

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Karolína Opustilová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Buněčné nosiče  
Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Cell scaffolds  
Bachelor Thesis

2023

Karolína Opustilová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína Opustilová**  
Osobní číslo: **C19279**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Buněčné nosiče**  
Téma práce anglicky: **Cell Scaffolds**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma buněčné nosiče. V úvodní části bakalářské práce definujte pojem regenerativní medicína a uveďte jaké jsou její hlavní směry a cíle. Zvýšenou pozornost věnujte oblasti tkáňového inženýrství.
2. V hlavní části bakalářské práce definujte pojem buněčný nosič, resp. scaffold. Zaměřte se zejména na klasifikaci scaffoldů a charakterizujte materiály, ze kterých jsou vyráběny. Dále shrňte způsoby jejich výroby a popište vlastnosti ideálního biomateriálu pro jejich výrobu. Zvláštní pozornost věnujte procesu decelularizace a možnostem jejího použití v rámci tkáňového inženýrství. V závěrečné části práce se zaměřte na aktuální praktické využití buněčných scaffoldů a popište jejich nejčastější aplikace v rámci klinické a experimentální medicíny. Uveďte konkrétní příklady klinických studií.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavla Staňková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem „Buněčné nosiče“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 15.6. 2023

Karolína Opustilová

**Poděkování:**

Děkuji panu RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za ochotu, pomoc, a především odborné vedení při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a všem blízkým za jejich trpělivost a oporu, kterou mi poskytovali.

## **ANOTACE**

Tématem této bakalářské práce jsou buněčné nosiče. V úvodu jsou definovány pojmy, jako regenerativní medicína, tkáňové inženýrství a její hlavní směry a cíle. Hlavní část práce je věnována klasifikaci buněčných nosičů, možnostem jejich využití, popisu jejich vlastností, charakterizaci materiálů využívaných k jejich výrobě a dále také popisu konkrétních způsobů výroby některých z nich. Pozornost je také věnována procesu decelularizace se zmíněnými možnostmi použití v rámci tkáňového inženýrství. V závěrečné části práce jsou shrnuty konkrétní příklady nosičů, které jsou nejčastěji využívány v klinické a experimentální medicíně a jsou uvedeny konkrétní příklady klinických studií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Buněčný nosič, tkáňové inženýrství, decelularizace, polymery, *in vitro* studie

## **ANNOTATION**

The topic of this bachelor thesis is cell carriers. In the introductory part, terms such as regenerative medicine, tissue engineering and its main directions and goals are defined. The main part of the thesis is devoted to the classification of cell carriers, their possible applications, description of their properties, characterization of the materials used for their production and also description of specific methods of production of some of them. Particular attention is paid to the process of decellularization with the mentioned possibilities of application in tissue engineering. In the final part of the thesis, specific examples of carriers that are most commonly used in clinical and experimental medicine are summarized and specific examples of clinical studies are given.

## **KEYWORDS**

Cell scaffold, tissue engineering, decellularization, polymers, *in vitro* studies



## OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SEZNAM ILUSTRACÍ</b> .....                         | <b>11</b> |
| <b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK</b> .....                  | <b>12</b> |
| <b>ÚVOD</b> .....                                     | <b>13</b> |
| <b>1. Buněčné nosiče</b> .....                        | <b>14</b> |
| <b>2. Materiály pro výrobu buněčných nosičů</b> ..... | <b>17</b> |
| 2.1 Přírodní polymery .....                           | 17        |
| 2.1.1 Kolagen .....                                   | 18        |
| 2.1.2 Celulóza .....                                  | 18        |
| 2.1.3 Chitosan .....                                  | 19        |
| 2.1.4 Glykosaminoglykany .....                        | 20        |
| 2.1.5 Fibroin.....                                    | 21        |
| 2.1.6 Agaróza .....                                   | 22        |
| 2.1.7 Alginát .....                                   | 22        |
| 2.1.8 Škrob.....                                      | 23        |
| 2.2 Syntetické polymery .....                         | 23        |
| 2.2.1 Polykaprolakton .....                           | 24        |
| 2.2.2 Kyselina polymléčná .....                       | 25        |
| 2.2.3 Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové .....     | 25        |
| 2.2.4 Ostatní syntetické polymery .....               | 25        |
| 2.3 Degradované polymery .....                        | 26        |
| <b>3. Metody pro výrobu buněčných nosičů</b> .....    | <b>28</b> |
| 3.1 Tepelně indukovaná separace fází .....            | 28        |
| 3.2 Technika elektrostatického zvlákňování.....       | 28        |
| 3.3 Technika pění.....                                | 29        |
| 3.4 Biotisk.....                                      | 30        |
| 3.5 Modelování tavené depozice .....                  | 33        |
| 3.6 Selektivní laserové sintrování.....               | 34        |
| 3.7 Technologie lisování a vyluhování částic.....     | 36        |
| 3.8 Technologie vytlačování a vyluhování částic ..... | 37        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.9       | Technologie vstřikování a vyluhování částic.....                             | 38        |
| 3.10      | Stereolitografie.....  | 39        |
| 3.11      | Decelularizace.....  | 40        |
| <b>4.</b> | <b>Praktické aplikace buněčných nosičů .....</b>                             | <b>43</b> |
| 4.1       | Porézní nosiče pro regeneraci kostí .....                                    | 43        |
| 4.1.1     | Buněčné nosiče pro regeneraci kostní tkáně pomocí mezenchymálních buněk..... | 45        |
| 4.1.2     | Injekční a antibakteriální nosič fosforečnanu vápenatého .....               | 45        |
| 4.1.3     | 3D tisk porézních nosičů dvoufázového fosforečnanu vápenatého.....           | 46        |
| 4.2       | Buněčné nosiče sloužící k hojení ran.....                                    | 48        |
| 4.2.1     | Dvouvrstvý nosič pullulan-PHBV .....   | 48        |
| 4.2.2     | Kolagenový nosič vyztužený furfurem .....                                    | 50        |
| 4.3       | Studie využívající metodu decelularizace.....                                | 53        |
| 4.4       | Nosiče používané při léčbě rakoviny .....                                    | 56        |
|           | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>60</b> |
|           | <b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>   | <b>61</b> |

## SEZNAM ILUSTRACÍ

|   |    |
|---|----|
| <b>Obr. 1: Požadavky na multifunkční nosič</b> .....  | 15 |
| <b>Obr. 2: Porézní struktura nosičů</b> .....   | 16 |
| <b>Obr. 3: Vzorec chitosanu</b> .....   | 19 |
| <b>Obr.4: Vzorec hyaluronanu</b> .....  | 21 |
| <b>Obr. 5: Vzorec alginátu</b> .....  | 23 |
| <b>Obr.6: Vzorec polyuretanu</b> .....  | 26 |
| <b>Obr. 7: Schéma techniky pění</b> .....   | 29 |
| <b>Obr. 8: Schéma inkoustového biotisku</b> .....   | 31 |
| <b>Obr. 9: Schéma biotisku založeného na extruzi</b> .....                                  | 32 |
| <b>Obr. 10: Schéma laserového biotisku</b> .....  | 33 |
| <b>Obr. 11: Schéma metody modelování tavené depozice.</b> .....                             | 34 |
| <b>Obr. 12: Schéma metody selektivního laserového sintrování.</b> .....                     | 35 |
| <b>Obr. 13: Schéma technologie lisování a vyluhování částic</b> .....                       | 36 |
| <b>Obr. 14: Schéma technologie vytlačování a vyluhování částic</b> .....                    | 37 |
| <b>Obr. 15: Schéma technologie vstřikování a vyluhování částic</b> .....                    | 38 |
| <b>Obr. 16: Schéma stereolitografie</b> .....   | 39 |
| <b>Obr. 17: Decelularizace a následná recelularizace krysích jater</b> .....                | 42 |
| <b>Obr. 18: Stavba kosti</b> .....  | 43 |
| <b>Obr. 19: Průběh 3D tisku nosiče dvoufázového fosforečnanu vápenatého</b> .....           | 46 |
| <b>Obr. 20: Charakterizace potiskovatelnosti 3D tisku v kombinaci s PMMA složkami</b> ..... | 47 |
| <b>Obr. 21: Makromorfologie dvouvrstvého nosiče po elektrostatickém zvlákňování</b> .....   | 50 |
| <b>Obr. 22: Fotografie excizních ran samic potkanů Wistar</b> .....                         | 51 |
| <b>Obr. 23: Makroskopické snímky nativního kohoutího hřebene</b> .....                      | 52 |
| <b>Obr. 24: Ukázka barvení preparátu hematoxylinem a eosinem</b> .....                      | 52 |
| <b>Obr. 25: Ukázka toluidinového barvení</b> .....  | 53 |
| <b>Obr. 26: Decelularizace prasečího srdce</b> .....  | 54 |
| <b>Obr. 27: Decelularizace založená na použití detergentu dodecylsulfátu sodného</b> .....  | 55 |
| <b>Obr. 28: Schematické znázornění mechanismu nanovláknenného nosiče</b> .....              | 57 |
| <b>Obr. 29: Schéma přípravy nosiče z černého fosforu a želatiny</b> .....                   | 59 |

## **SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK**

|       |  |
|-------|--|
| CMC   | karboxymethylcelulóza                      |
| CPC   | cement fosforečnanu vápenatého             |
| CS    | chondroitin sulfát                         |
| DS    | dermatan sulfát                            |
| ECM   | extracelulární matrix                      |
| FSC   | kolagenový nosič vyztužený furfurem        |
| HA    | hyaluronan                                 |
| HEC   | hydroxyethylcelulóza                       |
| HS    | heparan sulfát                             |
| KS    | keratan sulfát                             |
| MSC   | mezenchymální buňky                        |
| PBS   | fosfátový pufr                             |
| PCL   | polykaprolakton                            |
| PVA   | polyvinylalkohol                           |
| PEG   | polyethylenglykol                          |
| PLGA  | polymléčná kyselina glykolová              |
| PGA   | kyselina polyglykolová                     |
| PLA   | kyselina polymléčná                        |
| iPSC  | indukovaná pluripotentní kmenová buňka     |
| PEI   | polyetherimid                              |
| PETIM | polyethylenimin                            |
| PHBV  | poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) |
| PUL   | pullulan                                   |
| SDS   | dodecylsulfát sodný                        |
| SEM   | rastrovací elektronová mikroskopie         |
| TIPS  | tepelně indukovaná separace fází           |

## ÚVOD

Regenerativní medicína je v současné době jedním z nejintenzivněji studovaných oborů medicíny. Jedná se o široký obor s potenciálem regenerovat a nahrazovat poškozené tkáně a orgány. Mezi hlavní strategie regenerativní medicíny se řadí buněčná terapie, jejíž cílem je injekce kmenových buněk k navození přímé regenerace a obnově tkání a orgánů. Dále se jedná o imunomodulační terapii, která zahrnuje využití biologicky aktivních molekul stimulujičích regeneraci tkání, a tkáňové inženýrství.

Oblast tkáňového inženýrství je založena především na aplikaci nosičů pro připojení a růst buněk tím, že navrhuje a vyrábí trojrozměrné matrice obsahující buňky, které mohou být implantovány do těla. Cílem je vytvořit funkční biologické náhražky poškozené tkáně, které budou sloužit k obnově a zachování nebo zlepšení funkce tkání či orgánů. Využívá živé buňky, biokompatibilní materiály a vhodné biochemické a fyzikální faktory k vytvoření tkáňových struktur, respektive nosičů. Tkáňové inženýrství čerpá odborné znalosti z různých oborů, jako je klinická medicína, genetika, biologie a další příbuzné obory.

V důsledku některých onemocnění nebo traumat může docházet ke značnému poškození či degeneraci tkáně, následky mohou být pro daného člověka i fatální. Například při konečném stádiu onemocnění ledvin je jediným řešitelným postupem léčby transplantace ledviny, přičemž se ledvina od dárce označuje jako aloštěp. Tato léčba je život zachraňující, avšak získávání aloštěpu je velmi bolestivé a bývá spojené s komplikacemi jako je infekce, sepse, hematom a může vést až k odmítnutí štěpu dárce. Tkáňové inženýrství si klade za cíl vyřešit tento problém regenerací poškozené tkáně namísto jejího nahrazení, čehož lze dosáhnout vývojem biologických náhrad.

Pro regeneraci poškozených tkání používá tkáňové inženýrství porézní nosiče konstruované s využitím biomateriálů, které působí jako buněčná matrice a podpurná struktura. Při navrhování nosičů je kladen důraz na napodobení tkáně, kterou mají nahradit. Nosič slouží jako provizorní alternativa pro extracelulární matrix používanou v tkáňovém inženýrství a poskytuje dočasnou strukturální podporu tkáně, ale také fyzické prostředí pro růst buněk. Mechanické vlastnosti, vnitřní architektura, topografie a materiál nosiče má velký vliv na růst buněk, proto je třeba při výrobě nosiče vzít tyto parametry v úvahu.

## 1. Buněčné nosiče

Dle některých zdrojů je tkáňové inženýrství definováno jako pochopení principu růstu tkání a jejich použití k výrobě nových tkání pro klinické využití, respektive jako obor zahrnující vývoj umělého implantátu nebo podporu remodelace tkání za účelem opravy nebo zlepšení funkce tkání a orgánů. V praxi tento termín označuje postup, při kterém se používají materiály, buňky, růstové faktory nebo jiné bioaktivní molekuly k opravě a regeneraci poškozené tkáně. V souvislosti s termínem tkáňové inženýrství je zmiňován také termín regenerativní medicína, a to zejména v případech, hovoří-li se o buněčné terapii a použití kmenových buněk.

Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína využívají buněčné nosiče jako základní technologii, jelikož poskytují „substrát“ pro buňky. Ten buňkám slouží k navázání, proliferaci, diferenciaci a organizaci do tkáně (Hasanzadeh et. al., 2022).

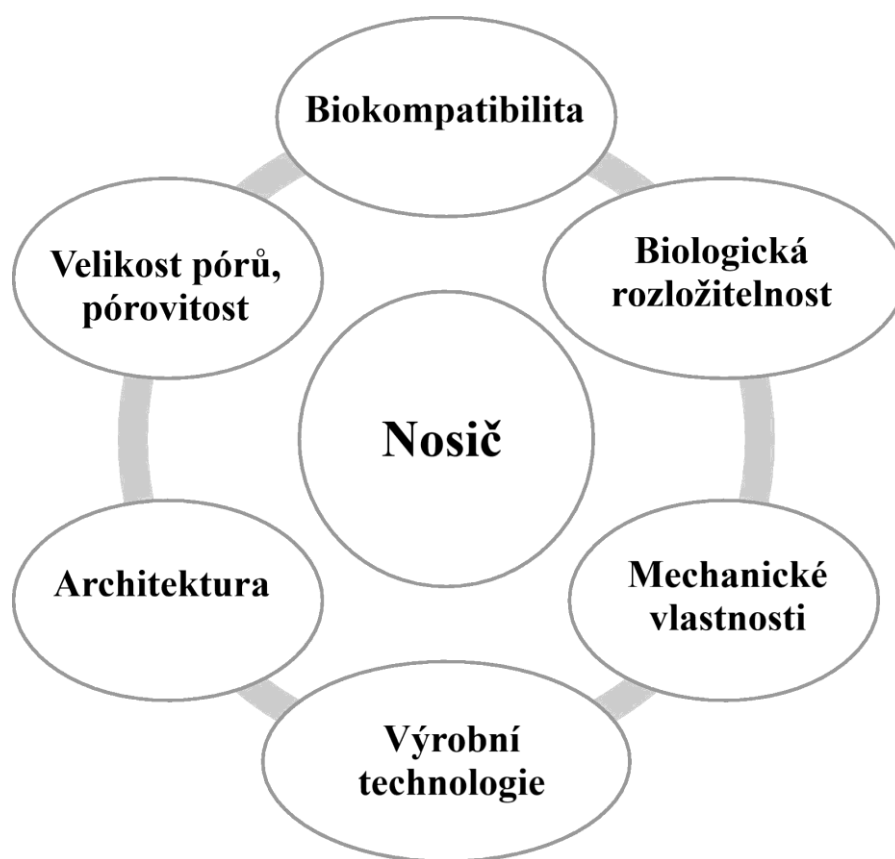
Tkáně mají různé struktury a vlastnosti, které by měl nově vytvořený nosič napodobovat. Lze říct, že by měl nahrazovat poškozenou nebo chybějící extracelulární matrix (ECM). Produkty tkáňového inženýrství jsou navrženy tak, aby napodobovaly reakce a architekturu tkáně. Představují prostor, který má tkáň k dispozici pro vývoj a podporu růstu buněk (Carletti et al., 2011).

Buněčný nosič je trojrozměrný materiál vyrobený do požadovaného tvaru a velikosti, ke kterému se přidávají buňky. Tento porézní 3D biomateriál je využíván jako šablona pro tvorbu tkáně. Nosiče jsou osázeny buňkami, kterým jsou následně dány růstové faktory nebo biofyzikální stimulační podpory podporující buněčný růst. Biofyzikální stimulační podpory probíhají prostřednictvím bioreaktorů, což je zařízení nebo systém poskytující buňkám různé mechanické nebo chemické podněty. Dále jsou nosiče kultivovány *in vitro*, a poté implantovány do zraněného místa *in vivo*, kde dochází k regeneraci tkáně pomocí vlastních biologických a biochemických mechanismů těla (Taneja et al., 2022).

Nejdůležitějším kritériem buněčných nosičů je biokompatibilita, která umožňuje buňkám přilnout, migrovat a proliferovat bez pozitivní imunitní odpovědi a závažné zánětlivé reakce, ke které by mohlo docházet vlivem cizího materiálu, ze kterého by byly nosiče tvořeny (Hasanzadeh et. al., 2022). Pokud by materiál nosiče vyvolal zánětlivou reakci, tak dochází k odmítnutí implantátu (Litowczenko et al., 2021). Dalším základním kritériem je biologická rozložitelnost, vzájemná propojenost, životnost a pórovitost nosičů (Hasanzadeh et. al., 2022).

Nosiče by měly podporovat normální fungování buněk a tkání. Nejintenzivněji studovaná je materiálová cytotoxicita, která je určena lýzou buněk vedoucí k apoptóze nebo inhibici buněčné proliferace. Nosiče by v ideálním případě neměly vykazovat žádné známky cytotoxického působení. Dalším sledovaným parametrem je genotoxicita, zejména související s destrukcí DNA, chromozomálními aberacemi, genovými mutacemi a s tím související karcinogenitou (Litowczenko et al., 2021).

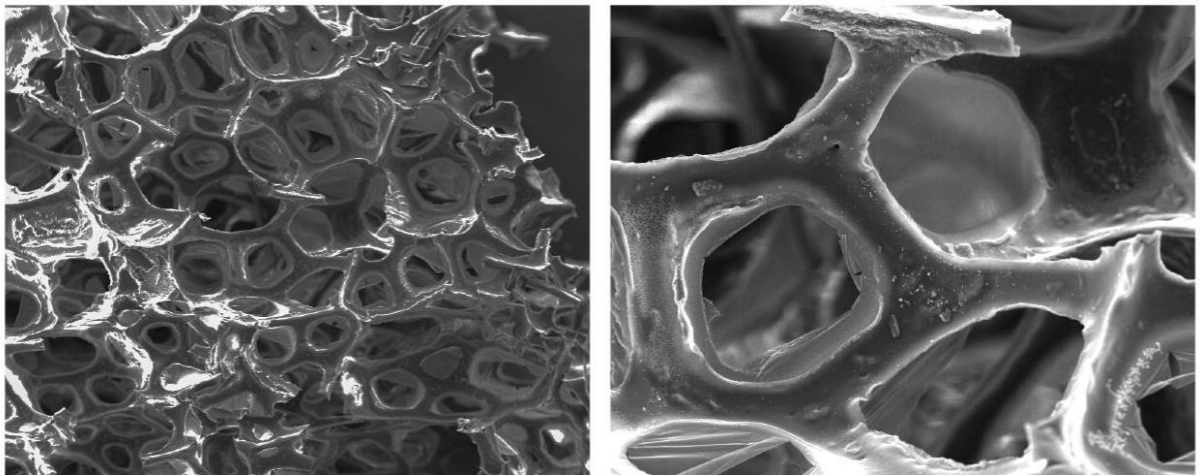
Buněčné nosiče by měly splňovat řadu parametrů a vlastností, mezi které patří drsnost povrchu, optimální hydrofobnost nebo hydrofilita, žádoucí porézní struktura a sterilizovatelnost (viz. obr. č. 1). Nosiče by měly mít mechanické vlastnosti a rychlost biologického rozkladu podobnou příslušné tkáni, aby napodobovaly mechanickou odezvu a růst dané tkáně (Hasanzadeh et al., 2022). Můžeme si je představit jako 3D síť, která napodobuje buněčné prostředí a zachovává strukturu regenerované tkáně (Abbasi et al., 2020).



**Obr. 1: Požadavky na multifunkční nosič** (upraveno dle Litowczenko et al., 2021).

Nosiče by měly v těle fungovat jako zařízení schopná podporovat a případně vyvolat komplexní sled událostí, jejichž konečným cílem je oprava a obnovení funkce tkáně. Kromě toho by měly být vyráběny pomocí reprodukovatelných, kontrolovaných a nákladově efektivních procesů (Carletti et al., 2011).

Pórovitost, jejíž příklad je znázorněn na obrázku 2, je jednou z klíčových vlastností buněčných nosičů, protože usnadňuje migraci buněk do nosičů, rozptyl živin a metabolických odpadních produktů a zlepšuje interakci mezi nosičem a okolními tkáněmi (Hasanzadeh et. al., 2022). Zároveň představuje základní charakteristiku při migraci buněk a vaskularizaci materiálu. Čím větší je dostupný povrch, tím větší množství buněk je k dispozici při buněčné interakci. Mikroporozita je důležitá zejména pro kapilární prorůstání a interakce mezi buňkami a matricí, zatímco makroporozita je důležitá pro přísun živin a odstraňování odpadních látek z metabolických pochodů. Optimální pórovitost je úzce spjata s typem tkáně, různorodá architektura tkáně může být spojena s odlišným mikroprostředím, ve kterém se tkáně nacházejí. Rozměry buněk, jejich buněčnou aktivitu, fenotypovou expresi a produkci ECM je třeba při navrhování nosiče brát v potaz (Carletti et al., 2011).



**Obr. 2: Porézní struktura nosičů;** A) porézní struktura nosiče se zvětšením 5000x, B) detail porézní struktury, zvětšení 12000x (Yang et al., 2019).



## 2. Materiály pro výrobu buněčných nosičů

Existuje mnoho materiálů používaných k výrobě nosičů, nejoblíbenějšími materiály jsou však polymery. Polymery lze rozdělit do dvou skupin na přírodní a syntetické, které lze dále rozdělit na biologicky odbouratelné a nerozložitelné. Použití konkrétního typu polymeru a jeho složení závisí na cílové aplikaci (Litowczenko et al., 2021). Přírodní polymery, mezi které patří například kolagen, chitosan, alginát a fibrin, jsou hydrofilní a mají relativně nízké mechanické vlastnosti. Syntetické polymery (polylaktid, polyglykolid, polykaprolakton) mají na rozdíl od přírodních polymerů vynikající mechanické a biologické vlastnosti, avšak pomalou rychlost degradace. Biokompatibilní a biologicky rozložitelné polymery by měly být zváženy pro aplikace, kde je biodegradace implantátu důležitým kritériem. Rychlost odbourávání je velmi důležitá a měla by být v korelaci s rychlostí růstu nové tkáně. Obecně lze získat lepší vlastnosti polymerů jejich kombinací, resp. mísením. V lidském těle takto funguje například lidská kost, která je složena z kolagenu a apatitu, čímž získává svou pevnost (Hasanzadeh et al., 2022).

### 2.1 Přírodní polymery

Jednou z hlavních složek nosičů jsou přírodní polymery, jejichž hlavní hmotnostní složkou je voda (Taneja et al., 2022). Využívají se díky své biokompatibilitě, biodegradaci, minimální imunitní reakci a z důvodu lepší provázanosti s různými typy buněk (Badekila et al., 2020). Přírodní polymery mohou být klasifikovány jako polysacharidy (chitosan, celulóza, alginát, chitin, kyselina hyaluronová) a proteiny (kolagen, fibrin, elastin, hedvábí, keratin, aktin, myozin). Největší výhodou nosičů vyrobených z přírodních zdrojů je téměř dokonalé napodobení ECM. Vzhledem ke svému přirozenému původu mají přírodní polymery tendenci být vysoce bioaktivní, což podporuje adhezi a růst buněk. Nosiče jsou šetrné k životnímu prostředí, což je další z výhod jejich použití. Materiály lidského a zvířecího původu však představují vážné riziko potenciálních onemocnění, navíc většina přírodních polymerů vykazuje špatné mechanické vlastnosti a rychlou degradaci (Litowczenko et al., 2021). Polymery lze klasifikovat na základě původu, rozložitelnosti, metod zesíťování a reakce na podněty (Taneja et al., 2022).

Polymerní materiály, jako je kolagen, fibrin, fibroin, glykosaminoglykany (GAG), chitosan, algináty a škrob, mohou být přímo extrahovány z rostlin, zvířat a lidských tkání (Carletti et al., 2011). Jedním z nejvýznamnějších přírodních nosičů je např. chitosanový nosič, který se využívá pro aplikaci do lidské rohovky při léčbě slepoty nebo tzv. „špenátový nosič“ vyrobený z decelularizovaných listů špenátu, využívaný k regeneraci srdce.

Aplikace přírodních nosičů má určité výhody, jejich širokému uplatnění však brání vysoké výrobní náklady, časová náročnost, omezená dostupnost přírodních zdrojů, nízké mechanické vlastnosti a etické kodexy. Proto je mnohem častěji využívána aplikace syntetických nosičů (Badekila et al., 2020).

### **2.1.1 Kolagen**

Příkladem běžně používaného přírodního materiálu je kolagen, což je vláknitý protein s dlouhou, pevnou šroubovicovou strukturou, jejíž hlavní úlohou je poskytovat mechanickou podporu pojivových tkání a zajišťovat distribuci buněk a tvorbu kapilár. Existují tři typy kolagenu – typ I, běžně se vyskytující v kůži a kostech, typ II, vyskytující se v chrupavce a typ III, který nalezneme ve stěně cév (Carletti et al., 2011). Kolagen je nejhojnější molekula ECM, která se nachází u všech savců a tvoří asi 30 % proteinové hmoty mnohobuněčných organismů (Taneja et al., 2022).

Kolagenové nosiče jsou vhodné při regeneraci cévních stěn, šlach, kostí, rohovky, vazů, kožní tkáně, pro léčbu popálenin a regeneraci periferních nervů (Carletti et al., 2011). Vzhledem k relativně slabým mechanickým vlastnostem a rychlé degradaci má kolagen omezené použití v 3D tisku (Taneja et al., 2022).

### **2.1.2 Celulóza**

Celulózu lze najít ve stromech, rostlinách, ovoci, biologickém odpadu apod. Celulóza a její deriváty, které jsou biokompatibilní a vysoce odbouratelné, mají vysoký potenciál pro tvorbu nosičů. Při výrobě nosičů je třeba vzít v úvahu její nerozpustnost ve vodě a mnoha organických rozpouštědlech, proto jsou využívány spíše její ve vodě rozpustné deriváty, např. hydroxyethylcelulóza (HEC) a karboxymethylcelulóza (CMC). K rozpouštění celulózy jsou využívány např. NaOH/močovina, NaOH/thiomočovina a iontové kapaliny, které jsou však vysoce nákladné a neekologické. Výzkumné týmy však neustále pracují na vývoji spolehlivého a ekologického rozpouštění celulózy, aby mohla být hojně využívána (Taneja et al., 2022).

Jedním z nejvyužívanějších přírodních polymerů je bakteriální celulóza (BC) produkovaná bakterií *Acetobacter Xylinum*, která je používána jako nosič pro regeneraci chrupavky. Syntéza BC se provádí fermentací a k regeneraci chrupavky se využívají roztavené voskové částice, na které se vysazují novorozenecké buňky. Studie prokázaly, že BC je vhodná pro výrobu nosičů, jelikož umožňuje přichycení a proliferaci eukaryotických buněk *in vitro*,

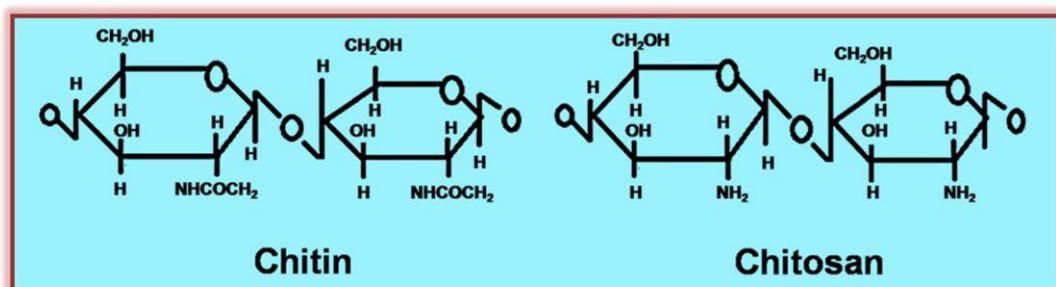
podobně jako nosiče z amyloidních vláken. Ty jsou vyrobené působením biofilmu, který je tvořen bakterie *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus subtilis* (Badekila et al., 2020).

### 2.1.3 Chitosan

Chitosan je polysacharid odvozený z částečné deacetylace chitinu, který se vyskytuje ve skeletu korýšů a hmyzu (Ingle et al., 2022). Jedná se o lineární polysacharid složený z  $\beta$ -1,4-glukosaminu a D-glukosaminu s náhodně rozptýlenými N-acetyl-glykosaminovými skupinami (obr. 3) (Carletti et al., 2011). Je jedním z nejhojnějších polysacharidů dostupných v přírodě a je využíván díky své biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti, antimikrobiální aktivitě, schopnosti hojit rány a hemostatické aktivitě. Kromě toho má tento polysacharid antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a výbornou afinitu k mnoha molekulám (Leite et al., 2022; Yan et al., 2022).

Chitosan může podléhat degradaci enzymy, jako je například lysozym (Carletti et al., 2011). Má široké uplatnění v potravinářství, zemědělství, medicíně a úpravě vody. Je nerozpustný ve vodě, což omezuje jeho antibakteriální aktivitu, která je ovlivněna faktory jako je pH, povrch a koncentrace bakterií (Yan et al., 2022). Surový chitosan je rozpustný pouze v roztocích zředěných kyselin, což silně omezuje jeho použití, stejně jako nízká mechanická pevnost, nízká tepelná odolnost a nízká adsorpční selektivita (Qu & Luo, 2020).

Chitosanové gely mohou být vytvářeny buď iontovou vazbou, nebo zesíťováním za použití zesíťovacích látek, jako je např. glutaraldehyd. Chitosan lze tvarovat do membrán nebo 3D struktur, bývá použit při regeneraci kostní tkáně a k uchycení a růstu chondrocytů (Carletti et al., 2011).



Obr. 3: Vzorec chitosanu (Ingle et al., 2022).

#### 2.1.4 Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou glykoproteiny, které jsou široce zastoupeny v organismu (Carletti et al., 2011). Někdy bývají nazývány jako mukopolysacharidy, vzhledem k tomu, že byly původně nalezeny a studovány na sliznicích a slizničních exsudátech. Tvoří součást skupiny proteoglykanů a představují heterogenní třídu vysoce polárních polysacharidů, které se vážou na proteiny přítomné v lidských a zvířecích tkáních, lze je najít v různých lidských i zvířecích tekutinách, jako je např. synoviální tekutina (Braun et al., 2021).

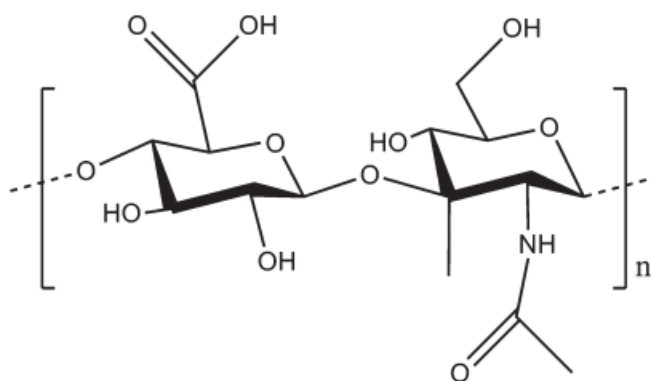
GAG jsou dlouhé, nerozvětvené řetězce skládající se z disacharidových jednotek obsahující karboxylové nebo sulfátové skupiny. Tyto funkční skupiny přemostují a spojují kolagen za vzniku sítě extracelulární matrix (Carletti et al., 2011). Vznikají střídavým navazováním uronových kyselin a aminokyselin pomocí glykosidické vazby, některé podjednotky jsou modifikovány sulfatací. GAG tvoří jeden z nejhojnějších heteropolysacharidů v těle (Braun et al., 2021). Jsou klíčovými hráči v mnoha biologických procesech v ECM, vytvářejí totiž interakce s proteinovými cíli jako jsou cytokiny, růstové faktory a kolagen. Narušení molekulárních mechanismů řízených GAG má za následek rakovinu, Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu a abnormality regenerace tkání (Kogut et al., 2022). Vzhledem k jejich vysoké polaritě silně přitahují vodu, obvykle mají gelovitou konzistenci a často hrají důležitou roli v organismu jako lubrikant nebo „tlumič nárazů“, např. u kloubní chrupavky. Vysoká viskozita GAG je doprovázena nízkou stlačitelností, čímž se vyznačují jako ideální molekuly sloužící jako mazací kapalina v kloubech. Obecně lze rozlišit pět hlavních tříd GAG v pojivových tkáních – heparan sulfát (HS), chondroitin sulfát (CS), dermatan sulfát (DS), keratan sulfát (KS) a hyaluronan (HA) (Braun et al., 2021).

Pro většinu GAG, s výjimkou hyaluronanu, je pro funkci těchto strukturně extrémně heterogenních polysacharidů nezbytná značná hladina sulfatace. Dynamický proces sulfatace je řízen třídou specifických enzymů známých jako sulfotransferázy a probíhá během a po syntéze GAG v Golgiho aparátu, následován dalším jemným doladěním extracelulárními desulfatázami. Sulfatace se vyskytuje na různých pozicích glykanového řetězce a vede k zapojení interakcí buňka-buňka a buňka-ECM, kdy změny v tomto „sulfatačním kódu“ způsobují širokou škálu patologických stavů (Ennemoser et al., 2022).

Mezi nejhojnější GAG patří CS, který je spojován především s bílkovinami za vzniku proteoglykanů, je hlavní složkou ECM a v těle jej nalezneme v chrupavkách, hrudní a kortikální kosti a v srdečních chlopních. Ztráta CS z chrupavek je hlavní příčinou

osteoartrózy. KS je obvykle spojen s proteintvornými proteoglykany, nalezneme jej v chrupkách rohovky, kostí, kloubů a meziobratlových plotének. DS je též známý jako chondroitin sulfát B, který je přítomen v kůži, cévách, erytrocytech, srdečních chlopních, šlachách a plicích. Důležitou roli má v procesu koagulace a jeho nadměrná akumulace v mitrální chlopni může způsobit její kolaps. HS, vyskytující se v bazálních membránách buněk, obsahuje více acetylovaného glukosaminu než heparin. Váže četné ligandy, jako jsou fibroblastové růstové faktory, vaskulární endoteliální růstový faktor a růstový faktor hepatocytů a chrání všechny růstové faktory před degradací (Braun et al., 2021).

Jediný nesulfatovaný GAG, fungující jako lubrikant, je HA, který umožňuje sorpci a zadržování vody, podílí se na osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk a reguluje remodelaci tkání (Braun et al., 2021). HA je aniontový glykosaminoglykan, který se přirozeně vyskytuje ve tkáních savců, váže velké množství vody a vytváří vodíkové vazby (obr. 4) s rozpouštědlem (Carletti et al., 2011). Od roku 1976 se používá při operaci očí, v pozdějších letech se injekce kyseliny hyaluronové začaly využívat při léčbě osteoartrózy kolenních kloubů, hyaluronanové gely k prevenci pooperačních srůstů. Deriváty kyseliny hyaluronové se využívají jako nosiče pro růst chondrocytů, regeneraci kostí a kožní tkáň. Kyselina hyaluronová se získává z přírodních zdrojů, nebo se vyrábí mikrobiální fermentací a lze ji poměrně snadno izolovat a modifikovat (Carletti et al., 2011).



**Obr.4: Vzorec hyaluronanu** (Carletti et al., 2011).

### 2.1.5 Fibroin

Fibroin je nerozpustná bílkovina ze skupiny skleroproteinů tj. fibrilárních bílkovin, tvořící chemickou podstatu vlákna přírodního hedvábí (Carletti et al., 2011). Hedvábí je jedním z nejsilnějších přírodních vláken, které produkuje bourec morušový, a skládá se ze dvou hlavních proteinů – fibroinu a sericinu (Maia et al., 2022). Vzhledem k zánětlivému procesu a alergickým reakcím, které způsobují sericiny, tj. bílkoviny pokrývající vnitřní stěnu vlákna,

se vlákna promývají ve vodném roztoku (Carletti et al., 2011). Přírodní hedvábí je ponořeno do vroucí vody a solí nebo detergentů, čímž dojde k odstranění sericinu a získání čistého fibroinu (Maia et al., 2022).

Materiály z fibroinu vykazují dobrou biokompatibilitu a jsou schopny podporovat růst lidských buněk (Carletti et al., 2011). Kromě toho tento protein vykazuje vynikající odolnost proti deformaci, vynikající zlomové napětí, dostatečnou pružnost a mechanickou pevnost, což z něj činí vhodný materiál pro nosné aplikace, jako jsou např. chirurgické sítky, šicí materiály apod. V současné době se pracuje na vývoji hedvábných nosičů pro aplikace v ortopedii (Maia et al., 2022).

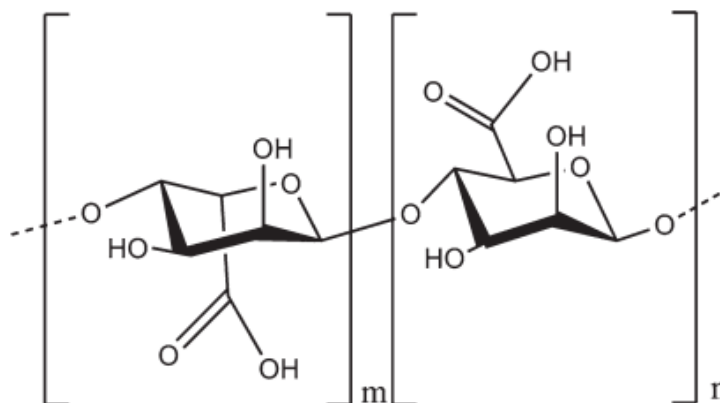
### **2.1.6 Agaróza**

Agaróza je lineární polysacharid získávaný z červených mořských řas s opakující se jednotkou obsahující jak  $\alpha$ , tak i  $\beta$ -glykosidické vazby. Za běžných podmínek ( $\text{pH} > 3$ ) je poměrně chemicky stabilní (Zucca et al., 2016). Je široce používaná v různých oblastech biomedicínského výzkumu, díky vysokému množství hydroxylových skupin je velmi dobře rozpustná ve vodě. Agaróza podléhá enzymatické degradaci, čímž se zásadně mění její pevnost, odolnost a propustnost (Carletti et al., 2011). V kombinaci s jinými látkami, jako je chitosan, kolagen, fibrin apod., se používá k výrobě různých lékařských biomateriálů, např. vysoce makroporézní kostní nosič byl navržen pomocí chitosan-agarózy vyztužené nanohydroxyapatitem pro podporu připojení a růstu buněk (Wang et al., 2022). V tkáňovém inženýrství se využívá zejména z důvodu podpory růstu buněk a regenerace chrupavky (Carletti et al., 2011).

### **2.1.7 Alginát**

Alginát je přírodní polysacharid získávaný z buněčné stěny hnědých řas, který je, stejně jako agaróza, velmi dobře rozpustný ve vodě. Jedná se o polyaniont složený ze dvou opakujících se monomerů  $\beta$ -D-manuronátu a  $\alpha$ -L-guluronátu, viz. obr. 5 (Carletti et al., 2011). Alginát je široce používán při výrobě hydrogelových nosičů, jedná se o biologicky odbouratelný a biokompatibilní polysacharid, který se díky multivalentnímu kationtovému přenosu může přeměnit na gel. Postrádá místa připojení buněk, což omezuje jeho buněčnou aktivitu a adhezi. Adherence může být zvýšena přidáním peptidů, tzv. adhezních peptidů, pro rozpoznávání buněk (např. tripeptid Arg-Gly-Asp) (Taneja et al., 2022). Alginát má výborné zahušťovací a gelotvorné vlastnosti a je široce využíván pro různé průmyslové účely. Vlákna získaná z alginátu jsou používána při léčbě ran díky jejich biokompatibilitě a schopnosti

zadržovat vodu. Díky jejich interakci s kovem, pektinem a dalšími chemickými skupinami je využíván pro tvorbu antibakteriálních vláken a různých typů funkčních kompozitů (Silva et al., 2022). Je široce využíván pro regeneraci kostní tkáně díky podobné struktuře jako kostní extracelulární matrix, snadno se kříží s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (Snyder & Jana, 2022).



**Obr. 5: Vzorec alginátu** (Carletti et al., 2011).

### 2.1.8 Škrob

Škrob je polysacharid složený z glukózových jednotek spojených glykosidickými vazbami, lze ho získat z přírodních zdrojů jako je kukuřice, rýže a jiné obiloviny (Carletti et al., 2011). Regeneruje se z  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  fotosyntézou v rostlinách (Prasopdee et al., 2021). Skládá se ze dvou typů molekul – amylozy a amylopektinu. Polymery na bázi škrobu jsou považovány za velmi vhodné biomateriály, zejména díky jejich biokompatibilitě a rozložitelnosti. Kromě toho jsou relativně levné a dostupné. Používají se v kombinaci s různými přísadami, výztužnými materiály nebo ve směsi s jinými polymery k výrobě kompozitních materiálů, nebo jako hydrogely pro podávání léčiv (Carletti et al., 2011).

## 2.2 Syntetické polymery

Syntetické nosiče jsou vhodně navrženy tak, aby zvyšovaly biokompatibilitu a podporovaly přirozené funkce buněk. Využívají se častěji než přírodní nosiče díky vysoké univerzálnosti, reprodukovatelnosti a dobré zpracovatelnosti, neboť je lze zpracovávat snadněji než přírodní polymery (Carletti et al., 2011). Hlavní výhodou syntetických polymerů jsou jejich vynikající mechanické vlastnosti, jako je viskozita, pevnost, rozpustnost a kontrolovatelná degradace. Existuje mnoho příkladů syntetických polymerů s vodivými a piezoelektrickými vlastnostmi, což je činí velmi atraktivními v elektricky citlivých tkáních jako jsou nervy a srdeční svalovina. Další z výhod některých polymerů jsou termoplastické vlastnosti, díky nimž se snadněji vyrábějí (Litowczenko et al., 2021). Nevýhodou je, že oproti přírodním

materiálům jsou méně biokompatibilní a nejsou bioaktivní (Carletti et al., 2011). Další nevýhodou je nedostatek míst vazajících buňky kvůli jejich hydrofobicitě a možnost vyvolání dlouhodobé toxicity způsobující zánět vlivem polymerních degradačních produktů. Pro zlepšení biologických vlastností mohou být nosiče obohaceny o bioaktivní signální molekuly, obvykle to mohou být adhezivní peptidy, proteiny ECM, růstové faktory, cytokiny nebo hormony (Litowczenko et al., 2021). Syntetické nosiče se připravují ve formě a jejich degradační vlastnosti jsou regulovány změnou složení polymerů. Mezi syntetické polymery patří PCL (polykaprolakton), PVA (polyvinylalkohol), PEG (polyethylenglykol) a PLGA (polymléčná kyselina glykolová) (Badekila et al., 2020).

Polykyselina glykolová (PGA), a kyselina polymléčná (PLA) jsou široce známé bioabsorbovatelné syntetické polymery, které jsou úspěšně používány ve tkáňovém inženýrství k transplantaci buněk a regeneraci různých tkání. Tyto lineární alifatické polyestery se rozkládají hydrolyzou, rychlost rozkladu závisí na struktuře, počáteční molekulové hmotnosti, velikosti povrchu, stupni krystalinity, aplikovaného napětí a množství zbytkového monomeru. Označujeme je jako termoplastické polymery, lze je totiž snadno tvarovat pomocí standardního zpracování jako je lisování, vytlačování apod. PLA, PGA a jejich kopolymery se často kombinují s keramickými materiály, jako je např. bioaktivní sklo, nebo hydroxyapatitem, čímž vznikají nosiče podporující regeneraci kostí (Carletti et al., 2011).

### **2.2.1 Polykaprolakton**

PCL patří mezi biologicky odbouratelné polymery, je složen z hexanoátových jednotek a vyrábí se polymerací  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Je velmi důležitým materiálem pro přípravu biomimetických scaffoldů, protože umožňuje difúzi živin, likvidaci odpadních látek a je vysoce propustný pro různé povrchové agens (Badekila et al., 2020). Je snadno modifikovatelný a vyrobitelný, má dobrou rozpustnost v organických rozpouštědlech, kontrolovatelnou rychlost odbourávání, je biokompatibilní, má dobré mechanické a termoplastické vlastnosti a brání adhezi buněk (Litowczenko et al., 2021; Maia et al., 2022). Má menší rychlost degradace (2 roky) díky hydrofobní povaze polymeru, což omezuje jeho použití v případech, kdy je požadovaná rychlá regenerace tkáně, na druhou stranu je vhodným kandidátem pro dlouhodobá implantační zařízení. Rychlost degradace lze katalyzovat působením enzymů, např. lipázami (Carletti et al., 2011).



Používá se při regeneraci Achillovy šlachy nebo při léčbě tracheální stenózy, jelikož je pevnost v tahu vyrobeného scaffoldu srovnatelná s lidskou průdušnicí a je biokompatibilní *in vivo*. Další možností využití je kombinace PCL s protinádorovým léčivem doxorubicinem, kdy dochází k prodloužení aktivity uvolňování léku proti epidermoidnímu karcinomu prsu a rakoviny děložního čípku (Badekila et al., 2020).

### **2.2.2 Kyselina polymléčná**

PLA je termoplastický alifatický polyester tvořený polymerací laktidu s kovovými katalyzátory (např. oktoát cínu ve vodném roztoku). Polylaktidový roztok je transformován spřádáním na vlákna, ze kterých následně dochází k výrobě nosiče. PLA se používá k vývoji kostního nosiče, který se podílí na vnitřní fixaci zlomenin kostí a snižuje bakteriální kolonizaci v popáleninách (Badekila et al., 2020). Tento syntetický polymer je biokompatibilní a biologicky odbouratelný, odvozený od přírodní organické kyseliny mléčné (Maia et al., 2022). Nevýhodou je nedostatek biologické aktivity, nízká adheze buněk, biologická inertnost, vedlejší produkty degradace kyseliny, riziko zánětu, nízká pórovitost a rychlost odbourávání (Litowczenko et al., 2021).

### **2.2.3 Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové**

PLGA je termoplastický alifatický polyester vytvořený polymerací laktidu pomocí kovových katalyzátorů (oktoát cíničitý ve vodném roztoku). Roztok polylaktidu se převádí zvlákňováním do vláken pro následnou výrobu scaffoldů. PLGA se využívá k vývoji kostního klipu, který se zavádí při fixaci zlomenin nebo ke snížení bakteriální infekce při popáleninách. Polykondenzací kyseliny glykolové vzniká termoplastický polymer PGA, který se vyrábí pomocí plynové pěny a je využíván v dentálních implantátech při léčbě paradentózy (Badekila et al., 2020).

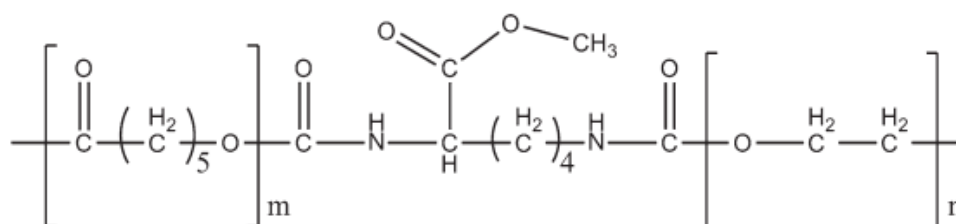
### **2.2.4 Ostatní syntetické polymery**

Polyethylenglykol (PEG) je jeden z nejpoužívanějších syntetických polymerů ve tkáňovém inženýrství. Vzniká polymerací etylenoxidu nebo ethylenglykolu ve vodném roztoku, je biologicky nerozložitelný a ve tkáňovém inženýrství se používá jako biologicky odbouratelný materiál díky schopnosti odpuzovat vodu a proteiny. PEG nosiče jsou hojně používány díky svým ohybovým mechanickým vlastnostem (Badekila et al., 2020).

Polyvinylalkohol (PVA) byl široce zkoumán a je považován za jeden z nejvhodnějších materiálů pro biomedicínské aplikace kvůli jeho netoxicitě, biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti. Za správných podmínek se polyvinylalcoholový nosič (PVA) může

autonomně „samoléčit“, tedy vykazovat silnou samoregenerační kapacitu i mechanickou pevnost (Taneja et al., 2022). Na rozdíl od ostatních polymerů není PVA vyráběn polymerací odpovídajícího monomeru, neboť je vinylalkohol nestabilní. Při výrobě tedy nejprve dochází k polymeraci vinyacetátu, až poté k polymeraci PVA. Scaffolds vyráběné z PVA mají hojně využití v oblasti srdečního tkáňového inženýrství, jsou biokompatibilní pro proliferaci lidských iPSC a podílí se na regeneraci rohovkových buněk (Badekila et al., 2020).

Polyuretany zahrnují širokou skupinu polymerů, které v polymerním řetězci obsahují uretan (obr. 6). Vznikají reakcí mezi diisokyanátem a polyolem, vzniká blokový kopolymer, ve kterém se pružné segmenty s nízkou teplotou skelného přechodu kombinují s tvrdými segmenty. V biomedicínských aplikacích jsou velmi žádané hlavně díky vynikajícím fyzikálním vlastnostem a biokompatibilitě. Poprvé byly využity na počátku 50. let 20. století v prsních implantátech a kardiostimulátorech, využívají se v olověných izolátorech, katétrech, při aplikaci umělých srdečních chlopní, regeneraci myokardu a cévní tkáně (Carletti et al., 2011).



**Obr.6: Vzorec polyuretanu** (Carletti et al., 2011).

### 2.3 Degradované polymery

Degradované polymery byly poprvé využity na počátku 50. let 20. století k výrobě chirurgických nití, dnes jsou již hojně využívány v medicíně. Kromě resorbovatelných chirurgických stehů jsou tyto polymery využívány jako nosiče pro řízené uvolňování léků, jako dočasné protézy (např. kostní čepy) a v posledním desetiletí jako materiály pro výrobu šroubů. Termín „biologická degradace“ označuje postupný rozklad materiálu, který je zprostředkovaný činností buněk nebo tkání. Biologicky degradované materiály se rozkládají po implantaci v těle nezávisle na mechanismu rozkladu, všechny produkty biodegradace jsou metabolizovány a vyloučeny z těla. Degradací chování biomateriálů se řídí několika mechanismy a je regulováno mnoha faktory. Pochopení kinetiky a mechanismu degradace je velmi důležité k tomu, aby bylo vhodně určeno místo jejich použití. Zejména v aplikaci

pro podávání léčiv je důležitý rozklad podle přesně definovaného mechanismu tak, aby se uvolnila zapouzdřená nebo navázaná léčiva a látky specifickou a požadovanou rychlostí (Carletti et al., 2011).

### **3. Metody pro výrobu buněčných nosičů**

Pro výrobu nosičů je využíváno několik metod, jako je např. elektrospinning (ELSP), techniky separace fází, biologické vyluhování, rychlé prototypování (RP) nebo technika pění apod. Tyto techniky mají důležité uplatnění v tkáňovém inženýrství, biomedicínském a biologickém výzkumu (Badekila et al., 2020).

Biologicky odbouratelné polymerní implantáty se často vyrábějí na bázi taveniny metodou vytlačování nebo vstřikování. Při výrobě bývají tyto metody kombinovány s jinými technikami, aby bylo dosaženo správné pórovitosti nosiče. Mezi výhody technologií na bázi taveniny patří rychlá výroba bez použití rozpouštědla, výroba nosičů různých tvarů a velikosti pouhou změnou geometrie formy a využití různých přísad, jako jsou například keramické částice a bioaktivní molekuly sloužící ke zlepšení mechanických vlastností (Hasanzadeh et al., 2022).

#### **3.1 Tepelně indukovaná separace fází**

Principem této metody je nalití horkého roztoku polymeru do vhodné formy (odlitek) a následné ochlazení, čímž vzniká skelet. Touto technikou vznikají vzájemně propojené porézní struktury. TIPS (tepelně indukovaná separace fází) technika při výrobě nosičů není však příliš vhodná kvůli složité výrobě, náhodnému zvyšování teploty a tím způsobené degradaci materiálu. Nejvýznamnější nosič vyrobený metodou TIPS je PEI-PETIM (polyetherimid-polyethylenimin), který by v budoucnu mohl být vhodný k hojení ran. Aplikace TIPS techniky však není příliš populární kvůli náhodnému zvyšování teploty při výrobě, což je problematické zejména z pohledu tepelné citlivosti buněk (Badekila et al., 2020).

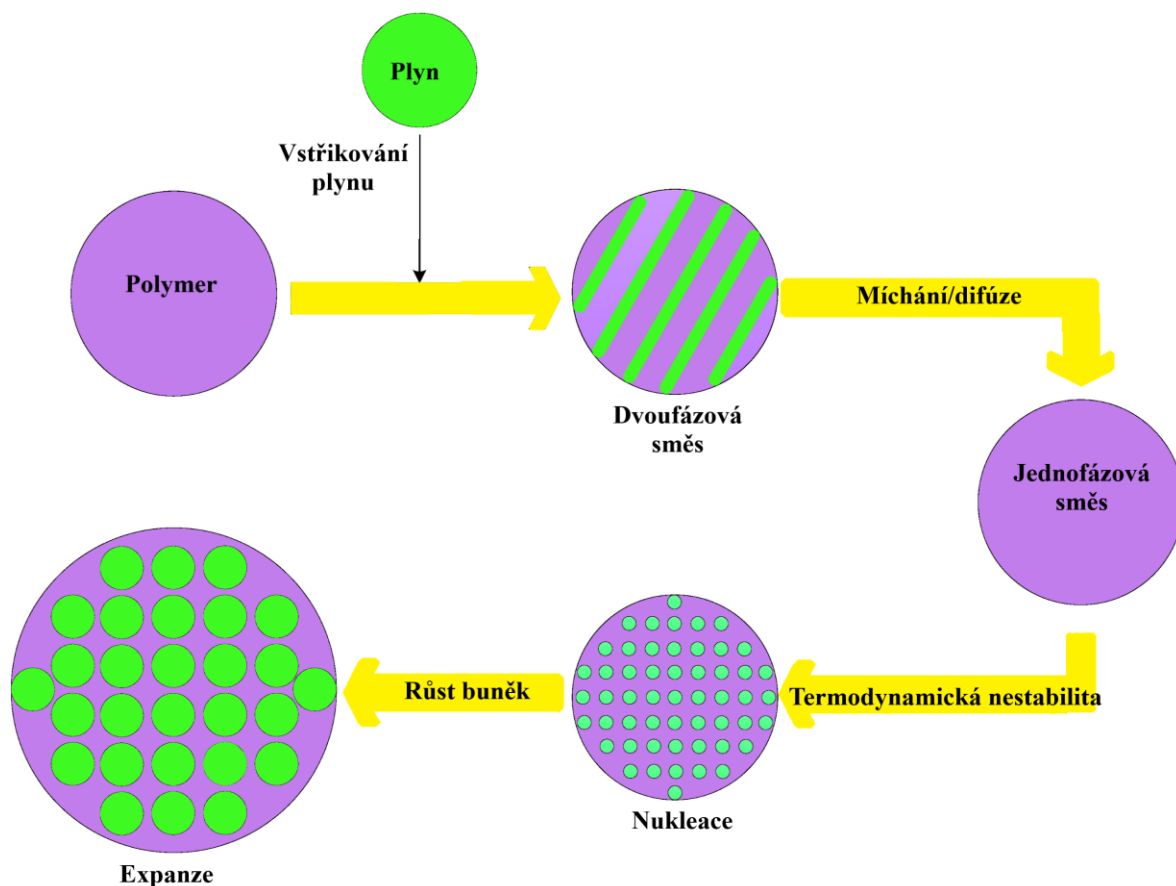
#### **3.2 Technika elektrostatického zvlákňování**

Technika elektrostatického zvlákňování zahrnuje výrobu ultratenkých vláken elektrickým nabíjením suspendované kapičky polymerního roztoku mezi kovovou tryskou a kolektorem, vlákno se sestavuje na kolektoru ukládáním netkané textilie (Badekila et al., 2021). Potenciál této techniky závisí na vnitřních vlastnostech roztoku, jako je koncentrace polymeru, viskozita nebo vodivost, kontrole výrobních parametrů (tj. napětí, průtok, vzdálenost mezi tryskou a kolektorem) a podmínkách prostředí, tj. teplota a vlhkost (Polonio-Alcalá et al., 2022). Touto technikou lze vyrobit nosiče s optimální pórovitostí, která je žádoucí pro proliferaci a růst buněk. Při hojení ran umožňuje tato technologie snadnou povrchovou modifikaci nanovláken a začlenění biomolekul potřebných pro správné hojení rány. Studie

dokazuje, že příprava methakrylátového roztoku kyseliny hyaluronové pomocí techniky elektrostatického zvlákňování ke generování biochemických podnětů je důležitá pro kultivaci lidských mezenchymálních buněk (Badekila et al., 2021).

### 3.3 Technika pěnění

Výroba polymerních nosičů technikou pěnění se provádí kombinací pevné a kapalné fáze za vzniku pěnové struktury, která umožňuje růst buněk. Při vysoké teplotě a tlaku se plyn ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ) rozpouští v tavenině, která jej zachycuje a dochází ke vzniku pěny (Badekila et al., 2021). Schéma této techniky je znázorněno na obrázku 7.



**Obr. 7: Schéma techniky pěnění;** Plyn se při vysokém tlaku a teplotě rozpouští v tavenině, která jej zachycuje a dochází ke vzniku pěny. Požadovaná nukleace je iniciována poklesem tlaku v důsledku smrštění nebo otevření formy, ve které je nosič vyráběn (upraveno dle Hasanzadeh et al., 2022).

Plyn potřebný k pěnění je zajištěn nadouvadly. Rozlišujeme dva typy nadouvadla, fyzikální a chemická, kdy fyzikální nadouvadla jsou plynné materiály ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ) přímo vstříkované do polymerní taveniny, chemická nadouvadla představují pevné materiály, které jsou distribuovány v polymerní matici. V momentě, kdy dojde k nárůstu teploty, uvolní se plyn potřebný pro proces pěnění (Hasanzadeh et al., 2022).

Jednou z nejvyužívanějších metod je vstřikování pěny, které je rozděleno na nízkotlaké a vysokotlaké. Při nízkotlakém vstřikování pěny se do formy vstříkuje v krátkých intervalech jednofázová směs polymeru a plynu. Pěnění nastává v momentě, kdy tavenina vstoupí do formy a dojde k náhlému poklesu tlaku, v důsledku čehož dochází k naplnění prázdné části formy. Při vysokotlakém vstřikování se do formy vstříkuje celý objem směsi polymeru a plynu najednou, dochází k rozpadu bublin, které se rozpouští v tavenině působením vysokého tlaku. Požadovaná nukleace je iniciována poklesem tlaku v důsledku smrštění nebo otevření formy (Hasanzadeh et al., 2022).

### **3.4 Biotisk**

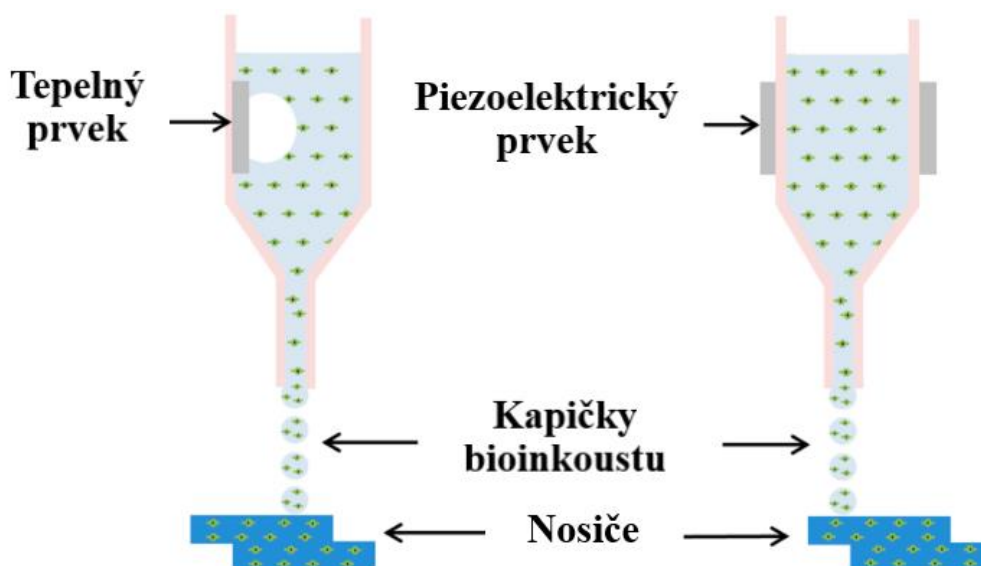
Biotisk je nově vznikající obor regenerativní medicíny. Je definován jako tisk struktur pomocí životaschopných buněk, biomateriálů a biologických molekul. Musí vyrábět nosiče s vhodnou mikroarchitekturou, která zajistí mechanickou stabilitu a podpoří růst buněk, zároveň zohlední dopad výroby na životaschopnost buněk. Produkce buněčných trojrozměrných struktur, které napodobují tělesné tkáně, má důležitou roli nejen v tkáňovém inženýrství, ale také při dodávání léků a studiích rakoviny (Kačarević et al., 2018). Jedná se o metodu, která má v oblasti tkáňového inženýrství slibnou budoucnost. Očekává se, že v budoucnu budou nemocnice vybaveny přístroji, které sestaví vícevrstvé komplexní tkáně jako je chrupavka, kost apod. (Badekila et al., 2021).

Biotisk lze rozdělit podle techniky tisku na vytlačovací tisk, inkoustový tisk a laserový tisk. Tyto techniky umožňují výrobu složitějších a reprodukovatelných nosičů, kromě toho mohou napodobovat environmentální vlastnosti kostní tkáně s vysokou přesností, jelikož různé biomateriály, růstové faktory a buňky mohou být vytištěny současně s přesnou kontrolou jejich distribuce. Těmito metodami je tedy možné vyrobit specifický nosič pro daného pacienta za krátký čas a nízké náklady, je ale nezbytný výběr vhodného materiálu a nejvhodnější metody 3D tisku (Maia et al., 2022).

První pokusy o tisk živých buněk byly provedeny pomocí speciálně upravených komerčně dostupných inkoustových tiskáren. Inkoustový tisk je technika, která dávkuje kapičky bioinkoustu pomocí tepelných nebo piezoelektrických přístupů, viz obrázek 8 (Kačarević et al., 2018). Tepelný inkoustový tisk je běžnější, zajišťuje vyšší míru životaschopnosti buněk, je snadno použitelný a představuje nižší náklady (Maia et al., 2022).

K nukleaci bubliny je využíván zahřátý prvek, bublina způsobuje nahromadění tlaku uvnitř tiskové hlavy, což vede k vypuzení kapičky (Kačarević et al., 2018). Lze tisknout několik

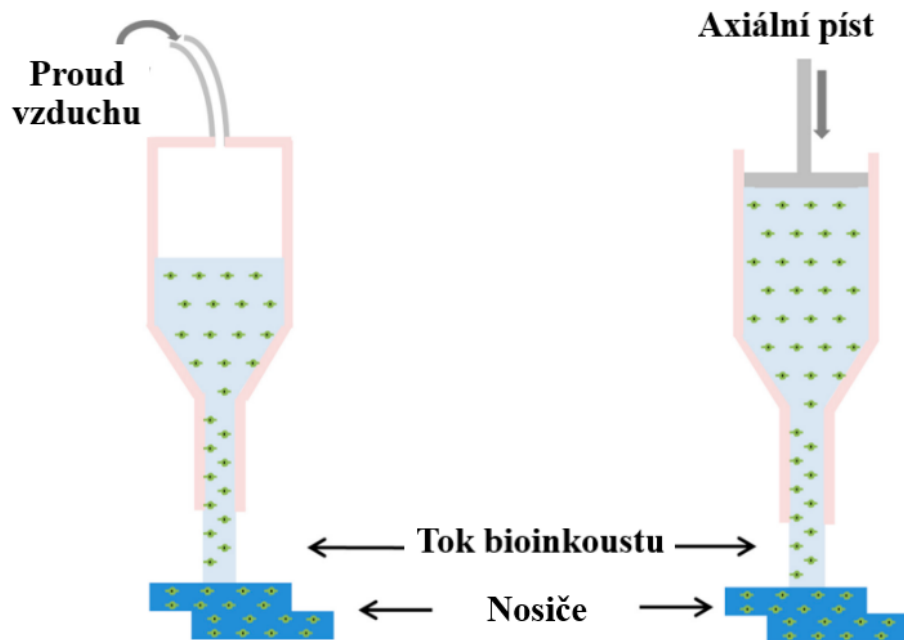
svazků kapiček v závislosti na teplotním gradientu, frekvenci pulzů a viskozitě bioinkoustu. V piezoelektrickém přístupu vznikají kapičky v důsledku použití akustické vlny na přítomné piezoelektrické prvky (Maia et al., 2022). Tento mechanismus omezuje použití vysoce koncentrovaných a viskózních bioinkoustů, jelikož jejich viskozita tlumí aplikované akustické vlny a brání vyvržení kapiček (Kačarević et al., 2018). Inkoustový tisk představuje slibnou metodu k výrobě modelů kostní tkáně s vysokým prostorovým rozlišením, umožňuje jednotnou a vysoce specifickou dispozici buněk, kromě toho může být kombinován s jinými technikami zpracování pro vytvoření relevantnějších modelů (Maia et al., 2022). Poskytuje vysoké rozlišení a přesné polohování buněk. Vyžaduje však nízkou koncentraci inkoustu, což může mít za následek špatnou strukturální integritu a neefektivní zapouzdření buněk. Tato technika prokázala velký úspěch při vytváření nervových a kožních tkání (Kačarević et al., 2018).



**Obr. 8: Schéma inkoustového biotisku:** Termální inkoustové tiskárny používají tepelně indukovanou nukleaci bublin, která pohání bioinkoust mikrotryskou. Piezoelektrický pohon vytváří akustické vlny, které pohánějí bioinkoust mikrotryskou (upraveno dle Kačarević et al., 2018).

Extruzní tisk se využívá po celém světě k vývoji přesných struktur díky snadnému přístupu, flexibilitě a cenové dostupnosti (Maia et al., 2022). Bioinkoust je vytlačován z kazet tryskou poháněnou pneumatickým nebo mechanickým tlakem a uložen v předem navržené struktuře, viz obrázek 9 (Kačarević et al., 2018). Pokud jde o pneumatickou sílu, k vytlačení materiálu je využíván stlačený vzduch, u mechanické síly jsou využívány pístové nebo šnekové šrouby. Volba mechanismu je závislá na elastických vlastnostech materiálu, který má být vytlačován (Maia et al., 2022). Hlavní výhodou extruzního tisku je schopnost tisknout s velmi vysokou

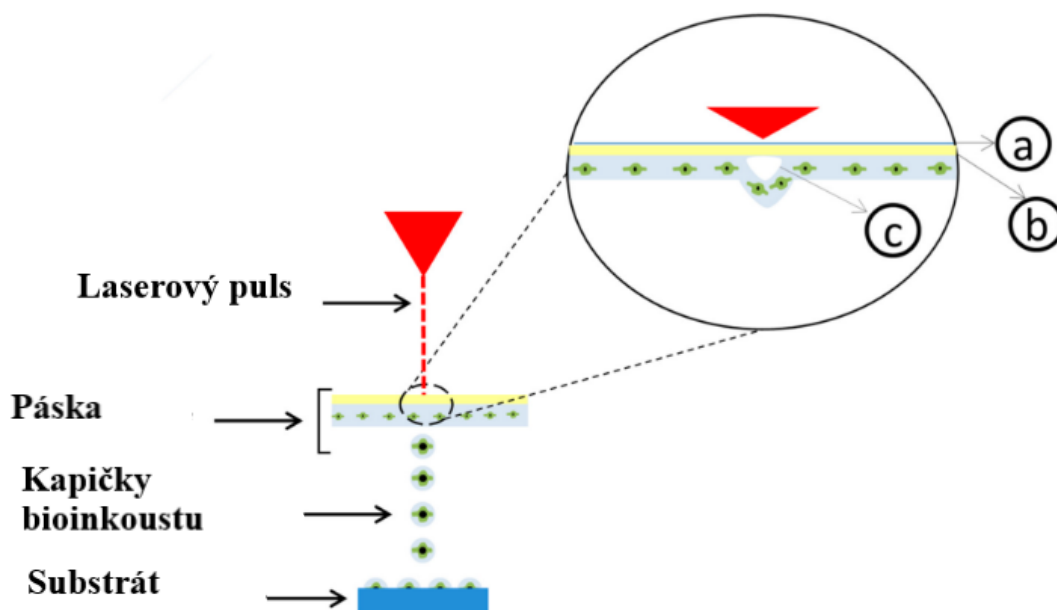
hustotou buněk (Kačarević et al., 2018). Tato technika však vykazuje i významné nevýhody, mezi které patří pomalá rychlost tisku, nekvalitní rozlišení a buněčná smrt vyvolaná stříhem. Navzdory těmto nevýhodám je extruzní tisk široce používán v inženýrství kostní tkáně, kde tato technika umožnila napodobit mikrostrukturu kostní tkáně (Maia et al., 2022).



**Obr. 9: Schéma biotisku založeného na extruzi; zleva pneumatická extruze, zprava mechanická extruze (upraveno dle Kačarević et al., 2018).**

Laserový tisk umožňuje tisk s vysokou přesností a rozlišením. Základem této techniky je laserem indukovaná depozice buněk nebo biomateriálů. Soustava se skládá z pulzního laseru pod napětím, pásky obsahující bioinkoust a fáze, na kterou bude nosič vytištěn. Páska je vyrobena z vrstvy průhledného substrátu (např. skla), který je potažen vrstvou kovu, který absorbuje laser (např. zlato), na vrchní vrstvě této pásky je umístěna tenká vrstva bioinkoustu. Laserový paprsek odpařuje kovovou vrstvu a přenáší kapičky bioinkoustu na substrát, kterým může být biopapír, polymerní list nebo nosič (viz. obr. č. 10). Tato technika má tu výhodu, že neobsahuje trysky, což umožňuje tisk drobných kapiček s vysokou hustotou buněk. Má schopnost umístit více typů buněk s vysokým stupněm přesnosti a jedinečnost v polohování jednotlivé buňky na kapičku. Jedná se však o velmi nákladný proces s nízkou stabilitou (Kačarević et al., 2018). Některé studie ukázaly, že laserové ozařování může poškodit buňky a snížit jejich životaschopnost (Maia et al., 2022).



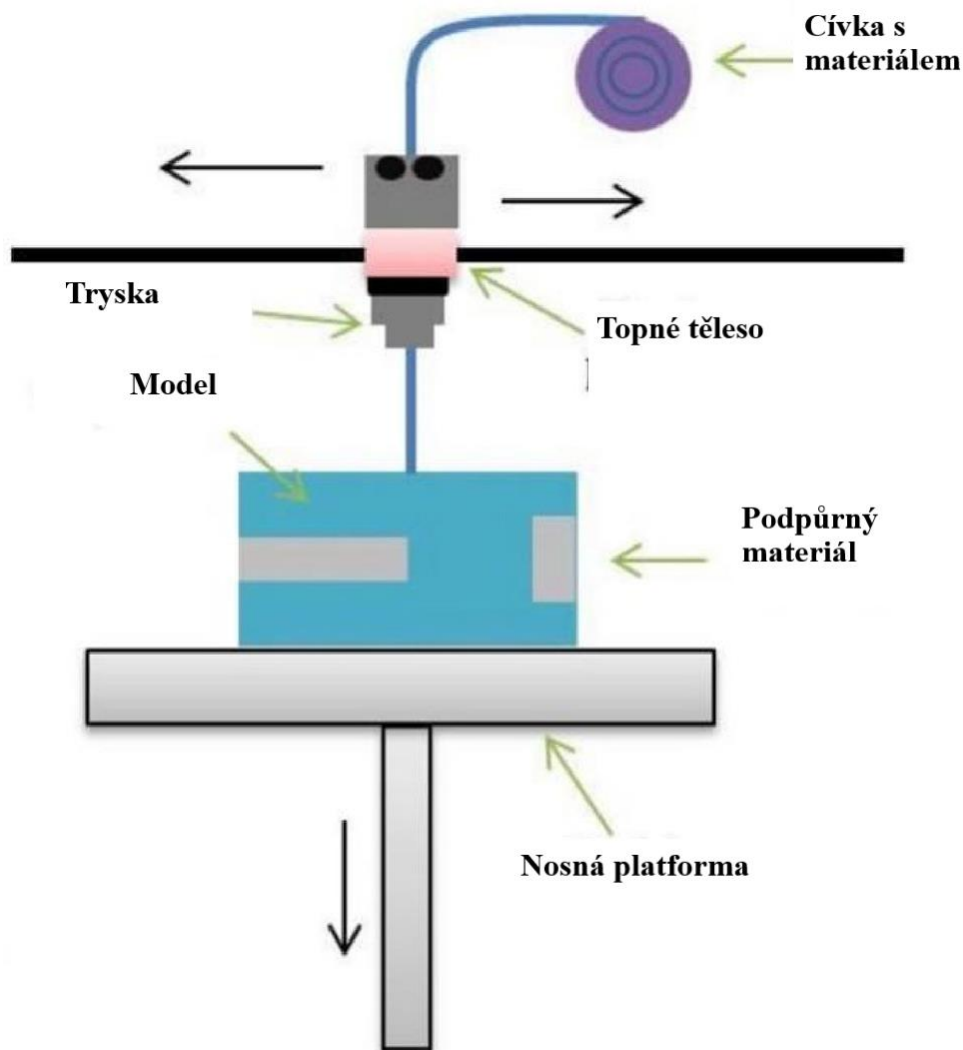


**Obr. 10: Schéma laserového biotisku:** a) průhledné sklo, b) tenká kovová vrstva, c) bublina vyvolaná odpařováním; Nukleace bublin indukovaná laserovou energií pohání kapičky bioinkoustu směrem k substrátu (upraveno dle Kačarević et al., 2018).

Nově vznikající technologii, která je stále v počáteční fázi, je 4D biotisk, který zahrnuje aplikaci biomateriálů reagujících na podněty. Na rozdíl od 3D biotisku mění konstrukce tvar při aplikaci podnětů jako je teplota, vlhkost, změna pH, světlo a elektrické pole. Touto metodou lze v budoucnu vyřešit problém při implantaci nosiče do defektní oblasti tuhé tkáně či orgánu, kdy dochází k nedokonalému uložení a zabránění biokompatibility. V různých studiích byly vyrobeny nosiče pro regeneraci nervů, růst nové tkáně pro terapii kmenovými buňkami apod., rozsáhlá aplikace této technologie však vyžaduje stále více výzkumu a zkušeností (Badekila et al., 2021).

### 3.5 Modelování tavené depozice

Modelování tavené depozice, známé také jako modelování tavené laminace, je technologie, která ohřívá a taví vláknité tavné materiály, kterými trojrozměrná tryska selektivně potahuje podpůrný materiál. Po rychlém ochlazení vzniká vrstva, na kterou jsou skládány další vrstvy do té doby, než je vytvořen celý tvar nosiče (Obr. 11). Pro metodu tavené depozice jsou většinou využívány smrštitelné polymery včetně polyamidu, polyesteru, polykarbonátu, polypropylenu apod. (Zhang et al., 2023).



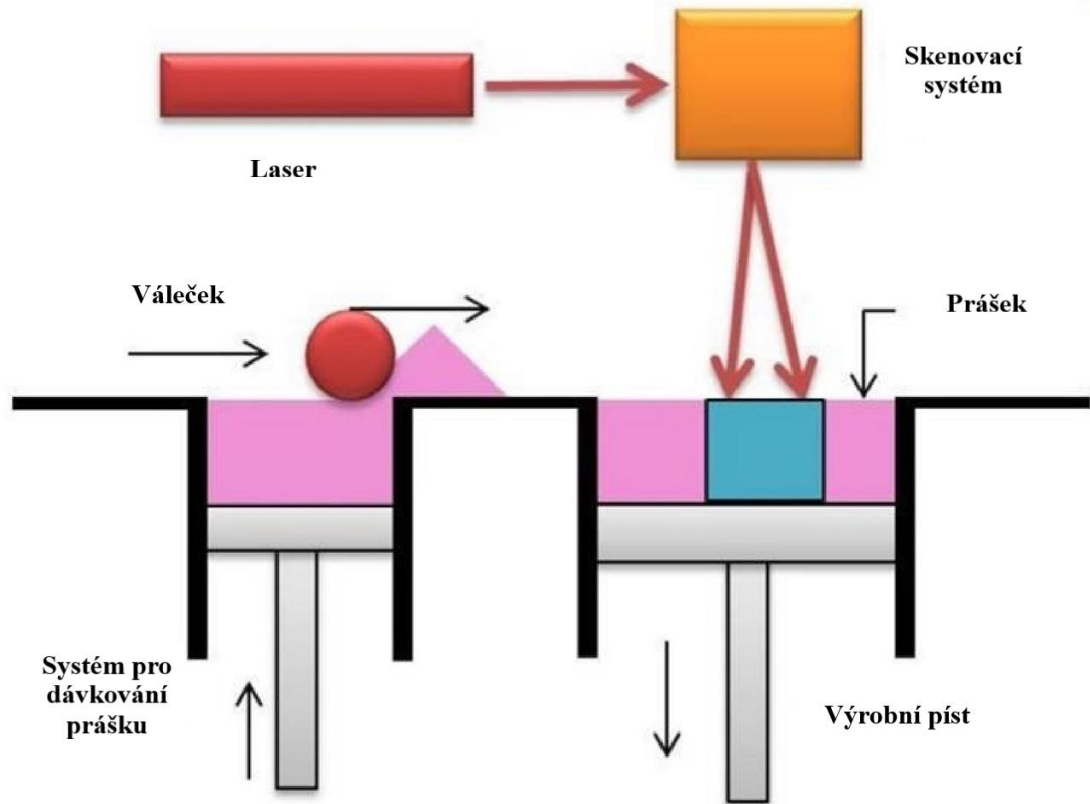
**Obr. 11: Schéma metody modelování tavené depozice;** Cívka s tavným materiálem je ohřívána topným tělesem, tryska potahuje tavným materiálem podpůrné těleso či podpůrný materiál na platformě, po rychlém ochlazení dochází k vytváření vrstev (upraveno dle Zhang et al., 2023).

### 3.6 Selektivní laserové sintrování

Pro metodu selektivního laserového sintrování (SLS) jsou využívány většinou práškové materiály, v současné době nejvíce voskový a plastový prášek. Během zpracování se prášek přehřeje na teplotu mírně nižší, než je jeho teplota tání a poté se prášek zploští působením válečku. Pod kontrolou počítače je laserovým paprskem prášek spékán za vzniku vrstvy, po jejím vytvoření se spéká další vrstva. Nakonec se přebytečný prášek odstraní (Zhang et al., 2023). Schéma metody je znázorněno na obrázku 12.

Chen et al. aplikovali technologii selektivního laserového sintrování k vybudování PCL nosiče s dobrými mikroskopickými a makroskopickými vlastnostmi (Zhang et al., 2023).

Tato metoda výroby poskytuje potenciál pro regeneraci obličejových chrupavek, kromě toho může takto vyrobený nosič sloužit jako páteř, do které jsou začleněny injekční hydrogely se zapouzdřenými buňkami (Chen et al., 2014).

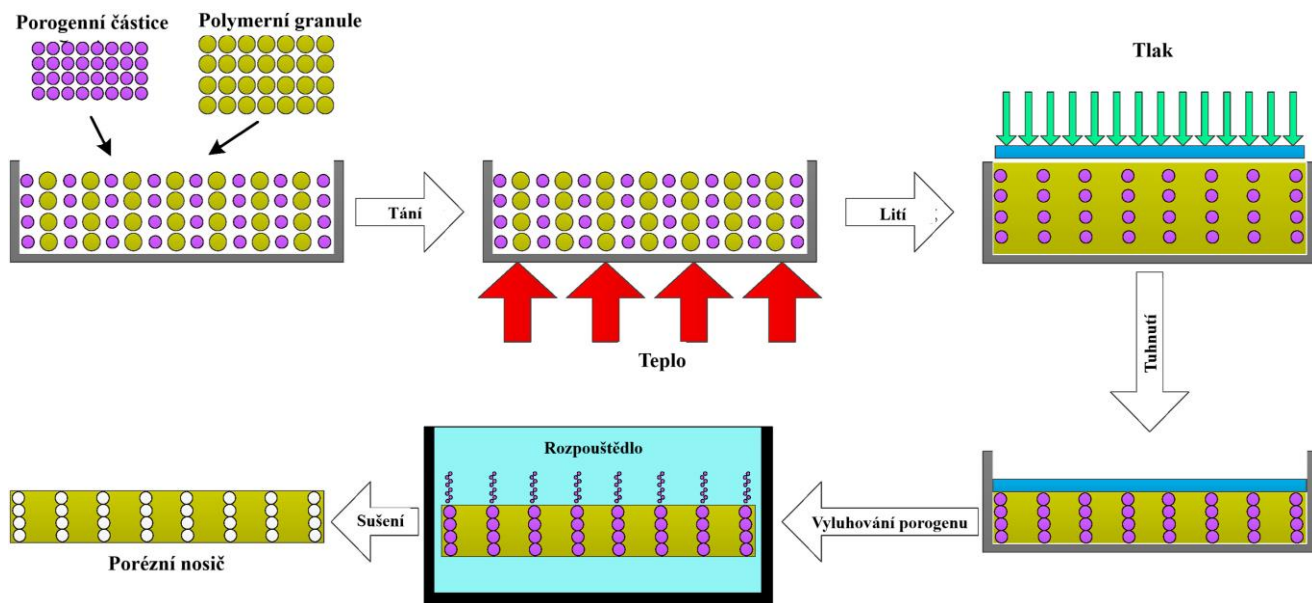


**Obr. 12: Schéma metody selektivního laserového sintrování;** Práškový materiál je přehřát na určitou teplotu a poté zploštěn pomocí válečku, laserovým paprskem je prášek spékán za vzniku vrstvy (upraveno dle Zhang et al., 2023).

Ve srovnání s modelováním tavené depozice má technika SLS širší výběr materiálů a má vysokou rychlost zpracování, vysokou přesnost a pevnost. Nevýhodou obou technik je, že při vysoké teplotě dochází ke zničení materiálu nebo růstových faktorů, další nevýhodou je drsnost povrchu nosiče, který díky tomu nelze použít pro tisk v kombinaci s živými buňkami (Zhang et al., 2023).

### 3.7 Technologie lisování a vyluhování částic

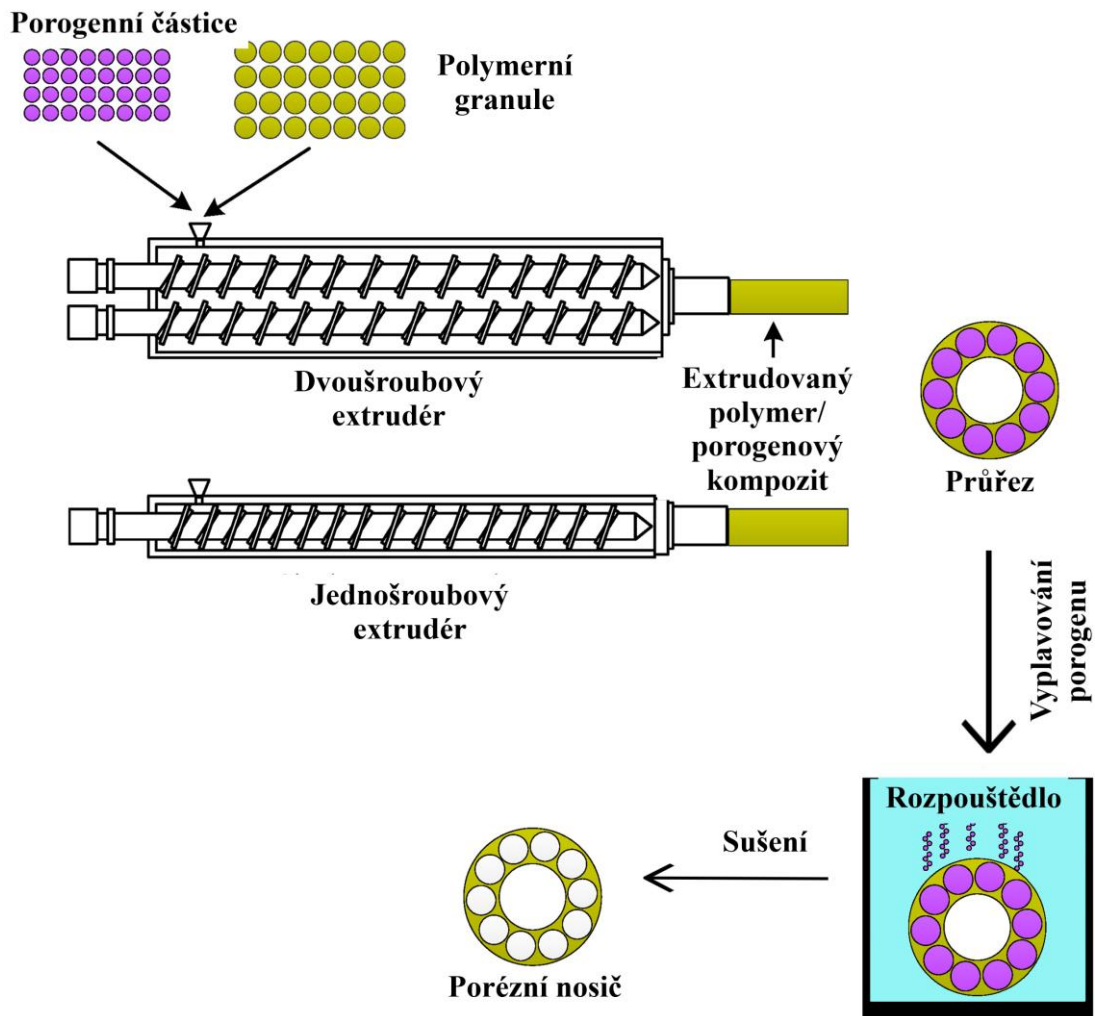
Při výrobě metodou lisování dochází k ohřevu formy obsahující příslušný polymer do té doby, než teplota dosáhne teploty skelného přechodu u amorfních polymerů nebo teplotě tání u polokrystalických polymerů. Poté jsou polymerní částice stlačovány do příslušného tvaru. Výhodami této metody je malá deformace ve srovnání s jinými technikami a proveditelnost výroby složitých geometrických nosičů. Jednou z neúčinnějších technik je kombinovaná metoda lisování a vyluhování částic (Obr. 13). Polymerní granula a částicový porogen jsou v pevném stavu, působením teploty dochází k jejich roztavení a zhutnění sloučeniny. Po roztavení kompozice se na formu aplikuje tlak, čímž je vyroben porézní nosič, který je vyluhován v porogenu, jehož koncentrace ovlivňuje pórovitost, velikost a tvar porogenu reguluje geometrii nosiče. Tato technika je nejčastěji využívána při výrobě nosiče sloužícího k vyztužení kosti nebo chrupavek (Hasanzadeh et.al., 2022).



**Obr. 13: Schéma technologie lisování a vyluhování částic;** Působením teploty dochází k roztavení porogenních částic a polymerních granulí a ke zhutnění sloučeniny, po roztavení je na formu aplikován tlak, čímž je vyroben nosič, který je vyluhován v porogenu (upraveno dle Hasanzadeh et.al., 2022).

### 3.8 Technologie vytlačování a vyluhování částic

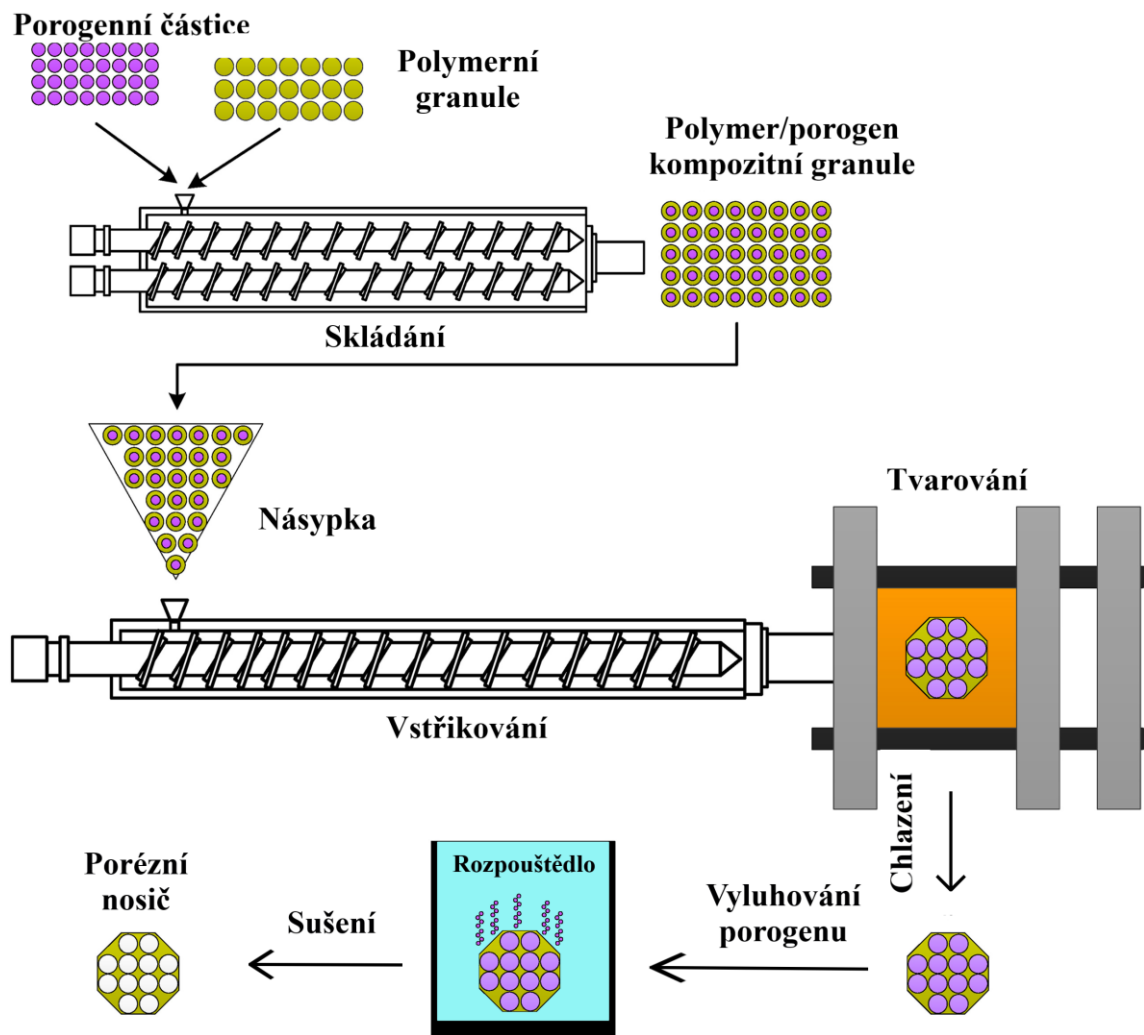
Kombinovaná technika vytlačování a vyluhování částic je použitelnou metodou pro nosiče s pevným průřezem (Obr. 14). Představuje typickou kombinovanou techniku vyluhování/extruze částic, kdy se polymerní granule a porogenní částice smíchají pomocí dvoušroubového nebo jednošroubového extrudéru. Polymerní nebo porogenní kompozit s pevným průřezem je následně vytlačen a vyluhován v rozpouštědle, čímž dojde k vytvoření porézního nosiče sloužícího k regeneraci poškozených cév (Hasanzadeh et.al., 2022).



**Obr. 14:** Schéma technologie vytlačování a vyluhování částic; Porogenní částice a polymerní granule jsou smíchány pomocí extrudéru, kompozit je následně vytlačen a vyluhován v rozpouštědle, čímž dojde k vytvoření nosiče (upraveno dle Hasanzadeh et.al., 2022).

### 3.9 Technologie vstřikování a vyluhování částic

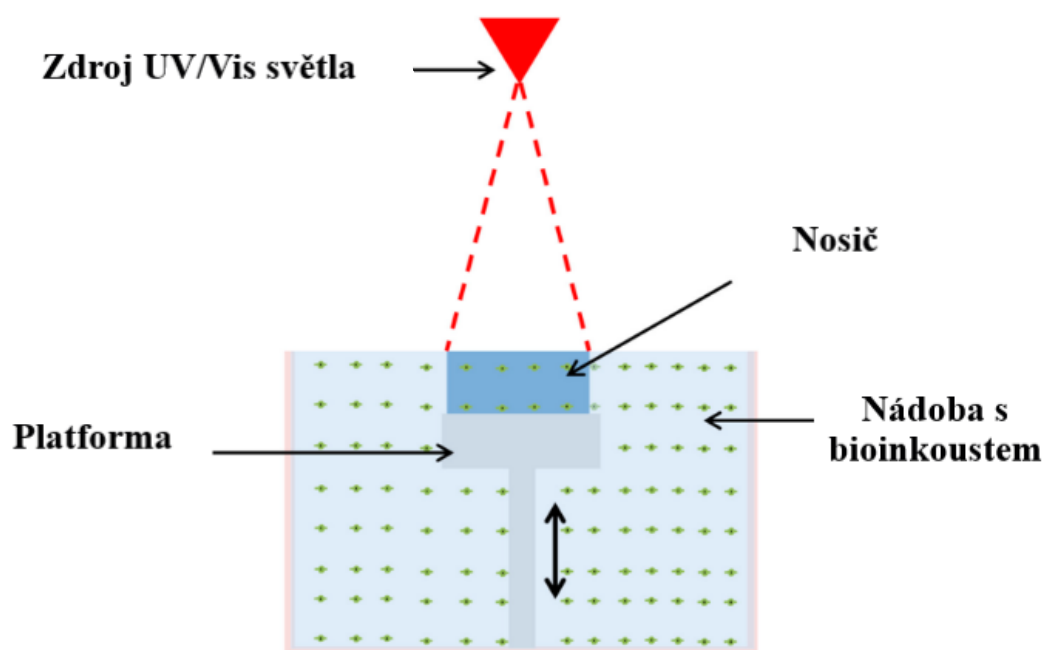
Několik studií prokázalo, že technika vstřikování může být použita pro výrobu nosiče sloužícího jako ortopedické implantáty nebo k dodávce léků. Proces vstřikování v kombinaci s vyluhováním částic je jednou z nejoblíbenějších výrobních technik (Obr. 15). Polymerní granule a porogenné částice se smíchají pomocí dvoušroubového extrudéru za vzniku polymerních a porogenných kompozitních granulí, které jsou vstřikovány do formy se specifickým tvarem. Takto lisovaný kompozit se vyluhuje ve vhodném rozpouštědle (např. chloroform), čímž dojde k vytvoření porézního nosiče (Hasanzadeh et.al., 2022).



**Obr. 15: Schéma technologie vstřikování a vyluhování částic;** Porogenné částice a polymerní granula jsou smíchány pomocí extrudéru za vzniku kompozitních granulí, která jsou vstřikována do formy specifického tvaru. Vylisovaný kompozit je vyluhován ve vhodném rozpouštědle, čímž dojde k vytvoření porézního nosiče (upraveno dle Hasanzadeh et.al., 2022).

### 3.10 Stereolitografie

Stereolitografie je jedna z méně známých metod sloužících k výrobě buněčných nosičů. Díky ní mohou být vytvořeny přesné vnější geometrie i vnitřní uspořádání odpovídající lidské tkáni (Skoog et al., 2014). Jedná se o rychlý prototypový proces, při kterém je využíváno vytváření struktur kladením jednotlivých vrstev na sebe. Je založena na principu fotopolymerace, což je jev, při kterém dochází po ozáření paprsky určité části spektra k aktivaci odpovídající látky obsažené v kompozitech. Rozpadem této látky je aktivována polymerační reakce, která zahrnuje počítačem řízené ozařování kapalné pryskyřice (Taneja et al., 2022). Využívá ultrafialové nebo viditelné světlo k vytvrzení fotosenzitivních polymerů vrstvu po vrstvě, viz obrázek 16 (Kačarević et al., 2018).



**Obr. 16: Schéma stereolitografie;** Fotopolymerace probíhá na povrchu nádoby, ve které je světlocitlivý bioinkoust vystaven světelné energii, platforma se během výroby pohybuje směrem dolů (převzato a upraveno dle Kačarević et al., 2018).

Dráha UV-světla je definována tzv. „počítačem podporovaným projektováním“ (CAD; Computer Aided Design). Volné radikály a další reaktivní látky vznikají excitací molekul fotoiniciátoru UV zářením, což způsobuje polymeraci pryskyřice a tvorbu pevné fáze materiálu (Taneja et al., 2022). Fotoiniciátory jsou chemické molekuly, které vytvářejí reaktivní činidla po vystavení světelné energii, reagují s monomery materiálu, aby pak iniciovaly tvorbu polymerních řetězců. Jsou citlivé na různé rozsahy vlnových délek, některé jsou spouštěny UV zářením, jiné viditelným světlem. Nejčastěji používanými a nejméně

cytotoxickými fotoiniciátory jsou Irgacure 2959 pro oblast UV světla, pro viditelné světlo je používán eosin Y (Kačarević et al., 2018).

Polymerace probíhá v horní části nádoby s bioinkoustem, kde je biomateriál vystaven světelné energii. Po polymeraci každé vrstvy je plošina nesoucí strukturu spuštěna do nádrže, což umožní fotopolymerizaci nové vrstvy nahoře (Kačarević et al., 2018). Proces spouštění plošiny nesoucí strukturu pokračuje až do úplného dokončení 3D struktury (Taneja et al., 2022).

Stereolitografie se jeví jako slibný kandidát pro výrobu buněčných nosičů. Absence smykového napětí z ní činí atraktivní volbu pro začlenění buněk, omezení však představuje poškození buněčné DNA způsobené UV zářením. Někteří výzkumníci již začali hledat alternativy, mezi které patří použití materiálů, které absorbují pouze viditelné světlo, tudíž nebude muset být použito UV záření (Kačarević et al., 2018).

### **3.11 Decelularizace**

Decelularizace je metoda, která je v posledních 20 letech často využívána ve studiích tkáňového inženýrství. Je zaměřena na odstranění všech buněčných a jaderných složek z tkáně, je však zachováno složení, biologická aktivita a mechanická integrita ECM (Inci, 2021). Zachování nativní struktury ECM je nezbytné, neboť ECM vytváří mikroprostředí pro buněčnou funkci, diferenciaci a proliferaci (Choudhury et al., 2020). Decelularizované tkáně jsou znovu osídleny buňkami pocházejícími od pacienta, jedná se o tzv. recelularizaci, čímž dojde k vytvoření „personalizovaného orgánu“ (Obr. 17). Po recelularizaci bude tento orgán implantován do těla pacienta bez nutnosti dlouhodobé imunosuprese (Hillebrandt et al., 2019). Existuje mnoho decelularizovaných tkání a orgánů, mezi které patří kůže, svaly, játra, chrupavka, kosti, cévní tkáně, srdce, perikard, amniotická membrána, tuková tkáň apod., které bývají využívány jako biomateriály (Inci, 2021).

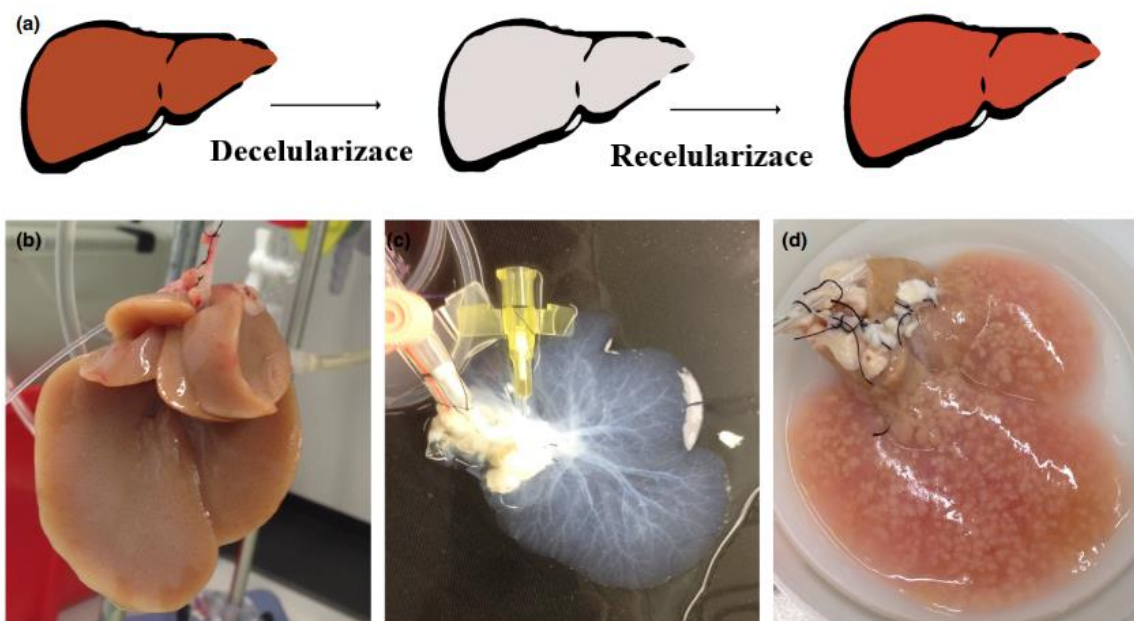
Kromě odstranění buněčného obsahu a jaderného materiálu je nutné také odstranění potenciálních kontaminantů nebo zbytkových detergentů. Tento proces lze rozdělit do tří kroků: fáze praní, fáze oplachování a fáze sterilizace. Fáze praní zahrnuje použití detergentu, enzymu nebo denaturačního činidla k lýzi buněk a rozkladu tkáně. Fáze oplachování odstraní zbytkové detergenty, neboť tyto kontaminanty, obvykle cytotoxické, inhibují buněčnou proliferaci během recelularizace. Ve sterilizační fázi jsou odstraněny antigenní složky a bakterie, aby došlo k zabránění imunogenní odpovědi (Choudhury et al., 2020). Sterilizace je nutná k odstranění potenciálních patogenů, které by mohly vyvolat imunitní odpověď.



Sterilizace je sice nezbytná, ale ovlivňuje strukturální a mechanické vlastnosti tkáně a může způsobit retenci cytotoxinů. Většina patogenů je bakteriální, je však možná virová a plísňová kontaminace nosiče, které lze odstranit standardními sterilizačními technikami, avšak endospory, retroviry a priony jsou vůči těmto metodám rezistentní. Nosiče se většinou sterilují pomocí nízkoteplotních technik, jako je namáčení kyselinou peroctovou,  $\gamma$ -ozařování, antibiotika, dlouhodobé UV-záření a ethylenoxid (Snyder & Jana, 2022).

K decelularizaci jsou využívána různá činidla, která se dělí na biologické, chemické a fyzikální. Mezi biologické látky patří především enzymy jako jsou nukleázy, trypsin a chelatační činidla jako je například kyselina ethylendiamintetraoctová. Nejběžněji se používají chemické prostředky, které dělíme na hypotonické nebo hypertonické roztoky a iontové nebo neiontové detergenty. Mezi fyzikální činidla patří např. mechanická síla a tlak, ale jsou málo využívány z důvodu nedostatečné decelularizace celého orgánu. V mnoha studiích dochází ke kombinaci různých technik a činidel, čímž dochází k vylepšení metody decelularizace, i přesto však zůstává tato metoda nedostatečně prozkoumána a není známa její stoprocentní využitelnost (Hillebrandt et al., 2019).

Chemické decelularizační metody vystavují tkáň chemikáliím prostřednictvím metod namáčení nebo perfuze, které způsobují poškození buněk. Nevýhodou je, že chemická expozice může poškodit tkáň a denaturovat proteiny. Detergenty jsou klasifikovány na základě jejich hydrofilních a hydrofobních vlastností jako iontové, neiontové nebo amfoterní (zwitterionové) detergenty. Nejběžnějším iontovým detergentem používaným pro decelularizaci je dodecylsulfát sodný (SDS), jeho amfifilní vlastnosti z něj činí vysoce účinnou povrchově aktivní látku schopnou narušit lipidovou dvojvrstvu exponovaných buněk. Má hydrofobní konec, díky kterému se váže na elastin, což má za následek otok tkáně a zachycení SDS v tkáni (Snyder & Jana, 2022).



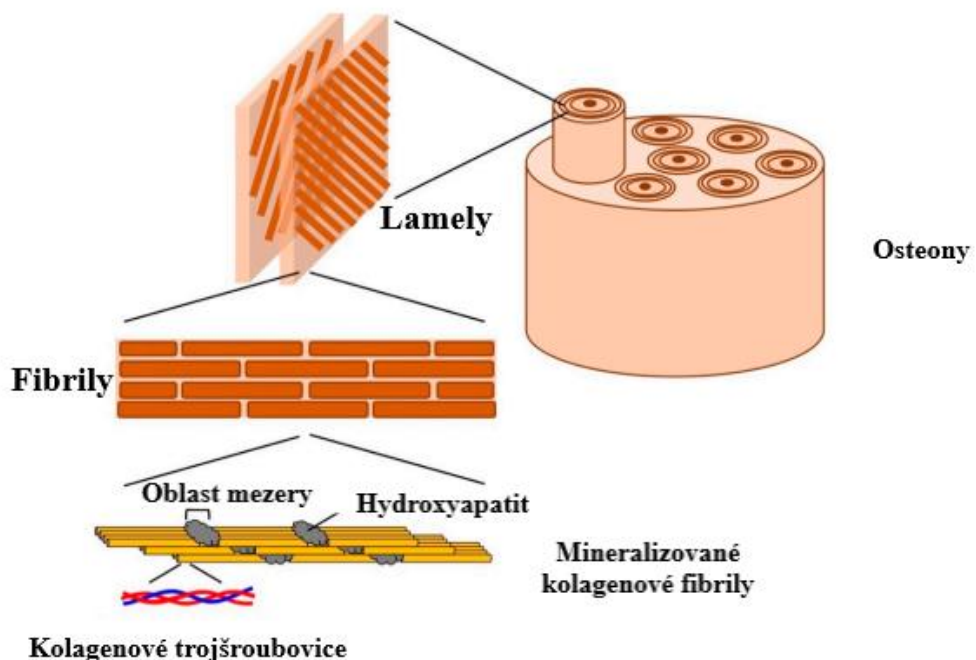
**Obr. 17: Decelularizace a následná recelularizace kryších jater: a) obecné schéma decelularizace a recelularizace, b) nativní kryší játra, c) decelularizovaná kryší játra, d) recelularizovaná kryší játra (Hillebrandt et al., 2019).**

## 4. Praktické aplikace buněčných nosičů

V této kapitole je představeno několik aktuálních studií, které se zabývají praktickou aplikací buněčných nosičů a metodami k jejich vytvoření.

### 4.1 Porézní nosiče pro regeneraci kostí

Kosti hrají v lidském těle důležitou roli při pohybu, poskytují mechanickou oporu, chrání orgány, řídí vstřebávání minerálů a dochází v nich ke krvetvorbě, konkrétně v kostní dřeni. Kostní tkáň se skládá z organické složky, kolagenu typu I, anorganické složky a hydroxyapatitu (Obr. 18). Na rozdíl od jiných tkání má kostní tkáň při drobných poraněních schopnost sebeobnovy, tato schopnost však bývá omezena nedostatkem zásobování krví nebo v případě systémových onemocnění (Kazutoshi Iijima and Hidenori Otsuka, 2020).



**Obr. 18: Stavba kosti** (upraveno dle Kazutoshi Iijima and Hidenori Otsuka, 2020).

U starších osob dochází v důsledku osteoporózy ke zlomeninám kostí, jejichž léčba je velmi komplikovaná a zdoluhavá. Dalšími důvody poškození kostí jsou úrazy při nehodách nebo sportu a léčba kostních nádorů (Kazutoshi Iijima and Hidenori Otsuka, 2020). Poranění a následná reparace kostí jsou celosvětový problém. Jednoduché zlomeniny se samy zahojí, ale velké kostní poškození vyžaduje roubování autologních kostí, které má značné riziko odmítnutí imunitním systémem, přenosem patogenů a nedostatečnosti (Sriwong et al., 2023). Nové léčebné postupy se snaží pomocí nosičů regenerovat poškozenou tkáň, která se špatně

hojí (Abbasi, 2020). Regenerace kosti je složitý proces, který zahrnuje řadu molekulárních, buněčných, biochemických a mechanických podnětů, proto jsou k regeneraci kostí vyžadovány nosiče s vhodným tvarem, velikostí pórů, rozložitelností, biokompatibilitou, vhodnými mechanickými vlastnostmi a žádoucími buněčnými odpověďmi (Wang et al., 2020).

Pokud je místo poranění příliš velké a nemůže dojít ke spontánnímu zahojení, využívá se několik přístupů využívajících autografty, alografty, aloštěpy nebo syntetické kostní náhražky. Autograft je použití kostního bloku odebraného z pacientovy vlastní kostní tkáně, alograft je lyofilizovaná kostní tkáň pocházející od lidského dárce. Aloštěpy pocházejí od geneticky odlišných jedinců téhož druhu, tzn. od dárce. Tyto léčebné strategie představují značná omezení, např. použití autograftů může vést k morbiditě v místě transplantace, infekcím v ráně nebo dlouhodobé bolesti. Použití aloštěpů zase představuje zvýšené riziko přenosu infekčního onemocnění. V případě kostních náhrad, jako jsou protézy, je obvykle vyžadována následná revize. K řešení těchto problémů byly studovány různé metody tkáňového inženýrství s cílem vyvinout vylepšenou strategii zaměřenou na použití nosičů, buněk a biologicky aktivních podnětů pro regeneraci kostní tkáně (Maia et al., 2022).

Osteogenní schopnost nosiče je ovlivněna vazbami mezi póry, čímž dochází k usnadnění distribuce buněk, integraci s hostitelskou tkání a prorůstání kapilár. Aby byl nosič účinný, musí splňovat požadavky na fyziologické a mechanické zatížení, musí splňovat příslušnou velikost pórů a vzájemnou propojenost, čehož stále nelze stoprocentně dosáhnout. Tkáňové inženýrství vyžaduje vhodnou architekturu nosičů, jelikož rozložení pórů a geometrická stavba silně ovlivňují schopnost buněk pronikat, proliferovat a diferencovat. Rychlost degradace nosiče musí být slučitelná se zráním a regenerací nové tkáně po transplantaci *in vivo*, proto materiály s velmi vysokou molekulovou hmotností, které se v těle nerozkládají, mají omezené použití jako materiály kostních štěpů. Produkty procesu degradace by měly být netoxické a neměly by stimulovat zánětlivou reakci (Abbasi, 2020).

Biomateriály k výrobě nosičů mohou být získávány buď z přírodních zdrojů (např. alginát, kolagen) nebo mohou být vyráběny synteticky (např. PEG, PCL). Mohou být použity jednotlivě nebo v kombinaci, podmínkou je, aby nosič nejlépe napodoboval ECM kostní tkáně a umožňoval připojení buněk, proliferaci a diferenciaci a zároveň poskytoval vhodnou mechanickou podporu (Maia et al., 2022).

#### **4.1.1 Buněčné nosiče pro regeneraci kostní tkáně pomocí mezenchymálních buněk**

Mezenchymální buňky (MSC) jsou izolovány z kostní dřevě, tukové tkáně, pupečnickové krve a zubní dřevě a k regeneraci kostního defektu přispívají přímými i nepřímými účinky. Za přímý účinek považujeme vyvíjení MSC za účelem vytvoření buněk tvořících kosti, za nepřímý účinek lze označit produkci cytokinů, růstových faktorů, regulaci vaskularizace a modulace zánětu. MSC mají schopnost diferenciaci na mezenchymální tkáň včetně kostí, šlach, svalů a chrupavek. K regeneraci kostní tkáně jsou využívány dvě metody – metoda konstrukce kostí tkáně z MSC *in vitro* a její transplantace a metoda transplantace MSC k indukci regenerace kostí *in vivo* (Iijima and Otsuka, 2020).

#### **4.1.2 Injekční a antibakteriální nosič fosforečnanu vápenatého**

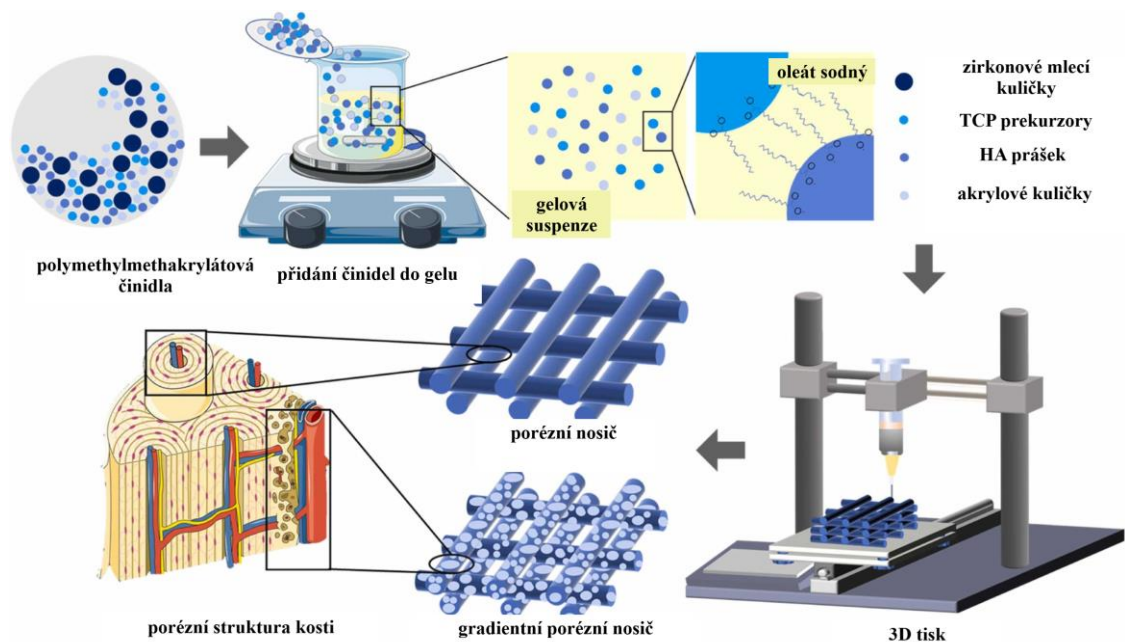
Osteomyelitida je běžné zánětlivé onemocnění kostí, které často vede ke kostní nekróze a destrukci, která je důsledkem polymikrobiální nebo smíšené infekce. Hlavním patogenem je zejména *Staphylococcus aureus*. Pro léčbu osteomyelitidy se používají běžná antibiotika, jako je např. penicilin, který patří mezi beta-laktamové látky. Nejúčinnější léčba je však dosažena pouze tehdy, když lokální koncentrace antibiotik zůstává nad minimální inhibiční koncentrací po delší dobu. Lokální podávání antibiotik je novou terapeutickou metodou, která přispívá k relativně vysoké koncentraci antibiotik v infikovaném místě v boji proti růstu bakterií a zabraňuje škodlivým účinkům systémových antibiotik na zbytek organismu. Dalším nezbytným zákrokem pro léčbu osteomyelitidy, který by mohl odstranit neživotaschopnou tkáň a infikovanou kost, je chirurgický debridement, což znamená chirurgické vyčištění rány. Tato metoda však může vést ke ztrátě kostní hmoty a následným obtížím při hojení. Za nejlepší metodu rekonstrukce kostních defektů jsou považovány autologní kostní štěpy, tato aplikace však byla relativně omezena z důvodu nedostatečného zásobování kostními štěpy. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny náhražky kostních štěpů (Wu et al., 2021).

Ve studii *Wu et al.* byla vyvinuta antibakteriální a injekční CPC-chitosanová pasta obsahující penicilin-zapouzdřené alginátové mikrokuličky. Cílem této studie bylo vyvinout nové injekční a mechanicky vylepšené mikrokuličky alginátu obsahující antibiotika, zkoumat mechanické a antibakteriální vlastnosti proti infekcím *S. aureus* a zajištění životaschopnosti nosiče. Vyvinutý CPC-chitosanový nosič měl mechanickou sílu odpovídající zdravé kosti, silnou antibakteriální funkci proti infekcím *S. aureus* a podporoval zapouzdření a životaschopnost mezenchymálních kmenových buněk. Byla prokázána dobrá mechanická pevnost, uvolňování antibiotik po delší dobu, nosič neměl žádné toxické účinky. Injekční CPC-chitosanový nosič

vykazoval větší inhibiční zónu než kontrola penicilinového disku, mimo to měl okamžitý účinek inhibující biofilm ke kontrole grampozitivních kokových infekcí. Tento vyrobený nosič je slibným kandidátem pro klinické aplikace v boji proti infekcím *S. aureus*, který je hlavním patogenem v lézích osteomyelitidy, které by jinak vyžadovaly agresivní chirurgický zákrok vedoucí ke snížení kvality života pacientů. Vyrobený nosič má několik hlavních výhod, mezi které patří injekční podání, síla odpovídající porušené kosti, silná a trvalá antibakteriální aktivita a biokompatibilita. Tento nosič je slibným kandidátem pro zubní, kraniofaciální a ortopedické aplikace pro kontrolu infekcí a zlepšení regenerace kostí (Wu et al., 2021).

#### 4.1.3 3D tisk porézních nosičů dvoufázového fosforečnanu vápenatého

Jak již bylo několikrát zmíněno, jednou z důležitých vlastností nosičů je jejich pórovitost. Obecně je dáno, že pro usnadnění buněčné migrace, vaskularizace, osteokondukce a integrace mezi vnitřní tkání a implantátem jsou zapotřebí póry o velikosti 50-500  $\mu\text{m}$ . *Duan et al.* Ve své studii použili pro přípravu porézních nosičů metodu 3D tisku v kombinaci s polymethylmethakrylátovými činidly (PMMA), která vytvářejí póry specifického rozsahu (Obr. 19).

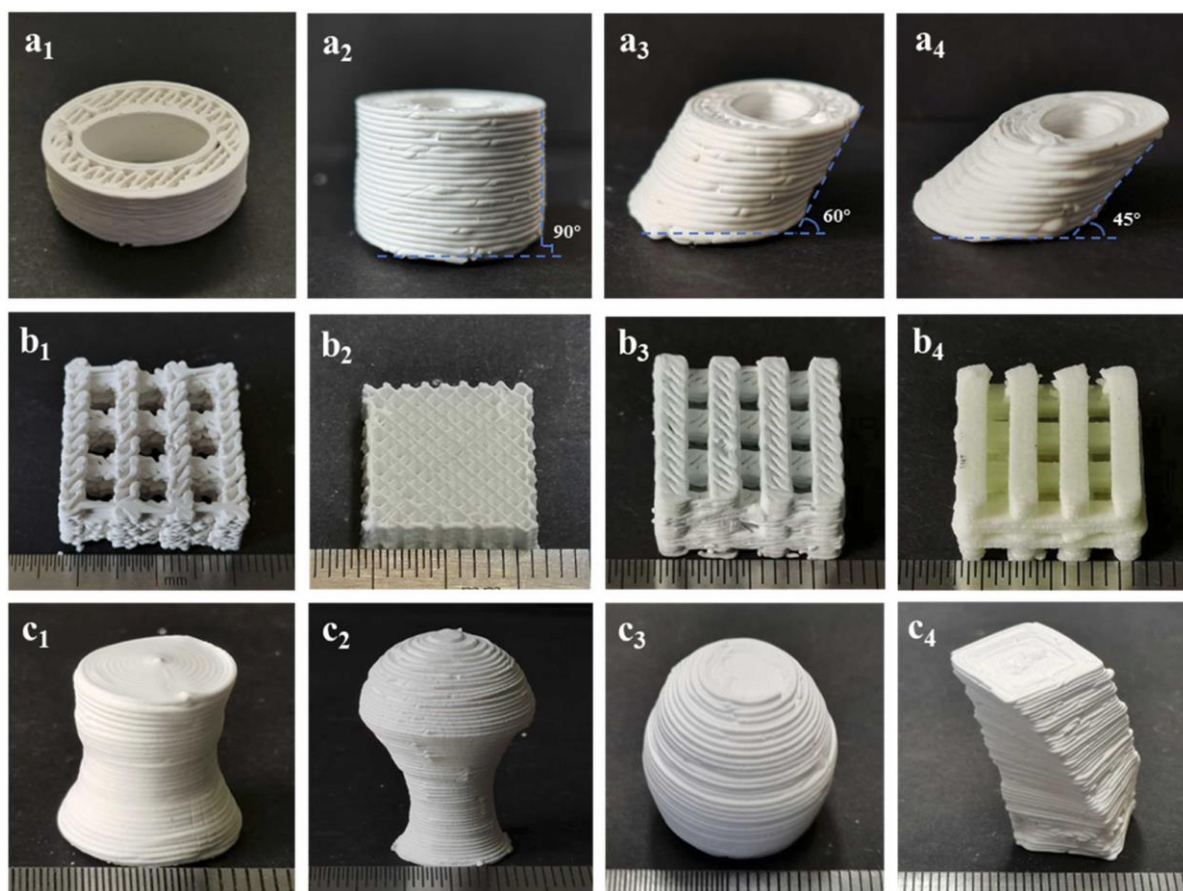


**Obr. 19: Průběh 3D tisku nosiče dvoufázového fosforečnanu vápenatého;** Přidáním polymethylakrylátových činidel do gelu vzniká gelová suspenze, která je využita k 3D tisku porézních nosičů (upraveno od Duan et al., 2023).

Hydroxyapatit, který je hlavní anorganickou složkou kostní tkáně, byl potažen nanopráškem fosforečnanu trojvápenatého (TCP) syntetizovaného chemickým srážením za vzniku

dvoufázového fosforečnanu vápenatého (BCP). TCP je při regeneraci tkáně zcela absorbován, což z něj činí nejžádanější biologicky odbouratelný materiál (Duan et al., 2023).

Ve studii *Duan et al., 2023* byl použit akrylamidový monomer N,N'-methylenbisakrylamid, citronan amonný, PEG 4000, HA, oleát sodný a deionizovaná voda. Nanoprášky prekurzorů TCP byly připraveny chemickým spolusrážením. Suroviny  $\text{CaCl}_2$  a  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  byly rozpuštěny v deionizované vodě, poté byl  $\text{CaCl}_2$  po kapkách přidáván do  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  a vznikající sraženina byla střídavě promývána deionizovanou vodou a alkoholem. Tímto procesem byly vyrobeny prekurzory TCP, které byly smíchány s HA a dalšími potřebnými látkami za vzniku tzv. tiskařské kaše (Duan et al., 2023). Metodou 3D tisku v kombinaci s PMMA vytvářející póry lze vytvořit různě složité tvary, viz. obr. č. 20, což má slibný potenciál pro použití při různých defektech kostí.



**Obr. 20: Charakterizace potiskovatelnosti 3D tisku v kombinaci s PMMA složkami.** Na obr. 21 a<sub>1</sub>-a<sub>4</sub> je charakterizována dobrá integrita tisku při různých sklonech. Obr. 21 b<sub>1</sub>-b<sub>4</sub> demonstruje dobrou plasticitu při konstrukci makroskopických dutin, obr. 22 c<sub>1</sub>-c<sub>4</sub> ilustruje využití 3D tisku pro zakřivené tvary (převzato od Duan et al., 2023).

## 4.2 Buněčné nosiče sloužící k hojení ran

Kůže je největším orgánem lidského těla, který je zodpovědný za ochranu těla před vnějšími stresy (Dalgic et al., 2021). Je rozdělena na epidermis, dermis a podkožní tkáň (Song et al., 2023). U zdravého jedince dochází k léčbě kožní rány samovolně, kdy hojení probíhá ve čtyřech fázích – hemostáza, zánět, proliferace a remodelace, které jsou zprostředkovány imunitními buňkami, endoteliálními buňkami, fibroblasty a keratinocyty. V některých případech však dochází ke komplikacím při hojení ran v důsledku probíhající infekce v ráně, nebo v případě, že je rána příliš velká. Tyto rány označujeme jako chronické, které jsou doprovázeny zdoluhavým hojením a nepřetržitou infekcí. K léčbě těchto druhů ran se používají pokročilé terapie, jako jsou buněčné nosiče a kožní štěpy (Dalgic et al., 2021).

Při léčbě ran je nutná aplikace léčiv potlačujících zánět a infekci, kdy se k podávání léčiv využívají dvě metody – systémová infuze a lokální aplikace. Zásadním rozdílem mezi těmito dvěma metodami je způsob, jakým léčiva působí. Lokální aplikace působí pouze v místě poškozené tkáň, zatímco perorální léčiva nebo injekce v celém těle. Další nevýhodou perorálních léčiv a injekcí je nutnost opakované aplikace k udržení potřebné hladiny léku (Kesavan et al., 2022).

### 4.2.1 Dvouvrstvý nosič pullulan-PHBV

V této studii byly k výrobě nosičů použity biopolymery. Hlavním důvodem použití biopolymerů je vynikající biokompatibilita, biologická rozložitelnost a bioaktivita. Biopolymery mají také lepší pružnost, smáčivost a přilnavost k místu rány. V případě biologické rozložitelnosti rozlišujeme taktéž polymery nerozložitelné nebo jen velmi málo rozložitelné v lidských tkáních. Biopolymery pocházející z mikroorganismů, rostlin a hmyzu (pullulan, celulóza, hedvábný fibroin apod.) jsou méně rozložitelné v lidských tkáních, zatímco biopolymery přítomné v tkáních ECM jsou v lidském těle snadno rozložitelné (Dalgic et al., 2021).

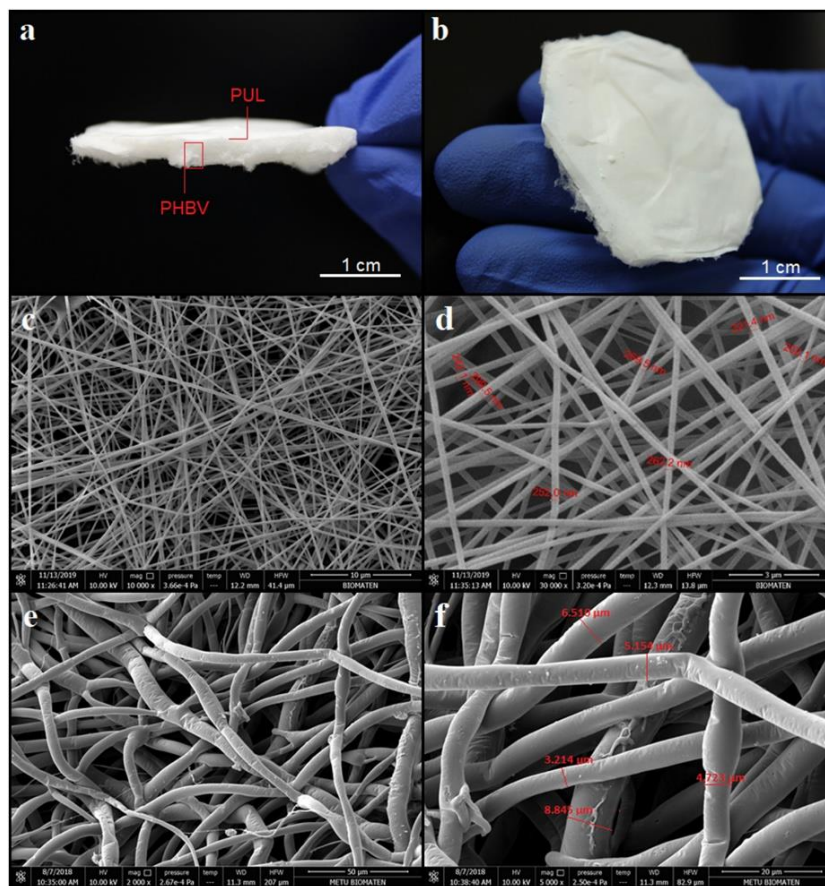
Pullulan (PUL) je polysacharid produkovaný během fermentace *Aureobasidium pullulans*, známými jako černé kvasinky (Wani et al., 2022). *A. pullulans* je všudypřítomná saprofytní houba podobná kvasinkám, která se nachází na listech, vlhkých místech, stromech apod. Kromě pullulanu produkuje také aureobasidiny, enzymy a kyselinu polyjablečnou (Bozoudi & Tsaltas, 2018). Jeho polysacharidové řetězce jsou tvořeny maltotriózovými jednotkami spojenými s  $\alpha$ -1,4 a  $\alpha$ -1,6 glykosidickými vazbami. PUL je známý výbornou přilnavostí, hydrofilností a vysokou absorpční kapacitou. Bioaktivita tohoto polymeru zlepšuje buněčnou



interakci a podporuje hojení ran zlepšením reepitelizace ran, regenerace kůže, tvorby krevních cév a syntézy kolagenu. Díky těmto vlastnostem je PUL oblíbeným polymerem pro použití k hojení ran buď v kombinaci s jinými polymery, nebo samostatně (Dalgic et al., 2021).

PHBV je polymer přírodního původu produkovaný různými druhy bakterií (např. *Cupriavidus necator*), který je tvořen jednotkami hydroxybutyrátu (HB) a hydroxyvalerátu (HV). Podporuje epidermální diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk kostní dřene a zároveň zlepšuje buněčnou adhezi a proliferaci. V této studii byl navržen a vyroben dvouvrstvý vláknitý nosič, kdy byly k výrobě použity pouze materiály přírodního původu, polymery PUL a PHBV. PHBV vrstva byla vyrobena tak, aby vytvořila hlavní regenerační vrstvu s větší velikostí pórů, PUL vrstva byla nanášena na vrstvu PHBV a tvořila membránu a menší velikostí pórů, která sloužila jako bariéra proti infekci. PHBV vrstva (spodní fáze) nosiče byla vyrobena mokřím elektrostatickým zvlákňováním, při kterém byla vlákna shromažďována do ethanolové lázně. Po shromáždění vláken na ethanol došlo k vytvoření 3D struktury (Obr. 21). Tato vrstva byla označována jako regenerační, podporovala proliferaci buněk a migraci, transport  $O_2$  a přenos živin. PUL vrstva vyrobená metodou suchého elektrostatického zvlákňování sloužila jako ochranná membrána, která zajišťovala prevenci proti přenosu bakterií a ztrátě vody. Obě vrstvy se od sebe lišily průměrem vláken, průměr vláken PUL vrstvy se pohyboval v nanometrech (cca 264,1 nm), kdežto průměr vláken PHBV byl v řádu mikrometrů (cca 5,68  $\mu\text{m}$ ). Odlišnost ve velikosti vláken je dána použitým roztokem při výrobě, kdy vlákna PHBV byla shromažďována v ethanolu, zatímco vlákna PUL v demineralizované vodě. Dalším faktorem v odlišnosti vláken je jejich rozdílná metoda výroby (Dalgic et al., 2021).

Jedním z hlavních požadavků na buněčný nosič je rychlost degradace. V nedávné studii byla rychlost degradace sledována po dobu 14 dnů, kdy bylo potvrzeno, že vytvořený dvouvrstvý nosič je vhodný pro aplikace krytí ran. Velkou mírou k tomu přispěla velikost vláken PHBV vrstvy. Dalšími sledovanými parametry byla schopnost zadržovat vodu, zabránit přenosu bakterií a udržet ránu vlhkou. Regulace vlhkosti je důležitou vlastností při hojení, poněvadž poškozená kůže má až dvacetkrát větší ztrátu vody než kůže zdravá. Nosič by proto měl být schopen udržet v oblasti rány optimální vlhkost a přebytečný exsudát absorbovat. Vyroběný nosič je vhodný pro rány s nízkým až středním exsudátem a je slibným kandidátem k léčbě ran (Dalgic et al., 2021).



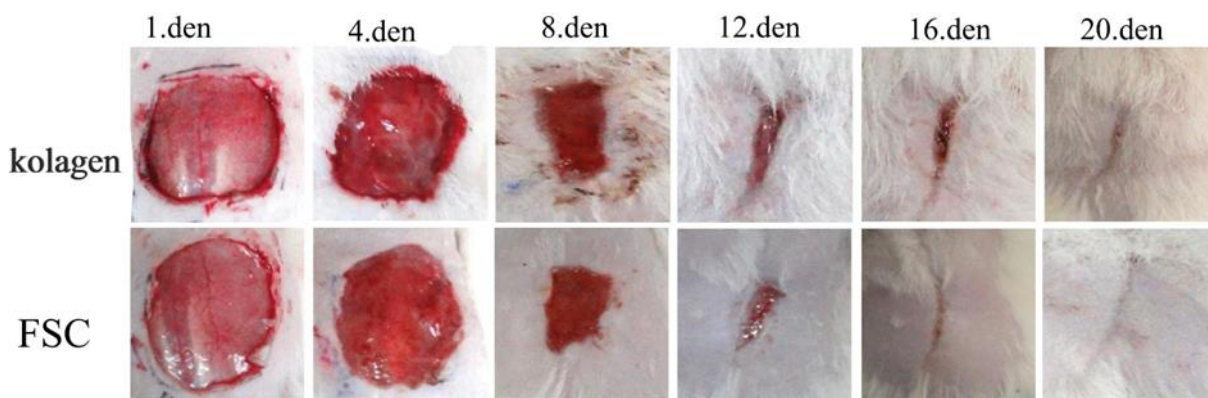
**Obr. 21: Makromorfologie dvouvrstvého nosiče po elektrostatičném zvlákňování PUL vrstvy na PHBV vrstvu:** (a), (b) pohled shora na povrch dvouvrstvého nosiče, (c), (d) morfologie vláken PUL vrstvy pozorována rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) při zvětšení 10000x a 30000x, (e), (f) morfologie vláken PHBV vrstvy pozorovaná pod SEM při zvětšení 2000x a 5000x (Dalgic et al., 2021).

#### 4.2.2 Kolagenový nosič vyztužený furfurem

Kolagen je výborný biomateriál pro hojení ran, který poskytuje mechanickou podporu a ochranu před vnějším prostředím. Lze jej snadno vytvarovat do vysoce organizovaných trojrozměrných nosičů. Zničení přirozeného zesíťování při extrakci vyžaduje stabilizaci kolagenu, který se může během výroby rozpadnout. Ke stabilizaci se využívá například furfural, což je organická sloučenina odvozená z rostlinných pentosanů. Experiment byl proveden na samicích potkanů Wistar, kterým byly na hřbetní straně vytvořeny otevřené excizní rány. Potkani byli rozděleni do dvou skupin, z nichž jedna skupina byla ošetřena pouze kolagenem, druhá skupina kolagenovým nosičem (FSC), který se měnil každý čtvrtý den až do úplného uzavření rány. 20. den bylo pozorováno uzavření rány jak u kolagenu, tak u potkanů léčených FSC (Obr. 22). Byla hodnocena mechanická pevnost zhojené kůže, protože kolagenová vlákna v nově vytvořené tkáni jsou neorganizovaná a slabá, což vede k praskání již zahojené rány. Pevnost v tahu u FSC byla téměř dvojnásobná. Přidání furfuralu

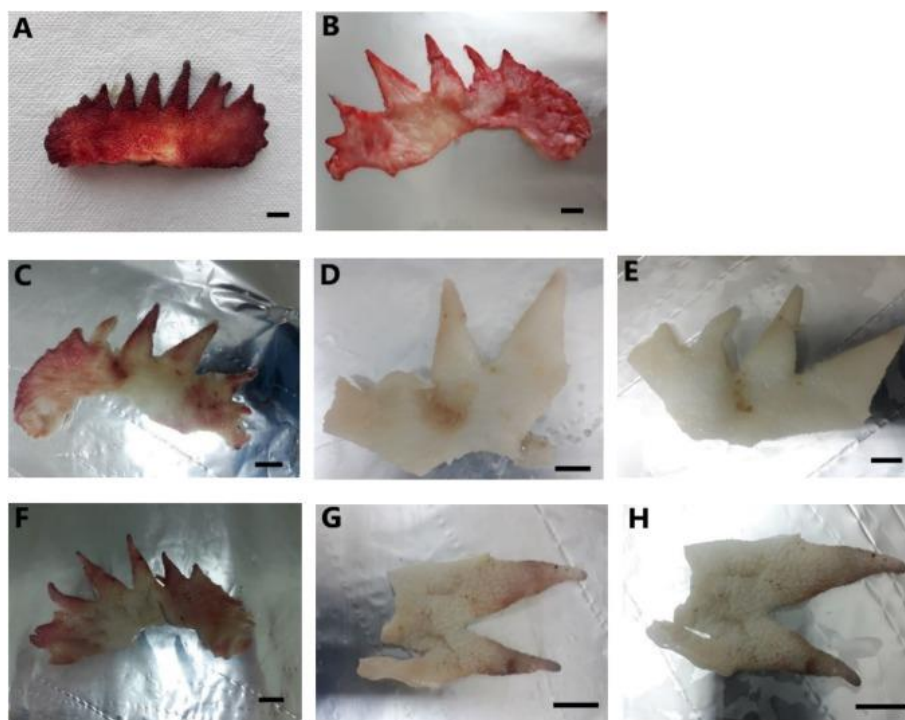
do kolagenového nosiče vedlo ke správnému vyrovnání fibril, což usnadnilo vytvoření stabilní sítě a následnému zvýšení mechanických vlastností kůže (Lakra et al., 2022).

Nosič FSC podporoval syntetické vyrovnání fibril, což vedlo k větší kompaktnosti, čímž byly zvýšeny mechanické vlastnosti kůže. Usnadnil i proces hojení a zkrátil dobu léčby, což z něj učinilo vhodného kandidáta na biomedicínskou aplikaci (Lakra et al., 2022).



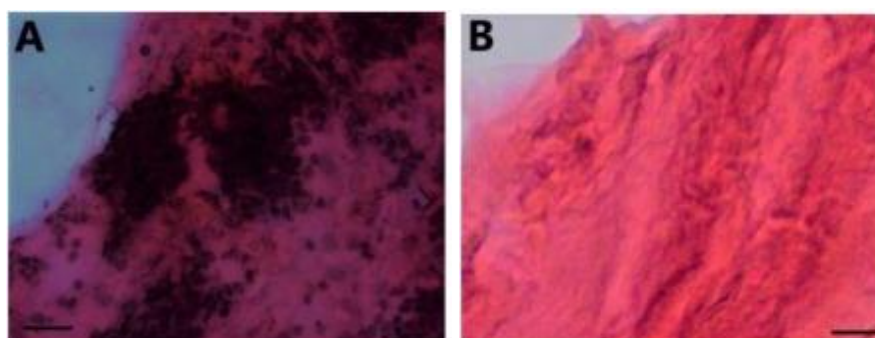
**Obr. 22: Fotografie excizních ran samic potkanů Wistar ošetřených kolagenem a FSC znázorňující průběh hojení; Rány pozorovány po dobu dvaceti dnů (Lakra et al., 2022).**

Další možností výroby nosičů sloužících k hojení ran je využití decelularizovaného kohoutího hřebene. Kohoutí hřeben se skládá ze tří hlavních částí, kterými jsou epidermis, dermis a pojivová tkáň. Mimo jiné obsahuje kolagenová vlákna, tukovou tkáň, mnoho velkých žil a tepen, velké množství glykosaminoglykanů a velké množství kyseliny hyaluronové, která slouží k hydrataci, tvorbě rámce pro migraci buněk apod. Cílem studie bylo připravit decelularizovaný kohoutí hřeben jako biomateriál pro použití v aplikacích tkáňového inženýrství. Získané vzorky kohoutích hřebenů byly naříznuty, aby se zlepšila difúze decelularizačních činidel a byly opláchnuty sterilním roztokem fosfátového pufru (PBS), který obsahuje 1 % penicilinu. Decelularizace byla provedena dvěma různými způsoby. V prvním případě byly vzorky ošetřeny 1% SDS v PBS po dobu 6 hodin (SDS-6 h), 24 hodin (SDS-24 h) a 48 hodin (SDS-48 h). V druhém případě byly ošetřeny 1% Tritonem X-100 v PBS po stejně dlouhou dobu, jako v prvním případě. Decelularizované kohoutí hřebeny byly opláchnuty sterilním PBS. Výsledky ukazují, že barva tkáně vybledla a stala se bělejší (Obr. 23). Je také patrné, že buňky a buněčné složky ve skupině SDS-6 h byly stále přítomny, k jejich odstranění došlo až po 24 a 48 hodinách decelularizace (Inci, 2021).



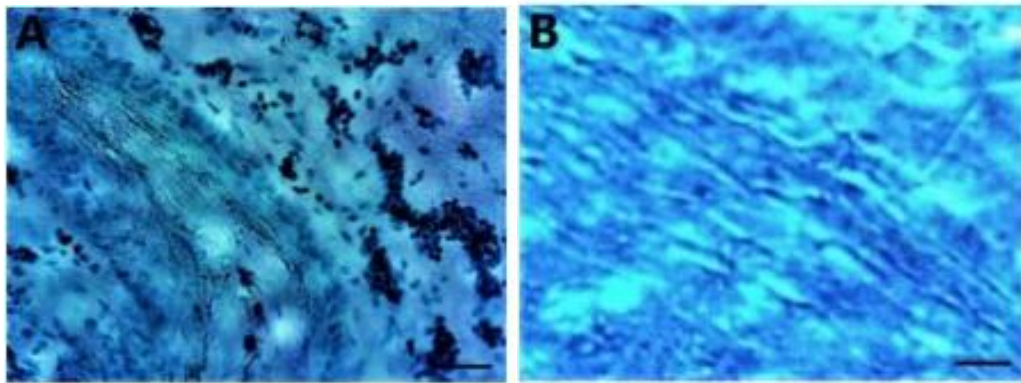
**Obr. 23: Makroskopické snímky nativního kohoutího hřebene:** (A), nativního kohoutího hřebene řezaného ve svislém průřezu (B), skupiny SDS-6 h (C), skupiny SDS-24 h (D), skupiny SDS-48 h (E), skupiny Triton-6 h (F), skupiny Triton-24 h (G) a skupiny Triton-48 h (H). Měřítko 1 cm. (Inci, 2021)

Účinnost procesu decelularizace a morfologie decelularizovaných tkání byla analyzována pomocí barvení tkání hematoxylinem a eosinem. V nativním kohoutím hřebenu byla jádra buněk zbarvena tmavě modrou barvou, extracelulární matrix a kolagenová vlákna byly zbarveny růžově. V decelularizovaných tkáních nebyla zbarvena žádná buňka, což ukazuje na účinnost decelularizačních procedur. V dalším kroku histologické analýzy byly decelularizované vzorky a nativní kohoutí hřeben obarveny toluidinovou modří, aby se vizualizovala intenzita GAG. Na obrázku 24 jsou v nativním vzorku jasně vidět tmavě modrá jádra buněk, které byly během decelularizace odstraněny (Inci, 2021).



**Obr. 24: Ukázka barvení preparátu hematoxylinem a eosinem:** A) Nativní preparát, B) decelularizovaný preparát (Inci, 2021).

Kromě toho lze na pozorovat zesvětlování modré barvy, což naznačuje pokles GAG ve tkáni (Obr. 25). Výsledky rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) decelularizovaných vzorků potvrdily odstranění buněk během decelularizačního procesu, zároveň bylo prokázáno toxické poškození tkáňové struktury vzorků decelularizovaných Tritonem X-100. Tyto vzorky měly nepravidelnou vláknitou strukturu, a navíc Triton X-100 poškodil také ECM a morfologii tkání (Inci, 2021).



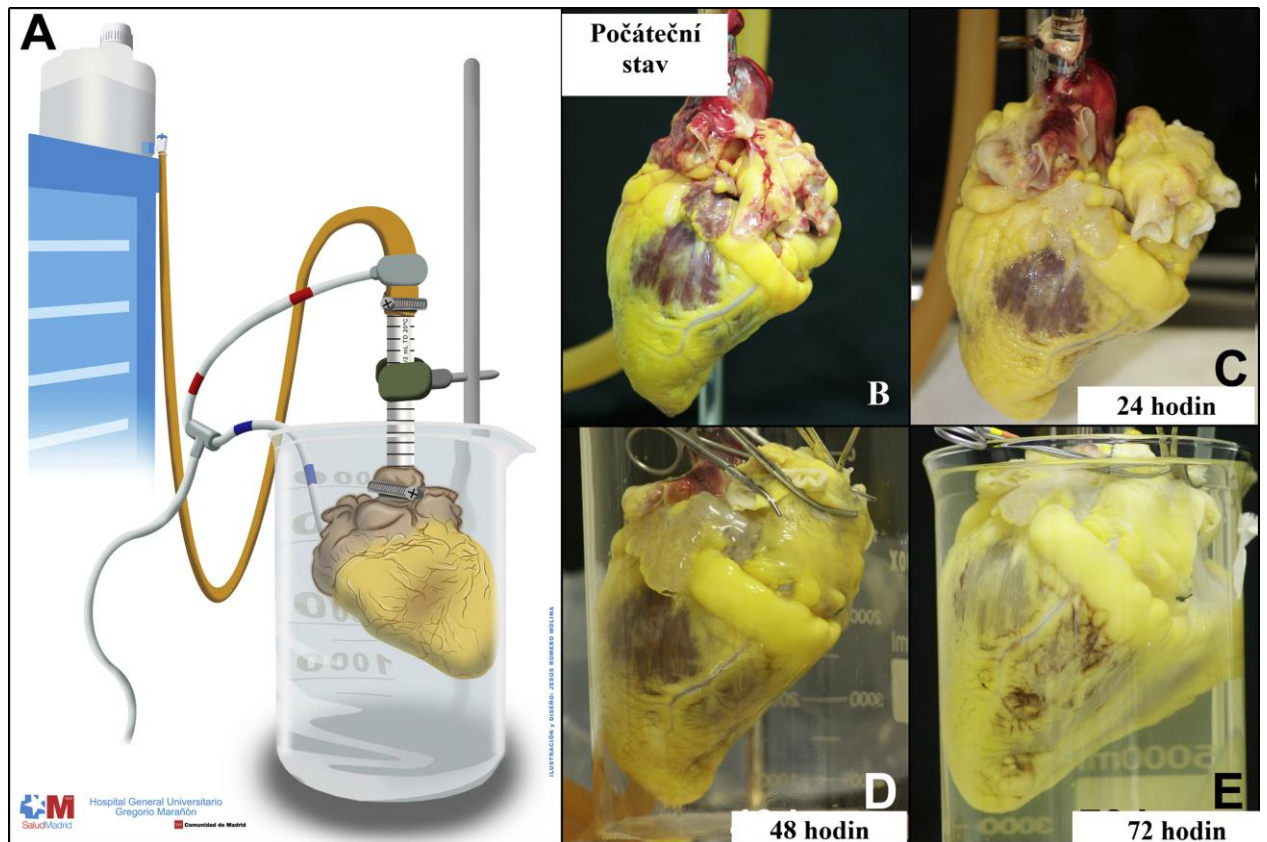
**Obr. 25: Ukázka toluidinového barvení:** A) nativního hřebene, B) decelularizovaného kohoutího hřebene, decelularizace po dobu 6 hodin (Inci, 2021).

V nedávno provedené studii byla poprvé popsána charakteristika decelularizovaného kohoutího hřebene, který by mohl posloužit jako levný, snadno dostupný a biokompatibilní nosič aplikovaný ve tkáňovém inženýrství, podporující růst a proliferaci buněk. Bylo zjištěno, že decelularizace prováděná 24 hodin je z hlediska cytotoxicity, mechanických vlastností a zachování struktury tkáně pro přípravu nosiče nejvhodnější. Bylo prokázáno, že aplikace SDS prokázala lepší výsledky v ochraně morfologie a struktury tkání ve srovnání s Tritonem X-100, vzorky měly taktéž vyšší úroveň mechanických vlastností a cytotoxicity. Závěrem lze shrnout, že decelularizovaný kohoutí hřeben by se mohl v budoucnu využívat jako nosič pro regeneraci kožní tkáně (Inci, 2021).

### 4.3 Studie využívající metodu decelularizace

Srdeční selhání je ve většině světa jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Jen ve Spojených státech žije téměř 5 milionů lidí se srdečním selháním, ročně je diagnostikováno asi 550 000 nových případů (Ott et al., 2008). Navzdory zlepšení v lékařské i přístrojové terapii zůstává transplantace srdce definitivním řešením, dárců srdce však stále ubývá. Vytvoření autologního „bioměřného“ srdce by mohlo tato omezení překonat. K odstranění buněk, ale se zachovanou ECM, byla použita decelularizační technika s 1 % detergentem dodecylsulfátem sodným v deionizované vodě. Schéma decelularizace je znázorněno na obrázku 26. Během procesu

decelularizace dochází ke ztrátě barvy srdce, protože decelularizace postupuje nejprve z nejtenčích oblastí, jako jsou velké cévy a síně, směrem k nejsilnějším oblastem srdce, takže se v konečném procesu srdce jeví jako průhledné (Sánchez et al., 2016).



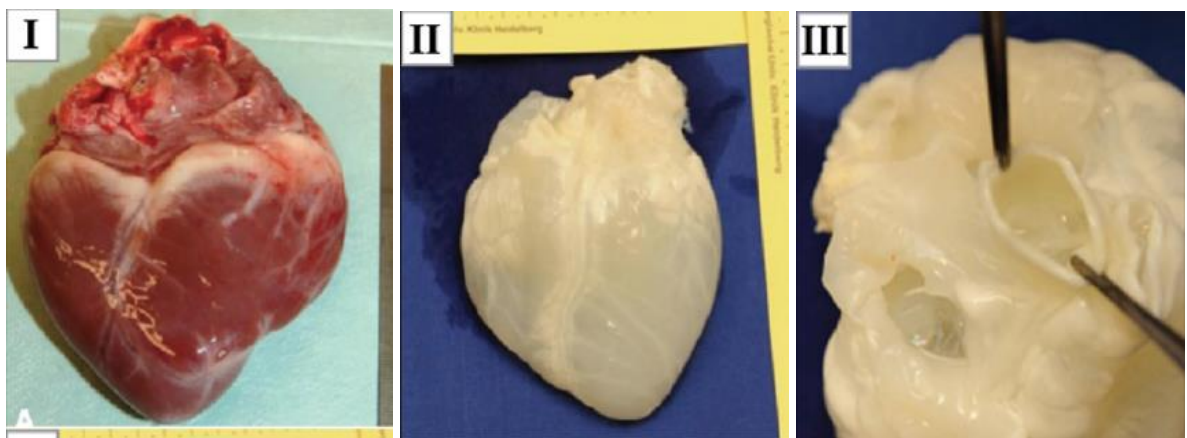
**Obr. 26: Decelularizace srdce:** A) schéma decelularizace, B) počáteční stav před decelularizací, C) srdce decelularizované 24 hodin, D) srdce 48 hodin po decelularizaci, E) srdce decelularizované 72 hodin (Sánchez et al., 2016).

Chlopenní vady srdce jsou v současnosti léčeny buď mechanickými nebo bioprotetickými srdečními chlopněmi. Mechanické chlopně však vyžadují celoživotní antikoagulační terapii, bioprotetické chlopně postupem času kalcifikují a degradují, což vyžaduje následné operace a náhrady (Snyder & Jana, 2022).

Mechanické srdeční chlopně jsou vyrobeny z materiálů, jako je titan a uhlík. Obvykle se skládají ze dvou lístků a kovového kroužku obklopeného kroužkem pleteniny, který je našit na srdce místo původní chlopně. Hlavní výhodou mechanických chlopní je jejich trvanlivost. Nevýhodou je, že poskytují povrch, na kterém se mohou tvořit krevní sraženiny. Každý, komu byla implantována mechanická chlopeň, musí celoživotně užívat léky na ředění krve, aby se zabránilo vzniku krevních sraženin způsobujících srdeční infarkt nebo cévní mozkovou příhodu. Tkáňové srdeční chlopně, známé také jako biologické nebo bioprotetické, se skládají ze zvířecí tkáně původem od prasat, skotu či koní nebo je použita lidská tkáň

z dárcovského lidského srdce, známá jako aloštěp. Výhodou tkáňových chlopní je nepotřebná léčba léky na ředění krve, nevýhodou je relativně špatná životnost ve srovnání s mechanickými chlopněmi. Mnohé z nich vyžadují opětovnou operaci po 10 až 20 letech (Harris C. et al., 2015).

Decelularizované nosiče srdečních chlopní mohou být alternativou k současným srdečním náhradám. Mezi základní parametry patří udržování vnitřní a vnější morfologie tkáně, zachování velikosti chlopně, prevence kalcifikace a trombózy, zajištění imunokompatibility a udržení mechaniky chlopně. Tkáň z alogenních i xenogenních zdrojů musí být před implantací decelularizována, aby došlo k odstranění imunitně citlivých materiálů a buněk, což snižuje riziko odmítnutí a umožňuje hostitelským buňkám recelularizovat nosič. Decelularizace pomocí detergentu SDS nepoškodila kolagen a elastin v chlopni, ale došlo k mírnému narušení GAG (Obr. 27). Bylo prokázáno, že tkáň srdeční chlopně ošetřená SDS zadržuje bovinní antigeny a růstové faktory, které mohou podporovat imunologickou odpověď (Snyder & Jana, 2022).



**Obr. 27: Decelularizace založená na použití detergentu dodecylsulfátu sodného.** Vyobrazení srdce před (I) a po (II) decelularizaci. Decelularizovaná srdeční chlopeň (III) před excízi (Snyder & Jana, 2022).

Enzymatické metody se zaměřují na proteinové vazby a narušují buněčné procesy, dlouhodobé vystavení těmto enzymům způsobuje poškození tkání. Pro decelularizaci srdečních chlopní se nejčastěji využívá trypsin, který se štěpí peptidovými vazbami na C-konci argininu nebo lysinu. Většinou se ke zlepšení odstranění buněčného materiálu používá trypsin v kombinaci s jinými činidly, např. Triton X-100. Chlopně ošetřené těmito dvěma metodami nevykazovaly zjevné poškození, tkáň byla bez buněk, ale došlo k uvolnění ECM, což je v případě správného decelularizačního postupu nežádoucí (Snyder & Jana, 2022).

Decelularizované nosiče srdečních chlopní mohou v blízké budoucnosti nahradit mechanické a bioprotetické chlopně. Aby nosiče byly životaschopnou náhradou srdečních chlopní, musí být schopny dlouhodobě fungovat *in vivo*, podporovat adhezi buněk a buněčný růst, umožňovat tvorbu endotelu na povrchu implantované chlopně a nezpůsobovat imunitní reakci v důsledku přítomnosti cizích antigenů. V nedávné studii bylo testováno několik technik decelularizace prasečích chlopní, které se za posledních 30 let výrazně zlepšily, ale stále vyžadují další, podrobnější testování (Snyder & Jana, 2022).

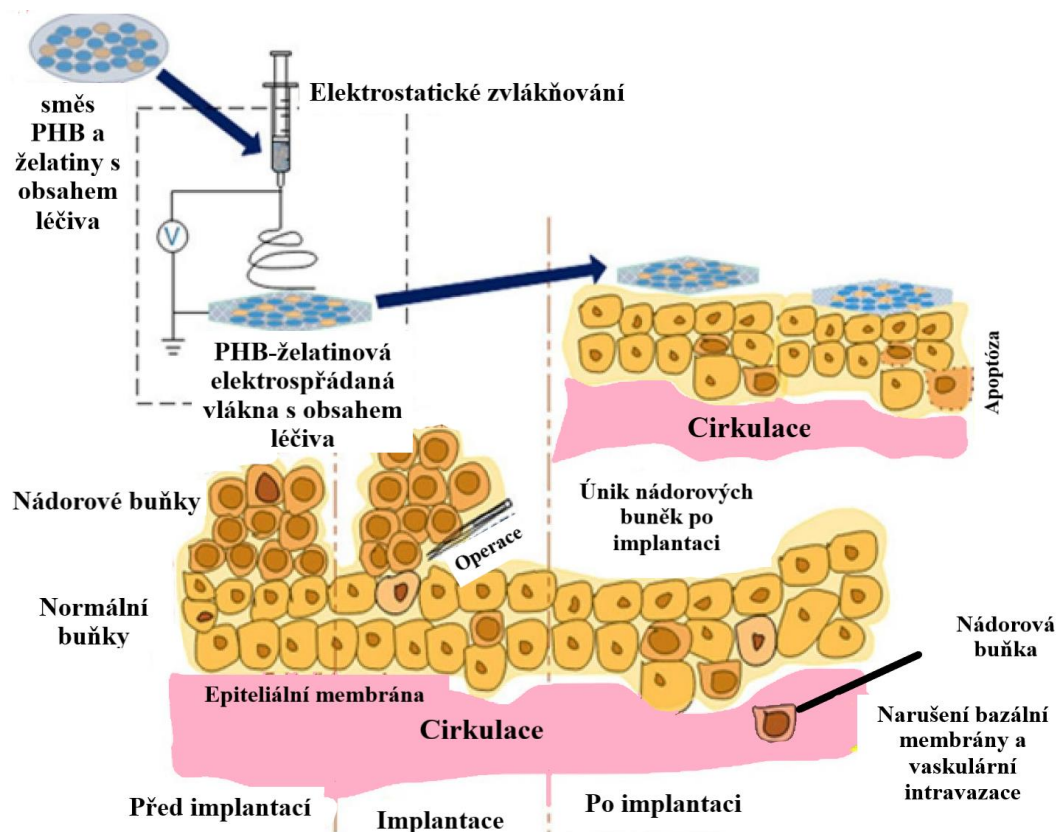
#### **4.4 Nosiče používané při léčbě rakoviny**

Rakovina je v podstatě nekontrolovatelná buněčná proliferace, která agresivně napadá jiné části těla. Je jednou z nejčastějších příčin úmrtí v ekonomicky rozvojových i rozvinutých zemích (Naderinezhad et al., 2017). V závislosti na postižené části organismu respektive systému je rakovina klasifikována jako rakovina krve, rakovina kostí, rakovina prsu, endokrinní rakovina, genitourinární rakovina, rakovina trávicího nebo gastrointestinálního traktu, rakovina dýchacích cest, rakovina kůže a mnoho dalších. Předpokládá se, že do roku 2030 bude na celém světě více než 24,1 milionů úmrtí na rakovinu. Léčba je v dnešní společnosti velkým problémem, k tomu přispěla i celosvětová pandemie COVID-19, kdy byl výzkum rakoviny odkloněn a celý svět se zabýval léky na toto onemocnění (Chaurasiya et al., 2023).

Recidiva nádoru po operaci je významným problémem po celém světě. Během posledních několika desetiletí se rakovina stala významnou hrozbou pro lidský život a hlavní příčinou úmrtnosti na celém světě (Ramanathan et al., 2022). Růst a progresse nádoru je způsoben speciálními rakovinnými proteiny, které jsou přítomny také ve zdravých tkáních, ale v rakovinných tkáních se nadměrně exprimují (Gupta et al., 2023). Nejčastější léčbou bylo použití chirurgického odstranění nádorové tkáně s následnou pooperační chemoterapií, avšak poté, co byl nádor odstraněn, některé nádorové tkáně vstoupily do celkového oběhu a zůstaly v těle. Vzhledem k významné ztrátě léčivých materiálů dříve, než se dostaly k cílovým rakovinným buňkám, bylo zapotřebí velkého množství dávky protinádorových léčiv, což vedlo k různým vedlejším účinkům, jako např. průjem, zvracení, selhání imunitního systému a anémie. Tyto nevýhody vedly vědce k vytvoření co nejlepšího materiálu pro zvýšení dodávání léčiv do rakovinných buněk, který minimalizuje dávkování léčiv, snižuje vedlejší účinky a zabraňuje pooperační invazi a metastazování (Ramanathan et al., 2022). Bylo zjištěno, že biologicky odbouratelné nosiče mají mnohá využití, zejména proto, že působí jako nosná molekula a nemusí být odstraněny z těla (Gupta et al., 2023).



Jednou z možností léčby rakoviny je výroba dvojitého nanovláčenného nosiče s kyselinou polyhydroxymáselnou a želatinou. Kyselina poly-3-hydroxymáselná a želatina umožňují zapouzdření nabitých molekul léčiv uvnitř nanovláček, které pak mohou být použity jako nosiče léků při léčbě rakoviny (Ramanathan et al., 2022). Nanovláčenné nosiče mohou také snížit hrozbu bakterií rezistentních na antibiotika a rezistenci vůči více lékům při léčbě místně specifickým, dávkově specifickým a časovaným uvolňováním různých typů léků. Další velkou výhodou je podobnost nanovláček s přirozenou fibrilární ECM, která usnadňuje připojení a proliferaci buněk pro biomedicínské aplikace (Luraghi et al., 2021). Cílem této studie bylo snížení recidivy nádoru s dvojitým léčivým nanovláčenným nosičem v místě pooperačního nádoru, viz. obrázek 28 (Ramanathan et al., 2022).

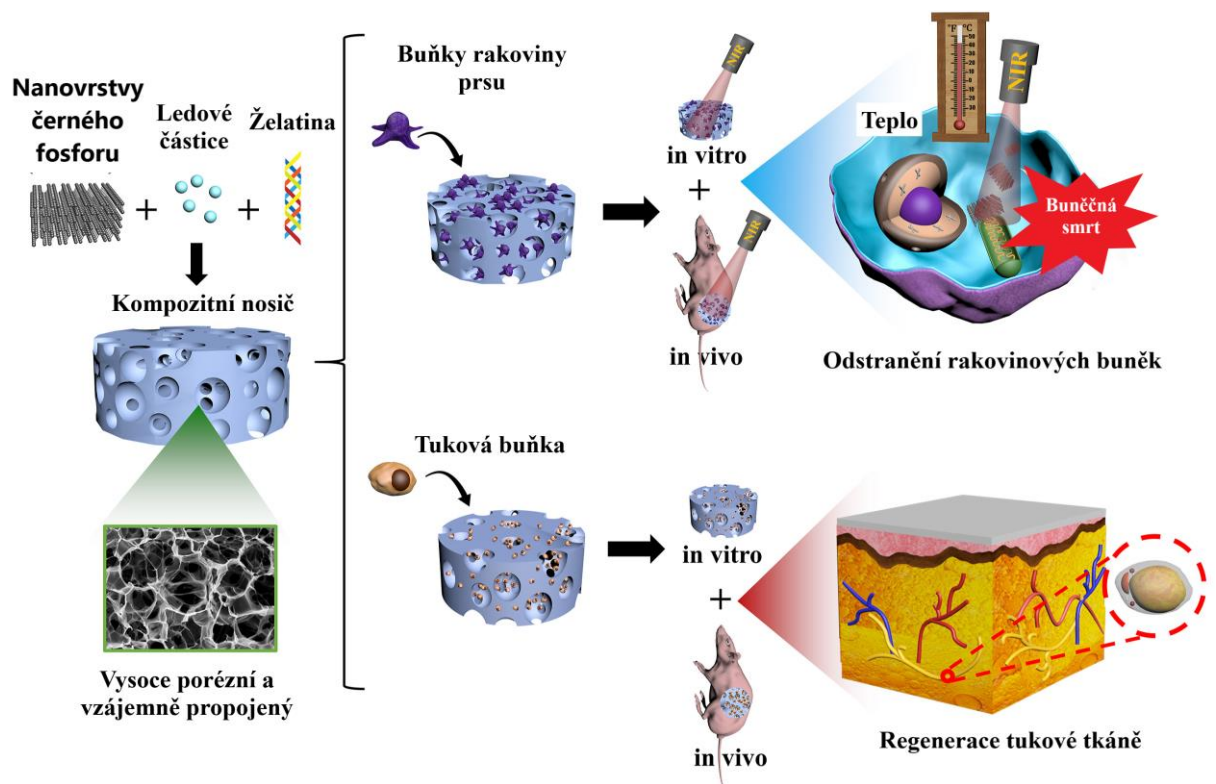


**Obr. 28:** Schematické znázornění mechanismu nanovláčenného nosiče v místě pooperačního nádoru (upraveno dle Ramanathan et al., 2022).

Nanovláčenné nosiče byly ve studii *Ramanathan et al., 2022* vyrobeny technikou elektrostatického zvlákňování a byly charakterizovány pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Morfologie nanovláček je důležitým parametrem pro růst normálních i rakovinných buněk. PG nosič měl vynikající pórovitost, bobtnání, buněčnou adhezi a proliferaci, proto může být považován za velmi účinný. Uvolňování léčiv vázaných na nosič bylo výrazně pomalejší než uvolňování volných léčiv, což lze hodnotit jako velmi dobrý

parametr, který potlačuje růst nádorových buněk v resekcí oblasti a současně napraví tkáňový defekt. Kromě toho vyrobený nosič vykazoval dobrou biokompatibilitu a snížení životaschopnosti nádorových buněk. Vyrobený nanovláknový nosič PG-FU-MT s duálními léky poskytoval jednotnou hladkou morfologii nanovláken, s dobrou pórovitostí a dlouhodobým trvalým uvolňováním léčiva než volné léky. Synergický účinek léčiv z nosiče měl lepší protinádorovou aktivitu po chirurgické resekcii, což jej činí vhodným kandidátem pro pooperační terapeutickou aktivitu (Ramanathan et al., 2022).

Další nedávná studie *Sutrisno et al., 2021* se zabývala léčbou rakoviny prsu, která má vysokou úmrtnost po celém světě. V této studii byl vytvořen kompozitní nosič z černého fosforu (BP) a želatiny tak, aby zabíjel rakovinné buňky v prsní tkáni a indukoval rekonstrukci tukové tkáně po resekcii nádoru. Nosič byl připraven vložením BP do porézního želatinového nosiče, předem připravené ledové částice byly použity k přesnému nastavení velikosti pórů. Protinádorová účinnost byla analyzována *in vitro* v buněčných kulturách a *in vivo* pokusem na zvířatech pod laserovou expozicí (Obr. 29). BP-želatinový kompozitní nosič zcela zabil všechny rakovinné buňky a jeho dobře propojené póry umožnily rakovinným buňkám migrovat do nosiče, kde došlo k jejich zničení pomocí laserového ozáření. BP-želatinový kompozitní nosič by v blízké době mohl být účinný pro destrukci různých typů rakovinných buněk, a tím účinný např. při léčbě melanomu, osteosarkomu apod. (Sutrisno et al., 2021).



Obr. 29: Schéma přípravy nosiče z černého fosforu a želatiny a jeho aplikace pro terapii proti buňkám karcinomu prsu a rekonstrukci prsní tkáně (upraveno dle Sutrisno et al., 2021).

## ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo podrobně popsat buněčné nosiče aktuálně využívané ve tkáňovém inženýrství. Úvodní část práce je věnována tkáňovému inženýrství obecně a regenerativní medicíně. Následně je definován pojem „buněčné nosiče“ a jsou popsány jejich vlastnosti, funkce a požadavky, jako např. biokompatibilita, pórovitost, biologická rozložitelnost, životnost, cytotoxicita, karcinogenita apod.

Dále se práce věnuje materiálům, ze kterých mohou být nosiče vyrobeny, a také výrobním technikám, které jsou v současné době využívány. Je zde představena například metoda 3D tisku, elektrostatického zvlákňování, stereolitografie, ale také decelularizace, která je v tkáňovém inženýrství v současné době velmi oblíbená. Materiály, ze kterých jsou nosiče vyráběny, se rozdělují na přírodní a syntetické. Mezi přírodní polymery patří například kolagen, chitosan, alginát či fibrin, mezi syntetické polymery patří polykaprolakton, kyselina polymléčná, polyethylenglykol a jiné. V posledních kapitolách této práce jsou představeny různé klinické aplikace a studie nosičů. Jednou z nich je i metoda decelularizace prasečího srdce, při které dochází k odstranění buněk a ztrátě barvy, čímž se srdce jeví jako průhledné. Další studie se zabývá decelularizací prasečích srdečních chlopní, které mohou sloužit jako alternativa k současným mechanickým srdečním náhradám.

Buněčné nosiče jsou velmi žádané v oblasti tkáňového inženýrství, nicméně aby mohly být tyto nosiče použity v praxi, je potřeba jejich detailnější charakteristika a případná modifikace ke zlepšení biokompatibility. Vzhledem k jejich vlastnostem, funkcím a nespočtu výhod mohou být v blízké době velmi dobrým pomocníkem při léčbě široké škály onemocnění.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. ABBASI, Naghmeh, Stephen HAMLET, Robert M. LOVE, Nam-Trung NGUYEN. **Porous scaffolds for bone regeneration.** *Journal of Science: Advanced Materials and Devices.* 2020, 5(1), 1-9. ISSN 24682179. DOI:10.1016/j.jsamd.2020.01.007
2. BADEKILA, Anjana K., Sudarshan KINI, Amit K. JAISWAL. **Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture.** *A review. Journal of Cellular Physiology.* 2021, 236(2), 741-762. ISSN 0021-9541. DOI:10.1002/jcp.29935
3. BOZOUDI, Despina a Dimitrios TSALTAS. **The Multiple and Versatile Roles of Aureobasidium pullulans in the Vitivinicultural Sector.** *Fermentation.* 2018, 4(4). ISSN 2311-5637. DOI:10.3390/fermentation4040085
4. BRAUN, Martin, Šárka RÝGLOVÁ a Tomáš SUCHÝ. Determination of glycosaminoglycans in biological matrices using a simple and sensitive reversed-phase HPLC method with fluorescent detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2021, 1173. ISSN 15700232. DOI:10.1016/j.jchromb.2021.122626
5. CARLETTI, Eleonora, Antonella MOTTA a Claudio MIGLIARESI. **Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture.** In: HAYCOCK, John W., ed. **3D Cell Culture.** Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-10-07, s. 17-39. *Methods in Molecular Biology.* ISBN 978-1-60761-983-3. DOI: 10.1007/978-1-60761-984-0\_2
6. DALGIC, Ali Deniz, Ezgi KOMAN, Ayten KARATAS, Aysen TEZCANER, Dilek KESKIN. **Natural origin bilayer pullulan-PHBV scaffold for wound healing applications.** *Biomaterials Advances.* 2022, 134. ISSN 27729508. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112554
7. DUAN, Jing, Huiping SHAO, Hongyuan LIU, Jing XU, Mengmeng CONG et al. **3D gel-printing of hierarchically porous BCP scaffolds for bone tissue engineering.** *Journal of the European Ceramic Society.* 2023, 43(6), 2646-2653. ISSN 09552219. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2023.01.010
8. ENNEMOSER, Maria, Alexandra PUM, Andreas KUNGL. **Disease-specific glycosaminoglycan patterns in the extracellular matrix of human lung and brain.**

- Carbohydrate Research*. 2022, 511 [cit. 2023-05-14]. ISSN 00086215. DOI: 10.1016/j.carres.2021.108480
9. GUPTA, Archana A., Supriya KHEUR, Ravindra V. BADHE, Saranya VARADARAJAN, Madhura SHEKATKAR et al. **Potential use of anti-cancer drugs coated scaffolds for local drug delivery in cancer cell lines.** *Oral Oncology Reports*. 2023, 6. ISSN 27729060. DOI: 10.1016/j.oor.2023.100032
  10. HARRIS C., CROCE B., CAO C. **Tissue and mechanical heart valves.** *Ann Cardiothorac Surg*. 2015 Jul;4(4):399. DOI: 10.3978/j.issn.2225-319X.2015.07.01. PMID: 26309855; PMCID: PMC4526499
  11. HASANZADEH, Rezgar, Taher AZDAST, Mehran MOJAVER, Mohammad M. DARVISHI, Chul B. PARK. **Cost-effective and reproducible technologies for fabrication of tissue engineered scaffolds: The state-of-the-art and future perspectives.** *Polymers*. 2022, 244. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/j.polymer.2022.124681
  12. HILLEBRANDT, Karl H., Hannah EVERWIEN, Nils HAEP, Eriselda KESHI, Johann PRATSCHKE, Igor M. SAUER. **Strategies based on organ decellularization and recellularization.** *Transplant International*. 2019. ISSN 0934-0874. DOI: 10.1111/tri.13462
  13. CHAURASIYA, Abhishek, Simranpreet K WAHAN, Chandrakant SAHU, Pooja A CHAWLA. **An insight into the rational design of recent purine-based scaffolds in targeting various cancer pathways.** *Journal of Molecular Structure*. 2023, 1274. ISSN 00222860. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134308
  14. CHEN, Chih-Hao, Victor Bong-Hang SHYU, Jyh-Ping CHEN, Ming-Yih LEE. **Selective laser sintered poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffold hybridized with collagen hydrogel for cartilage tissue engineering.** *Biofabrication*. 2014, 6(1). ISSN 1758-5082. DOI: 10.1088/1758-5082/6/1/015004
  15. CHOUDHURY, Deepak, Marcus YEE, Zach Lee Jia SHENG, Ahmad AMIRUL, May Win NAING. **Decellularization systems and devices: State-of-the-art.** *Acta Biomaterialia*. 2020, 115, 51-59. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.07.060

16. IJIMA, Kazutoshi a Hidenori OTSUKA. **Cell Scaffolds for Bone Tissue Engineering.** *Bioengineering.* 2020, 7(4). ISSN 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering7040119
17. INCI, Ilyas. **Preparation and characterization of decellularized rooster comb as a scaffold for tissue engineering applications.** *Tissue and Cell.* 2021, 73. ISSN 00408166. DOI: 10.1016/j.tice.2021.101614
18. INGLE, Pramod U., Sudhir S. SHENDE, Prashant R. SHINGOTE, et al. **Chitosan nanoparticles (ChNPs): A versatile growth promoter in modern agricultural production.** *Heliyon.* 2022, 8(11). ISSN 24058440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11893
19. KAČAREVIĆ, Željka, Patrick RIDER, Said ALKILDANI, Sujith RETNASINGH, Ralf SMEETS et al. **An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects.** *Materials.* 2018, 11(11). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma11112199
20. KESAVAN, Sathesh Kumar, Deepa SELVARAJ, Sathiamurthi PERUMAL, Arockiarajan ARUNACHALAKASI, Nalini GANESAN et al. **Fabrication of hybrid povidone-iodine impregnated collagen-hydroxypropyl methylcellulose composite scaffolds for wound-healing application.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2022, 70. ISSN 17732247. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103247
21. KOGUT, Małgorzata M., Mateusz MARCISZ, Sergey A. SAMSONOV. **Modeling glycosaminoglycan–protein complexes.** *Current Opinion in Structural Biology.* 2022, 73. ISSN 0959440X. DOI: 10.1016/j.sbi.2022.102332
22. LAKRA, Rachita, Manikantan Syamala KIRAN, Purna SAI KORRAPATI. **Collagen scaffold reinforced with furfural for wound healing application.** *Materials Letters.* 2022, 315. ISSN 0167577X. DOI: 10.1016/j.matlet.2022.131956
23. LEITE, Maria Luísa, Caroline ANSELMINI, Igor Paulino Mendes SOARES, Adriana Pigozzo MANSO, Josimeri HEBLING et al. **Calcium silicate-coated porous chitosan scaffold as a cell-free tissue engineering system for direct pulp capping.** *Dental Materials.* 2022, 38(11), 1763-1776. ISSN 01095641. DOI: 10.1016/j.dental.2022.09.014

24. LITOWCZENKO, Jagoda, Marta J. WOŹNIAK-BUDYCH, Katarzyna STASZAK, Karolina WIESZCZYCKA, Stefan JURGA, Bartosz TYLKOWSKI. **Milestones and current achievements in development of multifunctional bioscaffolds for medical application.** *Bioactive Materials*. 2021, 6(8), 2412-2438. ISSN 2452199X. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.007
25. LURAGHI, Andrea, Francesco PERI, Lorenzo MORONI. **Electrospinning for drug delivery applications.** *Journal of Controlled Release*. 2021, 334, 463-484. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.033
26. MAIA, F. Raquel, Ana R. BASTOS, Joaquim M. OLIVEIRA, Vitor M. CORRELO, Rui L. REIS. **Recent approaches towards bone tissue engineering.** *Bone*. 2022, 154. ISSN 87563282. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116256
27. NADERINEZHAD, Samira, Ghasem AMOABEDINY, Fateme HAGHIRALSADAT. **Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers.** *RSC Advances*. 2017, 7(48), 30008-30019. ISSN 2046-2069. DOI: 10.1039/C7RA01736G
28. OTT, Harald C, Thomas S MATTHIESEN, Saik-Kia GOH, Lauren D BLACK, Stefan M KREN et al. **Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart.** *Nature Medicine*. 2008, 14(2), 213-221. ISSN 1078-8956. DOI: 10.1038/nm1684
29. POLONIO-ALCALÁ, Emma, Enric CASANOVA-BATLLE, Teresa PUIG, Joaquim CIURANA. **The solvent chosen for the manufacturing of electrospun polycaprolactone scaffolds influences cell behavior of lung cancer cells.** *Scientific Reports*. 2022, 12(1). ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-022-23655-2
30. PRASOPDEE, Thridsawan, Chomdao SINTHUVANICH, Rungsima CHOLLAKUP, Pimporn UTTAYARAT, Wirasak SMITTHIPONG. **The albumin/starch scaffold and its biocompatibility with living cells.** *Materials Today Communications*. 2021, 27. ISSN 23524928. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2021.102164



31. QU, Bai, Yangchao LUO. **Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors.** *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 152, 437-448. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.240
32. RAMANATHAN, Giriprasath, Muthukumar THANGAVELU, Sekar JEYAKUMAR GRACE FELCIYA, Uma TIRUCHIRAPALLI SIVAGNANAM. **Dual drug loaded polyhydroxy butyric acid/gelatin nanofibrous scaffold for possible post-surgery cancer treatment.** *Materials Letters*. 2022, 323. ISSN 0167577X. DOI: 10.1016/j.matlet.2022.132597
33. SÁNCHEZ, Pedro L., M. Eugenia FERNÁNDEZ-SANTOS, Salvatore COSTANZA, et al. **Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts.** *Biomaterials*. 2015, 61, 279-289. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.056
34. SÁNCHEZ, Pedro L, M<sup>a</sup> Eugenia FERNÁNDEZ-SANTOS, M<sup>a</sup> Angeles ESPINOSA, et al. **Data from acellular human heart matrix.** *Data in Brief*. 2016, 8, 211-219. ISSN 23523409. DOI: 10.1016/j.dib.2016.04.069
35. SKOOG, Shelby A., Peter L. GOERING, Roger J. NARAYAN. **Stereolithography in tissue engineering.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014, 25(3), 845-856. ISSN 0957-4530. DOI: 10.1007/s10856-013-5107-y
36. SILVA, Mariana P., Ishrat Jahan BADRUDDIN, Thierry TONON, Sameer RAHATEKAR, Leonardo D. GOMEZ. **Environmentally benign alginate extraction and fibres spinning from different European Brown algae species.** *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, 226, 434-442. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.306
37. SNYDER, Yuriy, Soumen JANA. **Strategies for development of decellularized heart valve scaffolds for tissue engineering.** *Biomaterials*. 2022, 288. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121675
38. SONG, Ziyu, Jiajun WANG, Shaojie TAN, Jing GAO, Lu WANG. **Conductive biomimetic bilayer fibrous scaffold for skin regeneration.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2023, 656. ISSN 09277757. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2022.130211

39. SRIWONG, Chotiwit, Suwimon BOONRUNGSIMAN, Prakrit SUKYAI. **Sugarcane bagasse cellulose-based scaffolds incorporated hydroxyapatite for promoting proliferation, adhesion and differentiation of osteoblasts.** *Industrial Crops and Products*. 2023, 192. ISSN 09266690. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115979
40. SUTRISNO, Linawati, Huajian CHEN, Yazhou CHEN, Toru YOSHITOMI, Naoki KAWAZOE et al. **Composite scaffolds of black phosphorus nanosheets and gelatin with controlled pore structures for photothermal cancer therapy and adipose tissue engineering.** *Biomaterials*. 2021, 275. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120923
41. TANEJA, Himanshu, Sandeep M. SALODKAR, Avanish SINGH PARMAR, Shilpi CHAUDHARY. **Hydrogel based 3D printing: Bio ink for tissue engineering.** *Journal of Molecular Liquids*. 2022, 367. ISSN 01677322. DOI: 10.1016/j.molliq.2022.120390
42. WANG, Chong, Wei HUANG, Yu ZHOU, Libing He, Zhi He et al. **3D printing of bone tissue engineering scaffolds.** *Bioactive Materials*. 2020, 5(1), 82-91. ISSN 2452199X. DOI:10.1016/j.bioactmat.2020.01.004
43. WANG, Yuancheng, Feng WANG, Riyuan WANG, Chi TIAN, Xiaoting HUA, Ping ZHAO, Qingyou XIA. **Human-derived cytokine functionalized sericin/agarose composite gel material with cell proliferation-promoting activity fabricated using genetically engineered silk for medical application.** *Materials & Design*. 2022, 224. ISSN 02641275. DOI: 10.1016/j.matdes.2022.111362
44. WANI, Shoib Mohmad, F.A. MASOODI, Sajad Ahmad MIR a F.A. KHANDAY. **Pullulan production by Aureobasidium pullulans MTCC 1991 from apple pomace and its characterization.** *Food Bioscience*. 2023, 51. ISSN 22124292. DOI:10.1016/j.fbio.2022.102254
45. WU, Shizhou, Lei LEI, Chongyun BAO, Jin Liu, Michael D.Weir et al. **An injectable and antibacterial calcium phosphate scaffold inhibiting Staphylococcus aureus and supporting stem cells for bone regeneration.** *Materials Science and Engineering: C*. 2021, 120. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111688

46. YAN, Xiaoxia, Zeyi LIU, Mengxue DIAO, Tiehua ZHANG. **Effect of molecular weight of chitosan on properties of chitosan-Zn nanoparticles.** *Food Bioscience.* 2022, 50. ISSN 22124292. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.102206
47. YANG, Hui, Lai WEI, Chen LIU, et al. **Engineering human ventricular heart tissue based on macroporous iron oxide scaffolds.** *Acta Biomaterialia.* 2019, 88, 540-553. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.02.024
48. ZHANG, Qiliang, Jian ZHOU, Peixuan ZHI, Leixin LIU, Chaozong LIU et al. **3D printing method for bone tissue engineering scaffold.** *Medicine in Novel Technology and Devices.* 2023, 17. ISSN 25900935. DOI: 10.1016/j.medntd.2022.100205
49. ZUCCA, Paolo, Roberto FERNANDEZ-LAFUENTE, Enrico SANJUST. **Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization.** *Molecules.* 2016, 21(11). ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules21111577