito kompletní médium obsahující DMEM, 15 % fetálního telecího séra, 1 U ml<sup>-1</sup> penicilinu, 0,1 mg/ml streptomycinu a 100 mM roztok neesenciálních aminokyselin (vše od Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 0,05 mM 2-merkptoethanolu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 1000 U ml<sup>-1</sup> LIF (Gibco, MA, USA) [80].

## 6.2 Struktura polylaktidu

Testované vzorky PLA byly připraveny na Ústavu polymerů SAV, Slovenská akademie věd, díky spolupráci výzkumné skupiny Biomateriály na Centru polymerních systémů ve Zlíně s Mgr. Zdenkem Špitálským, PhD.

Kyselina polymléčná neboli polylaktid (PLA) je biologicky odbouratelný polymer kyseliny mléčné. Získává se z kyseliny mléčné a degraduje se procesem hydrolyzy. Kyselina mléčná (LA) je přírodní organická kyselina, kterou lze vyrobit fermentací cukrů získaných z obnovitelných zdrojů, jako je kukuřice a cukrová třtina. PLA je tedy ekologický netoxický polymer a byl schválen FDA pro implantaci do lidského těla. Díky svým vlastnostem se jeví jako důležitý polymerní materiál pro biomedicínské aplikace, jako je biokompatibilita, biologická rozložitelnost, mechanická pevnost a zpracovatelnost. Přestože má PLA široké spektrum aplikací, existují určitá omezení, jako je pomalá rychlost degradace, hydrofobnost a nízká rázová houževnatost spojená s jeho použitím.

Použití PLA ve směsi s jinými polymery nabízí vhodné možnosti pro zlepšení souvisejících vlastností nebo pro vytvoření nových PLA polymerů/směsí pro cílové aplikace, jako je podávání léků, implantáty, stehy a TI. PLA a jeho kopolymery se stávají široce používané v TI pro obnovu funkcí poškozených tkání díky jejich vynikající biokompatibilitě a mechanickým vlastnostem. Míchání PLA s jinými přírodními nebo syntetickými polymery s lepší smáčitelností a rychlejší degradací poskytuje účinný prostředek k vyladění její biologické rozložitelnosti tak, aby byla kompatibilní s dobou potřebnou k růstu a/nebo regeneraci tkáně. PLA tak může být smíchán s různými polymery pro modifikaci tkáňově specifických scaffoldů [81]. Ghosal et al., 2019 ve své práci vytvořili kolagen/PLA kopolymer, který má potenciál jako scaffold pro TI chrupavky díky jeho vysoké poréznosti a propojení pórů, dobré absorpci vody a penetraci chondrocytů a zlepšení mechanické pevnosti ve srovnání s jednoduchými kolagenovými scaffoldy [82]. Další studie (Scaffaro et al., 2016) uvádí, že scaffold na bázi PLA/PEG představuje zajímavé biomedicínské aplikace, zejména týkající se oblasti regenerace kostí. [83]. Bylo prokázáno, že PEG zlepšuje porézní strukturu změnou distribuce velikosti pórů, co vede ke zvětšení velikosti pórů bez zvýšení celkové pórovitosti. Kromě toho PLA scaffoldy s PEG podporují metabolickou aktivitu v průběhu času, co ukazuje na zvýšení proliferace buněk v porovnání se samotným PLA. [84]. Zhang et al., 2016, vyrobili kompozitní lešení PLA/hydroxyapatit pomocí 3D tisku a vyhodnotili jejich schopnost opravy kostí a zánět. Tyto 3D scaffoldy vykazovaly

dobrou biokompatibilitu, bioaktivitu a osteoinduktivní aktivitu s malou zánětlivou reakcí, což dokazuje jejich slibnou kandidaturu na opravu kostních defektů [81].



Obrázek 4 Struktura polylaktidu.

## 6.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 6.3.1 Test cytotoxicity – MTT test

Test MTT se používá k měření buněčné metabolické aktivity jako indikátoru buněčné životaschopnosti. Tento kolorimetrický test je založen na redukci žluté tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid na purpurové krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami. Životaschopné buňky jsou schopny aktivním metabolismem převést MTT na purpurově zbarvený formazanový produkt s maximem absorbance blízko 570 nm. Když nastane buněčná smrt v důsledku vystavení vyšším koncentracím toxické látky, ztrácejí buňky schopnost přeměnit MTT na formazan. Redukce MTT na formazan je katalyzována mitochondriální dehydrogenázou v dýchacím řetězci. Množství formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk. Čím je roztok tmavší, tím větší je počet životaschopných, metabolicky aktivních buněk. Tvorba formazanu tak slouží jako užitečný a vhodný marker životaschopnosti buněk [85].

Cytotoxicita materiálu byla stanovena *in vitro* dle normy ČSN EN ISO 10993. Samotný test cytotoxicity *in vitro* byl proveden v souladu s 5. částí normy ČSN EN ISO 10993, tedy



ISO 10993–5:2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*.

*Příprava mikrotitračních destiček:* Denzita buněk byla v případě buněčné linie NIH/3T3  $1 \times 10^5$  buněk/ml a v případě buněčné linie ES R1  $1,5 \times 10^3$  buněk/cm<sup>2</sup>. Nasazení buněk na mikrotitrační destičku bylo provedeno 24 hodin před přidáním extraktu. Nasazením buněk na mikrotitrační destičku se rozumí pasážování buněčné linie, naředění suspenze na příslušnou koncentraci, napipetování 100  $\mu$ l suspenze do každé jamky 96 jamkové destičky a inkubace 24 hodin.

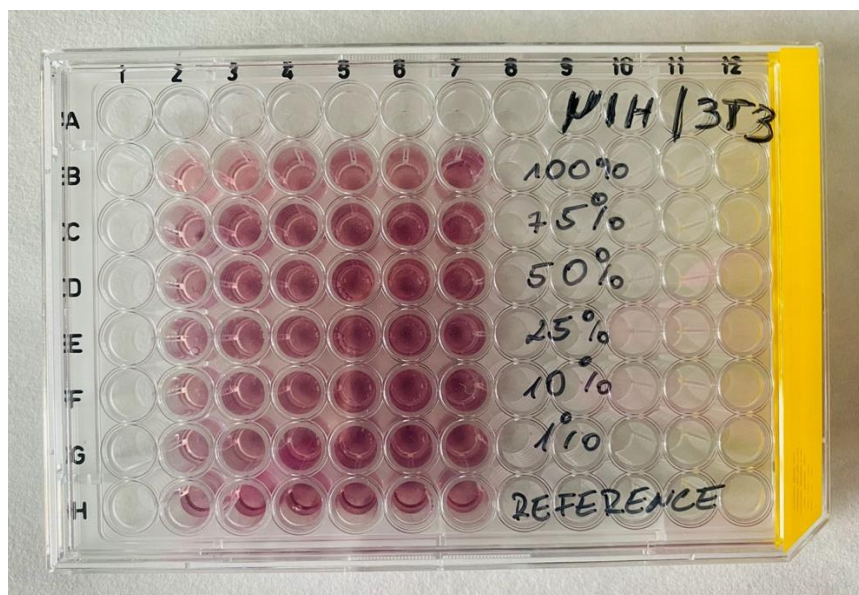
*Příprava extraktu:* Před testem byla provedena extrakce materiálu podle části 12 této normy, tedy ČSN EN ISO 10993-12:2021 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály. Extrakční podmínky u této zkoušky jsou založeny na základě standardizovaného přístupu, který je v mnoha ohledech vhodným v rámci použití produktu. Přijatelná extrakce materiálu pro test cytotoxicity je 24 hodin při  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$  v kultivačním médiu. Vyšší extrakční teplota, než  $37^\circ \text{C}$  může nepříznivě ovlivnit chemii nebo stabilitu složek kultivačního média včetně séra. Testovaný materiál PLA struktury spadá do kategorie „nepravidelné tvarované pevné prostředky“, proto byl zvolen extrakční poměr 0,2 g/ml viz tabulka 1 [86].

**Tabulka 1** Standardní plochy povrchu a objemy extrakčního média dle ISO 10993-12.

Tloušťka [mm]	Extrakční poměr (plocha povrchu nebo hmotnost/objem) $\pm 10\%$	Formy materiálu
<0,5	6 cm <sup>2</sup> /ml	film, fólie, stěna hadičky
0,5 až 1,0	3 cm <sup>2</sup> /ml	stěna hadičky, plátek, malé tvarované předměty
>1,0	1,25 cm <sup>2</sup> /ml	velký(-é) tvarovaný(-é) předmět(-y)
nepravidelné tvarované pevné prostředky	0,2 g/ml	prášek, palety, pěna, neabsorbující části, předměty vyrobené vstříkáním
nepravidelné tvarované porézní prostředky (materiály o nízké hustotě)	0,1 g/ml	membrány

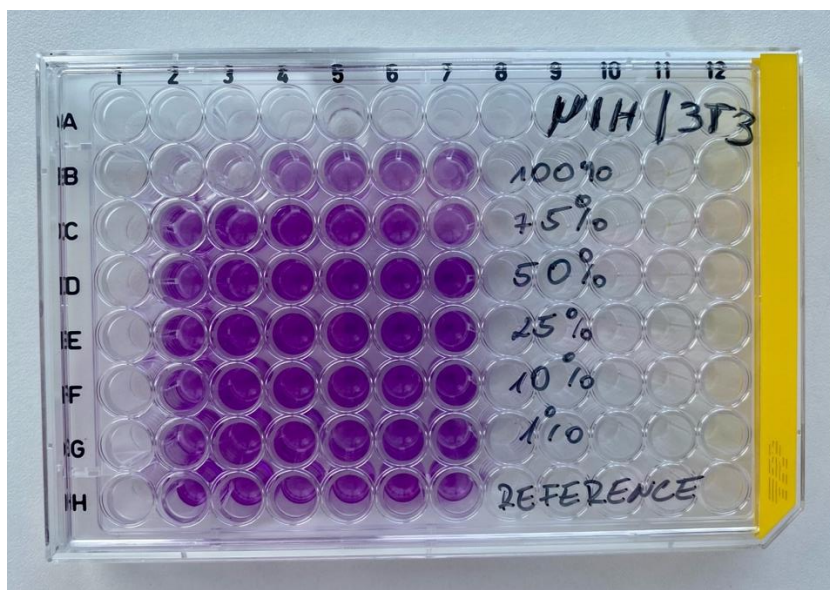
Před samotnou extrakcí byl vzorek PLA nastříhán na drobné kousky, aby došlo ke zlepšení kontaktu materiálu s kultivačním médiem. Extrakce 24 hodin při  $37^\circ \text{C}$  za stálého třepání. Po 24 hodinách byl extrakt materiálu přefiltrován přes 0,22  $\mu$ m filtr Milex GV (Merck, Darmstadt, Německo) pro zajištění sterility. Původní 100 % extrakt byl naředěn na

sérii ředění kompletním médiem. Extrakty byly připraveny v jednotlivých koncentracích 100, 75, 50, 25, 10 a 1 % přidány k předkultivovaným buňkám na 96 jamkové mikrotitrační destičce s příslušnou buněčnou linií, přičemž celkový obsah roztoku byl 100  $\mu$ l/jamku.



**Obrázek 5** Ukázka mikrotitrační destičky po přidání MTT. Fialové zabarvení je spojeno s tvorbou krystalků formazanu.

*Přidání MTT:* Po 24 hodinové kultivaci buněk v přítomnosti extraktů bylo přidáno v konečné koncentraci 0,5  $\text{mg/ml}^{-1}$  MTT. Kultivace poté probíhala po dobu 4 hodin. Po uplynulé době kultivace byl obsah jamek odsát a následovala solubilizace krystalů formazanu 80  $\mu$ l DMSO (Sigma Aldrich, USA). Výsledek testu byl stanoven pomocí spektrofotometru M200 PRO NanoQuant (Tecan, Švýcarsko) při absorbanci 570 nm.

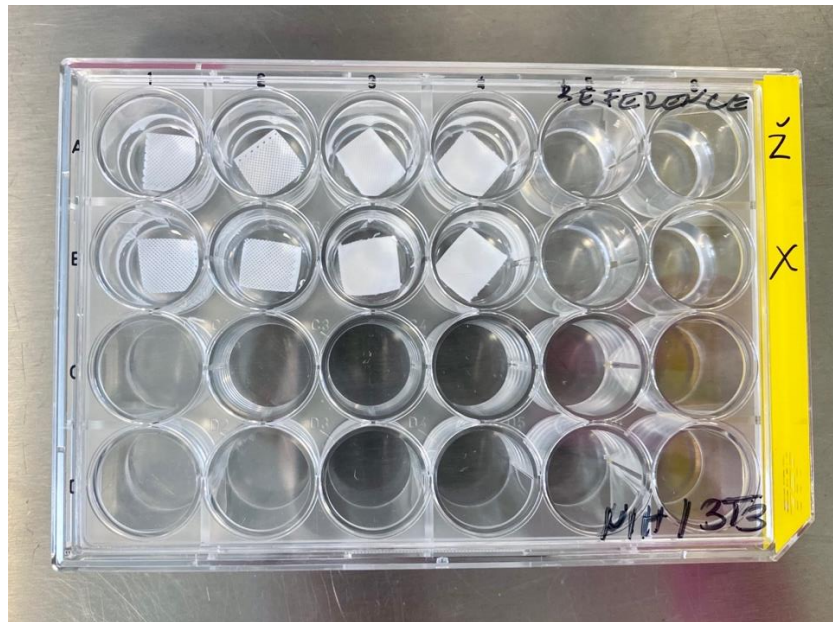


*Obrázek 6 Ukázka mikrotitrační destičky po přidání DMSO a rozpuštění formazanu.*

### 6.3.2 Test proliferace buněk na PLA

Vzorek PLA byl před vyhodnocením proliferace sterilizován po dobu 15 minut v 70 % ethanolu a pomocí UV záření po dobu 30 minut z každé strany vzorku. Následně byl materiál nařezán na 8 jednotlivých vzorků, každý o rozměru 1 cm<sup>2</sup>. Vzorky byly vloženy do 24 jamkové mikrotitrační destičky. Čtyři vzorky byly na 15 minut ošetřeny roztokem 0,1 % želatiny. Následně byla na vzorky nasazena buněčná suspenze s denzitou buněk v případě myších embryonálních fibroblastů 5 x 10<sup>5</sup> buněk/ml a v případě embryonálních kmenových buněk 4,5 x 10<sup>3</sup> buněk/cm<sup>2</sup>. Kultivace probíhala h. Po uplynulé době kultivace byla provedena fixace buněk na substrát. Fixace byla provedena odsátím média z jamek a po promytím PBS pufrem byl napipetován 1 ml 4 % formaldehydu na 15 minut. Objem jamky byl odsát a vzorky byly promyty PBS.

Následovala permeabilizace buněčné membrány 1 ml 0,5 % Tritonem X-100 po dobu 5 minut. Po uplynulé době byly vzorky 3x promyty PBS pufrem. Na závěr byla buněčná kultura nabarvena. Do 1 ml PBS pufru byla přidána 1 kapka barviva (ActinRed<sup>TM</sup> 555 v případě buněčné linie NIH/3T3 a ActinGreen<sup>TM</sup> 488 v případě buněčné linie ES R1) a 25 µl Hoechst 33258. Po 30 minutách byl PBS s barvivou odstraněn a buněčná morfologie byla pozorována pomocí konfokálního mikroskopu (Olympus).



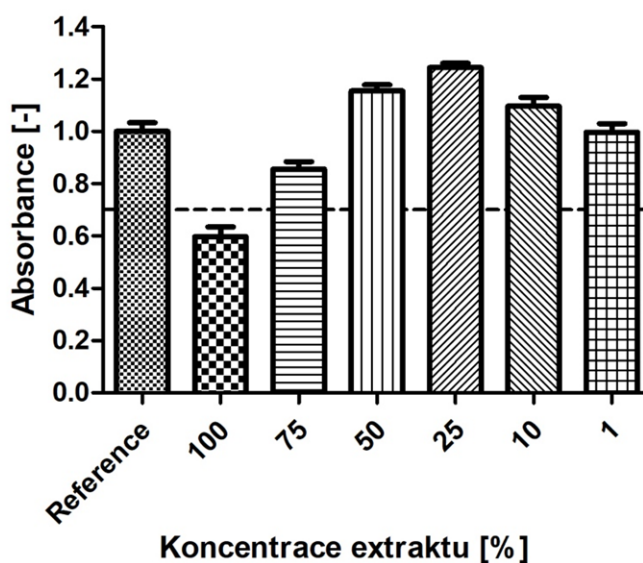
*Obrázek 7 Vzorky PLA v mikrotitrační destičce před testem proliferace.*

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Test cytotoxicity PLA extraktu

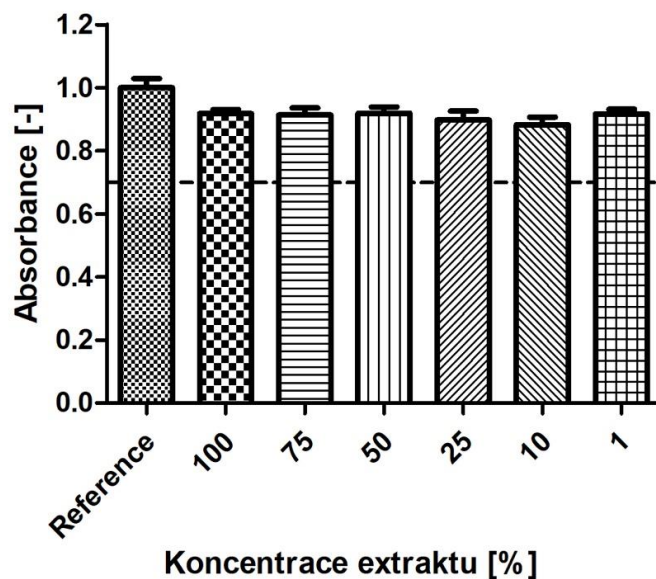
Cytotoxicita PLA byla stanovena za základě normy ČSN EN ISO 10993-5:2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Metoda je specifikována nepřímým kontaktem materiálu s buněčnou linií. Buňky byly vystaveny účinku extraktu PLA materiálu v různých koncentracích, kdy extrakt byl připraven dle normy ČSN EN ISO 10993-12:2021 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály. Buněčné linie byly vystaveny následujícím koncentracím extraktu 100, 75, 50, 25, 10 a 1 %. Pro vyhodnocení životaschopnosti buněk v souvislosti s účinkem extraktu byl použit MTT kolorimetrický test zahrnující redukci žlutého MTT barviva na fialové krystaly formazanu za pomoci aktivního metabolismu živých buněk.

Test cytotoxicity byl proveden pro obě buněčné linie – myší embryonální fibroblasty NIH/3T3 a myší embryonální kmenové buňky ES-R1. Hodnocení probíhalo za pomoci spektrofotometru s délkou absorpance 570 nm. Účinek extraktu na buňky byl porovnáván s referenčním vzorkem, kde buňky byly kultivovány s kompletním médiem bez extraktu. Podle ISO 10993-5 životaschopnost vyšší než 0,7 představuje nepřítomnost cytotoxicity, zatímco vzorky s životaschopností nižší než 0,7 jsou považovány za cytotoxické.



Obrázek 8 Životaschopnost buněk linie NIH/3T3 po expozici extraktu PLA.





*Obrázek 9 Životaschopnost buněk linie ES R1 po expozici extraktu PLA.*

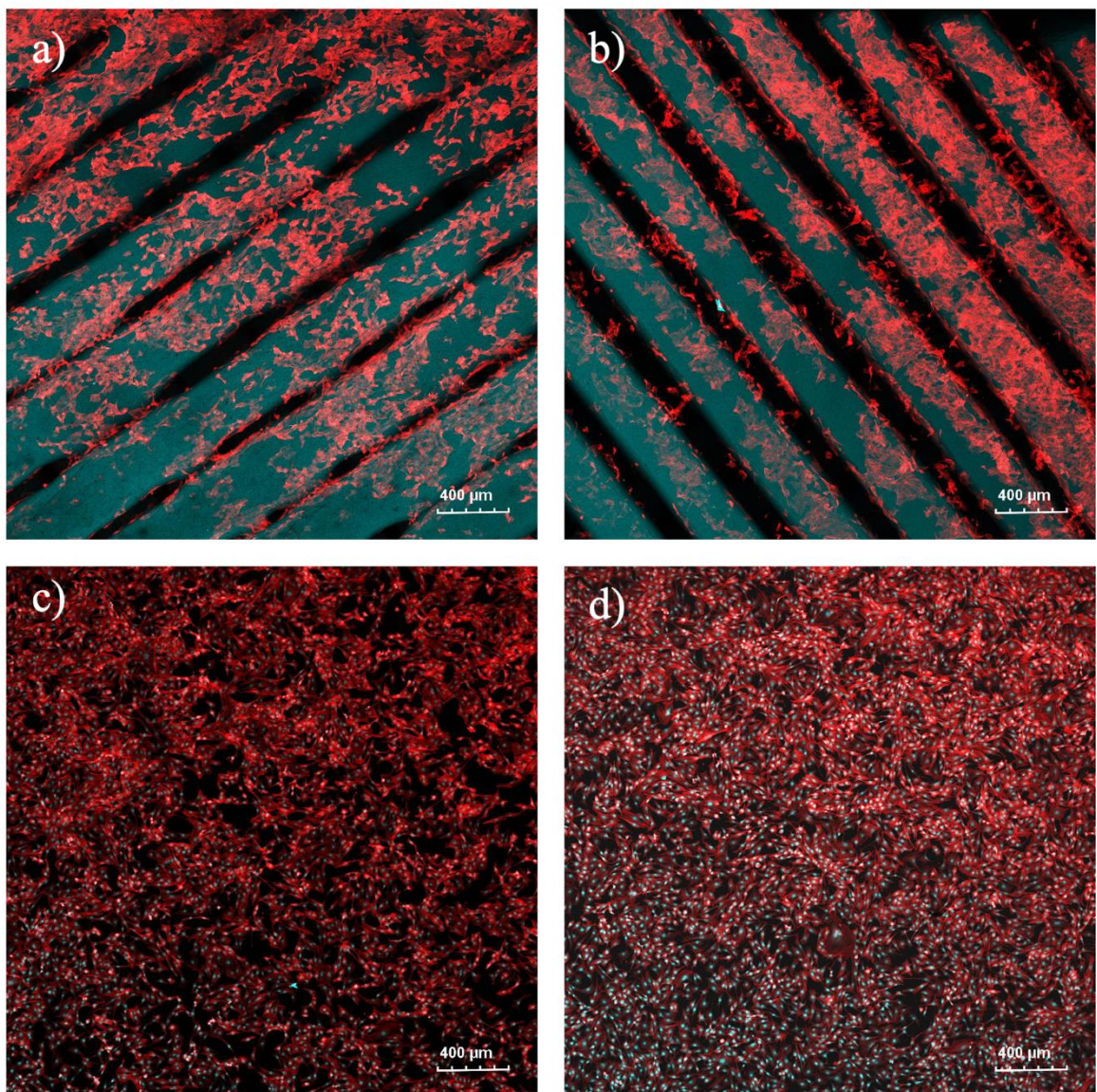
Výsledky byly zpracovány ve formě grafu, kde byla reference nastavena na relativní buněčnou viabilitu 1. Tato hodnota odpovídá 100 % buněčné životaschopnosti. Dle stupnice normy ČSN EN ISO 10993-5:2009 jsou extrakty vzorků s relativní buněčnou viabilitou vyšší než 0,7 hodnoceny jako necytotoxické.

V případě myších fibroblastových buněk buněčné linie NIH/3T3 byl v koncentraci extraktu 100 % zaznamenán cytotoxický efekt kdy byla hodnota absorbance nižší než 0,7, (Obrázek 8). U dalších koncentrací extraktu (75, 50, 25, 10, 1 %) nejsou zaznamenány žádné cytotoxické účinky. V případě linie myších embryonálních kmenových buněk ES R1 jsou hodnoty viability ve všech koncentracích vyšší než 70 % (Obrázek 9), co znamená že nebyl zaznamenán žádný toxický účinek. Obecně lze říci, že extrakt PLA není shledán jako cytotoxický.

## 7.2 Test proliferace buněk na PLA

Adheze buněk na materiál a následná proliferace *in vitro* je obecně používanou technikou ke stanovení interakce buněk s povrchem biomateriálu. Při testu proliferace jsou buňky kultivovány v přímém kontaktu s materiálem, přičemž je sledována buněčná odezva

související s povrchovými vlastnostmi materiálu. Test byl kvalitativně vyhodnocen pomocí konfokálního mikroskopu. Pro lepší zobrazení morfologie buněk byly jádra a cytoskelet předem nabarveny fluorescenčními barvami. Pro podporu adheze buněk na materiál byla před inokulací buněčné suspenze část vzorků inkubována 15 minut s želatinou. Jako referenční materiál byl použit polystyrenový tkáňový plastik, který se běžně používá pro kultivaci tkáňových kultur.

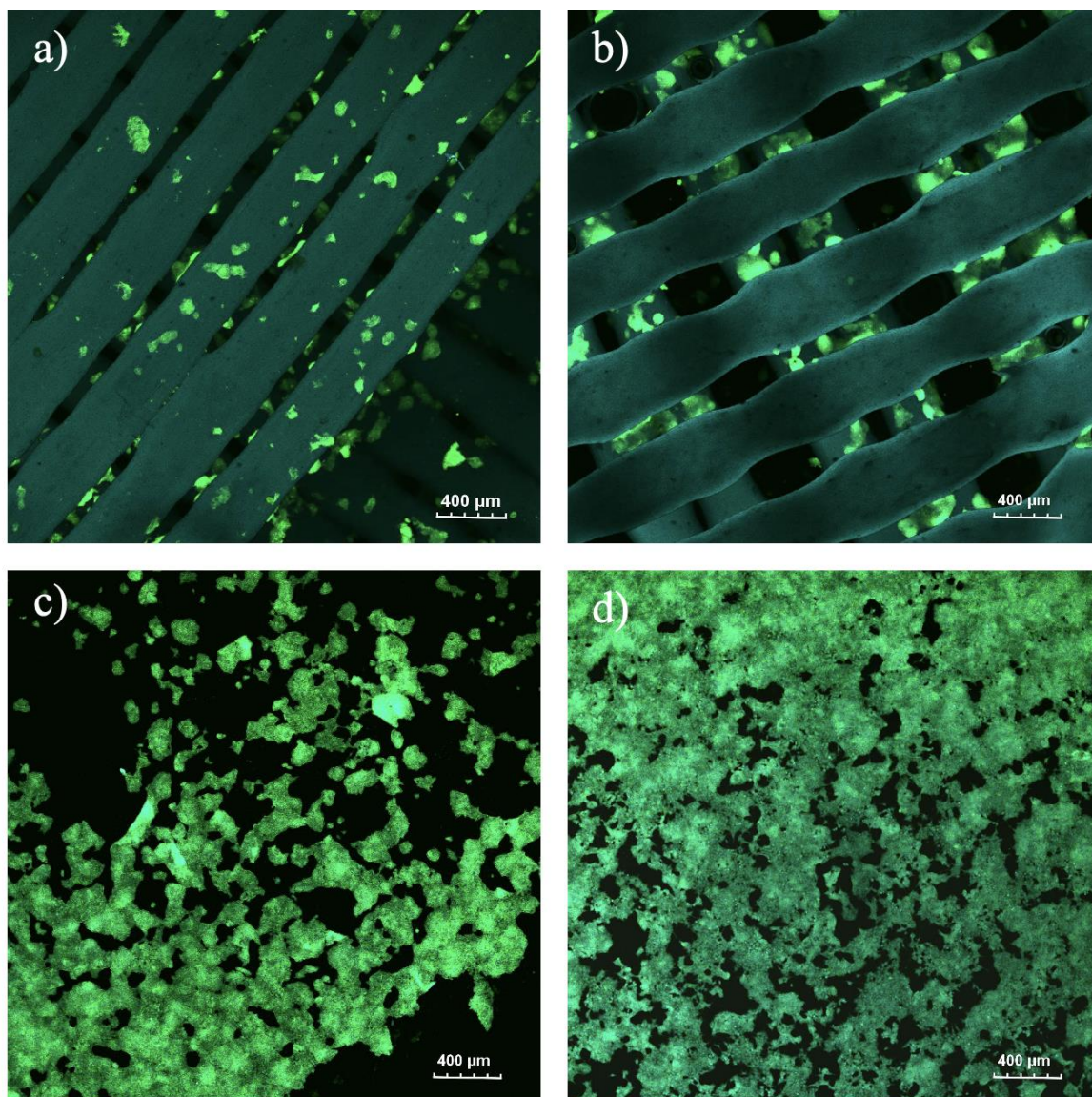


**Obrázek 10** Buněčná kultura NIH/3T3, a) PLA bez želatinou, b) PLA s želatinou, c) reference bez želatinou, d) reference s želatinou.

Na obrázku 10. jsou výsledky proliferace pro myší embryonální fibroblasty NIH/3T3. Buňky zaujímaly typický rozvětvený a hvězdicovitý tvar, co je na mikrofotografiích

znázorněno jako červeně barvené aktinové vlákna. Jádra fibroblastů jsou typicky oválného tvaru a na mikrofotografiích se jeví jako modře barvené struktury. Pro zlepšení adheze buněk byla testována i sada ošetřená 0,1 % želatinou. Porovnáme-li proliferaci na PLA s želatinou (Obrázek 10, b) a PLA bez želatiny (Obrázek 10, a), vidíme mírné zlepšení proliferace na materiálu PLA s želatinou. Viditelné jsou jednotlivé vrstvy struktury polymeru, skrze které jsou buňky schopny prorůst. Stejně tak tomu bylo v případě reference, kdy želatina podpořila proliferaci buněk. Nicméně myší embryonální fibroblasty byly schopny proliferovat jak na pokoutovaném tak nepokoutovaném PLA, což naznačuje vhodné povrchové vlastnosti materiálu pro proliferaci buněk. Referenční vzorek s a bez želatiny znázorňuje rovnoměrné rozprostření buněk na povrchu ve srovnání se vzorky PLA struktury s a bez želatiny, kde buňky nejsou na celém povrchu jednotlivých vláken, ale prorůstají nerovnoměrně do 3D struktury materiálu.





**Obrázek 11** Buněčná kultura ES-R1, a) PLA bez želatiny, b) PLA s želatinou, c) reference bez želatiny, d) reference s želatinou.

Obrázek 11. znázorňuje výsledky proliferace pro myší embryonální kmenové buňky ES R1. Kmenové buňky rostou v nediferencovaných shlucích s nepřesnými morfologickými znaky. Aktinová vlákna znázorňující cytoskelet buněk jsou na mikrofotografiích znázorněny zelenou fluorescenční barvou. Testované byly vzorky samotného PLA (Obrázek 11, a) a vzorky PLA ošetřené 0,1 % želatiny (Obrázek 11, b). Porovnáme-li proliferaci na PLA s želatinou a PLA bez želatiny lze si všimnout, vzorek PLA bez želatiny znázorňuje lepší prorůstání buněk skrze strukturu, co naznačuje, že adheze buněk na vnější vrstvě PLA materiálu s želatinou byla nižší ve srovnání s PLA bez želatiny. Naopak je viditelné mírné zvýšení počtu buněk u vzorku PLA s želatinou, co naznačuje podporu proliferace buněk díky

želatinové vrstvě. Při srovnání vzorků reference bez želatiny (Obrázek 11, c) a vzorek reference s želatinou (Obrázek 11, d) si lze všimnout, že želatina podpořila proliferaci embryonálních kmenových buněk. Mikrofotografie PLA s a bez želatiny znázorňují menší hustotu buněk v porovnání, jelikož rostou v jednotlivých vrstvách struktury, ve srovnání se vzorkem reference s a bez želatiny, kde buňky jsou rozprostřeny v jedné rovině na plochém 2D povrchu. Jednotlivé mikrofotografie vzorku PLA s a bez želatiny naznačují lepší proliferaci NIH/3T3 buněk ve srovnání s buněčnou linií ES R1, přičemž extrakt PLA neměl na žádnou z linií cytotoxický účinek. Jednotlivé buněčné linie preferují topografické struktury. Rozdíly v proliferaci mohou být dané buněčným typem, jelikož každý typ buněk preferuje jiné povrchové vlastnosti materiálu.

## 8 DISKUZE

Biomateriály se využívají jako scaffoldy ve strategiích TERM. Scaffoldy působí jako matrice pro buňky s cílem podpory tvorby nebo regenerace nové tkáně. Po implantaci do místa poškozené tkáně, dochází k buněčným odezvám na rozhraní implantovaného materiálu a okolního prostředí. Interakce buněk s biomateriálem jsou nezbytné pro přichycení adherentních buněk k povrchu a jejich souvisejících buněčných funkcí, jako je růst, diferenciaci, migrace nebo apoptóza. Buněčné odezvy na materiál jsou nezbytné pro určení biokompatibility materiálu. Aspekty vztahů polymer-buňka lze pozorovat v lidských tkáních i na zvířecích modelech. Kromě toho lze studium buněčné aktivity a buněčné komunikace pozorovat pomocí *in vitro* metod, jako jsou buněčné kulturní systémy [87, 88].

V této práci byl studován vliv povrchových vlastností na proliferaci buněk. Použitým materiálem byla hotová struktura polylaktidu (PLA). Vzorkování struktury bylo zhotoveno technikou 3 D inkoustového biotisku. Polylaktid je alifatický hydrofobní polyester, který je schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv FDA (Food and Drug Administration) a využívá se pro různé biomedicínské a klinické aplikace včetně konstruktů TI [89]. V experimentech byly použity dvě buněčné kultury. První z nich byly myší embryonální fibroblastové buňky linie NIH/3T3. Tyto buňky jsou adherentní, diferencované a mají specifický rozvětvený, hvězdicovitý tvar. Jedná se jednu z nejčastěji používaných buněčných linií pro studium řady mechanických buněčných testů, včetně funkční analýzy proteinů. Morfologie buněk je adherentní, fibroblastická a je považována za jednu z relativně snadno pěstovatelných buněčných linií. Doba zdvojení je 20-26 hodin. Druhou použitou buněčnou linií byla ES R1, přičemž se jedná o myší embryonální kmenové buňky. Buňky této linie jsou pluripotentní a mohou se diferencovat do jakéhokoliv typu somatických buněk [90]. Před provedením testu proliferace bylo nezbytné ověřit biokompatibilní vlastnosti použitého materiálu. Biokompatibilita byla hodnocena testem cytotoxicity na základě ISO normy ČSN EN ISO 10993-5:2009 – Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Vyhodnocení bylo provedeno MTT testem. PLA je FDA schváleným biomateriálem, běžně používaným v medicíně a aplikacích TI. U extraktu tohoto materiálu nebyla očekávána žádná cytotoxicita. Vyšší cytotoxický účinek extraktu byl detekován pouze u 100 % koncentrace extraktu u buněčné linie NIH/3T3. Nutné je poznamenat, že v koncentraci 50, 25 a 10 % byla hodnota viability buněk vyšší ve srovnání s referencí. Tento výsledek může naznačovat uvolňování kyseliny mléčné při degradaci PLA, která pro buňky působí jako zdroj energie a ochrana před volnými radikály. Výsledky

byly srovnány s literaturou (Morozov et al., 2020), která se zaměřuje na *in vitro* studie degradačního chování, cytotoxicity a buněčné adheze ataktické kyseliny poly(mléčné) pro biomedicínské účely. Výsledky MTT testu cytotoxicity této studie potvrzují necytotoxické účinky tohoto materiálu [91].

Test proliferace buněk byl hodnocen na základě schopnosti buněk množit se a růst na povrchu materiálu. Buněčné kultury byly kultivovány v přímém kontaktu se strukturou PLA biomateriálu. Hodnocení proběhlo kvalitativně na základě pozorování morfologie buněk. Na základě hodnocení pořízených mikrofotografií lze říci, že struktury poskytly buňkám vhodné povrchové vlastnosti pro adhezi a následnou proliferaci. Buňky fibroblastů ve srovnání s kmenovými buňkami vykazovaly lepší buněčnou adhezi na povrch biomateriálu a následnou proliferaci ve srovnání s kmenovými buňkami. Tyto výsledky proliferace buněk na PLA strukturu byly srovnány s literaturou (Farto-Vaamonde et al., 2019). Tato studie se zaměřila na využití 3D tištěných PLA scaffoldů jako nosiče léku (prednisolon a dexamethason) pro aplikace regenerace tkání. PLA materiál byl v této studii kultivován s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC). Scaffoldy poskytovaly buňkám vynikající biokompatibilitu a buňky dosáhly vysoké úrovně proliferace [92].

V experimentální části této diplomové práce byly některé vzorky PLA byly před kultivací s buňkami opatřeny želatinou za účelem úpravy povrchových vlastností biomateriálu. Preparáty s želatinou vykazovaly zvýšenou buněčnou adhezi ve srovnání se vzorky bez želatiny. U vzorků s želatinou rovněž došlo k lepšímu prorůstání do vnitřních vrstev scaffoldu u obou buněčných kultur.

Želatina je molekulární derivát kolagenu získaný nevratnou denaturací kolagenových proteinů. Sdílí velmi blízkou molekulární strukturu a funkci s kolagenem, a proto se často používá v buněčných a tkáňových kulturách jako náhrada kolagenu pro biomateriálové účely [93]. Přestože se želatina získává z nativního kolagenu hydrolýzou, která vede k oddělení molekul od původní konformace  $\alpha$ -helixu přerušením mezimolekulárních vazeb, jednotlivé molekuly želatiny si stále zachovávají svou primární strukturu. Tato primární struktura poskytuje aminokyselinovou sekvenci RGD, což je rozpoznávací sekvence pro integrinem zprostředkovanou buněčnou adhezi. Podle literatury (Su a Wang, 2015) želatina významně zlepšuje infiltraci, adhezi, šíření a proliferaci buněk na scaffoldech, což bylo úspěšně prokázáno testem buněčné proliferace buněk v experimentální části této diplomové práce. [94]. Povrchovou úpravu PLA materiálu pomocí pokrytí struktury povrchu kolagenovým filmem studovali Atthof a Hilborn (Atthoff a Hilborn, 2007). Absorbovaná vrstva vykazovala

na povrchu PLA jasné vláknité síť. Tato studie prokázala zvýšenou adhezi myších fibroblastů buněčné linie 3T3 na povrch PLA [95].

Vlákna PLA struktury mají tloušťku cca 400  $\mu\text{m}$ , co umožňuje buňkám jejich migraci buněk do struktury materiálu. Vlákna v mikrometrovém měřítku nemají vliv na změnu morfologie buněk. Pokud by byl použit materiál s vlákny v nano měřítku, pravděpodobněji by došlo ke změně morfologie buněk. Faktorem určujícím adhezi, proliferaci a změnu morfologie buněk jsou topografické rysy na povrchu materiálu. Po adhezi se buňky začínají přizpůsobovat svému topografickému mikroprostředí na základě vytváření stabilních adhezních míst k substrátu. Konformace buněk by mohla vést ke změnám v buněčné morfologii, tvaru, uspořádání, a nakonec k buněčné diferenciaci. Na tyto změny mají vliv jak rozměry, tak geometrie a uspořádání jednotlivých topografických prvků [96]. Jelikož vlákna PLA materiálu nebyla strukturovaná, nebyla očekávaná změna morfologie buněk. Změnu morfologie fibroblastů v reakci na strukturu povrchů danou charakterizovanou výstupky studovali Dalby et al., 2003. Výsledky této studie ukázaly, že buňky na povrchu strukturovaném povrchu se ve srovnání s referencí plně nezploštily. Na plochých kontrolách fibroblasty přijaly svou obvyklou morfologii a byly schopné proliferovat a dosáhnout plné konfluence [97]. Vliv na morfologii fibroblastových buněk má i drsnost povrchu. Dle studie Hallab et al., 2001 bylo prokázáno, že drsnější povrchy polymerních materiálů vedou k zvýšenému přichycení fibroblastových buněk 3T3 na povrch polymeru [61]. Souvislost topografických vzorů na adhezi fibroblastových buněk na povrchy diskutovali Schulte et al., 2009. K adhezi buněk na materiál dle této studie přispívají topografické vzory. Mikrostrukturovaná topografie linií nebo sloupků na povrch PEG umožnila zvýšení adheze fibroblastů ve srovnání s plochým substrátem [98]. Například na pilířových substrátech jsou fibroblasty schopny tvořit fokální adheze na vrcholcích a po stranách pilířů a jsou na těchto strukturách schopny tvořit rozvětvené morfologie, co v důsledku mělo vliv na jejich pohyb po substrátu [99]. Z hlediska těchto studií lze soudit, že adheze fibroblastů je úspěšnější na drsnější povrchy se strukturovanou topografií.

Vliv topografie na kmenové buňky byl již zmíněn na základě výzkumů, z nichž některé byly uvedeny v teoretické části práce (kapitola 4.1.3.2. „Povrchový vzor“). Studie Song et al., 2016 zde uvádí, že 560 nm vysoké topografické hřebeny zvyšují diferenciaci pluripotentních kmenových buněk na neurony. Další studie (Abagnale et al., 2015) uvádí, že různé drážkové a hřebenové struktury zvyšují diferenciaci na specifické buněčné linie (15  $\mu\text{m}$  hřebeny – adipocyty, 2  $\mu\text{m}$  hřebeny – osteocyty, nano-vzory s periodicitou 650 nm –

osteocyty a adipocyty). Dále Yang et al., 2014 prokázali, že kombinace nanopórů a mikrodrážek byla schopna vyvolat diferenciaci nervových SC do neuronů [42]. Autoři Gerecht et al., 2007 se v experimentální části zabývali účinky nanotopografie na lidské embryonální kmenové buňky. Výsledky ukázaly, že lidské ESC reagují na substrátovou topografii v nanoměřítku podobným způsobem jako jiné terminálně diferencované savčí buňky, čímž demonstrují prodloužení a zarovnání buněk, změny v organizaci a polarizaci proteinů cytoskeletu a sníženou proliferaci [100]. Dle literatury lze soudit, že buněčná odezva na topografii povrchu biomateriálu může mít vliv na diferenciaci kmenových buněk na určitý buněčný typ.

## ZÁVĚR

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor a zahrnuje aplikaci principů a metod inženýrských a biomedicínských věd k vývoji biologických náhražek pro obnovu, udržení nebo zlepšení funkcí poškozených tkání. Koncept léčby dysfunkčních tkání a orgánů zahrnuje „triádu tkáňového inženýrství“, jejíž součástí jsou buňky, růstové faktory a matrice neboli scaffoldy. Za tímto účelem jsou využívány speciální materiály – biomateriály nejčastěji na bázi kovů, keramiky a polymerů. Biomateriály jsou definovány jako „materiály navržené tak, aby samotné nebo jako součást komplexního systému, který prostřednictvím interakcí s živými systémy řídil průběh jakéhokoli terapeutického nebo diagnostického postupu, v humánní nebo veterinární medicíně.“ Kritériem každého biomateriálu je biokompatibilita, která jim umožňuje aplikaci v přímém kontaktu s tkání pro regeneraci *in situ*.

Studium interakcí buněk s biomateriály se primárně soustředí na dvě neoddelitelné oblasti zkoumání: povahu povrchu biomateriálu a biologickou odezvu na kontakt s materiálem. Biomateriály interagují s biologickým prostředím na jejich povrchu, takže přesná biofyzikální charakterizace povrchu je velmi důležitá pro pochopení následných biologických účinků. V této souvislosti je známo, že povrchové charakteristiky, jako je hydrofobnost, povrchová energie, drsnost, náboj a chemické složení, hrají klíčovou roli při regulaci odezvy buněk, které interagují s biomateriálem. Adheze buněk na povrch je zprostředkována adhezními glykoproteiny, které poskytují buňkám vazebný signál prostřednictvím specifické aminokyselinové sekvence. Další povrchové vlastnosti biomateriálu poskytují buňkám informace pro další buněčné chování včetně proliferace a diferenciaci.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na studium interakce buněk s biomateriály. Použitým biomateriálem byla 3D struktura polylaktidu zhotovená inkoustovým biotiskem. Hodnocena byla cytotoxicita biomateriálu a proliferace buněk na scaffoldu. Testy byly provedeny za použití buněčné linie NIH/3T3 a ES R1. V testu cytotoxicity nebyly prokázány žádné negativní účinky na životaschopnost buněk žádné z linií. Test povrchových vlastností na proliferaci buněk byl vyhodnocen pomocí konfokální mikroskopie. Buňky, především fibroblasty, byly schopné adheze na povrch materiálu a následné proliferace.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] AKTER, F. What is Tissue Engineering?. In: *Tissue Engineering Made Easy* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 1-2 [cit. 2023-03-06]. ISBN 9780128053614. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805361-4.00001-1
- [2] ABDULGHANI, Saba a Geoffrey MITCHELL. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules* [online]. 2019, **9**(11) [cit. 2023-03-06]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9110750
- [3] ZURINA, Irina M., Viktoria S. PRESNIAKOVA, Denis V. BUTNARU, Andrey A. SVISTUNOV, Peter S. TIMASHEV a Yury A. ROCHEV. Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach. *Acta Biomaterialia* [online]. 2020, **113**, 63-83 [cit. 2023-04-15]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2020.06.016
- [4] GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh, Davood KOLAHREEZ, Seeram RAMAKRISHNA a David WILLIAMS. Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2019, **10**, 45-50 [cit. 2023-04-15]. ISSN 24684511. Dostupné z: doi:10.1016/j.cobme.2019.02.004
- [5] PINA, Sandra, Viviana P. RIBEIRO, Catarina F. MARQUES, F. Raquel MAIA, Tiago H. SILVA, Rui L. REIS a J. Miguel OLIVEIRA. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials* [online]. 2019, **12**(11) [cit. 2023-04-15]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12111824
- [6] CARLETTI, Eleonora, Antonella MOTTA a Claudio MIGLIARESI. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In: HAYCOCK, John W., ed. *3D Cell Culture* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-10-07, s. 17-39 [cit. 2023-04-15]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60761-983-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-984-0\_2
- [7] *Principles of Tissue Engineering* [online]. Elsevier, 2020. ISBN 9780128184226. Dostupné z: doi:10.1016/C2018-0-03818-9
- [8] PLACE, Elsie S., Julian H. GEORGE, Charlotte K. WILLIAMS a Molly M. STEVENS. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical Society*



- Reviews* [online]. 2009, **38**(4) [cit. 2023-03-06]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b811392k
- [9] VACANTI, Charles. The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2006, **1**(3), 569-576 [cit. 2023-02-06]. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.2755/jcmm010.003.20
- [10] DZOBO, Kevin, Nicholas Ekow THOMFORD, Dimakatso Alice SENTHEBANE, Hendrina SHIPANGA, Arielle ROWE, Collet DANDARA, Michael PILLAY a Keolebogile Shirley Caroline M. MOTAUNG. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells International* [online]. 2018, **2018**, 1-24 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2018/2495848
- [11] SHAFIEE, Ashkan a Anthony ATALA. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annual Review of Medicine* [online]. 2017, **68**(1), 29-40 [cit. 2023-04-15]. ISSN 0066-4219. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-med-102715-092331
- [12] LANGER, Robert a Joseph P. VACANTI. Tissue Engineering. *Science* [online]. 1993, **260**(5110), 920-926 [cit. 2023-03-06]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.8493529
- [13] MHANNA, Rami a Anwarul HASAN. Introduction to Tissue Engineering. In: HASAN, Anwarul, ed. *Tissue Engineering for Artificial Organs* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2017, 2017-04-07, s. 1-34 [cit. 2023-04-17]. ISBN 9783527689934. Dostupné z: doi:10.1002/9783527689934.ch1
- [14] KUO, Catherine K., Wan-Ju LI a Rocky S. TUAN. Cartilage and Ligament Tissue Engineering. In: *Biomaterials Science* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 1214-1236 [cit. 2023-05-09]. ISBN 9780123746269. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00114-5
- [15] QU, Huawei, Hongya FU, Zhenyu HAN a Yang SUN. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Advances* [online]. 2019, **9**(45), 26252-26262 [cit. 2023-03-06]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C9RA05214C
- [16] MATHEW, Ansuja, Robin AUGUSTINE, Nandakumar KALARIKAL a Sabu THOMAS. Tissue Engineering: Principles, Recent Trends and the Future. In: KALARIKKAL, Nandakumar, Robin AUGUSTINE, Oluwatobi OLUWAFEMI a

- Sabu THOMAS, ed. *Nanomedicine and Tissue Engineering* [online]. Apple Academic Press, 2016, 2016-03-28, s. 31-82 [cit. 2023-04-17]. ISBN 978-1-77188-118-0. Dostupné z: doi:10.1201/b19867-3
- [17] LOTT, Juliana, Pablo Herthel DE CARVALHO, Dawidson ASSIS a Alfredo Miranda DE GOES. Innovative Strategies for Tissue Engineering. In: PIGNATELLO, Rosario, ed. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* [online]. InTech, 2013, 2013-03-27 [cit. 2023-04-17]. ISBN 978-953-51-1051-4. Dostupné z: doi:10.5772/53337
- [18] GROLIK, Maria. Inżynieria tkankowa: nowe narzędzie w rekonstrukcji tkanek. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego. Nauki Ścisłe* [online]. 2011. No. 3 (2), p. 33–41. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: ftp://ftp.zpu.uj.edu.pl/towarzystwodoktorantow/zeszyty\_naukowe/scisle/3\_ZESZYTY\_NAUKOWE\_SCISLE\_NR\_3\_2011.pdf#page=35
- [19] MURPHY, CM, FJ O'BRIEN, DG LITTLE a A SCHINDELER. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European Cells and Materials* [online]. 2013, **26**, 120-132 [cit. 2023-05-14]. Dostupné z: doi:10.22203/eCM.v026a09
- [20] KEANE, Timothy J. a Stephen F. BADYLAK. Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery* [online]. 2014, **23**(3), 112-118 [cit. 2023-04-20]. ISSN 10558586. Dostupné z: doi:10.1053/j.sempedsurg.2014.06.010
- [21] WAGNER, William, Shelly Sakiyama ELBERT, Guigen ZHANG a Michael YASZEMSKI. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 4. San Diego: Academic press is an imprint of Elsevier, 2020. ISBN 9780128161388.
- [22] BASU, Bikramjit. *Biomaterials science and tissue engineering: principles and methods*. Cambridge University Press, 2017. ISBN 9781108415156
- [23] WILLIAMS, David F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(30), 5897-5909 [cit. 2023-02-23]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027
- [24] AHADIAN, Samad, Rahaf RAHAL, Javier RAMÓN-AZCÓN, Raquel OBREGÓN a Anwarul HASAN. Biomaterials in Tissue Engineering. In: HASAN, Anwarul, ed. *Tissue Engineering for Artificial Organs* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-

- VCH Verlag GmbH & Co., 2017, 2017-04-07, s. 35-83 [cit. 2023-04-20]. ISBN 9783527689934. Dostupné z: doi:10.1002/9783527689934.ch2
- [25] WILLIAMS, David F. Biocompatibility Pathways: Biomaterials-Induced Sterile Inflammation, Mechanotransduction, and Principles of Biocompatibility Control. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2017, 3(1), 2-35 [cit. 2023-05-04]. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00607
- [26] KESHARWANI, Rajesh K., Raj K. KESERVANI a Anil K. SHARMA. *Tissue Engineering* [online]. Boca Raton: Apple Academic Press, 2022 [cit. 2023-04-20]. ISBN 9781003180531. Dostupné z: doi:10.1201/9781003180531
- [27] SALTZMAN, W. Mark a Themis R. KYRIAKIDES. Cell interactions with polymers. In: *Principles of Tissue Engineering* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 275-293 [cit. 2023-02-23]. ISBN 9780128184226. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818422-6.00017-4
- [28] DOLCIMASCOLO, Anna, Giovanna CALABRESE, Sabrina CONOCI a Rosalba PARENTI. Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. In: BARBECK, Mike, Ole JUNG, Ralf SMEETS a Tadas KORŽINSKAS, ed. *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-5-22 [cit. 2023-03-02]. ISBN 978-1-83880-377-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.83839
- [29] XU, Yibo, Chuanxin CHEN, Peter B. HELLWARTH a Xiaoping BAO. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioactive Materials* [online]. 2019, 4, 366-379 [cit. 2023-02-28]. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2019.11.002
- [30] ELSHAHAWY, Waleed. Biocompatibility. In: SIKALIDIS, Costas, ed. *Advances in Ceramics - Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment* [online]. InTech, 2011, 2011-09-06 [cit. 2023-04-22]. ISBN 978-953-307-350-7. Dostupné z: doi:10.5772/18475
- [31] CACOPARDO, Ludovica. Biomaterials and biocompatibility. In: *Human Orthopaedic Biomechanics* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 341-359 [cit. 2023-04-22]. ISBN 9780128244814. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824481-4.00038-X
- [32] GERVASO, Francesca, Alessandro SANNINO a Giuseppe PERETTI. The biomaterialist's task: scaffold biomaterials and fabrication

- technologies. *Joints* [online]. 2017, **01**(03), 130-137 [cit. 2023-04-22]. ISSN 2282-4324. Dostupné z: doi:10.11138/jts/2013.1.3.130
- [33] GUO, Baolin a Peter X. MA. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* [online]. 2018, **19**(6), 1764-1782 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b00276
- [34] LE, Thanh-Hai, Yukyung KIM a Hyeonseok YOON. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. *Polymers* [online]. 2017, **9**(12) [cit. 2023-05-08]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym9040150
- [35] RATNER, Buddy D. The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *Journal of Cardiovascular Translational Research* [online]. 2011, **4**(5), 523-527 [cit. 2023-04-22]. ISSN 1937-5387. Dostupné z: doi:10.1007/s12265-011-9287-x
- [36] WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(20), 2941-2953 [cit. 2023-04-13]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- [37] TABATA, Yasuhiko. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2009, **6**(suppl\_3) [cit. 2023-04-03]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2008.0448.focus
- [38] BISWAL, Trinath, Sushant Kumar BADJENA a Debabrata PRADHAN. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2020, **30**, 274-282 [cit. 2023-04-20]. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.01.437
- [39] FARTO-VAAMONDE, Xián, Giulia AURIEMMA, Rita Patrizia AQUINO, Angel CONCHEIRO a Carmen ALVAREZ-LORENZO. Post-manufacture loading of filaments and 3D printed PLA scaffolds with prednisolone and dexamethasone for tissue regeneration applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2019, **141**, 100-110 [cit. 2023-05-08]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2019.05.018
- [40] HORST, Orapin V., Miquella G. CHAVEZ, Andrew H. JHEON, Tejal DESAI a Ophir D. KLEIN. Stem Cell and Biomaterials Research in Dental Tissue Engineering and

- Regeneration. *Dental Clinics of North America* [online]. 2012, **56**(3), 495-520 [cit. 2023-05-08]. ISSN 00118532. Dostupné z: doi:10.1016/j.cden.2012.05.009
- [41] DAVISON, Noel L., Florence BARRÈRE-DE GROOT a Dirk W. GRIJPM. Degradation of Biomaterials. In: *Tissue Engineering* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 177-215 [cit. 2023-05-05]. ISBN 9780124201453. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00006-7
- [42] KIM, Hyun S., Sangamesh G. KUMBAR a Syam P. NUKAVARAPU. Biomaterial-directed cell behavior for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2021, **17** [cit. 2023-05-14]. ISSN 24684511. Dostupné z: doi:10.1016/j.cobme.2020.100260
- [43] ZHANG, Fan a Martin W. KING. Biodegradable Polymers as the Pivotal Player in the Design of Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2020, **9**(13) [cit. 2023-05-08]. ISSN 2192-2640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201901358
- [44] REED, A.M. a D.K. GILDING. Biodegradable polymers for use in surgery — poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation. *Polymer* [online]. 1981, **22**(4), 494-498 [cit. 2023-05-08]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/0032-3861(81)90168-3
- [45] IKADA, Yoshito. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2006, **3**(10), 589-601 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2006.0124
- [46] HEATH, Carole A. Cells for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. 2000, **18**(1), 17-19 [cit. 2023-03-15]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(99)01396-7
- [47] WAN, Xingyi, Zhirong LIU a Linlin LI. Manipulation of Stem Cells Fates: The Master and Multifaceted Roles of Biophysical Cues of Biomaterials. *Advanced Functional Materials* [online]. 2021, **31**(23) [cit. 2023-03-16]. ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.202010626
- [48] AUGUSTINE, Robin, Pan DAN, Anwarul HASAN, et al. Stem cell-based approaches in cardiac tissue engineering: controlling the microenvironment for autologous

- cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2021, **138** [cit. 2023-04-03]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.111425
- [49] SHOKEIR, Ahmed A, Ahmed M HARRAZ a Ahmed B Shehab EL-DIN. Tissue engineering and stem cells: Basic principles and applications in urology. *International Journal of Urology* [online]. 2010, **17**(12), 964-973 [cit. 2023-05-03]. ISSN 09198172. Dostupné z: doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02643.x
- [50] KNAPP, Sarah. Stem Cell - The Definitive Guide | Biology Dictionary. *Biology Dictionary - Explanations and Examples of Biological Concepts* [online]. Copyright © 2023 [cit. 08.05.2023]. Dostupné z: <https://biologydictionary.net/stem-cell/>
- [51] ZHANG, Zhanpeng, Melanie J GUPTA a Peter X MA. Biomaterials and stem cells for tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2013, **13**(4), 527-540 [cit. 2023-03-16]. ISSN 1471-2598. Dostupné z: doi:10.1517/14712598.2013.756468
- [52] ELTOM, Abdalla, Gaoyan ZHONG a Ameen MUHAMMAD. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 2019, **2019**, 1-13 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1687-8434. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3429527
- [53] BAČÁKOVÁ, L, E FILOVÁ, F RYPÁČEK, V ŠVORČÍK a V STARÝ. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research* [online]. S35-S45 [cit. 2023-05-14]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.930000.53.S35
- [54] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- [55] WANG, Fushi, Xinjie CAI, Ya SHEN a Liuyan MENG. Cell–scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction. *Bioactive Materials* [online]. 2023, **23**, 16-44 [cit. 2023-05-04]. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2022.10.029
- [56] GONÇALVES, Sara, Fernando DOURADO a Lígia R. RODRIGUES. Overview on Cell-Biomaterial Interactions. In: PUOCI, Francesco, ed. *Advanced Polymers in Medicine* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015-12-03, s. 91-



- 128 [cit. 2023-05-04]. ISBN 978-3-319-12477-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-12478-0\_4
- [57] LOTFI, M., M. NEJIB a M. NACEUR. Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. In: PIGNATELLO, Rosario, ed. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* [online]. InTech, 2013, 2013-03-27 [cit. 2023-05-04]. ISBN 978-953-51-1051-4. Dostupné z: doi:10.5772/53542
- [58] BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUMML a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, **29**(6), 739-767 [cit. 2023-04-27]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
- [59] SANTOS, Edorta, Gorka ORIVE, Rosa M a Jose LUIS. Cell-Biomaterial Interaction: Strategies To Mimic The Extracellular Matrix. In: PRAMATAROVA, Lilyana, ed. *On Biomimetics* [online]. InTech, 2011, 2011-08-29 [cit. 2023-05-04]. ISBN 978-953-307-271-5. Dostupné z: doi:10.5772/21634
- [60] DOS SANTOS, Venina, Rosmary Nichele BRANDALISE a Michele SAVARIS. Biomaterials: Characteristics and Properties. In: DOS SANTOS, Venina, Rosmary Nichele BRANDALISE a Michele SAVARIS. *Engineering of Biomaterials* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-02, s. 5-15 [cit. 2023-04-23]. Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering. ISBN 978-3-319-58606-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-58607-6\_2
- [61] AMANI, Hamed, Hamidreza ARZAGHI, Mehrdad BAYANDORI, Amin Shiralizadeh DEZFULI, Hamidreza PAZOKI-TOROUDI, Abbas SHAFIEE a Lida MORADI. Controlling Cell Behavior through the Design of Biomaterial Surfaces: A Focus on Surface Modification Techniques. *Advanced Materials Interfaces* [online]. 2019, **6**(13) [cit. 2023-04-28]. ISSN 2196-7350. Dostupné z: doi:10.1002/admi.201900572
- [62] CHANG, Hsin-I a Yiwei WANG. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. In: EBERLI, Daniel, ed. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* [online]. InTech, 2011, 2011-08-29 [cit. 2023-05-03]. ISBN 978-953-307-663-8. Dostupné z: doi:10.5772/21983
- [63] GENTLEMAN, Molly M. a Eileen GENTLEMAN. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *International Materials Reviews* [online].

- 2014, **59**(8), 417-429 [cit. 2023-04-27]. ISSN 0950-6608. Dostupné z: doi:10.1179/1743280414Y.0000000038
- [64] SCHMIDT, David Richard, Heather WALDECK a Weiyuan John KAO. Protein Adsorption to Biomaterials. In: PULEO, David A. a Rena BIZIOS, ed. *Biological Interactions on Materials Surfaces* [online]. New York, NY: Springer US, 2009, 2009-5-19, s. 1-18 [cit. 2023-04-27]. ISBN 978-0-387-98160-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-98161-1\_1
- [65] ZHAO, Xinlian, Lulu JIN, Haifei SHI, Weijun TONG, Dmitry GORIN, Yuri KOTELEVTSSEV a Zhengwei MAO. Recent advances of designing dynamic surfaces to regulate cell adhesion. *Colloid and Interface Science Communications* [online]. 2020, **35** [cit. 2023-04-28]. ISSN 22150382. Dostupné z: doi:10.1016/j.colcom.2020.100249
- [66] CAI, Shuxiang, Chuanxiang WU, Wenguang YANG, Wenfeng LIANG, Haibo YU a Lianqing LIU. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnology Reviews* [online]. 2020, **9**(1), 971-989 [cit. 2023-04-28]. ISSN 2191-9097. Dostupné z: doi:10.1515/ntrev-2020-0076
- [67] GAMBARDELLA, Alessandro, Gregorio MARCHIORI, Melania MAGLIO, Alessandro RUSSO, Chiara ROSSI, Andrea VISANI a Milena FINI. Determination of the Spatial Anisotropy of the Surface MicroStructures of Different Implant Materials: An Atomic Force Microscopy Study. *Materials* [online]. 2021, **14**(17) [cit. 2023-05-02]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14174803
- [68] REID, James Alexander, Kiera D DWYER, Phillip R SCHMITT, Arvin H SOEPRIATNA, Kareen LK COULOMBE a Anthony CALLANAN. Architected fibrous scaffolds for engineering anisotropic tissues. *Biofabrication* [online]. 2021, **13**(4) [cit. 2023-05-02]. ISSN 1758-5082. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/ac0fc9
- [69] GIL, Eun Seok, Sang-Hyug PARK, Jeff MARCHANT, Fiorenzo OMENETTO a David L. KAPLAN. Response of Human Corneal Fibroblasts on Silk Film Surface Patterns. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2010, **10**(6), 664-673 [cit. 2023-05-13]. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200900452
- [70] SONG, Liqing, Kai WANG, Yan LI a Yong YANG. Nanotopography promoted neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Colloids and*



- Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **148**, 49-58 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.08.041
- [71] ABAGNALE, Giulio, Michael STEGER, Vu Hoa NGUYEN, et al. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials* [online]. 2015, **61**, 316-326 [cit. 2023-05-13]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.030
- [72] DASZEK, J., E. KIJEŃSKA, M. ŁOJKOWSKI a W. SWIESZKOWSKI. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. *Applied Surface Science* [online]. 2016, **388**, 762-774 [cit. 2023-05-03]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2016.03.038
- [73] DAWSON, Eileen, Gazell MAPILI, Kathryn ERICKSON, Sabia TAQVI a Krishnendu ROY. Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(2), 215-228 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.08.037
- [74] DAVE, Khyati a Vincent G. GOMES. Interactions at scaffold interfaces: Effect of surface chemistry, structural attributes and bioaffinity. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **105** [cit. 2023-04-23]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110078
- [75] GARG, Tarun, Onkar SINGH, Saahil ARORA a R. S. R. MURTHY. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 2012, **29**(1), 1-63 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0743-4863. Dostupné z: doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v29.i1.10
- [76] NIKOLOVA, Maria P. a Murthy S. CHAVALI. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials* [online]. 2019, **4**, 271-292 [cit. 2023-05-09]. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2019.10.005
- [77] KUBOKI, Yoshinori, Qiming JIN, Masahiro KIKUCHI, Javed MAMOOD a Hiroko TAKITA. Geometry of Artificial ECM: Sizes of Pores Controlling Phenotype Expression in BMP-Induced Osteogenesis and Chondrogenesis. *Connective Tissue Research* [online]. 2009, **43**(2-3), 529-534 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0300-8207. Dostupné z: doi:10.1080/03008200290001104

- [78] WANG, Lu, Cunyang WANG, Shuai WU, Yubo FAN a Xiaoming LI. Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: current progress and challenges. *Biomaterials Science* [online]. 2020, **8**(10), 2714-2733 [cit. 2023-04-16]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/D0BM00269K
- [79] RAVI, Maddaly, V. PARAMESH, S.R. KAVIYA, E. ANURADHA a F.D. Paul SOLOMON. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2015, **230**(1), 16-26 [cit. 2023-05-09]. ISSN 00219541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.24683
- [80] SKOPALOVÁ, Kateřina, Katarzyna Anna RADASZKIEWICZ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, et al. Modulation of Differentiation of Embryonic Stem Cells by Polypyrrole: The Impact on Neurogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(2) [cit. 2023-05-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22020501
- [81] SINGHVI, M.S., S.S. ZINJARDE a D.V. GOKHALE. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2019, **127**(6), 1612-1626 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14290
- [82] GHOSAL, Kajal, Christian AGATEMOR, Zdenko ŠPITÁLSKY, Sabu THOMAS a Erich KNY. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2019, **358**, 1262-1278 [cit. 2023-05-11]. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2018.10.117
- [83] SCAFFARO, R., F. LOPRESTI, L. BOTTA, S. RIGOGLIUSO a G. GHERSI. Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2016, **54**, 8-20 [cit. 2023-05-11]. ISSN 17516161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2015.08.033
- [84] BHASKAR, Birru, Robert OWEN, Hossein BAHMAEE, Zena WALLY, Partha SREENIVASA RAO a Gwendolen C. REILLY. Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2018, **106**(5), 1334-1340 [cit. 2023-05-11]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36336

- [85] Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf. *National Center for Biotechnology Information* [online].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [86] ČSN EN ISO 10993-12. Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály. Česká technická norma (ČSN) 2021. 28 s.  
Třídící znak: 855220
- [87] ZIATS, Nicholas P., Kathleen M. MILLER a James M. ANDERSON. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* [online]. 1988, **9**(1), 5-13 [cit. 2023-05-08]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(88)90063-4
- [88] SANZ-HERRERA, Jose A. a Esther REINA-ROMO. Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, **12**(11), 8217-8244 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms12118217
- [89] GRÉMARE, Agathe, Vera GUDURIC, Reine BAREILLE, et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2018, **106**(4), 887-894 [cit. 2023-05-08]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36289
- [90] NIH3T3 Cells - *NIH 3T3 CELL LINE*. *NIH3T3 Cells - NIH 3T3 CELL LINE* [online].  
Dostupné z: <https://nih3t3.com>
- [91] MOROZOV, Alexander G., Danila A. RAZBOROV, Tatevik A. EGIAZARYAN, et al. In Vitro Study of Degradation Behavior, Cytotoxicity, and Cell Adhesion of the Atactic Polylactic Acid for Biomedical Purposes. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2020, **28**(10), 2652-2660 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01803-x
- [92] FARTO-VAAMONDE, Xián, Giulia AURIEMMA, Rita Patrizia AQUINO, Angel CONCHEIRO a Carmen ALVAREZ-LORENZO. Post-manufacture loading of filaments and 3D printed PLA scaffolds with prednisolone and dexamethasone for tissue regeneration applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2019, **141**, 100-110 [cit. 2023-05-08]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2019.05.018

- [93] BELLO, Alvin Bacero, Deogil KIM, Dohyun KIM, Hansoo PARK a Soo-Hong LEE. Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2020, **26**(2), 164-180 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1937-3368. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2019.0256
- [94] SU, Kai a Chunming WANG. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters* [online]. 2015, **37**(11), 2139-2145 [cit. 2023-05-14]. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-015-1907-0
- [95] RASAL, Rahul M., Amol V. JANORKAR a Douglas E. HIRT. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, **35**(3), 338-356 [cit. 2023-05-09]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003
- [96] NGUYEN, Anh Tuan, Sharvari R SATHE a Evelyn K F YIM. From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *Journal of Physics: Condensed Matter* [online]. 2016, **28**(18) [cit. 2023-04-28]. ISSN 0953-8984. Dostupné z: doi:10.1088/0953-8984/28/18/183001
- [97] DALBY, M.J., S. CHILDS, M.O. RIEHLE, H.J.H. JOHNSTONE, S. AFFROSSMAN a A.S.G. CURTIS. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(6), 927-935 [cit. 2023-05-12]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(02)00427-1
- [98] SCHULTE, Vera A., Mar DÍEZ, Martin MÖLLER a Marga C. LENSEN. Surface Topography Induces Fibroblast Adhesion on Intrinsically Nonadhesive Poly(ethylene glycol) Substrates. *Biomacromolecules* [online]. 2009, **10**(10), 2795-2801 [cit. 2023-05-11]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm900631s
- [99] FREY, Margo T., Irene Y. TSAI, Thomas P. RUSSELL, Steven K. HANKS a Yu-li WANG. Cellular Responses to Substrate Topography: Role of Myosin II and Focal Adhesion Kinase. *Biophysical Journal* [online]. 2006, **90**(10), 3774-3782 [cit. 2023-05-12]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.105.074526
- [100] MARTÍNEZ, E., E. ENGEL, J.A. PLANELL a J. SAMITIER. Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* [online]. 2009, **191**(1), 126-135 [cit. 2023-05-12]. ISSN 09409602. Dostupné z: doi:10.1016/j.aanat.2008.05.006

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

Arg-Gly-Asp	Tripeptid arginin-glycin-kyselina asparagová
ASC	Dospělé kmenové buňky (Adult stem cells)
ATCC	American Type Culture Collection
CP	Vodivé polymery (Conducting polymers)
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagleho médium
ECM	Extracelulární matrix
ERK	Extracelulárním signálem regulovaná kináza
ESC	Embryonální kmenové buňky
ETES	Evropská společnost tkáňového inženýrství
FAK	Fokální adhezní kináza
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GAG	Glykosaminoglykany
HA	Kyselina hyaluronová (Hyaluronic acid)
ILK	Integrin kináza
iPSC	Indukované pluripotentní buňky
LA	Kyselina mléčná (Lactic acid)
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinázy
MSC	Mezenchymální kmenové buňky
MTT	(3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
NSF	Národní vědecká nadace (National Science Foundation)
PANI	Polyanilin
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PCL	Poly( $\epsilon$ -kaprolakton)
PGA	Kyselina poly(glykolová)
PLA	Kyselina poly(mléčná)

---

PLGA	Poly(laktid-ko-glykolová) kyselina
PPY	Polypyrrol
PS	Polystyren
PTEI	Pittsburg Tissue Engineering Initiative
RGD	Specifická aminokyselinová sekvence
SC	Kmenové buňky (Stem cells)
TERM	Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína
TERMIS	Mezinárodní společnost pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu
TI	Tkáňové inženýrství
TES	Společnost tkáňového inženýrství – Tissue Engineering Society

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1</i> Triáda tkáňového inženýrství, upraveno dle Murphy a kol. 2013.....	<b>14</b>
<i>Obrázek 2</i> Diferenční potenciál kmenových buněk, upraveno dle Knapp, 2021.....	<b>25</b>
<i>Obrázek 3</i> Kultivační láhev s NIH/3T3 buněčnou linií.....	<b>38</b>
<i>Obrázek 4</i> Struktura polylaktidu.....	<b>40</b>
<i>Obrázek 5</i> Ukázka mikrotitrační destičky po přidání MTT. Fialové zbarvení je spojeno s tvorbou krystalků formazanu.....	<b>42</b>
<i>Obrázek 6</i> Ukázka mikrotitrační destičky po přidání DMSO a rozpuštění formazanu.....	<b>43</b>
<i>Obrázek 7</i> Vzorky PLA v mikrotitrační destičce před testem proliferace.....	<b>44</b>
<i>Obrázek 8</i> Životaschopnost buněk linie NIH/3T3 po expozici extraktu PLA.....	<b>45</b>
<i>Obrázek 9</i> Životaschopnost buněk linie ES R1 po expozici extraktu PLA.....	<b>46</b>
<i>Obrázek 10</i> Buněčná kultura NIH/3T3, a) PLA bez želatiny, b) PLA s želatinou, c) reference bez želatiny, d) reference s želatinou.....	<b>47</b>
<i>Obrázek 11</i> Buněčná kultura ES-R1, a) PLA bez želatiny, b) PLA s želatinou, c) reference bez želatiny, d) reference s želatinou.....	<b>49</b>

## SEZNAM TABULEK

*Tabulka 1 Standardní plochy povrchu a objemy extrakčního média dle ISO 10993-12.....41*





