

# Obsah

Úvod .....	4
Seznam zkratk.....	5
Úvod do tkáňového inženýrství.....	8
A. Scaffoldy .....	15
1. Požadavky na materiály pro tkáňové inženýrství.....	16
2. Přírodní materiály pro výrobu tkáňových nosičů .....	21
2.1. Proteiny .....	21
2.1.1. Kolagen .....	23
2.1.2. Elastin .....	24
2.1.3. Přírodní hedvábí .....	24
2.2. Polysacharidy.....	25
2.2.1. Celulóza .....	25
2.2.2. Chitin .....	26
2.2.3. Chitosan.....	26
2.2.4. Alginát.....	27
2.2.5. Glykosaminoglykany.....	27
2.2.6. Polyhydroxyalkanoáty .....	29
3. Syntetické materiály pro výrobu tkáňových nosičů .....	31
3.1. Biodegradabilní polyestery.....	31
3.1.1. Polyglykolid.....	32
3.1.2. Polylaktid .....	32
3.1.3. Kopolymer polylaktidu a polyglykolid .....	33
3.1.4. Polykaprolakton.....	33
3.1.5. Polydioxanon .....	34
3.2. Fluorované syntetické polymery .....	35
3.2.1. Polyvinylidendifluorid.....	35
3.2.2. Polytetrafluorethylen .....	35
3.3. Vodorozpustné syntetické polymery.....	36
3.3.1. Polyvinylalkohol.....	36
3.3.2. Polyethylenoxid .....	37
3.3.3. Polyvinylpyrrolidon.....	37
3.4. Vodivé syntetické polymery .....	38

3.4.1.	Polypyrrol .....	38
3.4.2.	Polyanilin .....	38
4.	Technologie přípravy tkáňových nosičů .....	41
4.1.	Vláknenné scaffoldy.....	41
4.1.1.	Tkaní .....	42
4.1.2.	Pletení.....	42
4.2.	Nevláknenné scaffoldy .....	42
4.2.1.	Odpaření rozpouštědla.....	42
4.2.2.	Vymývání částic .....	43
4.2.3.	Zpěňování plynem .....	43
4.2.4.	Lyofilizace .....	44
4.2.5.	Rapid prototyping.....	44
4.2.6.	Hydrogely.....	45
4.2.7.	Decelularizace tkání.....	45
5.	Charakterizace tkáňových nosičů .....	48
5.1.	Chemická struktura .....	49
5.1.1.	UV/VIS spektroskopie .....	50
5.1.2.	IR spektroskopie .....	52
5.2.	Molekulová hmotnost .....	53
5.2.1.	Gelová permeační chromatografie.....	54
5.3.	Struktura scaffoldu .....	55
5.3.1.	Optická mikroskopie.....	55
5.3.2.	Fluorescenční mikroskopie .....	56
5.3.3.	Skenovací elektronová mikroskopie.....	56
5.3.4.	Transmisní elektronová mikroskopie .....	57
5.4.	Porozita.....	57
5.4.1.	Rtuťová porozimetrie .....	57
5.4.2.	Bublinková metoda.....	58
5.4.3.	Plynová porozimetrie .....	58
5.4.4.	Výpočetní tomografie .....	58
5.5.	Mechanické vlastnosti .....	59
5.5.1.	Tahová zkouška .....	59
5.5.2.	Test přilnavosti .....	60
5.6.	Krystalinita.....	61

5.6.1.	Diferenční skenovací kalorimetrie.....	62
5.6.2.	Rentgenová krystalografie.....	63
5.7.	Smáčivost povrchu .....	63
5.7.1.	Měření kontaktního úhlu.....	64
5.8.	Drsnost povrchu .....	64
5.8.1.	Mikroskopie atomárních sil .....	64
5.9.	Degradabilita .....	65
5.10.	Shrnutí .....	66
6.	Modifikace tkáňových nosičů, systémy řízeného uvolňování léčiv .....	67
6.1.	Povrchová modifikace .....	67
6.1.1.	Chemická modifikace.....	67
6.1.2.	Fyzikální modifikace .....	67
6.2.	Systémy cíleného dodávání léčiv.....	68
6.3.	Charakterizace modifikovaných tkáňových nosičů .....	73
7.	Sterilizace scaffoldů.....	75
7.1.	Sterilizační metody .....	76
7.1.1.	Tepelná sterilizace .....	76
7.1.2.	Radiační sterilizace .....	76
7.1.3.	Plazmová sterilizace .....	77
7.1.4.	Sterilizace ethylen oxidem.....	77
7.1.5.	Sterilizace peroctovou kyselinou.....	78
7.2.	Dezinfekční metody.....	78
7.2.1.	UV záření .....	78
7.2.2.	Ethanolová dezinfekce.....	78
7.2.3.	Dezinfekce jódem .....	79

# Úvod

Skripta byla vypracována jako studijní materiál pro výuku předmětů zabývajících se tkáňovým inženýrstvím na Fakultě Textilní (FT) Technické Univerzity v Liberci (TUL):

1. Vláknenné materiály pro tkáňové inženýrství MAT (bakalářský studijní program)
2. Základy biologie buňky a tkání ZBT (bakalářský studijní program)
3. Materiály pro tkáňové inženýrství MTI (navazující studijní program)

Text obsahuje úvodní kapitolu, která se zabývá obecným úvodem do tkáňového inženýrství. Dále je vlastní text skript rozdělen do 3 sekcí:

- A) Scaffoldy
- B) Buňky, mezibuněčná hmota, interakce buněk s biomateriály
- C) Vybrané aplikace tkáňového inženýrství

## Seznam zkratek

<b>AFM</b>	mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
<b>AMK</b>	Aminokyselina
<b>API</b>	aktivní látka (aktive pharmaceutical ingredience)
<b>CT</b>	výpočetní tomografie (computed tomography)
<b>DCM</b>	dichlormethan
<b>DDS</b>	cílené dodávání léčiv (drug delivery systems)
<b>DMAc</b>	Dimethylacetamid
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DSC</b>	diferenční skenovací kalorimetrie
<b>DTA</b>	diferenční termogravimetrická analýza
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>EtOx</b>	Ethylen oxid
<b>FBR</b>	Reakce na cizí těleso (Foreign body reaction)
<b>FDM</b>	Fused deposition modeling
<b>FTIR</b>	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykan
<b>GPC</b>	gelová permeační chromatografie
<b>HA</b>	Kyselina hyaluronová (Hyaluronic acid)
<b>HFIP</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>HPLC</b>	vysocúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
<b>IR</b>	infračervená spektroskopie (infrared spectroscopy)
<b>LBL</b>	layer by layer
<b>MIP</b>	rtuťová porozimetrie (mercury intrusion porosimetry)
<b>NMR</b>	Nukleární magnetická rezonance

<b>PAA</b>	Peroctová kyselina (peracetic acid)
<b>PANI</b>	Polyanilin
<b>PCL</b>	Polykaprolakton (Poly- $\epsilon$ -caprolectone)
<b>PDX</b>	Polydioxanon
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PEO</b>	Polyethylenoxid
<b>PGA</b>	Polyglykolid (Polyglycolic acid)
<b>PHA</b>	Polyhydroxyalkanoáty
<b>PHB</b>	Polyhydroxybutyrát
<b>PHV</b>	Polyhydroxyvalerát
<b>PLA</b>	Polylaktid (Polylactic acid)
<b>PLCL</b>	Kopolymer polylaktidu a polykaprolatonu
<b>PLGA</b>	Kopolymer polylaktidu a polyglykolidu
<b>PPy</b>	Polypyrrol
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen
<b>PVA</b>	Polyvinylalkohol
<b>PVAc</b>	Polyvinylacetát
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>ROS</b>	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
<b>sc CO<sub>2</sub></b>	Superkritický oxid uhličitý
<b>SCPL</b>	Vymývání částic, odpaření rozpouštědla (Solvent casting, aparticle leaching)
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SEC</b>	vyučovací chromatografie (size exclusion chromatography)
<b>SEM</b>	skenovací elektronová mikroskopie
<b>SFM</b>	mikroskopie atomárních sil (scanning force microscopy)
<b>SLA</b>	Stereolitografie

<b>SLS</b>	Selective laser sintering
<b>TA</b>	termogravimetrická analýza
<b>TEM</b>	transmisní elektronová mikroskopie
<b>TFE</b>	Trifluoroethanol
<b>XPS</b>	rentgenová fotoelektronová spektroskopie
<b>XRD</b>	rentgenová krystalografie (X-ray diffraction)

# Úvod do tkáňového inženýrství

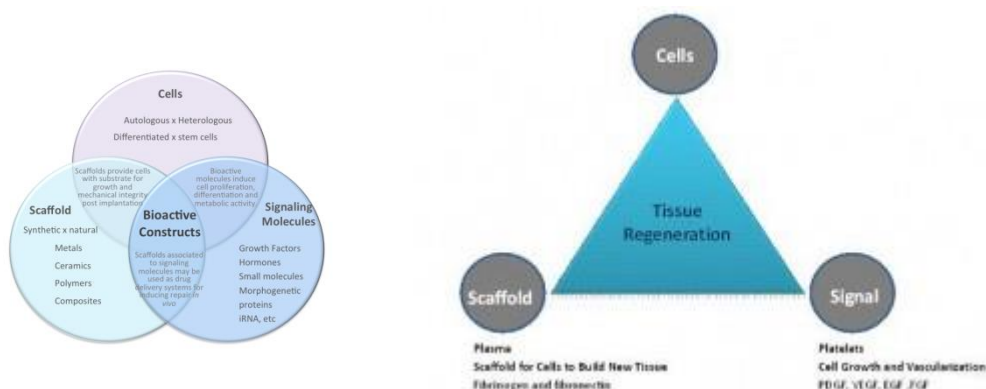
Jana Horáková

*Důležité pojmy: definice tkáňového inženýrství, 3 pilíře tkáňového inženýrství – scaffoldy, buňky, signály, regenerativní medicína, Vacantiho myš*

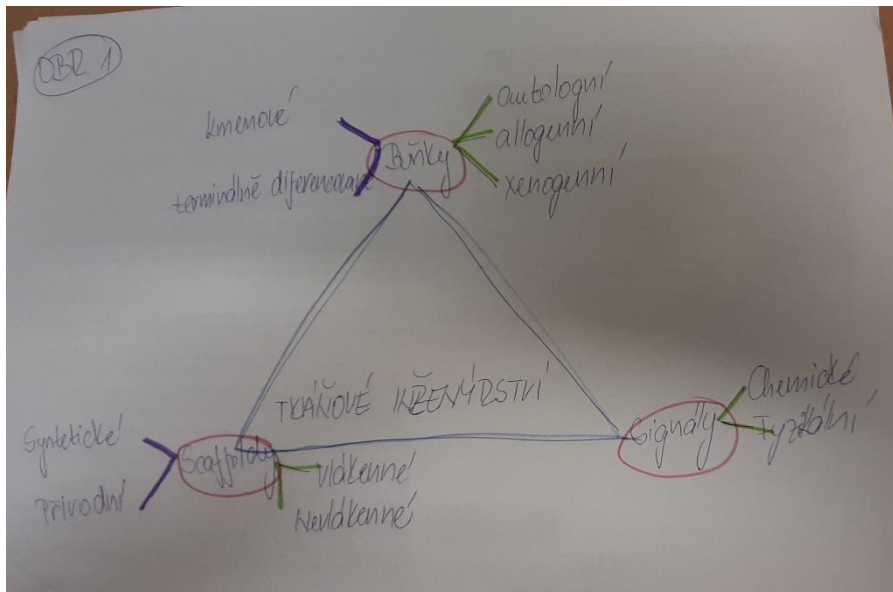
Tkáňové inženýrství (TI) je poměrně mladým oborem, jehož počátky sahají do 90. let 20. století. Poprvé byl termín „tkáňové inženýrství“ zmíněn v publikaci roku 1984, jako obor byl uznán a vymezen roku 1987. Jedna z prvních definic tkáňového inženýrství od průkopníků tohoto oboru (Robert Langer a Joseph Vacanti) zní: „Interdisciplinární obor využívající znalostí inženýrství a přírodních věd k vývoji biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání nebo orgánů“. Multidisciplinarita je nutnou podmínkou pro splnění cílů TI, v oboru jsou využívány znalosti biologie, chemie, fyziky, inženýrství biomateriálů, počítačové technologie, medicíny,...

V klinické praxi se rutinně využívají 2 druhy léčebných postupů. Jedním z nich je „biologický“ přístup s využitím transplantací orgánů. Druhý přístup je naopak materiálový využívající umělých náhrad. Obě zmíněné možnosti zachraňují mnoho životů a ve spoustě aplikací mají nezastupitelnou úlohu. Bohužel nemohou vyřešit všechny případy, proto tkáňové inženýrství využívá znalostí obou těchto přístupů a vhodně je kombinuje pro určité aplikace, jak bude vysvětleno dále.

Tkáňové inženýrství se opírá o 3 pilíře, kterými jsou **tkáňové nosiče** neboli scaffoldy, **buňky** a **signály**, jak je vidět na obr. 1. Tyto 3 složky mohou být kombinovány různým způsobem (v laboratoři- *in vitro*, v organismu – *in vivo* / *in situ*), všechny však mají zásadní vliv na konečnou funkci biomateriálu. Obor tkáňového inženýrství tedy využívá scaffoldů jako podpůrných struktur pro růst buněk, které umožní regeneraci či nahrazení poškozené tkáně.







Obr. 1: Znárodnění 3 pilířů tkáňového inženýrství: scaffoldy, buňky, signály.

**Tkáňové nosiče** budou rozebrány velmi podrobně v následujících kapitolách. Mohou být konstruovány mnoha technologiemi do podoby vláknenných či nevláknenných materiálů (hydrogely, folie, porézní 3D materiály, 3D tisk) s využitím celé škály materiálů (polymery přírodní / syntetické, kovy, keramika). Spacifickým typem přírodních tkáňových nosičů je tzv. decelularizovaná tkáň, která je tvořena mezibuněčnou hmotou.

Tkáňové nosiče mohou být osídleny buňkami před vlastní implantací v prostředí *in vitro* nebo může probíhat regenerace přímo v organismu (*in vivo*). Pro většinu aplikací je výhodné, aby buňky osídlily tkáňový nosič a vytvořily si svou vlastní mezibuněčnou hmotu, zatímco se původní struktura scaffoldu postupně odbourá (při využití biodegradabilních materiálů). Jsou však jisté výjimky, kde je osídlení buňkami nežádoucí reakce. Tkáňové inženýrství je velmi širokým oborem, proto může být jakákoliv obecná klasifikace zavádějící. V závěru skript jsou uvedeny konkrétní příklady vývoje scaffoldů pro určité aplikace – kožní kryty, cévní náhrady, materiály pro prevenci pooperačních adhezí.

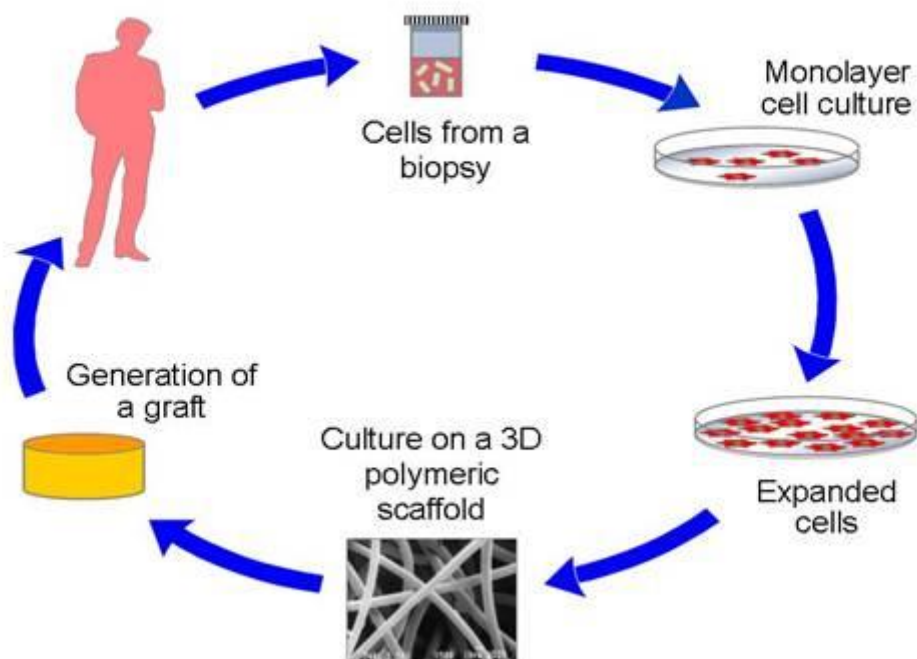
**Buňky** mohou pocházet z různých zdrojů dle jejich dostupnosti. Pokud pocházejí od stejného jedince, označují se jako *autologní* (např. Jiří Novák dárce – Jiří Novák příjemce). Buňky pocházející od stejného živočišného druhu se označují jako *alogenní* (např. Jan Svoboda dárce – Jiří Novák příjemce). Pokud buňky pochází od jiného živočišného druhu, označují se jako *xenogenní* (např. prasátko Pepa dárce - Jiří Novák příjemce). Dále se mohou lišit tzv. diferenciací – mohou být využívány buňky *terminálně diferencované* nebo buňky *kmenové*. Tyto termíny budou podrobněji rozebrány v sekci B) Buňky, mezibuněčná hmota, interakce buněk s biomateriály. Kmenové buňky jsou využívány zejména pro svoji schopnost se neomezeně dělit, což je zásadní předpoklad pro jejich namnožení v laboratorních podmínkách. S využitím kmenových buněk je často spojován termín **regenerativní medicína**. Regenerativní medicína je definována jako „proces nahrazování, vytváření nebo regenerace lidských nebo zvířecích buněk, tkání či orgánů pro obnovu normální funkce“. U regenerativní medicíny nemusí být využívány tkáňové nosiče. Termíny tkáňové inženýrství a regenerativní medicína

mají však mnoho společných znaků a mohou být v určitých případech zaměňovány díky společným cílům.

Jako poslední pilíř byly zmíněny **signály**, pod které lze zařadit všechny faktory, které ovlivňují tkáňové nosiče a buňky. Může se jednat o chemické či fyzikální působení. Scaffoldy mohou být obohaceny o látky, které ovlivňují buněčné funkce (zlepšení buněčné adheze modifikací povrchu materiálu, inkorporace látek ovlivňujících buněčnou proliferaci – např. růstových faktorů). Chemické „signály“ mohou být přidávány *in vitro* k buněčným kulturám, což může zvyšovat jejich proliferaci nebo navozovat jejich diferenciaci v určitý buněčný typ (např. při využití kmenových buněk). Mezi fyzikální signály patří např. stimulace pomocí mechanického namáhání. Tyto signály jsou využívány např. při konstrukci náhrad kostních, kloubních či cévních, které jsou v organismu určitým způsobem namáhány. Existují specifické typy bioreaktorů, které umožňují napodobení přirozeného prostředí buněk v laboratorních podmínkách. Pro každou tkáň mají specifické uspořádání umožňující vývoj funkční tkáně za podmínek blížících se podmínkám *in vivo*.

Tyto 3 pilíře – scaffoldy, buňky a signály (viz obr. 1) mohou být kombinovány různými způsoby tak, aby se dosáhlo konečné regenerace požadované tkáně. Obecně je obvykle popisován proces tkáňového inženýrství přístupem tzv. *in vitro* tkáňového inženýrství, který je zobrazen na obr. 2. Během tohoto postupu dochází nejprve k izolaci buněk (specializovaných či kmenových). Ty je nutné dostatečně namnožit v laboratorních podmínkách. V případě práce s kmenovými buňkami je možná také jejich diferenciaci v podmínkách *in vitro*. V dalším kroku jsou tyto namnožené buňky nasazeny na tkáňový nosič, který by měl být před implantací rovnoměrně osídlen buňkami v celém svém 3D objemu. K tomuto kroku se obvykle využívají různé typy bioreaktorů. Následně je tento osazený scaffold implantován do těla pacienta. Nevýhodou tohoto přístupu je doba „výroby“ osídleného scaffoldu. Namnožení buněk v laboratorních podmínkách a následná adheze a proliferace buněk přímo v tkáňovém nosiči může trvat řádově týdny až měsíce a v případě urgentní operace není možné tento přístup použít. Naopak výhodou je, že mohou být využity pacientovy vlastní buňky, což vede k lepšímu přijetí scaffoldu po implantaci. Otázkou je dostupnost a kvalita daných buněk při poškození tkáně, proto je možné volit cestu odběru kmenových buněk a využít jejich následnou diferenciaci.

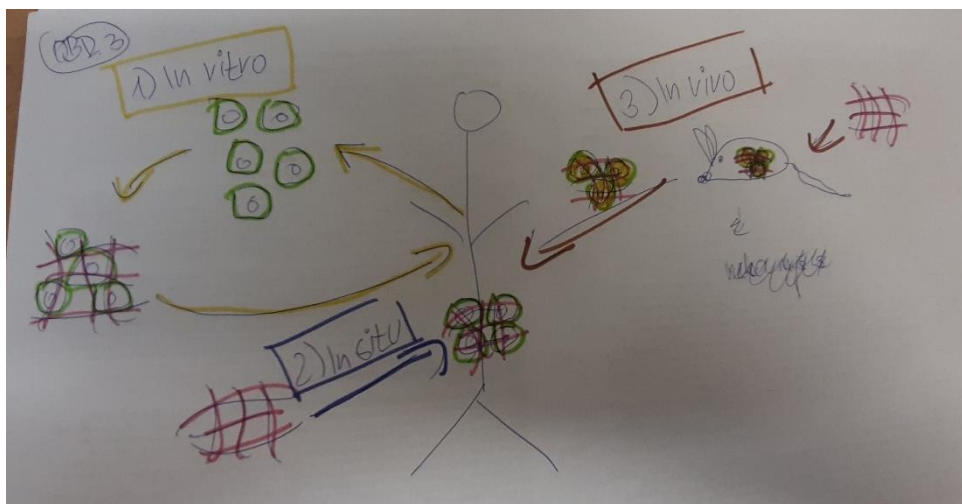
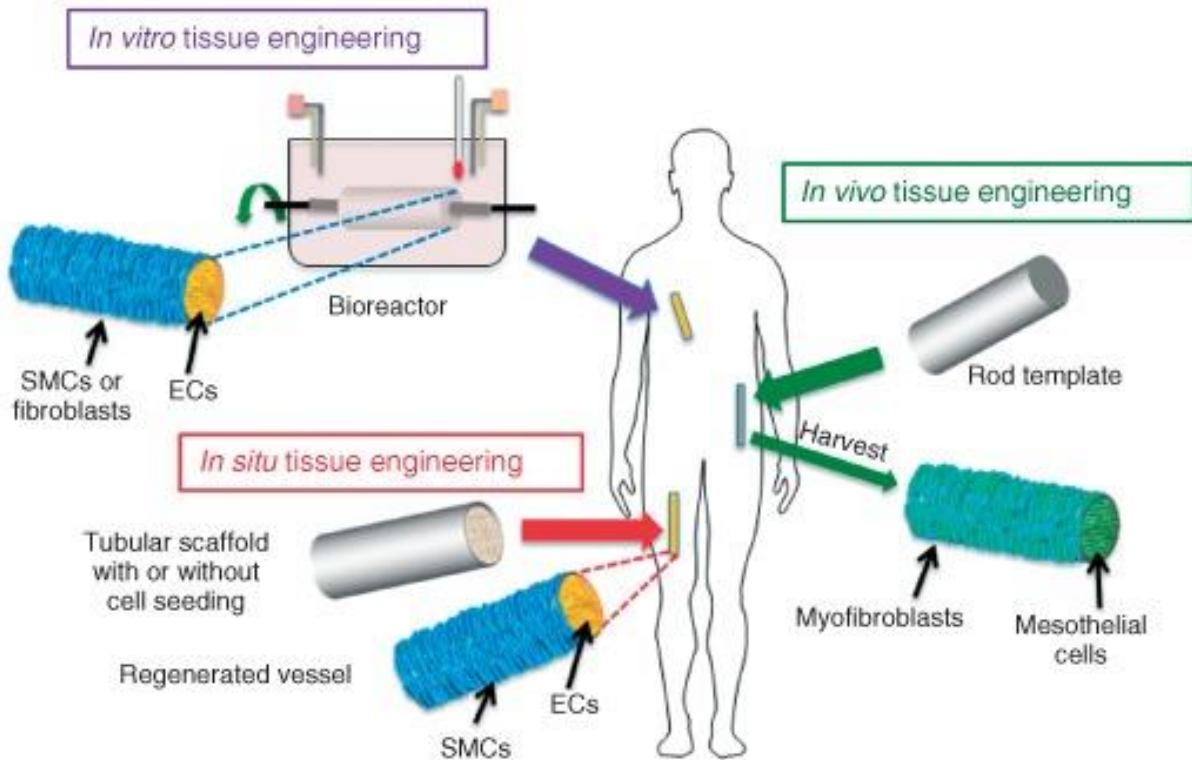
## Basic principles of Tissue engineering



Obr. 2: Proces *in vitro* tkáňového inženýrství: odběr buněk (specializované / kmenové), jejich namnožení v laboratorních podmínkách, osazení scaffoldu, implantace pacientovi.

Mimo tento „klasický“ přístup existují ještě další varianty označované jako *in vivo* a *in situ* tkáňové inženýrství. Příklady těchto přístupů jsou zobrazeny na obr. 3. *In situ* tkáňové inženýrství využívá schopnosti regenerace tkáně přímo v organismu. Implantuje se samotný tkáňový nosič bez buněk do poškozeného místa. Díky povrchovým vlastnostem scaffoldu dochází k interakcím s adhezními bílkovinami a následně k adhezi a proliferaci buněk, které osídlí tkáňový nosič přímo v těle pacienta. Pokud je použit biodegradabilní materiál, dojde postupně k jeho odbourání a k tvorbě mezibuněčné hmoty, kterou produkují samotné buňky.

Tento přístup má obrovskou výhodu v okamžité aplikaci. Sterilní scaffolds mohou být implantovány i při akutních stavech. Tkáňový nosič musí ideálně simulovat prostředí přirozené tkáně, aby mohlo dojít k regeneraci. Musí se také jednat o tkáň, která má alespoň částečně zachovanou regenerační schopnost.



Obr. 3: Ukázky *in vitro*, *in vivo* a *in situ* přístupu tkáňového inženýrství.

Posledním přístupem tkáňového inženýrství je tzv. *in vivo* tkáňové inženýrství, které bude demonstrováno na známém pokusu s tzv. Vacantiho myší. Jedná se o experiment, který proslavil tento obor, přestože vedl zpočátku ke klamavému vysvětlení v médiích (byl použit v boji proti geneticky modifikovaným organismům, přestože zde k žádné genetické modifikaci nedošlo). V experimentu jsou použity přístupy *in vitro* a *in vivo* tkáňového inženýrství. Přístup *in vivo* využívá živý organismus jako bioreaktor, kde po implantaci (nejčastěji do podkoží)

dochází k přestavbě tkáňového nosiče. Roku 1997 byl publikován článek, který popisoval vývoj chrupavčité tkáně v organismu myši. Chrupavčitá tkáň postrádá regenerační schopnost, proto je velmi obtížná její náhrada. V tomto pokusu byl vytvořen konstrukt v podobě ucha z netkané textilie složený z biodegradabilních polyesterů (polyglykolid ponořený do roztoku polylaktidu). Tento materiál byl v laboratorních podmínkách osázen chondrocyty izolovanými z bovinní kloubní chrupavky (*in vitro* přístup). Poté byl tento osázený scaffold implantován do podkoží myši (viz obr. 4, *in vivo* přístup). Po 12ti týdnech došlo v organismu myši k vytvoření komplexní struktury, která svou stavbou připomínala skutečný ušní boltce. Tento experiment byl ve své době zcela průlomový a nastartoval éru rychle se rozvíjejícího se oboru tkáňového inženýrství. Tkáňové inženýrství *in vivo* tedy využívá organismu pro vytvoření komplexních struktur pro další implantace. Vacantiho myš dokázala „vytvořit“ strukturu připomínající strukturu ušního boltce 3letého dítěte. Tento experiment měl za cíl vytvořit náhradu lidské funkční tkáně.



Obr. 4: Experiment známý pod názvem „Vacanti mouse“ – konstrukt ve tvaru ucha osázený bovinními chondrocyty po implantaci do podkoží myši. Zdroj: [https://en.wikipedia.org/wiki/Vacanti\\_mouse](https://en.wikipedia.org/wiki/Vacanti_mouse)

#### **Použitá a doporučená literatura:**

Cao Y., Vacanti J.P., Paige K.T., Upton J., Vacanti C.A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1997, 100 (2):297-302. DOI: 10.1097/00006534-199708000-00001

Langer R., Vacanti J.P. Tissue Engineering. Science 1993, 260 (5110): 920-6. DOI: 10.1126/science.8493529

Vacanti C.A. The history of tissue engineering. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2006, 10 (3): 569-76. DOI: 10.2755/jcmm010.003.20

# A. Scaffoldy

První sekce je věnována tkáňovým nosičům. Jsou představeny požadavky na materiály pro medicínské aplikace, dále jsou rozebrány nejvýznamnější materiály používané pro konstrukci scaffoldů. Kapitola obsahuje stručný popis technologií pro výrobu scaffoldů, je představena řada charakterizačních metod pro správné hodnocení vyvíjených materiálů. V neposlední řadě je zde zmíněna modifikace tkáňových nosičů a sterilizace scaffoldů.

# 1. Požadavky na materiály pro tkáňové inženýrství

Jana Horáková

*Důležité pojmy: biomateriál, zdravotnický prostředek, léčivý přípravek, přípravek moderní terapie, ČSN EN ISO 10993, biokompatibilita, reakce na cizí těleso.*

Tkáňové inženýrství je poměrně novým oborem, jehož produkty jsou zatím spíše vzácně v klinické praxi. V experimentálním vývoji je mnoho „produktů“ tkáňového inženýrství, ale uvedení do praxe je velmi zdlouhavý a složitý proces. Na počátku vývoje stojí vždy potřeba klinika pro vývoj určitého typu materiálu s definovanými vlastnostmi. Na základě znalosti problematiky pak dojde k návrhu tkáňového nosiče pro danou aplikaci. Jak již bylo zmíněno, může se jednat o kombinaci materiálů a technologií, kterými jsou zpracovány, různých typů buněk a signálů. Dále je tento tkáňový nosič řádně charakterizován – je nutné znát jeho fyzikální, chemické vlastnosti, morfologii, vhodný způsob sterilizace a její vliv na materiálové vlastnosti. V dalším kroku se přistupuje k *in vitro* testování, které obvykle zahrnuje testování cytotoxicity materiálu, test adheze a proliferace buněk, případně diferenciaci buněk. Dále je materiál podroben *in vivo* testování na laboratorních zvířatech (myši, potkani, králíci, prasata) a teprve po úspěšném testování na zvířatech mohou být zahájeny klinické testy na lidských pacientech.

Vyvíjené materiály je nutné správně klasifikovat a poté testovat podle platných norem. Jako biomateriál se označuje neživý materiál, který interaguje s živým systémem. Biomateriály se dále rozdělují na zdravotnické prostředky, léčivé přípravky a přípravky moderní terapie. Zdravotnický prostředek je definován jako nástroj nebo materiál, který se používá při zmírnění nemocí, k vyšetření pacientů, diagnóze nebo k prevenci nemocí. Může se jednat např. o kožní kryty (gáza, náplast). Naproti tomu léčivý přípravek je látka nebo kombinace látek, která je podávána lidem či zvířatům za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění jejich fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku. Do této skupiny spadají všechna léčiva. Další speciální kategorií jsou tzv. přípravky moderní terapie, kam spadají produkty tkáňového inženýrství. Jedná se o materiály, které obsahují upravené buňky nebo tkáň a slouží k obnově, opravě nebo nahrazení lidských tkání. U mnoha produktů tkáňového inženýrství je zařazení do kategorie sporné a je nutná konzultace se Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). SÚKL je podřízen Ministerstvu zdravotnictví, řídí se českou legislativou i mezinárodními dohodami.

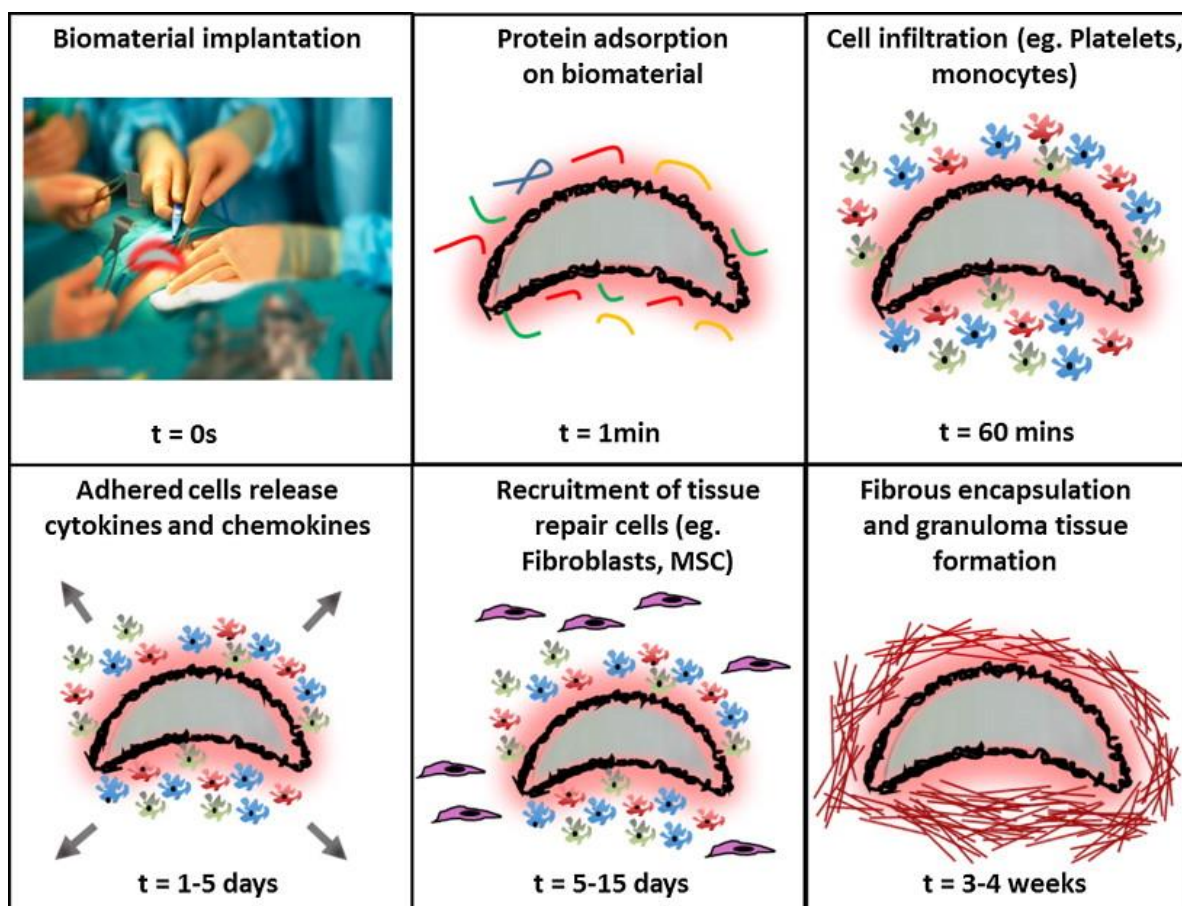
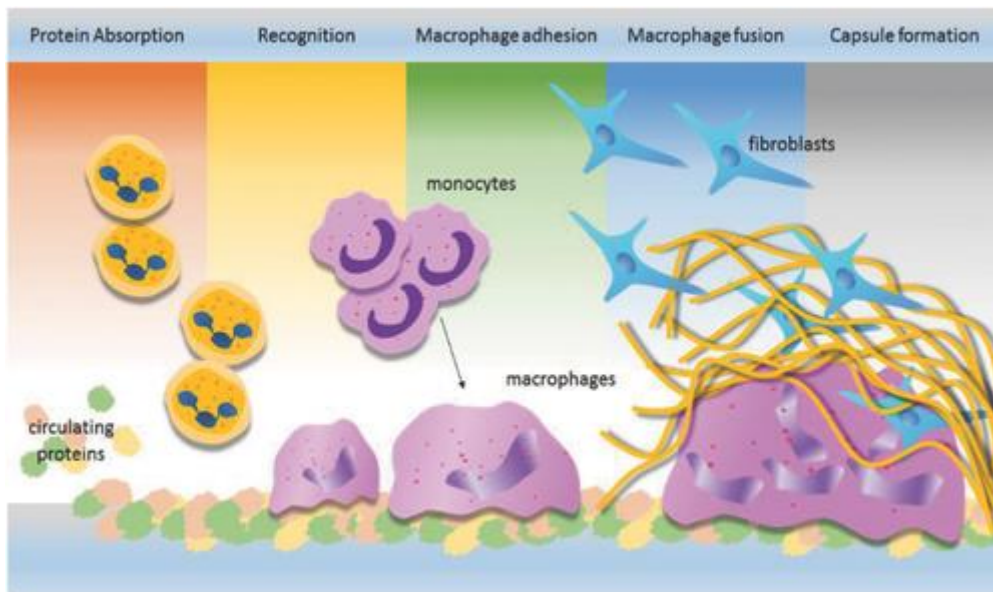
Materiály vyvíjené pro použití v medicíně musí splňovat řadu přísných kritérií. Testování vychází z normy ČSN EN ISO 10993 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků. Tato norma obsahuje 20 částí, které se zabývají např. *in vitro* testováním cytotoxicity materiálů, hodnocením interakce s krví, *in vivo* testováním (lokální účinky po implantaci, systémová toxicita), stanovením degradačních produktů, měřením reziduí po sterilizaci ethylen oxidem, chemickou, fyzikálně chemickou, mechanickou a morfologickou charakterizací. Některé požadované vlastnosti jsou specifické pro konkrétní použití, některé vlastnosti však musí být splněny bez výjimky. Jedná se např. o použití netoxických materiálů. Materiály nesmí negativně působit na okolní tkáň a buňky. Při použití degradabilních materiálů musí být

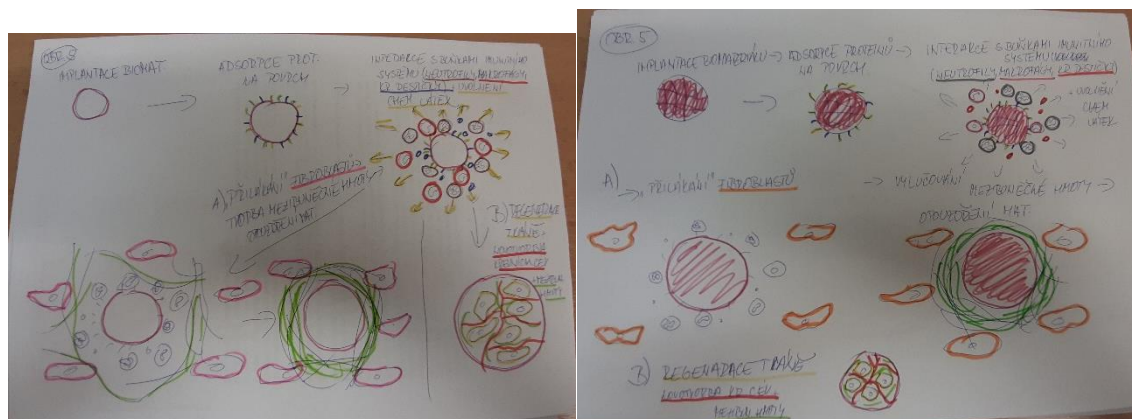
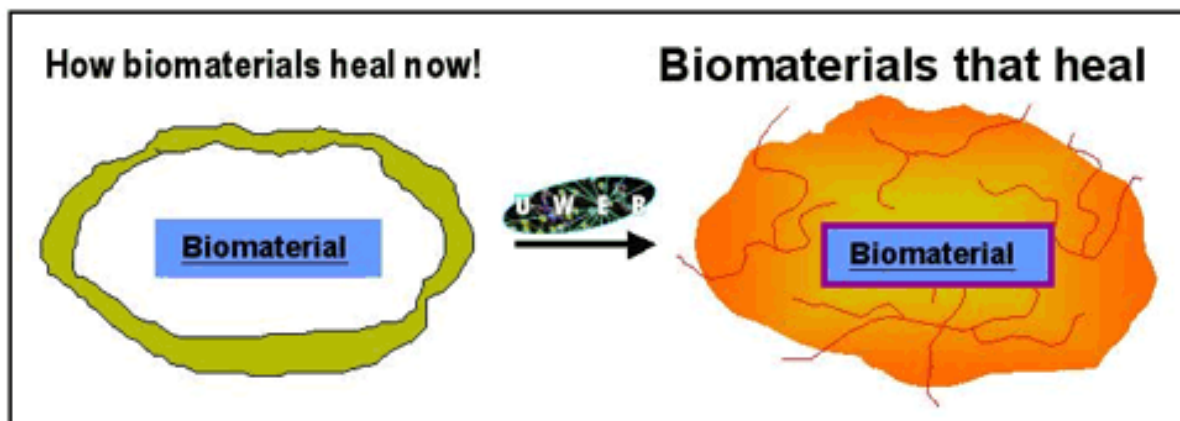


produkty jejich rozpadu také bezpečné a z těla by měly odcházet přirozenou cestou, nemělo by docházet k jejich akumulaci v tkáních / orgánech. Dále by materiály měly vyvolávat minimální odezvu imunitního systému. Nemělo by docházet k opouzdření materiálu kolagenními vlákny. Tkáňový nosič by měl mít vhodné mechanické vlastnosti, ideálně odpovídající nahrazované tkáni. Měl by být vyrobiteľný v průmyslovém měřítku ve vhodných rozměrech vhodných pro klinické použití. Dále by měla být zvažena vhodná sterilizační metoda a stanovení doby použitelnosti sterilního produktu. V neposlední řadě by měl být vyvíjený materiál cenově dostupný.

Materiály by měly být tzv. biokompatibilní, což je pojem, který bývá často nesprávně nadužíván. Definicí termínu biokompatibilita se zabývá Buddy Ratner v publikaci *The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century*. Poprvé byl termín „biokompatibilní“ použit v roce 1970, od té doby vzniklo mnoho definic. Jedna z nejčastěji uváděných definic tohoto termínu zní: „Schopnost materiálu vykonávat vhodnou funkci na daném místě v organismu bez vedlejších negativních účinků.“ Neexistuje však metodika, jak tuto *vhodnou funkci bez vedlejších negativních účinků* objektivně hodnotit. U materiálů implantovaných do organismu často dochází k tzv. reakci na cizí těleso (FBR – foreign body reaction) viz obr. 5. Po implantaci materiálu dochází k adsorpci proteinů na povrch biomateriálu. Tato reakce nastává velmi rychle (během několika minut). Navázané proteiny jsou rozpoznány krevními buňkami (neutrofil, makrofágy, krevní destičky). Po navázání krevních buněk na adsorbované proteiny dochází k uvolnění chemických látek, tzv. cytokinů, které ovlivňují další buněčné typy. Jedná se nejčastěji o fibroblasty, které se začnou množit v okolí biomateriálu a které začnou produkovat mezibuněčnou hmotu ve formě kolagenních vláken. Kolagen tak zcela opouzdří implantovaný biomateriál a ten je tak „oddělen“ od organismu. Materiál však může i takto opouzdřený po určitou dobu plnit svoji funkci, proto i tyto materiály bývají označovány za „biokompatibilní“. Tato situace však není ideální a po čase dochází k selhávání těchto materiálů. V publikaci zmíněné výše doporučuje autor nazývat tyto materiály jako tzv. biotolerantní.

Koncept tkáňového inženýrství však usiluje o vývoj materiálů, které budou integrovány do organismu a ne z něj „vyčleněny“ kolagenním opouzdřením. Jen takové materiály by se měly označovat termínem biokompatibilní. Po implantaci do organismu vždy dojde k imunitní odezvě, ta by však měla být minimální a neměla by vést až k fibrotické reakci. Adsorbované proteiny a na ně navázané buňky krevního řečiště by měly navodit „hojící reakci“, která vede k adhezi a proliferaci buněk z okolí, které prorostou tkáňový nosič, začnou produkovat vlastní mezibuněčnou hmotu, zatímco degradabilní scaffold je postupně odbourán. Zároveň by mělo dojít k novotvorbě krevních cév, tzv. neoangiogenezi, aby mohla být nově vznikající tkáň plně vyživována. Takto by měla ideálně probíhat regenerace poškozené tkáně.





Obr. 5: Reakce na cizí těleso – implantace biomateriálu do organismu.

Tkáňové inženýrství většinou využívá biodegradabilních materiálů právě proto, aby byla umožněna regenerace poškozené tkáně s využitím tkáňového nosiče. Scaffold by měl co nejlépe simulovat původní tkáň svými morfologickými i mechanickými vlastnostmi. Vláknenné materiály napodobují vláknennou složku mezibuněčné hmoty (kolagenní, elastinová vlákna), nevláknenné materiály pak mohou simulovat amorfnní složku mezibuněčné hmoty (proteoglykany). Vhodně zvolenými polymerními materiály lze řídit mechanické vlastnosti scaffoldu a jejich degradaci v organismu. Důležitá je i porozita materiálu, aby mohlo docházet ke správné „komunikaci“ mezi tkáňovým nosičem a buňkami. Póry musí být dostatečně veliké (řádově desítky mikrometrů) a propojené (interkonektivita), aby buňky mohly prorůstat do scaffoldu a vytvořit tak 3D funkční strukturu. V pozdějším stadiu hojení musí vzniknout i nové cévní zásobení (neoangiogeneze), aby byla tkáň správně vyživována.

Jako biomateriály se nejčastěji používají 3 typy materiálů – kovy, keramika a polymery. Kovy a keramika jsou v současné době využívány v klinické praxi jako umělé náhrady např. kloubů, zubů apod.

Kovy vynikají svými mechanickými vlastnostmi. Nejčastěji se používají nerezová ocel, slitiny kobaltu a chromu, titanové slitiny, zlato, platina. Využívají se zejména v ortopedii, zubním lékařství a v cévní a srdeční chirurgii (stenty, umělé srdeční chlopně).

Keramické materiály jsou velmi tvrdé a křehké. Jsou velmi stabilní. Používají se také v ortopedii a v zubním lékařství. Nejvíce se používají oxidy hliníku, zirkonu a kalcium fosfát.

Polymerní materiály jsou nejvíce používanými materiály pro konstrukci tkáňových nosičů. Polymerních materiálů vyvíjených pro biomedicínské aplikace je celá řada. V následujících kapitolách budou podrobněji probráni nejvýznamnější zástupci jednotlivých skupin. Polymery se dají dělit podle několika hledisek. Rozlišují se polymerní materiály přírodního původu a synteticky vyráběné. Přírodní polymery zajišťují lepší interakci s buňkami, na druhou stranu je zde velká variabilita vlastností těchto materiálů (tzv. batch to batch variability), což komplikuje jejich zpracování. Syntetické materiály mají lépe definované vlastnosti, některé vlastnosti lze řídit jejich výrobou, což usnadňuje následné zpracování. Obvykle však nevytváří vhodné podmínky pro buněčnou adhezi, proto bývají často kombinovány s přírodními materiály nebo povrchově modifikovány pro zvýšení buněčné adheze.

Dále se mohou dělit podle rozložitelnosti v organismu na degradabilní a nedegradabilní. Dříve se používaly spíše nedegradabilní materiály, ale v posledních letech se tkáňové inženýrství zaměřuje spíše na degradabilní materiály, aby byla zajištěna regenerace poškozené tkáně.

#### **Použitá a doporučená literatura:**

Státní ústav pro kontrolu léčiv. *SUKL* [online]. 2010 [cit. 2023-10-25]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/>

Ratner B.D. The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 2011, 4 (5): 523-7. DOI: 10.1007/s12265-011-9287-x

Bauer S., Schmuki P., von der Mark K., Park J. Engineering biocompatible implant surfaces: Part1: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science* 2013, 58 (3): 261-326. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.001

TECHNICKÉ NORMY ČSN. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků* ČSN EN ISO 10993 (855220), 2021.

## 2. Přírodní materiály pro výrobu tkáňových nosičů

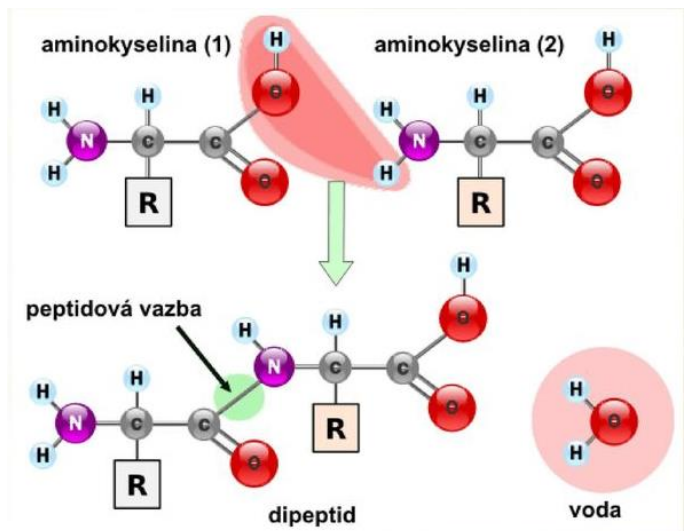
Jana Horáková, Markéta Klíčová

*Důležité pojmy: aminokyseliny, proteiny – primární, sekundární, terciární, kvartérní struktura, funkce proteinů, kolagen, želatina, elastin, přírodní hedvábí, polysacharidy – struktura, funkce, celulóza a její deriváty, chitin, chitosan, alginát, glykosaminoglykany, kyselina hyaluronová, polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát*

Přírodní materiály používané pro výrobu tkáňových nosičů se dělí podle své struktury na proteiny a polysacharidy. V následující kapitole budou uvedeny základní informace o struktuře a zástupcích přírodních polymerních materiálů. Přírodní materiály vykazují lepší adhezivitu pro buňky. Nevýhodou je jejich variabilita, která se liší podle zdroje přírodního materiálu díky biologické variabilitě tkání, ze kterých jsou extrahovány. Přírodní polymery degradují enzymaticky, proto degradabilita v lidském organismu závisí na přítomnosti daných enzymů. Mezi přírodními materiály se vyskytují degradabilní polymery jako např. kolagen (díky přítomnosti kolagenáz v lidském těle) i nedegradabilní polymery jako např. celulóza (díky absenci celuláz v lidském organismu).

### 2.1. Proteiny

Bílkoviny neboli proteiny jsou makromolekulární látky složené z aminokyselin (AMK). Aminokyseliny jsou organické kyseliny obsahující aminovou ( $-NH_2$ ) a karboxylovou ( $-COOH$ ) skupinu (viz obr. 6). V živých organismech rozlišujeme 20 druhů aminokyselin, které se liší uhlovodíkovým zbytkem ( $-R$ ). Biogenní aminokyseliny patří mezi tzv.  $\alpha$ -L-aminokyseliny. Aminoskupina je vázána na tzv.  $\alpha$ -uhlík (2. atom uhlíku řetězce karboxylové kyseliny). Dále je na  $\alpha$ -uhlíku navázán atom vodíku a postranní řetězec, jedná se tedy o chirální uhlík se čtyřmi různými substituenty. Díky tomu jsou aminokyseliny opticky aktivní, v lidském těle se vyskytují pouze L-formy. Reaktivní skupiny aminokyselin se v přirozeném prostředí lidského těla (pH 7,4) vyskytují v disociované formě ( $COO^-$ ,  $NH_3^+$ ). Některé aminokyseliny si tělo umí samo syntetizovat, označují se jako neesenciální. Část aminokyselin však musí být organismu dodávána potravou, jedná se o tzv. esenciální aminokyseliny. Jednotlivé aminokyseliny jsou v molekulách proteinů spojeny peptidovou vazbou, která vzniká mezi karboxylem jedné aminokyseliny a aminoskupinou druhé aminokyseliny za odštěpení molekuly vody (viz obr. 6). Bílkoviny jsou tvořeny řetězcem aminokyselin spojených kovalentní peptidovou vazbou. Uhlovodíkové zbytky pak tvoří postranní řetězec, který určuje vyšší strukturu proteinů, kde se uplatňují i další interakce jako např. vodíkové můstky, iontové vazby, van der Waalsovy síly.



Obr. 6: Struktura aminokyseliny a vznik peptidové vazby.

Podle počtu aminokyselin v polypeptidovém řetězci se rozlišují oligopeptidy obsahující 2-10 AMK, polypeptidy složené z 11-100 AMK a proteiny obsahující více než 100 AMK. Pořadí aminokyselin v řetězci určuje *primární strukturu* proteinu. Z 20ti aminokyselin může vzniknout obrovské množství bílkovin (u polypeptidového řetězce o 100 AMK je možné získat  $20^{100}$  kombinací). Pořadí AMK a charakter jejich postranních řetězců podmiňuje chemické vlastnosti proteinu. Molekuly bílkovin však musí být ještě dále uspořádány, aby mohly plnit své funkce. *Sekundární struktura* popisuje uspořádání několika AMK v řetězci. Rozlišují se 2 základní konformace:  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaný list, které jsou stabilizované vodíkovými můstky mezi skupinami N-H a C=O. V jednom proteinu se obvykle vyskytují obě konformace v určitých úsecích. Struktura  $\alpha$ -helixu vytváří pravidelnou šroubovici, kde se polypeptidový řetězec ovíjí kolem sebe sama a tvoří dutý válec, postranní řetězce AMK směřují vně. Výskyt  $\alpha$ -šroubovice je častý v proteinech buněčných membrán.  $\beta$ -skládaný list je tvořen antiparalelními řetězci, které jsou spojeny pomocí vodíkových můstků, postranní řetězce AMK směřují nad a pod rovinu  $\beta$ -skládaného listu. *Terciární struktura* popisuje trojrozměrné chování celého polypeptidového řetězce. Rozlišují se globulární proteiny (např. albumin<sup>1</sup> či enzymy) vyznačující se kompaktním kulovitým tvarem a fibrilární proteiny (např. intermediární filamenta, kolagen, elastin). Tyto struktury mohou být stabilizovány disulfidovými můstky, které se tvoří mezi AMK obsahujícími síru ve svém postranním řetězci (cystein). *Kvartérní struktura* charakterizuje uspořádání podjednotek složitých proteinů (např. fibrily kolagenu, podjednotky hemoglobinu).

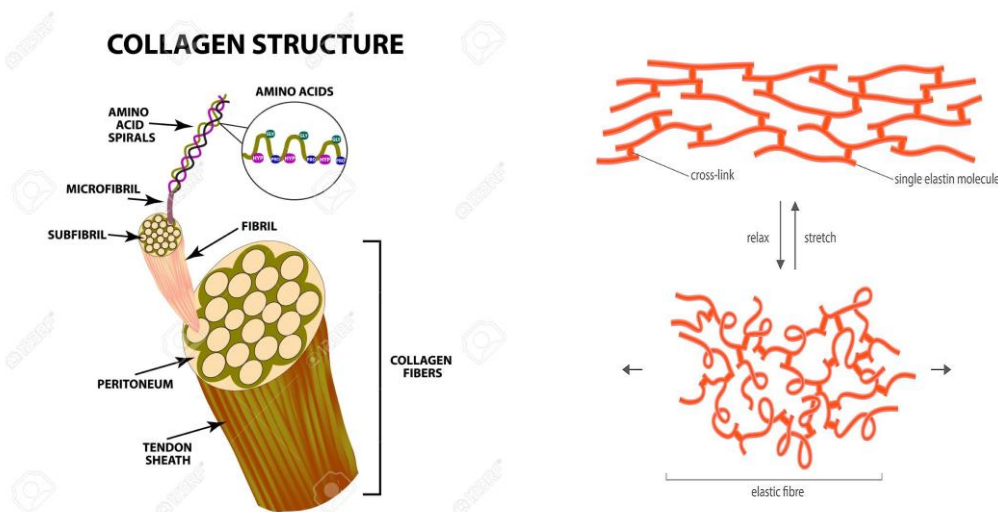
<sup>1</sup> Albumin – nejvíce zastoupená bílkovina v krevním séru, dále se vyskytuje v tkáňovém a mozkomíšním moku. Zajišťuje transport látek, podílí se na udržení stálého vnitřního prostředí (homeostáza).

Proteiny plní v organismu mnoho esenciálních funkcí. Některé proteiny mají stavební funkci, k nim patří např. bílkoviny mezibuněčné hmoty (kolagen, elastin) a cytoskeletu (keratin - intermediární filamenta). Dále mohou proteiny zajišťovat transport a skladování látek (hemoglobin, transferin, albumin), pohybovou funkci (aktin, myosin) a ochranné funkce (protilátky). Důležitá je také enzymatická a regulační funkce bílkovin, která řídí buněčné pochody.

V tkáňovém inženýrství nachází uplatnění zejména některé vybrané proteiny, které budou podrobněji probrány v následujících odstavcích. Zejména se jedná o přirozené složky mezibuněčné hmoty jako je kolagen a elastin.

### 2.1.1. Kolagen

Kolagen je nejhojněji zastoupený protein v živočišných organismech, tvoří asi 25-35 % celkového proteinu v těle. Vyskytuje se v pojivových tkáních, kde zajišťuje jejich pevnost. Ta je dána jeho uspořádanou strukturou, která je zobrazena na obr. 7A. Polypeptidový řetězec kolagenu je složen nejčastěji z aminokyselin glycinu, prolinu a hydroxylovaných aminokyselin hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Polypeptidový řetězec vykazuje pravidelnou strukturu – na každé třetí pozici se vyskytuje aminokyselina glycin. Díky této pravidelné struktuře dochází ke vzniku trojšroubovice o průměru cca 1,5 nm, kde jsou 3 polypeptidové řetězce kolagenu obtočeny kolem sebe. Tyto trojšroubovice jsou dále uspořádány do tzv. kolagenových fibril o průměru cca 10-300 nm, dosahují délky několika mikrometrů. Kolagenové fibrily se organizují do silných kolagenových vláken o průměru 0,5-3  $\mu\text{m}$ . Kolagen je produkován buňkami pojivové tkáně (fibroblasty, osteoblasty, chondroblasty). Buňky produkují prekurzor kolagenu, tzv. prokolagen. Organizované uspořádání kolagenových vláken se uskutečňuje vně buněk. Existuje několik typů kolagenu (bylo popsáno cca 27 typů) vyskytující se v různých tkáních, jsou označovány velkými římskými číslicemi (I-XXVII).



Obr. 7: Uspořádání fibrilárních proteinů kolagenu (A), elastinu (B).

Kolagen ve vlhkém prostředí přirozeně váže vodu, což vede ke změně jeho vlastností. V organismu proto dochází k bobtnání, kdy kolagen může několikanásobně zvětšit svůj objem. Kolagen je odbouráván enzymaticky působením specifických enzymů kolagenáz.

Zahříváním kolagenu ve vodném roztoku vzniká **želatina**, která také může být využita pro konstrukci tkáňových nosičů. Želatina může být použita jako výchozí materiál, má menší molekulovou hmotnost než kolagen. Její složení se může velmi lišit v závislosti na zdroji či stupni hydrolyzy. Během zpracování kolagenu různými technologiemi může docházet k hydrolyze, proto výsledné scaffoldy mohou být tvořeny spíše želatinou než samotným kolagenem. Kolagen ve vodném roztoku podléhá progresivní hydrolytické degradaci, kdy dochází ke štěpení příčných kovalentních vazeb i peptidových vazeb v polypeptidovém řetězci. Rychlost této degradace závisí na okolních podmínkách, jako jsou teplota, pH.

Kolagen se pro tkáňové nosiče zpracovává nejčastěji technologií lyofilizace. Je možné ho i elektrostaticky zvláknit, obvykle ve směsi s jiným polymerem. Pro stabilizaci scaffoldu je pak nutné zesíťování kolagenu pomocí chemických nebo fyzikálních metod.

### 2.1.2. *Elastin*

Elastin patří mezi další přirozeně se vyskytující proteiny mezibuněčné hmoty, proto bývá velmi často využíván pro konstrukci tkáňových nosičů. Uplatňuje se zejména v aplikacích, které vyžadují elastické chování materiálu jako např. pro náhradu krevních cév, plic či kůže. V lidském těle je elastin syntetizován ve formě rozpustného prekurzoru tropoelastinu určitými typy buněk (hladkosvalové buňky, endotelové buňky, fibroblasty, chondrocyty). Polypeptidový řetězec elastinu obsahuje asi 75% aminokyselin s hydrofobním postranním řetězcem (glycin, valin, alanin). Elastin je ve vodě nerozpustný díky četným crosslinkům mezi řetězci, jeho struktura je znázorněna na obr. 7B. Elastinová vlákna jsou také velmi stabilní.

Pro tkáňové inženýrství může být použit elastin v několika formách. Přirozený elastin může být získán např. procesem decelularizace tkání bohatých na elastin, kdy dojde k odstranění buněčných komponent a reziduální mezibuněčná hmota může sloužit jako scaffold. Dále může být použit čistý izolovaný elastin, problém však bývá s jeho dostupností díky jeho nerozpustnosti. Proto se častěji volí použití částečně hydrolyzovaného rozpustného elastinu. Mimo přirozené zdroje elastinu je dnes možné použít i elastin syntetický produkovaný rekombinant<sup>2</sup> bakteriemi (nejčastěji *Escherichia coli*) nebo vyrobený chemickou syntézou. Takto uměle mohou být připraveny různé formy elastinu jako např. rozpustný tropoelastin či „elastinu podobné polypeptidy“ (elastin like polypeptides).

Elastin je možné elektrostaticky zvláknit, jako rozpouštědla se používají fluorovaná rozpouštědla typu trifluoroethanol (TFE) či hexafluoroisopropanol (HFIP). Největší uplatnění má elastin v cévním tkáňovém inženýrství, kde se kombinuje s jinými polymery (syntetickými i přírodními) pro dosažení ideálních vlastností cévních náhrad.

### 2.1.3. *Přírodní hedvábí*

Přírodní hedvábí (silk fibroin) je produktem vyměšovacíh žláz housenky bource morušového (*Bombyx mori*). Kukla bource morušového se skládá z dlouhých vláken fibroinu (tvoří asi

---

<sup>2</sup> Rekombinantní protein – do genomu producenta (bakterie) je uměle začleněn gen produkující požadovanou bílkovinu (elastin)



75%), která jsou spojena sericinem (25%). Amorfni sericin je během zpracování kokonu odstraněn, pro scaffoldy se využívá jen semikrystalický fibroin. Vlákna přírodního hedvábí jsou tvořena převážně aminokyselinami glycin, alanin a serin. Tyto sekvence aminokyselin jsou uspořádány v  $\beta$ -skládaný list. Má výborné mechanické vlastnosti (vysoká pevnost, elasticita), je biodegradabilní. V tkáňovém inženýrství nachází široké uplatnění v mnoha aplikacích jako např. kožní kryty, cévní a kostní tkáňové inženýrství. Může být zpracováván do podoby (nano)vláken, folií, 3D porézních materiálů či hydrogelů.

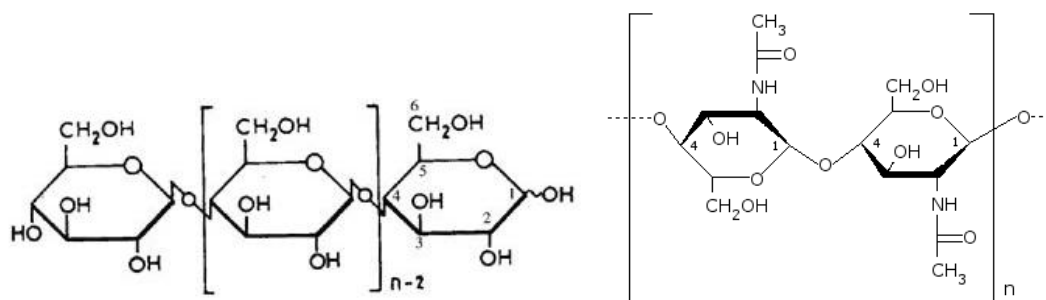
## 2.2. Polysacharidy

Polysacharidy jsou další velmi využívanou skupinou přírodních polymerů pro konstrukci scaffoldů. Makromolekuly polysacharidů jsou složeny z jednotek monosacharidů spojených glykosidovou vazbou. Monosacharidy jsou po chemické stránce polyhydroxyderiváty karbonylových sloučenin (aldehydů a ketonů). Podle funkční skupiny se dělí na aldózy a ketózy. Podle počtu uhlíku v řetězci je možné monosacharidy rozdělit na triózy, tetrózy, pentózy a hexózy, přičemž v polysacharidech využívaných tkáňovým inženýrstvím se uplatňují především šestiuhlíkaté cukerné jednotky. V roztocích se monosacharidy vyskytují v cyklické formě. Nejvýznamnějším monosacharidem je glukóza (Glc), která slouží v buňkách jako zdroj energie. Glukóza patří mezi aldohexózy. Mezi další významné monosacharidy patří fruktóza (Fru, ketohexóza), galaktóza (Gal, aldohexóza), ribóza (aldopentóza). Dvě molekuly monosacharidů se mohou spojovat kondenzační reakcí v molekulu disacharidu za odštěpení molekuly vody. Mezi disacharidy se řadí např. sacharóza (Glc+Frc), laktóza (Glc+Gal), maltóza (Glc+Glc). Monosacharidové jednotky se stejným způsobem mohou spojovat i v dlouhé makromolekulární řetězce nazývané polysacharidy. Díky přítomnosti hydroxylových skupin mohou být polysacharidy lineární neb větvené.

Sacharidy zastávají v organismu několik důležitých funkcí. Monosacharidy slouží jako energetická zásoba pro buňky (Glc, Fru), jsou složkou nukleových kyselin (ribóza, deoxyribóza). Polysacharidy mají funkci zásobní (glykogen u živočichů, škrob u rostlin) a stavební (chitin, celulóza). V následujících odstavcích budou podrobněji popsány polysacharidy využívané v tkáňovém inženýrství, mezi které patří celulóza, chitin, chitosan, alginát, kyselina hyaluronová.

### 2.2.1. Celulóza

Celulóza je polysacharid tvořený jednotkami glukózy (cca 500 jednotek) spojenými glykosidovou vazbou, její struktura je znázorněna na obr. 8A. Makromolekuly tvoří dlouhé, nerozvětvené řetězce, které nejsou rozpustné ve vodě. Celulóza je hlavní stavební látka buněčných stěn rostlin, představuje nejrozšířenější biopolymer na Zemi. Pro živočichy je nestravitelná, jelikož v organismech živočichů chybí enzymy (celulázy) pro štěpení  $\beta$ -1,4 glykosidové vazby. Pro tkáňové inženýrství se využívají spíše deriváty celulózy (acetát celulózy, oxidovaná celulóza). Díky přítomnosti četných hydroxylových skupin je modifikace celulózy velmi snadná a často využívaná.



Obr. 8: Chemická struktura celulózy (A), chitinu (B).

V posledních letech se velmi rozvíjí využití nanocelulózy, která se může vyskytovat ve formě nanofibril či nanokrystalů. Může být produkována různými typy bakterií nebo izolována z rostlin. Všechny typy nanocelulózy jsou využívány pro konstrukci tkáňových nosičů a drug delivery systémy. Je možné je zpracovat řadou technologií včetně elektrostatického zvláknování.

### 2.2.2. Chitin

Chitin je další zástupce polysacharidů, který se hojně využívá v tkáňovém inženýrství. Jedná se o druhý nejrozšířenější polysacharid po celulóze. Chitin tvoří základní stavební složku kutikuly členovců (krabů, raků, hmyzu), ze kterých se také získává. Dále se nachází v buněčné stěně hub. Makromolekula chitinu je složená z monomerních jednotek N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny  $\beta$ -1,4 glykosidovou vazbou. Chemicky má chitin podobné složení jako celulóza, místo hydroxylové skupiny na C2 uhlíku se vyskytuje acetamidová funkční skupina (viz obr. 8B).

Chitin patří mezi biodegradabilní polysacharidy, může být zpracován nejrůznějšími technologiemi do různých struktur. Je možné ho i elektrostaticky zvláknit. Je rozpustný pouze v omezeném množství rozpouštědel jako např. silné kyseliny, fluorovaná rozpouštědla (HFIP) nebo dimethylacetamid., což limituje jeho zpracování. Scaffolds na bázi chitinu nachází uplatnění v mnoha aplikacích tkáňového inženýrství.

### 2.2.3. Chitosan

Chitosan je deacetylovaný derivát chitinu, který je využíván v tkáňovém inženýrství častěji než chitin. Je složen z jednotek glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Získává se částečnou deacetylací chitinu, stupeň deacetylce (DD – degree of deacetylation) je důležitým parametrem tohoto polymeru, který ovlivňuje jeho vlastnosti. Jako chitosan se označuje molekula, která má stupeň deacetylce alespoň 60%. Přítomné aminoskupiny v polymerním řetězci se mohou vyskytovat v protonizované formě ( $\text{NH}_3^+$ ), což zajišťuje jeho lepší rozpustnost v porovnání s chitinem. Chitosan je rozpustný ve zředěných kyselinách ( $\text{pH} < 6$ ). Vykazuje antimikrobiální a hemostatické vlastnosti, je biodegradabilní. Je možné ho zpracovat mnoha technologiemi včetně elektrostatického zvláknování. Díky protonizaci molekuly je elektrostatické zvláknování samotného chitosanu poněkud obtížné. Často se tedy využívá zvláknování derivátů chitosanu nebo přidavek dalších, lépe zvláknitelných polymerů (PEO, PVA).

#### 2.2.4. Alginát

Alginát patří také mezi polysacharidy hojně využívané v tkáňovém inženýrství. Získává se nejčastěji z hnědých mořských řas, mohou ho produkovat i určité typy bakterií. Molekuly alginátu se skládají ze dvou základních složek  $\beta$ -1,4-D-manuronátu (M) a  $\alpha$ -L-guluronátu (G). Alginát je složen z bloků těchto základních složek (MMMMMM a GGGGGG) a z částí, kde se vyskytuje alternativní uspořádání manuronátu a guluronátu (MGMGMG). Zastoupení těchto 2 složek i jejich uspořádání se liší podle zdroje alginátu. Alginát je vodorozpustný polymer, který se často zpracovává do podoby hydrogelů pro tkáňové nosiče. Dá se zpracovat i dalšími technologiemi do podoby mikročástic pro drug delivery systémy, porézních materiálů apod. Elektrostatické zvláknění alginátu je komplikované díky jeho struktuře – tvoří gely při nízké koncentraci, roztoky mají vysokou vodivost. Využívá se proto „nosných“ dobře zvláknitelných polymerů jako např. PVA, PEO nebo deriváty alginátu.

#### 2.2.5. Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou součástí mezibuněčné hmoty, proto se tyto materiály také používají v oboru tkáňového inženýrství. Jsou složené z opakujících se disacharidových jednotek. Řetězce glykosaminoglykanů jsou navázány na proteinovou kostru (osový protein). Jsou degradovány buňkami pojivové tkáně pomocí lysosomálních enzymů. Mezi zástupce glykosaminoglykanů patří *kyselina hyaluronová*, která bude rozebrána podrobněji v následujícím odstavci. Dále do této skupiny patří *chondroitin sulfát* vyskytující se v chrupavčité tkáni, *keratan sulfát* vyskytující se v rohovce, v kostní tkáni, *dermatan sulfát* nacházející se převážně v pokožce, dále i v krevních cévách, srdečních chlopních, ve šlachách, v plicích, *heparan sulfát* nacházející se ve většině tkání, kde má vliv na buněčné interakce a ovlivňuje celou řadu buněčných procesů (srážení krve, angiogeneze), *heparin*, který má významné antikoagulační účinky. Je produkován tzv. žírnými buňkami, které se vyskytují hojně v játrech, v plicích a ve střevě.

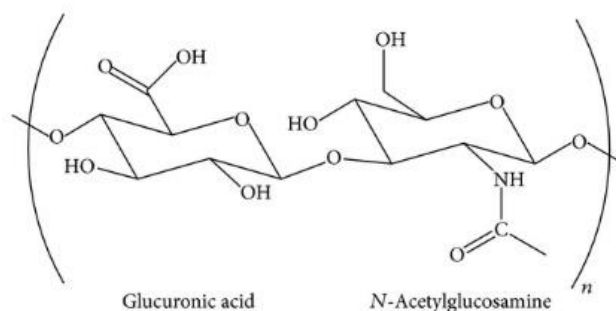
#### *Kyselina hyaluronová*

Kyselina hyaluronová (HA) je viskoelastický<sup>3</sup> biopolymer s velkou molekulovou hmotností, která může dosáhnout až  $4 \times 10^6$  Da<sup>4</sup>. Tento přírodní glykosaminoglykan se nachází v organismech všech obratlovců včetně člověka. Kyselina hyaluronová je tvořena lineárním řetězcem opakujícího se disacharidu, jehož struktura je znázorněna na obr. 9. Disacharidickou jednotku představují dva monosacharidy N-acetylglukosamin a kyselina D-glukuronová, které jsou spojeny  $\beta$ -1,3 glykosidickou vazbou. Opakující se disacharidické jednotky jsou pak spojeny  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbou.

---

<sup>3</sup> Kombinující vlastnosti elastických materiálů (elastické = pružné, po odstranění deformační síly se materiál vrátí do původního stavu, „pamatuje“ si své uspořádání) a viskózních (chování při namáhání je časově závislé, po odstranění se nevrátí do původního stavu). Viskoelastické jsou kombinací – časově závislé chování, částečné obnovení původního stavu apod.

<sup>4</sup> Da značí jednotku Dalton, která je často využívána v biochemii pro vyjádření molekulové hmotnosti. Platí, že 1 Da = 1 g/mol.



Obr. 9: Chemická struktura kyseliny hyaluronové.

Kyselina hyaluronová se v lidském těle nachází hlavně v kůži, v synoviálních tekutinách, očním sklivci, ale je přítomná ve všech tkáních jako součást mezibuněčné hmoty. V lidském těle je HA syntetizována na buněčné membráně pomocí integrálních membránových proteinů, tzv. hyaluronan syntáz. Hyaluronan syntáza v lidském těle existuje ve třech formách (HAS1, HAS2, a HAS3). Kyselinu hyaluronovou lze získat pomocí biofermentačních procesů za využití bakterií *Streptococcus* či extrakcí ze zvířecích tkání. Existuje i nová technologie, která stojí na katalýze polymerizace disacharidických monomerů pomocí izolované hyaluronan syntázy. Tato nová technologie by dokázala odstranit problémy, které přináší používané HA bakteriálního či živočišného původu, a to sice například kontaminaci viry, proteiny a v případě bakterií endotoxiny. V případě HA získávané z živočišných tkání je komplikací i degradace HA, což je důsledek přítomnosti enzymů hyaluronidázy ( $\beta$ -D-glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidázy).

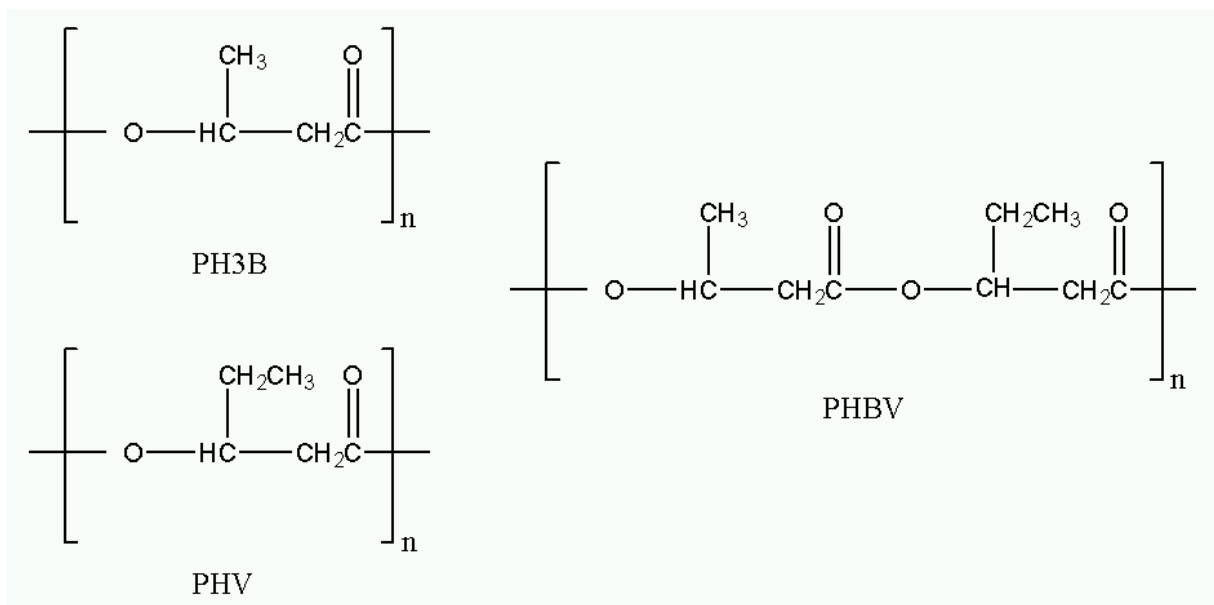
Kyselina hyaluronová se vyskytuje v lidském těle, je tedy přirozeně biokompatibilní, má schopnost tvořit hydrogely a je biodegradabilní, tudíž se nabízí její široké využití ve zdravotnictví, dermatologii, farmacii a tkáňovém inženýrství.

Dermatologie využívá především schopnost HA hydratovat kůži, redukovat tvorbu jizev a fungovat jako výplň. Používá se i pro drobné augmentace, kde ale degradace HA *in vivo* zkracuje výdrž výplně, nejedná se teda o trvalý implantát, spíše o dočasné použití. Další aplikací HA je viskosuplementace pro synoviální tekutiny. HA by zde mohla sloužit jako kloubní lubrikant. Studie ovšem ukázaly, že HA velmi rychle degraduje a léčba tak má velmi malý efekt. Nicméně i nadále lze HA v ortopedických aplikacích používat, jelikož byly zjištěny protizánětlivé a analgetické účinky HA, čímž zmírňuje bolestivé účinky artrózy. Jelikož se HA nachází i v očním sklivci, nalezne tak uplatnění v oční chirurgii a oftalmologii. Další poměrně novou a podstatnou aplikací HA je tkáňové inženýrství, zde se kyselina hyaluronová uplatní jako scaffold v podobě hydrogelů či nanovláken a to často ve směsi s jinými biokompatibilními polymery.

Co se týká nežádoucích reakcí na aplikaci HA *in vivo*, nalezneme pouze minimální výskyt nežádoucích účinků, kde se jedná především o místní reakce jako otok, zarudnutí či zvýšená citlivost. Nejedná se o trvalé účinky a obvykle rychle odezní.

### 2.2.6. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupinou přírodních polyesterů produkovaných bakteriálními kmeny. Patří mezi přírodní polymery, svými vlastnostmi se velmi podobají syntetickým biodegradabilním polyesterům. Bakteriální kmeny produkují PHA jako zásobní polymery. K tvorbě PHA dochází při dostatečném zdroji uhlíku a současném nedostatku esenciálních živin. PHA jsou tvořeny mnoha typy monomerů, z nichž nejvýznamnější jsou polyhydroxybutyrát (PHB) a polyhydroxyvalerát (PHV) a jejich kopolymery. Jejich chemická struktura je znázorněna na obr. 10. PHA jsou biodegradabilní a biokompatibilní. Jejich materiálové vlastnosti se dají řídit poměrem jednotlivých komponent finálního polymeru. Jsou to termoplastické polymery, které se dají dobře zpracovávat. Jsou nerozpustné ve vodě, naopak se rozpouští např. v chloroformu, dichlormethanu. Jejich teplota tání je 175°C, teplota skelného přechodu 2°C. Jsou vyvíjeny pro mnohé aplikace jako např. šicí materiály, kožní kryty, stenty, náhrady chrupavčité tkáně, nervové tkáně atd. Nevýhodou těchto materiálů je vysoká variabilita vzniklého produktu. Lze je zpracovat nejrůznějšími technologiemi přípravy tkáňových nosičů včetně elektrostatického zvlákňování.



Obr. 10: Chemická struktura poly-3-hydroxybutyrátu a polyhydroxyvalerátu a jejich kopolymeru

## **Použitá a doporučená literatura:**

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Ryglova S., Braun M., Suchy T. Collagen and Its Modifications—Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. *Macromolecular Materials and Engineering* 2017, 1600460, DOI: 10.1002/mame.201600460

Hoque M.E., Nuge T., Yeow T.K., Nordin N., Prasad R.G.S.V. Galetin based scaffolds for tissue engineering – A Review. *Polymers Research Journal* 2015, 9 (1), ISSN: 1935-2530, Nova Science Publishers, Inc.

Daamen W.F., Veerkamp J.H., van Hest J.C.M., van Kuppevelt T.H. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 2007, 28: 4378-98. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.025

Sashithorn N., Martinova L., Horakova J., Mongkolrattanasit R. Fabrication of Silk Fibroin Nanofibres by Needleless Electrospinning. *Electrospinning – Material, Techniques, and Biomaterial Applications*. InTech, 2016. DOI: 10.5772/65835

Courtenay J.C., Sharma R.I., Scott J.L. Recent Advances in modified cellulose for tissue culture applications. *Molecules* 2018, 23: 654. DOI: 10.3390/molecules23030654

Trache D., Tarchoun A.F., Derradji M., Hamidon T.S., Masruchin N., Brosse N., Hussin M.H. Nanocellulose: From fundamentals to advanced applications. *Frontiers in Chemistry* 2020. DOI: 10.3389/fchem.2020.00392

Barber P.S., Griggs Ch.S., Bonner J.R., Rogers R.D. Electrospinning of chitin nanofibers directly from an ionic liquid extract of shrimp shells. *Green Chemistry* 2013, 15 (3): 601-7. DOI: 10.1039/C2GC36582K

Croisier F., Jerome Ch. Chitosan-based materials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 2013, 49: 780-92. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009

Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2012, 37 (1): 106-26. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

Mokhena T.C., Mochane M.J., Mtibe A., John M.J., Sadiku E.R., Sefadi J.S. Electrospun alginate nanofibers towards various applications: A Review. *Materials* 2020, 13 (4): 934. DOI: 10.3390/ma13040934

Collins M.N., Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* 2013, 92(2): 1262–1279. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028

Chen G.Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005, 26 (33): 6565-78. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036

## 3. Syntetické materiály pro výrobu tkáňových nosičů

Jana Horáková

*Důležité pojmy: polyglykolid, polylaktid, polykaprolakton, polydioxanon, polyvinylidendifluorid, polytetrafluorethylen, polyvinylalkohol, polyethylenoxid, polyvinylpyrrolidon, polypyrrol, polyanilin*

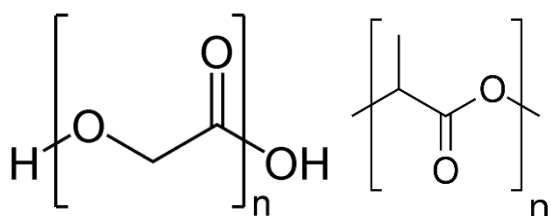
Syntetické polymerní materiály představují druhou významnou skupinu materiálů hojně využívanou pro konstrukci tkáňových nosičů. Jejich výhodou jsou lépe definované vlastnosti než u přírodních polymerů, které se dají řídit během samotné syntézy. Syntetické materiály mohou být degradabilní i nedegradabilní. V následující kapitole jsou popsány zástupci syntetických polymerů používaných pro výrobu tkáňových nosičů, které jsou rozděleny do následujících podkapitol: Biodegradabilní polyestery (1), fluorované polymery (2), vodorozpustné polymery (3), vodivé polymery (4).

### 3.1. Biodegradabilní polyestery

Mezi významné zástupce syntetických biodegradabilních polymerů hojně využívaných v oboru tkáňového inženýrství patří polyglykolid (PGA), polylaktid (PLA), polykaprolakton (PCL) a polydioxanon (PDX). Z pohledu chemické struktury se jedná o polyestery, které degradují v organismu hydrolýzou esterových vazeb. Jednotlivé polymery se liší dobou degradace v závislosti na délce uhlovodíkového řetězce, hydrofobicitě, molekulové hmotnosti, morfologii a porositě tkáňového nosiče a dalších vlastností. Po implantaci do organismu ztrácí biodegradabilní polyestery své mechanické vlastnosti, k jejich úplnému vstřebání dochází v řádu týdnů až měsíců. Produkty jejich rozpadu jsou pro tělo přirozené látky, které umí metabolizovat a vyloučit. Degradací jsou kyselého charakteru, proto při zvýšené degradaci může docházet k místnímu okyselování a vyvolání zánětlivých reakcí. Degradace polyesterů probíhá ve dvou fázích. Nejprve dochází k difuzi vody do amorfních částí polymeru, kde probíhá hydrolytické štěpení esterových vazeb. V druhé fázi pak degradují krystalické části polymeru. Degradace probíhá tedy hydrolyticky, může však být urychlena přítomností enzymů (esteráza, proteináza K, lipáza). Akumulované kyselé degradační produkty rozpadu také degradaci urychlují. Často bývají jednotlivé polyestery kombinovány ve formě kopolymerů či směsí (blendů) za účelem vytvoření ideálních mechanických a degradačních vlastností pro jednotlivé aplikace. Tyto materiály byly schváleny pro použití v medicíně a jsou již dostupné na trhu, nejčastěji ve formě chirurgických šicích nití. Biodegradabilní polyestery se vyrábí polymerací za otevření kruhu. Jejich nevýhodou jsou hydrofobní vlastnosti, často jsou proto tyto materiály dále povrchově upravovány.

### 3.1.1. Polyglykolid

Polyglykolid neboli polyglykolová kyselina (PGA) je nejjednodušší lineární alifatický<sup>5</sup> termoplastický<sup>6</sup> polyester. Jeho struktura je zobrazena na obr. 11A. Jedná se o semikrystalický polymer (45-55% krystalinity), který je špatně rozpustný v organických rozpouštědlech, což značně limituje jeho zpracování do podoby tkáňových nosičů. PGA lze rozpustit například v hexafluoroisopropanolu (HFIP). Teplota skelného přechodu PGA se pohybuje okolo teploty lidského těla (35-40°C), teplota tání je poměrně vysoká (225-230°C). Díky špatné rozpustnosti PGA je možné pro zpracování polymeru použít technologie extruze, vstřikování či lisování, nicméně je důležité hlídat podmínky výroby díky vysoké citlivosti PGA na hydrolytickou degradaci. Dále je PGA zpracovávána technologiemi odpaření rozpouštědla (solvent casting) a vymývání částic (particle leaching). PGA degraduje v organismu obvykle během 6ti-12ti měsíců. Díky rychlé degradaci může docházet k akumulaci kyselých produktů rozpadu a ke vzniku zánětu, proto použití samotného PGA pro výrobu tkáňových nosičů nebývá tolik časté. PGA je k dostání v klinické praxi ve formě vstřebatelných chirurgických nití.



Obr. 11: Struktura polyglykolidu (A), polylaktidu (B).

### 3.1.2. Polylaktid

Polylaktid (PLA) je další zástupce alifatických lineárních polyesterů, obsahuje o jednu methylovou skupinu více než PGA, díky čemuž je hydrofobnější a má delší dobu degradace. Jeho struktura je zobrazena na obr. 11B. Jedná se o termoplastický polymer s podílem krystalické fáze okolo 37%. Teplota skelného přechodu PLA je 60-65°C, teplota tání 130-180 °C. Je rozpustný v běžných organických rozpouštědlech jako např. chloroform či dichlormethan. Díky lepší rozpustnosti se nabízí širší možnosti zpracování. Lze použít nejrůznější technologie zvláknování, PLA je také možné zpracovávat 3D tiskem. Doba degradace v organismu se pohybuje okolo 12-36 měsíců v závislosti na jeho izomerii<sup>7</sup>. PLA je chirální molekula, která se může vyskytovat ve 3 izoformách: poly-L-laktid (PLLA), poly-D-laktid (PDLA) a poly-DL-laktid (PDLLA). V tkáňovém inženýrství se nejvíce využívá L-forma, jelikož je přednostně metabolizována v lidském těle. Jednotlivé izomery se liší svými vlastnostmi a dobou degradace. Zatímco izotaktický<sup>8</sup> PLLA a PDLA jsou semikrystalické

<sup>5</sup> alifatický

<sup>6</sup> termoplastický – od určité vyšší teploty má plastický (tvárný) charakter, po ochlazení je pevný. Tyto změny mohou nastávat opakovaně

<sup>7</sup> izomerie – vzájemný vztah sloučenin, které mají stejný sumární vzorec (obsahují stejné atomy ve stejném počtu), ale liší se uspořádáním atomů v molekule

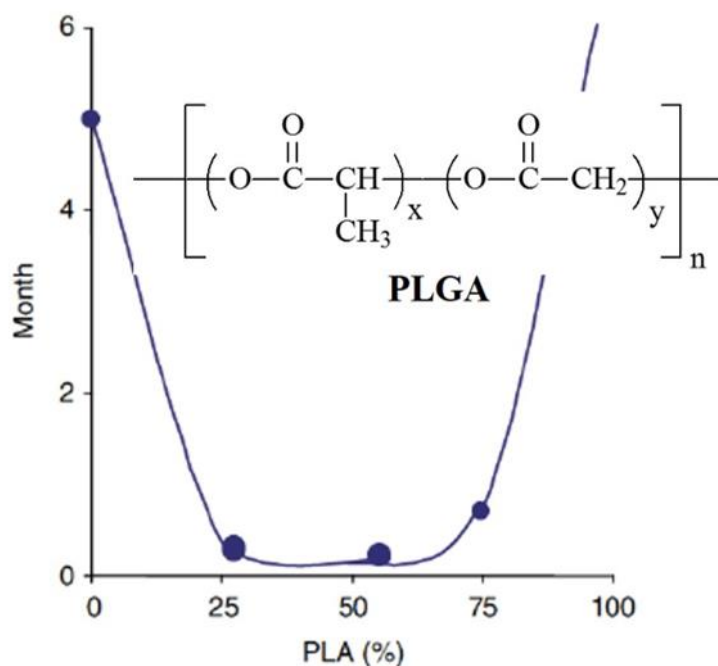
<sup>8</sup> izotaktický – polymer se stereochemicky pravidelnou strukturou lineárního řetězce



polymery s dobou degradace s pomalejší dobou degradace (24-36 měsíců), ataktický<sup>9</sup> PDLLA je amorfní polymer s rychlejší degradací (12-16 měsíců). Produktem degradace je kyselina mléčná (laktát), což je pro tělo přirozený metabolit. V klinické praxi je PLA používán ve formě fixačních materiálů v ortopedii.

### 3.1.3. Kopolymer polylaktidu a polyglykolid

Velmi často jsou využívány kopolymery výše zmíněných polymerních materiálů (PLGA) s různým zastoupením jednotlivých složek. Tyto materiály se využívají v klinické praxi ve formě vstřebatelných chirurgických šicích nití (Vicryl, Ethicon Inc). Poměrným zastoupením jednotlivých polymerů lze dosáhnout požadovaných materiálových vlastností, zejména mechanických vlastností a doby degradace. Zajímavostí je, že nejrychlejší dobu degradace má kopolymer tvořený 50% PGA a 50% PLA, ostatní poměry zastoupení PGA: PLA mají delší dobu degradace (viz obr. 12). Obecně mají kopolymery PLGA kratší dobu degradace než samotné homopolymery.



Obr. 12: Závislost rychlosti degradace PGLA na složení kopolymeru.

Převzato z: <https://specificpolymers.com/wp-content/uploads/2020/12/plga.png>

### 3.1.4. Polykaprolakton

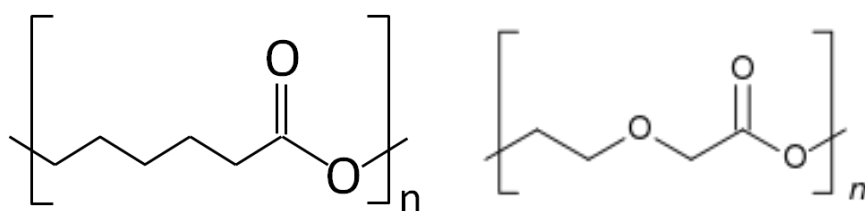
Polykaprolakton (poly-ε-kaprolakton, PCL) patří mezi nejvíce využívaný polymer v oboru tkáňového inženýrství ze skupiny biodegradabilních polyesterů. Jeho struktura je znázorněna na obr. 13A. Jedná se o alifatický semikrystalický (50-60% krystalinity) termoplastický polymer s nejdelsí dobou degradace ze zmíněných polyesterů (více než 36 měsíců). V organismu dochází k hydrolýze esterových vazeb polykaprolaktonu. Proces degradace může

<sup>9</sup> zotaktický – polymer se stereochemicky pravidelnou strukturou lineárního řetězce

probíhat buď od povrchu (*surface erosion*) nebo v celém objemu polymerního nosiče (*bulk degradation*) v závislosti na rychlosti difuze vody. Povrchová degradace nastává, pokud dochází ke štěpení polymerního řetězce na povrchu za vzniku oligomerů a monomerů. Pokud dojde k difuze vody do celého objemu nosiče, nastává celková degradace. Polymerní nosič pak degraduje v celém svém objemu, dochází k náhodnému štěpení řetězců za vzniku polymerních řetězců s nižší molekulovou hmotností. Konečné produkty rozpadu polykaprolaktonu mohou akcelarovat tuto celkovou degradaci. PCL je v organismu tedy rozložen pomocí hydrolýzy za vzniku krystalického polymeru s nižší molekulovou hmotností ( $\leq 3,000$  g/mol). Tento produkt může být dále rozložen intracelulárně (např. buňkami imunitního systému – makrofágy, žírnými buňkami či fibroblasty). Konečným produktem rozpadu PCL jsou látky vstupující do tzv. Krebsova cyklu, což je metabolická dráha každé buňky obsahující mitochondrie.

Teplota skelného přechodu PCL je  $-60^{\circ}\text{C}$ , teplota tání  $59-64^{\circ}\text{C}$ . Polykaprolakton je rozpustný v organických rozpouštědlech jako např. chloroform, dichlormethan, je nerozpustný v alkoholech a ve vodě. Vyrábí se z  $\epsilon$ -kaprolaktonu polymerací za otevření kruhu. Výsledná molekulová hmotnost se nejčastěji pohybuje mezi 3,000 a 80,000 g/mol. Může se mísit s dalšími polymerními materiály pro doasazení ideálních materiálových vlastností. Může být zpracováván nejrůznějšími textilními i netextilními technologiemi. Nachází uplatnění v mnoha oblastech tkáňového inženýrství. Výhody jeho dlouhé doby degradace se využívá pro dlouhodobé uvolňování léčiv, bylo dosaženo uvolňování aktivních látek po dobu delší než 1 rok. Dále je PCL využíván pro celou řadu aplikací, jsou vyvíjeny náhrady kostí, chrupavek, šlach a vazů, scaffoldy pro kardiovaskulární aplikace, pro náhradu nervové tkáně, kožní kryty na bázi PCL. V klinické praxi se PCL nachází např. jako šicí materiál (Monocryl, Ethicon – blokovaný kopolymer PGA a PCL).

Polykaprolaton lze také kombinovat s dalšími polyestery ve formě kopolymerů. Kopolymer PCL a PLA (PLCL) je také hojně využíván v oboru tkáňového inženýrství. Jedná o statistický amorfní kopolymer s rychlejší dobou degradace.



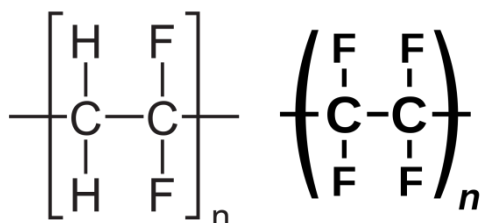
Obr. 13: Struktura polykaprolaktonu (A), polydioxanonu (B).

### 3.1.5. Polydioxanon

Polydioxanon (PDX) je polyester-ether, jeho struktura je zobrazena na obr. 13B. Jedná se o semikrystalický polymer (55% krystalinity) s dobou degradace okolo 6ti měsíců. Jeho teplota skelného přechodu je  $-10^{\circ}\text{C}$  –  $0^{\circ}\text{C}$ , teplota tání  $110-115^{\circ}\text{C}$ . Jeho využití v klinické praxi je v podobě chirurgických šicích nití, v ortopedických a kardiovaskulárních aplikacích.

### 3.2. Fluorované syntetické polymery

Další významnou skupinou polymerů používaných pro tkáňové nosiče tvoří polymery obsahující ve své struktuře fluor. Jedná se o nedegradabilní, vysoce stabilní a odolné polymery. Podrobněji budou rozebrány 2 fluorované polymery – polyvinylidendifluorid a polytetrafluorethylen, jejichž struktura je znázorněna na obr. 14.



Obr. 14: Struktura polyvinylidendifluoridu (A), polytetrafluoroethylenu (B).

#### 3.2.1. Polyvinylidendifluorid

Polyvinylidendifluorid (PVDF) je tvořen monomerní jednotkou obsahující 2 molekuly fluoru. Jedná se o termoplastický polymer se stupněm krystalinity okolo 50-60%. Existuje v několika formách ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) podle konformace vazeb v polymerním řetězci. Vyniká termickou a chemickou stabilitou. Je také znám pod obchodními názvy Kynar, Solef, Hynar podle dodavatelů.

Jeho použití v medicíně již bylo schváleno a na trhu již existují výrobky z PVDF používané v klinické praxi (šicí nitě, kýlní síťky). Pro konstrukci tkáňových nosičů může být zpracován do podoby filmů (porézních i neporézních), vláken a mikrokapslí. Je možné ho elektrostaticky zvláknit po rozpuštění např. v dimethylformamidu (DMF), dimethylsulfoxidu (DMSO), dimethylacetamidu (DMAc).

#### 3.2.2. Polytetrafluorethylen

Polytetrafluorethylen (PTFE) je tvořen monomerem obsahujícím ve své struktuře 4 molekuly fluoru. Je známý také pod obchodním názvem teflon, který byl patentovaný firmou DuPont. PTFE je termoplastický polymer s vysokou hustotou. Je chemicky a tepelně velmi stabilní. Pro elektrostatické zvláknění se používá směšování s nosným polymerem, nejčastěji PEO, PVA.

### 3.3. Vodorozpustné syntetické polymery

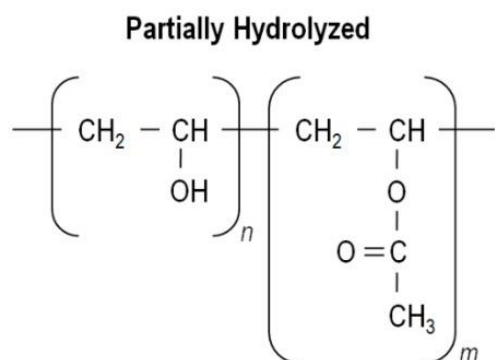
Vodorozpustné polymery jsou hojně využívány v oboru tkáňového inženýrství. Rozpustnost ve vodě přináší některé výhody jako např. možnost inkorporace citlivých aktivních látek jako jsou proteiny apod. Na druhou stranu je nutné zajistit alespoň částečnou stabilitu těchto materiálů v organismu, proto je často nutné polymery síťovat. Proces síťování musí být také bezpečný pro medicínální použití finálního scaffoldu, což bývá často obtížné. Mezi nejvýznamnější zástupce syntetických vodorozpustných polymerů patří polyvinylalkohol, polyethylenoxid a polyvinylpyrrolidon, které budou podrobněji popsány v následující kapitole.

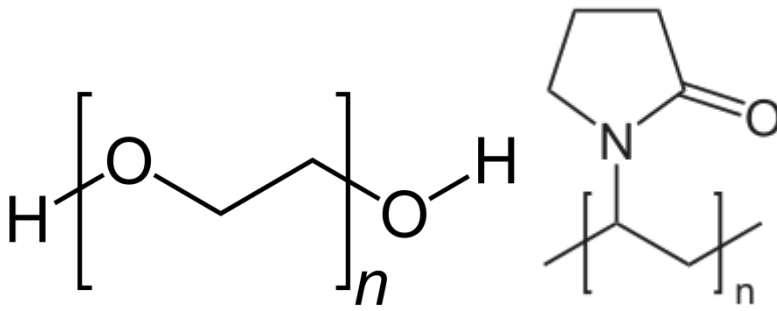
#### 3.3.1. Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) je tvořen uhlíkovými vazbami s postranními hydroxylovými a acetátovými skupinami, jeho struktura je zobrazena na obr. 15A. Vyrábí se z polyvinylacetátu (PVAc) alkalickou hydrolyzou, která však nikdy neprobíhá úplně. Výsledný polymer tedy obsahuje určité procento vinylacetátových skupin. Důležitou vlastností polyvinylalkoholu je tzv. procento hydrolyzy. Jako částečně hydrolyzovaný PVA se označuje polymer se stupněm hydrolyzy 80-98,5% (obsahuje 80-98,5% hydroxylových skupin), vysoce hydrolyzovaný pak s více než 98,5% hydrolyzy. PVA s nižším stupněm hydrolyzy je více rozpustný ve vodě při nižších teplotách, má nižší stupeň krystalinity než PVA s vyšší hydrolyzou. PVA má výborné mechanické vlastnosti.

Pro účely konstrukce tkáňových nosičů je nutné jeho síťování – využívá se nejčastěji chemická metoda s využitím glutaraldehydu. Dále je možné využít fyzikálních metod jako např. UV záření. Výhodou PVA je přítomnost hydroxylových skupin, které lze snadno modifikovat. Proto bývá PVA pro konkrétní aplikace dále upravován.

PVA je možné zpracovat mnoha technologiemi, nejčastěji se v tkáňovém inženýrství využívají hydrogely a nanovláknenné materiály. Zpracování PVA se liší v závislosti na stupni hydrolyzy a molekulové hmotnosti polymeru.





Obr. 15: Chemická struktura PVA (A), PEO (B), PVP (C).

### 3.3.2. Polyethylenoxid

Jako polyethylenoxid (PEO) se označuje polymer ethylenoxidu, jeho struktura je znázorněna na obr. 15B. Jeho oligomer se označuje jako polyetylenglykol (PEG). Jedná se tedy o stejné chemické složení s rozdílnou molekulovou hmotností. Je schválen pro použití v medicíně. PEO je rozpustný v řadě rozpouštědel jako např. voda, metanol, dichlormethan. Je značně hydrofilní, což znesnadňuje navázání proteinů. Často se tedy využívá povrchové modifikace scaffoldů pomocí PEO/PEG pro zamezení kolonizace bakteriemi, snížení trombogenicity a imunogenicity. Ve farmacii se využívá navázání polyetylenglykolu na léčiva či bílkoviny, tento proces se označuje jako tzv. PEGylace. Po navázání molekuly PEG dojde ke zlepšení vlastností aktivních látek a jejich následnému využití v organismu.

Pro účely tkáňového inženýrství se PEO používá samostatně ve formě hydrogelů, dále pro povrchovou úpravu scaffoldů nebo jako součást nanovlákných materiálů. U těžce zvláknitelných polymerů lze využít přídavek PEO pro lepší zpracování. Pokud nedojde k zesíťování PEO, po kontaktu s vodním prostředím se PEO rozpustí. Produkty jeho rozpadu jsou netoxické, tudíž tento postup je běžně používán při konstrukci tkáňových nosičů.

### 3.3.3. Polyvinylpyrrolidon

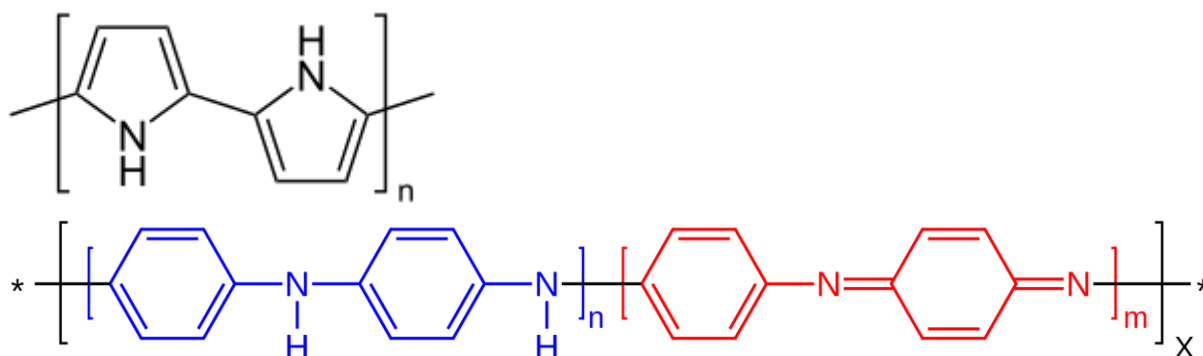
Polyvinylpyrrolidon (PVP) je další za zástupců vodorozpustných polymerů, jeho struktura je zobrazena na obr. 15C. Je schválen pro použití v medicíně, běžně se používá ve farmacii jako pojivo v tabletách, v potravinářství jako aditivum – stabilizátor (E1202). Je rozpustný ve vodě a v polárních rozpouštědlech jako jsou alkoholy apod. Pro konstrukci tkáňových nosičů může být zpracován technologiemi elektrostatického zvláknování či sprejování, 3D tisku.

### 3.4. Vodivé syntetické polymery

Vodivé polymery jsou také hojně využívány pro konstrukci tkáňových nosičů. Elektrická vodivost dává těmto materiálům další přídatnou vlastnost, kdy buňky mohou přijímat elektrickou stimulaci, což je u určitých buněčných typů přínosné (např. svalové buňky, nervové buňky). Vodivé polymery spojují ideální vlastnosti kovů a polymerních materiálů – mají výborné elektrické a optické vlastnosti, lze je snadno syntetizovat a vlastnosti upravovat reakčními podmínkami dle konkrétní aplikace. Elektrickou vodivost zajišťuje jejich struktura, která je tvořena konjugovanými dvojnými vazbami. Dále musí být ve struktuře přítomný tzv. dopant, který zajišťuje transport náboje po polymerním řetězci. Vodivé polymery se syntetizují dvěma cestami – chemickou či elektrochemickou oxidací. Dnes je známo asi 25 vodivých polymerů, z nichž nejvíce využívané v oboru tkáňového inženýrství jsou polypyrrol a polyanilin. Objevy a vývoj vodivých polymerů byly oceněny v roce 2000 Nobelovou cenou v oblasti chemie.

#### 3.4.1. Polypyrrol

Chemická struktura polypyrrolu (Ppy) je znázorněna na obr. 16A. Patří mezi nedegradabilní polymery, je však biokompatibilní. Je špatně rozpustný, proto jsou některé technologie zpracování obtížné. Je možné ho elektrostaticky zvláknit s nosným polymerem (např. PEO). Může být také využit pro povrchovou funkcionalizaci nanovláken. Je možné ho využít též jako systém pro řízené dodávání léčiv (drug delivery systems). Jeho nevýhodou je křehkost, proto se využívá spíše jako kompozitní materiál s dalšími syntetickými i přírodními polymery. Využívá se pro náhrady nervové a svalové tkáně.



Obr. 16: Chemická struktura polypyrrolu (A), polyanilinu - emeraldinová báze (B).

#### 3.4.2. Polyanilin

Polyanilin (PANI) se může vyskytovat ve 3 různých oxidačních formách (leukoemeraldin, emeraldin, pernigranilin). Vodivé vlastnosti má pouze protonovaná forma emeraldinu, která má zelenou barvu. Emeraldin ve formě báze je nevodivý, má modrou barvu struktura viz obr. 16B). Plně redukovaná forma (bezbarvý leukoemeraldin) a plně oxidovaná forma (fialový pernigranilin - báze, modrý - protonovaná forma) jsou izolanty. Je historicky nejdéle známým vodivým polymerem. Patří mezi nedegradabilní polymery. Polyanilin je možné elektrostaticky zvláknit, obvykle s nosným polymerem (např. PEO), což vede k výraznému snížení vodivosti. Je špatně rozpustný v běžných organických rozpouštědlech, proto bývá zvláknovací roztok

dopován organickými solemi. Pro tkáňové inženýrství se používá v kombinaci s dalšími polymery (PCL, PLA, chitosan, želatina) pro náhradu svalové tkáně a jako pro cílové dodávání léčiv.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Gunatillake P.A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 2003, 5:1-16. DOI: 10.22203/eCM.v005a01

Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010, 35: 1217-56. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Mikes P., Horakova J., Saman A., Vejsadova L., Topham P., Punyodom W., Dumklang M., Jencova V. Comparison and characterization of different polyster nano/micro fibres for use in tissue engineering applications. *Journal of Industrial Textiles* 2019, DOI: 10.1177/1528083719848155

Boland E.D., Cleman B.D., Barnes C.P., Simpson D.G., Wnek G.E., Bowlin G.L. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta Biomaterialis* 2005, 1(1): 115-23. DOI: 10.1016/j.actbio.2004.09.003

Goonoo N., Jeetah R., Bhaw-Luximon A.B., Jhurry D. Polydioxanone-based biomaterials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015, 97:371-91. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.05.024

Cardoso V.F., Correia D.M., Ribeiro C., Fernandes M.M., Lanceros-Mendez S., Fluorinated Polymers as Smart Materials for Advanced Biomedical Applications. *Polymers* 2018, 10, 161. DOI: 10.3390/polym10020161

Klapstova A., Horakova J., Tunak M., Shynkarenko A., Erben J., Hlavata J., Bulir P., Chvojka J. A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as glaucoma drainage implant. *Materials Science and Engineering C* 2021, 119, 111637. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111637

Teixeira M.A., Amorim M.T.P., Felgueiras H.P. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers (Basel)* 2019, 12(1):7. DOI: 10.3390/polym12010007

Xiao X.F., Jiang X.Q., Zhou L.J. Surface modification of poly ethylene glykol to resist nonspecific adsorption of proteins. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2013, 41 (3): 445-53. DOI: 10.1016/S1872-2040(13)60638-6

Kurakula M., Koteswara Rao G.S.N. Moving polyvinyl pyrrolidone electrospun nanofibers and bioprinted scaffolds towards multidisciplinary biomedical applications. *European Polymer Journal* 2020, 136: 109919. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109919

Prokeš J., Stejskal J., Omastovič M. Polyanilina a polypyrrol – dva představitelé vodivých polymerů. *Chemické Listy* 2001, 95: 484-92.

Balint R., Cassidy N.J., Cartmell S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2014, 10: 2341-53. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015

Cong Y., Liu S., Chen H. Fabrication of Conductive Polypyrrole Nanofibers by Electrospinning. *Journal of Nanomaterials* 2013, 148347, DOI: 10.1155/2013/148347

Lukášek J., Hauzerová Š., Havlíčková K., Strnadová K., Mašek K., Stuchlík M., Stibor I., Jenčová V., Řezanka M. Cyclodextrin-Polypyrrole Coatings of Scaffolds for Tissue Engineering. *Polymers* 2019, 459, DOI: 10.3390/polym11030459

Liang Y., Cho-Hong Goh J., Polypyrrole-incorporated conducting constructs for tissue engineering applications: A Review. *Bioelectricity* 2020, 2 (2): 101-19. DOI: 10.1089/bioe.2020.0010

Razak S.I.A., Wahab I.F., Fadil F., Dahli F.N., Khudzari A.Z.M., Adeli H. A Review of Electrospun Conductive Polyaniline Based Nanofiber Composites and Blends: Processing Features, Applications and Future Directions. *Advances in Materials Science and Engineering* 2015, 356286. DOI: 10.1155/2015/356286



## 4. Technologie přípravy tkáňových nosičů

Jana Horáková. Jakub Erben

*Důležité pojmy: tkaní, pletení, netkané textilie, elektrostatické zvlákňování (AC, DC), centrifugální zvlákňování, odpaření rozpouštědla, vymývání částic, zpěňování, lyofilizace, rapid prototyping, biotisk, hydrogely, decelularizace*

Pro přípravu tkáňových nosičů je využívána celá řada technologií, které mohou být i kombinovány pro dosažení cílené struktury scaffoldu. V následující kapitole budou rozebrány významné technologie, které jsou nejvíce využívány pro konstrukci tkáňových nosičů.

Polymery se nejčastěji zpracovávají po rozpuštění ve vhodném rozpouštědle. Je proto nutné znát interakce mezi zvoleným polymerním materiálem a rozpouštědlem či rozpouštědlovým systémem. Jako rozpouštědlo se označuje látka se schopností rozpouštět ostatní látky za vzniku homogenního roztoku, aniž by s nimi chemicky reagovala. Ve vzniklé směsi je zpravidla v nadbytku. Nejjednodušším příkladem rozpouštědla je voda, která patří mezi tzv. **polární rozpouštědla**. Tyto molekuly mají nenulový dipólový moment, jsou schopné rozpouštět polární látky. Dále se dělí podle schopnosti odštěpit atom vodíku na tzv. protická a aprotická. *Protická polární rozpouštědla* mají oštěpitelný atom vodíku. Do této skupiny patří kromě již zmiňované vody alkoholy (methanol, ethanol, isopropylalkohol) a karboxylové kyseliny (kyselina mravenčí, octová). *Aprotická polární rozpouštědla* nemají odštěpitelný atom vodíku. Mezi zástupce této skupiny patří dichlormethan (DCM), aceton, dimethylformamid (DMF), acetonitril, dimethylsulfoxid (DMSO). **Nepolární organická rozpouštědla** jsou tvořena molekulami s nulovým dipólovým momentem (nepolárními molekulami), jsou schopné rozpouštět nepolární látky. Nejsou mísitelná s vodou. Mezi zástupce této skupiny patří například benzen, hexan, toluen, chloroform, diethylether.

Pro rozpouštění polymerů se používá rozdělení na „dobrá“ a „špatná“ rozpouštědla. „**Dobrá**“ **rozpouštědla** tvoří s polymerem v určitém rozsahu koncentrací homogenní systém. Makromolekula je v roztoku rozvinutá, dochází k interakcím mezi polymerní látkou a rozpouštědlem. Ve „**špatných**“ **rozpouštědlech** je polymerní makromolekula svinutá tak, aby byl omezen kontakt mezi polymerním materiálem a rozpouštědlem. Míra rozpustnosti je závislá na teplotě a koncentraci makromolekulární látky v roztoku.

Technologie se rozdělují do dvou skupin podle výsledné struktury materiálu na vlákenné a nevlákenné metody. Jelikož technologie přípravy vlákenných materiálů jako např. elektrostatické či centrifugální zvlákňování ve všech jeho modifikacích, tkaní nebo pletení jsou studentům Textilní fakulty Technické univerzity v Liberci dobře známé, budou jen zmíněny s vysvětlením využití technologie pro tkáňové inženýrství. Pod pojem nevlákenné scaffoldy zahrnujeme folie, porézní materiály, a materiály připravené pomocí 3D tisku.

### 4.1. Vlákenné scaffoldy

Struktura vlákenných scaffoldů může mít nejrůznější podobu – od uspořádaných vlákenných systémů po neuspořádanou strukturu. Průměry vláken se mohou také velmi lišit – řádově od

několika mikrometrů po desítky nanometrů. Od struktury vláknenných materiálů se dále odvíjí jejich specifické vlastnosti (mechanické vlastnosti apod.).

#### **4.1.1. Tkaní**

Tkaní je textilní technologie, která může být využita i pro konstrukci tkáňových nosičů. Vlastnosti tkanin jako např. porozita, mechanické vlastnosti, tloušťka mohou být řízeny zvolenou metodou tkaní a volbou příze. Tkané scaffoldy se využívají např. pro náhrady chrupavčité tkáně a jako cévní náhrady.

#### **4.1.2. Pletení**

Pleteniny mohou také být využity pro konstrukci tkáňových nosičů, nejčastěji pro náhrady chrupavčité tkáně a jako cévní náhrady. Oproti tkaninám jsou ohebnější a jemnější.

#### **4.1.3. Netkané textilie**

Netkané textilie vyrobené nejrůznějšími technologiemi mohou také sloužit jako tkáňové nosiče. Tyto materiály mají vysokou porozitu, proto jsou zkoumány pro nejrůznější aplikace tkáňového inženýrství (náhrady kostní, chrupavčité tkáně).

#### **4.1.4. Elektrostatické zvlákňování**

Jednou z velmi významně se rozšiřujících technologií pro výrobu scaffoldů je elektrostatické zvlákňování ve všech jeho modifikacích (jehlové / bezjehlové, stejnosměrné / střídavé, koaxiální). Je možné zvláknit širokou škálu polymerních materiálů (přírodních i syntetických) včetně jejich kombinací (blendů). Vždy je nutné optimalizovat proces výroby, tzn. najít vhodný rozpouštědlový systém, koncentraci a složení polymerního roztoku a optimalizovat procesní podmínky výroby.

#### **4.1.5. Centrifugální zvlákňování**

Další metodou pro výrobu vláknenných tkáňových nosičů je centrifugální zvlákňování neboli forcespinning využívající odstředivou sílu pro tvorbu vláken. Výsledná struktura je v porovnání s konvenčně elektrostaticky zvlákněnými materiály nadýchanější. Je možné vyrobit 3D materiál s většími póry, které mohou podpořit migraci a proliferaci buněk.

### **4.2. Nevláknenné scaffoldy**

Nevláknenné tkáňové nosiče mohou mít podobu jednoduchých fólií či porézních 3D materiálů vyrobených technologiemi zpěňování, lyofilizací, 3D tisku či biotisku. Dále do této skupiny patří tzv. hydrogely.

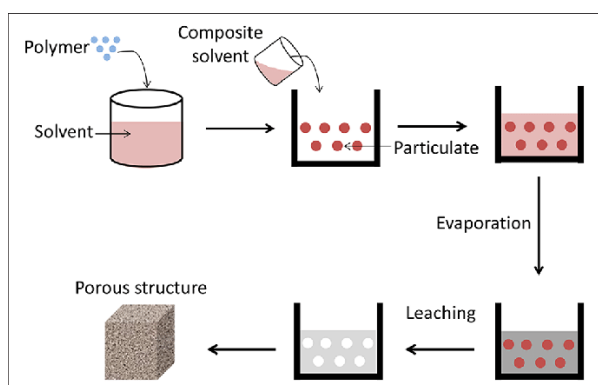
#### **4.2.1. Odpaření rozpouštědla**

Metoda odpaření rozpouštědla neboli solvent casting je jednoduchá technologie pro výrobu hladkých fólií. Polymer se rozpustí ve vhodném rozpouštědlovém systému, tento roztok je nalit do příslušné nádoby a umístěn do digestoře, kde dojde k odpaření rozpouštědla a vznikne polymerní folie. Vhodnou volbou polymerního roztoku je možné řídit výslednou strukturu folie. Tímto způsobem se vyrábí především hladké polymerní folie. Tato technologie se může

využívat jako povrchová modifikace tkáňových nosičů. Pro výrobu porézních struktur se technologie odpaření rozpouštědla často kombinuje s technologií vymývání částic.

#### 4.2.2. Vymývání částic

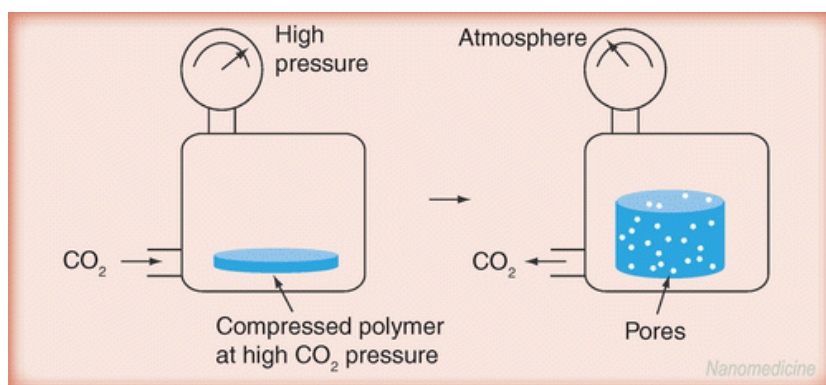
Technologie vymývání částic (particle / particulate leaching) se využívá v kombinaci s výše zmíněnou technologií odpaření částic (SCPL – solvent casting particulate leaching). Jednotlivé kroky jsou zobrazeny na obr. 17. Nejprve je připraven polymerní roztok, který je umístěn do vhodné nádoby s obsahem rovnoměrně rozprostřeného porogenu. Po určité době dojde k odpaření rozpouštědla a následnému vymytí porogenu. Výsledná struktura je závislá především na použitém porogenu. Nevýhodou této technologie je produkce tkáňových nosičů s omezenou tloušťkou (cca 3 mm).



Obr. 17: Technologie vymývání částic a odpaření rozpouštědla.

#### 4.2.3. Zpěňování plynem

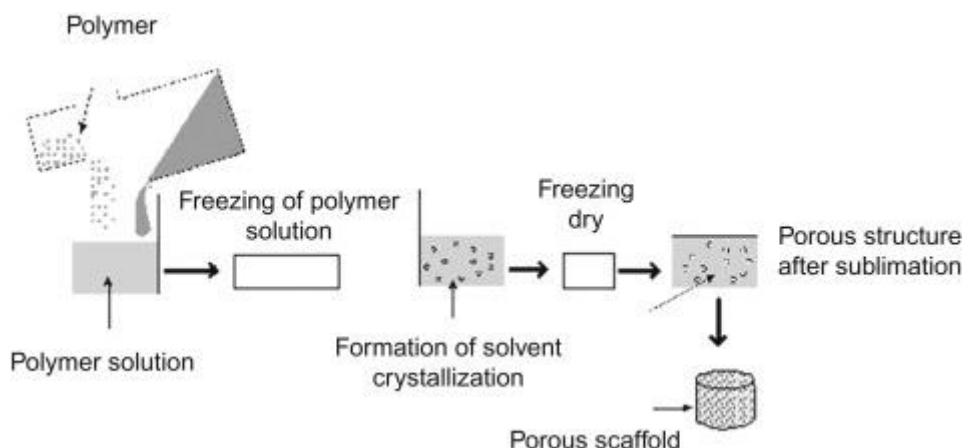
Tato technologie je založena na působení plynu za vysokého tlaku (viz obr. 18), což vede k tvorbě vzduchových bublin o velikostech 100-500  $\mu\text{m}$  ve struktuře polymeru. Výhodou této technologie je nepoužívání organických rozpouštědel, nevýhodou struktura s nedokonale propojenými póry a neporézním povrchem.



Obr. 18: Technologie zpěňování plynem.

#### 4.2.4. Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem je metoda hojně používaná ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Postup je zobrazen na obr. 19. V prvním kroku dochází ke zmrazení polymerního roztoku na teplotu, kdy rozpouštědlo vytvoří krystaly ve struktuře polymeru. Ve druhém kroku dochází k sublimaci zmrzlého rozpouštědla a vytvoření porézní struktury polymeru. Porozita výsledného scaffoldu závisí na koncentraci polymerního roztoku, distribuce velikostí pórů je závislá na procesních podmínkách (použitá teplota, tlak). Tato technologie je velmi šetrná, lze s ní připravovat i scaffoldy s obsahem aktivních látek či dokonce buněk.



Obr. 19: Technologie lyofilizace.

#### 4.2.5. Rapid prototyping

Jako rapid prototyping se označuje soubor technologií výroby prototypů pomocí 3D tisku. 3D tisk (3D printing, additive manufacturing) je proces výroby trojrozměrných pevných objektů na základě vytvořeného digitálního souboru. Výhodou této technologie v porovnání s ostatními výše zmíněnými technologiemi je reprodukovatelnost výroby s jasně definovanými rozměry vnitřní a vnější struktury. Rozlišuje se několik typů 3D tisku: stereolitografie, (SLA), selective laser sintering (SLS), fused deposition modeling (FDM) a 3D tisk.

Stereolitografie je metoda vytváření objektů pomocí vytvrzování kapalných polymerů působením záření o určité vlnové délce.

Selective laser sintering (SLS) je metoda vytváření prototypů pomocí tavení práškového materiálu. Práškovým materiálem může být polymer, kov nebo keramika. Tento materiál je následně spékán vysoce výkonným laserem.

Fused deposition modeling (FDM) využívá termoplastické polymerní materiály pro výrobu 3D scaffoldů. Termoplast je pomocí tiskové hlavy nataven a nanášen na modelovací desku.

Trojrozměrný tisk spočívá v tisku pojiva na vrstvu prášku. Výhodou tohoto postupu je vytváření scaffoldů s obsahem bioaktivních látek.

Specifickým typem je pak tzv. biotisk, který kombinuje materiály s buňkami pro výrobu scaffoldů či náhradu orgánů. Celý proces se skládá ze 3 kroků. V prvním kroku je nutné získat

přesný model pro následný tisk a získat dostatek buněk. V druhém kroku je vytvořen scaffold, který se skládá z podpůrného materiálu, buněčné suspenze a základních živin, které musí být přítomné pro správnou funkci buněk. V posledním kroku je nutné vytvořit stabilní strukturu, nejčastěji pomocí mechanické a chemické stimulace. Technologie biotisku je velmi nadějná ve smyslu vytváření funkčních orgánů.

#### **4.2.6. Hydrogely**

Jako hydrogely se označují zesítené polymerní řetězce s vysokým obsahem vody ve své struktuře. Jedná se o hydrofilní polymery, které obsahují vysoké procento vody, nejsou v ní však rozpustné. Výhodou hydrogelů je využití pro transport aktivních látek. Mohou být vyrobeny ze syntetických (polyetylen glykol, polyvinylalkohol) i přírodních polymerů (kyselina hyaluronová, alginát, želatina). Síťování polymerů může probíhat chemicky či fyzikálně. Svojí strukturou napodobují amorfní složku mezibuněčné hmoty, proto jsou s výhodou využívány pro konstrukci tkáňových nosičů. Je možné je aplikovat injekčně na místo určení, což je jejich další výhodou oproti ostatním materiálům. Do hydrogelu lze také přidat buňky a aplikovat tak scaffold přímo s buňkami na poškozené místo. Hydrogely s buňkami se také využívají v biotisku. Mezi nevýhody hydrogelů patří nedostatečné mechanické vlastnosti.

#### **4.2.7. Decelularizace tkání**

Dalším procesem výroby tkáňových nosičů je tzv. decelularizace tkání neboli odstranění buněk z tkání. Výsledným produktem je tkáňový nosič složený z přirozené mezibuněčné hmoty ve své typické struktuře a složení. K decelularizaci se využívá kombinace fyzikálních, chemických a enzymatických metod, které vedou k lýze buněčných membrán a následnému odstranění buněčných komponent. Fyzikální metody decelularizace zahrnují např. cykly zamrazování a rozmrazování, působení vyššího tlaku (vhodné pro orgány s tenkou stěnou jako např. střevní stěna) a třepání, které je často kombinováno s chemickými decelularizačními metodami. Mezi další fyzikální metody decelularizace patří pefuze, která je využívána především u decelularizace celých orgánů jako např. plíce či ledviny. Využívá se přirozeného cévního systému, kterým proudí tekutina.

Chemické metody decelularizace zahrnují nejčastěji použití detergentů, které způsobují rozpad buněčné membrány. Detergenty jsou amfipatické molekuly obsahující nepolární hydrofobní řetězec a polární hydrofilní hlavičku. Díky této chemické struktuře jsou schopné včlenit se do buněčné membrány a způsobit její rozpad. Mezi nejvýznamnější detergenty patří např. Triton X-100 nebo dodecylsulfát sodný (SDS). Použití detergentů je velmi účinné pro odstranění buněk, ale musí být zvažován jejich možný účinek na extracelulární matrix. Kromě detergentů se dá využít i dalších chemických látek jako např. kyselin (peroctová kyselina, chlorovodíková kyselina), hydroxidů (hydroxid sodný, amonný), hypertonických a hypotonických roztoků (solné roztoky – NaCl), jejich použití je však minoritní v porovnání s detergenty.

Mezi enzymatické metody decelularizace patří využití enzymů, které narušují strukturu tkáně. Nejvíce využívaným enzymem je trypsin, který štěpí peptidové vazby bílkovin. Enzymatické štěpení pomocí trypsinu se provádí obvykle na počátku zpracování tkáně pro narušení buněčné struktury před následným hlavním decelularizačním procesem. Dále se využívají nukleázy

(DNáza), které degradují nukleové kyseliny ve vzorcích. Jejich přítomnost by mohla vyvolávat nežádoucí imunologické reakce, proto je nutné zajistit jejich úplné odstranění ze vzorků. Tento proces se naopak využívá na konci decelularizačního postupu.

Účinnost decelularizace je zvyšována přidavkem chelatačních činidel (např. EDTA ethylendiamintetraoctová kyselina), které vytvářejí komplexní sloučeniny s ionty kovů ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Tyto ionty se účastní vazby buněk k adhezním proteinům, proto jejich odstranění znemožní vazbu buněk na proteiny extracelulární hmoty a zlepší úspěšnost decelularizačního procesu.

Využití decelularizačních metod je vždy spojeno i se zásahem do struktury mezibuněčné hmoty. Proto je nutné vždy zvažovat a vyhodnotit vliv úspěšnosti decelularizace a zachování struktury mezibuněčné hmoty, která má dále sloužit jako tkáňový nosič. Po provedení decelularizace je nutné ověření úspěšnosti procesu (detekce zbytkových buněk či genetického materiálu, struktura mezibuněčné hmoty). Ověření se provádí histologickými a biochemickými metodami, kvantifikací DNA.

Po vytvoření decelularizovaného scaffoldu následuje tzv. recelularizace – osídlení tkáňového nosiče buňkami, často se využívají kmenové buňky. Byly učiněny pokroky ve vývoji recelularizované kůže, plic, jater a ledvin.

#### **Použitá a doporučená literatura:**

King W., Chen J., Deshpande M., He T., Ramakrishna H., Xie Y., Zhang F., Zhao F. Structural design, fabrication and evaluation of resorbable fiber-based tissue engineering scaffolds. *Biotechnology nad Bioengineering*. Intechopen 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84243

Singh Ch. Wong C., Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *Journal of Functional Biomaterials* 2015, 6(3): 500-25. ISSN 2079-4983. DOI: 10.3390/jfb6030500

Wang X., Han Ch., Hu X., Sun H., Chuangang Y., Gao Ch., Haiyang Y. Applications of knitted meshe fabrication techniques to scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2011, 4(7), 922-32. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.04.009

Erben J., Pilarova K., Sanetnik F., Chvojka J., Jencova V., Blazkova L., Havlicek J., Novak O., Mikes P., Prosecka E., Lukas D., Kuzelova Kostakova E. The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Materials Letters* 2015, 143:172-6. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.12.100

Erben J., Jencova V., Chvojka J., Blazkova L., Strnadova K., Modrak M., Kuzelova Kostakova E. The combination of meltblown and electrospinning – The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability. *Materials Letters* 2016, 173: 153-7. DOI: 10.1016/j.matlet.2016.02.147

Rampichova M., Bozgo M., Chvojka J., Prosecka E., Kofronova O., Amler E. Cell penetration to nanofibrous scaffolds. *Cell Adhesion & Migration* 2014, 8 (1): 36-41. DOI: 10.4161/cam.27477

Zhu N., Chen X. Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. IntechOpen 2013. DOI: 10.5772/54125

Murphy S.V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* 2014, 32 (8): 773-85. DOI: 10.1038/nbt.2958

El-Sherbiny I.M., Yacoub M.H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science & Practice* 2013, 2013 (3): 316-42. DOI: 10.5339/gcsp.2013.38

Zhang X., Chen X., Hong H., Hu R., Liu J., Liu Ch. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive Materials* 2022, 10: 15-31. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.014

## 5. Charakterizace tkáňových nosičů

Jana Horáková

*Důležité pojmy: povrchové, makroskopické vlastnosti, UV/VIS spektroskopie, IR spektroskopie, gelová permeační chromatografie, optická, fluorescenční mikroskopie, rastrovací, transmisní elektronová mikroskopie, porozimetrie, výpočetní tomografie, statická zkouška tahem, test přilnavosti, kalorimetrie, rentgenová krystalografie, měření kontaktního úhlu, mikroskopie atomárních sil, testování degradability*

Pro správnou funkci tkáňových nosičů jsou důležité určité vlastnosti, které je nutné adekvátními technikami měřit. Některé vlastnosti byly již jmenovány v kapitole 2. Požadavky na materiály pro tkáňové inženýrství. V této kapitole bude pojednáno o tom, jak takové vlastnosti správně charakterizovat. Budou popsány některé analytické metody, které jsou nejvíce využívány pro hodnocení scaffoldů, zejména polymerních nanovlákných materiálů. Detaily jednotlivých metod lze blíže nastudovat z učebnic analytické chemie / instrumentální analýzy. Následující tabulka shrnuje důležité vlastnosti scaffoldů a metody, kterými je lze měřit.

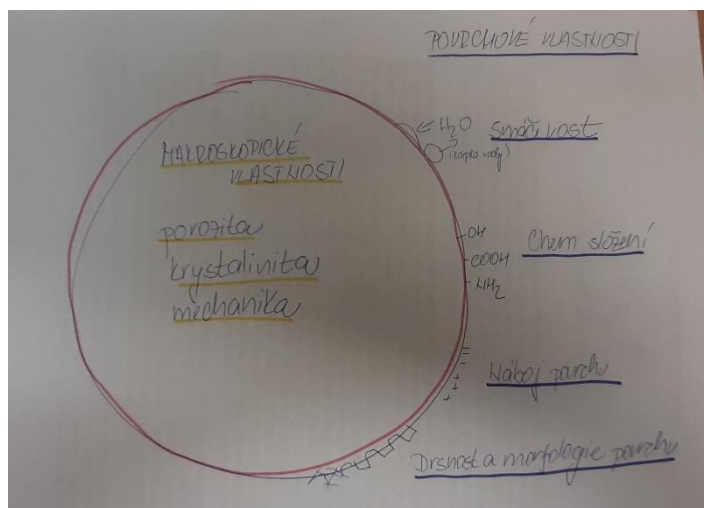
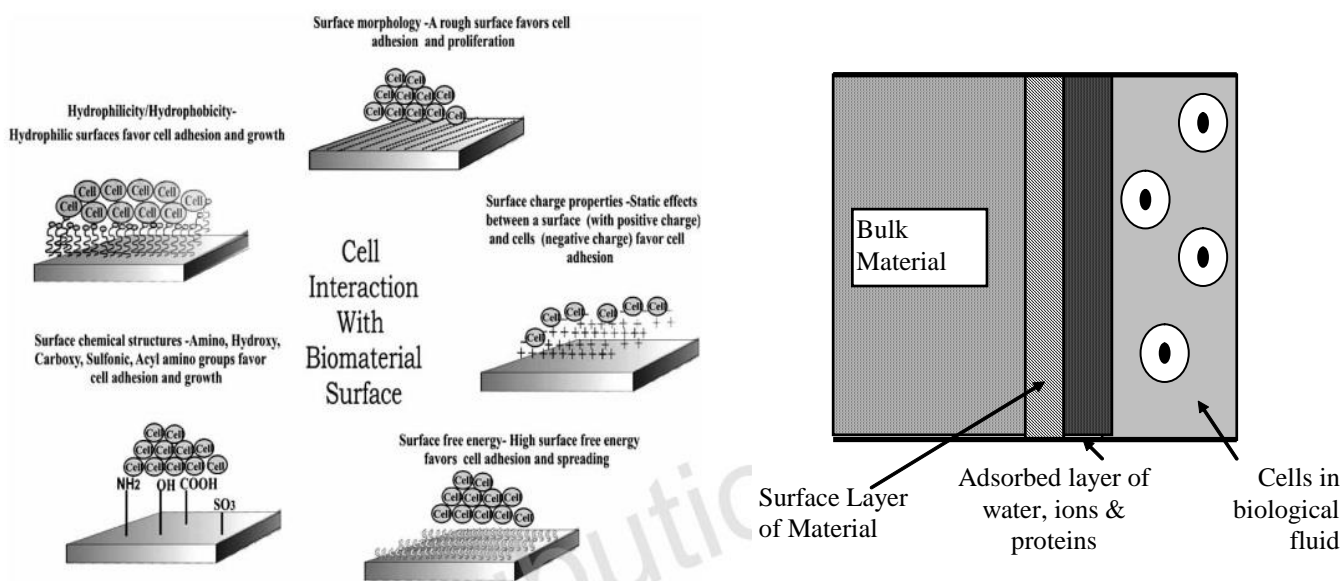
*Tabulka 1: Vlastnosti tkáňových nosičů a metody měření těchto vybraných vlastností.*

<b>Vlastnost</b>	<b>Metody měření</b>
Chemická struktura	Spektroskopie (UV/VIS, IR)
Molekulová hmotnost	Gelová permeační chromatografie
Struktura scaffoldu	Mikroskopie (optická, fluorescenční, elektronová)
Porozita	Porozimetrie Výpočetní tomografie
Mechanické vlastnosti	Statická zkouška tahem Test přilnavosti
Krystalinita	Kalorimetrie Rentgenová krystalografie
Smáčivost povrchu	Měření kontaktního úhlu
Drsnost povrchu	Mikroskopie atomárních sil
Degradabilita	Změna hmotnosti, struktury, molekulové hmotnosti

Tkáňové nosiče jsou zpravidla 3D struktury, u kterých se rozlišují 2 typy vlastností – povrchové a makroskopické (v angličtině surface, bulk properties). Tyto vlastnosti se odvíjí zejména od chemického složení tkáňového nosiče, tzn. zvolených polymerních materiálů, případně dalších látek, které jsou ve struktuře obsaženy. Vstupní polymerní materiály je nutné charakterizovat před samotnou výrobou a dále monitorovat změny po technologii výroby scaffoldu a po sterilizaci.

Pro interakci s organismem jsou velmi důležité tzv. povrchové vlastnosti (viz obr. 20 A, B) jako např. smáčivost povrchu, struktura povrchu, povrchový náboj a energie dané chemickou strukturou (funkčními skupinami). Povrchové vlastnosti materiálu udávají, jak bude materiál interagovat s okolním vodním prostředím a adhezními bílkovinami, které zajišťují následnou adhezi buněk.





Obr. 20: Povrchové vlastnosti biomateriálu (A) a jejich vliv na interakci s okolním prostředím (B).

Dále jsou u 3D scaffoldů důležité makroskopické vlastnosti, ke kterým patří vnitřní struktura tkáňového nosiče (porozita), kryštalinita a mechanické vlastnosti.

### 5.1. Chemická struktura

Chemickou strukturu je nutné zjišťovat u materiálů, které jsou přímo syntetizovány. Pokud se pracuje s dodávaným polymerem (často u elektrostatického zvláknování), obvykle postačují údaje od dodavatele polymeru (data sheet). Dále je vhodná při použití přírodních materiálů, u kterých lze očekávat vysokou variabilitu vlastností. Mezi monitorované vlastnosti polymerních materiálů patří zejména chemická struktura a molekulová hmotnost.

Chemická struktura se zjišťuje pomocí spektroskopie – u nízkomolekulárních látek používaných např. pro modifikaci scaffoldu se využívá UV/VIS spektroskopie, pro detekci

funkčních skupin polymerů se využívá infračervená spektroskopie (IR) s Fourierovou transformací (FTIR). Spektroskopické metody jsou založeny na interakci materiálů s elektromagnetickým zářením o různé vlnové délce (UV < 190 nm, VIS 190-780 nm, IR 780 nm- 1 mm). UV/VIS spektroskopie se využívá primárně pro kvantitativní analýzu („kolik toho je“), IR spektroskopie především pro kvalitativní analýzu („co tam je“).

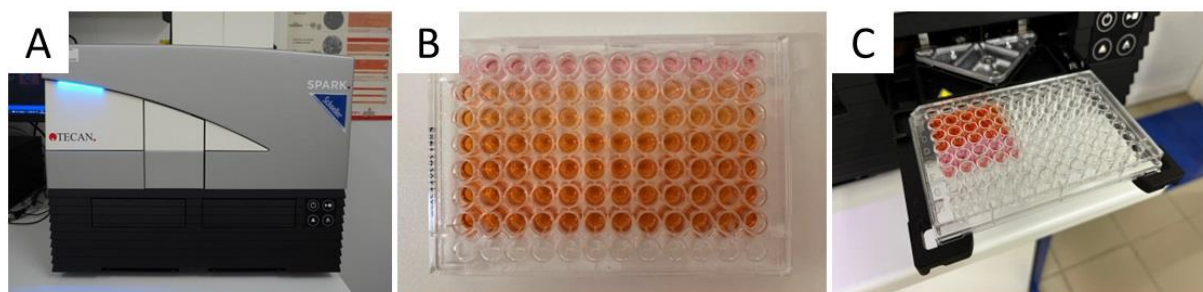
### 5.1.1. UV/VIS spektroskopie

Tato metoda je velmi využívaná v tkáňovém inženýrství pro detekci nízkomolekulárních látek s obsahem tzv. chromoforu, což je část molekuly zodpovědná za absorpci elektromagnetického záření (např. aromatický kruh, báze nukleových kyselin apod.). V laboratoři tkáňového inženýrství se tato metoda rutinně využívá pro stanovení viability buněk pomocí tzv. kolorimetrických testů jako např. MTT, cck-8, které budou podrobně rozebrány v kapitole In vitro testování tkáňových nosičů.

K měření se používají přístroje zvané spektrofotometry (viz obr. 21). Součástí spektrofotometru je zdroj elektromagnetického záření (wolframová žárovka, halogenová žárovka), monochromátor, kyveta / destička s kapalným vzorkem a detektor. Zařízení funguje na principu měření tzv. transmitance, což je veličina udávající množství elektromagnetického záření, které prošlo vzorkem podle vztahu

$$T = \frac{I}{I_0},$$

Kde T je transmitance, I je intenzita světla, které prošlo vzorkem,  $I_0$  je intenzita světla, které do vzorku vstoupilo.



Obr. 21: Foto spektrofotometru (A), 96jamková destička s barevnými roztoky pro měření absorbance (B), umístění 96jamkové destičky do spektrofotometru před měřením (C).

Spektrofotometrie se využívá primárně pro kvantifikaci látek v roztoku. Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že transmitance je závislá na koncentraci látky v roztoku vztahem

$$T = 10^{-\epsilon lc},$$

kde  $\epsilon$  je molární extinkční koeficient (konstanta specifická pro danou látku při určité vlnové délce), l je optická délka kyvety a c je koncentrace absorbující látky v roztoku. Hodnotu transmitance lze také vyjádřit pomocí tzv. absorbance jako

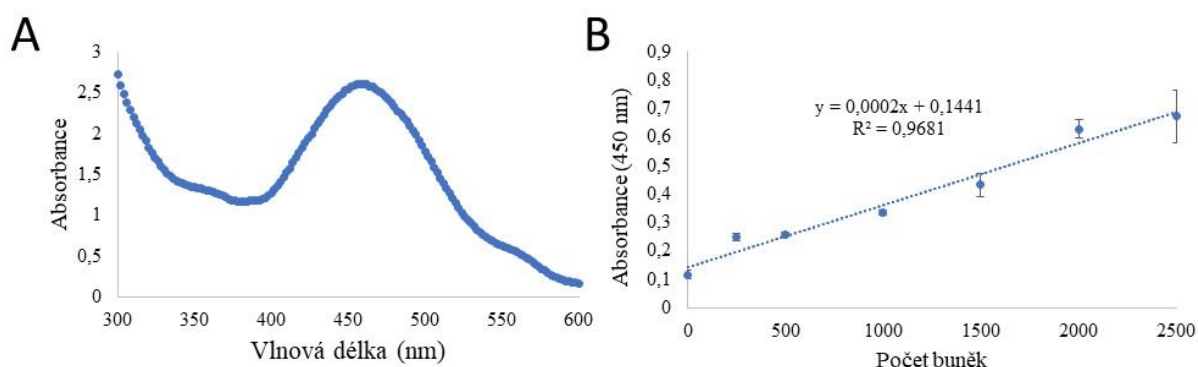
$$A = -\log T$$

$$A = \epsilon lc$$

Jelikož molární extinkční koeficient a délka kyvety jsou konstantami, koncentrace látky je závislá na měřené absorbanci. Absorbance je bezrozměrná veličina.

Použití UV/VIS spektrofotometrie má velmi široké uplatnění nejen v laboratoři tkáňového inženýrství. Má však omezenou použitelnost pouze na látky, které jsou schopné absorpce elektromagnetického záření (barevné látky ve VIS oblasti, některé bezbarvé látky v UV oblasti). Lambert-Beerův zákon platí pouze pro zředěné roztoky analytů a v omezeném rozsahu, který je nutný experimentálně stanovit pro každou metodu. Podmínkou je správné provádění měření, zejména přesné pipetování a čistota kyvet / destiček.

Vlnová délka pro měření může být již známá z předchozích experimentů nebo doporučená dodavatelem příslušného testu (např. u cck-8 testu se volí vlnová délka 450 nm). Případně může být tzv. absorpční maximum zjištěno pomocí měření celého spektra vlnových délek, pokud to přístroj umožňuje. Na trhu existují jednodušší přístroje tzv. fotometry, které měří jen při několika daných vlnových délkách. Dále jsou dostupné spektrofotometry, které umožňují proměření celého spektra vlnových délek. Výsledkem je tzv. absorpční spektrum vyjadřující závislost naměřené absorbance na vlnové délce viz obr. 22A. V místě nejvyšší dosažené hodnoty absorbance se volí nejvhodnější vlnová délka pro měření, v případě cck-8 testu je doporučeno od výrobce používat vlnovou délku 450 nm, což odpovídá nejvyššímu peaku naměřené absorbance.



Obr. 22: Absorpční spektrum cck-8 – proměření spektra vlnových délek s maximální absorbancí kolem 450 nm (A). Kalibrační přímka závislosti počtu buněk na změřené absorbanci měřená pomocí cck-8 testu (B).

Po stanovení vhodné vlnové délky se tato hodnota nastaví fixně pro další měření. Postupuje se nejčastěji metodou kalibrační křivky. Připraví se koncentrační řada měřené látky. V experimentu, jehož výsledky jsou na obr. 22B bylo změřeno celkem 7 koncentrací buněk v rozmezí 0-2500 buněk / testovací jamku, 12 opakování pro každou koncentraci (viz Obr. 21B). Následně byla změřena absorbance při 450 nm. Naměřené hodnoty absorbance byly vyneseny do grafu a sestrojila se kalibrační přímka, která je zobrazena v grafu na obr. 22B. Korelační koeficient ( $R^2$ ) by měl být co nejvyšší (ideálně více než 0,99), což je však zejména u biologických testů obtížné dosáhnout. Ideálně by se naměřená absorbance měla pohybovat

v rozpětí 0,2-1. Při vyšších hodnotách je vhodné roztoky ředit a do výpočtu zahrnout i příslušné ředění pro dosažení správného výsledku.

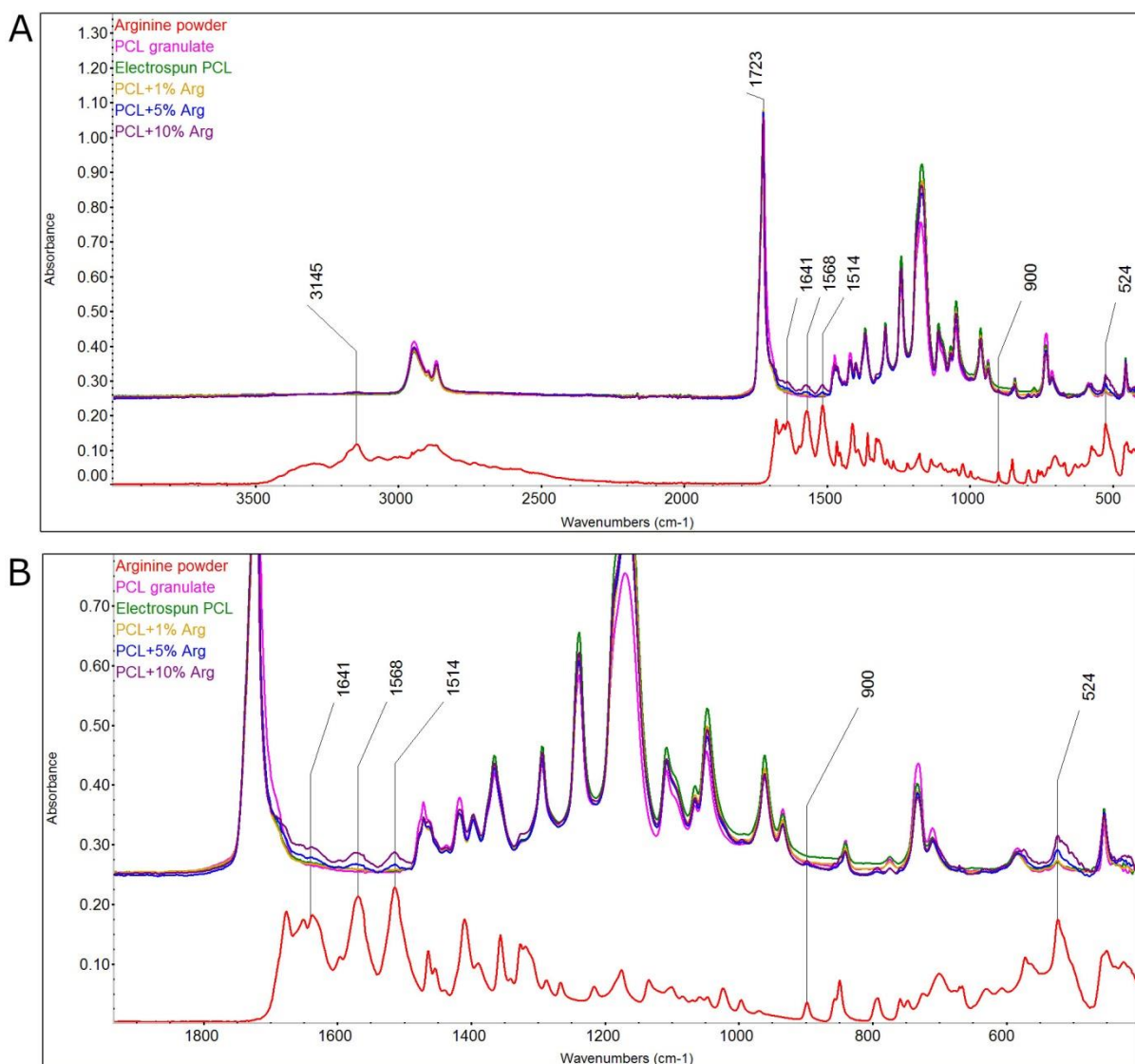
Pokud se kalibrační přímka používá pro kvantifikaci barevné látky v roztoku, je možné po sestrojení kalibrační přímky určit neznámou koncentraci látky ve vzorku. Ten se změří stejným způsobem jako vzorky pro kalibraci a ze známé rovnice kalibrační přímky se vypočítá koncentrace látky v roztoku. Pro přepočet buněk se však rovnice kalibrační přímky nepoužívá, protože metabolická aktivita nutně nemusí korelovat s počtem buněk.

Spektrofotometrie se využívá především pro kvantifikaci barevných sloučenin. Pomocí spektrofotometrie lze stanovovat pouze jednu absorbující látku v roztoku. Pokud dochází k interakci více sloučenin se zdrojem světla, není kvantifikace pomocí této metody možná.

### **5.1.2. IR spektroskopie**

Infračervená spektroskopie je analytická metoda, která se používá na rozdíl od předešlé techniky k identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a anorganických látek. Pomocí IR spektroskopie lze například ověřovat změnu polymerního materiálu před a po zvláknování, po sterilizaci, ověřovat přítomnost směsných polymerů či inkorporovaných látek do tkáňových nosičů. Při IR spektroskopii se měří pohlcení infračerveného záření (vlnová délka 0,78-1000  $\mu\text{m}$ ) analyzovaným materiálem. Výstupem měření je závislost absorbance / transmitance na vlnočtu / vlnové délce dopadajícího záření. IR záření způsobuje změny ve vibračních a rotačních stavech molekul, proto umožňuje charakterizaci funkčních skupin přítomných ve vzorcích. Existují tabulky vlnočtů charakteristických vibrací, podle kterých lze tyto funkční skupiny ve vzorku jednoznačně určit. Dnes se nejvíce využívají IR spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR) využívající matematickou transformaci pro získání klasického spektrálního záznamu.

Příklad měření je uveden na obr. 23, kde je znázorněno FTIR spektrum polykaprolaktonu (polymerního granulátu a elektrostaticky zvlákněné vrstvy), argininu a elektrostaticky zvlákněných vrstev s obsahem obou složek (PCL+ Arg v koncentracích 1, 5 a 10 hm%).



Obr. 23: FTIR spektrum polykaprolaktonu (PCL ve formě granulátu – růžová křivka, elektrostaticky zvlákněná vrstva - zelená křivka), argininu (Arg – červená křivka) a elektrostaticky zvlákněných vrstev s obsahem obou složek (PCL+ Arg v koncentracích 1 hm% - žlutá křivka, 5 hm% - modrá křivka a 10 hm% - fialová křivka). A) celé spektrum vlnových délek, B) detail s charakteristickými píky pro arginin (1641, 1568, 1514, 900, 524  $\text{cm}^{-1}$ ).

## 5.2. Molekulová hmotnost

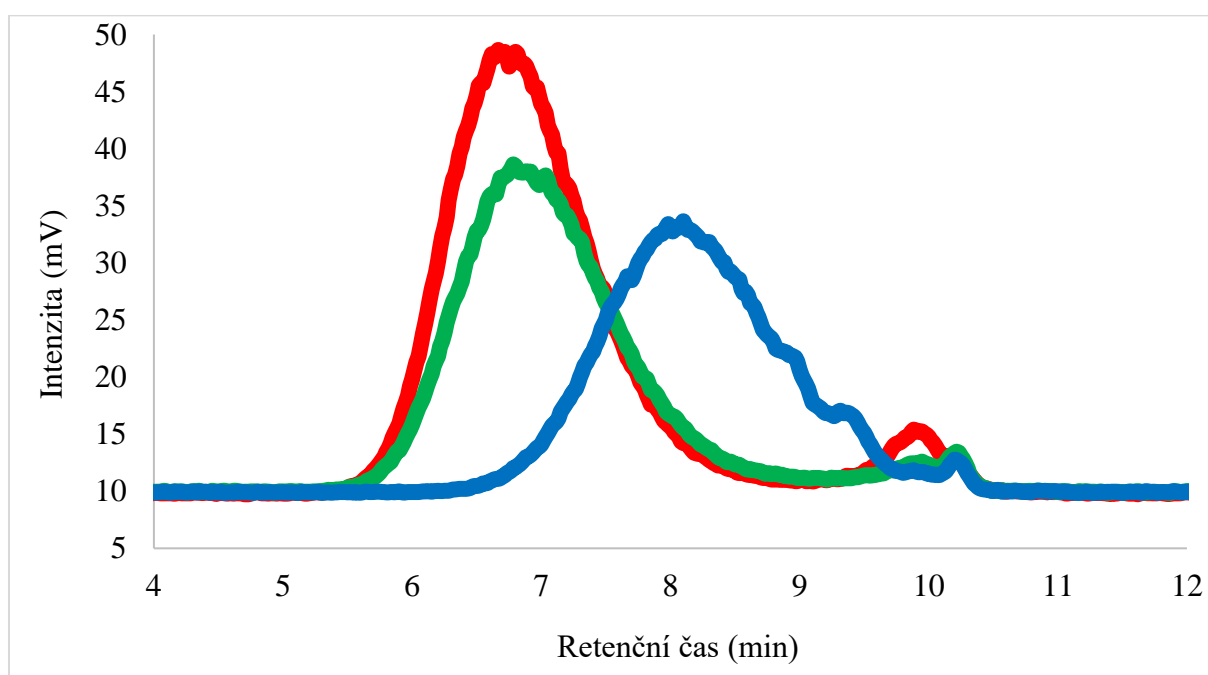
Další důležitou vlastností polymerních materiálů je molekulová hmotnost. Ta může být známá od dodavatele polymeru, je však vyjádřena pomocí nejrůznějších veličin jako např. číselně střední molekulová hmotnost ( $M_n$ ), hmotnostně střední molekulová hmotnost ( $M_w$ ) nebo viskozitní průměr molekulové hmotnosti. Pro mnoho technologických postupů zpracování polymerů jsou tyto hodnoty velmi důležité, včetně distribuce molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost se měří nejčastěji pomocí gelové permeační chromatografie.

### 5.2.1. Gelová permeační chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metody, kdy je nutné od sebe oddělit a analyzovat složky ve směsích na základě rozdílné distribuce mezi tzv. stacionární a mobilní fází. Chromatografické metody mají velmi široké využití v analytické chemii, zde se zaměříme na specifický typ kapalinové chromatografie (HPLC high performance liquid chromatography) pro určení molekulové hmotnosti.

Gelová permeační chromatografie (GPC gel permeation chromatography) označovaná také jako vylučovací chromatografie (SEC size exclusion chromatography) odděluje molekuly podle velikosti a tvaru. Stacionární fáze je tvořena nerozpustným inertním gelem, který obsahuje póry ve své struktuře. Velké molekuly nepronikají do těchto pórů a jsou unášeny ze separační kolony mobilní fází. Malé molekuly jsou zadržovány póry v koloně a tímto způsobem dochází k separaci látek. Látky tedy vystupují (elují) z kolony podle klesající molekulové hmotnosti (velké – střední – malé molekuly). Výsledná molekulová hmotnost polymeru se určí podle kalibrace standardů o známé molekulové hmotnosti.

Na obr. 24 je znázorněn GPC chromatogram 3 polymerních materiálů. Retenční časy polymerních materiálů označených červeně a zeleně mají shodnou molekulovou hmotnost, jelikož došlo k jejich retenci ve stejný čas (cca 7 minut). Polymerní materiál označený modře má menší molekulovou hmotnost než předchozí 2 materiály, jelikož došlo k jeho retenci později (po 8. minutě).



Obr. 24: GPC chromatogram 3 polymerních materiálů: červeně a zeleně jsou označeny materiály s větší molekulovou hmotností, modře pak materiál s nižší molekulovou hmotností.

### 5.3. Struktura scaffoldu

K pozorování struktury tkáňových nosičů se nejvíce využívají mikroskopické techniky. Nejjednodušší optická mikroskopie často nemá dostatečné rozlišení pro pozorování vnitřní struktury. Při inkorporaci fluorescenčních látek je možné využít i fluorescenční mikroskopii pro charakterizaci tkáňových nosičů. Její význam je však největší při pozorování buněk na scaffoldech. Nejvíce se pro morfologickou analýzu tkáňových nosičů využívá elektronová mikroskopie (skenovací, transmisní).

#### 5.3.1. Optická mikroskopie

Optická mikroskopie umožňuje pozorování objektů s rozlišovací schopností přibližně  $0,2 \mu\text{m}$  (zvětšení 1000x). Mikroskop je zobrazen na obr. 25. Skládá se z osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona), mechanické části (stojan, stolek s křížovým posuvem) a optické části (objektiv, okulár). Objektivy s různým zvětšením se u klasicky uspořádaného mikroskopu nachází nad vzorkem. V laboratoři buněčných kultur jsou využívány tzv. invertované mikroskopy, které mají objektiv umístěn pod vzorkem, což umožňuje pozorování buněk na průhledném povrchu kultivačních nádob. Dále existují mikroskopy speciálně vybavené pro tzv. live cell imaging, které umožňuje kontinuální zachycení chování buněk na kultivačních nádobách. Při speciální úpravě je možné takto pozorovat i buňky na scaffoldech. Toto kontinuální pozorování umožňuje analyzovat přímý kontakt buněk s materiálem, jejich proliferaci a další charakteristiky.

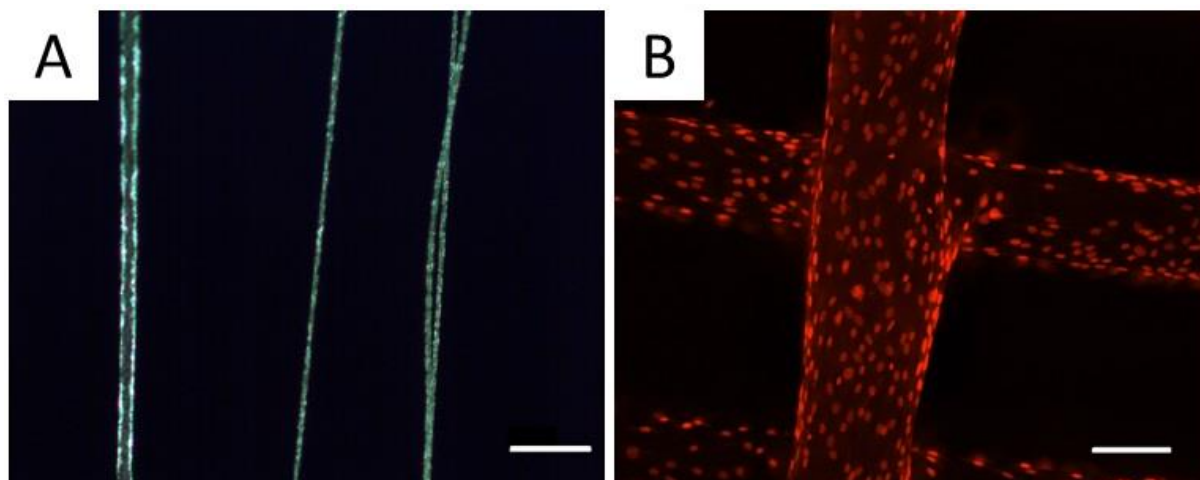
Pro analýzu morfologie scaffoldů se dá optická mikroskopie využít tam, kde je dostatečná rozlišovací schopnost pro pozorování struktury (např. mikrovlákně tkáňové nosiče – viz obr. 26).

Při analýze materiálů se využívá tzv. konfokální mikroskop, který má vyšší rozlišovací schopnost. Umožňuje snímat jednotlivé roviny preparátu (tzv. optické řezy) a poté rekonstruovat 3D obraz zkoumaného materiálu.



1. Okulár – Základní optický člen (různé hodnoty zvětšení, zpravidla 10x, 15x ...)
2. Okulárový tubus – Umožňuje zasunutí okuláru do optimální polohy vůči hlavici
3. Hlavice mikroskopu – Různé varianty - monokulární, binokulární, trinokulární
4. Revolverová hlavice – Slouží pro uchycení objektivů různých hodnot a jejich snadnou záměnu
5. Objektiv – To je „srdce“ mikroskopu (obvyklé hodnoty zvětšení, 4:1, 10:1, 40:1 ...)
6. Rameno mikroskopu – Hlavní nosič opticko-mechanických prvků mikroskopu
7. Noha mikroskopu – Základna mikroskopu, v níž je umístěn zdroj osvětlení
8. Vypínač osvětlení – Pro zapnutí či vypnutí zdroje osvětlení
9. Ovladač regulace osvětlení – Plynule reguluje intenzitu osvětlení
10. Pracovní stůl – Základní pracovní deska pro založení preparátu
11. Držák preparátu – pérový – Slouží k upevnění preparátu (podložní a krycí sklíčko)
12. Kondenzor – Umožňuje zkontrastnění obrazu
13. Kolektor – Soustřeďuje paprsky světelného zdroje
14. Ovladač makroposuvu – Pro hrubé zaostření pozorovaného objektu
15. Ovladač mikroposuvu – Pro jemné doostření pozorovaného objektu

Obrázek č. 25: jednotlivé části optického mikroskopu



Obr. 26: Foto z optické mikroskopie mikrovláken připravených technologií *drawing* (A), fluorescenčně značená buněčná jádra pomocí propidium jodidu na scaffoldu vyrobeném pomocí technologie 3D tisku, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.2. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je obdoba optické mikroskopie s tím rozdílem, že se pozoruje fluorescenční signál generovaný vzorkem. Vzorek musí obsahovat látky schopné fluorescence, což znamená, že látka je schopná absorpce záření, která způsobí excitaci elektronu a následnou emisi záření o delší vlnové délce společně s vyzářením fotonu. Fluorescence může být primární nebo sekundární. Primární fluorescence se vyskytuje u některých materiálů, což znesnadňuje fluorescenční barvení buněk na těchto scaffoldech. Sekundární fluorescence spočívá ve využití fluorescenční látky, která se naváže na zkoumané struktury (inkorporace fluorescenčních barviv do scaffoldů, obarvení specifických buněčných struktur apod.). Fluorescenční mikroskopie je nejvíce využívána pro pozorování buněk při *in vitro* testování scaffoldů. Je možné obarvit buněčná jádra a buňky kvantifikovat (viz obr. 26B). Dále je možné barvit i jednotlivé buněčné struktury a sledovat „chování“ buněk na testovaných materiálech.

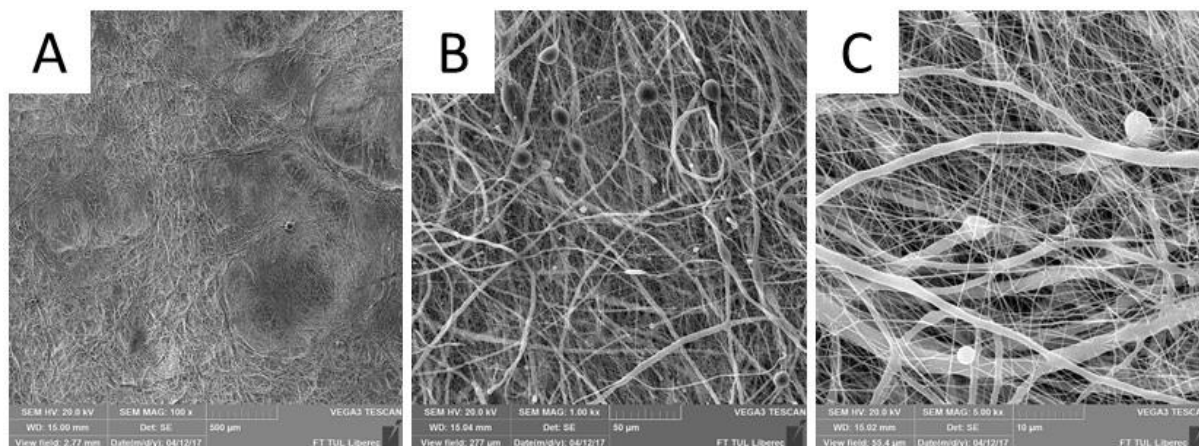
### 5.3.3. Skenovací elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie využívá místo světla (=proud fotonů) proud elektronů, který je směřován na vzorek pomocí soustavy elektromagnetických čoček. U skenovací (rastrovací) elektronové mikroskopie (SEM) dopadá postupně tenký svazek elektronů na vzorek, detekovány jsou odražené částice – sekundární a zpětně odražené elektrony. Vzorky pro pozorování v SEM se pokrývají tenkou vrstvou (10-20 nm) kovu (Au, Pt) pro zvýšení vodivosti. Vzorky musí být stabilní ve vakuu, nemělo by docházet k nabíjení preparátu. Vzorky musí být čisté a suché. Biologické vzorky je proto nutné před pozorováním odvodnit. SEM může dosahovat maximálního rozlišení přibližně 0,2 nm.

Skenovací elektronová mikroskopie se využívá téměř rutinně při analýze morfologie povrchu tkáňových nosičů, zejména u nanovláknenných materiálů. Příklad snímků ze SEM je znázorněn na obr. 27. Po zvláknovacím procesu je ověřena homogenita materiálu, jsou pořízeny snímky



s dostatečným rozlišením, které jsou následně podrobeny obrazové analýze. Nejčastěji je vyhodnocován průměr vláken a jeho distribuce. Dále je možné kvantifikovat přítomnost defektů (jejich velikost, zastoupení), orientaci vláken. Pozorovat lze jak povrchy zvlákněných materiálů, tak příčné řezy, na kterých lze měřit např. tloušťku vrstvy.



Obr. 27: Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu při různém zvětšení: 100x (A, měřítko 500  $\mu\text{m}$ ), 1000x (B, měřítko 50  $\mu\text{m}$ ), 5000x (C, měřítko 10  $\mu\text{m}$ ).

#### 5.3.4. Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) analyzuje elektrony procházející vzorkem, proto je možné pomocí této techniky analyzovat pouze velmi tenké řezy (1  $\mu\text{m}$ ). Jeho rozlišovací schopnost dosahuje zvětšení až 100 000x (rozlišení 0,1 nm), což umožňuje pozorování vzorků o nanorozměrech (scaffoldy s obsahem nanočástic, buněčné struktury apod). TEM je například využívána pro pozorování vláken typu jádro-plášť a průkaz koaxiality těchto vláken.

### 5.4. Porozita

Porozita je důležitá vlastnost tkáňových nosičů, její měření je však poměrně složité. Porozita je definována jako poměr celkového objemu pórů k celkovému objemu vzorku. Existuje několik technik, které ale pro charakterizaci tkáňových nosičů není snadné aplikovat. Ke standardním metodám charakterizace pórů patří kapalínová (rtuťová) a plynová porozimetrie. V posledních letech je trendem hodnocení porozity pomocí výpočetní tomografie. Měření pórů lze provést také pomocí analýzy obrazu ze snímků pořízených elektronovým mikroskopem. Je však třeba mít na paměti, že póry jsou charakteristiky 3D struktur, tudíž by měly být využity další techniky pro kvantifikaci a bližší charakterizaci pórů.

#### 5.4.1. Rtuťová porozimetrie

Rtuťová porozimetrie (MIP mercury intrusion porosimetry) patří k nejuniverzálnějším metodám měření pórů, jelikož umožňuje měření pórů o velikostech jednotek nm po stovky  $\mu\text{m}$ . Nevýhodou metody je toxicita rtuti. Vzorek je umístěn do měřicí nádoby, která je postupně naplněna rtutí. Dochází ke zvýšení tlaku, což vede k zaplnění pórů rtutí. Během měření jsou zaznamenávány objem rtuti a tlak. Výstupem měření jsou data o celkovém objemu pórů, distribuci velikosti pórů, měrném povrchu a počtu pórů.

#### 5.4.2. *Bublíková metoda*

Také obdobně jako výše zmíněná metoda využívá průnik tekutiny skrz studovaný materiál. Materiál je ponořen do tekutiny a sleduje se tlak, kterým je tekutina vytlačována ven. Pomocí bublínkové metody lze stanovit největší a průměrnou velikost póru v materiálu. Metoda zachycuje pouze otevřené póry.

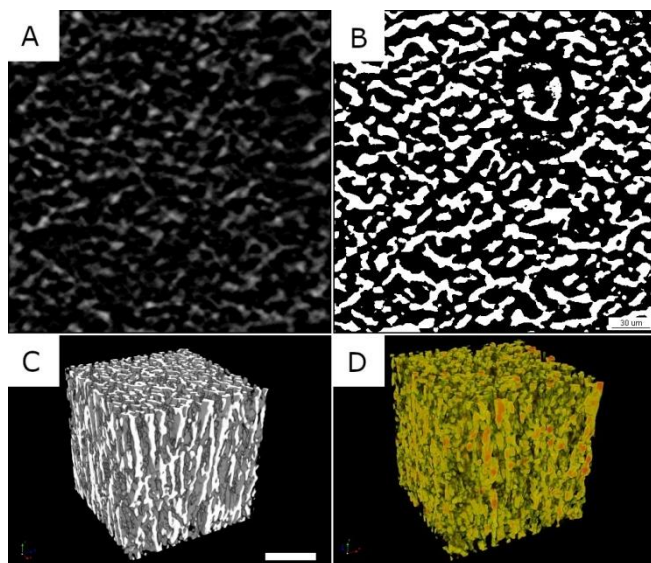
#### 5.4.3. *Plynová porozimetrie*

Plynová adsorpční porozimetrie je založena na adsorpci plynu ( $N_2$ , Ar) na povrch zkoumané látky. Během měření jsou zaznamenávány adsorpční izotermy, ze kterých lze vyhodnotit celkový objem pórů, distribuce velikosti pórů. Je možné měřit póry o velikostech v rozsahu jednotek až stovek nm. Pro stanovení měrného povrchu se využívá metoda BET (dle práce vědců Brunauer-Emmett-Teller).

#### 5.4.4. *Výpočetní tomografie*

Výpočetní tomografie (CT computed tomography) je zobrazovací metoda 3D objektů využívající rentgenového záření. Dle dosaženého rozlišení se pro analýzu materiálů používá mikroCT a nanoCT. Principem metody je interakce rtg záření se zkoumaným materiálem, při které dojde k zeslabení záření v závislosti na hustotě a složení materiálu. Materiál je skenován pod různými úhly, z čehož se následně rekonstruuje 3D obraz a lze získat podrobné informace o materiálových charakteristikách jako např. velikost pórů a jejich distribuce. Pomocí výpočetní tomografie lze charakterizovat také uzavřené póry na rozdíl od použití kapalinové a plynové porozimetrie. Využití mikroCT a nanoCT je pro charakterizaci tkáňových nosičů velmi vhodnou metodou umožňující detailní popis struktury materiálu.

Na obrázku 28 jsou znázorněny snímky pořízené pomocí mikroCT elektrostaticky zvlákněného kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu (PLCL). Dále bylo pomocí měření zjištěno, že výsledná struktura byla složená z vláken o tloušťce  $5,58 \pm 0,10 \mu\text{m}$ , z pórů o velikosti  $9,34 \pm 0,19 \mu\text{m}$ . Celková porozita materiálu tvořila  $69,63 \pm 0,76 \%$ , z čehož bylo více než 99,99 % otevřených pórů.



Obr. 28: Snímky pořízené mikroCT elektrostaticky zvlákněného kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu (PLCL): snímek řezu vlákněného materiálu (A), snímek po binarizaci (B), 3D vizualizace binárního obrazu (C), barevná 3D vizualizace znázorňující rozdíly v tloušťce vláken – zelená = 2  $\mu\text{m}$ , žlutá = 4  $\mu\text{m}$ , červená = 8  $\mu\text{m}$ , fialová = 12  $\mu\text{m}$  (D).

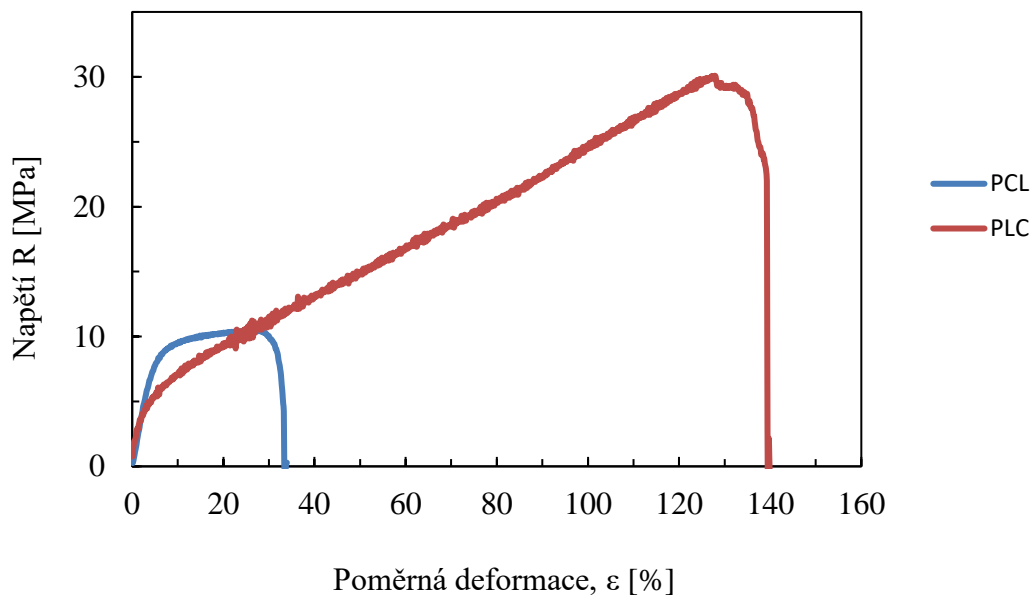
## 5.5. Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti jsou další důležitou vlastností, která by měla být u tkáňových nosičů správně vyhodnocována. Pro každou aplikaci jsou požadované jiné mechanické vlastnosti, které by se měly ideálně blížit vlastnostem nahrazované tkáně. U degradabilních materiálů je potřeba počítat se změnou mechanických vlastností během degradace. Základní testovací metodou je statická zkouška tahem. Testování mechniackých vlastností také podléhá legislativě, konkrétně se jedná o normu ČSN EN ISO 13934-1 (800812) Textilie – Tahové vlastnosti plošných textilií – Část 1: Zjišťování maximální síly a tažnosti při maximální síle pomocí metody Strip.

### 5.5.1. Tahová zkouška

Tahová zkouška se provádí na trhacích strojích po upnutí materiálu do čelistí. Materiál je zatěžován tahem v jednom směru, dokud nedojde k poškození testovaného materiálu. Během měření je zaznamenávána závislost síly ( $F$  [N]) na prodloužení materiálu (absolutní změna délky  $\Delta L$  [mm]). Tento záznam se označuje jako tzv. pracovní diagram. V praxi se však častěji pracuje s tzv. smluvním diagramem, který průběh tahové zkoušky převádí do souřadnic napětí ( $R$  [MPa]) a poměrné deformace ( $\varepsilon$  [%]). Napětí se vypočítá podle vztahu  $R = \frac{F}{S}$ , kde  $S$  je plocha příčného průřezu testovaného materiálu v nezatíženém stavu. Z tohoto důvodu je nutné znát rozměry (tloušťku!) testovaného materiálu. Poměrná deformace se vypočítá podle vztahu  $\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$ , kde  $L_0$  je počáteční délka vzorku. Příklad smluvního diagramu pro porovnání 2 nanovlákněných materiálů je zobrazen na obr. 30. Mechanické vlastnosti dosahují u elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu hodnoty cca 11 MPa a poměrnou deformaci 32%, u kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu bylo naměřeno napětí 30 MPa a 140% poměrné deformace.

Získaná deformační křivka dává celou řadu charakteristik jako např. mez pevnosti, tažnost, Youngův modul pružnosti. Mez pevnosti ( $R_m$ ) udává nejvyšší napětí, při kterém již došlo k porušení testovaného materiálu. Při dosažení meze pevnosti je odečteno i maximální relativní prodloužení (tažnost  $A = \frac{\Delta L}{L_0} * 100$ ). Youngův modul pružnosti ( $E$  [MPa]) je definován v oblasti tzv. pružných (vratných) deformací jako poměr napětí v tahu  $\sigma$  [MPa] a jím vyvolané poměrné prodloužení dle vztahu  $E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$ .

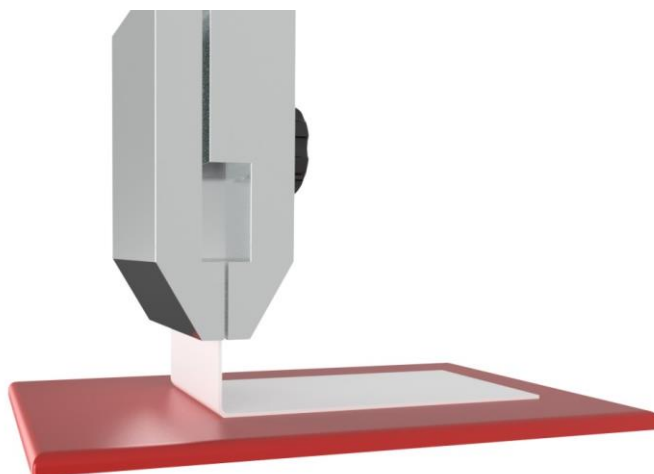


Obr. 30: Porovnání deformační křivky elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu (PCL – modrá křivka) a kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu (PLC – červená křivka).

Pro mechanické testování tkáňových nosičů je opět nutné napodobovat co nejlépe přirozené prostředí nahrazované tkáně, proto je možné tuto základní metodu modifikovat např. testováním vzorků za mokra, aplikovat cyklické tahové zatížení ve správném rozsahu sil (např. pro testování náhrad cévních náhrad a dalších tkání, které jsou v těle cyklicky namáhány) apod.

### 5.5.2. Test přilnavosti

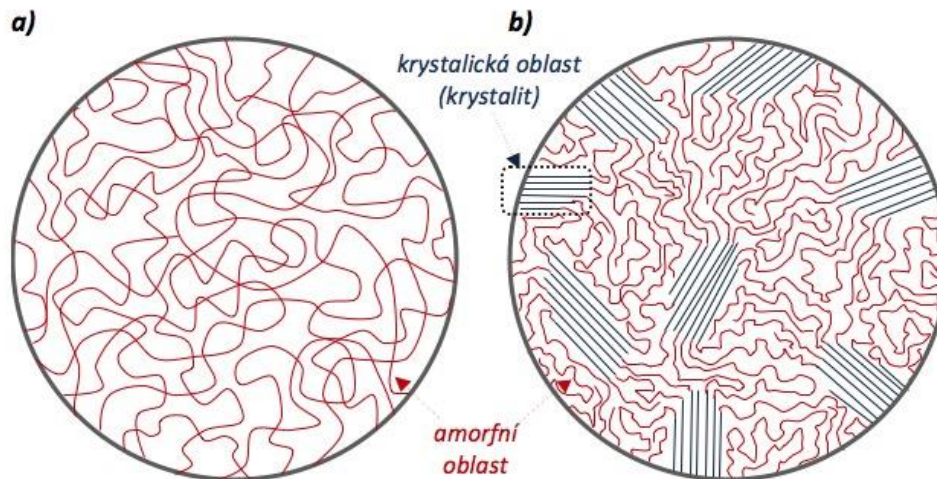
Další modifikací tahové zkoušky jsou tzv. peel testy, kdy se testuje přilnavost dvou materiálů. Tyto vlastnosti jsou důležité pro některé aplikace např. v gastrointestinálním traktu (viz kapitola Prevence gastrointestinálních adhezí), kdy je požadovaná různá adheze k okolní tkáni (adhezní nebo naopak neadhezní materiály). Testovaný materiál je položen na substrát a pomalu odtahován, přičemž se zaznamenává síla nutná k odtržení materiálu viz obr. 31. Existují různé variace peel testu, materiál může být odtrháván pod různým stupněm apod. Do grafu se zaznamenává závislost síly na délce odtržení. Z grafu lze odečíst maximální sílu nutnou k odtržení dvou materiálů a porovnat tak přilnavost různých materiálů k podkladu. Podkladem může být např. biologický materiál.



*Obr. 31: Schéma testu přilnavosti materiálu k podkladu. Materiál je přiložen k podkladu a pomocí trhacího zařízení odtahován. Síla nutná k odtržení materiálu od povrchu je úměrná adhezi materiálu k tomuto povrchu.*

## **5.6. Krystalinita**

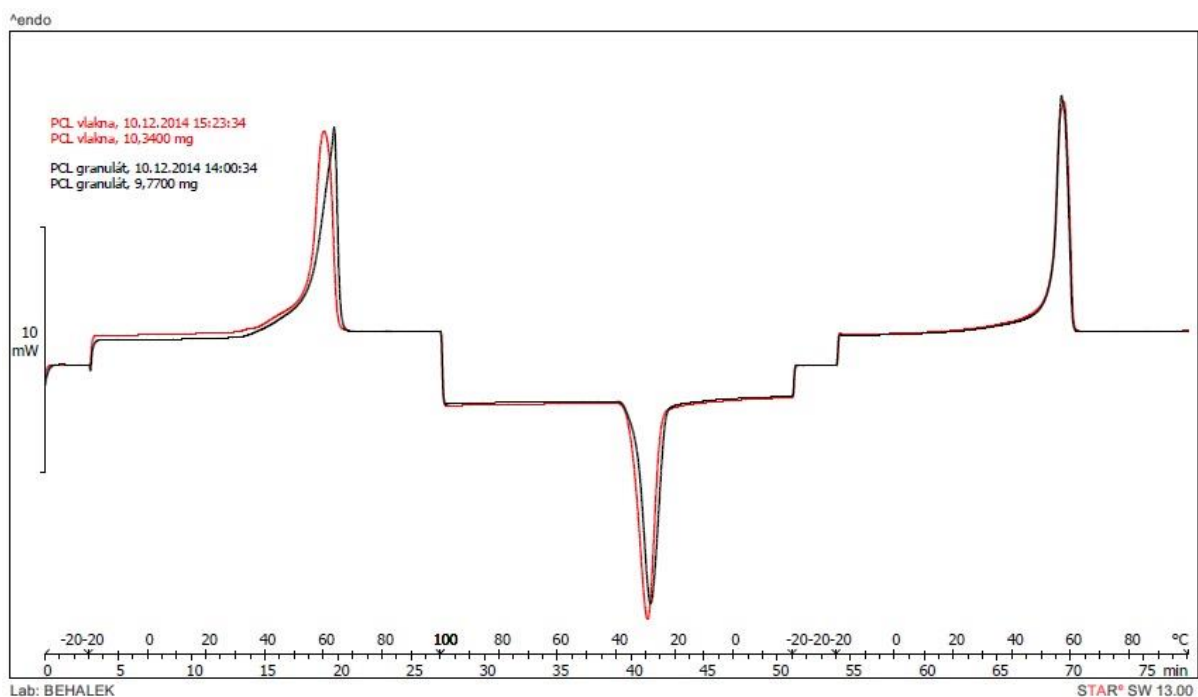
Polymerní materiály se dělí na (semi)krystalické a amorfni dle uspořádanosti makromolekulárního řetězce v pevném stavu. V tavenině jsou makromolekuly vždy uspořádány nepravidelně, během chlazení je však ustálena určitá struktura polymerních řetězců. Amorfni polymer se vyznačuje neuspořádanou strukturou, kde jsou makromolekuly ve formě náhodných klubek, která mohou být vzájemně propletena. Naproti tomu semikrystalické polymery jsou tvořeny oblastmi s uspořádanými řetězci makromolekul společně s neuspořádanými řetězci. Proto jsou tyto polymerní materiály označovány jako semikrystalické, jelikož polymer nemůže být 100% krystalický. Podíl těchto uspořádaných částí je vyjádřen pomocí stupně krystalinity, kterou lze měřit např. termickými metodami jako je diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), která bude rozebrána podrobněji. Další metody termické analýzy zahrnují např. termogravimetrickou analýzu (TA), při které se měří závislost vzorku na teplotě nebo diferenční termickou analýzu (DTA), při které se měří rozdíl teplot mezi vzorkem a referenčním materiálem. Stupeň krystalinity závisí na chemickém složení polymeru, ale také na podmínkách zpracování a přítomnosti dalších látek. Krystalické polymery jsou v porovnání s amorfni polymery mechanicky odolnější (mají vyšší pevnost, modul pružnosti), mají však nižší tažnost. Amorfni polymery jsou čiré (průhledné), krystalické polymery se jeví zakalené.



Obr. 32: Uspořádání amorfního a semikrystalického polymeru v tuhém stavu.

### 5.6.1. Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je jedna z metod termické analýzy polymerních materiálů, při které je měřen tepelný tok. Rychlost tepelného toku je měřena u testovaného a referenčního vzorku. Měření se provádí v určitém tepelném rozmezí, rychlost ohřevu je možné nastavit. Výsledkem měření je graf závislosti tepelného toku na teplotě nebo na čase (DSC křivka). Z této křivky lze vysledovat důležité fázové přeměny, které se na grafu jeví jako píky. Endotermické děje spojené se spotřebou tepla se zobrazují jako negativní hodnoty vzhledem k výchozí DSC křivce (krystalizace), naopak exotermní děje spojené s výdejem tepla se zobrazují jako píky nad základní DSC křivku (tání). Na obr. je znázorněn DSC křivka polykaprolaktonu ve dvou formách – polymerní granulát (černá křivka) a elektrostaticky zvláknění vlákenná vrstva (PCL vlákna znázorněná červenou křivkou). Při prvním ohřevu dochází k tání polymeru okolo 60°C. Při analýze byl zvolen cyklus dvou ohřevů. Při prvním měření je vidět mírný rozdíl v chování polymeru (před a po zpracování), u druhého cyklu jsou již píky totožné. První cyklus tedy dává informace o zpracování polymerního materiálu, druhý ohřev již vypovídá o samotném polymerním materiálu bez vlivu použitých technologií a dalších manipulací, které mohou termické chování ovlivnit. Dále je na grafu vidět teplota krystalizace kolem 30°C naměřená během ochlazovacího cyklu. Rozsah měřených teplot byl zvolen z dostupných údajů o polykaprolaktonu (-20°C – 100°C), rychlost ohřevu byla stanovena experimentálně (10°C / min). Teplota tání a krystalizace se určují z vrcholu píky, energie spotřebovaná na tání / krystalizaci se zjišťuje integrací píky. Z hodnoty energie tání ( $\Delta H_m$ ) je možné vypočítat stupeň krystalizace ( $\Delta X$ ), pokud je známa hodnota energie 100% krystalického polymeru. Pro PCL je udávána hodnota 135,44 J/g dle Crescenzi et al. Naměřená hodnota entalpie pro PCL byla kolem 86 J/g, což odpovídá zastoupení 64% krystalizační fáze v polymerním materiálu.



Obr. 33: Záznam DSC křivky pro polykaprolakton ve formě granulátu (černá křivka) a v nanovlákněné formě (červená křivka).

Diferenční skenovací kalorimetrie umožňuje měření krystalinity, ale pouze pro polymery se známou hodnotou energie 100% krystalického polymeru, což není možné použít pro celé spektrum materiálů využívaných v tkáňovém inženýrství. Mezi další metody patří např. rentgenová krystalografie.

### 5.6.2. Rentgenová krystalografie

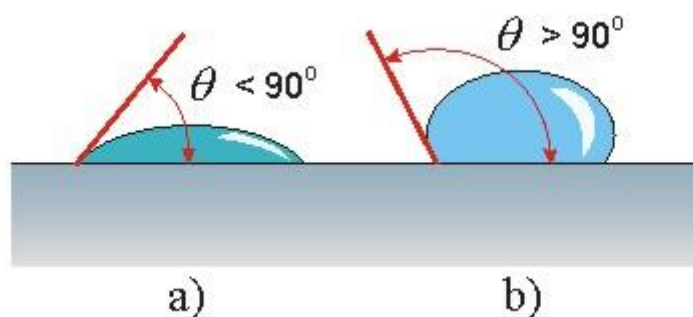
Rentgenová krystalografie (XRD X-ray diffraction) je metoda sloužící k určení prostorové struktury molekul. Jejím principem je interakce rentgenova záření s krystalickou strukturou látek. V makromolekulární chemii lze touto metodou stanovit krystalinitu polymerů. Z naměřených difraktogramů lze kvantifikovat zastoupení krystalické a amorfni fáze ve studovaném scaffoldu. Pro polykaprolakton byla naměřena krystalinita cca 50%. Odhad relativní chyby měření je okolo 10%, což je nutné zohlednit při interpretaci výsledků měření.

### 5.7. Smáčivost povrchu

Smáčivost povrchu je velmi důležitá povrchová vlastnost scaffoldu ovlivňující interakci s adhezními proteiny, které zprostředkovávají následnou adhezi buněk (viz kapitola Interakce mezi buňkami a biomateriálem). Materiály lze z tohoto hlediska dělit na hydrofilní (smáčivé, kontaktní úhel  $< 90^\circ$ , obr. 33A) a hydrofobní (nesmáčivé (kontaktní úhel  $> 90^\circ$ , obr. 33B). Pro správnou buněčnou adhezi jsou výhodné povrchy mírně hydrofilní (kontaktní úhel cca  $50-80^\circ$ ), kdy dochází k adsorpci adhezních proteinů ve správné konformaci. Smáčivost je projevem přitažlivých a odpuzivých sil mezi částicemi povrchových vrstev dvou stýkajících se povrchů (testovaný materiál a voda). Pro kvantifikaci sočivosti se nejčastěji používá měření kontaktního úhlu.

### 5.7.1. Měření kontaktního úhlu

Kontaktní úhel charakterizuje míru smáčení kapaliny na pevném povrchu, konkrétně se měří úhel smáčení ( $\theta$ ), který svírá tečna povrchu kapky vedená v bodě styku kapky s testovaným materiálem. V praxi se měření provádí aplikací definovaného množství kapky vody (jednotky  $\mu\text{l}$ ) na povrch testovaného materiálu a snímá se profil kapky, který se může v čase měnit. Pokud dochází ke změně tvaru kapky, měření se provádí v určitých časových intervalech, dokud nedojde k vsáknutí kapky nebo k ustálení rovnováhy mezi pevnou látkou a vodou. Pro měření se využívá přístroj s videokamerou a softwarem, který umožňuje profil kapky na kružnici pomocí tří bodů vyznačených na povrchu.



Obr. 34: Schéma přisedlé kapky na hydrofilním (A) a hydrofobním (B) povrchu. Foto z testování (C)?

Měření kontaktního úhlu je takto definováno na ideálně hladkém povrchu. Tato podmínka však zejména u tkáňových nosičů nebývá splněná, proto vyhodnocení může být silně komplikováno nehomogenitou drsnosti povrchu a chemického složení povrchu.

## 5.8. Drsnost povrchu

Drsnost povrchu také velmi ovlivňuje pozdější interakci scaffoldů s buňkami. Pro hodnocení drsnosti povrchu se nejčastěji využívá mikroskopie atomárních sil. Nejčastěji se měří parametr  $R_A$ , což je průměrná aritmetická hodnota drsnosti. U tkáňových nosičů je však velmi důležitý i tvar a rozmístění nerovností, což lze obtížně kvantifikovat. Proto je nutné pro správnou charakterizaci scaffoldu vždy kombinovat zobrazovací metody (např. elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil a mikroCT).

### 5.8.1. Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM atomic force microscopy / SFM scanning force microscopy) je technika používaná k charakterizaci povrchů. Dosahuje velkého rozlišení srovnatelného s elektronovou mikroskopií. Základem konstrukce mikroskopu atomárních sil je ostrý hrot (cantilever) upevněný na ohebném nosníku. Během měření se tento hrot pohybuje po povrchu v pravidelném rastru. Měření může probíhat ve 3 módech. Při kontaktním měření se hrot pohybuje přímo po povrchu vzorku, což může vést k poškození vzorku. Při nekontaktním módu nosník s hrotem osciluje nad vzorkem a zaznamenávají se změna frekvence nebo oscilace při



přiblížení se k povrchu vzorku. Posledním typem je tzv. pokleповý mód, který kombinuje oba výše zmíněné přístupy.

Výhodou mikroskopie atomárních sil je, že vzorek pro analýzu není potřeba nijak speciálně upravovat. Nevýhodou je malá velikost skenovaného pole a časová náročnost analýzy.

## 5.9. Degradabilita

V posledních letech jsou velmi využívány degradabilní materiály pro konstrukci tkáňových nosičů, což přináší nutnost nových testovacích metod pro odhad správné doby degradace v organismu. Ideálně by měla degradace probíhat stejnou rychlostí, jakou probíhá obnova poškozené tkáně / orgánu v organismu. Tento děj však může trvat u různých jedinců různě dlouho, je však nutné alespoň teoreticky simulovat přirozené prostředí laboratorně a analyzovat rychlost degradace. Při testování degradace je nutná znalost o prostředí implantace materiálu a přítomnosti enzymů v daném místě.

Pro správné hodnocení je nutné znát mechanismus degradace v organismu. Přírodní materiály jsou degradovány převážně enzymaticky. Enzymy vykazují různou specifitu k substrátu. Existují např. nespecifické proteázy, které štěpí peptidové vazby aminokyselin v bílkovinném řetězci. Na druhé straně existují specifické enzymy jako např. kolagenáza, která štěpí kolagen.

Syntetické materiály mohou degradovat různými způsoby. Například degradabilní polyestery jsou rozkládány hydrolyticky. Hydrolýza může být urychlena přítomností enzymů. Rozklad může probíhat povrchově nebo makroskopicky v závislosti na difuzi vody do tkáňového nosiče. Pokud je rychlost štěpení polymerního řetězce větší než difuze vody dovnitř materiálu, probíhá povrchová degradace. Z polymeru jsou odštěpovány oligomery a monomery a materiál degraduje z povrchu do středu materiálu. Pokud voda difunduje do celého objemu scaffoldu, nastává tzv. makroskopická degradace. Dochází ke štěpení polymerního materiálu v celém objemu, produkty štěpení mohou navíc fungovat jako autokatalyzátory a degradaci tak ještě urychlit. Pokud je degradace příliš rychlá (jako tomu může být např. u polyglykolové kyseliny), mohou se v místě implantace hromadit kyselé produkty, které vyvolají nežádoucí zánětlivou odpověď organismu.

Při testování degradability v laboratoři je tedy nutné správně nasimulovat přirozené prostředí (vodné prostředí – pufr / médium, přítomnost enzymů, teplota 37°C) a sledovat změny scaffoldu v různých časových intervalech. Všechny vlastnosti zmíněné výše se mohou při degradaci měnit. Nejčastěji se při testování degradability měří úbytek hmotnosti. U materiálů, které ve vodě bobtnají jako např. kolagen, se může zpočátku jednat o přírůstek hmotnosti, který je ale způsoben vazbou vody. Dále se sleduje změna molekulové hmotnosti. Může docházet k postupnému odštěpování monomerů / oligomerů a k poklesu molekulové hmotnosti nebo mohou být „odplavovány“ celé polymerní řetězce. Způsob degradace také velmi silně ovlivňuje mechanické vlastnosti, které by měly být zachovány po dobu, než dojde k tvorbě mezibuněčné hmoty buňkami, které nově osídlily scaffold po implantaci. S degradací může docházet ke změně struktury scaffoldu, proto se tkáňové nosiče sledují i mikroskopickými technikami. Dále dochází ke změně krystalinity, nejčastěji k jejímu zvýšení, jelikož preferenčně dochází k degradaci amorfních částí polymeru.

## 5.10. Shrnutí

Výše zmíněné metody nepředstavují kompletní soubor charakterizačních metod. Při přípravě tkáňových nosičů je nutné zohlednit požadovanou funkci scaffoldu, jeho materiálové složení a správně navrhnout důslednou charakterizaci materiálu. Porézní materiály, které slouží jako tkáňové nosiče je mnohdy složité charakterizovat konvenčními postupy, proto je nutné hledat alternativy těchto metod a správně je použít pro charakterizaci vyvíjeného materiálu.

### Použitá a doporučená literatura:

Bacakova L. Filova E., Parizek M., Ruml T., Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* 2011, 29 (6): 739-67. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004

Bauer S., Schmuki P., von der Mark K., Park J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science* 2013, 58 (3): 261-26. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.001

TECHNICKÉ NORMY ČSN. ČSN EN ISO 13934-1 (800812) Textilie – Tahové vlastnosti plošných textilií – Část 1: Zjišťování maximální síly a tažnosti při maximální síle pomocí metody Strip.

Vasita R., Shanmugam K., Katti D.S. Imporved Biomaterials for Tissue Engineering Applications: Surface Modification of Polymers. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2008, 8 (4): 341-53. DOI: 10.2174/156802608783790893

Klouda P. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.

Crescenzi V., Manzini G., Calzolari G., Borri C. Thermodynamics of Psion of poly- $\beta$ -propiolactone and poly- $\epsilon$ -caprolactone. Comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. *European Polymer Journal* 1972, 8 (3): 449-63. DOI: 10.1016/0014-3057(72)90109-7

Chang H.-I., Wang Y. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering – Cells and Biomaterials*. IntechOpen 2011. DOI: 10.5772/21983

Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010, 35: 1217-56. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Klicova M., Oulehlova Z., Klapstova, Hejda M., Krejcik M., Novak O., Mullerova J., Erben J., Rosendorf J., Palek R., Liska V., Fucikova A., Chvojka J., Zvercova I., Horakova J. Biomimetic hierarchical nanofibrous surfaces inspired by superhydrophobic lotus leaf structure for preventing tissue adhesions. *Materials & Design* 2022, 217, 110661. DOI: 10.1016/j.matdes.2022.110661

## 6. Modifikace tkáňových nosičů, systémy řízeného uvolňování léčiv

Jana Horáková

*Důležité pojmy: povrchová modifikace, chemická modifikace, fyzikální modifikace, plazmatická úprava, fyzikální adsorpce, layer by layer assembly, systémy cíleného dodávání léčiv, micely, liposomy, dendrimery, nanočástice*

Tkáňové nosiče vyrobené nejrůznějšími technologiemi je možné dále modifikovat a vylepšovat tak jejich funkci pro konkrétní aplikace. Způsobů modifikace je mnoho, tato kapitola bude zaměřena především na modifikaci nanovláknenných tkáňových nosičů pomocí povrchové modifikace (surface coating) a na systémy cíleného dodávání léčiv (DDS drug delivery systems).

### 6.1. Povrchová modifikace

Interakce s buňkami je závislá na adsorpci adhezních proteinů ve správné konformaci, proto je výhodné u některých polymerních scaffoldů použít tzv. povrchovou modifikaci pro zvýšení hydrofilicity povrchu. Běžně používané materiály jako například polykaprolakton a další polymery jsou příliš hydrofobní, což neumožňuje ideální osídlení buňkami v organismu. Proto může být povrch scaffoldu upravován chemicky či fyzikálně a následně může dojít k navázání biomolekul zodpovědných za buněčnou adhezi (RGD sekvence, fibronectin, laminin).

#### 6.1.1. Chemická modifikace

Chemická funkcionalizace je stabilnější v porovnání s fyzikálními metodami modifikace. Je možné jí provádět u polymerů s funkčními skupinami, které lze modifikovat jako např. -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>. Na tyto funkční skupiny jsou kovalentní vazbou navázány biomolekuly usnadňující buněčnou adhezi. Pro zvýšení hydrofilicity se používá např. coating pomocí polydopaminu. Na vrstvu polydopaminu je možné vázat další biomolekuly jako např. heparin pro snížení srážlivosti krve u cévních náhrad.

#### 6.1.2. Fyzikální modifikace

Mezi fyzikální funkcionalizace patří plazmatická modifikace, adsorpce a „vrstvení“ (LBL layer by layer assembly), které též vedou ke zvýšení hydrofilicity povrchu. Plazma obsahuje ionty, elektrony, excitované atomy a volné radikály, které interagují se scaffoldem a mění tak jeho povrchové vlastnosti. Modifikace je závislá na používaném plynu (nejčastěji se používá O<sub>2</sub>, Ar, CO<sub>2</sub>, vzduch) a na podmínkách plazmatické modifikace (použitý tlak, doba působení plazmatu). Při použití reaktivních plynů (O<sub>2</sub>) dochází k navazování nových funkčních skupin na povrch scaffoldu, díky kterým se mění povrchová energie a smáčivost. Nevýhodou plazmatu je nehomogenita úpravy materiálu a nestálost této úpravy v čase. Díky vzniku reaktivních míst může docházet k postupné změně povrchové energie a smáčivosti povrchu v dlouhodobém horizontu. Při nesprávně zvolených podmínkách může docházet i k porušení struktury scaffoldu. Na KNT byl vyvíjen scaffold z polykaprolaktonu, který byl plazmaticky upraven

pomocí hexamethyldisiloxanu. Tato povrchová úprava byla stabilní po dobu 3 měsíců (Klíčová et al., 2022).

Fyzikální adsorpce je jednoduchý proces, kdy je tkáňový nosič ponořen do roztoku modifikující látky (nejčastěji biomolekul usnadňujících buněčnou adhezi, růstových faktorů, enzymů, antimikrobiálních látek). Díky elektrostatickým, vodíkovým, hydrofobním a van der Waalsovým silám může dojít k adsorpci biomolekul na povrch scaffoldu. Proces adsorpce nevyžaduje přítomnost organických rozpouštědel či vysokých teplot, proto si adsorbované biomolekuly zachovávají svoji konformaci. Nevýhodou může být slabá interakce mezi scaffoldem a adsorbovanou látkou, kdy může snadno dojít k vymytí při manipulaci s tkáňovým nosičem.

Layer by layer assembly („vrstevní“) je proces fyzikální adsorpce, kdy dochází k adsorpci opačně nabitých polymerů. V závislosti na okolních podmínkách roztoku (pH) dochází k tvorbě náboje na povrchu scaffoldu a následně může dojít k adsorpci opačně nabitého polyelektrolytu (proteinu, polysacharidu).

## **6.2. Systémy cíleného dodávání léčiv**

Kromě povrchové modifikace mohou být nanovláknenné materiály kombinovány s účinnými látkami (API active pharmaceutical ingredients). V následující kapitole budou uvedeny příklady látek, které lze do scaffoldů přidávat. Dále budou zmíněny způsoby, kterými lze kombinovat polymerní nanovláknenné materiály a účinné látky.

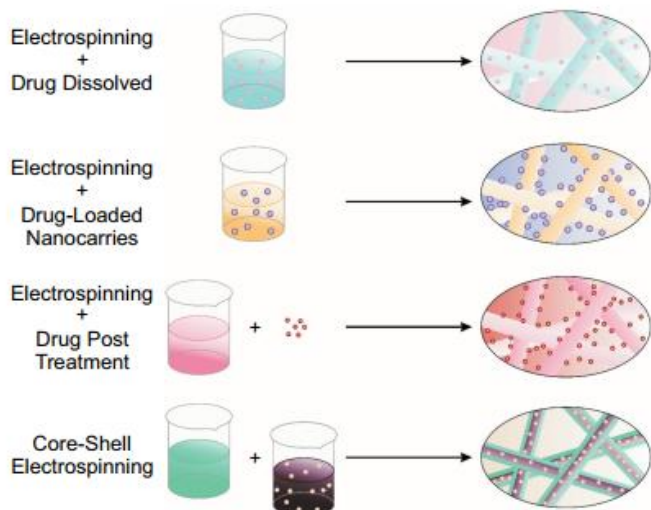
Látky přidávané do scaffoldů se odvíjí od způsobu použití a funkce scaffoldu v organismu. Výhodou nanovláknenných materiálů je velký měrný povrch, možnost inkorporace poměrně vysoké koncentrace účinných látek, jednoduchá a poměrně levná výroba materiálů. Pokud scaffold obsahuje účinné látky, dochází k uvolňování přímo v místě určení, což je velká výhoda v porovnání se systémovým podáním léků pacientovi (nitrožilně / orálně). Do nanovláknenných tkáňových nosičů lze přidávat například protizánětlivé léky s analgetickým účinkem (látky snižující bolest jako například ibuprofen). Při implantaci vždy dochází k zánětlivé odpovědi organismu, která může být přídavkem těchto látek do jisté míry zmírněna. Další častou komplikací může být bakteriální infekce, které lze předcházet inkorporací antibiotik do scaffoldu. Nanovláknenné materiály jsou také mimo jiné vyvíjeny pro cílenou léčbu rakoviny, kdy je do scaffold přidávány účinné látky působící proti přítomné nádorové tkáni. Dále je možné zlepšovat interakci scaffoldu s buňkami a urychlit regeneraci inkorporací růstových faktorů. K tomuto účelu mohou být využity lyzáty krevních destiček, které obsahují směs růstových faktorů. Aby byly růstové faktory aktivní a plnily své funkce, je nutné, aby během procesu výroby nedošlo ke změně jejich konformace. Proto je nutné používat šetrná rozpouštědla (ideálně na vodné bázi) a vyhýbat se síťovacími technikám, které mohou poničit vyšší strukturu proteinů. Další aplikace se odvíjí od konkrétního prostředí implantace scaffoldu a jeho specifických požadavků. Například pro cévní náhrady je nutné zabránit srážení krve, které by mohlo vést v konečném důsledku k ucpání cévní náhrady. Proto jsou vyvíjeny cévní náhrady s antitrombogenními látkami jako např. heparin.

Existuje mnoho způsobů inkorporace látek do nanovláknenných tkáňových nosičů, jak je znázorněno na obr. 35. Vždy je nutné zvážit rozpustnost použitého polymerního materiálu a aktivní látky a jejich mísitelnost. Dále je nutné vzít v potaz kinetiku uvolňování aktivní látky ze scaffoldu. Nejjednodušší cestou je rozpuštění aktivní látky ve zvláknovacím roztoku (tzv. blending electrospinning). Vzniklý roztok / suspenze je pak zvlákněna pomocí elektrostatického zvláknování a výsledný scaffold je složen z nanovláken obsahujících aktivní látku. Interakce mezi polymerem a aktivní látkou závisí na fyzikálně chemických vlastnostech. Například biodegradabilní polyestery jsou hydrofobní, umožňují tedy inkorporaci spíše lipofilních molekul. Vodorozpustné polymery jako např. PVA, PEG umožňují inkorporaci hydrofilních látek, je však zapotřebí jejich síťování pro zajištění stability scaffoldu ve vodném prostředí.

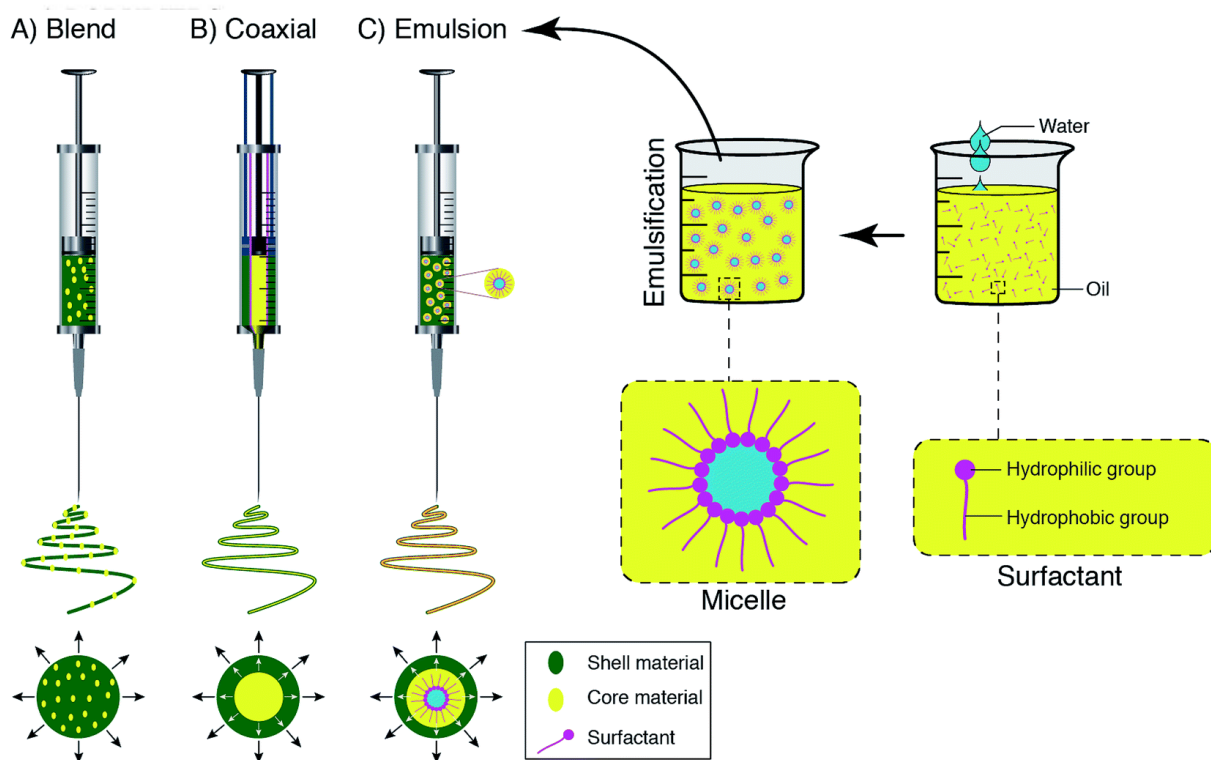
Další možností je kombinace technologií pro konečnou výrobu scaffoldu. Může být kombinován např. electrospinning a electrospraying. Electrospraying je metoda umožňující výrobu nano-/mikročásteček, které mohou obsahovat i aktivní látky. Electrospraying může být použit jako povrchová modifikace scaffoldu, kdy jsou aktivní látky enkapsulovány pouze na povrchu tkáňového nosiče. Pro větší „loading“ aktivní látky a rovnoměrné rozprostření biomolekul je možné využít kombinace technologií electrospinningu a electrosprayingu přímo při výrobě, kdy jsou současně tvořena nanovláknena a nanočástice.

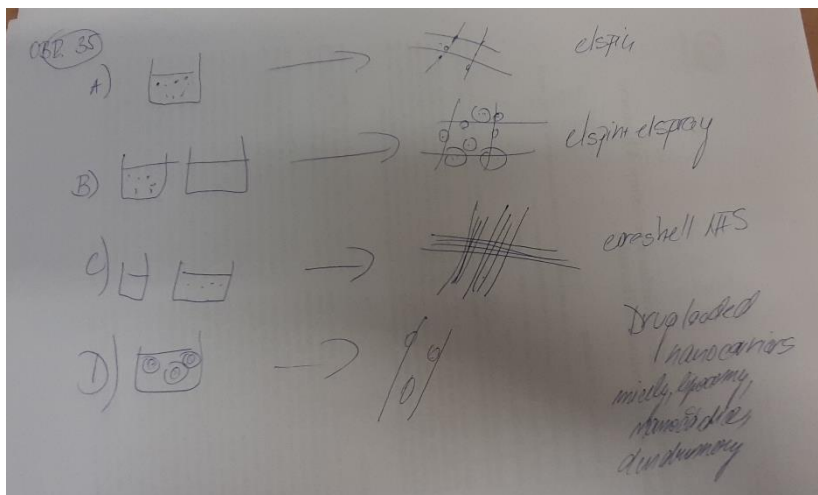
Další velmi využívanou technologií pro řízené dodávání léčiv je koaxiální zvláknování (core-shell electrospinning). Vznikající vlákna typu jádro-plášť obsahují uvnitř aktivní látky, které jsou chráněny polymerním pláštěm. Tato technologie tedy umožňuje inkorporaci látek, které by pomocí klasického elektrostatického zvláknování byly poškozeny jako např. proteiny apod. Nevýhodou koaxiálního zvláknování je zajištění opakovatelnosti výroby materiálu, což je u medicínálních aplikací velmi podstatné.

Emulzní zvláknování umožňuje kombinaci hydrofilních a hydrofobních látek pro výslednou strukturu. Emulze je tvořena dvěma nemísitelnými roztoky. Vláknotvorný polymer je obvykle rozpuštěn v organickém rozpouštědle, zatímco aktivní látka je rozpuštěna ve vodě. U všech zmíněných technologií je zapotřebí optimalizovat procesní parametry, což je u takto komplikovaných procesů poměrně složité.



**Fig. (3).** Graphic representation of several strategies for the preparation of drug-loaded nanofibers. (a) Electrospinning + drug dissolved (b) Electrospinning + drug loaded nanocarriers. (c) Electrospinning + drug post treatment. (d) Core-shell electrospinning. Scheme based on [6].





Obr. 35: Schéma možné inkorporace aktivních látek do nanovláknenných tkáňových nosičů: blending electrospraying (A), elektrospinning + electrospraying (B), core-shell elektrospinning (C).

#### Blend / coaxial / emulzní zvlákňování

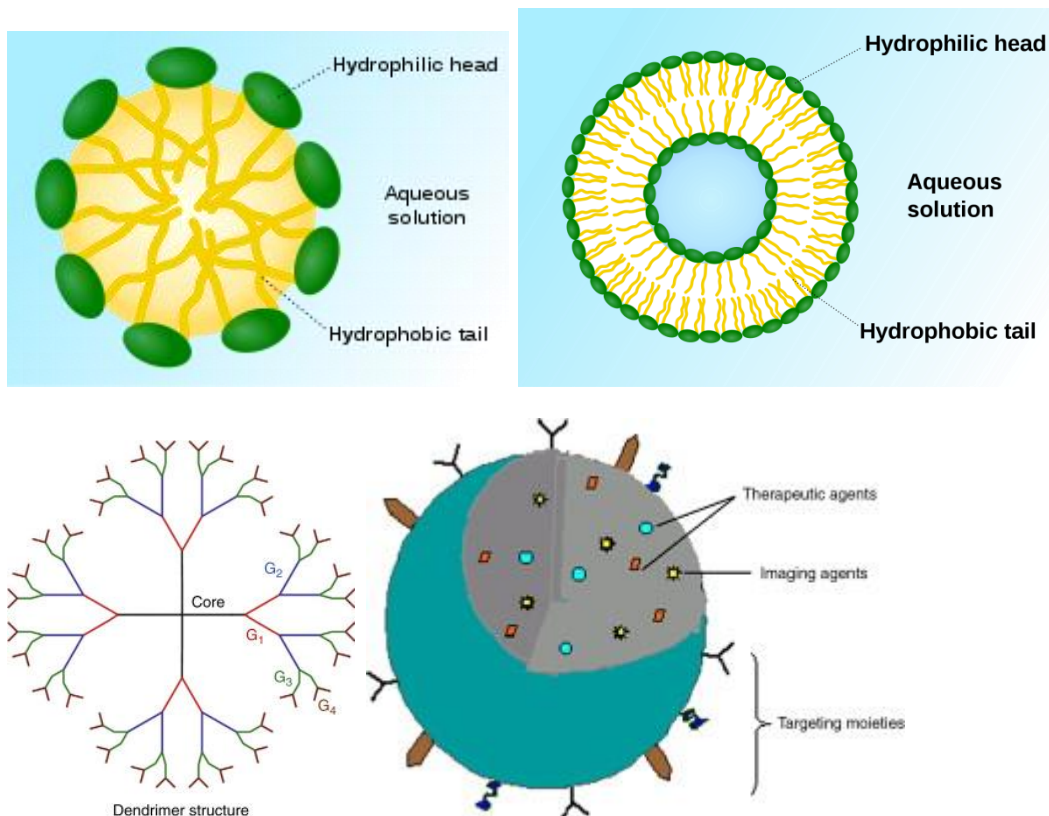
Mimo výše zmíněné metody, které využívají elektrostatické zvlákňování v jeho modifikacích je také možné využít nosiče léčiv jako jsou např. micely, liposomy, dendrimery či nanočástice (viz obr. 36). Tyto nosiče lze pro cílenou dopravu léčiv využít buď samostatně nebo také v kombinaci s nanovláknem.

Micely jsou struktury tvořené jednou vrstvou molekul specificky uspořádaných tak, že ve vodném prostředí hydrofilní konce směřují ven a hydrofobní konce dovnitř micel. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 10-100 nm. Využívají se zejména pro transport hydrofobních aktivních látek.

Liposomy jsou struktury tvořené fosfolipidovou dvouvrstvou, uvnitř které je dutina s obsahem aktivní látky. Velikost liposomů se pohybuje v rozmezí 80-300 nm. Vzhledem k obdobné stavbě liposomů a buněčné membrány dochází v organismu ke splynutí a k uvolnění aktivní látky přímo do buňky.

Dendrimery jsou uspořádané rozvětvené molekuly s přesně řízenou strukturou. Jsou tvořené jádrem, dendrony a povrchovými funkčními skupinami. Jádro může být tvořeno atomem nebo molekulou, na kterou jsou připojeny dendrony. Na povrchu se pak vyskytují funkční skupiny, které mohou v organismu reagovat s receptory buněk. Aktivní látky mohou být inkorporovány do nitra dendrimerů (do vzniklých kavit dendronů) nebo navázány na jejich povrch. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 1-10 nm.

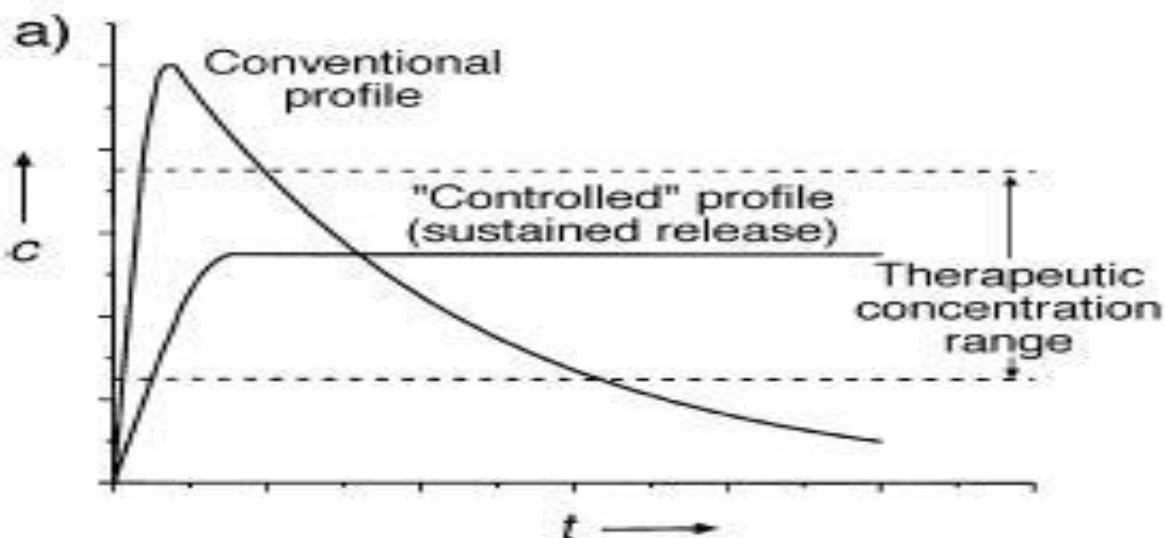
Nanočástice jsou velmi využívané pro cílené dodávání léčiv. Jejich velikost může být mezi 1 a 100 nm v závislosti na typu nanočástic (polymerní, magnetické). Aktivní látky mohou být vázány jak uvnitř, tak i na povrchu nanočástic.



Obr. 36: Systémy cíleného dodávání léčiv: micely (A), liposomy (B), dendrimery (C), nanočástice (D).

Využití konkrétní technologie se odvíjí od požadovaného uvolňování aktivní látky. Jsou aplikace, kdy je vyžadováno dlouhodobé postupné uvolňování látky v koncentračním rozmezí, které je terapeuticky výhodné (nad mezí účinnosti a pod mezí toxicity – viz obr. 37). Kinetika uvolňování aktivní látky je vždy závislá na fyzikálně chemických vlastnostech použitého polymerního materiálu a inkorporované látky, na loadingu biomolekul a prostředí, ve kterém se scaffold nachází. Každá aplikace vyžaduje jinou kinetiku uvolňování látek (maximální účinná a netoxická koncentrace, dlouhodobé uvolňování v řádu dnů / měsíců). Zpočátku může docházet k vysokému nárůstu koncentrace látky, tzv. burst release.





Obr. 37: Graf koncentrace uvolňování aktivní látky v závislosti na čase. Množství uvolnění aktivní látky by se mělo pohybovat v terapeutickém rozmezí (nad mezi účinnosti, pod mezi toxicity). Ideálně by mělo být dosaženo postupného uvolňování dané látky v co nejdelším časovém úseku.

### 6.3. Charakterizace modifikovaných tkáňových nosičů

Modifikované scaffoldy je nutné charakterizovat, což bývá zvláště u nanovláknenných materiálů obtížné. U povrchové modifikace znesnadňuje měření nerovný povrch. Pro analýzu povrchu se využívá rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS X-ray photoelectron spectroscopy). Povrch vzorku je ozářen pomocí rtg záření a měří se emitované elektrony z povrchu vzorku (tzv. fotoelektrický jev).

U materiálů obsahujících bioaktivní látku je nutné vědět, zda je přidaná látka přítomná na povrchu / ve struktuře scaffoldu, zda je navázána kovalentně či nekovalentně a jak stabilní je ve vodném prostředí. Pro ověření přítomnosti látky se využívá nejčastěji metoda FTIR. Je nutná kvantifikace loadingu aktivní látky, nelze předpokládat, že vše, co bylo zpracováno, je přítomno ve finálním scaffoldu. Pro měření obsahu aktivní látky mohou být využity metody HPLC, metody elementární analýzy (např. CHNS elementární analýza) nebo nukleární magnetická rezonance v pevné fázi (solid state NMR). Detaily jednotlivých analytických technik jsou nad rámec této publikace.

Kromě počátečního obsahu látky ve scaffoldu je nutné znát kinetiku uvolňování inkorporované aktivní látky. Je nutné v laboratorních podmínkách nasimulovat prostředí organismu – umístit scaffold do vodného prostředí (nejčastěji se využívá pufr nebo kultivační médium), umístit jej do inkubátoru při 37°C a v průběžných intervalech odebrat pufr / médium a měřit množství uvolněné látky do roztoku. Doba měření je závislá na době uvolňování látky ze scaffoldu, může se jednat o hodiny až měsíce, proto je nutné zvolit optimální doby odběru vzorků. Po skončení analýzy je vhodné charakterizovat scaffold z hlediska změny struktury, úbytku hmotnosti, změny krystalinity, mechanických vlastností atd.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Niemczyk-Soczynska B., Gradys A., Sajkiewicz P. Hydrophilic Surface Functionalization of Electrospun Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Polymers* 2020, 12 (11), 2636.

DOI: 10.3390/polym12112636

Klíčová M., Oulehlova Z., Klapstova, Hejda M., Krejčík M., Novak O., Mullerova J., Erben J., Rosendorf J., Palek R., Liska V., Fucikova A., Chvojka J., Zvercova I., Horakova J. Biomimetic hierarchical nanofibrous surfaces inspired by superhydrophobic lotus leaf structure for preventing tissue adhesions. *Materials & Design* 2022, 217, 110661. DOI:

10.1016/j.matdes.2022.110661

Zuppolini S., Cruz-Maya I., Giarino V., Borriello A. Optimization of Polydopamine Coating onto Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Electrospun Fibers for the Fabrication of Bio-Electroconductive Interfaces. *Journal of Functional Biomaterials* 2020, 11, 19. DOI: 10.3390/jfb11010019

Singh B., Kim K., Park M.H. On-Demand Drug Delivery Systems Using Nanofibers.

*Nanomaterials* 2021, 11 (12), 3411, DOI: 10.3390/nano11123411

Filova E., Blanquer A., Knitlova J., Plencner M., Jencova V., Koprivova B., Lisnenko M., Kuzelova Kostakova E., Prochazkova R., Bacakova L. The Effect of the Controlled Release of Platelet Lysate from PVA Nanomats on Keratinocytes, Endothelial Cells and Fibroblasts. *Nanomaterials* 2021, 11 (4): 995, DOI: 10.3390/nano11040995

Manuel C.B.J., Jesus V.G.L., Aracely S.M. Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. *Electrospinning – Materials, Techniques and Biomedical Applications*. IntechOpen 2016. DOI: 10.5772/62860, ISBN:978-953-51-2822-9

Wilczewska A.Z., Niemirowicz K., Markiewicz K.H., Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports* 2012, 64 (5): 1020-37. DOI: 10.1016/s1734-1140(12)70901-5

## 7. Sterilizace scaffoldů

Jana Horáková

*Důležité pojmy: sterilizace, dezinfekce, aseptická výroba scaffoldu, terminální sterilizace, fyzikální / chemická sterilizace, autokláv, gamma záření, plazmová sterilizace, ethylen oxid, peroctová kyselina, UV záření, ethanol, jód, superkritický CO<sub>2</sub>, antibiotika, lyofilizace*

Scaffoldy určené pro náhradu tkání musí být sterilní, tzn. nesmí obsahovat mikroorganismy. Proces sterilizace se provádí za účelem usmrcení všech životaschopných mikroorganismů včetně spor<sup>10</sup>, vajíček červů a virů. Jako dezinfekce se označují mírnější postupy, které vedou ke zničení patogenních mikroorganismů v daném prostředí. Nemusí však vést k usmrcení klidových stadií bakterií či inaktivaci virů. Dezinfekční postupy proto nejsou dostatečné pro implantovatelné scaffoldy. Často se však dezinfekční postupy používají před *in vitro* testováním. Způsob sterilizace / dezinfekce ovlivňuje materiálové vlastnosti tkáňových nosičů, proto by celkové testování scaffoldů (materiálové, *in vitro*, *in vivo*) mělo být prováděno se sterilními materiály.

Sterility scaffoldů lze docílit dvěma cestami. Jednou z nich je výroba materiálu za aseptických podmínek. Tento způsob se využívá např. u biotisku, kde jsou již součástí materiálu buňky. Tento přístup je velmi náročný – procesně i ekonomicky, proto se v praxi upřednostňuje spíše proces tzv. terminální sterilizace. Scaffold je vyroben v čistých prostorech za normálních podmínek bez nároků na sterilitu prostředí a následně je podroben sterilizaci. Pro každý materiál je nutné najít vhodnou metodu sterilizace, ověřit její vliv na materiálové vlastnosti a účinnost sterilizace.

Sterilizační postupy jsou zakotveny v legislativě. Každá sterilizační metoda vyžaduje jiný typ balení materiálu, probíhá za různých podmínek. Je nutné řídit se danou legislativou, zároveň je však třeba mít na zřeteli možnost odlišného chování nově vyvíjených materiálů. Obzvláště u porézních biodegradabilních polymerů mohou nastat problémy se správnou metodou sterilizace. Adekvátně zvolená metoda sterilizace je tedy velmi klíčovou součástí vývoje scaffoldu pro danou aplikaci.

Metody sterilizace se dělí na fyzikální a chemické. Mezi fyzikální metody patří působení tepla, radiační a plazmová sterilizace. Chemické sterilizační postupy jsou založeny na působení plynů (ethylen oxid) nebo kapalin (peroctová kyselina). V následujících odstavcích budou stručně popsány jednotlivé sterilizační postupy. Vliv sterilizace bude demonstrován na elektrostaticky zvlákněném polykaprolaktonu. Vzhledem k rozšířenosti dezinfekčních postupů budou stručně nastíněny i metody dezinfekce pomocí UV záření (fyzikální dezinfekce), ethanolu a jódu (chemické dezinfekce). V závěru kapitoly budou nastíněny některé nové směry sterilizačních technik, které doposud nejsou plošně využívány.

---

<sup>10</sup> spora – klidové stadium bakterií, ve kterých mohou přežívat v nepříznivých podmínkách po velmi dlouhou dobu (stovky let). Při změně okolních podmínek se bakterie opět mohou vrátit do vegetativního stadia a začít se rychle množit. Spory jsou tvořeny několika vrstvami, které jim zajišťují vysokou odolnost. Dezinfekční techniky nedokáží spory odstranit.

## 7.1. Sterilizační metody

### 7.1.1. Tepelná sterilizace

Metody založené na tepelné sterilizaci jsou metodou první volby, často však nemohou být použity kvůli termosenzitivitě mnohých materiálů. Pro tepelnou sterilizaci se využívá zařízení autokláv, ve kterém probíhá proces sterilizace působením vodní páry za zvýšené teploty (obvykle 121°C) a tlaku (101,3 kPa) po dobu 23 minut. Autoklávování je rutinní laboratorní úkon prováděný za účelem sterilizace především skla a roztoků používaných v biologických laboratořích. Autokláv je obvykle součástí každé laboratoře, tudíž se jedná o nejlépe dostupnou sterilizační techniku. Sterilita je dosaženo pouze fyzikální cestou, nedochází tedy k žádným chemickým reakcím. Při zvýšené teplotě však může docházet k tání materiálu nebo jeho hydrolytické degradaci díky přítomnosti páry. U porézních materiálů je často nutné upravit podmínky sterilizačního procesu (teplotu, tlak, dobu působení). Pro biodegradabilní polykaprolaton nelze tuto sterilizační metodu použít díky jeho nízké teplotě tání (59-64°C). Po autoklávování se z nanovláknenného materiálu stala hladká folie.

### 7.1.2. Radiační sterilizace

Pro sterilizaci jsou nejčastěji využívány 2 typy ionizujícího záření – gamma záření a elektronový paprsek. Gamma záření je elektromagnetické záření, které je nejčastěji generováno rozpadem kobaltu 60 (<sup>60</sup>Co). Obvyklá sterilizační dávka 25 kGy je dána normou (ČSN EN ISO 11137: Sterilizace výrobků pro zdravotní péči – Sterilizace zářením), může se však lišit podle typu materiálu (obvykle v rozmezí 10-40 kGy). Elektronový paprsek je urychlený proud elektronů, který má nižší penetrační schopnost než gamma záření, používané sterilizační dávky jsou vyšší (10-60 kGy). Výhodou těchto sterilizačních technik je nízká teplota (30-40°C), rychlost sterilizace, efektivita, nepřítomnost toxických reziduí. Metoda působení ionizujícího záření na mikroorganismy spočívá v narušení nukleových kyselin následkem přenosu energie a vzniku reaktivních produktů kyslíku<sup>11</sup> (ROS=reactive oxygen species), které narušují buněčné komponenty.

Nevýhodou radiační sterilizace může být změna struktury a vlastností materiálu. Může docházet ke zvýšení hydrofilicity povrchu materiálu, ke změně molekulové hmotnosti – jejímu snížení díky štěpení polymerního řetězce nebo naopak k jejímu zvýšení díky zniku crosslinků mezi řetězci, případně mohou nastat oba děje najednou, ke změně mechanických vlastností a rychlosti degradace. Není možné zajistit vždy stejnou dávku ionizujícího záření, která může ovlivňovat dopad na materiálové vlastnosti. Při požadavku na sterilizaci se volí nejnižší požadovaná dávka (např. 25 kGy), skutečná dávka však bývá o něco vyšší, aby byla zajištěna především sterilita materiálu. Po sterilizaci elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu nedošlo ke změně morfologie materiálu, byla pozorována vyšší proliferace fibroblastů

---

<sup>11</sup> Reaktivní formy kyslíku (ROS) – jsou chemicky reaktivní látky obsahující kyslík jako např. peroxidy, superoxid, hydroxylové radikály. Vznikají v těle v určité míře přirozeně, jsou důležitou součástí buněčné signalizace a biochemických dějů. Za určitých podmínek však může docházet k vyšší tvorbě těchto ROS, což může vést k narušení buněk. Tento stav se označuje jako oxidační stres.

zapříčiněná pravděpodobně zvýšenou hydrofilicitou povrchu. V České republice zajišťuje radiační sterilizaci např. firma BIOSTER a.s.

### **7.1.3. Plazmová sterilizace**

Sterilizace plazmou probíhá v plynné atmosféře. Mohou být využity inertní plyny jako např. argon, případně pro vyšší účinnost sterilizace je používán peroxid vodíku, ze kterého jsou generovány vysoce reaktivní radikály. Výhodou plazmové sterilizace je nízká teplota (do 50°C), rychlost. Díky vzniku volných radikálů dochází ke změně materiálových vlastností – bylo pozorováno zvýšení hydrofilicity povrchu. Materiálové vlastnosti se následně mohou měnit v čase, je proto nutné sledovat stabilitu těchto změn. V materiálu mohou zůstat toxická rezidua, která mohou ovlivňovat buněčné interakce. Po plazmové sterilizaci nanovlákněného polykaprolaktonu byla pozorována na některých místech změna morfologie materiálu – z vláken se stala hladká folie. Přestože se jedná o nízkoteplotní sterilizaci, pravděpodobně došlo místně k překročení teploty tání polykaprolaktonu, tudíž se tato sterilizační metoda nejeví jako vhodná pro tento typ materiálu. Plazmové sterilizátory bývají dostupné ve větších nemocnicích, např. v Krajské nemocnici Liberec nebo v Ústřední vojenské nemocnici v Praze.

### **7.1.4. Sterilizace ethylen oxidem**

Ethylen oxid (EtOx) je toxický, karcinogenní plyn. Sterilizací pomocí ethylen oxidu se věnuje norma ČSN EN ISO 10993-7 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 7: Rezidua při sterilizaci ethylenoxidem. Jedná se o chemickou sterilizaci působením ethylen oxidu, který působí nevratnou alkylací biomolekul (nukleových kyselin, proteinů), což následně vede k zástavě buněčného metabolismu a dělení buněk. Efektivita sterilizace závisí na použitých podmínkách jako např. koncentrace ethylen oxidu, teplota (obvykle mezi 30-60°C), vlhkost (40-80%) a doba působení (3-6 hodin). Obecně se jedná o velmi účinnou nízkoteplotní sterilizační metodu.

Mezi nevýhody sterilizace pomocí ethylen oxidu patří především přítomnost toxických reziduí. Po provedení sterilizace je nutné materiál odvětrávat po dobu cca 2 týdnů. Doba odvětrání se liší pro každý typ materiálu, je nutné sledovat rezidua ethylen oxidu na materiálu v čase – viz výše zmíněná norma ČSN EN ISO 10993-7. Z důvodu nebezpečnosti ethylen oxidu (hořlavý, výbušný, toxický, karcinogenní plyn) je důležité dodržování bezpečnosti práce personálu obsluhujícího toto sterilizační zařízení. Sterilizace ethylen oxidem také vede ke změně materiálových vlastností. Po sterilizaci elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu nebyla pozorována změna morfologie vláken, docházelo k pomalejší proliferaci fibroblastů na scaffoldech sterilizovaných pomocí nízkoteplotního ethylen oxidu v porovnání s ostatními testovanými sterilizačními metodami. Buněčná adheze a proliferace však probíhala, materiál tedy nejevil cytotoxické vlastnosti. Sterilizátory založené na působení ethylen oxidu jsou dostupné ve větších nemocnicích, např. v Ústřední vojenské nemocnici v Praze, kde je k dispozici nízkoteplotní sterilizace při 37°C nebo vysokoteplotní sterilizace při 55°C. Dále je možné zakoupit laboratorní sterilizátory Anprolene (firma Andersen Products Inc.), které umožňují sterilizaci materiálů při pokojové teplotě. Tento laboratorní ethylen oxidový sterilizátor je dostupný i na KNT FT TUL.

### 7.1.5. Sterilizace peroctovou kyselinou

Kyselina peroctová (peroxyoctová, PAA) je čirá bezbarvá kapalina s ostrým octovým zápachem. Má silné oxidační vlastnosti, které způsobují enzymatickou inaktivaci mikroorganismů. Pro sterilizaci se používá obvykle v koncentracích 0,05-1%. Tato chemická sterilizace je velmi efektivní, probíhá za pokojové teploty. Může však působit změnu materiálových vlastností a zanechávat kyselá rezidua. Na trhu je k dostání např. přípravek Persteril, který obsahuje kyselinu peroctovou jako aktivní složku. Nachází široké využití pro dezinfekci povrchů a nástrojů v nejrůznějších odvětvích. Po sterilizaci nanovlákněného polykaprolaktonu smočením v ředěné peroctové kyselině (0,5% PAA ve 20% ethanolu) nedošlo ke změně materiálových vlastností, byla pozorována adheze i proliferace fibroblastů. Možná přítomnost kyselých reziduí byla odstraněna dvojnásobným oplachem před *in vitro* testováním.

## 7.2. Dezinfekční metody

Přestože tkáňové nosiče musí projít procesem sterilizace, nikoliv jen dezinfekčním postupem, bývají dezinfekční techniky používány např. před *in vitro* testováním. Tento postup není zcela správný, jelikož sterilizací může docházet ke změně materiálových vlastností, které se mohou projevit i v interakci buněk s materiálem. Nicméně v literatuře se často objevují i tyto postupy, proto budou v této kapitole zmíněny i dezinfekční techniky, mezi které patří UV záření, působení ethanolu a jódu.

### 7.2.1. UV záření

Ultrafialové záření je elektromagnetické záření s vlnovou délkou kratší než viditelné světlo a delší než rentgenové záření (cca 10-400 nm). Pro usmrcení mikroorganismů se nejčastěji používá UV záření o vlnové délce v rozmezí 200-280 nm, přičemž nejúčinnější je popisována vlnová délka 260 nm. Pro zajištění účinnosti této dezinfekční metody je také důležitá doba působení UV záření. UV záření poškozuje DNA mikroorganismů díky excitaci elektronů a akumulaci fotoproduktů. Tento způsob dezinfekce je účinný na povrchy předmětů, může být použit u průhledných scaffoldů. U objemných 3D seriálů nedochází k plné penetraci do struktury materiálů a není dosaženo kompletního odstranění mikroorganismů. Další nevýhodou UV záření je různá citlivost mikroorganismů na UV záření. Spory, priony<sup>12</sup> a některé viry jsou na UV záření rezistentní. UV záření může také ovlivňovat materiálové vlastnosti scaffoldů. V biologických laboratořích se UV záření běžně využívá pro dezinfekci povrchů v laminárních boxech, jedná se tedy o dostupnou techniku.

### 7.2.2. Ethanolová dezinfekce

Použití ethanolu je velmi rozšířené v biologických laboratořích pro dezinfekci povrchů. Využívá se proto velmi často jako presterilizace scaffoldů před nasazením buněk. Ethanol se používá nejčastěji o koncentracích 60-80 %. Jedná se o velmi levnou, nízkoteplotní, rychlou a nenáročnou dezinfekční techniku. Ethanol působí denaturaci proteinů, dehydrataci buněk,

---

<sup>12</sup> priony – infekční prionové bílkoviny, které mohou být původci neurodegenerativních chorob lidí a zvířat jako např. Creutzfeld-Jacobova nemoc, bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, nemoc šilných krav).

rozrušení lipidů cytoplazmatické membrány, což vede k usmrcení mikroorganismů. Dezinfekce etanolem však není zcela efektivní na celé spektrum mikroorganismů, nepůsobí na spory bakterií a některé typy virů. Použití ethanolu také může ovlivňovat materiálové vlastnosti. Po působení ethanolu je doporučován oplach vodou / pufrem pro důkladné odstranění zbytků ethanolu.

### **7.2.3. Dezinfekce jódem**

Jód se často používá pro dezinfekci kůže, sliznic a ran. Na trhu je mnoho přípravků na bázi jódu, např. Betadine. Pro dezinfekci scaffoldů se příliš nevyužívá, vliv této metody na vlastnosti scaffoldů tedy nejsou prozatím zcela prozkoumány. Jód je velmi účinný na široké spektrum mikroorganismů, přesný mechanismus působení není známý. Předpokládá se, že k poškození mikroorganismů dochází vlivem oxidace, ionizace a poškození membrán. Důležitými parametry dezinfekce jsou koncentrace volného jódu v roztoku (obvykle 0,1 %), rozpouštědlo (velmi účinný je polyvinylpyrrolidon), pH.

#### **Použitá a doporučená literatura:**

Rogers W.J. Sterilization of polymer healthcare products. Rapra Technology, 2005. ISBN: 1-85957-490-4.

Rediguieri C.F., Sassonia R.C., Dua K., Kikuchi S., Pinto T.J.A. Impact of sterilization techniques on electrospun scaffolds for tissue engineering. European Polymer Journal 2016, 82: 181-95. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016

Dai Z., Ronholm J., Tian Y., Sethi B., Cao X. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. Journal of Tissue Engineering 2016, 7: 1-13. DOI: 10.1177/2041731416648810

Horakova J., Klicova M., Erben J., Klapstova A., Novotny V., Behalek L., Chvojka J. Impact of various sterilization and disinfection techniques on electrospun poly- $\epsilon$ -caprolactone. ACS Omega 2020, 5(15): 8885-92. DOI: 10.1021/acsomega.0c00503