

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Biokompatibilní materiály ovlivňující proliferaci buněk

Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Effects of biocompatible materials on cell proliferation

Bachelor thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kamila Becková**
Osobní číslo: **C18200**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Biokompatibilní materiály ovlivňující proliferaci buněk**
Téma práce anglicky: **Effects of Biocompatible Materials on Cell Proliferation**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis možností ovlivnění reprodukce buněk pomocí kultivací na biokompatibilních materiálech v podmínkách in vitro či in situ. V práci nejprve uveďte přehled materiálů používaných ve tkáňovém inženýrství a porovnejte jejich výhody/nevýhody při buněčných kultivacích. Následně podrobně diskutujte téma cíleného ovlivnění proliferační kapacity buněk kultivovaných na vybraných materiálech s uvedením typů buněčných linií.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jana Báčová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Biokompatibilní materiály ovlivňující proliferaci buněk jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2022

Kamila Becková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a rozšíření mých znalostí. Poděkování patří také Mgr. Janě Báčové za konzultace a poskytnutí užitečných rad. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a mým spolužačkám za podporu během psaní této práce.

ANOTACE

Práce se zabývá tkáňovými nosiči a jejich úlohou v proliferaci buněk. Stručně se věnuje materiálům a vlastnostem skafoldů, které ovlivňují nejen proliferaci, ale také výběr vhodného skafoldu. Přesněji se zaměřuje na povrchovou úpravu materiálů a složení kultivačního média.

KLÍČOVÁ SLOVA

skafold, proliferace, tkáňové inženýrství, úprava povrchu, kultivace, biomateriál

TITLE

Effects of biocompatible materials on cell proliferation

ANNOTATION

The work deals with scaffolds and their role in cell proliferation. It briefly describes the materials and properties of scaffolds, which affect not only proliferation, but also the selection of a suitable scaffold. More precisely, it focuses on the surface treatment of materials and the composition of the culture medium.

KEYWORDS

scaffold, proliferation, tissue engineering, surface treatment, cultivation, biomaterial

OBSAH

ÚVOD.....	12
1. TKÁŇOVÉ NOSIČE.....	13
1.1 <u>Buňky pro tkáňové inženýrství</u>	14
1.2 <u>Materiály skafoldů</u>	15
1.2.1 Přírodní materiály	15
1.2.2 Syntetické materiály	16
1.3 <u>Vlastnosti skafoldů</u>	17
1.3.1 Biokompatibilita	17
1.3.2 Biodegradace	18
1.3.3 Geometrie	18
1.3.4 Povrchové vlastnosti.....	19
1.3.5 Pórovitá struktura	19
2. ÚPRAVA POVRCHU MATERIÁLU	21
2.1 <u>Smáčivost</u>	21
2.1.1 Ozařování plazmou.....	22
2.1.2 Ozařování UV zářením.....	25
2.1.3 Ozařování ionty	30
2.2 <u>Povrchová drsnost</u>	31
2.2.1 Leptání kyselinami	32
2.2.2 3D tisk	34
2.2.3 Otryskávání.....	36
2.3 <u>Navázání molekul na povrch skafoldu</u>	37
2.3.1 Bioaktivní molekuly	38
2.3.1.1 <i>Peptidové sekvence</i>	38
2.3.1.2 <i>Kolagen</i>	38
2.3.1.3 <i>Fibronektin</i>	39

3. SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA	40
3.1 <u>Růstové faktory</u>	41
3.1.1 Růstový faktor odvozený od destiček.....	41
3.1.2 Epidermální růstový faktor.....	43
3.2 <u>Hormony</u>	43
3.2.1 Folikulostimulační hormon	44
3.2.2 Růstový hormon	45
ZÁVĚR	47
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Proces tkáňového inženýrství	14
Obr. 2: Kolagenový skafold.....	16
Obr. 3: Rozdělení povrchů dle smáčivosti.....	22
Obr. 4: Kontaktní úhly povrchu polykaprolaktonové (PCL) membrány.....	24
Obr. 5: Výsledky kalorimetrického testu	25
Obr. 6: Výsledky experimentu s polytetrafluorethylenem (PTFE).....	27
Obr. 7: Snímky hydroxyapatitu (HA) ze skenovacího elektronového mikroskopu	29
Obr. 8: Průměrné hodnoty kontaktního úhlu na neošetřených a na H ₃ PO ₄ modifikovaných povřích hydroxyapatitu ozářených UV zářením a ozonem (UV/O ₃)	29
Obr. 9: : Snímky morfologie povrchu titanových disků leptaných kyselinou sírovou při 120, 130, 140 a 150 °C ze skenovacího elektronového mikroskopu	33
Obr. 10: Morfologie povrchu otrýskaného různými tvary abraziva	37
Obr. 11: Závislost počtu buněk na koncentraci PDGF-BB	42
Obr. 12: Vliv růstového hormonu na proliferaci a apoptózu buněk	46

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Podmínky provedení experimentu v plazmovém reaktoru MARCH PX-500.....	23
Tab. 2: Podmínky experimentu s polytetrafluorethylenem	26
Tab. 3: Výsledné hodnoty kontaktního úhlu polytetrafluorethylenu	28
Tab. 4: Výběr vhodného média dle typu buněk.....	40

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ECM	Extracelulární matrix
EGF	Epidermální růstový faktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EUV	Extrémní ultrafialové záření
FBS	Fetální hovězí sérum (<i>fetal bovine serum</i>)
FDM	Modelování fúzních depozic (<i>fused deposition modeling</i>)
FEP	Fluorovaný ethylen-propylen
FN	Fibronektin
FSH	Folikulostimulační hormon (<i>follicle-stimulating hormone</i>)
GF	Růstový faktor (<i>growth factor</i>)
HA	Hydroxyapatit
HF	Kyselina fluorovodíková (<i>hydrogen fluoride</i>)
PCL	Polykaprolakton (<i>polycaprolactone</i>)
PDGF	Růstový faktor odvozený od destiček (<i>platelet derived growth factor</i>)
PETg	Polyethylentereftalátglykol
PGA	Kyselina polyglykolová (<i>polyglycolic acid</i>)
PLA	Kyselina polymléčná (<i>polylactic acid</i>)
PLGA	Kopolymer kyseliny glykolové a mléčné (<i>polylactic-co-glycolic acid</i>)
PTFE	Polytetrafluorethylen
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
SF	Hedvábný fibroin (<i>silk fibroin</i>)
SPM	Médium pro přípravu spermatu (<i>sperm preparation medium</i>)
TE	Tkáňové inženýrství (<i>tissue engineering</i>)
UV	Ultrafialové záření
WPU	Vodou ředitelný polyuretan (<i>waterborne polyurethane</i>)

ÚVOD

Buněčná proliferace neboli buněčné bujení je jeden z hlavních předpokladů tkáňového inženýrství a úspěšně vytvořeného skafoldu. Ten představuje základní kostru pro izolované buňky, kterým následně poskytuje vhodný povrch a strukturu k růstu, jejich dalšímu vývoji a k uložení své extracelulární matrix, což má za následek vytvoření náhradní tkáně.

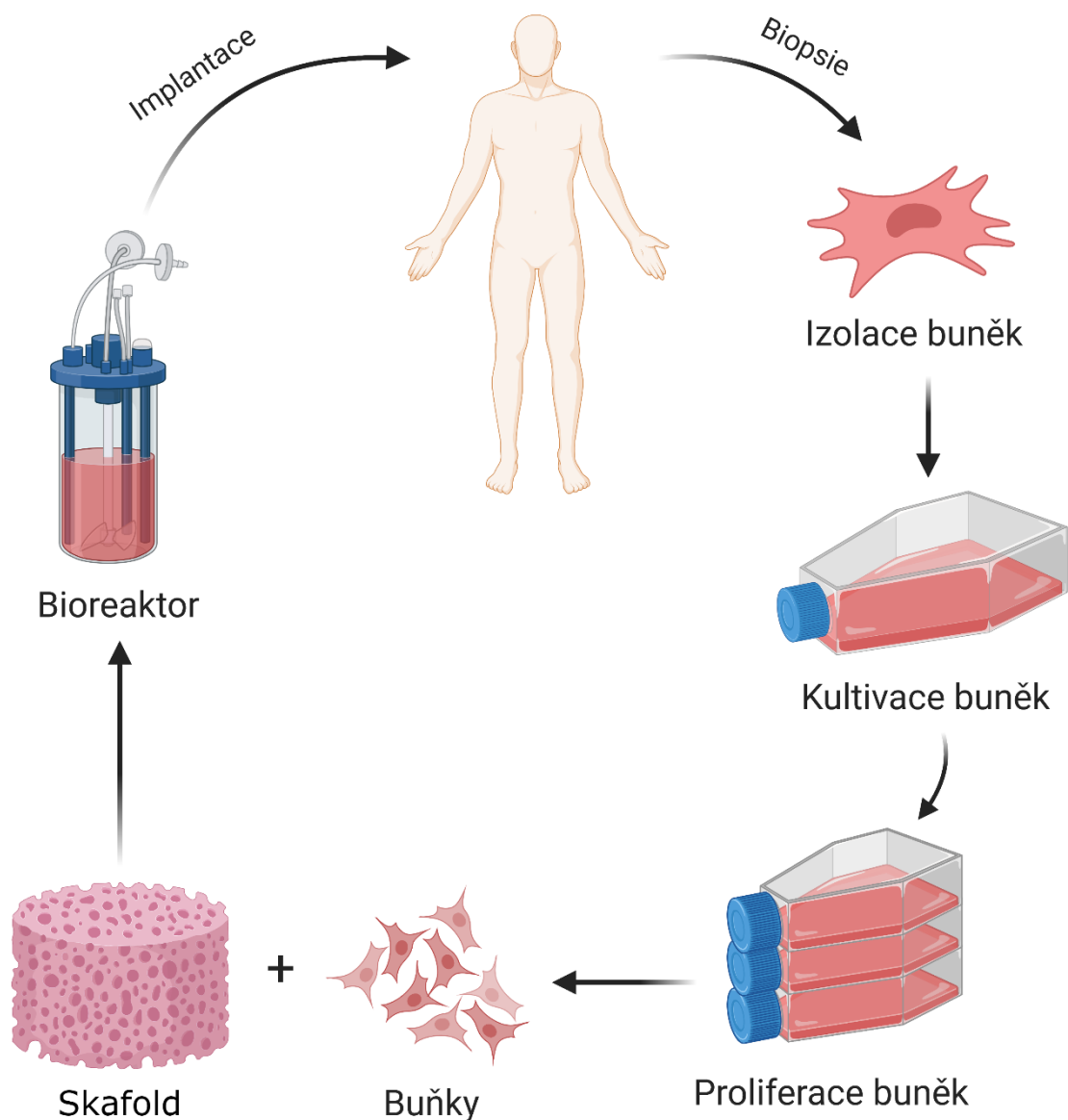
Úvodní část práce zahrnuje představení buněk, vhodných pro tkáňové inženýrství a přírodní nebo syntetické materiály skafoldů, na kterých jsou následně buňky kultivovány. Poté jsou představeny důležité vlastnosti skafoldů, jako je biokompatibilita, biodegradace, vhodná geometrie, pórovitá struktura a příznivé povrchové vlastnosti, které mohou ovlivnit proliferaci buněk. Dále se práce zabývá úpravou povrchu materiálu, která zahrnuje úpravu smáčivosti a povrchové drsnosti. V poslední části této kapitoly se práce věnuje bioaktivním molekulám, které se vážou na povrch skafoldu, a tím zlepšují proliferaci buněk. Závěrečná část popisuje vliv složení kultivačního média, přesněji vybraných růstových faktorů a hormonů na proliferaci buněk.

Cílem této bakalářské práce je představení možností ovlivnění reprodukce buněk, pomocí kultivace na skafoldech *in vitro* či *in situ* v různých podmínkách či na různých površích. Jsou zde zahrnuty i příklady experimentů jako ukázka toho, že daná metoda funguje a má vliv na buněčnou proliferaci.

1. TKÁŇOVÉ NOSIČE

Tkáňové nosiče neboli tzv. skafoldy jsou 3D pórovité struktury z různých materiálů, které jsou mezi sebou vzájemně propojené a podporují růst a vývoj buněk. Slouží k osazení cílenými buňkami *in vitro*, – nebo podporují migraci nových buněk *in vivo*. Jsou vytvořené ke splnění následujících kritérií, musí: a) podporovat vzájemné působení buněk mezi sebou, poskytnout vhodný povrch pro adhezi, rozptřeni buněk na daném materiálu a musí umožnit uloženi vlastní extracelulární matrix (ECM), b) svou porézností podporovat eliminaci odpadních látek, difuzi živin, plynů – zejména kyslíku a regulačních faktorů, které umožní přežití, proliferaci a diferenciaci buněk, c) regulovatelnou rychlostí biologicky se rozkládat, a to tak, aby se tato rychlost blížila rychlosti, kterou se regenerují (formují) tkáň za sledovaných podmínek, a d) vyvolat minimální stupeň zánětlivé reakce nebo toxické reakce *in vivo*. Nejlépe dosáhneme optimálních vlastností, tj. pevnost, rychlost degradace, pórovitost, tvar a velikost u polymerních skafoldů (Dhandayuthapani et al., 2011). Tkáňové nosiče mohou být na bázi přírodních nebo syntetických polymerů. Kvůli nižší ceně a snadné funkčnosti se ve tkáňovém inženýrství (TE) více využívají právě skafoldy syntetické než přírodní (Janoušková, 2018).

Tyto struktury hrají nejdůležitější roli ve TE, kde slouží k regeneraci a opravě tkání. Využívají se také při výzkumu biomateriálů, kdy se na těchto strukturách zkoumá chování buněk za daných podmínek. Jako běžné se jeví použití skafoldů při tzv. „drug delivery“ (Loh a Choong, 2013). TE zahrnuje několik kroků (Obr. 1). Prvním krokem je výběr vhodných buněk, jejich izolace a následná kultivace, kdy dochází k diferenciaci na specifické fenotypy. Dalším důležitým krokem je konstrukce, výběr vhodného materiálu a vlastností skafoldu. Takto připravený skafold se osadí vybranými buňkami a kultivuje se v bioreaktorech, tj. zařízeních, ve kterých dochází k růstu buněk za kontrolovaných podmínek. Při kultivaci se využívají média obsahující růstové faktory (GF), které stimulují růst a dělení buněk. Buňky se šíří po skafoldu a vytváří tak náhradní tkáň. Poslední krok zahrnuje implantaci buňkami osazeného skafoldu do těla pacienta, kde se následně absorbuje nebo rozpustí. TE zahrnuje také testování účinnosti různých postupů, skafoldů, buněk a kultivačních podmínek na pokusných zvířatech (Gomes a Reis, 2004).



Obr. 1: Proces tkáňového inženýrství.

1.1 Buňky pro tkáňové inženýrství

Dle zdroje, odkud buňky pochází je dělíme na autologní, alogenní a xenogenní. Autologní pochází od stejného jedince, do kterého jsou poté opětovně implantovány. Mají tu výhodu, že u nich hrozí nejmenší riziko imunologické reakce nebo odmítnutí tělem pacienta. Jedinou jejich nevýhodou je to, že vyžadují dlouhou dobu k expanzi na potřebné množství. Buňky, které jsou geneticky odlišné, ale stejného druhu jako pacient, se nazývají alogenní. Buňky, které jsou použity z jiného živočišného druhu, nežli je člověk se nazývají xenogenní. Alogenní a xenogenní buňky jsou rychle dostupné, ale mají výrazně vyšší riziko imunologické reakce než buňky autologní (Iordache et al., 2019).

1.2 Materiály skafoldů

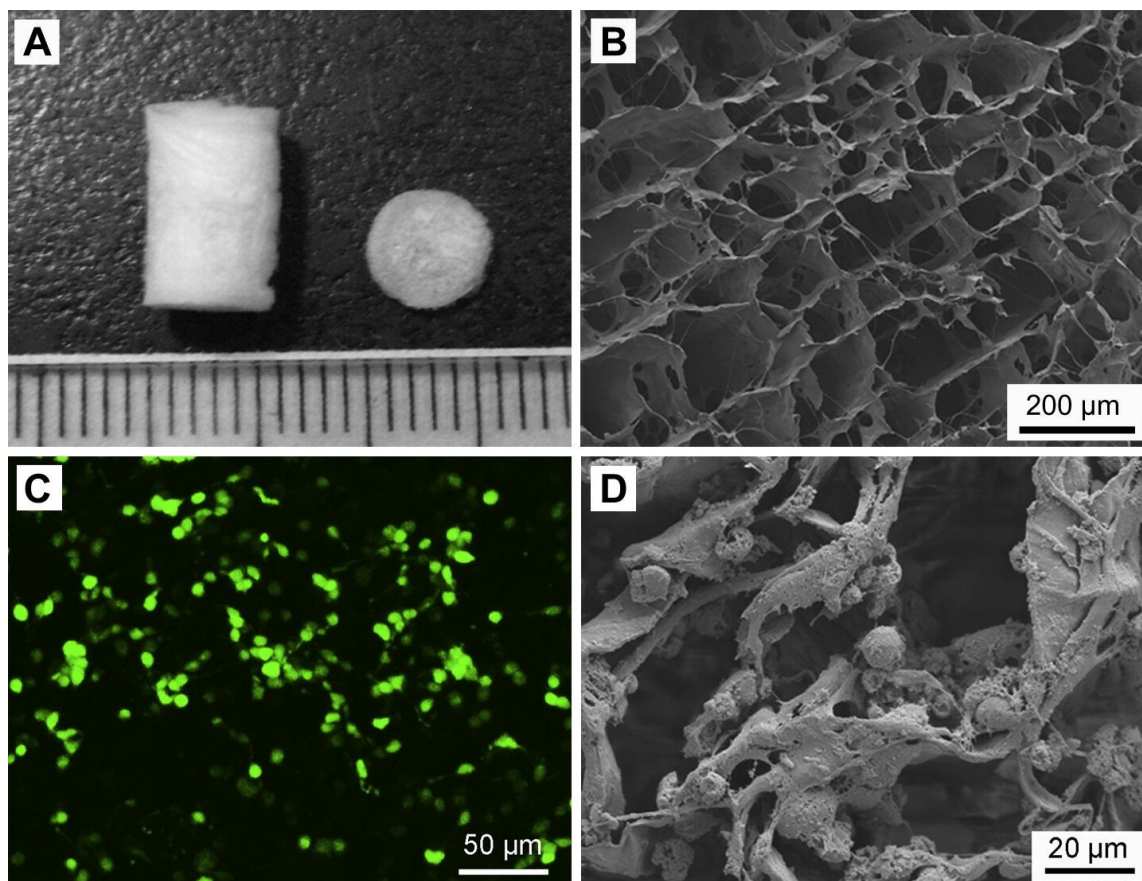
Volba správného materiálu je důležitá, jelikož může ovlivnit regeneraci tkáně *in situ*. Jejich vlastnosti regulují chování buněk a umožňují tvorbu tkání nových (Shpichka et al., 2019). Můžeme je rozdělit do dvou velkých skupin, a to na přírodní a syntetické.

1.2.1 Přírodní materiály

Do této skupiny řadíme kolagen, chitosan, algináty a glykosaminoglykany (GAG) nazývané také mukopolysacharidy, kdy z nich má nejvýznamnější využití kyselina hyaluronová. Jejich největší výhodou je nízká toxicita a malá, nebo žádná, imunitní odpověď. Degradují na netoxické produkty, které jsou následně přirozenou cestou vyloučeny z těla. Mezi jejich hlavní nevýhody řadíme nedostatečnou mechanickou pevnost a složitou konstrukci, která způsobuje obtížnější manipulaci s takovými materiály. Přírodní materiály snadno denaturují a často vyžadují chemickou úpravu, což může následně vést k jejich toxicitě.

Běžně používaným přírodním materiálem, který je obsažen ve většině výrobcích dostupných na světovém trhu je kolagen (Obr. 2), který je hlavním proteinem ECM a je součástí pojivových tkání, kde poskytuje mechanickou podporu. Skafoldy vyrobené z kolagenu mají široké uplatnění, a to především v otorinolaryngologii, kde slouží k výrobě stehů, hemostatických látek (jako jsou prášky a houby), krevních cév, šlach a vazů. Používají se také při regeneraci periferních nervů a při regeneraci kůže, kde se využívají k léčbě popálenin. Můžeme je kombinovat s dalšími přírodními nebo syntetickými materiály (Vats et al., 2003). Kolagen je vhodný materiál díky své nízké antigenicitě, nízké zánětlivé a cytotoxické reakci, vysoké afinitě k vodě a dobré kompatibilitě buněk. Výhodou je také jeho izolace z několika různých zdrojů a dobrá biodegradace (Sell et al., 2010).

Zajímavým přírodním materiálem je hedvábný fibroin (SF), který se získává z kokonů bource morušového (*Bombyx mori*) a má vlastnosti, které mohou řešit potřeby pro *in situ* opravu močového měchýře. Přestože budou nutné další studie zaměřené na dlouhodobé hodnocení urologických onemocnění, už nyní analýzy *in vivo* ukázaly, že matrice SF vykazuje řadu výhod oproti syntetickým biomateriálům (Sack, 2017).



Obr. 2: Kolagenový skafold. (A) Struktura kolagenového skafoldu o průměru 4 mm, (B) snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu ukazující morfologii porézního kolagenového skafoldu, (C) konfokální obraz barvený pomocí fluorescein diacetátu a (D) snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu zachycující neurální progenitorové buňky kultivované na kolagenovém skafoldu po dobu 7 dnů (převzato a přeloženo z Li et al., 2013).

1.2.2 Syntetické materiály

Druhou velkou skupinou jsou syntetické materiály, které zahrnují polymery, biokeramiku, skla a bioaktivní skla (Vats et al., 2003). Oproti přírodním materiálům mají výhodu, že mohou být přesně vyrobeny, a to s velkou rozličností jejich fyzikálních a chemických vlastností. Ve skupině polymerů se nejvíce využívá polypropylenu, polyesterů jako kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymléčná (PLA), kopolymer kyseliny glykolové a mléčné (PLGA), polykaprolakton (PCL) a různé polyuretany. Široké využití má polypropylen, a to díky jeho mechanické pevnosti a relativně nízké ceně. *In vivo* je netoxický a nerozložitelný, čímž neuvolňuje žádné produkty rozkladu, které by mohly vyvolat zánětlivou reakci. PLGA patří mezi nejpoužívanější syntetický materiál v inženýrství kosterní svaloviny. Díky jeho netoxickým produktům rozkladu je oblíbeným zdrojem implantabilního materiálu, který se používá v zařízeních jako jsou šicí materiály nebo skafoldy pro tkáňové inženýrství. Bylo zjištěno, že biologicky rozložitelný PLGA použitý jako materiál pro skafoldy podporuje adhezi buněk, jejich proliferaci a tvorbu nových trojrozměrných tkání.

PCL se *in vivo* biologicky rozkládá v rozmezí 2–4 let, což je pomalejší než u PLGA. Skafoldy z PCL se používají v situacích, kdy je potřeba dlouhodobá mechanická nebo strukturální podpora. Polyuretany jsou látky vznikající reakcí vícefunkčních izokyanátů s polyalkoholy. Různými chemickými modifikacemi polyuretanů můžeme docílit různých vlastností skafoldu, jako například rychlost degradace a hydrofobicita (Wolf et al., 2015).

Biokeramika, krystalická keramika a amorfní skla patří mezi mechanicky silné materiály s příznivou bioaktivitou, a navíc jsou odolné proti korozi a stlačení. Jde ale o slabé materiály, co se týče stříhu a tažných sil, které následně vedou ke křehkosti. Fosforečnan vápenatý patří mezi nejpoužívanější krystalickou biokeramiku, a to díky jeho převaze v nativní kostní tkáni. Pro regeneraci kostí se dále používá hydroxyapatit (HA), fosforečnan vápenatý, anebo jejich směs tzv. dvoufázový fosforečnan vápenatý. Zmíněné keramické materiály se *in vivo* degradují na ionty vápníku a fosfátů, které následně podporují tvorbu nových kostí procesem osteoindukce (Turnbull et al., 2018).

Bioaktivní skla představují podskupinu keramických materiálů, které jsou povrchově reaktivní a jejich strukturu tvoří křemičité síť s ionty jako je vápník, sodík a fosfor (Vats et al., 2003). Jakmile je bioaktivní sklo rozpuštěno, tak napomáhá vytvořit bioaktivní vrstvu hydroxyapatitu na povrchu skla. Vrstva hydroxyapatitu následně interaguje s kolagenovými fibrily v hostitelské kosti a vytváří tak silnou vazbu. Předpokládá se, že produkty rozpouštění, jako jsou ionty vápníku a oxidu křemičitého, stimulují hostitelské buňky k tvorbě kostní matrice. Bioaktivní skla se používají především v oborech ortopedické a maxilofaciální chirurgie, kde slouží k výrobě protéz. Částice nebo granula se využívají k léčbě osteomyelitidy, defektu měkkých tkání a ran (Turnbull et al., 2018).

1.3 Vlastnosti skafoldů

1.3.1 Biokompatibilita

Ve tkáňovém inženýrství je jednou z nejdůležitějších vlastností skafoldů biokompatibilita, tj. snášenlivost materiálu v biologickém prostředí. Skafold by tedy měl být netoxický, neměl by vyvolávat zhoubné rakovinotvorné bujení a neměl by způsobit imunitní reakci, tj. tvorbu protilátek. Měl by být antitrombotický, vazoaktivní, tzn. působící na cévy, jejich průsvit a na průtok danou oblastí těla a měl by umožňovat regeneraci cílených buněk (Iordache et al., 2019). Pokud by tato kritéria skafold nesplňoval, mohlo by dojít ke špatnému hojení, nebo k odmítnutí skafoldu, či transplantovaných buněk organismem příjemce (O'Brien, 2011).

Při hodnocení různých materiálů z pohledu biokompatibility je hlavním cílem odhalení jakéhokoliv toxického účinku na organismus. Proto se vyhodnocují biologické reakce, které by mohly mít negativní vliv na příjemce, a to především jeho poškození nebo nežádoucí vedlejší účinky. Mezi hlavní biologické reakce, které musíme brát v úvahu, řadíme: zánět, hojení a imunologickou reakci, popřípadě imunotoxicitu. Pro tento účel zveřejnila Mezinárodní organizace pro normalizaci normu, která popisuje biologické hodnocení zdravotnických prostředků. Biokompatibilitu materiálu mohou v neposlední řadě ovlivnit také různé faktory, jako je povaha a kvalita lékařského zákroku, věk, pohlaví, genetika a zdravotní stav pacienta (příjemce), popřípadě přítomnost jakýchkoliv mikroorganismů a endotoxinů (Naahidi et al., 2017).

1.3.2 Biodegradace

Biologický rozpad neboli biodegradace patří mezi důležité vlastnosti, jelikož skafold musí umožnit buňkám v těle, aby postupem času nahradily jeho konstrukci vlastní ECM. Vedlejší produkty, které vznikají při rozkladu by měly být netoxické stejně jako skafold samotný. Měly by být schopné opustit tělo bez poškození ostatních orgánů. Aby mohlo dojít ke správnému rozkladu skafoldu, na kterém se současně tvoří tkáň, tak je nutno využít zánětlivé odpovědi těla v kombinaci s řízenou infuzí buněk, jako jsou makrofágy (O'Brien, 2011).

Polymery se skládají z monomerů, které jsou vzájemně spojené funkčními skupinami a ve své struktuře obsahují nestabilní vazby. Tyto nestabilní vazby umožňují hydrolytickou degradaci prostřednictvím deesterifikace. Rozkládají se na inertní monomery a vylučují se z těla metabolickými cestami. Mezi takové materiály zařazujeme polyestery, polyanhydridy, polyuretany, polyortoestery, amid polyesteru, polyaminokyseliny a polykarbonáty získané z tyrosinu. Jejich degradaci ovlivňuje několik faktorů, jako jsou hydrofilicita, pH, jejich molekulová hmotnost, reaktivní hydrolytická skupina v kostře, krystalicita a samotná velikost polymeru (Teshamariam, 2016). Přírodní polymery vykazují lepší biodegradaci a biokompatibilitu než polymery syntetické. Přirozeně získané polymery mohou také poskytovat bioaktivní podněty a biologickou signalizaci buňkám (Yang et al., 2019).

1.3.3 Geometrie

Ke správné rekonstrukci tkáně by skafold měl mít takovou geometrii, aby odpovídala anatomickým vlastnostem dané tkáně a aby bylo dosaženo její správné funkce. Při konstrukci by měl mít tedy skafold takovou geometrii, aby se co nejvíce blížila geometrii cílové tkáně. Pro jednoduché struktury se používají CAD (počítačem podporované projektování) nebo CAM

(počítačem podporované obrábění) programy, tj. programy určené pro počítačové projektování umožňující kreslení rozsáhlých 2D a 3D modelů. Další možností je převedení obrázků z počítačové tomografie nebo z magnetické rezonance do STL souborů, jež jsou následně rozpoznány biotiskárnou. Při tvorbě tkání je důležitá vnitřní geometrie, protože podporuje přichycení buněk a jejich proliferaci (Iordache et al., 2019).

1.3.4 Povrchové vlastnosti

Mezi posuzované vlastnosti zahrnujeme povrchovou energii, smáčivost, topologii, chemické složení a povrchový náboj. Povrchová energie ovlivňuje adsorpci proteinů a buněčnou vazbu na povrch skafoldu. Při přiblížení proteinů, vody nebo buňky k povrchu, dojde k tomu, že jejich povrchové domény se zarovnají, aby došlo k minimalizování celkové povrchové volné energie na rozhraní těchto dvou struktur. Další důležitou vlastností pro buněčnou vazbu, proliferaci a diferenciaci je smáčivost. Zda je povrch hydrofobní, nebo hydrofilní značně ovlivňuje interakci mezi proteiny a povrchem skafoldu. Pro uchycení a vývoj buněk je důležité chemické složení povrchu. Integriny, cytoskeletální a extracelulární proteiny matrix jako kolagen, fibronectin a RGD peptidy (arginin-glycin-asparagová kyselina) mohou být připojeny kovalentní vazbou, elektrostaticky adsorbovány, nebo samostatně sestaveny na povrch skafoldu (Iordache et al., 2019). Povrchový náboj hraje důležitou roli v chování buněk, a to v jejich orientaci, adhezi, proliferaci a zánětlivé odezvě. Bylo zjištěno, že časná fáze akutní zánětlivé reakce je závislá na počtu negativně nabitých nábojů. Další nevýhodou negativně nabitých skafoldů je to, že podporují vyšší zarůstání cév (Verma et al., 2011).

1.3.5 Pórovitá struktura

Mezi základní faktory úspěšné konstrukce skafoldu, které musíme vzít v úvahu, patří pórovitost, propojenost pórů a jejich velikost. Propojenost pórů je nezbytnou vlastností pro difuzi živin, buněčný růst a transport plynů skrz celý objem skafoldu.

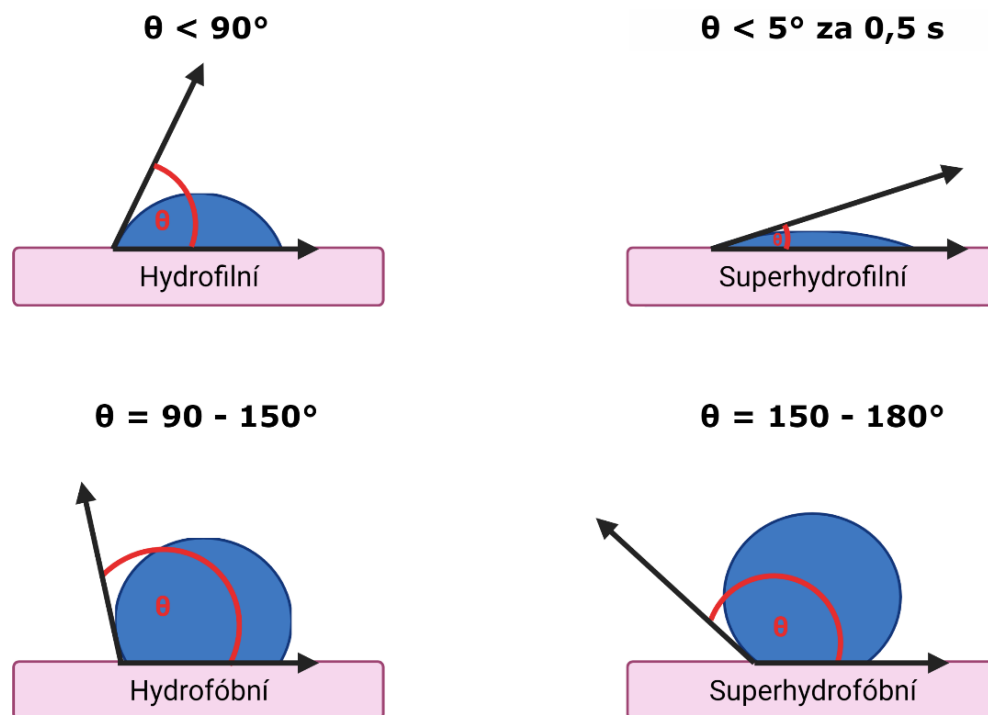
Velikost pórů je klíčová pro buněčnou migraci ve skafoldu. Při velmi malé velikosti pórů dochází k zablokování buněčné migrace, a to vede k vytvoření buněčné kapsle kolem okrajů skafoldu. Následkem vytvoření této kapsle je omezená difuze živin a omezené odstraňování odpadu napříč buněčnou populací, což může vést k rozvoji nekrotických oblastí v rámci konstrukce skafoldu. Velmi velké póry mají za následek omezenou adhezi buněk, a to z důvodu zmenšené plochy skafoldu. Rychlost buněk, které migrují velkými póry, se snižuje, ale jejich směrový pohyb jim umožňuje putovat dále do skafoldu. Větší velikost pórů

ale také zvyšuje migraci buněk a infiltraci skafoldu. Díky charakteristické velikosti buněk různého druhu, upřednostňují buňky adhezi ke skafoldu, který má různou střední velikost pórů. Například v hedvábném fibroinu s velikostí pórů v rozmezí 200–250 μm a 86% pórovitostí dochází ke zlepšené proliferaci buněk. K podpoření proliferace došlo i u skafoldu, který měl 91% pórovitost a velikost pórů v rozmezí 100–150 μm . Různé typy buněk a kostních tkání vyžadují pro svůj růst jinou velikost pórů. Bylo zjištěno, že póry s velikostí v rozmezí 186–200 μm u PCL skafoldů podporují růst fibroblastů. Zatímco u stejného skafoldu, který má odlišnou velikost pórů, v rozmezí 380–405 μm byla zjištěna podpora růstu osteoblastů a chondrocytů (Dave a Gomes, 2019).

2. ÚPRAVA POVRCHU MATERIÁLU

2.1 Smáčivost

Dalším důležitým parametrem pro adhezi buněk, jejich následnou proliferaci, diferenciaci a životaschopnost je smáčivost neboli hydrofilita či hydrofobicita. Ovlivňuje vzájemné působení mezi proteiny a povrchem skafoldu – mění se distribuce, hmotnost a konformace adsorbovaných proteinů (Iordache et al., 2019). Jde o schopnost materiálu přitahovat nebo odpuzovat molekuly vody, a to se promítá do biologické aktivity *in situ*. Kontaktní úhel (neboli úhel smáčení, θ) kapaliny na pevném substrátu kvantifikuje smáčivost povrchu (Pires et al., 2020). Pokud je tento kontaktní úhel menší jak 90° , tak mluvíme o hydrofilitě (Obr. 3). Jestliže ale úhel přesáhne 90° , tak mluvíme o hydrofobicitě. Při kontaktním úhlu nad 150° je povrch tzv. superhydrofobní, zatímco povrch s kontaktním úhlem pod 5° je tzv. superhydrofilní (Lai et al., 2013). Vysoce hydrofilní povrchy adsorbují molekuly v denaturovaném a tuhém stavu, zatímco vysoce hydrofobní povrchy zabráňují adsorpci proteinů (Canullo et al., 2020). Smáčivost pevných povrchů je také ovlivňována drsností, heterogenitou a plošnou deformací materiálu. Výsledky studie, kdy byly použity pre-osteoblastické buňky MC3T3-E1 myší linie ukázaly, že při použití biokeramického materiálu, který měl kontaktní úhel menší než 90° – hydrofilní povrch – došlo ke zvýšení počáteční fáze buněčné adheze, diferenciaci, proliferaci a mineralizaci kostí než u povrchu hydrofobního (Pires et al., 2020). Důležitou roli hraje v osteokonduktivitě, kdy smáčivost povrchu ovlivňuje množství GF a proteinů na částicích biomateriálu, a úměrně tak zvyšuje migraci a adhezi kostních buněk (Canullo et al., 2020). U syntetických polymerů můžeme regulovat smáčivost různými fyzikálními úpravami – ozařováním ionty, plazmou nebo UV zářením.



Obr. 3: Rozdělení povrchů dle smáčivosti (vytvořeno dle Asmatulu, 2016).

2.1.1 Ozařování plazmou

Jde o široce používanou techniku pro úpravu polymerních povrchů. Při generování plazmy se nejčastěji používají plyny jako argon, helium a dusík, kdy dochází k tvorbě volných radikálů (reaktivních míst) na povrchu polymerů, to umožní následné navázání monomeru nebo polymeru kovalentní vazbou na materiál. Plyny obsahující dusík se používají k vytvoření aminoskupiny na povrchu substrátu, a tím se zlepšuje biokompatibilita, smáčivost, adheze, adsorpce, chemická reaktivita a citlivost na světlo (Alves et al., 2014). Používá se mnoho typů plazmových systémů s atmosférickým tlakem, jako plazmové hořáky, korónové výboje, dielektrické bariérové výboje a plazmové trysky s atmosférickým tlakem. Výzkum ukázal, že ošetření plazmovými tryskami s atmosférickým tlakem zvýšilo funkčnost materiálu, smáčivost povrchu, podporovalo buněčnou proliferaci a poskytlo vynikající genovou expresi (Kung et al., 2019).

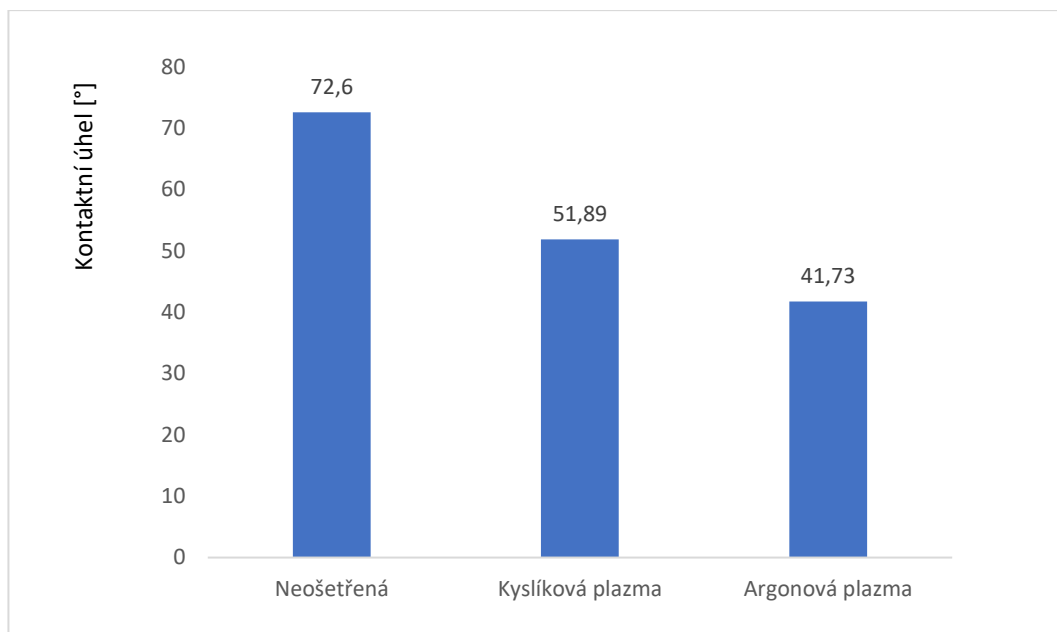
V experimentu Suntornond et al. byl zkoumán vliv plynné plazmy a kolagenu na PCL, kdy se zjišťovala buněčná proliferace. Šlo o experiment, který zkoumal podmínky úpravy plazmy, které by vedly k požadované úrovni hydrofobicity ($40-60^\circ$) na polymerní membráně. Měnily se tři faktory – druh plynu, průtok plynu a doba ošetření. Ostatní faktory jako radiofrekvence, provozní tlak a umístění polohy plazmové komory, byly udržovány

konstantní. Nejdříve se muselo dosáhnout optimálních podmínek – kontaktní úhel s vodou blízky 40°. Následně byly membrány PLC upraveny procesem imobilizace kolagenu typu I z důvodu zlepšení proliferace buněk. Experiment byl proveden za použití buněčné kultury fibroblastů L929. Každý ze tří faktorů se měnil na dvou úrovních – nízká (-) a vysoká (+). Faktory v tomto experimentu jsou: (A) typ plynového plazmatu – argon (+) nebo kyslík (-), (B) průtok plynu – 200 (+) a 100 (-) standardních kubických centimetrů za minutu (scm) a (C) doba ošetření – 180 (+) a 120 (-) sekund. Experimentu se podrobilo osm setů s pěti vzorky membrán PCL s uvedenými podmínkami v Tab. 1 pomocí plazmového reaktoru MARCH PX-500.

Tab. 1: Podmínky provedení experimentu v plazmovém reaktoru MARCH PX-500 (upraveno dle Suntornnond et al., 2016).

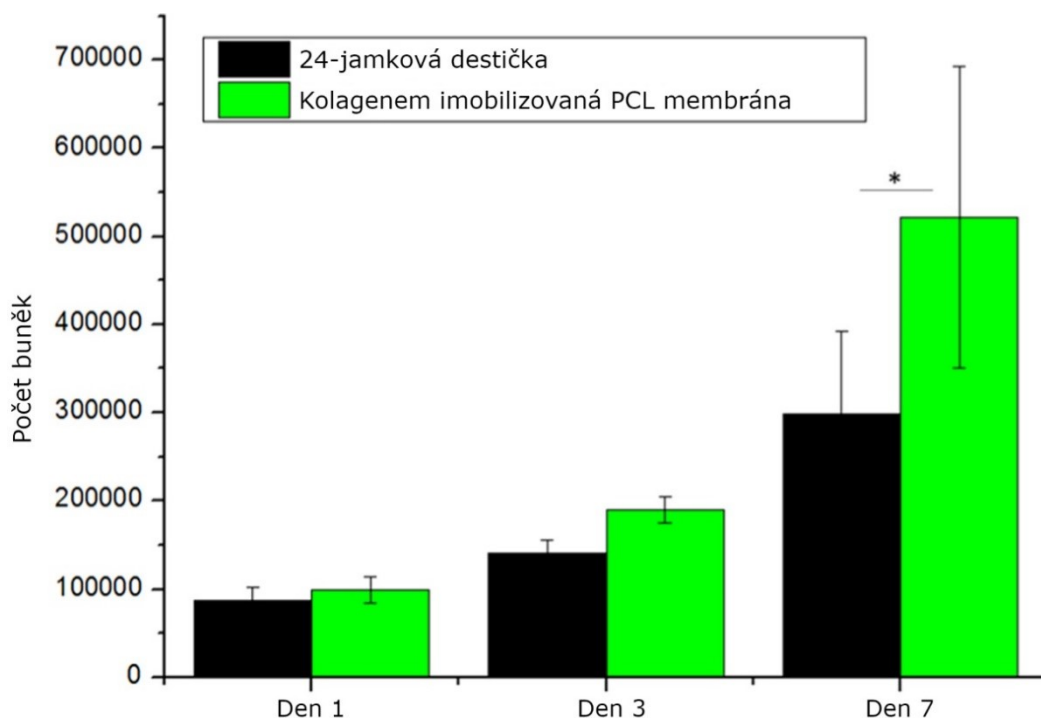
Set	A	B	C	Obsah argonu (%)	Obsah kyslíku (%)	Kontaktní úhel
1	-	-	-	-	20	49,20 ± 4
2	+	-	-	28	-	40,56 ± 3
3	-	+	-	-	40	52,19 ± 1
4	+	+	-	56	-	41,07 ± 1
5	-	-	+	-	20	53,93 ± 1
6	+	-	+	28	-	43,07 ± 3
7	-	+	+	-	40	52,25 ± 3
8	+	+	+	56	-	42,21 ± 1

Jak ukazuje Tab. 1, set 2 vedl k požadovanému kontaktnímu úhlu (40,56 ± 3), kdy byl použit čistý argonový plyn (o obsahu argonu 28 %), nízký průtok plynu (100 scm) a krátká doba ošetření (120 s). Použitím argonové plazmy lze také zmenšit kontaktní úhel povrchu PCL ze 72,6° na 41,73°, což můžeme vidět na obrázku 4.



Obr. 4: Kontaktní úhly povrchu polykaprolaktonové (PCL) membrány. Porovnání kontaktního úhlu mezi neošetřeným, kyslíkem a argonem ošetřeným povrchem PCL membrány (převzato a přeloženo ze Suntornnond et al., 2016).

Z výsledků MTT, tj. kolorimetrický test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity, jenž je vhodný pro analyzování proliferace, viability a cytotoxicity materiálu, prokázala lepší buněčnou proliferaci buněk PCL membrána imobilizovaná kolagenem typu I v porovnání s 24-jamkovou kultivační destičkou. První až třetí den byl počet buněk mezi PCL membránou a kultivační destičkou téměř stejný (Obr. 5). Proliferace se výrazně zlepšila sedmý den, kdy membránový vzorek měl téměř dvojnásobný počet buněk ve srovnání s kultivační destičkou. Důvodem byla zvýšená poréznost a drsnost, jež vedly ke zvýšení celkové plochy a k lepšímu přichycení buněk. Díky tomuto experimentu, kdy se použil kolagen typu I a optimální plazmatický stav, byla smáčivost PCL membrány zlepšena, což se ukázalo vhodnější pro buněčnou proliferaci (Suntornnond et al., 2016).



Obr. 5: Výsledky kalorimetrického testu. Porovnání mezi počtem buněk u kolagenem imobilizované polykaprolaktonové membrány a u 24-jamkové kultivační destičky. PCL = polykaprolakton. * označuje $p < 0,05$ (upraveno a přeloženo dle Suntornond et al., 2016).

Bohužel nevýhodou této techniky je to, že účinnost povrchové úpravy se do určité míry ztrácí kvůli přeuspořádání povrchu. Byly učiněny pokusy, omezit pohyblivost polárních skupin na povrchové vrstvě polymerů a bylo pozorováno, že modifikující účinky by mohly být zachovány, pokud by vzorky byly uchovávány při nízké teplotě od 0 °C do 4 °C. Tento přístup však není moc praktický pro biomedicínské aplikace, jelikož teplotní rozsah je mnohem nižší než fyziologická a pokojová teplota. Další nevýhodou je to, že samotný proces plazmové úpravy může způsobovat degradaci některých syntetických materiálů jako je například PLA (Bhushan a Kumar, 2019).

2.1.2 Ozařování UV zářením

Biomateriály můžeme ozařovat ultrafialovým zářením (UV), extrémním ultrafialovým zářením (EUV) nebo směsí s různými reaktivními plyny. UV záření je elektromagnetické záření o vlnové délce kratší než viditelné světlo (390–760 nm). Hlavním zdrojem je Slunce, ale lze jej generovat i uměle – vzniká například při průchodu proudu mezi dvěma elektrodami v křemenné trubici naplněné rtuťovými parami. Máme tři typy UV: 1) UVA záření o vlnové délce 400 až 320 nm, které se používá především u terapeutických zářičů a v soláriích, 2) UVB záření o vlnové délce 320 až 280 nm, které má využití v germicidních zářičích, a kde slouží jako doplňková dezinfekční metoda a 3) UVC záření o vlnové délce 280 až 100 nm, které se využívá také v germicidních zářičích (Lajčíková a Pekárek, 2009). EUV pokrývá rozsah vlnových délek

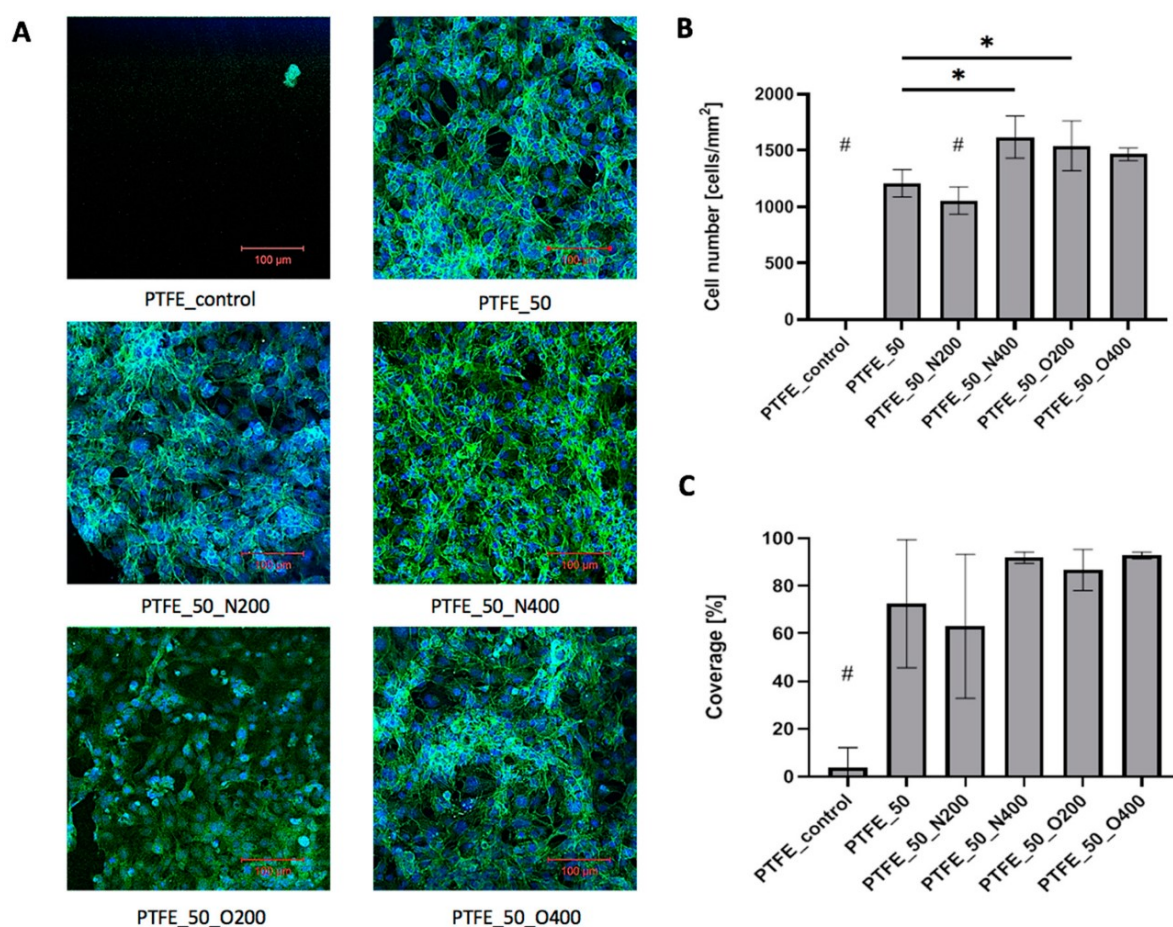
od 10 nm do 121 nm a používá se především k modifikaci polymerů. Je o něj velký zájem díky jeho extrémně krátkým absorpčním délkám v polymerech, což umožňuje velmi silnou interakci mezi EUV fotony a materiálem. EUV fotony mají omezenou hloubku průniku do polymerů – méně než 100 nm. Velkou nevýhodou použití EUV je nedostatek komerčně dostupných laboratorních zdrojů EUV záření a jejich cena. Účinným zdrojem EUV je laserová plazma produkovaná jako výsledek interakce nanosekundových laserových pulzů s hmotou (Lech et al., 2020). Metoda ultrafialového/ozonového (UV/O₃) ozařování se obecně používá k odstraňování kontaminantů z povrchů keramických materiálů působením ozonu a excitovaného atomu kyslíku z atmosférického kyslíku vytvořeného zářením UVC (Yasuda et al., 2017). Bylo prokázáno, že ozařování implantátů UV světlem zlepšuje jejich přidružený buněčný růst a schopnost vázat kosti (Kaneko et al., 2020).

V experimentu Lech et al. byl vystaven polytetrafluorethylen (PTFE) EUV a pro testování buněčné adheze byly použité lidské mikrovaskulární endoteliální buňky (HMEC). Samotný PTFE je velmi nepříznivý materiál pro buněčný růst, a proto bez modifikace EUV došlo po 72 hodinách kultivace k potažení povrchu volně sférickými buňkami. Naopak všechny povrchy modifikované EUV silně podporovaly buněčnou adhezi a byly potaženy několika dobře přilnutými zploštělými buňkami – buněčné překrytí po 72 hodinách kultivace přesáhlo 60 %. Při použití kyslíku a dusíku, jako reaktivních plynů, došlo ke zlepšení proliferace buněk – kyslík výrazně zlepšil proliferaci v porovnání s dusíkem. V případě dusíku byla adheze buněk menší ve srovnání s kyslíkem, nicméně počet buněk byl stále vyšší ve srovnání s kontrolním materiálem. Rozdíl ve vzorcích byl v použití reaktivního plynu – kyslík, dusík nebo bez reaktivního plynu, v délce otevření ventilu – po dobu 200 nebo 400 ms a v počtu EUV impulzů – žádné nebo 50. Popis jednotlivých vzorků, jejich označení a vlastností experimentu můžeme vidět v Tab. 2.

Tab. 2: Podmínky experimentu s polytetrafluorethylenem (upraveno dle Lech et al., 2020).

Polymer	Počet EUV impulsů	Reaktivní plyn	Doba otevření ventilu [ms]	Označení vzorku
Polytetrafluorethylen (PTFE)	0	Žádný	0	PTFE_control
	50	Žádný	0	PTFE_50
	50	Dusík	200	PTFE_50_N200
	50	Dusík	400	PTFE_50_N400
	50	Kyslík	200	PTFE_50_O200
	50	Kyslík	400	PTFE_50_O400

Výsledky buněčné adheze můžeme vidět na Obr. 6 a výsledné hodnoty kontaktního úhlu v Tab. 3. Smáčivost byla nejlepší u povrchů, které byly modifikované pouze EUV bez reaktivního plynu. Zde byly povrchy nejvíce hydrofilní – kontaktní úhel vody se snížil na 82,8°. Při použití kyslíku nebo dusíku se hydrofilita mírně snížila, avšak hodnoty kontaktního úhlu byly stále nižší ve srovnání s kontrolním PTFE, který měl kontaktní úhel 117,5°. Nejlepší výsledek – co se týče použitých reaktivních plynů – byl změřen u PTFE_50_O400, kdy se kontaktní úhel vody snížil na 96,3° (přesto ale došlo k menšímu snížení než u povrchů, které byly ošetřeny EUV bez reaktivního plynu). Všechny povrchy ošetřené EUV vykazovaly také zvýšenou drsnost povrchu (Lech et al., 2020).

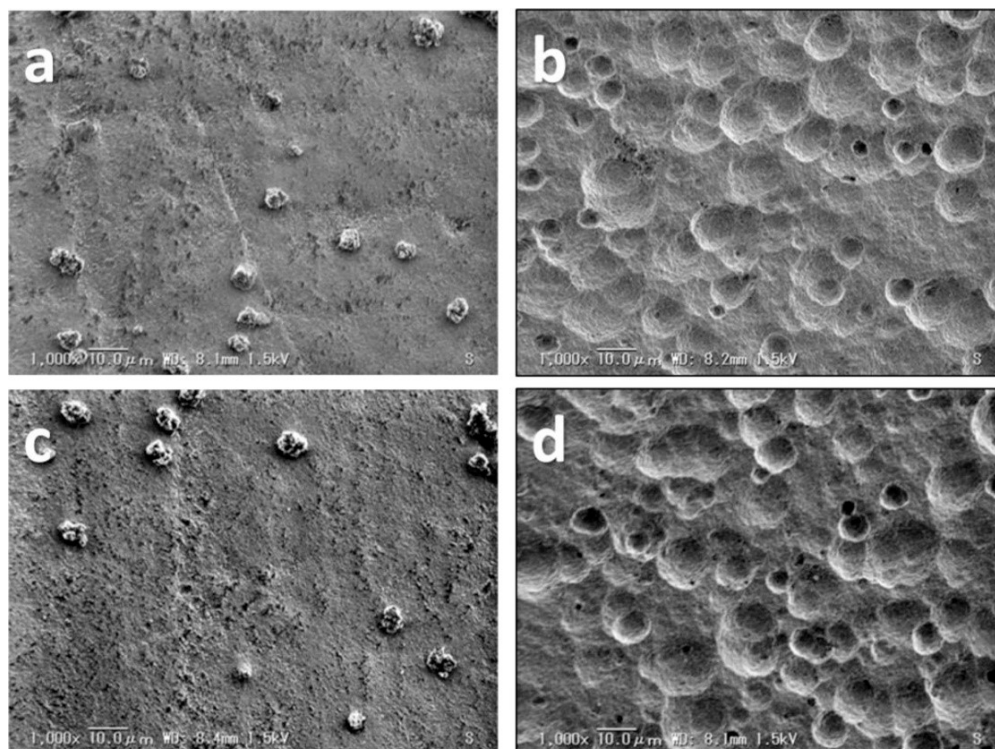


Obr. 6: Výsledky experimentu s polytetrafluorethylenem (PTFE). (A) Adherované buňky na povrchu PTFE po 72 h kultivace znázorněné pomocí fluorescenčního barvení, (B) počet adherovaných buněk na povrch PTFE po 72 h kultivace, (C) buněčné pokrytí povrchu PTFE po 72 h kultivace. # značí $p < 0.05$. PTFE_50 ve srovnání s PTFE_50_N400 (* $p = 0,006$) a PTFE_50_O200 (* $p = 0,032$) (upraveno dle Lech et al., 2020).

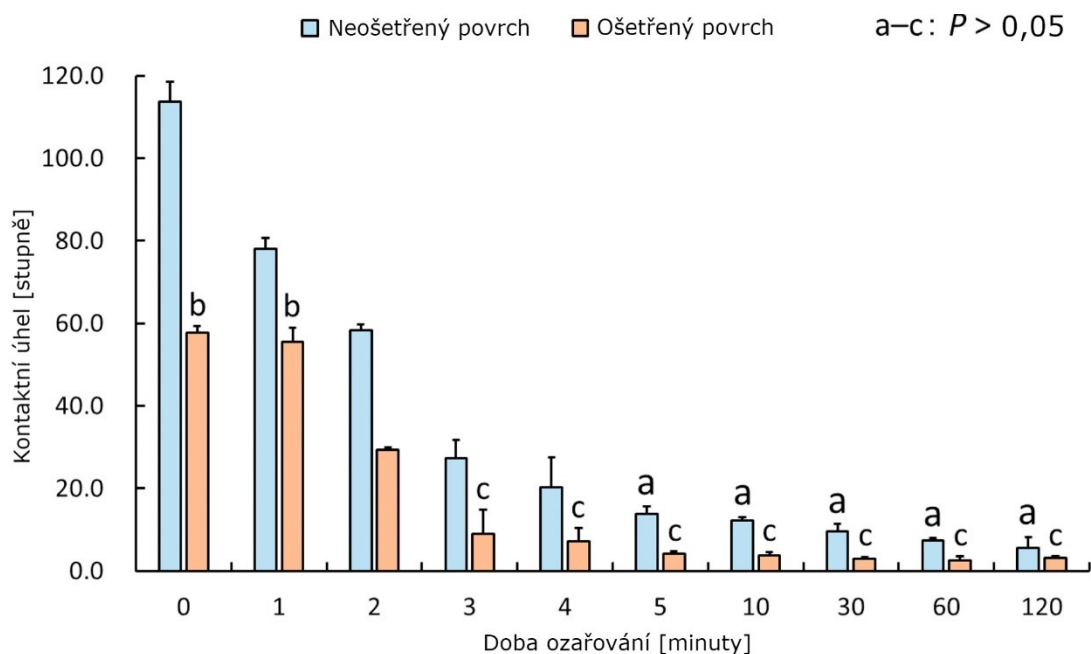
Tab. 3: Výsledné hodnoty kontaktního úhlu polytetrafluorethylenu (upraveno dle Lech et al., 2020)

Označení vzorku	Kontaktní úhel vody [°]
PTFE_control	117,5
PTFE_50	82,8
PTFE_50_N200	113,6
PTFE_50_N400	109,3
PTFE_50_O200	106,2
PTFE_50_O400	96,3

V jiném experimentu byly povrchy HA ozářeny UV zářením a ozonem, kdy půlka vzorků byla předem ošetřena 30% roztokem kyseliny fosforečné. Ozařování probíhalo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60 nebo 120 minut. Bylo zjištěno, že čím delší byla doba ozařování, tím více došlo ke zmenšení kontaktního úhlu HA, avšak k nejvýraznější změně došlo po 5 minutách ozařování, kdy se nejvíce zlepšila smáčivost HA. Po 5 minutách došlo také k významné dekontaminaci, zdrsnění povrchu (Obr. 7) a také k urychlení proliferace, diferenciaci a mineralizaci použitých buněk podobných osteoblastům myši linie MC3T3-E1. U vzorků, které byly předem ošetřeny kyselinou fosforečnou a následně ozářeny UV zářením a ozonem došlo k nejvýraznějšímu snížení kontaktního úhlu po 3 minutách ozařování (Obr. 8). Do budoucna by pravděpodobně ošetření HA UV zářením a ozonem mohlo patřit mezi přínosnou metodu pro poskytování vysoce biokompatibilních produktů obsahujících HA pacientům (Yasuda et al., 2017).



Obr. 7: Snímky hydroxyapatitu (HA) ze skenovacího elektronového mikroskopu. (a, c) Snímek neošetřeného povrchu HA, (b) povrchu HA modifikovaného H_3PO_4 , který nebyl vystaven ultrafialovému a ozónovému záření, (d) HA povrchu, který byl modifikován H_3PO_4 a následně vystaven ultrafialovému a ozónovému záření po dobu 120 minut (převzato a přeloženo z Yasuda et al., 2017).



Obr. 8: Průměrné hodnoty kontaktního úhlu na neošetřených a na H_3PO_4 modifikovaných površích hydroxyapatitu ozářených UV zářením a ozonem (UV/O₃). Písmena a-c nad grafy znamenají to, že mezi těmito dvěma typy vzorků nebyly žádné významné rozdíly ($P > 0,05$). Chybové úsečky označují standardní odchylku (upraveno a přeloženo z Yasuda et al., 2017).

V posledním experimentu byl HA s 0% a 55% porézností ozařován UV zářením po dobu 15 minut. Před ozáření byl povrch obou HA hydrofobní se středním kontaktním úhlem okolo 60°. Po ozáření UV zářením se oba povrchy staly hydrofilními, kdy u HA s 0% porézností klesl kontaktní úhel z 53,9° na 17,7°. U HA s 55% porézností klesl kontaktní úhel mnohem více, a to z 79,5° na 3,2° (Kaneko et al., 2020).

Ze všech výše zmíněných experimentů vyplývá, že ozáření povrchu UV zářením má příznivý vliv na snížení kontaktního úhlu, a tedy i na adhezi a následnou proliferaci buněk. Z těch, které se snažily upravit smáčivost povrchu různých materiálů pomocí UV, EUV nebo ve spojení se směsí různých plynů, vyšel nejlépe experiment Yasuda et al., který upravoval smáčivost povrchu HA pomocí kyseliny fosforečné v kombinaci s UV ozáření a ozonem. Tento postup dokázal nejvíce snížit kontaktní úhel vody na neošetřeném povrchu HA, který byl ozářen pomocí UV záření a ozonu po dobu 5 minut, z cca 115° na cca 15°.

2.1.3 Ozařování ionty

Ozařování povrchů různých materiálů ionty poskytuje mimořádné efekty, které jsou zcela neproveditelné jinými metodami. Iontové paprsky dělíme na základě energie, kterou se pohybují, a to na iontové paprsky s nízkou energií (< několik desítek megaelektronvoltů = MeV) a s vysokou energií (> několik desítek MeV). Nízkoenergetické ionty ztrácejí svou energii elastickými srážkami s jádrem cílového atomu, zatímco vysokoenergetické ionty ztrácejí svou energii nepružnými srážkami s cílovými elektrony (Shanthini et al., 2015).

V experimentu Hwang et al. došlo k ozařování filmů z fluorovaného ethylen-propylenu (FEP) ionty xenonu. Filmy FEP byly potaženy lidskými nádorovými buňkami plic (H1299). Vzorky o rozměrech 80x80 mm² byly prvně ozářeny 100 keV (kiloelektronvolty) xenonu při fluktuaci 1x10¹⁶ iontů/cm² a proudovou hustotou 1 A/cm². Poté byly filmy FEP s buňkami podruhé ozářeny různými proudy od 7x10¹⁶ do 2x10¹⁷ iontů/cm², kdy proudová hustota byla 15 A/cm² za použití 300 keV iontového implantátoru. Povrch ozářený při nízké proudové hustotě byl rovnoměrný a hladký, zatímco povrch vystavený druhému ozařování při vysoké proudové hustotě měl výrazně zdrsňenou strukturu. Kontaktní úhel vody byl u kontrolního vzorku FEP 108°, po prvním ozáření klesl na 80°, což ukazuje na tvorbu hydrofilních skupin. Po druhém ozáření se kontaktní úhel vody drasticky zvýšil na 140° při všech iontových fluencích. Povrch FEP vystavený prvnímu ozáření vykazuje vyšší rychlost proliferace, zatímco kontrolní FEP a povrchy s druhým ozařováním ukazují velmi špatnou proliferaci buněk (Hwang et al., 2019).

2.2 Povrchová drsnost

Nejdůležitějším aspektem topografie povrchu je jeho drsnost. Udává texturu povrchu materiálu a zjistíme ji měřením povrchových výstupků nebo prohlubní. Pro měření můžeme využít mnoho přístrojů a technik: mikroskopii atomárních sil (AFM), laserový skenovací konfokální mikroskop (LSCM), skenovací elektronový mikroskop (SEM) anebo různé profilometry. AFM dokáže ve vysokém rozlišení kvantifikovat drsnost povrchu v řádech nanometrů. Zároveň je také důležitou metodou pro lepší pochopení vlastností povrchů, čímž přispívá k optimalizaci výkonu biomateriálů (Marrese et al., 2017). Další používanou technikou je LSCM, která využívá laser pro skenování povrchu a vytváří tak fotografie s vysokým kontrastem a rozlišením na úrovni jednoho nanometru. LSCM se stala oblíbenou díky tomu, že jde o techniku, která je pro vzorky nedestruktivní a bezkontaktní, vyžaduje minimální přípravu zkoumaného vzorku, který je zároveň také dobře chráněn před otěrem nebo kontaminací (Hong a Meng, 2018; Hongru et al., 2017). SEM pak nachází uplatnění především v charakterizaci topografie povrchů materiálů a nanočástic. Využívá vysokoenergetické elektronové paprsky k získání informací o morfologii vzorku, jeho chemickém složení či krystalické struktuře. Prostorové rozlišení SEM se pohybuje v rozmezí 1-20 nm (Zuncheddu et al., 2021). Profilometr patří mezi často využívané přístroje, kdy k použití je možná jak kontaktní, tak nekontaktní varianta. Kontaktní profilometr měří drsnost povrchu pomocí diamantové špičky, která přechází přes povrch vzorku, čímž vzorek ničí. Nkontaktní profilometr využívá laserový paprsek či obecně monochromatické světlo k vyhodnocení drsnosti povrchu. Ve srovnání se SEM má tu výhodu, že jde o metodu nízkonákladovou, vyhodnocení zabere relativně krátký čas a vzorek nevyžaduje žádnou speciální přípravu jako je naprašování či jeho dělení (Sultan et al., 2022).

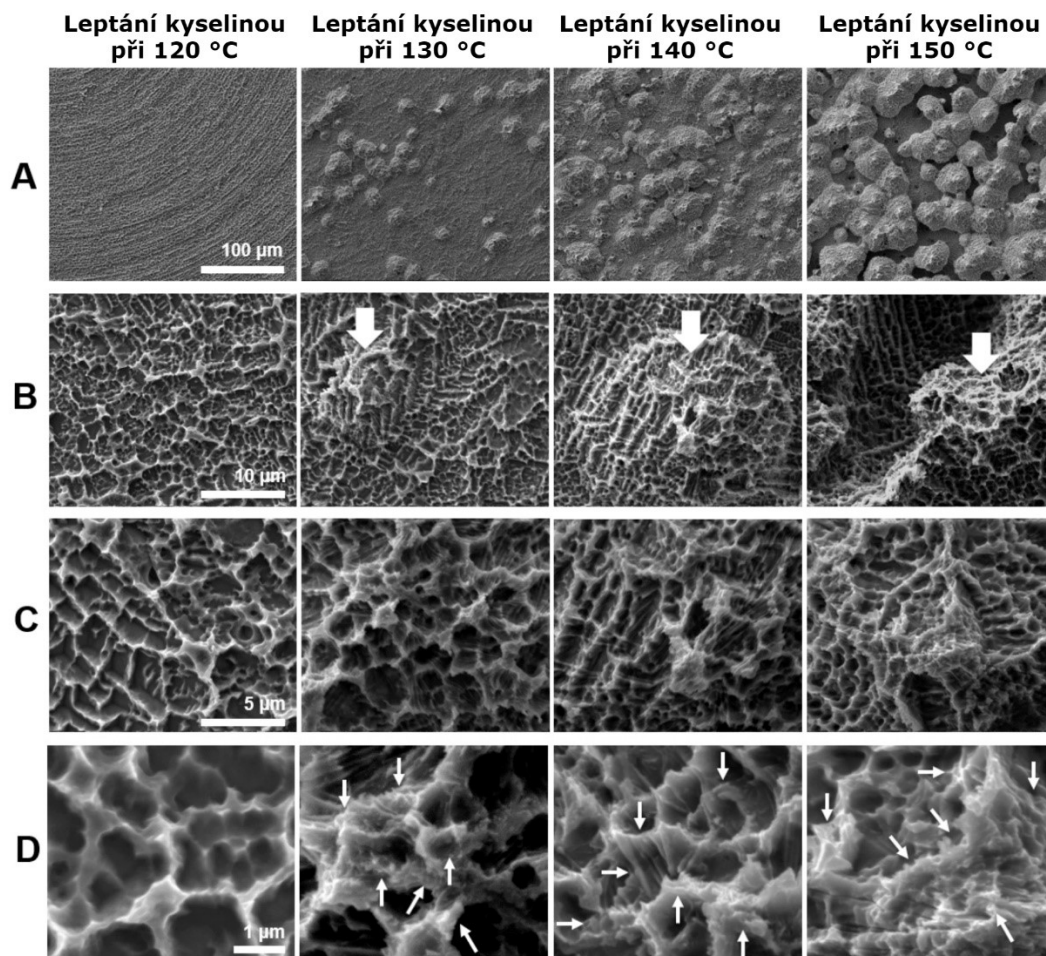
Za účelem vytvoření nebo zvýšení drsnosti povrchu biomateriálu byly vyvinuty metody jako například plazmová úprava, broušení, mechanické leptání, 3D tisk, litografie, mikroobrábění, leptání kyselinou, otryskávání apod. Jednotlivé druhy buněk vyžadují jinou drsnost – například osteoblastové buňky preferují drsnější povrch, periodontální fibroblastové buňky lépe adherují na hladší povrchy a epiteliální buňky přilnou nejlépe k hladkým povrchům. Rozeznáváme tři úrovně: makrodrsnost, mikrodrsnost a nanodrsnost. Pro studium vlivu povrchové drsnosti na buněčné funkce a chování, byly testovány dvě kategorie materiálů. První kategorií jsou kovové konstrukce jako titan, platina a nerezová ocel. Druhou kategorií jsou polymerní biomateriály (Amani et al., 2019; Bourkoula et al., 2016). Bylo prokázáno několika studiemi, že úprava drsnosti povrchu je jednou z klíčových rolí při regulaci buněčné

diferenciace. Ovlivňuje i další parametry materiálu jako povrchovou geometrii, tuhost a adsorpci proteinů z roztoku, ke které dojde během několika sekund (Liu et al., 2021; Rosqvist et al., 2019). Nanodrsnost má výhodné vlastnosti pro uchycení a šíření buněk, napomáhá produkci proteinů ECM a posiluje vzájemné mechanické spojení biomateriálů (Hasegawa et al., 2020).

2.2.1 Leptání kyselinami

Leptání kyselinami je dlouhou dobu považováno za účinnou metodu pro vytvoření povrchové drsnosti kovových a polymerních biomateriálů. Leptání se může provádět jednou, či dvakrát – druhé leptání způsobuje zvýšení nanodrsnosti a specifické povrchové plochy, což zvýší adsorpci proteinů, a to v konečném důsledku moduluje buněčnou signalizaci (Giner et al., 2018). Nejčastěji se k leptání používá kyselina sírová, dusičná, chlorovodíková, hyaluronová a pro leptání titanového povrchu kyselina fluorovodíková (HF). Mnoho studií potvrdilo také fakt, že povrchová drsnost se zvýšila, když se prodloužila doba leptání kyselinou (Vu et al., 2018). S nárůstem teploty leptání kyselinou neboli zvýšením drsnosti povrchu došlo k úměrnému zvýšení diferenciace buněk.

V experimentu Hasegawa et al. byly vzorky titanu leptány 67% kyselinou sírovou po dobu 75 sekund při různých teplotách – 120, 130, 140 a 150 °C. Titanové povrchy, které byly leptané kyselinou při 120 °C nevykazovaly při nejmenším zvětšení žádné rozpoznatelné struktury. Struktury, které byly leptané při vyšší teplotě vykazovaly na povrchu vyčnívající struktury podobné hrotům, podle snímků SEM se pohybovaly v měřítku od 10 do 80 μm. Čím byla teplota vyšší, tím byla vyšší hustota a velikost hrotů na titanových površích. Povrch se stal polymorfní, kdy obsahoval nanohřebeny, nanouzly, nanopilíře a nanokompartmentové struktury, které můžeme vidět na Obr. 9, kde jsou označeny bílými šipkami u obrázků D (Hasegawa et al., 2020).



Obr. 9: Snímky morfologie povrchu titanových disků leptaných kyselinou sírovou při 120, 130, 140 a 150 °C ze skenovacího elektronového mikroskopu. (A) 500x zvětšený povrch s měřítkem 100 μm, (B) 5000x zvětšený povrch s měřítkem 10 μm, (C) 10 000x zvětšený povrch s měřítkem 5 μm, (D) 30 000x zvětšený povrch s měřítkem 1 μm (převzato a přeloženo z Hasegawa et al., 2020).

Následně byly titanové vzorky osazeny osteoblasty, které byly izolované ze stehenních kostí osmítýdenních potkanů. Diferenciace osteoblastů byla v průběhu kultivace zkoumána stanovením aktivity alkalické fosfatázy (ALP), ukládáním vápníku a sledováním exprese osteoblastických genů osteopontinu a osteokalcinu. Aktivita ALP po 4 dnech kultivace se zvyšovala s rostoucí teplotou kyseliny, nejvyšší aktivita ALP tedy byla u vzorku, který byl leptán kyselinou při 150 °C. Ukládání vápníku po 14 dnech kultivace vykazovalo stejný trend jako u ALP, a to zvýšené ukládání vápníku s rostoucí teplotou. Exprese osteopontinu a osteokalcinu se zvýšila 7. a 14. den kultivace na površích leptaných při vyšších teplotách, což ukazuje, že třístupňová drsnost nejen urychlila diferenciaci osteoblastů, ale také zvýšila stupeň a pravděpodobnost diferenciace. Diferenciace se zvýšila u povrchů, které byly leptané vyšší teplotou. Průměrná drsnost (1–5 μm) povrchu třístupňového drsného povrchu byla 6–12krát vyšší než pouze povrch s mikrodrsností. Celková síla osseointegrace byla největší, když bylo leptání kyselinou provedeno při 140 °C (Hasegawa et al., 2020).

V experimentu Silva et al. byly titanové disky leptány směsí HF a kyseliny dusičné (HNO_3). Všechny disky byly mechanicky leštěny pod vodní závlahou pomocí brusných papírů, hadříků na leštění kovů a tkaninou na leštění titanu. Následně byly rozděleny do tří skupin podle způsobu zpracování: první skupina disků byla pouze leštěna, druhá skupina byla leštěna a následně leptána směsí 0,8% HF a 13% HNO_3 po dobu 15 minut, třetí skupina měla stejný způsob zpracování jako druhá, ale lišila se dobou leptání, a to o 15 minut déle – tedy celkově 30 minut. Měření ukázalo, že leptání směsí HF a HNO_3 po dobu 15 a 30 minut produkovalo disky s různou povrchovou topografií. SEM snímky povrchu u první skupiny potvrdily svůj leštěný vzhled, kdy byl povrch hladký a bez jakýchkoliv struktur. Povrch leptaný po dobu 15 minut vykazoval homogennější morfologii s drážkovitými prohlubněmi, zatímco povrch leptaný 30 minut vykazoval drsnější vzhled s mnoha nepravidelnými strukturami. Všechny disky byly následně osazené lidskými buňkami kostní dřeně, které byly získané od 45letého pacienta v dobrém fyziologickém stavu. Tři dny po kultivaci vykazovala první ($R_a = 0,15 \mu\text{m}$) a třetí ($R_a = 0,77 \mu\text{m}$) skupina nižší hodnoty proliferace než druhá ($R_a = 0,50 \mu\text{m}$) skupina. Po 7 a 14 dnech kultivace nebyly významné rozdíly mezi skupinami, ačkoli buňky kultivované na discích druhé skupiny vykazovaly zlepšenou proliferaci. 3, 7, 14 a 21 dnů po kultivaci byla stanovena exprese osteopontinu – větší exprese byla pozorována třetí, sedmý a 14. den v buňkách kultivovaných na discích druhé a třetí skupiny (index drsnosti byl mezi $0,50 \mu\text{m}$ a $0,77 \mu\text{m}$). Exprese osteokalcinu byla vyšší v buňkách kultivovaných na discích druhé a třetí skupiny, a to zejména 14 dní po kultivaci. Nejlepší proliferace a diferenciacce byla tedy u titanových disků, které byly leptány směsí HF a HNO_3 po dobu 15 minut, kdy měly průměrnou drsnost $0,50 \mu\text{m}$ (Silva et al., 2009).

Při porovnání těchto dvou experimentů, bez ohledu na typ buněk, vychází lépe experiment s kyselinou sírovou. Je vhodnější pro klinické podmínky díky jeho jednoduchosti, rychlosti a malému množství použitého materiálu.

2.2.2 3D tisk

3D tisk je známý také pod pojmem aditivní výroba, kdy jeho uplatnění můžeme najít v mnoha odvětvích života, jako je průmyslový design, inženýrství, umění a také lékařství. Jde o účinnou metodu navrhování přizpůsobených struktur a výroby syntetických kostních štěpů, vhodných pro kostní implantáty. Obecný postup zahrnuje navržení 3D modelu pomocí konstrukčního programu na počítači a následné vytvoření 3D objektu několikanásobným vrstvením různých materiálů na sebe, například pryskyřice, kovové jíly, keramika nebo různé polymery. Aditivní výroba materiál postupně přidává, naopak proces, kdy se materiál odebírá,

se nazývá obrábění. Díky dobrým formovacím vlastnostem a vysoké přesnosti je hojně používána fotosenzitivní pryskyřice založená na technice UV polymerace. Jde o speciální druh pryskyřice, která se používá pro 3D tisk a ztuhne po vystavení UV záření uvnitř 3D tiskárny během tisku. Nevýhodou pryskyřice je to, že některé její složky používané při 3D tisku nejsou příznivé pro buněčnou adhezi a proliferaci. Různé studie zjistily, že polymerace fotosenzitivní pryskyřice je složitá a domnívají se, že nezreagovaný materiál v pryskyřici může poškodit tkáň degradací a erozí. Aby bylo použití pryskyřice výhodnější, je nutné zvýšit buněčnou přilnavost pryskyřic pro 3D tisk, a to změnou drsnosti a hydrofilních vlastností, například potahem povrchu různými polymery (Lu et al., 2016; Oladapo et al., 2020).

Vytlačování polymeru na bázi vláken, známé také jako modelování fúzních depozic (FDM), je jedna z nejpoužívanějších technik 3D tisku, která je nízkorozpočtová, rychlá, výkonnější a nabízí širokou škálu materiálů z termoplastických polymerních vláken pro výrobu mikrofluidních zařízení. Nevýhodou těchto zařízení ale je, že trpí nízkou optickou průhledností. Všechny 3D tištěné součásti jsou drsné díky procesu vytlačování a způsobu výroby vrstvy po vrstvě. Nejvyhledávanějším přírodním polymerem pro FDM 3D tisk se stala PLA. Při tisku skafoldu z PLA měl povrch střední kvadratickou hodnotu drsnosti větší než 360 nm. Mezi další vhodné materiály pro FDM 3D tisk patří polyethyltereftalátglykol (PETg), akrylonitrilbutadienstyren, polyethylen s vysokou hustotou, PTFE (známý pod názvem teflon) apod. (Mehta et al., 2021; Feng et al., 2018).

V experimentu Lu et al. použili pro zlepšení buněčné adheze a proliferace na pryskyřici potah vodou ředitelného polyuretanu (WPU), který využívá jako disperzní médium vodu místo organického rozpouštědla. Používá se v lékařských implantátech pro svou nízkou toxicitu, dobrou biokompatibilitu a vlastnosti povlaku. Výsledky ukazují, že povrch pryskyřice potažený WPU byl hladký a bez trhlin, zatímco povrch čistého pryskyřicového skafoldu byl drsný s určitými trhlinami. Drsnost pryskyřicového skafoldu bez potahu WPU byla okolo 5,332 nm a skafold s potahem WPU měl drsnost okolo 4,187 nm, po potažení povrchu WPU došlo tedy ke snížení jeho drsnosti. Pro posouzení adheze a proliferace byly použity lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly (HUVEC, ATCC® CRL-1730™). Poměr proliferace buněk na pryskyřicovém skafoldu byl $0,38 \pm 0,06$ a u pryskyřice potažené WPU byl $0,97 \pm 0,01$. Relativní životaschopnost buněk na pryskyřici potažené WPU byla také vyšší než u samotného pryskyřicového skafoldu. Výsledky potvrdily, že pryskyřicový skafold potažený WPU zlepšil adhezi, proliferaci buněk a jejich životaschopnost (Lu et al., 2016).

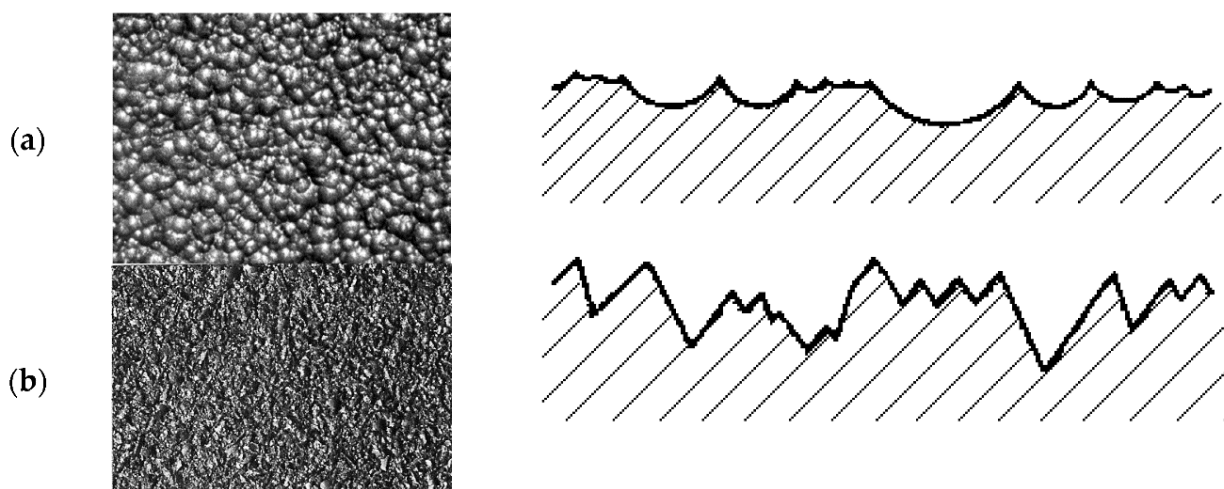
V dalším experimentu Mehta et al. použili pro FDM 3D tisk PETg. Drsnost takto vytištěného skafoldu byla okolo 30 μm . Skafold byl následně osazen myšími fibroblastovými

buňkami L929. Třetí den kultivace ukazuje barvení povrchu PETg signifikantní počet živých buněk a několik mrtvých buněk, což dokazuje, že 3D tištěný povrch PETg je biokompatibilní. I přes nízkou smáčivost povrchu z PETg umožňuje tento vytištěný skafold přichycení, šíření a proliferaci buněk, a to bez potahování ECM nebo jiné povrchové úpravy (Mehta et al., 2021).

2.2.3 Otryskávání

Abrazivní tryskání, známé spíše jako brokování nebo pískování, je metoda násilného pohánění proudu abrazivního materiálu proti povrchu materiálu pod vysokým tlakem, za účelem vyhlazení hrubého povrchu, zdrsňení hladkého povrchu nebo odstranění povrchových nečistot. V posledních desítkách let se otryskávání široce využívá pro ošetření kovových biomateriálů a biomedicínských implantátů po zpracování, ke zlepšení jejich funkčnosti a výkonu. K pohonu abrazivního materiálu se používá stlačená kapalina, stlačený vzduch nebo odstředivé kolo. Výhodou této technologie ve spojení s následnou aplikací povlaku je zvětšení skutečné velikosti plochy, což vytváří příznivé podmínky pro zvýšenou přilnavost nátěrů. Tryskací materiály neboli abraziva dělíme především do dvou skupin – kovová a nekovová (Draganovská et al., 2018; Arifvianto et al., 2020).

Kovová abraziva jsou tří tvarů: kulovitěho (ocelové broky), nepravidelněho ostrěho (litinová drť) a válcověho (sekaný drát). Podle použitého tvaru abraziva bude vypadat výsledná morfologie povrchu materiálu (Obr. 10). Mezi nejrozšířenější kovová abraziva patří ta na bázi železa. Nekovová abraziva se používají především pro určitý druh předem upraveného materiálu. Nejrozšířenější nekovová abraziva jsou přírodního nebo umělého minerálního původu, jako například oxid hlinitý (Al_2O_3 , známý jako korund), přírodní granát, skleněné kuličky a také druhotné suroviny (strusky z metalurgických procesů). V porovnání s kovovými abrazivy mají nekovová abraziva nižší specifickou hmotnost, způsobují nižší deformaci materiálu, nižší drsnost povrchu a mají kratší životnost, proto se používají pro jednorázové tryskání (Draganovská et al., 2018). Zvláštním typem otryskávání je technika CoBlast, která je velmi jednoduchá a nízkonákladová, protože v procesu nejsou zahrnuty žádné mokré mezistupně, vakuum nebo inertní prostředí. Jde o techniku, která kombinuje tryskání a povlakování povrchu kovu v jednom procesním kroku. Mění se povrchová chemie reaktivních kovů impregnací dopovací přísady do vrstvy oxidu, když je vystavena zdrsňení působením abraziva (Oladoye et al., 2014).



Obr. 10: Morfologie povrchu otrýskaného různými tvary abraziva. (a) Povrch kovového substrátu otrýskaný polydisperzními broky a (b) drtí (převzato a přeloženo z Draganovská et al., 2018).

Titanový povrch ošetřený metodou tryskání HA, vykazoval lepší a silnější kostní odezvu a lepší osteokonduktivitu než neošetřený titanový povrch. Pískování oxidem zinečnatým (o velikosti částic 60 μm) a leptání kyselinou se ukázalo jako nejvýhodnější metoda, protože *in vitro* došlo k největší proliferaci a vysokému stupni diferenciace buněk.

V experimentu Liao et al. se porovnávala drsnost povrchu Ti-6Al-4V, který byl ošetřen tryskáním částicemi Al_2O_3 , karbidem křemíku (SiC) a směsí HA a SiC. Všechny testované povrchy byly osazeny buňkami MG63 (buňky podobné osteoblastům). Výsledky ukazují, že drsnost povrchu se zvyšovala s rostoucí velikostí částic Al_2O_3 . Při použití abraziva SiC byla drsnost povrchu vyšší než u Al_2O_3 stejné velikosti, díky větší tvrdosti SiC částic. Pomocí otrýskávání výše zmíněnými částicemi došlo k úpravě povrchů Ti-6Al-4V, které se staly ve všech případech hydrofilnější než původní neotryskaný vzorek. Největší rozdíl nastal ale u techniky CoBlast, kdy se použila směs HA s SiC a povrch Ti-6Al-4V vykazoval až superhydrofilní vlastnosti. Nejúčinnějším se tak jeví povrchová modifikace pomocí techniky CoBlast částicemi HA a SiC, kdy byl povrch nejvíce hydrofilní a vykazoval lepší životaschopnost buněk (Liao et al., 2018).

2.3 Navázání molekul na povrch skafoldu

K vybudování úspěšného skafoldu je nutné napodobit interakce mezi povrchovými receptory buněk a molekulami ECM. Interakce jsou velmi důležité při regulaci buněčné adheze, proliferace, migrace, diferenciace, přežití buněk, také podporují hojení a regeneraci prostřednictvím integrace s nativní tkání (Leszczak et al., 2015).

2.3.1 Bioaktivní molekuly

Funkcionalizace skafoldů bioaktivními molekulami, může podporovat angiogenezi, životaschopnost a přežití štěpované tkáně. Řadíme sem chemikálie ve formě iontových rozpouštědel, produktů, léků, peptidových sekvencí a GF. Jde o celé proteinové molekuly jako například ECM proteiny nebo krátké peptidové sekvence neboli tzv. buněčné vazebné domény izolované z ECM proteinů. Krátké peptidy jsou obecně výhodnější, jelikož celé proteiny mají tendenci se náhodně skládat, a tím zamezují dostupnosti vazebných domén. Krátké peptidy jsou navíc během procesu modifikace stabilnější a lze je hromadně vyrábět v laboratořích (Tallawi et al., 2015).

2.3.1.1 Peptidové sekvence

Peptidy jsou molekuly složené nejméně ze dvou aminokyselin a mají širokou škálu biologických aktivit. Oproti menším molekulám, mají peptidy tu výhodu, že mají vysokou specifickou a jsou nízkonákladové. Díky tomu má návrh peptidů, které napodobují specifická vazebná proteinová místa, velký terapeutický potenciál (Lee et al., 2021). Nejběžněji používanou peptidovou sekvencí je RGD (Arg-Gly-Asp), která je odvozena od fibronektinu typu III a nachází se v mnoha přírodních adhezivních proteinech, mimo fibronektinu také ve vintronektinu, lamininu a kolagenu typu I. Prostřednictvím tohoto peptidu dochází ke spojení buněčných integrinů intracelulárního cytoskeletu s ECM, což podle dostupných studií s různými buněčnými typy prokázalo dobrou adhezi (Tallawi et al., 2015). Hojně používaná je také cyklická syntetická forma RGD: RGDfK (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) peptid, který je odolný vůči proteáze, vysoce stabilní ve vodných roztocích a má vysokou afinitu k buněčným integrinům. Ve studii Sondermeijer et al. byl použit cyklický RGDfK peptid pro modifikaci alginátového skeletu. Z výsledků je zřejmé, že takto funkcionalizované skelety jsou biokompatibilní, neimunogenní, zvyšují životaschopnost buněk, podporují angiogenezi a mohou být použity jako prostředek k dodání buněk do oblastí infarktu myokardu, pro zlepšení neovaskularizace a srdeční funkce (Sondermeijer et al., 2018).

2.3.1.2 Kolagen

Jeden z nejoblíbenějších bioaktivních povlaků, který se hojně používá patří kolagen. Jde o hlavní protein ECM, který je široce používán k podpoře buněčné adheze, a to konkrétně pro fibroblasty, lidské keratinocyty, epiteliální a endoteliální buňky. Buněčná adheze ke kolagenu je řízena dvěma integriny: $\alpha1\beta1$ a $\alpha2\beta1$. Fibrilární kolagen (kolagen typu I) váže tyto buněčné integriny a zároveň vykazuje trojitou helikální strukturu, která je nezbytná

pro jeho biologické a mechanické vlastnosti (Leszczak et al., 2015). Kolagen typu I poskytuje především strukturální podporu, kdy zajišťuje tuhost a odolnost proti deformaci. Kolagen typu III hraje důležitou roli, jelikož spojuje kontraktilní elementy sousedních myocytů dohromady. Výhodou kolagenu je to, že je vysoce biokompatibilní a biologicky odbouratelný. Na polymerní povrchy je kolagen inkorporován ponořením skafoldu do roztoku proteinu, kdy získáme vrstvy kolagenu fyzicky připojeného k povrchu polymeru (Tallawi et al., 2015). V experimentu Leszczak et al. byly lidské mikrovaskulární endoteliální buňky kultivovány na povrchu, který byl inkorporován kolagenem. Cílem bylo zjistit, zda budou buňky více adherovat k povrchu s kolagenem nebo bez něj. Výsledky ukázaly, že endoteliální buňky vykazují zvýšenou adherenci ke kolagenu, přičemž si zachovávají svůj *in vivo* fenotyp na nanostrukturovaných površích. Diferenční potenciál nanodrátkových povrchů, které byly imobilizované kolagenem, byl hodnocen pomocí imunobarvení a Western blottu pro klíčové endoteliální buněčné markery. Expres jedného z markerů po 14 dnech na nanostrukturovaných površích ukázala na více kontaktů mezi buňkami (Leszczak et al., 2015).

2.3.1.3 Fibronektin

Zásadní vliv na biologické procesy buněk má vysokomolekulární multifunkční glykoprotein nazývaný fibronektin (FN). FN je klíčovou složkou ECM, kdy je distribuován v mnoha tkáních a jde o potenciální ligand povrchových receptorů většiny typů buněk. Integriny jsou předními buněčnými povrchovými receptory a mnoho z nich váže FN. Tato interakce FN-integrin vede k mnoha biologickým procesům, jako je buněčná adheze, růst, migrace, proliferace a diferenciace (Lee et al., 2021). V experimentu Ai et al. bylo zjištěno, že potah povrchu hedvábného fibroinu (SF) želatinou a FN zlepšil jeho biologickou aktivitu a zvýšil buněčnou adhezi mezenchymálních kmenových buněk kostní dřene (Ai et al., 2021). Při použití FN s jiným proteinem ECM, například kolagenem, došlo díky správné koncentraci FN k usnadnění homogenní distribuce ve skafoldu. Přesněji byl poměr kolagenu I k fibronektinu 3:1 a poskytl nejúčinnější chemisorpci na 3D skafoldech. Tento poměr zajistil, že byl celkový obsah bílkovin, které lze naroubovat na skafold, nejvyšší a nejhomogennější, což vedlo ke zvýšení účinnosti buněčného výsevu a proliferace buněk linie hepatocelulárního karcinomu Huh-7.5 (Das et al., 2020).

3. SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA

Kultivační podmínky jsou pro buňky velmi důležité, jak už z hlediska růstu, přežití, tak jejich následného vývoje na biomateriálech, a proto i typ zvoleného média, popř. druh suplementů má vliv na úspěšné vytvoření náhradní tkáně na/v skafoldu.

Kultivační neboli růstové médium je jakýkoliv kapalný nebo pevný přípravek, vyrobený speciálně pro růst, skladování a transport mikroorganismů či buněk *in vitro*. Obsahuje jak anorganické, tak organické látky, které zajišťují buňkám výživu a vhodné podmínky pro růst. Například kultivační média používaná pro pěstování kmenových buněk jsou běžně doplňována zvířecím sérem pro podporu růstu, úspěšné udržování a diferenciaci buněk. Nejrozšířenější sérum, které je nyní považováno za globální růstové adjuvans, účinné pro téměř všechny typy buněk je fetální hovězí sérum (FBS), a to díky tomu, že představuje kombinaci většiny faktorů nezbytných pro uchycení a proliferaci buněk. Všestrannost FBS v různých aplikacích buněčných kultur je způsobena velmi nízkou hladinou protilátek a vysokou hladinou růstových faktorů. Nevýhodou FBS je absence přesného složení, sezonní a geografická variabilita mezi jednotlivými šaržemi, a to, že může dojít k ohrožení personálu nebo ke kontaminaci endotoxiny, mykoplazmaty, virovými kontaminanty nebo prionovými proteiny. Problémem se také stává otázka etiky, kdy jsou různé kontroverze týkající se metod odběru FBS z krve plodu skotu prostřednictvím uzavřeného systému odběru na jatkách. Mezi další používaná séra patří telecí sérum (CS) a koňské sérum (HoS), které je preferováno před CS. Alternativou FBS mohou být lyzáty lidských krevních destiček nebo chemicky definovaná média bez séra (Abdel Moniem et al., 2019; Freshney, 2016; van der Valk et al., 2018). Kultivační médium obsahuje sérum, aminokyseliny, vitamíny, soli, glukózu, organické látky, hormony, GF a antibiotika. Různé typy buněk vyžadují dle studií různý typ séra (Tab. 4).

Tab. 4: Výběr vhodného média dle typu buněk. FBS = fetální hovězí sérum, CS = telecí sérum, HoS = koňské sérum (upraveno a přeloženo z Freshney, 2016).

Buňky	Typ séra
Chondrocyty	FBS
Fibroblasty	CS
Gliové buňky	FBS
HeLa buňky	CS
Keratinocyty	FBS
Kosterní sval	FBS, HoS

3.1 Růstové faktory

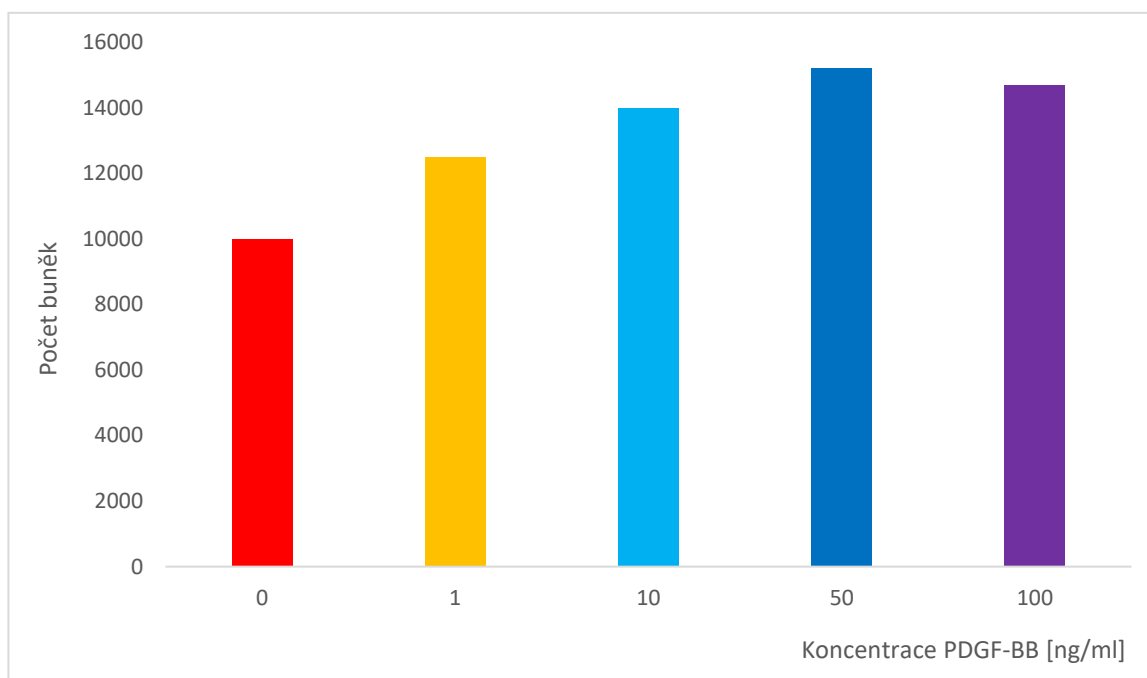
Jedná se o molekuly, proteiny nebo steroidní hormony, které se podílí na mezibuněčné signalizaci, a prostřednictvím příslušných receptorů ovlivňují buněčný metabolismus, stimulují buněčný růst, proliferaci a diferenciaci. Podílejí se na obnově tkání, ale také mohou stimulovat růst nádorových buněk. GF jsou produkovány různými typy buněk a můžeme je dělit dle místa účinku na autokrinní (působí na buňky, které je produkují), parakrinní (působí na okolní buňky) a endokrinní (cévním systémem jsou dopravovány k cílovým buňkám, na které působí). GF mohou být jak univerzální, tak specifické pro určité buňky, tkáň nebo stadia proliferace. Do GF řadíme také cytokiny a hormony. Jelikož je hlavním cílem TE napodobit fyziologické podmínky, mohou být za tímto účelem do kultivačního média přidány některé GF v určitých koncentracích. Diferenciaci na určitý buněčný typ, lze navodit suplementací specifickými GF, jak syntetického, tak přírodního původu. Mezi nejznámější GF patří růstový faktor odvozený od destiček (PDGF), epidermální růstový faktor (EGF), inzulínu podobné růstové faktory, erythropoetin a trombopoetin (Hefka Blahnova et al., 2020; Vokurka, 2012).

3.1.1 Růstový faktor odvozený od destiček

Tento dimerický glykoprotein je jeden z hlavních GF vyskytujících se v lidském séru a tkáních. Je odvozen od krevních destiček a hraje zásadní roli v regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a migraci. PDGF je produkován v megakaryocytech a následně skladován v krevních destičkách v α granulích. Nutné je ale zmínit i to, že je produkován i řadou dalších buněk, například makrofágy, fibroblasty nebo nádorovými buňkami. Z granulí krevních destiček je poté následně uvolněn při jejich aktivaci během procesu hemostáze. PDGF se skládá ze čtyř různých polypeptidových řetězců, tj. A, B, C a D. Tyto řetězce mohou sestavit čtyři homodimery (například PDFG-AA, PDFG-BB, PDFG-CC a PDFG-DD) a jeden heterodimer (například PDGF-AB). Nejvíce zastoupenými cirkulujícími izoformami PDGF u lidí jsou PDGF-BB, PDGF-AA a PDGF-AB. Mezi nimi je účinnějším ligandem PDGF-BB, který je známý jako silný mitogen, stimulující mezenchymální fenotyp různých buněk. Rozdíl mezi jednotlivými izoformami je v tom, že každá má jinou afinitu k receptorům. Izoformy PDGF-AA, PDGF-BB a PDGF-AB jsou již aktivovány intracelulárně, prostřednictvím proteáz podobným furinu, zatímco izoformy PDGF-CC a PDGF-DD jsou vylučovány jako neaktivní prekurzorové molekuly s N-koncovým CUB (tj. doména se strukturálním motivem přibližně 110 zbytků, které se nacházejí v proteinech asociovaných

s extracelulární a plazmatickou membránou), z nichž mnohé jsou vývojově regulovány (Wu et al., 2020). PDGF silně stimuluje proliferační a migrační potenciál cévních buněk hladkého svalstva, což má za následek zvýšenou proliferaci a migraci těchto buněk z média do intimy. Identifikace kandidátů, kteří mohou potlačit proliferaci a migraci těchto buněk zprostředkovanou PDGF, se považuje za dobrou strategii k prevenci nebo léčbě proliferativního vaskulárního onemocnění (Hwang et al., 2020).

V experimentu Mihaylova et al. se zkoumala role PDGF-BB v proliferaci, diferenciaci a udržování vlastností kmenových buněk v periodontálním vazivu *in vitro*. Buňky byly kultivované po dobu 48 hodin v médiu bez séra (přesněji v tzv. Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), které obsahovalo různé koncentrace PDGF-BB – přesněji 1, 10, 50 a 100 ng/ml. Při zkoumání rychlosti buněčné proliferace vyšlo najevo, že všechny koncentrace významně zvyšují rychlost proliferace s největším účinkem při 50 ng/ml (Obr. 11), tzn. PDGF-BB zvyšuje počet buněk v závislosti na dávce až do 50 ng/ml. Vyšlo najevo, že PDGF-BB je silný promotor buněčné proliferace, který zvyšuje expresi markerů (secernovaný protein kyselý a bohatý na cystein, zkráceně nazývaný SPARC) kmenových buněk, inhibuje produkci kolagenu a mineralizaci, a také urychluje zrání kolagenových řetězců prostřednictvím zvýšené aktivity lisyloxidázy (Mihaylova et al., 2018).



Obr. 11: Závislost počtu buněk na koncentraci PDGF-BB. PDGF-BB = růstový faktor odvozený od destiček (upraveno dle Mihaylova, 2018).

V jiné studii byla zkoumána exprese PDGF-AA v různých tkáních v procesu stárnutí, a to, zda dysregulované hladiny PDGF-AA ovlivnily proliferaci a funkci buněk u stárnoucích

myší. Buňky INS1 (linie odvozená od β buněk vylučujících inzulin) byly kultivovány v médiu RPMI-1640, doplněném 10% FBS, 0,2% bovinním albuminem a 2% penicilinem/streptomycinem. Takto kultivované buňky se následně přenesly do stárnoucí kostní dřeně myší, kde se pozorovala zvýšená sekrece inzulinu z ostrůvků. Myši ve skupině po transplantaci vykazovaly lepší odpověď na glukózovou zátěž a zvýšenou glukózovou toleranci. Výsledky naznačují, že PDGF-AA vylučovaný buňkami osteoblastové linie může zlepšit proliferaci a funkci pankreatických buněk, což může být v budoucnu potenciálně slibnou terapií pro omlazení stařeckých buněk a zlepšení stárnutí slinivky břišní (Liu et al., 2020).

3.1.2 Epidermální růstový faktor

Dalším nezbytným GF je EGF, což je protein sestavený z 53 aminokyselinových zbytků a tří intramolekulárních disulfidových můstků nacházející se v mnoha tělních tekutinách. Má důležitou roli v řadě biologických procesů, podporuje přežití buněk, jejich růst, proliferaci, diferenciaci, chemotaktickou migraci a inhibuje apoptózu. EGF je velmi důležitý ve zdravé epidermální homeostáze. V epidermis přispívá k hojení ran, reguluje bariérovou funkci, potlačuje terminální diferenciaci, způsobuje ztrátu adheze a indukuje sekretované proteázy. Váže se na svůj receptor (EGFR), který se nachází v membráně buněk. EGFR je glykoproteinový člen rodiny receptorových tyrosinkináz. EGF po navázání na EGFR způsobí dimerizaci receptoru a následnou aktivaci jeho cytoplazmatické kinázy. Aktivovaná kináza iniciuje několik signálních transdukčních kaskád proteinové fosforylace, což vede k aktivaci transkripčních faktorů, které regulují expresi mnoha genů. Mimo jiné se EGF podílí na vývoji lidského placentárního-trofoblastového mikroprostředí, a to mnoha způsoby, včetně proliferace trofoblastů, přežití, diferenciaci, invaze a migrace. Přidání EGF do kultivačního média má velké účinky na lidské myogenní buněčné kultury *in vitro*. Bylo prokázáno, že lidské myogenní buňky v médiu s EGF před naočkováním na skafold tvoří myobloky a svazky svalových vláken s vynikající kontraktilní funkcí v porovnání s buňkami, které byly kultivované v médiu bez EGF. Kvantitativní dopad růstových a diferenciacních médií obohacených o EGF na strukturu kosterního svalstva a kontraktilní funkce, musí být ještě probádán (Blumenberg, 2013; Jeong et al., 2013; Wroblewski et al., 2021).

3.2 Hormony

Mezi další látky, které můžeme přidat do kultivačního média či jimi nahradit sérum v médiích jsou hormony. Jsou to chemické látky vylučované žlázami s vnitřní sekrecí (endokrinními žlázami), transportované nejčastěji krví a jsou posly, kteří mají za úkol přenášet

informace od jedné tkáně ke druhé. Významným znakem hormonů je to, že stačí pouze malé množství k předání informace a vyvolání určité změny v organismu. Hormony můžeme dělit podle tří hledisek, tzn. dle chemické povahy, způsobu účinku a místa sekrece. Mezi hormony, které jsou používány jako náhrada séra patří růstový hormon (GH) o koncentraci 50 ng/ml a inzulín, který při koncentraci 1-10 U/ml zvyšuje účinnost ploten u řady typů buněk. Dalším hormonem je hydrokortizon, který zlepšuje klonování glia a fibroblastů, je nezbytný pro udržení epidermálních keratinocytů a dalších epiteliálních buněk. Různé kombinace estrogenu, androgenu nebo progesteronu s hydrokortizonem a prolaktinem o koncentraci okolo 10 nM se mohou ukázat jako nezbytné součásti media pro udržení epitelu mléčné žlázy (Freshney, 2016).

3.2.1 Folikulostimulační hormon

Folikulostimulační hormon (FSH), nazýván také jako folitropin, patří do skupiny lidských pohlavních hormonů vyskytujících se u obou pohlaví. Patří mezi tzv. gonadotropní hormony, což jsou hormony, které stimulují vývoj pohlavních orgánů u savců. Místem produkce je adenohipofýza, tj. přední lalok hypofýzy. Z chemického hlediska jde o glykoprotein, který je u žen klíčovým faktorem, jelikož stimuluje tvorbu estrogenu a podporuje vývoj folikulů od sekundárního folikulu po preovulační fázi – FSH je tedy silným a nezbytným regulátorem proliferace a diferenciaci granulózních buněk (Hoque et al., 2019). U mužů ve varletí je FSH důležitý na začátku spermatogeneze, tj. tvorba mužských pohlavních buněk, kdy je nezbytný pro diferenciaci zárodečných buněk. V Sertoliho buňkách FSH přímo aktivuje transkripci živin, hormonů, růstových a parakrinních faktorů, které jsou nezbytné pro spermatogenezi. Další funkcí FSH je inhibice apoptózy prostřednictvím vnější dráhy, stimulace buněčného cyklu a meiózy (Sá et al., 2012). Rekombinovaný FSH je rutinně používán pro řízenou ovariální hyperstimulaci během procedur asistované reprodukce, kdy mezi oblíbené patří folitropin alfa (Gonal-F) a folitropin beta (Puregon) (Chang et al., 2011).

V experimentu Sá et al. bylo cílem práce kvantifikovat časové a fázově specifické účinky FSH a testosteronu na proliferační kapacity lidského semenotvorného epitelu. Lidské semenotvorné tubuly byly odebrané od čtyř mužů ve věkovém rozmezí 28 až 35 let. Následně byly kultivované ve třech různých médiích: 1) kontrolní (médiu pro přípravu spermatu, SPM), 2) SPM s 50 IU/l FSH a 1 μ mol/l testosteronu (50/1) a 3) SPM s 500 IU/l FSH a 10 μ mol/l testosteronu (500/10). Kultury byly hodnoceny ve dnech 0, 7, 14 a 28. V médiu 50/1 se počet kulatých spermií snížil po 14. dni a průměrný počet prodloužených spermatid se během celé kultivace zvýšil bez ztráty. Na konci kultivace byl průměrný počet zárodečných

buněk pod hormonální suplementací vždy vyšší než u kontrol. Při porovnání mezi dvěma médii s hormony bylo dosaženo lepších výsledků u média 50/1, které poskytlo lepší výsledky ve vztahu k celkovému počtu zárodečných buněk. Výsledky ukázaly, že hormonální suplementace média umožnila udržení lidských semenotvorných kanálků po dobu jednoho měsíce bez jejich významné ztráty a zlepšila proliferační a diferenciační kapacitu buněk v porovnání s kontrolním médiem (Sá et al., 2012).

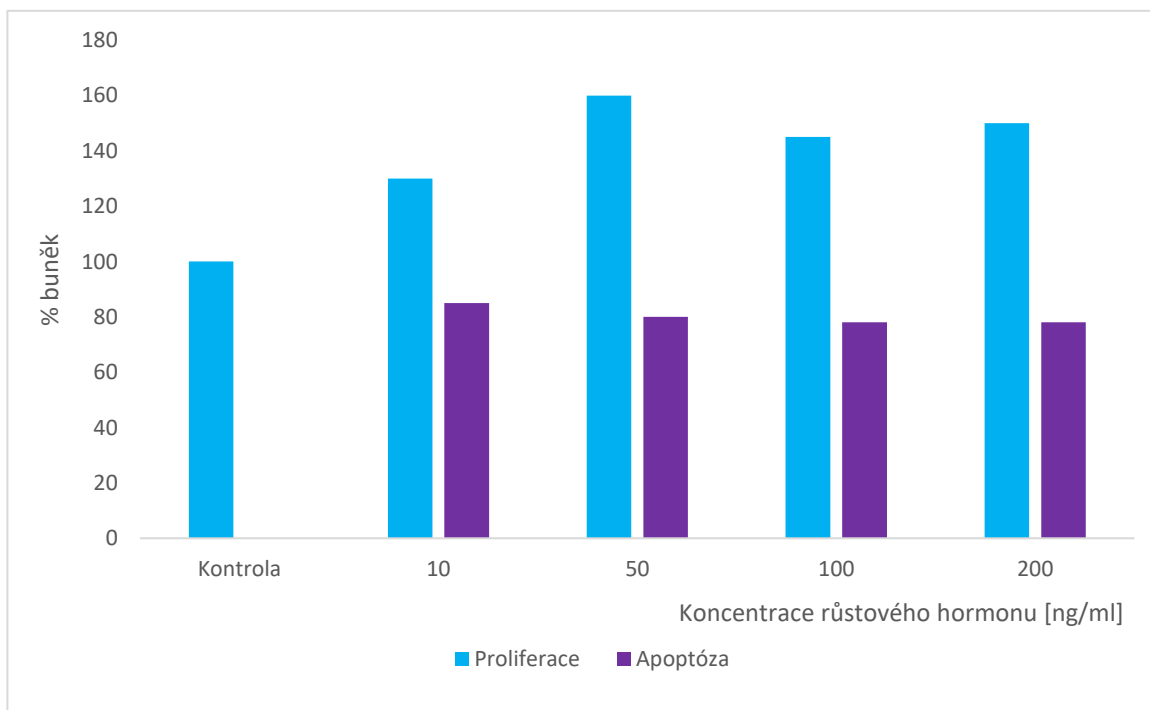
3.2.2 Růstový hormon

Růstový neboli somatotropní hormon (odkud druhá možná zkratka STH) je polypeptid, produkován somatotropními buňkami v přední hypofýze, který se podílí na růstu tkání a tělesném metabolismu. GH je také znám pro svou diabetogenní a antiinzulínovou aktivitu. Vyskytuje se ve fibroblastech, v různých buňkách vaskulární tkáně, včetně buněk hladkého svalstva a endoteliálních buňkách. V buňkách/tkáních působí GH jako mitogenní faktor, jenž uplatňuje své regulační funkce při řízení metabolismu, vyváženém růstu a diferenciaci buněk působením na specifické predimerizované receptory, vázané v plazmatické membráně. Vazba GH na receptor vede k aktivaci intracelulární Janus-kinázy 2, tato kináza aktivuje převaděč signálu a aktivátory transkripce-5 (známější pod zkratkou STAT-5), který po fosforylaci tyrosinu dimerizuje a vstupuje do jádra, aby reguloval transkripci genů specifických pro GH. Další důležitou funkcí GH je to, že ovlivňuje rozdělování živin, oxidaci, syntézu a distribuci jak bílkovin, tak sacharidů i tuků. Některé studie popsaly, že GH zvyšuje migraci lidských keratinocytů, napomáhá expresi inzulínu podobnému růstovému faktoru (známý jako IGF-1), podporuje fibroblasty lidské předkožky a stimuluje proliferaci fibroblastů *in vitro* (Ding et al., 2015; List et al., 2020; Messias de Lima et al., 2017).

Rekombinantní GH (rGH) byl schválen úřady ve Spojených státech k léčbě trpasličího vzrůstu a nedostatku GH u dospělých. rGH se používá jako tzv. off-label, kdy se léčebný přípravek použije způsobem, který není v souladu se souhrnem údajů o přípravku. rGH se používá pro urychlené hojení epidermálních ran spojených s operacemi a popáleninami. Nedostatek nebo nadbytek GH je spojen s endoteliální dysfunkcí. U dospělých pacientů s deficitem GH, u nichž byly popsány abnormality vaskulární funkce a její struktury, bylo po náhradě rGH pozorováno zlepšení endoteliální funkce a zvýšený počet cirkulujících endoteliálních progenitorových buněk. Léčba GH zvyšuje endoteliální uvolňování tkáňového aktivátoru plazminogenu v reakci na venózní okluzi, což má za následek zlepšení endoteliální fibrinolytické odpovědi. Myší modely odhalily působení GH, jak při opravě tkáně,

tak v mikrovaskulární cirkulaci normálních tkání (Ding et al., 2015; List et al., 2020; Messias de Lima et al., 2017).

Experiment Rak-Mardyła a Gregoraszcuk zkoumal, zda GH působí na progesteron, sekreci lidského choriového gonadotropinu v prvním trimestru těhotenství, buněčnou proliferaci a apoptózu. Použitá buněčná linie choriokarcinomu JEG-3 byla kultivována v DMEM médiu 24 hodin. Po této době bylo médium vyměněno za DMEM s přidavkem zvyšujících se dávek GH o koncentraci 10, 50, 100 a 200 ng/ml. Po 48 hodinách kultivace buněk bylo médium odebráno a byla stanovena koncentrace progesteronu a lidského choriového gonadotropinu. U buněk vystavených všem dávkám GH (10, 50, 100 a 200 ng/ml) byla buněčná proliferace zvýšená ve srovnání s kontrolními hladinami. Nejvíce zvýšená proliferace 1,6x byla u koncentrace 50 ng/ml (Obr. 12). GH měl také inhibiční účinek na buněčnou apoptózu. Sekrece progesteronu a lidského choriového gonadotropinu byla zvýšená (nejvyšší účinné dávky GH byly 10 a 50 ng/ml). Z výsledků vyplývá, že sekrece progesteronu, lidského choriového gonadotropinu a zvýšení buněčné proliferace bylo nejvíce u média, kde byl přidán GH o koncentraci 50 ng/ml. Tato zjištění poukazují na důležitou roli hypofyzárního GH v normální placentární funkci během prvního trimestru těhotenství (Rak-Mardyła a Gregoraszcuk, 2009).



Obr. 12: Vliv růstového hormonu na proliferaci a apoptózu buněk. Proliferace a apoptóza vyjádřena v procentech při různých koncentracích růstového hormonu ve srovnání s kontrolami (upraveno a přeloženo dle Rak-Mardyła a Gregoraszcuk, 2009).

4. ZÁVĚR

Tkáňové nosiče neboli skafoldy jsou nedílnou součástí tkáňového inženýrství. Využívá se tři typů buněk. Autologní buňky se jeví pro pacienta jako lepší volba, jelikož u nich hrozí nejmenší riziko imunologické reakce a odmítnutí tělem pacienta. Zatímco xenogenní a alogenní buňky jsou vhodnější z pohledu tkáňového inženýrství díky jejich rychlé dostupnosti. Zvolení vhodného materiálu skafoldu je důležitým faktorem pro regeneraci tkáně *in situ*. Přírodní materiály jsou výhodné díky jejich nízké toxicitě, malé imunitní odpovědi a degradaci na netoxické produkty. Mezi nejpoužívanější z nich patří kolagen, který kromě tkáňového inženýrství našel uplatnění především v otorinolaryngologii. Oproti tomu syntetické materiály, jako například polymery, mají výhodu v tom, že mohou být přesně vyrobeny dle potřeby buněk, a to s různými fyzikálními či chemickými vlastnostmi. Syntetické materiály jsou vhodnější pro tkáňové inženýrství, a to pro jejich nižší cenu a snadnou funkčnost.

Skafold se vyznačuje několika důležitými vlastnostmi. Biokompatibilita představuje jednu z vlastností, na kterou bude zaměřen výzkum i v budoucnu, především díky velkému významu pro pacienta, ve snaze omezit riziko při implantaci materiálu, který není snášen v biologickém prostředí a může vést k odmítnutí či vyvolání závažných nežádoucích účinků. Biodegradační materiál musí umožnit buňkám, aby jeho konstrukci nahradily svou extracelulární maticí, a přitom nesmí mít materiál při rozkladu toxické vedlejší produkty. Geometrie skafoldu musí co nejvíce odpovídat anatomickým vlastnostem tkáně a lze ji dosáhnout pomocí specializovaných programů, které umožní vytvoření rozsáhlých 2D nebo 3D modelů. Pórovitá struktura ovlivňuje především difuzi živin, buněčný růst, transport plynů a migraci buněk. Nejvhodnější velikost pórů se volí dle použitého materiálu a typu buněk, ač studie *in vitro* ukázaly, že většina buněk preferuje střední velikost pórů.

Zkoumanými úpravami povrchu byla smáčivost, drsnost povrchu a navázání biomolekul na povrch skafoldu. Vhodné smáčivosti, které jsou kvantifikovány pomocí kontaktního úhlu, lze dosáhnout pomocí ozařování plazmou, UV zářením či ionty. Jako nejvhodnější se jeví ozařování pomocí UV, jelikož došlo k největšímu snížení kontaktního úhlu vody na povrchu materiálu, čímž se vytvořil hydrofilní povrch, který podpořil proliferaci buněk. Povrchové drsnosti se dá dosáhnout mnoha způsoby. Jedním z nich bylo leptání kyselinami, jako lepší se jevío leptání kyselinou sírovou, a to díky jednoduchosti, rychlosti metody a malému množství použitého materiálu. 3D tisk je velmi oblíbenou a vyhledávanou metodou. Technika nazývaná modelování fúzních depozic patří mezi nejpoužívanější díky nízkým nákladům, rychlosti, výkonnosti a široké škále používaných

materiálů, kde se nejvíce používá kyselina polymléčná. Otryskávání se stalo v posledních desítkách let oblíbenou metodou obzvláště pro ošetření biomateriálů a biomedicínských implantátů. Jako nejúčinnější se ukázala metoda CoBlast, která je velmi jednoduchá, nízkonákladová a kombinuje dva procesy (tryskání a povlakování povrchu materiálu) v jednom. Buněčnou proliferaci také zlepšilo navázání bioaktivních molekul na povrch skafoldu. Mezi zmíněnými biomolekulami byly nízkonákladové peptidové sekvence, které budou mít do budoucna velký terapeutický potenciál a dva proteiny extracelulární matrix kolagen a fibronectin.

Kultivační médium obsahující fetální hovězí sérum patří, i přes etické problémy ohledně metod jeho odběru, k nejpoužívanějším ve tkáňovém inženýrství. Mezi další používaná séra patří telecí a často upřednostňované koňské sérum. Součástí kultivačního média jsou růstové faktory, které v určitých koncentracích dokážou napodobit fyziologické prostředí buněk *in vivo*. Rychlost proliferace při použití růstového faktoru odvozeného od destiček v koncentraci 50 ng/ml se ukázala jako nejvhodnější pro kultivaci kmenových buněk. Epidermální růstový faktor ukázal velký vliv na myogenní buňky s příznivými výsledky, ale kvantitativní dopad média na tyto buňky musí být ještě prozkoumán. Poslední částí této práce bylo ovlivnění proliferace pomocí hormonů, které mohou být přidány do média nebo mohou nahradit sérum v médiu. Folikulostimulační hormon se rutinně používá v procedurách asistované reprodukce, kde slouží k řízení ovariální hyperstimulaci. Experiment dokázal, že přidání tohoto hormonu do kultivačního média zlepšilo proliferační a diferenciací kapacitu buněk. Růstový hormon má význam pro růst tkání a tělesný metabolismus. *In vitro* studie ukázala, že koncentrace růstového faktoru 50 ng/ml nejvíce zvýšila buněčnou proliferaci, ale také produkci progesteronu a lidského choriového gonadotropinu.

Studium proliferace buněk na biokompatibilních materiálech bude do budoucna mít velký vliv na mnoho odvětví medicíny. Obzvláště v oblasti regenerativní medicíny, která bude moci u pacientů zlepšit kvalitu života, a to biokompatibilními materiály, které pomůžou k rychlejšímu hojení a nahrazení poškozené tkáně.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABDEL MONIEM, E. M., M. M. EL-BATRAN, A. M. HALAWA, et al. Optimizing a serum-free/xeno-free culture medium for culturing and promoting the proliferation of human dental pulp stem cells. *Stem Cell Investigation* [online]. 2019, **6**(15), 1-10. DOI:10.21037/sci.2019.06.05.
2. AI, Ch., L. LIU a J. C. GOH. Pore size modulates in vitro osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in fibronectin/gelatin coated silk fibroin scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2021, **124**, 1-12. DOI:10.1016/j.msec.2021.112088.
3. ALVES, P., S. PINTO, P. FERREIRA, et al. Improving cell adhesion: development of a biosensor for cell behaviour monitoring by surface grafting of sulfonic groups onto a thermoplastic polyurethane. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2014, **25**(8), 2017-2026. DOI:10.1007/s10856-014-5233-1.
4. AMANI, H., H. ARZAGHI, M. BAYANDORI, et al. Controlling Cell Behavior through the Design of Biomaterial Surfaces: A Focus on Surface Modification Techniques. *Advanced Materials Interfaces* [online]. 2019, **6**(13), 1-30. DOI:10.1002/admi.201900572.
5. ARIFVIANTO, B., M. MAHARDIKA, U. A. SALIM, et al. Comparison of Surface Characteristics of Medical-grade 316L Stainless Steel Processed by Sand-blasting, Slag Ball-blasting and Shot-blasting Treatments. *Journal of Engineering and Technological Sciences* [online]. 2020, **52**(1), 1-13. DOI:10.5614/j.eng.technol.sci.2020.52.1.1.
6. ASMATULU, R. Highly Hydrophilic Electrospun Polyacrylonitrile/Polyvinylpyrrolidone Nanofibers Incorporated with Gentamicin as Filter Medium for Dam Water and Wastewater Treatment. *Journal of Membrane and Separation Technology* [online]. 2016, **5**(2), 38-56. DOI:10.6000/1929-6037.2016.05.02.1.
7. BHUSHAN, B. a R. KUMAR. *Materials for Biomedical Engineering: Hydrogels and Polymer-based Scaffolds*. Netherlands (Amsterdam): Elsevier, 2019, 562 s. ISBN 9780128169018.
8. BLUMENBERG, M. Profiling and metaanalysis of epidermal keratinocytes responses to epidermal growth factor. *BMC Genomics* [online]. 2013, **14**(1), 1-25. DOI:10.1186/1471-2164-14-85.

9. BOURKOULA, A., V. CONSTANTOUDIS, D. KONTZIAMPASIS, et al. Roughness threshold for cell attachment and proliferation on plasma micro-nanotextured polymeric surfaces: the case of primary human skin fibroblasts and mouse immortalized 3T3 fibroblasts. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2016, **49**(30), 1-10. DOI:10.1088/0022-3727/49/30/304002.
10. CANULLO, L., T. GENOVA, M. RAKIC, et al. Effects of argon plasma treatment on the osteoconductivity of bone grafting materials. *Clinical Oral Investigations* [online]. 2020, **24**(8), 2611-2623. DOI:10.1007/s00784-019-03119-0.
11. DAS, P., M. D. DIVITO, J. A. WERTHEIM, et al. Collagen-I and fibronectin modified three-dimensional electrospun PLGA scaffolds for long-term in vitro maintenance of functional hepatocytes. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, **111**, 1-11. DOI:10.1016/j.msec.2020.110723.
12. DAVE, K. a V. G. GOMES. Interactions at scaffold interfaces: Effect of surface chemistry, structural attributes and bioaffinity. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **105**, 1–15. DOI:10.1016/j.msec.2019.110078.
13. DHANDAYUTHAPANI, B., Y. YOSHIDA, T. MAEKAWA, et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2011, **2011**, 1–19. DOI:10.1155/2011/290602.
14. DING, J., B. WIROSTKO a D. A. SULLIVAN. Human Growth Hormone Promotes Corneal Epithelial Cell Migration in Vitro. *Cornea* [online]. 2015, **34**(6), 686-692. DOI:10.1097/ICO.0000000000000418.
15. DRAGANOVSKÁ, D., G. IŽARÍKOVÁ, A. GUZANOVÁ, et al. General Regression Model for Predicting Surface Topography after Abrasive Blasting. *Metals* [online]. 2018, **8**(11), 1-21. DOI:10.3390/met8110938.
16. FENG, K., A. PINKAS-SARAFOVA, V. RICOTTA, et al. The influence of roughness on stem cell differentiation using 3D printed polylactic acid scaffolds. *Soft Matter* [online]. 2018, **14**(48), 9838-9846. DOI:10.1039/C8SM01797B.
17. FRESHNEY, R. I. CULTURE OF ANIMAL CELLS: A manual of basic technique and specialized applications. 7th edition. Canada: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-87365-6.
18. GINER, L., M. MERCADÉ, S. TORRENT, et al. Double acid etching treatment of dental implants for enhanced biological properties. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* [online]. 2018, **16**(2), 83-89. DOI:10.5301/jabfm.5000376.

19. GOMES, M. E. a R. L. REIS. Tissue Engineering: Key Elements and Some Trends. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2004, **4**(8), 737–742. DOI:10.1002/mabi.200400094.
20. HASEGAWA, M., J. SARUTA, M. HIROTA, et al. A Newly Created Meso-, Micro-, and Nano-Scale Rough Titanium Surface Promotes Bone-Implant Integration. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(3), 1-17. DOI:10.3390/ijms21030783.
21. HEFKA BLAHNOVA, V., J. DANKOVA, M. RAMPICHOVA, et al. Combinations of growth factors for human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Bone & Joint Research* [online]. 2020, **9**(7), 412-420. DOI:10.1302/2046-3758.97.BJR-2019-0183.R2.
22. HONG, M. a G. MENG. Laser Scanning Confocal Microscopy 3D Surface Metrology Applications. *Microscopy and Microanalysis* [online]. 2018, **24**(S1), 1140-1141. DOI:10.1017/S1431927618006189.
23. HONGRU, A., L. XIANGQIN, S. SHUYAN, et al. Measurement of Wenzel roughness factor by laser scanning confocal microscopy. *RSC Advances* [online]. 2017, **7**(12), 7052-7059. DOI:10.1039/C6RA26897H.
24. HOQUE, S. A. M., T. KAWAI, Z. ZHU, et al. Mitochondrial Protein Turnover Is Critical for Granulosa Cell Proliferation and Differentiation in Antral Follicles. *Journal of the Endocrine Society* [online]. 2019, **3**(2), 324-339. DOI:10.1210/js.2018-00329.
25. <https://biorender.com/> (11.11.2021)
26. HWANG, B., J. SONG, S. L. PARK, et al. Carnosine Impedes PDGF-Stimulated Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro and Sprout Outgrowth Ex Vivo. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(9), 1-18. DOI:10.3390/nu12092697.Bu.
27. HWANG, I., J. SOHN, Ch. JUNG, et al. Fabrication of Wettability-Patterned Surface for Cellular Micropatterning Using Step-Wise Ion Beam Processing. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2019, **19**(8), 4647-4650. DOI:10.1166/jnn.2019.16696.
28. CHANG, Ch., Y. HSIEH, K. HSU, et al. Effects of gonadotropins (Gonal-F and Puregon) on human endometrial cell proliferation in vitro. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2011, **50**(1), 42-47. DOI:10.1016/j.tjog.2009.08.003.

29. IORDACHE, F., G. A. ABRAHAM a S. AGRAWAL, et al. *Materials for Biomedical Engineering: Hydrogels and Polymer-based Scaffolds*. Netherlands (Amsterdam): Elsevier, 2019, 562 s. ISBN 9780128169018.
30. JANOUŠKOVÁ, O. Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering. *Physiological Research* [online]. 2018, **67**(2), 335–348. DOI:10.33549/physiolres.933983.
31. JEONG, W., J. KIM, F. W. BAZER, et al. Epidermal growth factor stimulates proliferation and migration of porcine trophectoderm cells through protooncogenic protein kinase 1 and extracellular-signal-regulated kinases 1/2 mitogen-activated protein kinase signal transduction cascades during early pregnancy. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2013, **381**(1-2), 302-311. DOI:10.1016/j.mce.2013.08.024.
32. KANEKO, S., Y. YAMAMOTO, K. WADA, et al. Ultraviolet irradiation improves the hydrophilicity and osteo-conduction of hydroxyapatite. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* [online]. 2020, **15**(1), 1-8. DOI:10.1186/s13018-020-01949-3.
33. KUNG, F., Y. KUO, O. GUNDUZ, et al. Dual RGD-immobilized poly(L-lactic acid) by atmospheric pressure plasma jet for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2019, **178**, 358-364. DOI:10.1016/j.colsurfb.2019.03.030.
34. LAI, Y., F. PAN, C. XU, et al. In Situ Surface-Modification-Induced Superhydrophobic Patterns with Reversible Wettability and Adhesion. *Advanced Materials* [online]. 2013, **25**(12), 1682-1686. DOI:10.1002/adma.201203797.
35. LAJČÍKOVÁ, A. a L. PEKÁREK. UV záření a jeho vliv na zdrav. *Hygiena*. Praha, 2009, **54**(2), 57-61.
36. LEE, E., K. AHMAD, S. PATHAK, et al. Identification of Novel FNIN2 and FNIN3 Fibronectin-Derived Peptides That Promote Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation in Primary Cells and Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(6), 1-17. DOI:10.3390/ijms22063042.
37. LECH, A., B. A. BUTRUK-RASZEJA, T. CIACH, et al. Surface Modification of PLLA, PTFE and PVDF with Extreme Ultraviolet (EUV) to Enhance Cell Adhesion. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(24), 1-22. DOI:10.3390/ijms21249679.

38. LESZCZAK, V., D. A. BASKETT a K. C. POPAT. Endothelial Cell Growth and Differentiation on Collagen-Immobilized Polycaprolactone Nanowire Surfaces. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, **11**(6), 1080-1092. DOI:10.1166/jbn.2015.2021.
39. LI, X., Z. XIAO, J.HAN, et al. Promotion of neuronal differentiation of neural progenitor cells by using EGFR antibody functionalized collagen scaffolds for spinal cord injury repair. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(21), 5107-5116. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.03.062.
40. LIAO, P., H. CHENG, Ch. HUANG, et al. The cell culture of titanium alloy surface modifications by micro-powder blasting and co-blast techniques. *Surface Engineering* [online]. 2018, **35**(7), 643-651. DOI:10.1080/02670844.2019.1587570.
41. LIST, E. O., D. E. BERRYMAN, R. BASU, et al. The Effects of 20-kDa Human Placental GH in Male and Female GH-deficient Mice: An Improved Human GH? *Endocrinology* [online]. 2020, **161**(8). DOI:10.1210/endocr/bqaa097.
42. LIU, L., T. ZHANG, Ch. LI, et al. Regulating surface roughness of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/ β -tricalcium phosphate fibers for enhancing bone tissue regeneration. *European Polymer Journal* [online]. 2021, **143**, 1-10. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2020.110201.
43. LIU, X., F. ZHANG, Y. CHAI, et al. The role of bone-derived PDGF-AA in age-related pancreatic β cell proliferation and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2020, **524**(1), 22-27. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.12.057.
44. LOH, Q. L. a C. CHOONG. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2013, **19**(6), 485–502. DOI:10.1089/ten.teb.2012.0437.
45. LU, Z., X. JIANG, X. ZUO, et al. Improvement of cytocompatibility of 3D-printing resins for endothelial cell adhesion. *RSC Advances* [online]. 2016, **6**(104), 102381-102388. DOI:10.1039/C6RA20700F.
46. MARRESE, M., V. GUARINO a L. AMBROSIO. Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2017, **8**(1), 1-20. DOI:10.3390/jfb8010007.
47. MEHTA, V., S. VILIKKATHALA SUDHAKARAN a S. N. RATH. Facile Route for 3D Printing of Transparent PETg-Based Hybrid Biomicrofluidic Devices Promoting Cell Adhesion. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2021, **7**(8), 3947-3963. DOI:10.1021/acsbmaterials.1c00633.

48. MESSIAS DE LIMA, C. F., M. D. DOS SANTOS REIS, F. W. DA SILVA RAMOS, et al. Growth hormone modulates in vitro endothelial cell migration and formation of capillary-like structures. *Cell Biology International* [online]. 2017, **41**(5), 577-584. DOI:10.1002/cbin.10747.
49. MIHAYLOVA, Z., R. TSIKANDELOVA, P. SANIMIROV, et al. Role of PDGF-BB in proliferation, differentiation and maintaining stem cell properties of PDL cells in vitro. *Archives of Oral Biology* [online]. 2018, **85**, 1-9. DOI:10.1016/j.archoralbio.2017.09.019.
50. NAAHIDI, S., M. JAFARI, M. LOGAN, et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2017, **35**(5), 530–544. DOI:10.1016/j.biotechadv.2017.05.006.
51. O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88–95. DOI:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
52. OLADAPO, B. I., S. O. ISMAIL, M. ZAHEDI, et al. 3D printing and morphological characterisation of polymeric composite scaffolds. *Engineering Structures* [online]. 2020, **216**, 1-11. DOI:10.1016/j.engstruct.2020.110752.
53. OLADOYE, A. M., J. G. CARTON a A. G. OLABI. Characterization of Graphite Coatings Produced by CoBlast™ Technology. *JOM* [online]. 2014, **66**(4), 602-607. DOI:10.1007/s11837-014-0941-z.
54. PIRES, L. A., C. R. DE MEIRA, C. K. TOKUHARA, et al. Wettability and pre-osteoblastic behavior evaluations of a dense bovine hydroxyapatite ceramics. *Journal of Oral Science* [online]. 2020, **62**(3), 259-264. DOI:10.2334/josnusd.19-0007.
55. RAK-MARDYŁA, A. a E. Ł. GREGORASZCZUK. Effect of pituitary growth hormone and insulin-like growth factor type-I on proliferation, apoptosis and hormone secretion of the placental cell line JEG-3. *Gynecological Endocrinology* [online]. 2009, **26**(4), 302-306. DOI:10.3109/09513591003592726.
56. ROSQVIST, E., E. NIEMELÄ, A. P. VENU, et al. Human dermal fibroblast proliferation controlled by surface roughness of two-component nanostructured latex polymer coatings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2019, **174**, 136-144. DOI:10.1016/j.colsurfb.2018.10.064.
57. SÁ, R., I. GRAÇA, J. SILVA, et al. Quantitative Analysis of Cellular Proliferation and Differentiation of the Human Seminiferous Epithelium In Vitro. *Reproductive Sciences* [online]. 2012, **19**(10), 1063-1074. DOI:10.1177/1933719112440746.

58. SACK, B. S., J. R. MAUNEY a C. R. ESTRADA. Silk Fibroin Scaffolds for Urologic Tissue Engineering. *Current Urology Reports* [online]. 2016, **17**(2), 1–17. DOI:10.1007/s11934-015-0567-x.
59. SELL, S. A., P. S. WOLFE, K. GARG, et al. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers* [online]. 2010, **2**(4), 522–553. DOI:10.3390/polym2040522.
60. SHANTHINI, G.M., C. A. MARTIN, N. SAKTHIVEL, et al. Physical and biological properties of the ion beam irradiated PMMA-based composite films. *Applied Surface Science* [online]. 2015, **329**, 116-126. DOI:10.1016/j.apsusc.2014.12.129.
61. SHPICHKA, A., D. BUTNARU, E. A. BEZRUKOV, et al. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. 2019, **10**(1), 1–16. DOI:10.1186/s13287-019-1203-3.
62. SILVA, T. S. N., D. C. MACHADO, Ch. VIEZZER, et al. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cirurgica Brasileira* [online]. 2009, **24**(3), 200-205. DOI:10.1590/S0102-86502009000300007.
63. SONDERMEIJER, H. P., P. WITKOWSKI, T. SEKI, et al. RGDfK-Peptide Modified Alginate Scaffold for Cell Transplantation and Cardiac Neovascularization. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2018, **24**(9-10), 740-751. DOI:10.1089/ten.tea.2017.0221.
64. SULTAN, F., N. V. JOSHI a V. RATHOD. In vitro Analysis of Surface Roughness Produced by an Air Polishing Device and Conventional Root Planing on Cementum: A Profilometric Study. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 2022, **26**(2), 110-116. DOI:10.4103/jisp.jisp_594_20.
65. SUNTORNNOND, R., J. AN a Ch. K. CHUA. Effect of gas plasma on polycaprolactone (PCL) membrane wettability and collagen type I immobilized for enhancing cell proliferation. *Materials Letters* [online]. 2016, **171**, 293-296. DOI:10.1016/j.matlet.2016.02.059.
66. TALLAWI, M., E. ROSELLINI, N. BARBANI, et al. Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2015, **12**(108), 1-24. DOI:10.1098/rsif.2015.0254.
67. TEFAMARIAM, B. Bioresorbable vascular scaffolds: Biodegradation, drug delivery and vascular remodeling. *Pharmacological Research* [online]. 2016, **107**, 163–171. DOI:10.1016/j.phrs.2016.03.020.

68. TURNBULL, G., J. CLARKE, F. PICARD, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* [online]. 2018, **3**(3), 278–314. DOI:10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
69. VAN DER VALK, J., K. BIEBACK, Ch. BUTA, et al. Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. *ALTEX* [online]. 2018, **35**(1), 99-118. DOI:10.14573/altex.1705101.
70. VATS, A., N. S. TOLLEY, J. M. POLAK, et al. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* [online]. 2003, **28**(3), 165–172. DOI:10.1046/j.1365-2273.2003.00686.x.
71. VERMA, D., M. S. DESAI, N. KULKARNI, et al. Characterization of surface charge and mechanical properties of chitosan/alginate based biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2011, **31**(8), 1741–1747. DOI:10.1016/j.msec.2011.08.005.
72. VOKURKA, M. Patofyziologie pro nelékařské směry [online]. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-802-4620-329. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=8TQ3BQAAQBAJ&pg=PA44&dq=r%C5%AFstov%C3%A9+faktery&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwi4-vPZ2on0AhUfR_EDHWW5BLoQ6AF6BAgKEAI#v=onepage&q=r%C5%AFstov%C3%A9%20faktery&f=false.
73. VU, V. T., G. OH, H. LIM, et al. Evaluation of Acid Etching on Surface Characteristics, Strength and Biological Response of Glass-Infiltrated Zirconia. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2018, **18**(3), 2223-2226. DOI:10.1166/jnn.2018.14973.
74. WOLF, M. T., Ch. L. DEARTH, S. B. SONNENBERG, et al. Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2015, **84**, 208–221. DOI:10.1016/j.addr.2014.08.011.
75. WROBLEWSKI, O. M., E. E. VEGA-SOTO, M. H. NGUYEN, et al. Impact of Human Epidermal Growth Factor on Tissue-Engineered Skeletal Muscle Structure and Function. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2021, **27**(17-18), 1151-1159. DOI:10.1089/ten.tea.2020.0255.
76. WU, K., H. TANG, R. LIN, et al. Endothelial platelet-derived growth factor-mediated activation of smooth muscle platelet-derived growth factor receptors in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation* [online]. 2020, **10**(3), 1-15. DOI:10.1177/2045894020948470.

77. YANG, D., J. XIAO, B. WANG, et al. The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **104**, 1–17. DOI:10.1016/j.msec.2019.109927.
78. YASUDA, K., Y. OKAZAKI, Y. ABE, et al. Effective UV/Ozone irradiation method for decontamination of hydroxyapatite surfaces. *Heliyon* [online]. 2017, **3**(8), 1-16. DOI:10.1016/j.heliyon.2017.e00372.
79. ZUNCHEDDU, D., E. DELLA BELLA, A. SCHWAB, et al. Quality control methods in musculoskeletal tissue engineering: from imaging to biosensors. *Bone Research* [online]. 2021, **9**(1), 1-22. DOI:10.1038/s41413-021-00167-9.