

# Hydrogely pro *in vitro* modely tkání

Bc. Marie Schrammová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2023/2024

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Marie Schrammová**  
Osobní číslo: **T22307**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Hydrogely pro in vitro modely tkání**

### Zásady pro vypracování

Živé tkáně jsou složité a dynamické systémy, které se snaží vědci po celém světě napodobit jak strukturně, tak i funkčně. Výbornými kandidáty pro přípravu *in vitro* tkáňových modelů jsou například hydrogely. Teoretická část diplomové práce bude především zaměřena na popis nativních tkání. V praktické části budou připraveny kompozitní hydrogely na bázi kolagenu, modifikované kyseliny hyaluronové a fibro-netkinu. Připravené materiály budou charakterizovány pomocí materiálových a biologických testů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Magno, V., et al. 2020. Polymer Hydrogels to Guide Organotypic and Organoid Cultures. *Adv. Funct. Mater.* 30, 2000097.
- [2] Wang, Y., et al. 2018. Formation of Human Colonic Crypt Array by Application of Chemical Gradients Across a Shaped Epithelial Monolayer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 5, 113–130.
- [3] Antoine, E.E. et al. 2014. Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20, 683–696.
- [4] Summonte, S., et al. 2021. Thiolated polymeric hydrogels for biomedical application: Cross-linking mechanisms. *Journal of Controlled Release* 330, 470–482.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

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

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Marie Schrammová

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Cílem diplomové práce je připravit hydrogely pro *in vitro* model tenkého střeva. Teoretická část práce se zabývá popisem vybraných biomakromolekul mezibuněčné hmoty (kolagenu, fibronektinu, kyseliny hyaluronové) a popisem různých typů tkáňových modelů, především těch specifických pro tenké střevo. Experimentální část práce zahrnuje vytvoření kompozitního hydrogelu kombinujícího kolagen, thiolovanou kyselinu hyaluronovou a fibronektin a následnou charakterizaci hydrogelu. Charakterizace materiálu byla provedena jednak měřením viskoelastických vlastností pomocí reometru a dále stanovením vybraných parametrů buněčné kompatibility s využitím buněčné linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Stanovena byla míra cytotoxicity pomocí dvou postupů, a to cytotoxicity extraktu a cytotoxicity v přímém kontaktu. Následně byla stanovena schopnost buněk růst a množit se uvnitř hydrogelu, a to pomocí konfokální mikroskopie.

Klíčová slova: kolagen, fibronektin, kyselina hyaluronová, tenké střevo, tkáňový model, hydrogel

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis is to prepare hydrogels for an *in vitro* model of the small intestine. The theoretical part of the thesis focuses on the description of collagen, fibronectin, hyaluronic acid and different types of tissue models, especially those for the small intestine. The experimental part of the work involves the creation of a composite hydrogel combining collagen, thiolated hyaluronic acid and fibronectin. The characterization of the material was performed by measuring the viscoelastic properties using a rheometer. The biological properties of the hydrogel were also tested on the NIH/3T3 mouse embryonic fibroblast cell line, including cytotoxicity testing of the extract and in direct contact. Cell proliferation inside the hydrogel was monitored by confocal microscopy.

Keywords: collagen, fibronectin, hyaluronic acid, small intestine, tissue model, hydrogel

Chtěla bych poděkovat prof. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost a ochotu. Mé poděkování patří také Ing. Michaeli Kurkové, Ing. Monice Muchové, Ph.D. a Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři a cenné rady.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 KOLAGEN</b> .....	<b>12</b>
1.1 KLASIFIKACE.....	12
1.2 STRUKTURA .....	14
1.3 INTERAKCE S BUNĚČNÝMI RECEPTORY .....	15
<b>2 FIBRONEKTIN</b> .....	<b>16</b>
2.1 KLASIFIKACE.....	16
2.1.1 Plazmatický fibronectin .....	16
2.1.2 Buněčný fibronectin.....	16
2.2 STRUKTURA .....	17
2.3 INTERAKCE S BUNĚČNÝMI RECEPTORY .....	18
2.4 ÚLOHA PŘI HOJENÍ RAN .....	19
<b>3 KYSELINA HYALURONOVÁ</b> .....	<b>20</b>
3.1 STRUKTURA .....	20
3.1.1 Chemická modifikace.....	21
3.2 INTERAKCE S BUNĚČNÝMI RECEPTORY .....	21
3.3 ÚLOHA PŘI HOJENÍ RAN .....	22
<b>4 TKÁŇOVÉ MODEL Y</b> .....	<b>23</b>
4.1 TYPY TKÁŇOVÝCH MODELŮ .....	24
4.1.1 Sféroidy .....	24
4.1.2 Organoidy.....	25
4.1.3 Hydrogely.....	26
4.1.4 3D biotisk .....	27
4.1.5 Organ-on-chip .....	28
4.2 TKÁŇOVÝ MODEL TENKÉHO STŘEVA.....	29
4.2.1 Anatomie a fyziologie tenkého střeva .....	29
4.2.2 Parametry tkáňového modelu tenkého střeva .....	31
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>5 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>34</b>
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
5.2 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ .....	34
5.3 BUNĚČNÁ LINIE .....	36
5.3.1 Pasážování fibroblastů .....	36
5.4 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY .....	37

5.4.1	Cytotoxicita v přímém kontaktu.....	37
5.4.2	Cytotoxicita extraktu .....	37
5.4.3	MTT test.....	38
5.5	PROLIFERACE BUNĚK .....	39
5.6	MĚŘENÍ VISKOELASTICKÝCH VLASTNOSTÍ .....	39
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
6.1	CYTOTOXICITA V PŘÍMÉM KONTAKTU.....	40
6.2	CYTOTOXICITA EXTRAKTU .....	41
6.3	PROLIFERACE BUNĚK .....	44
6.4	VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI .....	48
6.4.1	Dynamický modul $G'$ .....	48
6.4.2	Ztrátový modul $G''$ .....	49
6.4.3	Komplexní modul $G^*$ .....	50
6.5	BUDOUCNOST MATERIÁLU .....	51
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>64</b>



## ÚVOD

Výzkum v oblasti tkáňového inženýrství se do značné míry opírá o buněčné testy a *in vitro* modely, které umožňují zkoumat a pochopit specifické biologické děje a procesy za různých podmínek. Kvalita těchto experimentálních modelů a zejména úroveň, na které reprezentují chování buněk v přirozené tkáni, má zásadní význam pro porozumění buněčných interakcí v tkáních a orgánech. Tyto buněčné modely se používají již od počátku 20. století a zpravidla jsou založeny na experimentech se savčími buňkami pěstovanými v mono-vrstvě na plochých dvourozměrných substrátech. Navzdory významnému rozvoji je i přesto potenciál těchto modelů omezený, zejména z toho důvodu, že 2D prostředí neodráží fyziologické chování buněk v nativních tkáních [1, 2].

Avšak pokrok v buněčné biologii vedl k vývoji nové generace buněčných modelů, které mohou lépe napodobovat prostředí *in vivo*. Za nejzajímavější lze označit 3D modely, které definujeme jako *in vitro* tkáňově specifické mikroprostředí, které umožňuje jednotlivým buňkám růst, udržovat si svůj tvar a funkčnost, dále interagovat s okolím a sousedními buňkami a vytvářet dostatečné signalizační dráhy v 3D struktuře. Patří mezi ně např. 3D modely na bázi scaffoldů (např. na bázi hydrogelů), sféroidy či organoidy. Zajímavým způsobem napodobení *in vivo* podmínek jsou pak tzv. „organ-on-chip“ a další orgánové modely, které se někdy pohybují na pomezí 2D a 3D kulturačních technik. Výše zmíněné modely poskytují přesnější informace o interakcích mezi buňkami a využívají se ve vývoji léčiv, výzkumu rakoviny, kmenových buněk a studiu různých onemocnění. Představují slibnou alternativu zejména ke zvířecím modelům, které často nedokáží napodobovat lidský organismus kvůli rozdílům ve fyziologii a v molekulárních a signálních mechanismech podílejících se na vzniku a progresi onemocnění [1, 2].

Dnes jsou popsány rekonstruované 3D modely řady tkání lidského těla. Z nich jsou v současné době nejpokročilejší modely tkáně kostí, chrupavek, kůže nebo plic. Model tkáně tenkého střeva stál delší dobu spíše na pokraji zájmu, a to jednak s ohledem na jeho strukturní složitost a relativně menší společenský význam. Model tenkého střeva přitom umožňuje studium zánětlivých střevních onemocnění či celiakie, pomáhá při vývoji léčiv hodnocením jejich absorpce a dále je užitečný při nutričních studiích, výzkumu mikrobiomu, testování toxicity či v regenerativní medicíně [3, 4].

Úvodní část diplomové práce se zabývá popisem biomakromolekul vyskytujících se v mezibuněčné hmotě, zejména pak kolagenu, fibronektinu a kyseliny hyaluronové. Text pokračuje popisem tkáňových modelů, s důrazem na tkáňový model tenkého střeva. V praktické části byly připraveny kompozitní hydrogely a otestovány jejich viskoelastické a biologické vlastnosti. Cílem bylo připravit materiálovou základnu pro přípravu modelu tenkého střeva na bázi výše zmíněných biomakromolekul.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KOLAGEN

Kolagen (COL) je nejrozšířenějším proteinem v extracelulární matrix (ECM) pojivové tkáně a tvoří přibližně 25 % všech tělesných bílkovin. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem je kolagen zodpovědný za integritu, pevnost a pružnost tkání. Dále hraje důležitou roli v procesu hojení ran, růstu tkání a podílí se také na procesech adheze, růstu a diferenciaci buněk. Kolagenové  $\alpha$  šroubovice agregují za vzniku pravotočivé trojšroubovice nazývanou tropokolagen. Tato struktura je zpevněna vodíkovými můstky, které významně zvyšují teplotní stabilitu a přispívají k pružnosti molekuly [5, 6].

### 1.1 Klasifikace

U obratlovců je dnes popsáno 29 typů kolagenu, které jsou klasifikovány na základě struktury, umístění a vlastností. V souladu se zavedenou nomenklaturou jsou jednotlivé typy kolagenů označeny římskými číslicemi (I až XXIX) podle chronologického pořadí, v jakém byly objeveny [5, 6]. Tyto typy se rozdělují do dvou hlavních skupin na fibrilární a nefibrilární kolageny. Nejrozšířenější jsou fibrilární kolageny, které tvoří 90 % veškerého kolagenu přítomného v lidském těle. Mají jedinečnou hierarchickou strukturu, při níž se molekuly kolagenu skládají do dlouhých fibrilárních struktur. Tyto kolagenní fibrily jsou v pojivových tkáních zodpovědné za odolnost proti zátěži a tahu. Tato skupina má také největší uplatnění v tkáňového inženýrství, především typ I, II a III. V této diplomové práci byl použit pro přípravu hydrogelů právě kolagen typu I.

Druhou skupinou jsou nefibrilární, také nazývané síťotvorné, kolageny tvořící zbylých 10 % veškerého kolagenu v lidském těle. Přestože jsou v organismu méně zastoupené, jsou díky své rozdílné struktuře a vlastnostem důležitou součástí mnoha orgánů. Síť kolagenu se nacházejí převážně v bazálních membránách, kde poskytují mechanickou oporu a ukotvení pro buňky nebo slouží jako filtrační bariéra pro makromolekuly v ledvinách [5, 7, 8].

Tabulka 1 a Tabulka 2 uvádí přehled všech 29 typů kolagenu a jejich umístění ve tkáních.

Tabulka 1 Umístění jednotlivých typů fibrilárního kolagenu v tkáních podle [5]

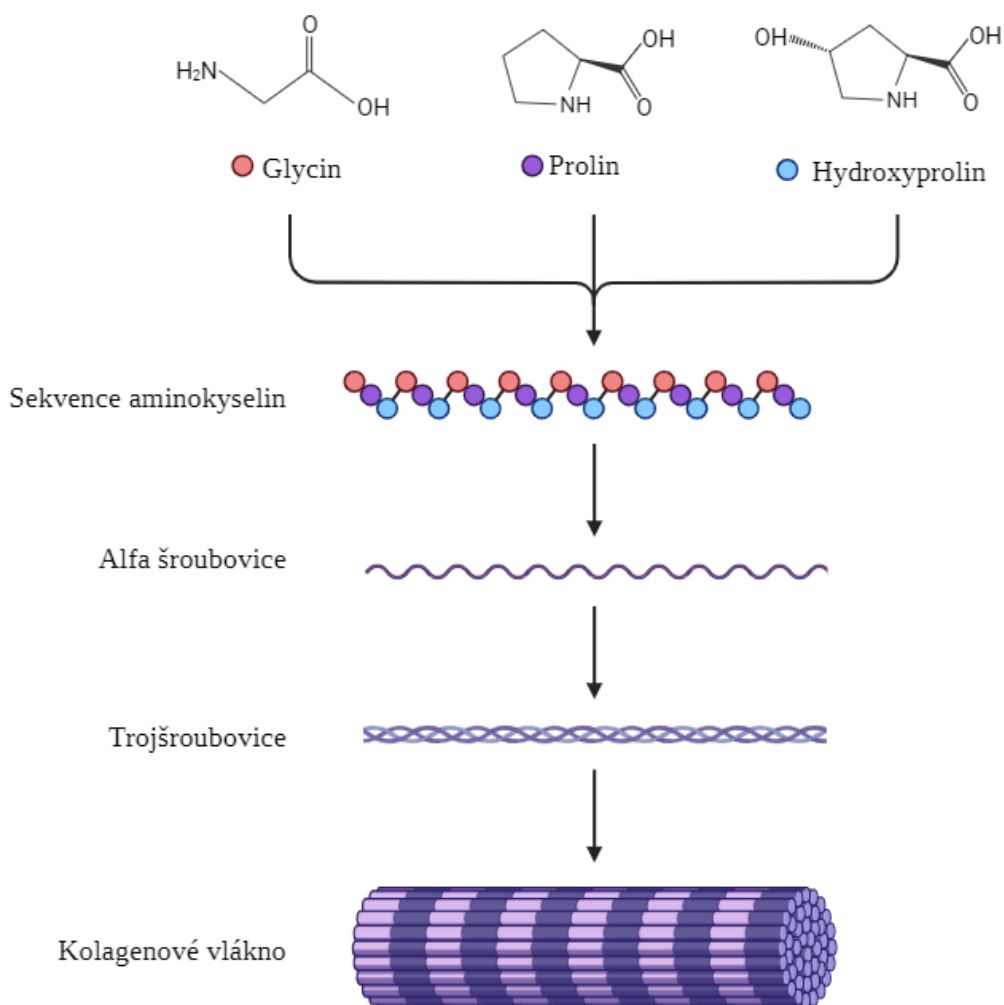
I	Kůže, kosti, šlachy, rohovka	XI	Chrupavka, meziobratlová ploténka
II	Chrupavka, sklivec	XXIV	Kosti, rohovka
III	Kůže, cévy, střevo, děloha	XXVII	Chrupavka
V	Kůže, kosti, rohovka, placenta		

Tabulka 2 Umístění jednotlivých typů nefibrilárního kolagenu v tkáních podle [5]

IV	Bazální membrána, kapiláry	XIV	Cévy, nervy, šlachy, kosti, kůže, chrupavka	XXII	Spoje tkání
VI	Kosti, cévy, kůže, rohovka, chrupavka	XV	Kapiláry, vaječníky, srdce, varlata, kůže, placenta, ledviny	XXIII	Metastazující karcinogenní buňky
VII	Mukózní membrána, kůže, pupečník, plodová voda	XVI	Srdce, kůže, ledviny, hladká svalovina	XXV	Mozek, srdce, varlata
VIII	Kůže, mozek, srdce, ledviny, cévy, kosti, chrupavka	XVII	Kůže	XXVI	Varlata, vaječníky
IX	Rohovka, sklivec, chrupavka	XVIII	Ledviny, plíce, játra	XXVIII	Buňky nervového systému
X	Chrupavka	XIX	Kůže, ledviny, játra, placenta, slezina, prostata	XXIX	Kůže
XII	Chrupavka, šlachy, kůže	XX	Rohovkový epitel		
XIII	Kosterní svalstvo, srdce, kůže, endoteliální buňky	XXI	Žaludek, ledviny, cévy, srdce, placenta, kosterní svalstvo		

## 1.2 Struktura

Jak znázorňuje Obrázek 1, primární struktura kolagenu je tvořena tripeptidovou sekvencí  $-(\text{Gly-X-Y})_n$ . Glycin (Gly) se vyskytuje na každém třetím zbytku a díky tomu, že má tato aminokyselina malý postranní řetězec, umožňuje těsné sbalení polypeptidových řetězců do trojitě šroubovice. Aminokyseliny X a Y závisí na typu kolagenu, nejčastěji se vyskytuje prolin a posttranslačně modifikovaný 4-hydroxyprolin. Sekundární struktura je tvořena opakováním tripeptidové sekvence za vzniku levotočivé  $\alpha$  šroubovice. Terciární struktura se nazývá tropokolagen a vyznačuje se pravotočivou trojšroubovicí tvořenou třemi  $\alpha$  řetězci stabilizovány pomocí vodíkových vazeb. Tato jedinečná struktura trojitě šroubovice je charakteristickým rysem kolagenu a přispívá k jeho pevnosti a stabilitě. Kolagenové vlákna neboli fibrily označují kvartérní strukturu, která je tvořena uspořádáním mnoha molekul tropokolagenu [8–10].



Obrázek 1 Schématické znázornění struktury kolagenu upraveno podle [11]; vytvořeno v BioRender.com

### 1.3 Interakce s buněčnými receptory

Interakce kolagenu s receptory na povrchu buněk regulují mnoho buněčných procesů (např. adhezi, proliferaci či migraci), naopak interakce s dalšími složkami ECM (např. fibronectin či GAG) jsou důležité pro samotnou strukturu matrix a jeho remodelaci. Kolagen se může vázat na více typů receptorů a vyvolávat tak odlišné buněčné odezvy v závislosti na formě ve které interaguje. Kolagenové fibrily inkorporované do ECM, malé kolagenové fragmenty vznikající při remodelaci matrix či trojšroubovice kolagenu interagují s buněčnými receptory odlišně. Buňky mohou stabilně adherovat ke kolagenu ve tkáních, migrovat přes matrix bohatý na kolagen jako součást morfogenního procesu nebo interagovat s kolagenem při hemostáze. Vzhledem k rozmanitosti procesů existuje několik různých skupin buněčných receptorů, které interagují s kolagenem nebo jeho fragmenty. Jedná se o integrinové receptory, DDR (discoidin-doménové receptory), glykoprotein VI, OSCAR (receptor osteoblastů) a LAIR-1 (receptor imunitních buněk) [12–14].

Integriny jsou hlavní receptory pro komponenty ECM, které jsou rozšířeny téměř ve všech buňkách a regulují vývoj a patologické procesy v orgánech. Jsou popsány čtyři typy integrinů vázajících kolagen a to  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$ ,  $\alpha11\beta1$ . Tyto jednotlivé typy jsou primárně exprimovány buňkami v různých tkáních a poskytují jedinečné signály. Integrin  $\alpha1\beta1$  signalizuje proliferaci fibroblastů;  $\alpha2\beta1$  adhezi krevních destiček a migraci buněk v epitelu;  $\alpha10\beta1$  se exprimuje na chondrocytech a  $\alpha11\beta1$  je exprimován při vývoji embrya a ve svalové tkáni. Při hojení ran dochází ke kontrakci vláken kolagenu a reorganizaci kolagení matrix právě pomocí integrinů (kapitola 2.4) [14].

Kolagen interaguje také se složkami ECM, jako je fibronectin, heparin, proteoglykany či glykosaminoglykany (GAG). Na degradaci nativního kolagenu se podílejí matrixové metaloproteinázy, včetně kolagenáz které štěpí trojšroubovici v jednom specifickém místě a želatináz, které dokáží štěpit denaturovaný kolagen a kolagen typu IV [12].

## 2 FIBRONEKTIN

Fibronektin (FN) je adhezivní glykoprotein ECM, který hraje zásadní roli při obnově tkání a migraci buněk. Jedná se o dimer, který je kovalentně vázaný disulfidickými vazbami o hmotnosti 500 kD s multimodulární strukturou skládající se z opakování tří částí (viz kapitola 2.2). V těle existují dva typy fibronektinu, plazmatický a buněčný.

### 2.1 Klasifikace

Fibronektin se dělí na buněčný FN (cFN) a na plazmatický FN (pFN). Plazmatická forma FN cirkuluje v krvi a při poranění tkáně se začleňuje do fibrinových sraženin ovlivňující funkci krevních destiček. Buněčný FN je pak syntetizován a sestavován buňkami, které migrují do sraženiny, aby obnovily poškozenou tkáň [15, 16]. Oba tyto typy fibronektinu mají za úkol regulovat adhezi buněk, avšak odlišují se v syntéze, rozpustnosti, velikosti i struktuře [17].

#### 2.1.1 Plazmatický fibronektin

Plazmatický FN je syntetizován převážně hepatocyty a vylučován do krevní plazmy, kde cirkuluje ve vysoké koncentraci 300-400  $\mu\text{g/ml}$  v rozpustné, kompaktní, neaktivní formě. Bezprostředně po poranění se v blízkosti zasažených cév pFN naváže na krevní destičky ve formě krátkých fibril spolu s fibrinem [15, 17].

Pro přípravu hydrogelů v této diplomové práci byl použit rozpustný fibronektin, který se běžně využívá pro přípravu scaffoldů právě v kombinaci s kolagenem typu I. Díky jejich synergickému efektu, kombinace kolagenu a plazmatického fibronektinu podporuje adhezi buněk a více se přibližuje nativnímu ECM [18].

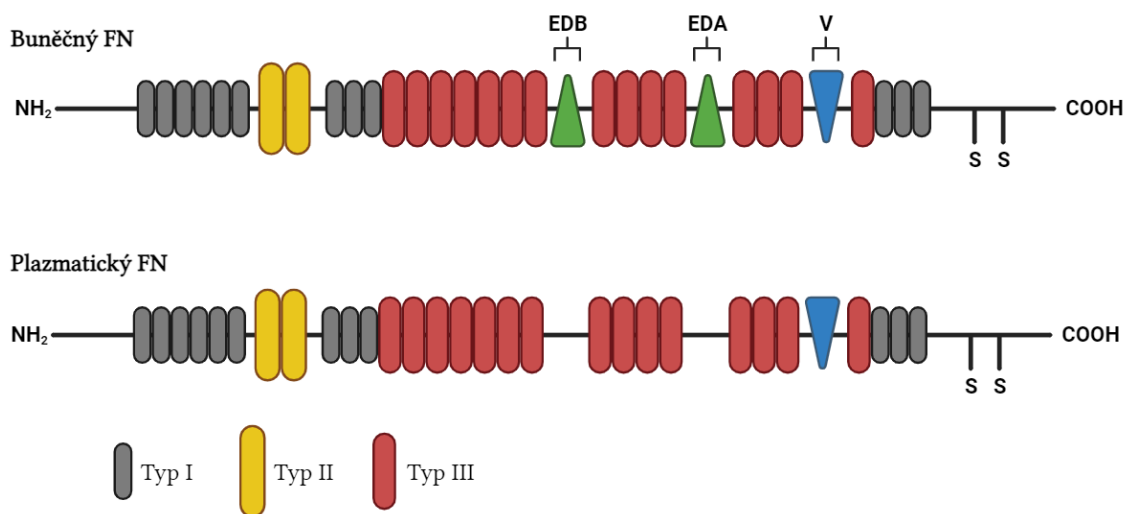
#### 2.1.2 Buněčný fibronektin

Buněčný FN je produkován fibroblasty, chondrocyty, myocyty a synoviálními buňkami, které jej lokálně vylučují ve formě nerozpustné sítě. V krevní plazmě cFN cirkuluje běžně ve velmi nízké koncentraci 1,3  $\mu\text{g/ml}$ , ale při poškození cév, po zánětu či ateroskleróze se hladina cFN zvyšuje, a navíc vykazuje 150krát vyšší účinnost při hemaglutinaci než pFN. Jakožto hlavní složka ECM zprostředkovává cFN širokou škálu buněčných interakcí s ostatními molekulami ECM, podporuje hojení ran prostřednictvím buněčné adheze, migrace a cytoskeletální organizace [17, 19, 20].



## 2.2 Struktura

Fibronektin má multidoménoovou strukturu (Obrázek 2) která je složena z řady opakujících se modulů. Ve struktuře se opakuje 12krát typ I, 2krát typ II, 15krát typ III, který je alternativně spojen pomocí EDA a EDB, a variabilní oblast (V). Tyto moduly jsou uspořádány do tří funkčních domén: N-koncové domény, centrální vazebné domény a konečné domény vázající heparin. Tyto specifické domény mohou interagovat s mnoha vazebnými partnery, včetně dalších složek ECM a buněčných receptorů. Fibronektin se vylučuje jako dimer spojený dvěma disulfidickými vazbami na svém C-konci [15].



Obrázek 2 Schematické znázornění primární struktury buněčného a plazmatického fibronektinu upraveno podle [21]; vytvořeno v BioRender.com

Buněčný FN se může nacházet ve 20 isoformách a to díky obsahu 3 oblastí nazývaných EDA (Extra Domain A), EDB (Extra Domain B) a V (Variable region). EDA a EDB představují oblasti, které jsou do struktury plně zařazeny nebo vyloučeny naopak oblast V vede ke vzniku 5 izoformem.

Izoformy obsahující EDA hrají roli především v migraci, diferenciaci, signalizaci, hojení ran a udržování tkání ve zdravém stavu. Tyto izoformy mají také zvýšenou vazebnou afinitu k integrinům.

Isoformy obsahující EDB přispívají ke stabilitě proteinu, vaskularizaci a fagocytóze. EDB zvyšuje proteolytickou citlivost FN, čímž podporuje rekonstrukci ECM při hojení ran. Přítomnost této sekvence také zvyšuje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor), proliferaci endoteliálních buněk a angiogenezi.

Izoformy obsahující oblast V hrají roli při uvolňování dimerů FN, rozpustnosti, buněčné adhezi, fibrilogenezi, vazbě ligandů a koagulaci. Oblast V se vyskytuje v 5 variantách: V<sub>0</sub>, V<sub>64</sub>, V<sub>89</sub>, V<sub>95</sub> a V<sub>120</sub> (číslo indexu odpovídá jejich aminokyselinové délce). Tato izoforma se objevuje v synoviálních kloubech, meziobratlových ploténkách, pFN a ve fetálních tkáních. U plazmatického FN je variabilita ve struktuře menší oproti cFN, neobsahuje domény EDA a EDB, ale pouze variabilní doménu V [17, 19].

### 2.3 Interakce s buněčnými receptory

Fibronektin interaguje v tkáních s mnoha makromolekulami, jako je kolagen typu I, II a III, glykosaminoglykany nebo fibrinogenem. Také zprostředkovává interakci buněk s komponenty ECM prostřednictvím vazebných domén, z nichž nejběžnější je zejména peptidová sekvence arginin-glycin-aspartát (RGD-sequenze) integrinů [16].

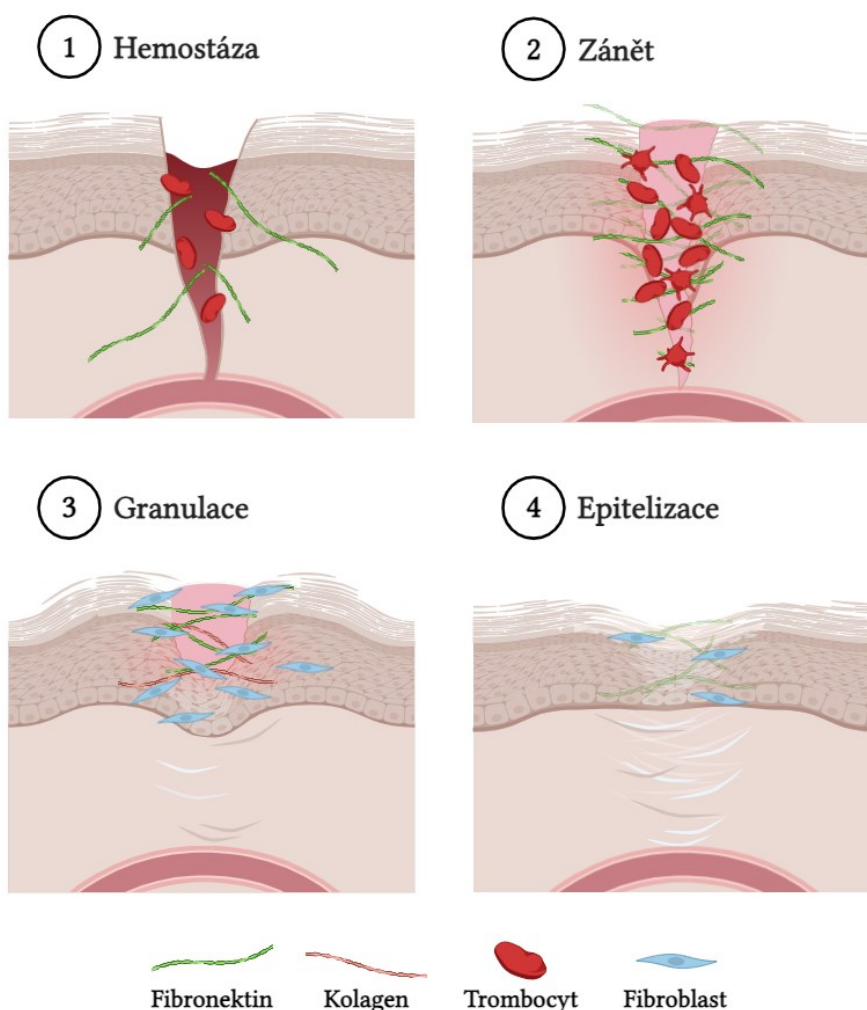
Buněčný FN se vyskytuje ve formě komplexní fibrilární sítě a interakce mezi buňkou a touto sítí je z velké části zprostředkována integriny. Fibronektin se váže na integrinové receptory, které po jejich aktivaci částečně řídí uspořádání cytoskeletu, což vede k natahování molekul fibronektinu a pozitivní zpětné vazbě pro tvorbu fibril [21].

Tato FN matrix může také vázat růstové faktory, např. kostní morfogenetický protein (BMP, Bone Morphogenetic Protein), který je důležitý při regeneraci kostních defektů či VEGF, který reguluje buněčnou signalizaci při hojení ran. Zatímco fibronektinová matrix je při tomto procesu buňkami průběžně sestavována a remodelována, sestavuje se na něm zralejší a stabilnější síť ECM [15, 21].

## 2.4 Úloha při hojení ran

Hojení rány je proces, který probíhá ve čtyřech na sebe navazujících fázích: hemostáza, zánětlivá, granulační a epitelizační. Oba typy fibronektinu se aktivně účastní ve všech fázích.

Obrázek 3 znázorňuje tyto 4 fáze: (1) Plazmatický fibronektin je důležitější v rané fázi hojení rány, kdy se během hemostázy váže na trombocyty a fibrin za vzniku sraženiny. (2) Poté se pomocí trombocytů začíná sestavovat prvotní matrix z fibril pFN prostřednictvím zvýšení exprese vazebného místa pro tyto buňky. (3) Později v průběhu hojení vstupují do okolí rány fibroblasty, které začínají ukládat buněčný fibronektin. V této fázi se tvoří granulační tkáň z dočasné matrice cFN, která stimuluje také ukládání kolagenu typu III a kontrakci rány. Nakonec se tato matrice v konečné fázi hojení remodeluje na síť kolagenu typu I obklopenou cFN, který na sebe váže pomocí integrinů buňky a stabilizuje tak ECM. Fibronektin navíc váže glykosaminoglykany, např. heparin sulfát a kyselinu hyaluronovou, které podporují hojení rány. (4) V poslední fázi dochází k zacelení a epitelizaci rány [19, 22].



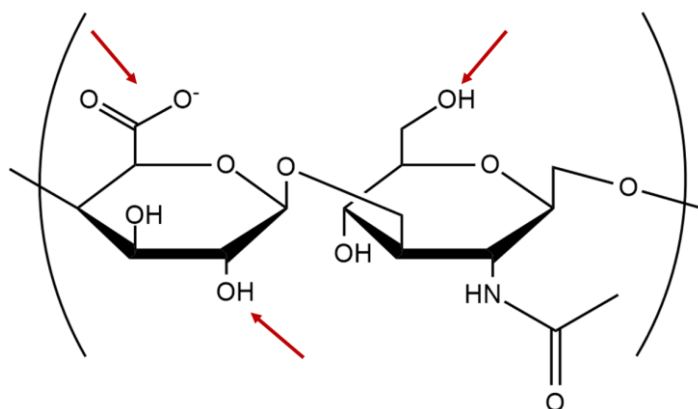
Obrázek 3 Fáze hojení ran upraveno podle [19]; vytvořeno v BioRender.com

### 3 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová (HA), nazývaná také jako hyaluronan, je lineární glykosaminoglykan (GAG), který představuje hlavní složku všech tělesných tekutin a ECM. Tento vysoce viskózní polysacharid je nejen lubrikantem, ale také významným regulátorem buněčného chování během embryogeneze, morfogeneze, migrace, proliferace a podílí se také na hojení ran a regeneraci kostí. Hyaluronan je syntetizován na vnitřním listu plazmatické membrány jako velký nerozvětvený polymer opakujících se jednotek kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. Od ostatních glykosaminoglykanů se liší vysokou molekulovou hmotností a chybějícími sulfátovými skupinami [23, 24].

#### 3.1 Struktura

Kyselina hyaluronová se skládá z opakujících se jednotek  $\beta$ -1,4-D-glukuronové kyseliny a  $\beta$ -1,3-N-acetylglukosaminu (Obrázek 4). Řetězec HA může mít délku až 25 000 disacharidových jednotek a také má široký rozsah molekulových hmotností pohybující se od 5 kDa až po 20 MDa. Biologické účinky HA jsou tedy do značné míry závislé na molekulové hmotnosti [25].



Obrázek 4 Struktura kyseliny hyaluronové s vyznačenými karboxylovými a hydroxylovými skupinami pro chemickou modifikaci upraveno podle [26]

Kyselina hyaluronová s molekulovou hmotností 20-200 kDa má antiangiogenní, imunosupresivní a protizánětlivé účinky. Podílí se např. na ovulaci, embryogenezi, regeneraci tkání a hojení ran. Vysokomolekulární HA s molekulovou hmotností nad 500 kDa je vysoce viskoelastická a viskózní, čímž působí jako lubrikant v synoviální tekutině. Naproti tomu HA se střední a nízkou molekulovou hmotností podporuje angiogenezi a má imunostimulační vlastnosti [27, 28].

### 3.1.1 Chemická modifikace

Nativní kyselina hyaluronová má mnoho žádoucích vlastností, jako je zadržování vody, biokompatibilita či viskoelastická, ale její náchylnosti k degradaci hyaluronidázou ji činí nevhodnou pro využití v tkáňovém inženýrství. K vyřešení těchto problémů se HA chemicky modifikuje za vzniku materiálu s lepšími mechanickými vlastnostmi, rozpustností a rychlostí degradace. Tyto modifikované deriváty HA nacházejí uplatnění pro přípravu scaffoldů v tkáňovém inženýrství, v chirurgii měkkých tkání, jako je augmentace hlasivek, pro systémy podávání léčiv či hojení ran.

Tyto modifikace cílí na karboxylové a hydroxylové skupiny HA (Obrázek 4). Karboxylové skupiny se modifikují esterifikací, amidací a reakcemi zprostředkovanými karbodiimidem, zatímco hydroxylové skupiny podléhají esterifikaci, etherifikaci a divinyl sulfonaci [23, 29].

### 3.2 Interakce s buněčnými receptory

Kyselina hyaluronová hraje klíčovou roli v regulaci buněčného chování a ovlivňuje procesy jako je migrace, proliferace a diferenciací. Přítomnost HA přispívá k lokální hydrataci tkáně a zároveň oslabuje ukotvení buněk v ECM. Tento proces usnadňuje buňkám jejich oddělování za účelem migrace či dělení. Interakce mezi HA a buňkami, zejména prostřednictvím receptorů jako je CD44 a RHAMM, významně ovlivňuje právě například migraci či proliferaci. Hromadění HA v ECM je spojeno s migrací buněk naopak degradací těchto receptorů nebo blokováním jejich aktivity lze dosáhnout opačného efektu, tedy buněčnou migraci inhibovat [30].

Prvním receptorem pro HA je CD44, multidoménový transmembránový glykoprotein. Existují tři aktivační stavy CD44, neaktivní, indukovatelný a konstitutivně aktivní. Tyto stavy jsou ovlivněny postranním řetězcem sacharidů CD44, tedy úrovní glykosylace. Konkrétně přítomnost nebo nepřítomnost určitých postranních sacharidových řetězců určuje jeho aktivační stav a následně jeho schopnost vázat se na HA. Tento receptor má afinitu také k dalším ligandům včetně osteopontinu, kolagenu, chondroitinu či fibronektinu, avšak HA má největší vazebnou afinitu ke všem izoformám CD44 než ostatní komponenty ECM.

Při interakci HA s receptorem dochází ke konformačním změnám a aktivaci signálních drah, které se podílejí na migraci, proliferaci, přežití a apoptóze buněk. Díky tomu hraje vazba HA s CD44 důležitou roli při regulaci aktivity nádorových buněk, progresi nádoru a metastáz. Dále vede aktivace CD44 k expresi genů multirezistence a anti-apoptotických genů, což více podporuje proliferaci nádorových buněk. Díky multifunkční roli CD44 v nádorovém mikroprostředí lze jeho interakci s HA považovat za důležitý cíl při vývoji protinádorových léčiv [24, 31, 32].

Dalším receptorem je RHAMM (Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility), který se vyskytuje v jádře, cytoplazmě a na cytoplazmatické membráně. RHAMM je méně prostudován než hlavní CD44, ale při absenci CD44 může RHAMM částečně kompenzovat některé jeho funkce. Tento receptor má zásadní význam pro buněčnou motilitu, sestavování a stabilitu mikrotubulů. RHAMM je také nadměrně exprimován např. u karcinomu prsu a prostaty, což přispívá k progresi nádoru a tvorbě metastáz [24, 31, 33].

Třetím významným buněčným receptorem pro HA je LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor), úzce příbuzný s CD44 a exprimovaný výhradně na endoteliálních buňkách v lymfatickém systému. LYVE-1 sdílí silnou homologii s CD44 a má spojovací doménu, který mu umožňuje vázat HA. Tento receptor lze využít jako marker pro zkoumání struktury lymfatických cév v benigních i maligních tkáni prostaty [24, 31].

### 3.3 Úloha při hojení ran

V kapitole 2.4 bylo již zmíněno, že se HA také účastní procesu hojení ran. Krátce po vzniku rány se v místě lokálně zvyšuje její koncentrace. To je způsobeno dvěma důležitými funkcemi, které HA plní během tohoto procesu. V raných fázích hojení rány slouží HA jako dočasná struktura především díky velikosti molekuly. Její struktura usnadňuje difúzi živin a odpadních produktů z místa poranění. Důležitější je však vliv HA na proliferaci a migraci keratinocytů, jejichž funkcí je produkovat v kůži keratin a vytvářet těsné spoje (angl. tight junctions). Účinek HA na hojení rány závisí také na molekulové hmotnosti. Molekuly HA s vyšší molekulovou hmotností stimulují protizánětlivé reakce, zatímco molekuly s nižší molekulovou hmotností zánět vyvolávají. Zánětlivou odpověď vyvolanou nízkomolekulárními fragmenty HA je důsledkem jejich afinitě ke CD44 receptoru [30].

## 4 TKÁŇOVÉ MODELY

Dvourozměrné metody kultivace buněk byly základem pro pochopení základních biologických procesů, které zahrnují buněčné interakce, mechanismy onemocnění, produkci proteinů a buněčnou biologii. Rovněž poskytly principy pro vývoj umělých tkání. Při tomto tradičním přístupu buňky přilnou a rostou v monovrstvě na plochem plastovém povrchu. Ačkoli jsou tyto *in vitro* metody neocenitelné pro studium buněčných reakcí na biochemické a biofyzikální podněty, jejich jednoduchost představuje problém při pochopení složitějších tkáňových struktur, protože 2D prostředí neodráží fyziologické prostředí a tedy ani chování buněk v nativních tkáních [1, 34].

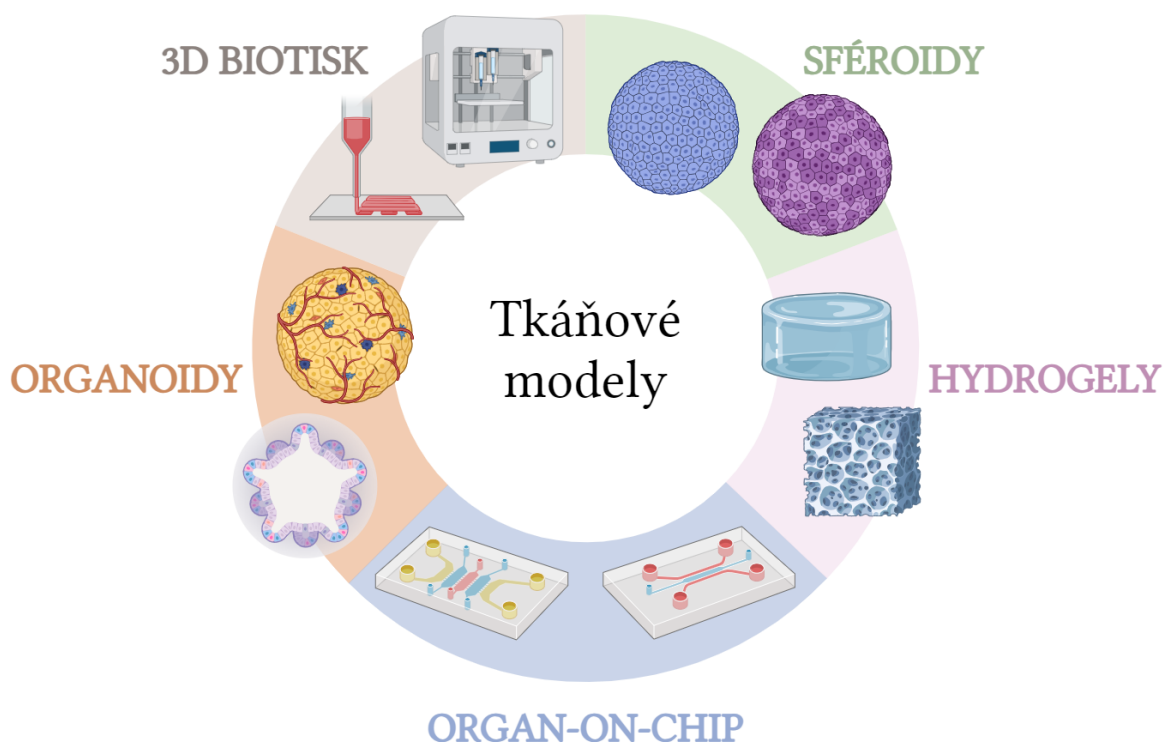
V posledních letech se přechází k trojrozměrným buněčným kulturám, které jsou schopny lépe napodobit složitou architekturu tkání a orgánů, včetně důležitých interakcí mezi buňkami a ECM. ECM funguje pod definovanými biochemickými signály a reguluje buněčné chování jako je proliferace, adheze, migrace či diferenciací. Z tohoto důvodu se vyvíjejí 3D modely s kombinací buněk a biomakromolekul, které mají napodobit nativní orgány a složení i architekturu ECM. Za tímto účelem mohou 3D buněčné kultury poskytnout dobře kontrolované mikroprostředí podobné *in vivo*, které je specificky přizpůsobeno každé aplikaci, ať už např. v oblasti testování léčiv či tkáňovém inženýrství [1, 34]. Tabulka 3 obsahuje stručný přehled výhod a nevýhod těchto modelů.

Tabulka 3 Srovnání výhod a nevýhod 2D a 3D modelů podle [35]

Typ buněčné kultury	Výhody	Nevýhody
<b>2D model</b>	Cenově dostupnější Vysoká reprodukovatelnost a výkonnost	Buňky rostou pouze v monovrstvě Nedostatek interakcí mezi buňkami a s ECM
<b>3D model</b>	Růst podobný jako v <i>in vivo</i> podmínkách Poskytuje interakce mezi buňkami a s ECM Distribuce živin podobná <i>in vivo</i>	Nákladné a časově náročné Omezená reprodukovatelnost a výkonnost Náročnější postupy a protokoly

## 4.1 Typy tkáňových modelů

Díky výhodám v porovnání s 2D modely, se postupně začaly vyvíjet různé typy a přípravy tkáňových modelů. Tato kapitola popisuje základní biotechnologie pro výrobu tkáňových modelů, zahrnující sféroidy a organoidy, scaffolds na bázi hydrogelů, modely organ-on-chip a 3D biotisk, jak znázorňuje Obrázek 5.



Obrázek 5 Přehled 3D tkáňových modelů; vytvořeno v Biorender.com

### 4.1.1 Sféroidy

Sféroidy jsou kulovité buněčné agregáty neadherující na povrch, které vykazují nízkou komplexnost danou nahodilým uspořádáním buněk. Agregace buněk do sféroidu je možná díky membránovým proteinům. Po počátečním kontaktu mezi buňkami dochází k hromadění E-kadherinu na povrchu buněk, kdy se poté sféroid stává kompaktní strukturou díky silným mezibuněčným interakcím pomocí E-kadherinu [36, 37]. Sféroidy se nejčastěji využívají při tvorbě nádorových modelů, výzkumu kmenových buněk či tkáňovém inženýrství. Výhody spočívají v tom, že usnadňuje interakce buněk s ECM a napodobuje fyzikálně-chemické prostředí *in vivo* a zlepšuje životaschopnost a proliferaci buněk. Příprava sféroidů je také poměrně rychlá a jednoduchá. Nevýhodou této metody je omezený přísun živin do jádra sféroidu kvůli absenci krevního řečiště a i přestože vykazují 3D strukturu, stále postrádají komplexnost nativních tkání [34].



Na výrobu sféroidů se využívá poměrně jednoduchých technik. Metoda visící kapky je jednou z nejstarších metod a spočívá v pipetování 20-40 µl buněčné suspenze na víčko, které se poté převrátí, což vede k agregaci buněk působením povrchového napětí a gravitační síly. Velikost sféroidu lze upravit počátečním počtem buněk a společnou kultivací více typů buněk lze vytvořit heterocelulární sféroidy. Další jednoduchou metodou je tzv. „*liquid-overlay*“. Při této metodě se buněčné suspenze nanášejí na destičky zabraňující přichycení buněk k povrchu. Neustálé kývání destičkou na třepačce podporuje shlukování buněk. Tato metoda lze provádět na 96-jamkových destičkách, což z něj činí jednoduchou a efektivní metodu. Nejjednodušší technikou je tzv. „*pellet culture*“. Tato metoda zahrnuje centrifugaci buněčné suspenze za účelem koncentrace buněk, přičemž odstředivá síla napomáhá jejich adhezi. Výhodou této metody je tvorba sféroidů o velkém průměru [34, 36].

#### 4.1.2 Organoidy

Organoidy jsou trojrozměrné kultivační systémy, které se podobají skutečným lidským orgánům a v některých případech jsou od nich histologicky nerozeznatelné. Společným znakem všech organoidů je, že jsou vytvářeny z kmenových buněk, které se mohou samy organizovat a diferencovat do 3D buněčných útvarů, jejichž morfologie a funkce jsou podobné těm, které mají orgány *in vivo* [38, 39].

Ve srovnání s tradiční dvourozměrnou buněčnou kulturou mají organoidy jedinečnou výhodu v tom, že zachovávají genovou expresi, případně i mutace, rodičovských buněk, dále dlouhodobě udržují funkci a biologické vlastnosti buněk *in vitro*. Všechny tyto vlastnosti organoidů jsou užitečné při vývoji léčiv, studování organogeneze, v regenerativní medicíně či modelování chorob, zejména několik dědičných chorob, které se obtížně modelují *in vitro*, bylo modelováno pomocí organoidů v kombinaci s editací genomu. Stejným problémem jako u sféroidů je absence cévního řečiště, jejich růst a vývoj tedy závisí na difúzi živin z okolního prostředí. Zatímco u malých organoidů to nemusí znamenat problém, v případě některých větších organoidů může docházet v jejich jádru k nekróze, a tím ke snížení dlouhodobé životaschopnosti systému [1, 39].

Příprava organoidů je podobná jako u sféroidů. Rozdílem je, že při tvorbě organoidů je pluripotentním a embryonálním kmenovým buňkám poskytováno specifické médium s růstovými faktory a morfogeny, které napodobuje vývojové stimuly *in vivo* [34].

Tabulka 4 obsahuje přehled základních charakteristických vlastností sféroidů a organoidů.

Tabulka 4 Srovnání sféroidů a organoidů upraveno podle [36]

Vlastnosti	Sféroidy	Organoidy
Typ buněk	Více typů buněčných linií, nádorové buňky	Převážně embryonální a pluripotentní buňky
Tvorba 3D struktury	Agregace a adheze buněk	Diferenciace buněk v reakci na fyzikálně-chemické podněty, tvorba komplexní struktury
Fyziologie orgánů	Vrstvy proliferujících, nečinných a nekrotických buněk, přechodně připomínají 3D buněčnou organizaci	Různé buněčné linie, které alespoň částečně odrážejí strukturu a funkci orgánu
Podmínky kultivace	Kultivace s nebo bez ECM a růstových faktorů	Vyžaduje ECM a množství růstových faktorů

#### 4.1.3 Hydrogely

Vzhledem k důležitosti interakce ECM s buňkami v nativních tkáních byly vyvinuty biomateriály napodobující ECM pro přípravu 3D modelů, přičemž nejrozšířenější metodou je právě zapouzdření buněk do hydrogelu. Hydrogel je tvořen ze zesíťovaného polymeru, dokáže absorbovat a zadržovat značné množství vody, aniž by se rozpouštěl a díky své struktuře a polymeru ze kterého je vyroben, velmi dobře napodobuje nativní ECM. Hydratace a pórovitost hydrogelu také usnadňuje lepší výměnu živin a plynů mezi buňkami a odstraňování odpadních produktů. Díky těmto vlastnostem jsou ideální pro *in vitro* modely měkkých tkání, protože struktura hydrogelu napodobující ECM velmi dobře podporuje růst a diferenciaci buněk. Existují dvě základní kategorie podle zdroje materiálu, ze kterého byl hydrogel vyroben, a to na přírodní a syntetické [1, 35, 40].

Hydrogely na bázi přírodních polymerů, jako je kolagen, chitosan, elastin, alginát, kyselina hyaluronová či fibrin, jsou biokompatibilní, lépe interagují s buňkami a obvykle vykazují přirozenou bioaktivitu. Zatímco ty na bázi syntetických polymerů nejsou tak biologicky aktivní, ale poskytují možnost lépe definovat jejich mechanické vlastnosti, jako je pružnost či tuhost. Mezi běžně využívané syntetické polymery patří polyethylenglykol, kyselina polymléčná, polykaprolakton či kyselina polymléčná-a-glykolová. Protože hydrogely vyrobené čistě z jednoho typu polymeru neodpovídají celkovým strukturním ani funkčním aspektům nativní tkáně, byly vyvinuty hybridní hydrogely, které ve své struktuře kombinuje více typů přírodního či syntetického polymeru [40, 41].

#### 4.1.4 3D biotisk

3D biotisk, známý také jako bioprinting, je pokročilá biotechnologie, která umožňuje vytvářet složité struktury tkání či orgánů s mimořádnou přesností. Cílem této technologie je napodobit přirozenou buněčnou architekturu nanesením materiálů a buněk určitým způsobem, který může obnovit normální strukturu a funkčnost složitých tkání. Při 3D biotisku se buňky nebo biomolekuly tisknou pomocí specifických bioinků přímo na substrát ve specifickém vzoru tak, aby vytvořily požadovanou 3D strukturu. Mezi hlavní metody bioprintingu můžeme zařadit extruzivní, laserem asistovaný, světlem řízený a na bázi kapek [35, 42].

Mezi nejběžnější metody patří extruzivní bioprinting (Extrusion-Based Bioprinting, EBB), který se používá pro výrobu 3D modelů např. aortální chlopně, nervové tkáně či kosti, používaných při screeningu léčiv a toxikologických výzkumech. Umožňuje vytvářet 3D tkáňové modely postupně, vrstvu po vrstvě, prostřednictvím dávkování bioinků s buňkami přes trysku. Mezi nejvyužívanější bioinky můžeme zařadit kolagen, kyselinu hyaluronovou, alginát, PEG, želatinu či chitosan. Nevýhodou této metody je relativně nízké rozlišení, tudíž nelze tisknout komplexnější struktury a smykové napětí během vytlačování ohrožuje viabilitu buněk [35, 43].

Laserem asistovaný bioprinting (LAB) využívá laserové impulsy k přenosu bioinku na podklad. LAB umožňuje depozici jednotlivých buněk v jedné kapce s vysokým rozlišením. Nevýhodou této metody je špatná škálovatelnost a vysoká cena [35].

Biotisk na bázi světla (LBB) zahrnuje použití ultrafialového nebo viditelného světla pro vytvrzení fotosenzitivního bioinku, což umožňuje postupnou tvorbu složitých modelů. Jako bioinky se využívají fotopolymery, např. akrylátové deriváty polyethylenglykolu, jako je dimetakrylát (PEGDMA) či diacrylát (PEGDA) [35, 42].

Biotisk na bázi kapek (DBB) vznikl z konvenčních inkoustových tiskáren a nyní se široce používá k vytváření 3D modelů tkání. Při této metodě je bioink s buňkami rozprašován z několika trysek pomocí tepelných nebo piezoelektrických mechanismů. Nastavením napětí lze přesně řídit velikost a tvar kapiček bioinku, což zajišťuje přesné nanášení buněk a jejich delší životaschopnost [35].

#### 4.1.5 Organ-on-chip

Organ-on-chip (OoC) je mikrofluidní kultivační zařízení jehož cílem je napodobit funkce na úrovni orgánů nebo dokonce celého organismu. Tyto mikrofluidní systémy mají duté kanály vystlané živými buňkami a tkáněmi kultivovanými za podmínek dynamického proudění tekutin. Některá zařízení napodobují struktury na úrovni orgánů, jako jsou rozhraní mezi tkáněmi, a zároveň poskytují příslušné mechanické podněty, jako je dýchání a pohyby podobné peristaltice, které jsou klíčové pro přesné modelování fyziologie orgánů a onemocnění [44].

Tyto mikrofluidní zařízení mohou napodobovat funkci jednoho orgánu (organ-on-chip) a vyhodnocovat specifické reakce orgánů na sloučeniny. Pokud jsou ale propojeny dva či více OoC, může být vytvořen tzv. "body-on-chip". Tento multiorgánový systém modeluje systémové reakce a zkoumá interakce mezi orgány, především prostřednictvím výměny metabolitů či signálních molekul. Hlavním rozdílem mezi těmito typy je složitost a komplexnost jednotlivých zařízení, kdy jednoorgánové systémy jsou biologicky detailnějšími modely orgánu, zatímco multiorgánové systémy používají méně podrobné modely orgánů a zaměřují se především na systémové interakce mezi orgány [44, 45].

OoC se také dělí podle toho, který orgán simulují. První jsou pevné orgánové čipy, kde jsou buňky kultivovány ve 3D struktuře, která podporuje buněčné interakce (např. jaterní, srdeční, nádorová či tuková tkáň). Druhou skupinou jsou bariérové tkáňové čipy, kde buňky tvoří přirozenou bariéru mezi proudícím médiem, což umožňuje sledovat selektivní transportní procesy skrz tuto bariéru (např. střevo, plíce či kůže) [45].

## 4.2 Tkáňový model tenkého střeva

Gastrointestinální trakt představuje pro tkáňové inženýrství výzvu, především kvůli požadavkům na pohyblivost a vstřebávání živin, rozdílným hodnotám pH a velmi specifickou 3D strukturu. Střevní epitel, nejrychleji se obnovující lidská tkáň, je velice komplexní tkáň tvořena z mnoha typů buněk s dynamickým a multiparametrickým mikroprostředím. Vzhledem k funkci a složité struktuře tenkého střeva je obzvláště náročné připravit takto komplexní tkáňový model v *in vitro* podmínkách [46, 47].

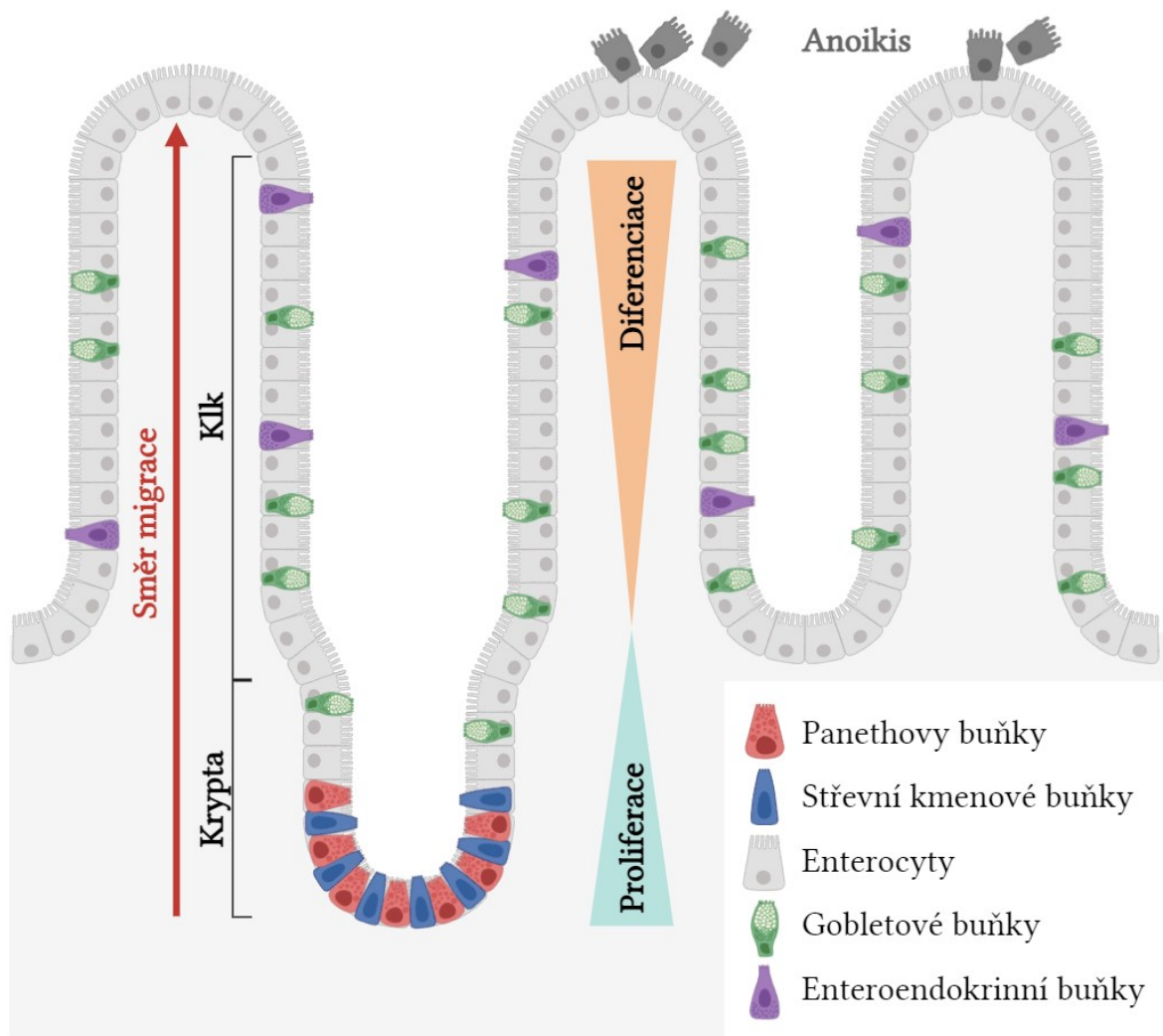
Jak již bylo zmíněno, 3D tkáňové modely poskytují fyziologicky přesnější prostředí pro růst buněk ve srovnání s 2D kulturami, nicméně i přesto postrádají některé tkáňové modely, především organoidy či sféroidy, orgánově specifické dynamické podněty významně ovlivňující chování buněk. Z tohoto důvodu se vyvíjejí komplexnější modely střevního epitelu na bázi např. organ-on-chip [48, 49], scaffoldů či hydrogelů z komponent ECM [44, 47] či modely vytvořené pomocí 3D biotisku [51].

### 4.2.1 Anatomie a fyziologie tenkého střeva

Tenké střevo je klíčovou součástí trávicí soustavy, která umožňuje rozklad a vstřebávání důležitých živin. Tato funkce je dosažena prostřednictvím složité sítě krevních cév, nervů a svalů ve struktuře tenkého střeva, které obvykle měří 3 až 5 metrů. Anatomicky se dělí na tři úseky a to duodenum, jejunum a ileum [52].

Podstatou jeho funkčnosti je střevní epitel, který je zodpovědný za trávení chymu i vstřebávání živin. Pro maximalizaci absorpční plochy je střevní epitel uspořádán do struktur klků a krypt. Klky jsou výběžky epitelu a každý klk je obklopen nejméně šesti kryptami, tzv. Lieberkühnovými kryptami, což jsou naopak invaginace epitelu. Střevní epitel je vystaven mechanickému obrušování a změnám pH, což vede k vysokému počtu odumírání buněk. Aby se tento úbytek buněk kompenzoval a zajistila se integrita bariéry, epitel se průběžně obnovuje, což ze střevního epitelu činí tkáň s nejrychlejší obnovou u dospělého člověka [46, 53].

Střevní epitel se skládá z pěti typů buněk. V kryptách dochází k proliferaci kmenových buněk a Panethových buněk. Střevní kmenové buňky sídlí na dně krypt, kde jsou chráněny před agresivním prostředím související s trávením. Uvnitř krypt se kmenové buňky pravidelně dělí a vytvářejí progenitory, tranzitorní amplifikující buňky, které se následně čtyřikrát až pětkrát dělí a diferencují se buď na enterocyty, gobletové buňky či enteroendokrinní buňky a začínají migrovat ke spodní části klků. V klcích jsou buňky plně diferencované a již se nedělí. Migrace buněk pokračuje směrem nahoru po ose klku a po 3 až 5 dnech buňky dosáhnou vrcholu, kde se vyloučí do střevního lumenu a dochází k apoptóze. Ta je indukována z důvodu ztráty adheze k extracelulární matrix a nazývá se anoikis [46, 54]. Obrázek 6 znázorňuje klky a krypty tenkého střeva včetně typu buněk a jejich směru migrace.



Obrázek 6 Mikrostruktura střevního epitelu; vytvořeno v Biorender.com

#### 4.2.2 Parametry tkáňového modelu tenkého střeva

Pro *in vitro* studie se nejčastěji používají epitelální buňky získané z kolorektálního karcinomu. V současné době je k dispozici velké množství buněčných linií, například HT-29, Caco-2, T84, SW480 a mnoho dalších, ale většina z nich vykazuje velké rozdíly v diferenciaci, metabolismu a proliferaci a vzhledem ke svému nádorovému původu nesou četné mutace. Buňky Caco-2 se používají nejčastěji pro testování propustnosti a absorpce léčiv a také pro diferenciaci. Tyto buňky se po dosažení konfluence spontánně diferencují v polarizovaný epitel a vykazují pak vlastnosti podobné enterocytům, jako jsou typické mikrokilky na povrchu, tight junctions a exprese několika specifických enzymů. Caco-2 buňky však nenapodobují rozmanitost buněčných typů přítomných v nativní tkáni. Proto jsou tyto buňky kultivovány společně s buněčnou linií HT29-MTX produkující mucin, čímž napodobují enterocyty i gobletové buňky. Nicméně i přesto tyto buněčné linie nereprezentují heterogenitu celého střevního epitelu [46, 54].

Kromě zvolení správné buněčné linie je také nutno reprodukovat další klíčové vlastnosti tenkého střeva, a to specifické složení ECM, 3D architekturu, gradienty přítomné ve střevním epitelu a mechanickou stimulaci tkáně, zahrnující smykové napětí a peristaltické kontrakce.

Úkolem scaffoldu je poskytovat biochemické, topologické a mechanické podněty umožňující adhezi a podporující proliferaci a diferenciaci epitelálních buněk. Ve většině uváděných 3D střevních modelů je častou volbou pro napodobení ECM hydrogel. Velmi hojně používaný je Matrigel, což je rekonstituovaná bazální membrána získaná z extraktů myšího sarkomu Engelbreth-Holm-Swarm. Tento nádor je bohatý na proteiny ECM a jeho hlavní složku tvoří laminin, dále kolagen typu IV, heparan sulfátové proteoglykany, a řadu růstových faktorů. Tato komerčně dostupná bioaktivní matrice od firmy Corning Life Sciences účinně podporuje růst střevního epitelu a tvorbu klků a ekvivalentů krypt v systémech organ-on-chip a v organoidech. Kvůli vysoké ceně a špatně definovanému složení se používají jiné přírodní matrice např. na bázi alginátu či kolagenu typu I nebo i na bázi syntetických polymerů, mezi které nejčastěji využívané patří PEG [46, 48, 55].

Dalším důležitým parametrem je rekonstrukce mikrostruktury tenkého střeva. Z fyziologického hlediska je přítomnost klků nesmírně důležitá, protože zvětšují plochu povrchu tenkého střeva, a tím i absorpci živin. *In vitro* studie na Caco-2 buňkách na různých scaffoldech napodobujících morfologii tenkého střeva s kryptami a klky ukazují, že 3D architektura ovlivňuje expresi a organizaci buněk do proliferujících a diferencujících se domén [56]. Wang a spol. [57] vytvořili kolagenový scaffold, který napodoboval topografii střevního epitelu. Bioptické střevní buňky se za statických podmínek spontánně uspořádaly do monovrstvy na zesíťovaném kolagenovém povrchu. Tento scaffold strukturovaný do klků a krypt umožnil rozdělení buněk do části proliferační a diferenciací a prokázal řízenou jednosměrnou migraci buněk směrem k vrcholu klků.

Napodobení topografie střevního epitelu můžeme dosáhnout pomocí mikrofabrikace, což je proces zahrnující výrobu struktur na úrovni mikrometrů. Mezi tyto techniky patří fotolitografie, měkká litografie či 3D tisk. Především fotolitografie a měkká litografie využívající elastomerové razítko k replikaci 3D struktury, byly použity v mnoha studiích k vytvoření 3D modelů tenkého střeva [46]. Castaño a spol. [58] pomocí fotolitografie vytvořili scaffoldy na bázi PEG reprodukcující střevní klky. Naopak Wang a spol. [57] díky měkké litografii replikovali střevní architekturu v kolagenovém scaffoldu pomocí PDMS razítka.

V neposlední řadě je také důležité v *in vitro* modelech napodobit mechanické stimuly, kterým je nativní střevo vystaveno. Peristaltika vytváří mechanické síly v trávicím traktu, které napomáhají trávení, vstřebávání živin a vyprazdňování střeva, ale také vyvolávají smykové napětí a radiální tlak na střevní epitel což souvisí s tvorbou klků a lokalizací krypt [48]. Ve studii od Kasendra a spol. [49] vyvinuli model organ-on-chip pro kultivaci epitelálních buněk získaných ze střevních biopsií, které byly předtím expandovány jako 3D organoidy a poté disociovány a kultivovány na porézní membráně společně s lidskými střevními mikrovaskulárními buňkami. Tento model bylo koncipováno tak, aby buňkám poskytoval jak průtok tekutiny, tak jednoosou cyklickou deformaci. Byla zaznamenána tvorba útvarů podobajících se klkům s apikálně polarizovanými epitelálními buňkami. Transkriptomická analýza navíc ukázala, že organ-on-chip věrně napodobuje lidské duodenum *in vivo*.



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Použité chemikálie

ActinRed™ 555 (Thermo Fisher Scientific, USA); Calf serum (BioSera, Francie); Dimethylsulfoxid (DMSO) (Penta, Česká republika); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Rakousko); Fibronectin (lidská plazma) (Sigma-Aldrich, USA); Formaldehyd 36-38 % (Penta, Česká republika); Fosfátový pufr (PBS) (Biosera, Francie); Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, USA); Kolagen typ I (Corning, USA); Kyselina hyaluronová (Contipro, Česká republika); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko); Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Rakousko); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA); Trypsin (Biosera, Francie).

### 5.2 Příprava hydrogelů

Celkově čtyři typy hydrogelů byly připraveny z kolagenu typu I (COL), fibronektinu (FN) a thiolované kyseliny hyaluronové (HA-SH), za použití HEPES pufru, který zvyšuje pH v roztoku z kyselého na neutrální a následně umožňuje gelaci složek bez přidání síťovadla. Chemická modifikace kyseliny hyaluronové na její thiolovaný derivát byla provedena na pracovišti Centrum polymerních systémů ve Zlíně postupem podle Bian a spol. [59].

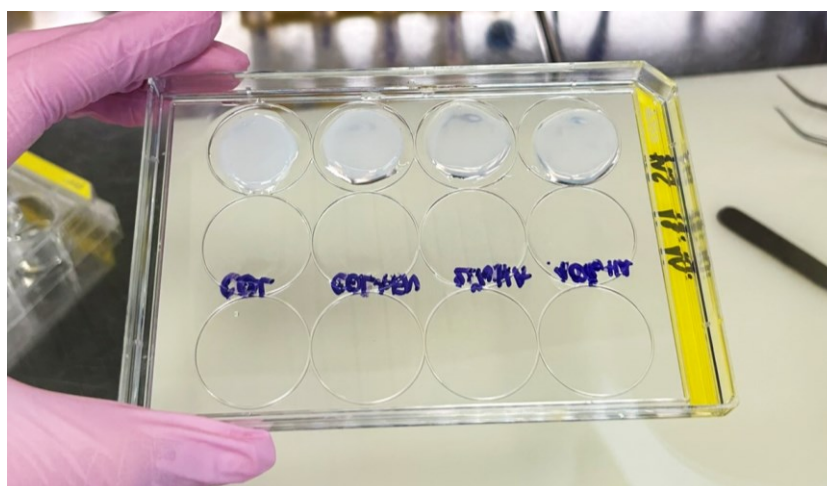
Před samotnou přípravou předcházelo rozpuštění HA-SH v UPW (ultrapure water) o koncentraci 1 mg/ml po dobu 4 hodin a naředění 704  $\mu$ l zásobního COL v 336  $\mu$ l 0,2% roztoku kyseliny octové (COL<sub>ACA</sub>).

Složení hydrogelů je uvedeno v Tabulka 5 a byly připraveny následujícím způsobem. (1) Hydrogel byl připraven pouze smícháním COL<sub>ACA</sub> s HEPES pufrém. (2) Hydrogel byl připraven smícháním FN s COL<sub>ACA</sub>, tento roztok byl promíchán na vortexu a následovalo přidání HEPES pufru. (3) Hydrogel byl opět připraven z FN s COL<sub>ACA</sub>, zvlášť ale bylo smícháno 2 % HA-SH s HEPES pufrém, kdy byl tento roztok až poté přidán k FN s COL<sub>ACA</sub>. (4) Hydrogel byl připraven obdobným způsobem, pouze se navýšil objem HA-SH na 10 %.

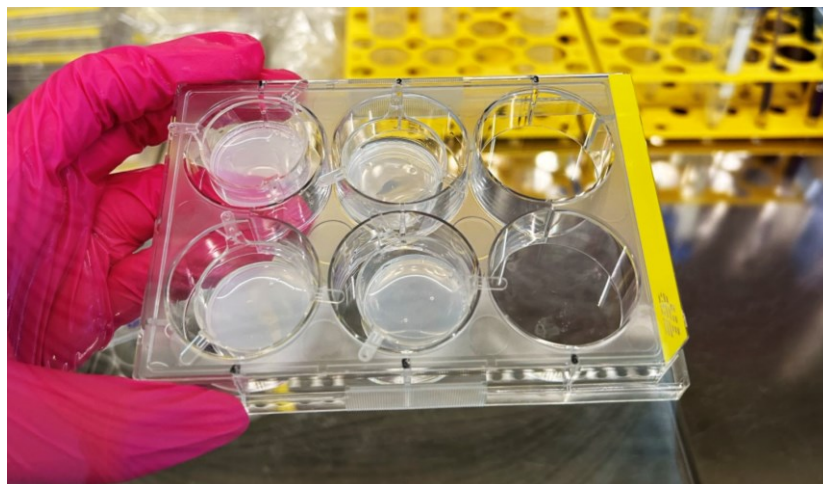
S takto připravenými roztoky, které již obsahovaly HEPES pufr, bylo nutno pracovat rychle aby nedošlo ke zgelovatění již ve zkumavce. Do jamek (Obrázek 7) či insertů (Obrázek 8) bylo přidáno 1 ml příslušného roztoku hydrogelu. Tyto hydrogely se nechaly inkubovat při 37 °C po dobu 1 hodiny, poté se již ke ztuhlým gelům přidalo PBS aby se zabránilo případnému vysychání. Za 24 hodiny tyto roztoky plně zgelovatěly a mohly být použity ihned k testování, případně se mohly ponechat v inkubátoru přibližně po dobu 2 týdnů.

Tabulka 5 Složení hydrogelů

Typ hydrogelu	Objem složek [μl]			
	COL <sub>LACA</sub>	HEPES	FN	HA-SH
<b>(1) COL</b>	840	280	0	0
<b>(2) COL + FN</b>	840	280	11,2	0
<b>(3) COL + FN + 2 % HA-SH</b>	840	300	12	24
<b>(4) COL + FN + 10 % HA-SH</b>	840	280	12,8	126



Obrázek 7 Hydrogely připravené do 12-jamkového plata



Obrázek 8 Hydrogely připravené do insertů

### 5.3 Buněčná linie

*In vitro* testování biologických vlastností hydrogelů bylo provedeno s využitím buněčné linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, USA). Fibroblasty byly kultivovány v polystyrenových kultivačních nádobách T-75 (TPP, Švýcarsko) za stálých podmínek v inkubátoru Heracell 150i (Thermo Scientific, USA) při teplotě 37 °C s řízenou atmosférou (5 % CO<sub>2</sub>) a za stálé relativní vlhkosti 90 %. Jako kultivační médium, které je vhodné pro fibroblasty bylo použito DMEM s 10 % Calf séra a 1 % Penicillin/Streptomycin. Pasážování buněk pomocí trypsinizace bylo provedeno před každým testováním.

#### 5.3.1 Pasážování fibroblastů

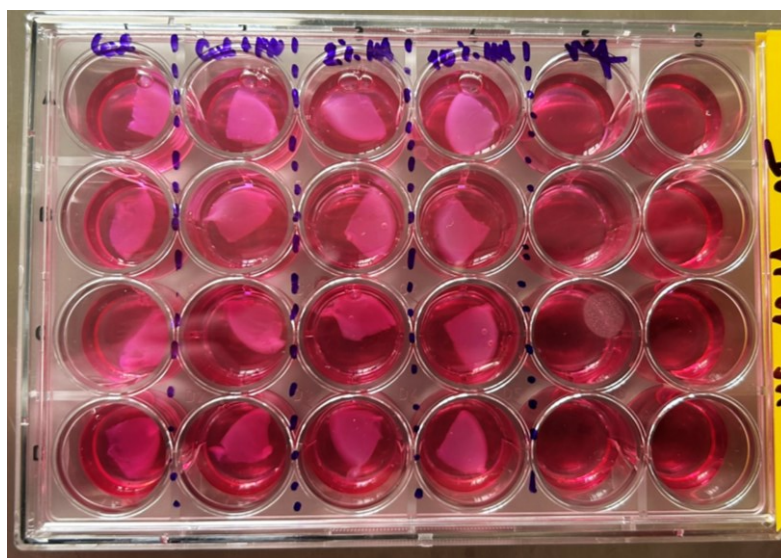
Kultivované buňky byly před pasážováním zkontrolovány pomocí inverzního mikroskopu. Z kultivační láhve bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty pomocí PBS. Poté byl k buňkám přidán enzym trypsin, který štěpí vazby mezi buňkami a kultivační nádobou a dochází k uvolnění adherentních buněk. Kultivační nádoba s trypsinem byla umístěna do inkubátoru po dobu 4 minut. Po vyjmutí z inkubátoru bylo přidáno stejné množství DMEM média jako trypsinu k zajištění neutralizace. Obsah kultivační nádoby byl převeden do zkumavky. Zkumavka s buněčnou suspenzí byla odstředěna pomocí centrifugy Eppendorf 5702 R po dobu 3 minut, při otáčkách 1100 rpm a při teplotě 37 °C. Po odstředění byl odsán supernatan a ponechaly se pouze buňky, které se usadily na dně zkumavky. Tyto buňky byly rozpipetovány v 1 ml DMEM média o konečné koncentraci  $2 \times 10^7$  buněk ve zkumavce.

## 5.4 Testování cytotoxicity

Testování cytotoxicity bylo provedeno podle normy ČSN EN ISO 10993-5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Na hydrogelech bylo provedeno testování cytotoxicity extraktu i v přímém kontaktu.

### 5.4.1 Cytotoxicita v přímém kontaktu

Stejně jako u testování cytotoxicity extraktu, byly nejprve zpasážované buňky pipetovány do 24-jamkové destičky o koncentraci  $10^5$  na 1 ml DMEM média a následně kultivovány v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté se jednotlivé vzorky hydrogelů pomocí pinzety vložily do středu jamek (Obrázek 9). Hydrogely se nechaly v přímém kontaktu s buňkami kultivovat v inkubátoru po dobu 24 hodin a poté opět následovalo vyhodnocení cytotoxicity pomocí MTT testu.



Obrázek 9 Testování cytotoxicity v přímém kontaktu

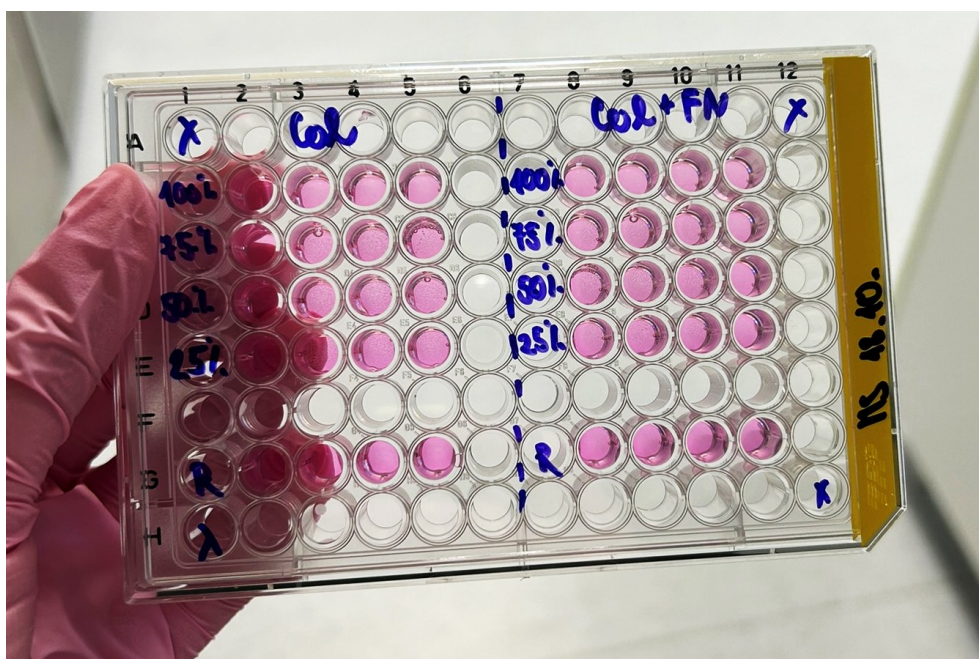
### 5.4.2 Cytotoxicita extraktu

Podle normy ČSN EN ISO 10993-12 byl připraven extrakt v poměru 0,1 g hydrogelu na 1 ml DMEM média. Hydrogely se v médiu extrahovaly na třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin. Zpasážované buňky byly pipetovány do 96-jamkové destičky o koncentraci  $10^5$  na 1 ml DMEM média a následně kultivovány v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin. Extrakty hydrogelů byly přidávány k buňkám v koncentracích 100 %, 75 %, 50 % a 25 %, kdy nižší koncentrace byly naředěny pomocí DMEM média. U buněk, které sloužily jako reference bylo pouze vyměněno kultivační médium. Buňky v destičce byly kultivovány po dobu 24 hodin, poté následovalo vyhodnocení cytotoxicity pomocí MTT testu (kapitola 6.4.3).

### 5.4.3 MTT test

MTT test je kolorimetrický kvantitativní test, který se používá k hodnocení metabolické aktivity buněk jako ukazatele jejich viability. Principem je redukce žluté tetrazoliové soli (MTT) na fialové krystaly formazanu aktivně metabolizujícími buňkami pomocí mitochondriálního enzymu. Mrtvé buňky nemají schopnost přeměnit MTT na krystaly formazanu, tmavší roztok tedy znamená vyšší počet životaschopných, metabolicky aktivních buněk. Nerozpustné krystaly formazanu se poté rozpustí pomocí solubilizačního roztoku např. dimethylsulfoxidu (DMSO) a výsledný barevný roztok se kvantifikuje měřením absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí spektrofotometru.

Nejprve byl připraven roztok MTT rozpuštěním 5 mg MTT v 1 ml ultračisté vody (UPW). U všech buněk bylo vyměněno kultivační médium, v případě testování cytotoxicity v přímém kontaktu byly z jamek vzorky odstraněny, a následně bylo do každé jamky napipetováno 10  $\mu$ l roztoku MTT. Roztok MTT se nechal působit po dobu 3 hodin, poté se opatrně odsál obsah jamek. Následně bylo přidáno 80  $\mu$ l DMSO pro rozpuštění krystalů formazanu v buňkách. Po 15 minutách byla změřena absorbance pomocí přístroje Infinite M200, přičemž referenční vlnová délka byla nastavena na 690 nm. Byla provedena srovnávací analýza výsledků extraktu s referenční hodnotou, která představovala buňky kultivované v čistém médiu jejichž životaschopnost byla stanovena na hodnotu 1 což nám představuje 100% životaschopnost buněk.



Obrázek 10 Buňky s extrakty hydrogelů připravené pro MTT test

## 5.5 Proliferace buněk

Na sledování proliferace buněk byly použity hydrogely připravené v insertech. Na hydrogely byly napipetovány buňky o koncentraci  $10^5$  na 1 ml DMEM média. Kultivační médium bylo přidáno také pod insert, a to z důvodu zabezpečení dostatečného přísunu živin v případě že by buňky migrovaly hydrogelem až k polopropustné membráně insertu. Takto se buňky nechaly inkubovat po dobu 48 hodin při 37 °C. Po uplynutí této doby byla nabarvena buněčná jádra a aktinová vlákna.

Při barvení buněk bylo nejprve odsáto kultivační médium a následovalo promytí pomocí PBS. Pro fixaci buněk byl přidán 4% roztok formaldehydu po dobu 15 minut. Poté se formaldehyd odsál a miska se znovu promyla PBS. Následně byl na 5 minut přidán 0,5% Triton X-100, který se následně také odsál. Nakonec byly hydrogely třikrát promyty pomocí PBS, kdy se na závěr ke vzorkům přidalo samotné PBS, aby se zabránilo vysychání.

Samotné barvení musí probíhat za tmy. Dvě kapky červeného fluorescenčního barviva ActinRed<sup>TM</sup> 555, které se váže na aktinové vlákna v cytoskeletu, bylo přidáno spolu s modrým fluorescenčním barvivem Hoechst v koncentraci 10 µg/ml, které se váže na jadernou DNA. Miska byla obalena hliníkovou fólií, aby byla barviva chráněna před světlem a ponechána 30 minut při laboratorní teplotě. V posledním kroku se odsál veškerý obsah a bylo znovu přidáno PBS. Snímky proliferujících buněk byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FV 3000.

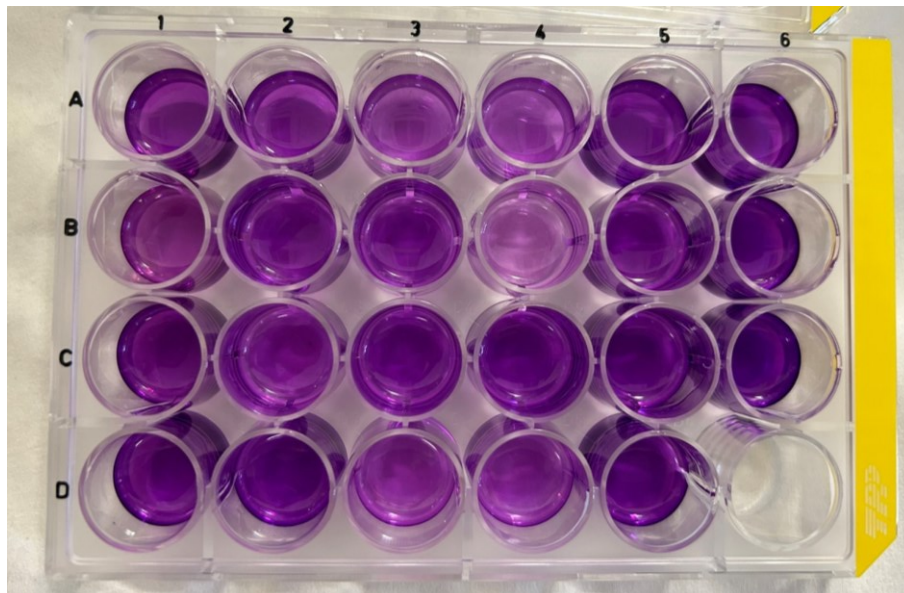
## 5.6 Měření viskoelastických vlastností

Viskoelastické vlastnosti hydrogelů byly měřeny pomocí reometru Anton Paar MCR 502 (Anton Paar, Rakousko). Ze vzorků hydrogelů připravených do jamek byla vyseknuta tělíska o průměru 1 cm. Pro měření bylo zvoleno uspořádání rotačního reometru deska-deska, kdy spodní podkladová deska byla vyhřívána na teplotu 37 °C. Rozmezí úhlových rychlostí bylo při frekvenci 1 až 10 Hz při konstantní deformaci 1 %.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Cytotoxicita v přímém kontaktu

Při stanovování cytotoxicity v přímém kontaktu bohužel docházelo k mechanickému poškození buněk. Buňky byly schopné za 24 hodin naadherovat na vzorek hydrogelu a při manipulaci se vzorkem docházelo ke stržení části buněčné kultury. Po přidání MTT soli bylo viditelné, že opravdu většina buněk byla stržena. Nebylo tedy možné cytotoxicitu hydrogelů v přímém kontaktu vyhodnotit, protože by výsledek z tohoto testu nebyl validní a vyhodnotil by vzorky jako značně cytotoxické. Z tohoto důvodu jsme přistoupili k stanovení cytotoxicity pomocí cytotoxicity extraktu.

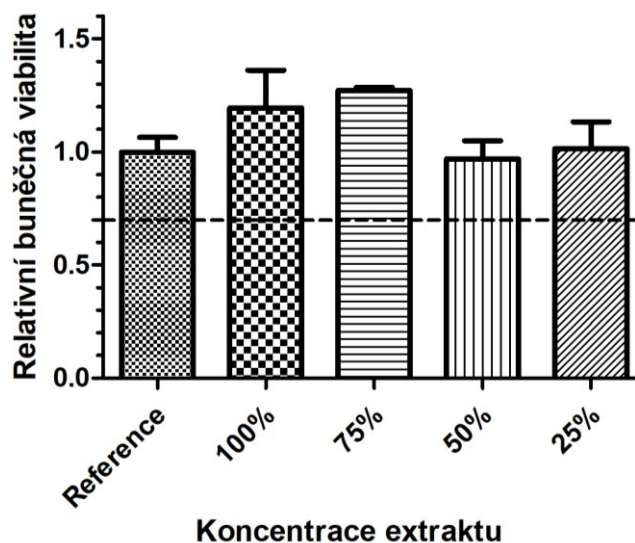


Obrázek 11 Buňky po testování cytotoxicity v přímém kontaktu



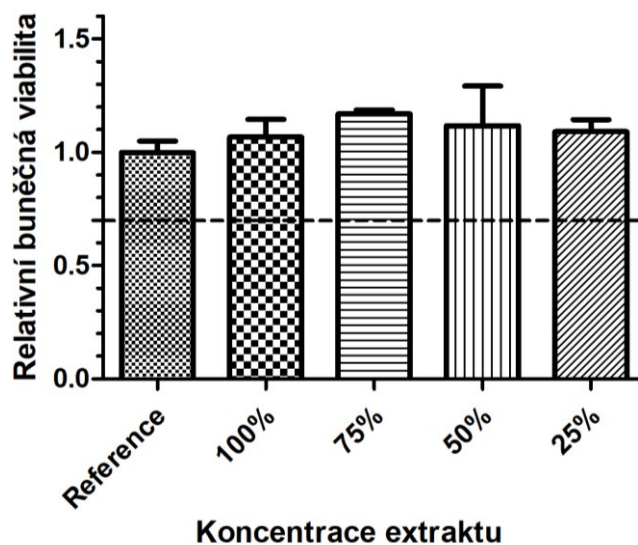
## 6.2 Cytotoxicita extraktu

Protože byly výsledky ze stanovení cytotoxicity v přímém kontaktu negativní, následovalo testování cytotoxicity extraktu. Tyto testy jsou prvotními ukazateli toho, jaký má materiál efekt na buňky. Podle normy ČSN EN ISO 10993-5 je stanoveno, že nad hodnotu 0,7 relativní buněčné viability referenčního vzorku považujeme extrakt za netoxický. Stanovení cytotoxicity extraktu hydrogelů bylo provedeno pomocí metody MTT u buněčné linie NIH/3T3.



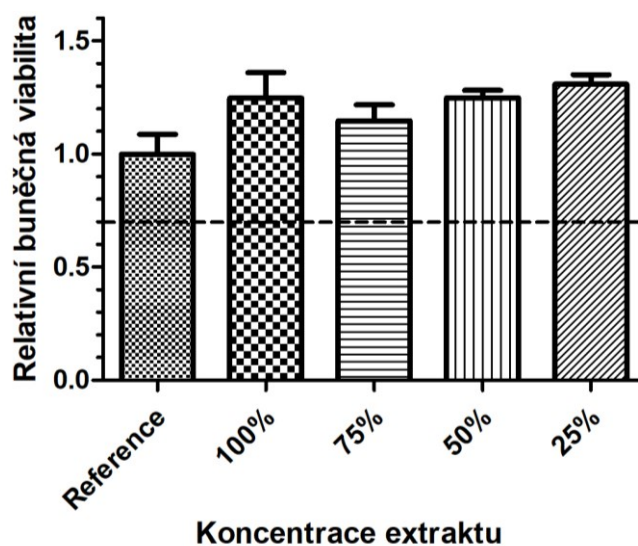
Obrázek 12 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL gelu

Jak znázorňuje Obrázek 12, při kontaktu s extraktem z hydrogelu obsahující pouze kolagen se nesnižuje buněčná viabilita oproti referenci. Naopak při koncentraci extraktu 100 % a 75 % se zvyšuje až k hodnotě 1,3.



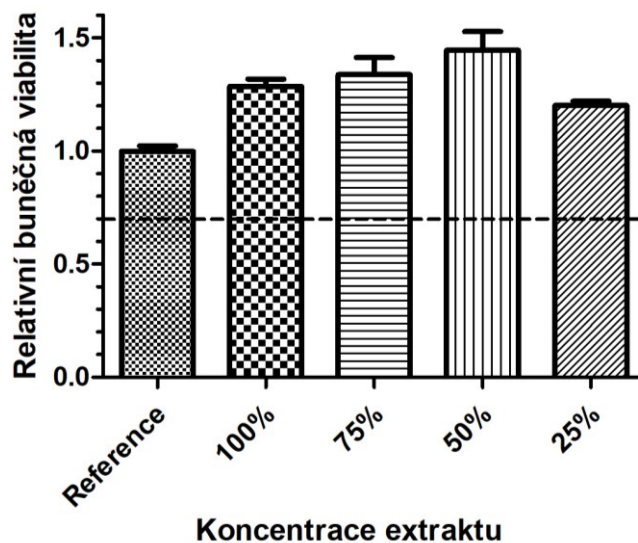
Obrázek 13 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL + FN gelu

Při kontaktu buněk s extraktem z kolagenového hydrogelu s přidavkem 1 % fibronektinu, jak znázorňuje Obrázek 13, můžeme vidět, že opět nedošlo ke snížení buněčné viability pod referenční hodnotu. Nejvyšší viabilita buněk byla při kontaktu se 75% extraktem.



Obrázek 14 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL + FN + 2 % HA-SH gelu

Hydrogel s fibronectinem a nižším přidavkem HA-SH, tedy 2 %, také zvyšoval buněčnou viabilitu oproti referenci. Jak znázorňuje Obrázek 14, buněčná viabilita v kontaktu s tímto extraktem dosahuje až hodnot 1,3.



Obrázek 15 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL + FN + 10 % HA-SH gelu

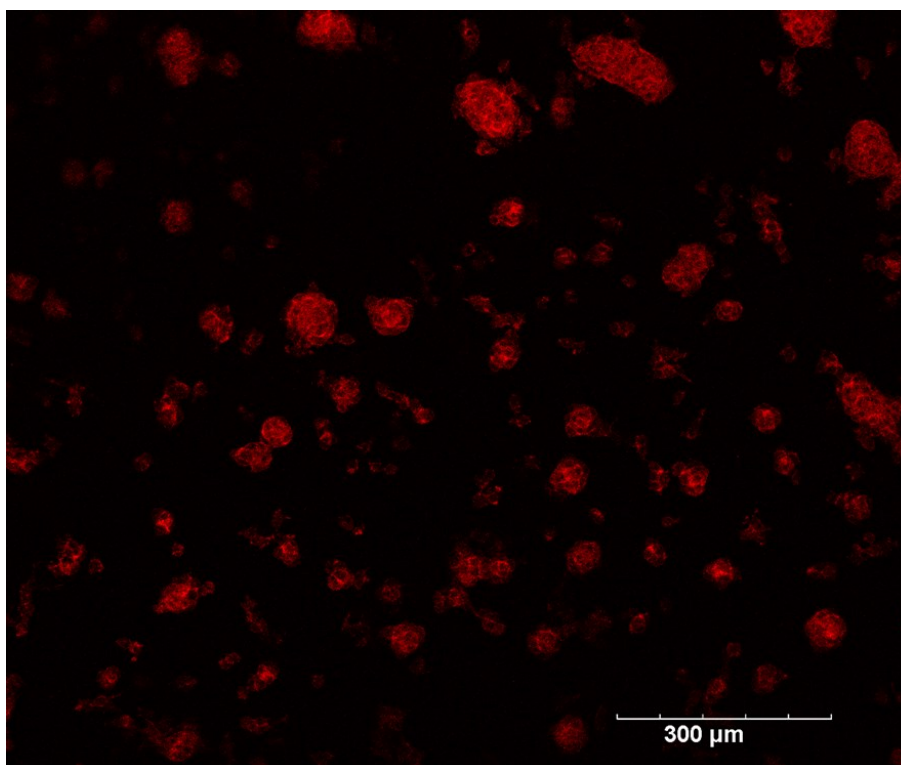
U hydrogelu s fibronectinem a 10% přidavkem HA-SH byly naměřeny nejvyšší hodnoty buněčné viability ze všech, pohybující se od 1,3 až po 1,5 (Obrázek 15). Tyto vyšší hodnoty mohou být způsobené právě vyšším obsahem HA-SH v hydrogelu, který podporuje růst buněk.

Všechny připravené hydrogely měly pozitivní účinek na buněčnou viabilitu. Žádný z nich nesnižoval viabilitu pod referenční hodnotu a lze je tedy označit za necytotoxické. Můžeme také říci, že extrakt z hydrogelu, který obsahoval více složek výrazněji podporoval buněčný růst.

### 6.3 Proliferace buněk

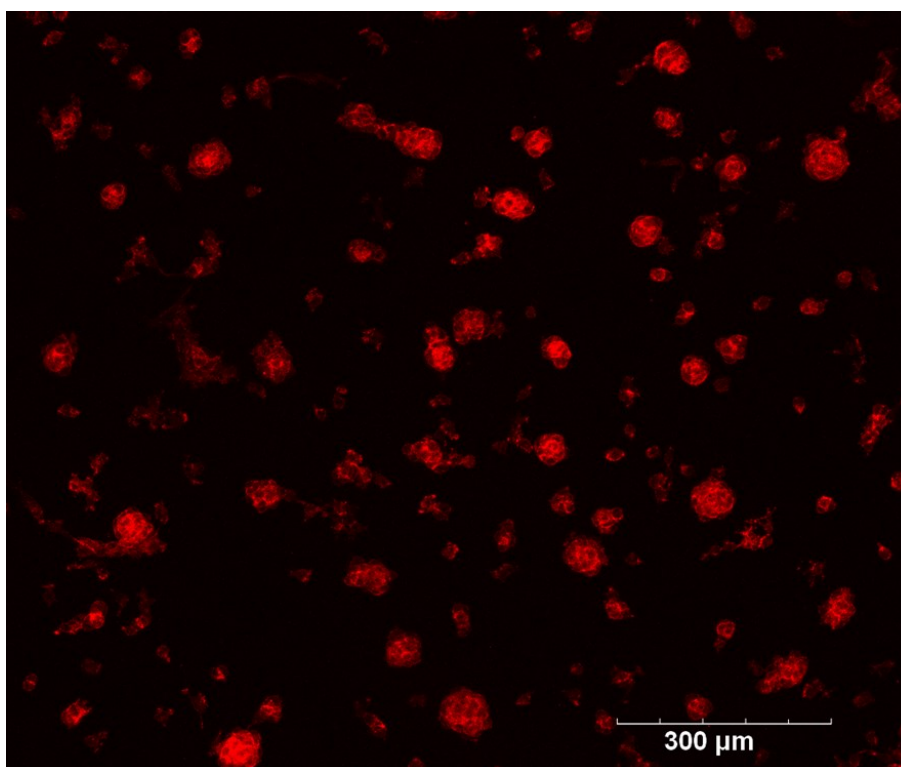
Sledování proliferace buněk bylo provedeno na hydrogelech které byly připraveny do insertů. Jako reference sloužily buňky, které byly nasazeny na tkáňový plastík a na insert bez hydrogelu. Všechny tyto vzorky byly poté obarveny pomocí fluorescenčních barviv. Pomocí barviva ActinRed<sup>TM</sup> 555 byl obarven cytoskelet červeně a pomocí barviva Hoechst byla obarvena jádra buněk modře. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FV 3000.

I přestože byly všechny vzorky nabarveny i barvivem Hoechst, samotný hydrogel pohlcuje barvivo a nebylo tedy možné pořídit snímky pouze samotných jader. Z tohoto důvodu pozorujeme u těchto vzorků proliferaci buněk pouze znázorněním jejich cytoskeletů. Protože buňky rostou uvnitř 3D struktury, odlišují se morfologicky od těch, které rostou na 2D povrchu (Obrázek 20). Na Obrázek 16 můžeme vidět buňky rostoucí uvnitř kolagenového hydrogelu, které se v něm shlukují do klastrů.



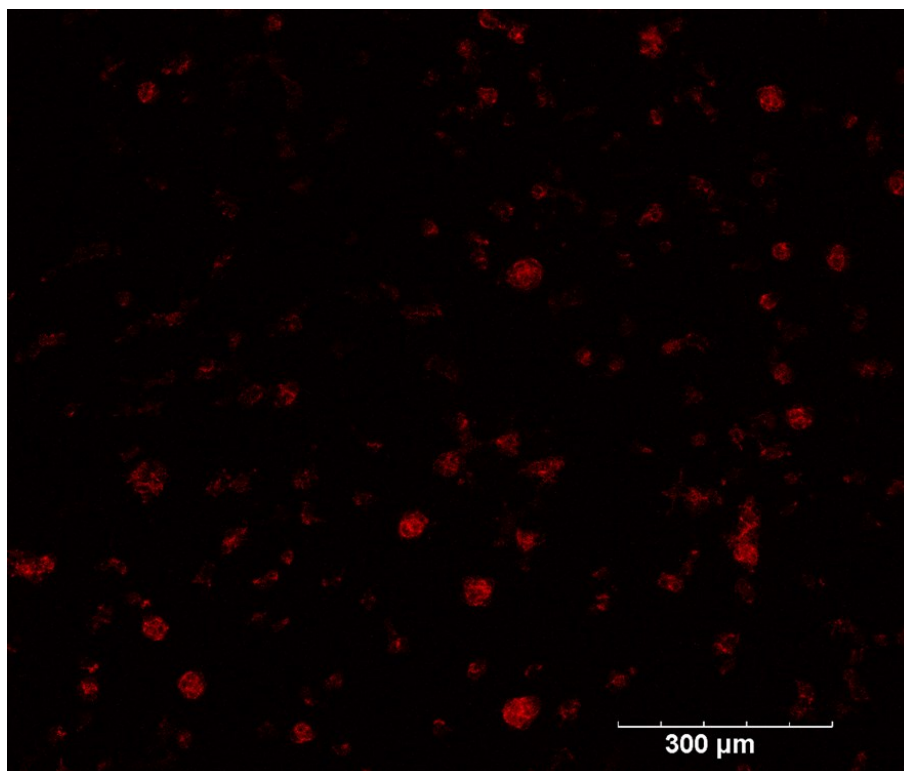
Obrázek 16 Proliferace buněk na COL hydrogelu

I v případě kolagenového hydrogelu obsahující 1 % fibronektinu, se uvnitř tvoří buněčné klastry (Obrázek 17). Oproti kolagenovému hydrogelu (Obrázek 16) se zdá že počet buněk, které dokázaly proliferovat v tomto hydrogelu, je vyšší. Jak bylo i zmíněno výše (viz kapitola 2), fibronektin podporuje adhezi buněk a dokáže interagovat s kolagenem, takže se dalo předpokládat, že začlenění fibronektinu do hydrogelu podpoří adhezi a proliferaci buněk.

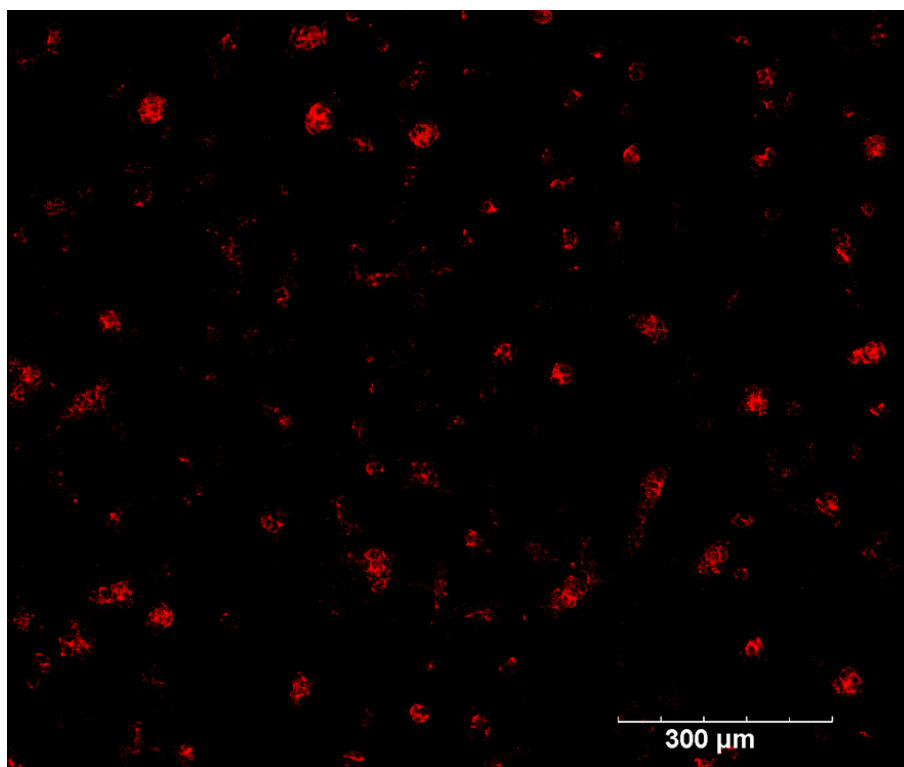


Obrázek 17 Proliferace buněk na COL + FN hydrogelu

Obrázek 18 a Obrázek 19 ukazují růst buněk na hydrogelech s přídavkem HA-SH. U obou vzorků se buňky shlukují do menších klastrů. I přestože z vyhodnocení cytotoxicity extraktů u těchto hydrogelů dosahovaly buňky vyšší viability, ze sledování proliferace na těchto gelech se zdá, že i nižší přídavek HA-SH zvyšuje hydrofilitu hydrogelů a tedy i ovlivňuje schopnost buněk adherovat na tento materiál.

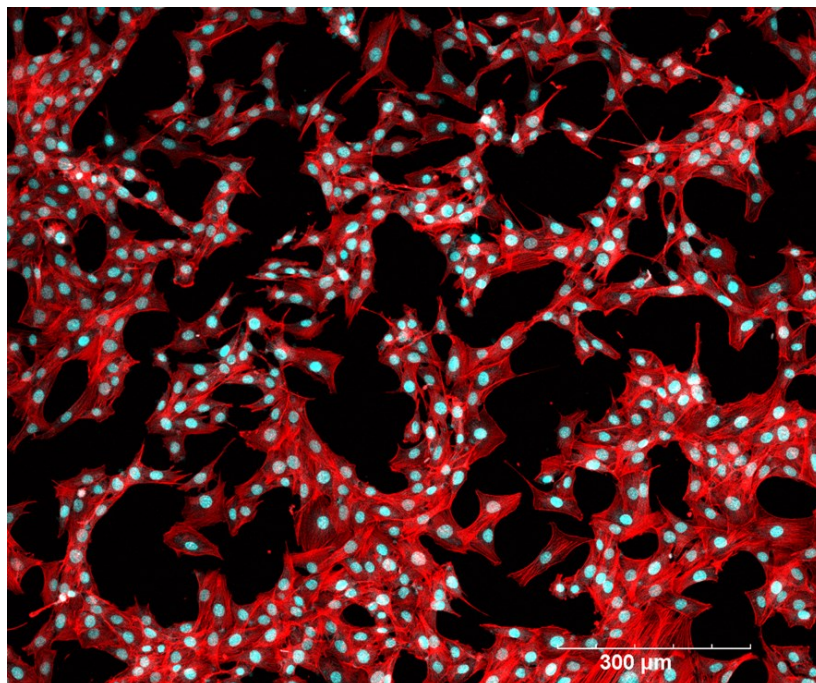


Obrázek 18 Proliferace buněk na COL + FN + 2 % HA-SH hydrogelu

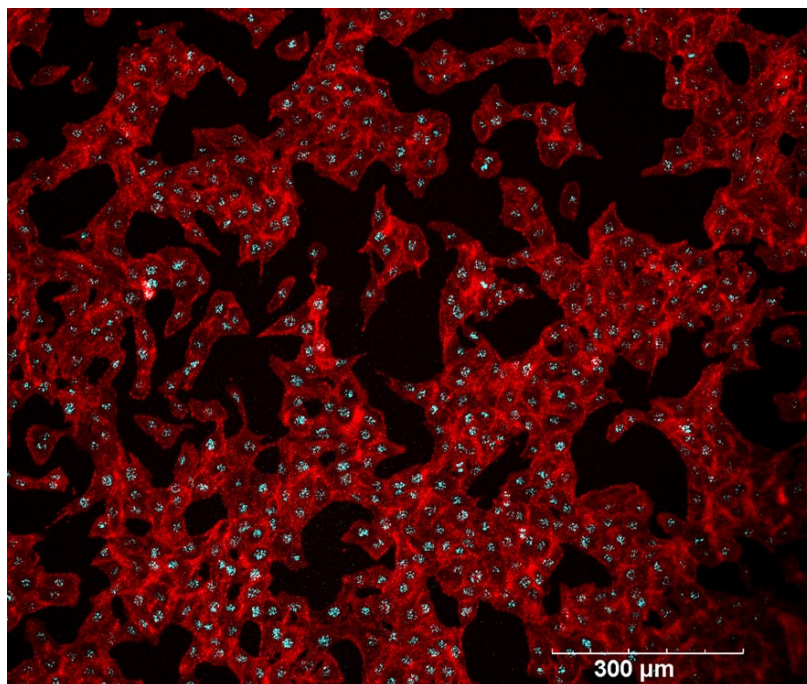


Obrázek 19 Proliferace buněk na COL + FN + 10 % HA-SH hydrogelu

A dalších snímcích můžeme vidět růst referenčních buněk, Obrázek 20 ukazuje růst buněk na tkáňovém plastiku a Obrázek 21 růst buněk na insertu. Buňky rostou na 2D povrchu, tudíž se jejich morfologie bude odlišovat od těch předchozích rostoucích na hydrogelech.



Obrázek 20 Proliferace referenčních buněk na plastiku



Obrázek 21 Proliferace referenčních buněk na insertu

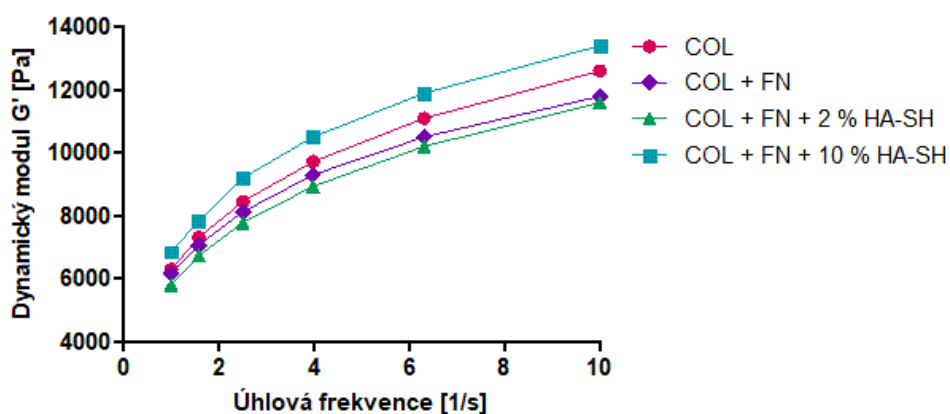
## 6.4 Viskoelastické vlastnosti

Viskoelastické vlastnosti hydrogelů byly analyzovány pomocí reometru při frekvenci úhlové rychlosti 1 až 10 Hz za konstantní deformace 1 % a při teplotě spodní desky 37 °C. Obrázek 22, Obrázek 23 a Obrázek 24 znázorňují závislost dynamického, ztrátového a komplexního modulu na úhlové frekvenci. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 6, Tabulka 7 a Tabulka 8.

### 6.4.1 Dynamický modul $G'$

Tabulka 6 Naměřené hodnoty dynamického modulu  $G'$

Frekvence $\omega$ [1/s]	COL		COL + FN		COL + FN + 2 % HA-SH		COL + FN + 10 % HA-SH	
	$G'$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G'$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G'$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G'$ [Pa]	Chyba [Pa]
1	6300	90	6166	241	5813	127	6850	354
1,58	7306	100	7083	275	6743	136	7850	69
2,51	8453	147	8133	290	7787	123	9197	267
3,98	9723	169	9300	295	8943	96	10533	321
6,31	11133	152	10500	300	10200	0	11933	321
10	12600	264	11800	360	11600	0	13433	321



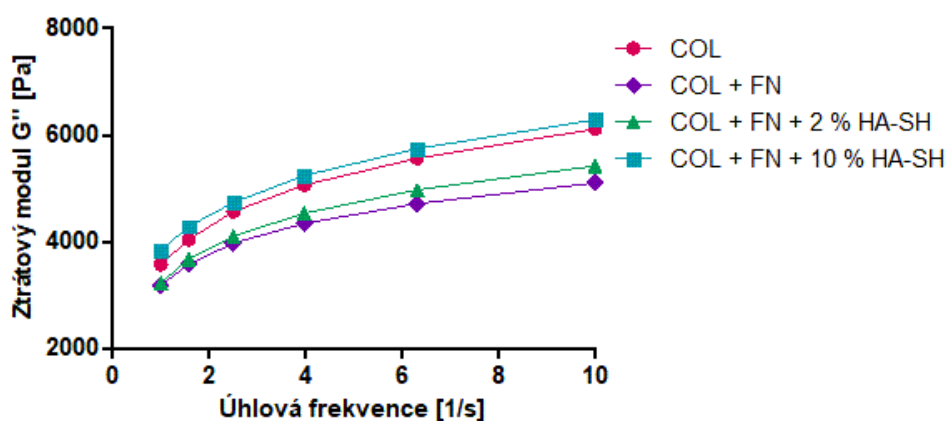
Obrázek 22 Závislost dynamického modulu na úhlové frekvenci

Z Obrázek 22 můžeme vidět, že vyšší dynamický modul  $G'$  je u vzorku obsahující FN a 10 % HA-SH, jehož mezní hodnoty dosahují  $(13433 \pm 321)$  Pa. Nejnižší dynamický modul má hydrogel obsahující FN a 2 % HA-SH, jehož mezní hodnoty dosahují  $(11600 \pm 0)$  Pa. Průběh křivek a hodnoty  $G'$  modulu jsou u všech vzorků velice podobné. Z měření dynamického modulu nám vyplývá, že u všech vzorků hydrogelů převládá část elastická.



6.4.2 Ztrátový modul  $G''$ Tabulka 7 Naměřené hodnoty ztrátového modulu  $G''$ 

Frekvence $\omega$ [1/s]	COL		COL + FN		COL + FN + 2 % HA-SH		COL + FN + 10 % HA-SH	
	$G''$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G''$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G''$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G''$ [Pa]	Chyba [Pa]
1	3570	26	3180	101	3223	68	3827	266
1,58	4043	50	3570	131	3670	56	4283	246
2,51	4557	64	3967	156	4103	50	4733	206
3,98	5060	72	4337	175	4533	35	5240	243
6,31	5563	81	4707	199	4970	62	5743	258
10	6110	92	5103	251	5420	61	6283	294

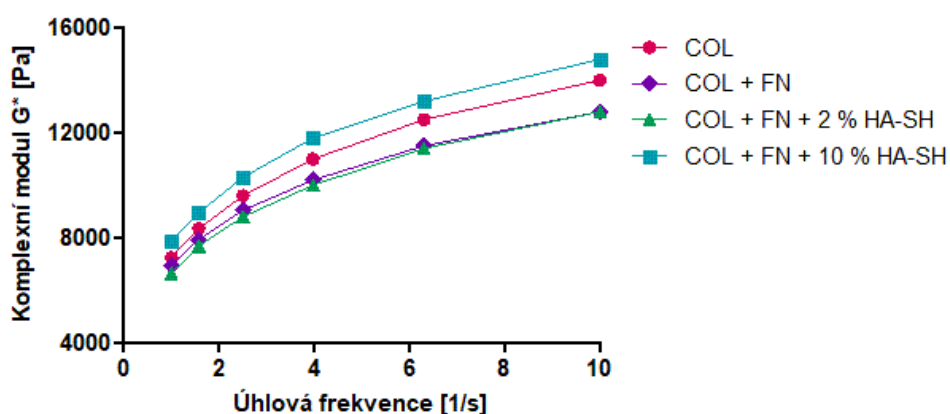


Obrázek 23 Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci

Při měření ztrátového modulu  $G''$  (Obrázek 23) jsou nejvyšší mezní hodnoty u hydrogelu obsahující FN a 10 % HA-SH a to  $(6283 \pm 294)$  Pa. Hodnoty ztrátového modulu jsou u všech vzorků přibližně o řád nižší než u modulu dynamického. Rozdílné hodnoty vidíme i u podílu HA-SH v hydrogelu, hydrogel s 10 % HA-SH je více elastický, i z toho důvodu že HA-SH síťuje za vzniku disulfidických vazeb které dodávají hydrogelu elasticnost, oproti hydrogelu pouze s 2 % HA-SH, který je viskóznější.

6.4.3 Komplexní modul  $G^*$ Tabulka 8 Naměřené hodnoty komplexního modulu  $G^*$ 

Frekvence $\omega$ [1/s]	COL		COL + FN		COL + FN + 2 % HA-SH		COL + FN + 10 % HA-SH	
	$G^*$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G^*$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G^*$ [Pa]	Chyba [Pa]	$G^*$ [Pa]	Chyba [Pa]
1	7240	95	6940	261	6647	143	7847	416
1,58	8353	115	7933	300	7677	126	8947	114
2,51	9600	159	9050	330	8803	100	10333	321
3,98	10967	208	10243	337	10020	72	11767	379
6,31	12467	208	11500	361	11367	58	13233	404
10	14000	265	12833	416	12800	0	14800	436

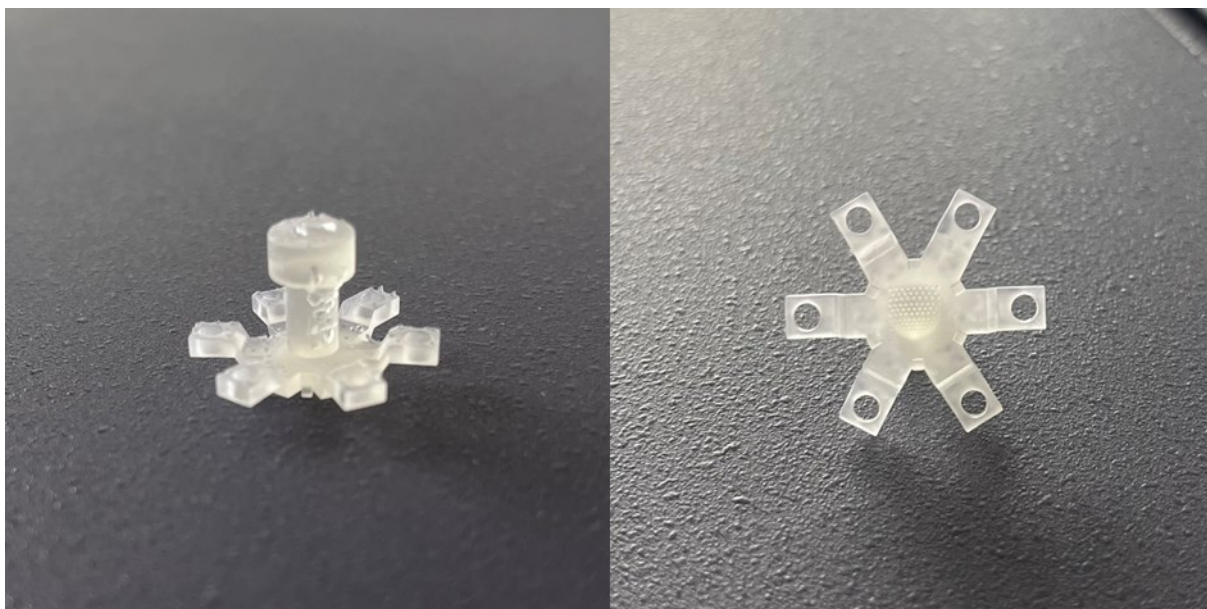


Obrázek 24 Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci

Komplexní modul  $G^*$  je vypočítán jako čtverec odmocniny součtu dynamického modulu  $G'$  a ztrátového modulu  $G''$ . Výsledky jsou řádově podobné těm pro elastický modul. Z Obrázek 24 můžeme vidět, že nejvyšší komplexní modul má opět hydrogel s FN + 10 % HA-SH a to  $(14800 \pm 436)$  Pa, což nám potvrzuje že tento hydrogel je spolu se vzorkem obsahující pouze COL více elastický. Oproti tomu hydrogely s přídavkem FN a 2 % HA-SH se chovají nepatrně viskózněji.

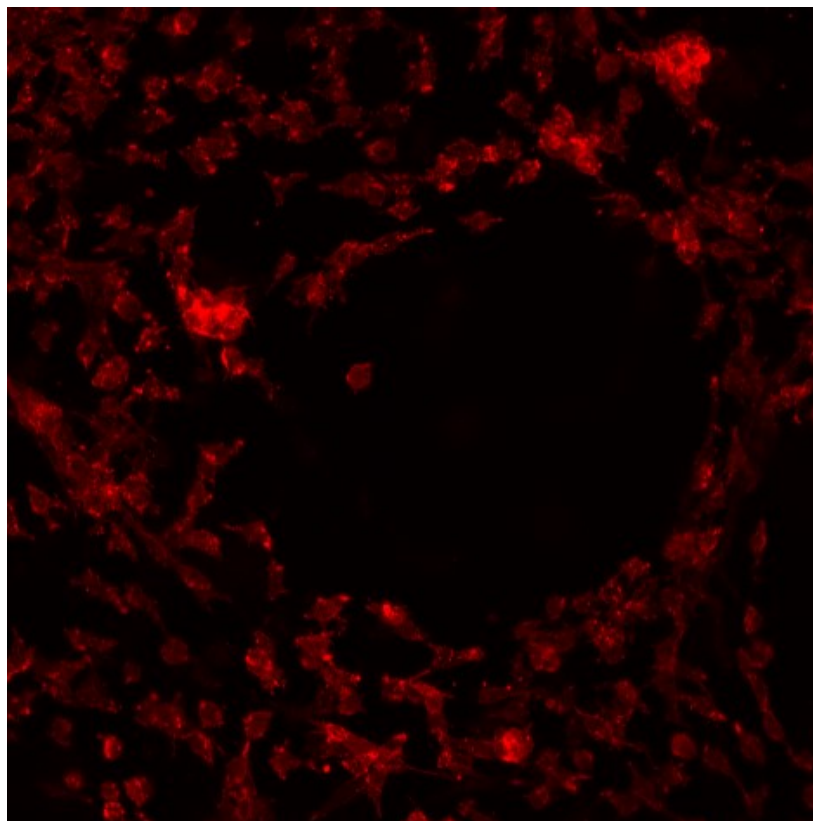
## 6.5 Budoucnost materiálu

Ve spolupráci s Ing. Michaelou Kurkovou (Centrum polymerních systémů, Zlín) byly připraveny hydrogely, které by měli být vhodnější pro tkáňový model tenkého střeva a také lépe napodobovat jeho nativní strukturu. Oproti přípravy hydrogelů, která byla popsána v této práci, rozdíl spočívá v použití raznice vytištěné na 3D tiskárně Ing. Markétou Kadlečkovou, Ph.D. (Centrum polymerních systémů, Zlín) (Obrázek 25), která simuluje klky vyskytující se na povrchu sliznice tenkého střeva tvorbou definovaných jamek do hydrogelu. Klky jsou v tenkém střevě klíčové pro vstřebávání živin a je tedy nutné tkáňový model přizpůsobit nejen ve složení hydrogelu, ale i v napodobení struktury nativní tkáně.

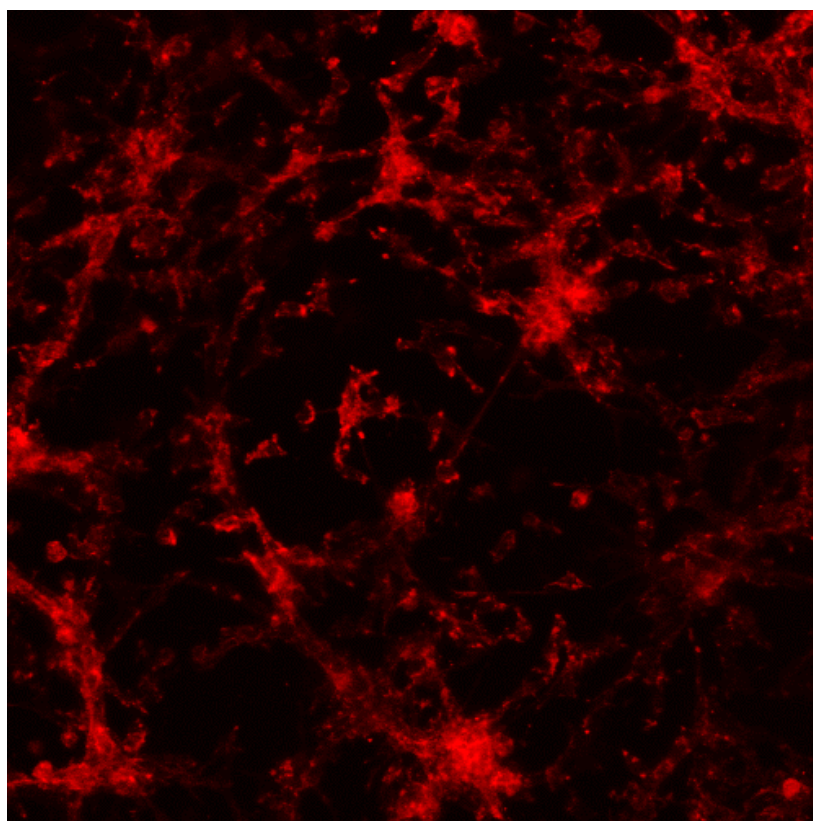


Obrázek 25 Raznice pro tkáňový model

Pro prvotní studii byly použity dva hydrogely obsahující COL + FN a COL + FN + HA-SH. Po obarvení buněk můžeme vidět, že v případě prvního hydrogelu (Obrázek 26) buňky proliferují po obvodu jamky, kdežto u hydrogelu s přídavkem HA-SH (Obrázek 27) migrují i do středu jamky. I přestože se jedná o pouze malou studii, je z výsledků patrné, že pro vytvoření tkáňového modelu tenkého střeva, je velice klíčové napodobit jeho typickou strukturu a také optimalizovat složení hydrogelů přibližující se ECM této tkáně, protože přídavek dalších složek do hydrogelu, v našem případě HA-SH, podporuje proliferaci buněk uvnitř uměle vytvořených klků.



Obrázek 26 Růst buněk na hydrogelu COL + FN s použitím raznice



Obrázek 27 Růst buněk na hydrogelu COL + FN + HA-SH s použitím raznice

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo sepsat rešerši zabývající se základními komponenty ECM a problematikou tkáňových modelů a následně připravit kompozitní hydrogely využitelné jako základní prvek pro *in vitro* model tkáně tenkého střeva.

Praktická část se skládala ze čtyř částí. První část se zabývala přípravou samotných kompozitních hydrogelů na bázi kolagenu typu I, rozpustného plazmatického fibronektinu a thiolované kyseliny hyaluronové. Tyto látky byly vybrány z toho důvodu, že se hojně nachází v ECM a vyznačují se vlastnostmi, které jsou výhodné pro použití v tkáňových modelech. Například kolagen typu I s plazmatickým fibronektinem synergicky napomáhají adhezi buněk. Celkově byly připraveny čtyři typy hydrogelů ve dvou provedeních, a to hydrogel na bázi kolagenu, dále na bázi kolagenu s fibronektinem a na bázi kolagenu, fibronektinu a thiolované kyseliny hyaluronové v koncentraci 2 % a 10 %. Tyto hydrogely byly připraveny buď v insertech, které byly dále použity pro sledování proliferace buněk nebo ve 12-jamkové destičce, které dále sloužily pro testování cytotoxicity a měření viskoelastických vlastností.

Druhá a třetí část se zabývala testováním biologických vlastností hydrogelů na buněčné linii myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Nejprve se začínalo s testováním cytotoxicity v přímém kontaktu. Bohužel při tomto testování docházelo k mechanickému poškození buněk, kdy během manipulace s hydrogelem byly adherované buňky strženy, a tudíž výsledek z tohoto testu vycházel jako cytotoxický a nebyl validní. Z tohoto důvodu bylo dále přistoupeno k testování cytotoxicity extraktu.

Testování cytotoxicity extraktu bylo provedeno podle normy ČSN EN ISO 10993-5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*. Připravené hydrogely měly pozitivní vliv na buněčnou viabilitu a žádný z nich ji nesnížil pod 70 % referenční hodnoty a můžeme je tedy považovat za necytotoxické. Předpokládalo se, že tyto kompozitní hydrogely nebudou snižovat buněčnou viabilitu, protože se všechny komponenty běžně vyskytují v nativní tkáni, ale testování cytotoxicity *in vitro* je nezbytnou a doporučenou součástí při hodnocení biologické bezpečnosti všech biomateriálů.

Třetí část praktické části se zabývala sledováním proliferace myších fibroblastů uvnitř hydrogelu. Buňky byly obarveny pomocí ActinRed<sup>TM</sup> 555, který obarvuje cytoskelet červeně a snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu. Uvnitř hydrogelu na bázi kolagenu a na bázi kolagenu s fibronectinem se tvořily buněčné klastry. U hydrogelu s přísávkem fibronectinu se zdá množství buněčných klastrů vyšší, a to z důvodu, že fibronectin podporuje adhezi buněk. Naopak u hydrogelů s 2 % a 10 % thiolované kyseliny hyaluronové se snížil počet buněčných klastrů. I přestože u těchto hydrogelů při testování cytotoxicity byla viabilita buněk vyšší oproti ostatním, přísávek HA-SH zvyšuje hydrofilitu materiálů z čehož vyplývá zhoršená schopnost buněk adherovat na jeho povrch.

Ve čtvrté části byly měřeny viskoelastické vlastnosti hydrogelů na rotačním reometru v uspořádání deska-deska. Z měření vyplývá že u všech hydrogelů převládá elastický charakter a také že hydrogely s 10% obsahem HA-SH vykazují vyšší elasticitu ve srovnání s ostatními hydrogely, a to z důvodu tvorby disulfidických vazeb, které dodávají materiálu větší elasticitu.

V poslední části byly ve spolupráci s kolegy připraveny hydrogely, které lépe napodobují strukturu tenkého střeva. Na rozdíl od předchozích publikovaných postupů, byla použita raznice vytištěna na 3D tiskárně, která vytvořila definované jamky na povrchu hydrogelu simulující klky nacházející se ve střevním epitelu. Snímky z konfokálního mikroskopu ukázaly, že buňky na hydrogelu s HA-SH migrují i do středu jamek. V tomto případě naopak HA-SH podporovalo adhezi a migraci buněk, než jak tomu bylo u hydrogelů bez použití raznice.

Všechny tyto výsledky naznačují, že pro vytvoření *in vitro* tkáňového modelu tenkého střeva je klíčové nejen napodobit strukturu střevního epitelu, ale také optimalizovat složení hydrogelů tak, aby více odpovídalo stavbě ECM. Je tedy nutné splnit mnoho aspektů při vývoji tkáňových modelů což jen potvrzuje komplexnost této problematiky.

Závěrem lze říci, že se úspěšně podařilo připravit a charakterizovat kompozitní hydrogely sloužící pro *in vitro* model tenkého střeva. Hydrogely složené z kolagenu, thiolované kyseliny hyaluronové a fibronectinu vykazovaly slibné viskoelastické vlastnosti a výsledky z hodnocení biologických vlastností nasvědčují jeho potenciál pro podporu růstu a proliferace buněk. Samozřejmě je zde místo pro zdokonalení tkáňového modelu a jeho kvalitu by zlepšilo přesnější napodobení architektury střevního epitelu nebo použití vhodnější buněčné linie jako je např. Caco-2.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MOYSIDOU, Chrysanthi-Maria, Chiara BARBERIO a Róisín Meabh OWENS. Advances in Engineering Human Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **8**, 620962. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.620962
- [2] JENSEN, Caleb a Yong TENG. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2020, **7**, 33. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2020.00033
- [3] WEINHART, Marie, Andreas HOCKE, Stefan HIPPENSTIEL, Jens KURRECK a Sarah HEDTRICH. 3D organ models—Revolution in pharmacological research? *Pharmacological Research* [online]. 2019, **139**, 446–451. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2018.11.002
- [4] JUNG, Sang-Myung a Seonghun KIM. *In vitro* Models of the Small Intestine for Studying Intestinal Diseases. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2022, **12**, 767038. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.767038
- [5] OWCZARZY, Aleksandra, Robert KURASIŃSKI, Karolina KULIG, Wojciech ROGÓŻ, Agnieszka SZKUDLAREK a Małgorzata MACIĄŻEK-JURCZYK. Collagen - structure, properties and application [online]. 2020 [vid. 2023-11-16]. Dostupné z: doi:10.34821/ENG.BIOMAT.156.2020.17-23
- [6] SUKI, Béla. The collagen molecule. In: *Structure and Function of the Extracellular Matrix* [online]. B.m.: Elsevier, 2022 [vid. 2023-11-16], s. 29–54. ISBN 978-0-12-819716-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819716-5.00001-0
- [7] AL-SHAER, Alaa, Aaron LYONS, Yoshihiro ISHIKAWA, Billy G. HUDSON, Sergei P. BOUDKO a Nancy R. FORDE. Sequence-dependent mechanics of collagen reflect its structural and functional organization. *Biophysical Journal* [online]. 2021, **120**(18), 4013–4028. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2021.08.013
- [8] XU, Qinghua, Jessica E. TORRES, Mazin HAKIM, Paulina M. BABIAK, Pallabi PAL, Carly M. BATTISTONI, Michael NGUYEN, Alyssa PANITCH, Luis SOLORIO a Julie C. LIU. Collagen- and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2021, **146**, 100641. ISSN 0927796X. Dostupné z: doi:10.1016/j.msre.2021.100641
- [9] CATOIRA, Marta Calvo, Luca FUSARO, Dalila DI FRANCESCO, Martina RAMELLA a Francesca BOCCAFOSCHI. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2019, **30**(10), 115. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-019-6318-7
- [10] BIRK, David E. a Peter BRÜCKNER. Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly. In: Robert P. MECHAM, ed. *The Extracellular Matrix: an Overview* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011 [vid. 2023-11-17], s. 77–115. ISBN 978-3-642-16554-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-16555-9\_3

- [11] SOBCZAK-KUPIEC, Agnieszka, Anna DRABCZYK, Wioletta FLORKIEWICZ, Magdalena GŁĄB, Sonia KUDŁACIK-KRAMARCZYK, Dagmara SŁOTA, Agnieszka TOMALA a Bożena TYLISZCZAK. Review of the Applications of Biomedical Compositions Containing Hydroxyapatite and Collagen Modified by Bioactive Components. *Materials* [online]. 2021, **14**(9), 2096. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14092096
- [12] AN, Bo, Yu-Shan LIN a Barbara BRODSKY. Collagen interactions: Drug design and delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **97**, 69–84. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2015.11.013
- [13] LEITINGER, Birgit a Erhard HOHENESTER. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* [online]. 2007, **26**(3), 146–155. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2006.10.007
- [14] ELANGO, Jeevithan, Chunyu HOU, Bin BAO, Shujun WANG, José Eduardo MATÉ SÁNCHEZ DE VAL a Wu WENHUI. The Molecular Interaction of Collagen with Cell Receptors for Biological Function. *Polymers* [online]. 2022, **14**(5), 876. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14050876
- [15] TO, Wing S a Kim S MIDWOOD. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair* [online]. 2011, **4**(1), 21. ISSN 1755-1536. Dostupné z: doi:10.1186/1755-1536-4-21
- [16] BIERBAUM, S., V. HINTZE a D. SCHARNWEBER. 2.8 Artificial Extracellular Matrices to Functionalize Biomaterial Surfaces ☆. In: *Comprehensive Biomaterials II* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2023-11-22], s. 147–178. ISBN 978-0-08-100692-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10206-1
- [17] DALTON, Caleb J. a Christopher A. LEMMON. Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cells* [online]. 2021, **10**(9), 2443. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10092443
- [18] ASADISHEKARI, Maryam, Elie N. MPOYI, Yifan LI, Javad ESLAMI, Matthew WALKER, Marco CANTINI a Delphine GOURDON. Three-Dimensional Tunable Fibronectin-Collagen Platforms for Control of Cell Adhesion and Matrix Deposition. *Frontiers in Physics* [online]. 2022, **10**, 806554. ISSN 2296-424X. Dostupné z: doi:10.3389/fphy.2022.806554
- [19] PATTEN, Jennifer a Karin WANG. Fibronectin in development and wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2021, **170**, 353–368. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2020.09.005
- [20] YANG, Shao Ling, Lv Yun ZHU, Rui HAN, Lei Lei SUN a Jing Tao DOU. Effect of Negative Pressure Wound Therapy on Cellular Fibronectin and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Expression in Diabetic Foot Wounds. *Foot & Ankle International* [online]. 2017, **38**(8), 893–900. ISSN 1071-1007, 1944-7876. Dostupné z: doi:10.1177/1071100717704940



- [21] KLAVERT, Jonathan a Bram C. J. VAN DER EERDEN. Fibronectin in Fracture Healing: Biological Mechanisms and Regenerative Avenues. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **9**, 663357. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2021.663357
- [22] LENSELINK, Ellie A. Role of fibronectin in normal wound healing. *International Wound Journal* [online]. 2015, **12**(3), 313–316. ISSN 1742-4801, 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12109
- [23] JAYASREE, Anjana, Aparna Viswanathan AMMANATH a Jolly THOMAS. Hyaluronic acid in tissue engineering. In: *Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2023 [vid. 2024-02-20], s. 585–607. ISBN 978-0-323-98827-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-98827-8.00016-3
- [24] SOLIS, Mairim Alexandra, Ying-Hui CHEN, Tzyy Yue WONG, Vanessa Zaiatz BITTENCOURT, Yen-Cheng LIN a Lynn L. H. HUANG. Hyaluronan Regulates Cell Behavior: A Potential Niche Matrix for Stem Cells. *Biochemistry Research International* [online]. 2012, **2012**, 1–11. ISSN 2090-2247, 2090-2255. Dostupné z: doi:10.1155/2012/346972
- [25] GUPTA, Ramesh C., Rajiv LALL, Ajay SRIVASTAVA a Anita SINHA. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2019, **6**, 192. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2019.00192
- [26] KHUNMANEE, Sureerat, Younghyen JEONG a Hansoo PARK. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. 2017, **8**, 204173141772646. ISSN 2041-7314, 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731417726464
- [27] LEE, Bo Mi, Sang Jun PARK, Insup NOH a Chun-Ho KIM. The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses. *Biomaterials Research* [online]. 2021, **25**(1), 27. ISSN 2055-7124. Dostupné z: doi:10.1186/s40824-021-00228-4
- [28] SNETKOV, Petr, Kseniia ZAKHAROVA, Svetlana MOROZKINA, Roman OLEKHNOVICH a Mayya USPENSKAYA. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers* [online]. 2020, **12**(8), 1800. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12081800
- [29] RAO, N. Vijayakameswara. Hyaluronic acid-based hydrogels for tissue engineering. In: *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2024-03-03], s. 551–565. ISBN 978-0-08-102906-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102906-0.00014-3
- [30] DOVEDYTIS, Matthew, Zhuo Jie LIU a Samuel BARTLETT. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. *Engineered Regeneration* [online]. 2020, **1**, 102–113. ISSN 26661381. Dostupné z: doi:10.1016/j.engreg.2020.10.001

- [31] SUKI, Béla. Hyaluronan and hyalactans: The good, the bad, and the ugly. In: *Structure and Function of the Extracellular Matrix* [online]. B.m.: Elsevier, 2022 [vid. 2024-03-24], s. 165–192. ISBN 978-0-12-819716-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819716-5.00013-7
- [32] CHAUDHRY, Gul-e-Saba, Abdah AKIM, Muhammad NAVEED ZAFAR, Naila SAFDAR, Yeong Yik SUNG a Tengku Sifzizul Tengku MUHAMMAD. Understanding Hyaluronan Receptor (CD44) Interaction, HA-CD44 Activated Potential Targets in Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2020, **11**(3), 426–438. ISSN 2228-5881, 2251-7308. Dostupné z: doi:10.34172/apb.2021.050
- [33] HINNEH, Josephine A., Joanna L. GILLIS, Nicole L. MOORE, Lisa M. BUTLER a Margaret M. CENTENERA. The role of RHAMM in cancer: Exposing novel therapeutic vulnerabilities. *Frontiers in Oncology* [online]. 2022, **12**, 982231. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2022.982231
- [34] SHYAM, Rohin, L. Vinod Kumar REDDY a Arunkumar PALANIAPPAN. Fabrication and Characterization Techniques of *In vitro* 3D Tissue Models. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(3), 1912. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24031912
- [35] XIE, Renjian, Vaibhav PAL, Yanrong YU, Xiaolu LU, Mengwei GAO, Shijie LIANG, Miao HUANG, Weijie PENG a Ibrahim T. OZBOLAT. A comprehensive review on 3D tissue models: Biofabrication technologies and preclinical applications. *Biomaterials* [online]. 2024, **304**, 122408. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2023.122408
- [36] GUNTI, Sreenivasulu, Austin T.K. HOKE, Kenny P. VU a Niyall R. LONDON. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers* [online]. 2021, **13**(4), 874. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13040874
- [37] BIAŁKOWSKA, Kamila, Piotr KOMOROWSKI, Maria BRYSZEWSKA a Katarzyna MIŁOWSKA. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(17), 6225. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21176225
- [38] KIM, Jihoon, Bon-Kyoung KOO a Juergen A. KNOBLICH. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2020, **21**(10), 571–584. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-020-0259-3
- [39] YANG, Siqu, Haijie HU, Hengchung KUNG, Ruiqi ZOU, Yushi DAI, Yafei HU, Tiantian WANG, Tianrun LV, Jun YU a Fuyu LI. Organoids: The current status and biomedical applications. *MedComm* [online]. 2023, **4**(3), e274. ISSN 2688-2663, 2688-2663. Dostupné z: doi:10.1002/mco2.274

- [40] MAJI, Somnath a Hyungseok LEE. Engineering Hydrogels for the Development of Three-Dimensional *In vitro* Models. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(5), 2662. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23052662
- [41] NAAHIDI, Sheva, Mousa JAFARI, Megan LOGAN, Yujie WANG, Yongfang YUAN, Hojae BAE, Brian DIXON a P. CHEN. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2017, **35**(5), 530–544. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.05.006
- [42] AGARWAL, Swarnima, Shreya SAHA, Vamsi Krishna BALLA, Aniruddha PAL, Ananya BARUI a Subhadip BODHAK. Current Developments in 3D Bioprinting for Tissue and Organ Regeneration—A Review. *Frontiers in Mechanical Engineering* [online]. 2020, **6**, 589171. ISSN 2297-3079. Dostupné z: doi:10.3389/fmech.2020.589171
- [43] SACHDEV, Ankita, Sourya ACHARYA, Tejas GADODIA, Samarth SHUKLA, Harshita J, Chinmay AKRE, Mansi KHARE a Shreyash HUSE. A Review on Techniques and Biomaterials Used in 3D Bioprinting. *Cureus* [online]. 2022 [vid. 2024-04-06]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.28463
- [44] INGBER, Donald E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2022, **23**(8), 467–491. ISSN 1471-0056, 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/s41576-022-00466-9
- [45] LEUNG, Chak Ming, Pim DE HAAN, Kacey RONALDSON-BOUCHARD, Ge-Ah KIM, Jihoon KO, Hoon Suk RHO, Zhu CHEN, Pamela HABIBOVIC, Noo Li JEON, Shuichi TAKAYAMA, Michael L. SHULER, Gordana VUNJAK-NOVAKOVIC, Olivier FREY, Elisabeth VERPOORTE a Yi-Chin TOH. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers* [online]. 2022, **2**(1), 33. ISSN 2662-8449. Dostupné z: doi:10.1038/s43586-022-00118-6
- [46] CREFF, Justine, Laurent MALAQUIN a Arnaud BESSON. *In vitro* models of intestinal epithelium: Toward bioengineered systems. *Journal of Tissue Engineering* [online]. 2021, **12**, 204173142098520. ISSN 2041-7314, 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731420985202
- [47] HUSSEY, George S., Timothy J. KEANE a Stephen F. BADYLAK. The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [online]. 2017, **14**(9), 540–552. ISSN 1759-5045, 1759-5053. Dostupné z: doi:10.1038/nrgastro.2017.76
- [48] PIMENTA, Joana, Ricardo RIBEIRO, Raquel ALMEIDA, Pedro F. COSTA, Marta A. DA SILVA a Bruno PEREIRA. Organ-on-Chip Approaches for Intestinal 3D *In vitro* Modeling. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2022, **13**(2), 351–367. ISSN 2352345X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmgh.2021.08.015

- [49] KASENDRA, Magdalena, Alessio TOVAGLIERI, Alexandra SONTHEIMER-PHELPS, Sasan JALILI-FIROOZINEZHAD, Amir BEIN, Angeliki CHALKIADAKI, William SCHOLL, Cheng ZHANG, Hannah RICKNER, Camilla A. RICHMOND, Hu LI, David T. BREault a Donald E. INGBER. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), 2871. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-21201-7
- [50] ZEIRINGER, Scarlett, Laura WILTSCHKO, Christina GLADER, Martin REISER, Markus ABSENGER-NOVAK, Eleonore FRÖHLICH a Eva ROBLEGG. Development and Characterization of an *In vitro* Intestinal Model Including Extracellular Matrix and Macrovascular Endothelium. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2023, **20**(10), 5173–5184. ISSN 1543-8384, 1543-8392. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.3c00532
- [51] KIM, WonJin a Geun Hyung KIM. An innovative cell-printed microscale collagen model for mimicking intestinal villus epithelium. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2018, **334**, 2308–2318. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2017.12.001
- [52] COLLINS, Jason T., Amanda NGUYEN a Madhu BADIREDDY. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024 [vid. 2024-04-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>
- [53] AGARWAL, Tarun, Valentina ONESTO, Lallepak LAMBONI, Aafreen ANSARI, Tapas K. MAITI, Pooyan MAKVANDI, Massoud VOSOUGH a Guang YANG. Engineering biomimetic intestinal topological features in 3D tissue models: retrospects and prospects. *Bio-Design and Manufacturing* [online]. 2021, **4**(3), 568–595. ISSN 2096-5524, 2522-8552. Dostupné z: doi:10.1007/s42242-020-00120-5
- [54] HEWES, Sarah A., Reid L. WILSON, Mary K. ESTES, Noah F. SHROYER, Sarah E. BLUTT a K. Jane GRANDE-ALLEN. *In vitro* Models of the Small Intestine: Engineering Challenges and Engineering Solutions. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2020, **26**(4), 313–326. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2019.0334
- [55] FUNAKI, Makoto a Paul A. JANMEY. Technologies to Engineer Cell Substrate Mechanics in Hydrogels. In: *Biology and Engineering of Stem Cell Niches* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2024-04-20], s. 363–373. ISBN 978-0-12-802734-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802734-9.00023-8
- [56] ANTFOLK, Maria a Kim B. JENSEN. A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology *in vitro*. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1), 6244. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-20052-z
- [57] WANG, Yuli, Dulan B. GUNASEKARA, Mark I. REED, Matthew DISALVO, Scott J. BULTMAN, Christopher E. SIMS, Scott T. MAGNESS a Nancy L. ALLBRITTON. A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials* [online]. 2017, **128**, 44–55. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.005

- [58] CASTAÑO, Albert G, María GARCÍA-DÍAZ, Núria TORRAS, Gizem ALTAY, Jordi COMELLES a Elena MARTÍNEZ. Dynamic photopolymerization produces complex microstructures on hydrogels in a moldless approach to generate a 3D intestinal tissue model. *Biofabrication* [online]. 2019, **11**(2), 025007. ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/ab0478
- [59] BIAN, Shaoquan, Mengmeng HE, Junhui SUI, Hanxu CAI, Yong SUN, Jie LIANG, Yujiang FAN a Xingdong ZHANG. The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **140**, 392–402. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.01.008

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BMP	Bone Morphogenetic Protein
cFN	Buněčný fibronectin
COL	Kolagen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracelulární matrix
EDA	Extra Domain A
EDB	Extra Domain B
FN	Fibronectin
GAG	Glykosaminoglykan
Gly	Glycin
HA	Kyselina hyaluronová
HA-SH	Thiolovaná kyselina hyaluronová
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor
pFN	Plazmatický fibronectin
RHAMM	Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility
UPW	Ultrapure water
V	Variable region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Schématické znázornění struktury kolagenu upraveno podle [11]; vytvořeno v BioRender.com.....	14
Obrázek 2 Schematické znázornění primární struktury buněčného a plazmatického fibronektinu upraveno podle [21]; vytvořeno v BioRender.com .....	17
Obrázek 3 Fáze hojení ran upraveno podle [19]; vytvořeno v BioRender.com .....	19
Obrázek 4 Struktura kyseliny hyaluronové s vyznačenými karboxylovými a hydroxylovými skupinami pro chemickou modifikaci upraveno podle [26] .....	20
Obrázek 5 Přehled 3D tkáňových modelů; vytvořeno v Biorender.com .....	24
Obrázek 6 Mikrostruktura střevního epitelu; vytvořeno v Biorender.com.....	30
Obrázek 7 Hydrogely připravené do 12-jamkového plata.....	35
Obrázek 8 Hydrogely připravené do insertů.....	36
Obrázek 9 Testování cytotoxicity v přímém kontaktu.....	37
Obrázek 10 Buňky s extrakty hydrogelů připravené pro MTT test.....	38
Obrázek 11 Buňky po testování cytotoxicity v přímém kontaktu .....	40
Obrázek 12 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL gelu .....	41
Obrázek 13 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL + FN gelu.....	42
Obrázek 14 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL + FN + 2 % HA-SH gelu .	42
Obrázek 15 Buněčná viabilita při kontaktu s extraktem z COL + FN + 10 % HA-SH gelu .....	43
Obrázek 16 Proliferace buněk na COL hydrogelu.....	44
Obrázek 17 Proliferace buněk na COL + FN hydrogelu .....	45
Obrázek 18 Proliferace buněk na COL + FN + 2 % HA-SH hydrogelu .....	46
Obrázek 19 Proliferace buněk na COL + FN + 10 % HA-SH hydrogelu .....	46
Obrázek 20 Proliferace referenčních buněk na plastiku .....	47
Obrázek 21 Proliferace referenčních buněk na insertu .....	47
Obrázek 22 Závislost dynamického modulu na úhlové frekvenci.....	48
Obrázek 23 Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci .....	49
Obrázek 24 Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci .....	50
Obrázek 25 Raznice pro tkáňový model.....	51
Obrázek 26 Růst buněk na hydrogelu COL + FN s použitím raznice .....	52
Obrázek 27 Růst buněk na hydrogelu COL + FN + HA-SH s použitím raznice.....	52

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Umístění jednotlivých typů fibrilárního kolagenu v tkáních podle [5] .....	13
Tabulka 2 Umístění jednotlivých typů nefibrilárního kolagenu v tkáních podle [5].....	13
Tabulka 3 Srovnání výhod a nevýhod 2D a 3D modelů podle [35] .....	23
Tabulka 4 Srovnání sféroidů a organoidů upraveno podle [36] .....	26
Tabulka 5 Složení hydrogelů .....	35
Tabulka 6 Naměřené hodnoty dynamického modulu $G'$ .....	48
Tabulka 7 Naměřené hodnoty ztrátového modulu $G''$ .....	49
Tabulka 8 Naměřené hodnoty komplexního modulu $G^*$ .....	50