

Alginátové tkáňové nosiče

Vivianna Matyóová

Bakalářská 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 BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Vivianna Matyóová**
Osobní číslo: **T21897**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Alginátové tkáňové nosiče**

Zásady pro vypracování

Alginát je přírodní polysacharid vykazující vynikající biokompatibilitu a biologickou odbouratelnost, který má mnoho různých aplikací v oblasti biomedicíny. Je snadno zpracovatelný a může být připraven v různých formách, jako jsou hydrogely, mikrokuličky, mikrokapsle, houby, pěny nebo vlákna.

I. Teoretická část:

Zaměření na popis vlastností alginátu, jeho síťování, možnosti modifikace k možným aplikacím.

II. Praktická část:

Příprava alginátových hydrogelů, které budou podrobeny materiálovým i biologickým charakteristikám.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Rehm, B. H., & Moradali, M. F. (Eds.). (2018). *Alginates and their biomedical applications* (Vol. 11, pp. 1–268). Singapore: Springer.
- [2] Sun, J., & Tan, H. (2013). Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*, 6(4), 1285–1309.
- [3] Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
- [4] Sahoo, D. R., & Biswal, T. (2021). Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 3(1), 30.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Zdenka Víchová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou 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 bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské 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 bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: **Vivianna Matyóová**

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Strata tkaniva alebo jeho funkcie má značný vplyv na kvalitu života človeka. Napriek vyspelým technológiám v medicíne je najčastejším spôsobom náhrady takto poškodeného tkaniva transplantácia, ktorá prináša veľké množstvo nevýhod. V práci boli preto vyrobené rôzne typy alginátových hydrogélů i v kombinácii so želatínou, ktoré boli následne biologicky aj materiálovo charakterizované. Charakterizácia zahŕňala testy cytotoxicity, proliferácie a viskoelastických vlastností v snahe dokázať, že materiál má vlastnosti vhodné na výrobu tkanivových nosičů pre mäkké tkanivá.

Kľúčové slová: alginát, hydrogély, tkanivové nosiče, želatína

ABSTRACT

Tissue loss or dysfunction has a significant impact on the quality of one's life. Despite advanced medical technologies, transplantation remains the most common way to replace such damaged tissue. However, transplantation comes with numerous drawbacks. Therefore, different types of alginate-based hydrogels, also in combination with gelatin, have been fabricated and their biological and material properties were characterized in the thesis. The characterization included cytotoxicity tests, proliferation assays, and assessment of viscoelastic properties, aiming to demonstrate that the material possesses properties suitable for the production of tissue scaffolds for soft tissues.

Keywords: alginate, hydrogels, tissue scaffolds, gelatin

Na tomto mieste by som sa chcela veľmi pekne poďakovať mojej školiteľke doc. Ing. Zdenke Víchovej, Ph.D., ktorá mi bola počas celej doby písania bakalárskej práce oporou, podelila sa so mnou o svoje vzácne skúsenosti a pri práci na praktickej časti ma priučila novým zručnostiam. Ďalej by som sa chcela poďakovať prof. Ing. Michalovi Sedlačíkovi, Ph.D., ktorý so mnou ochotne vykonal reologické testy obsiahnuté v praktickej časti práce a zároveň mi umožnil danej problematike pochopiť.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej práce a elektronická verzia nahraná v IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČASŤ	10
1 TKANIVOVÉ INŽINIERSTVO.....	11
1.1 HISTÓRIA	11
1.2 PRINCÍP	12
2 TKANIVOVÉ NOSIČE.....	14
2.1 POŽADOVANÉ VLASTNOSTI	15
2.1.1 Biologické vlastnosti.....	15
2.1.2 Štruktúrne a mechanické vlastnosti.....	16
2.1.3 Chemické vlastnosti	16
2.2 BIOMATERIÁLY VYUŽÍVANÉ NA PRÍPRAVU SCAFFOLDOV	17
2.2.1 Keramické biomateriály	17
2.2.2 Syntetické polyméry.....	18
2.2.3 Prírodné polyméry.....	18
3 ALGINÁTY	19
3.1 ZÍSKAVANIE	19
3.2 VLASTNOSTI.....	20
3.3 SIEŤOVANIE.....	21
3.4 VYUŽITIE.....	21
II PRAKTICKÁ ČASŤ.....	23
4 CIEĽ PRÁCE	24
5 MATERIÁL A METODIKA	25
5.1 POUŽITÉ PRÍSTROJE A POMÔCKY	25
5.2 BUNKOVÉ KULTÚRY	25
5.3 EXPERIMENT	25
5.3.1 Príprava alginátových hydrogélův	25
5.3.2 Pasážovanie a kultivácia buniek.....	27
5.3.3 Príprava extraktov	28
5.3.4 Test cytotoxicity z extraktu.....	29
5.3.5 MTT test.....	30
5.3.6 Test cytotoxicity v priamom kontakte.....	31
5.3.7 Test proliferácie na povrchu.....	31
5.3.8 Test vrastania buniek do objemu hydrogélův	32
5.3.9 Fixácia a farbenie buniek	33
5.3.10 Reologické testy	34
6 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	36
6.1 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	36

6.1.1	Test cytotoxicity z extraktu	36
6.1.2	Test cytotoxicity v priamom kontakte.....	38
6.1.3	Test proliferácie na povrchu a test vrastania buniek do objemu hydrogélu.....	39
6.2	MATERIÁLOVÉ VLASTNOSTI	42
6.2.1	Reologické testy	42
ZÁVER		46
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY		48
ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....		51
ZOZNAM OBRÁZKOV		52
ZOZNAM TABULIEK		54

ÚVOD

Počas života ľudí často dochádza k poškodeniu či obmedzeniu funkcie rôznych tkanív, čo značne ovplyvňuje kvalitu života. Keďže transplantácia, ktorá je najčastejším spôsobom riešenia týchto problémov prináša rôzne riziká a vyžaduje kompatibilné orgány alebo tkanivá darcov, ktorých počet je limitovaný, čoraz viac sa presadzuje snaha vytvoriť potrebné tkanivá de novo *in vitro*.

Medzi biomateriály vhodné na výrobu tkanív patria aj algináty, ktoré majú široké spektrum potenciálneho využitia v biomedicínskych aplikáciach, sú biokompatibilné, biodegradabilné a ľahko dostupné. Pre vytvorenie tkanivového nosiča je však okrem biokompatibility potrebné zabezpečiť aj vhodné mechanické a biologické vlastnosti, vďaka ktorým bude tkanivový nosič použiteľný v podmienkach *in vivo*.

V praktickej časti práce boli najprv vytvorené alginátové hydrogély s rôznym zložením, a následne bola vykonaná biologická a materiálová charakterizácia jednotlivých vzoriek. Na biologickú charakterizáciu boli uskutočnené testy cytotoxicity z extraktu aj v priamom kontakte a testy proliferácie na povrchu a po injektovaní do objemu 3D štruktúry. Materiálová charakterizácia zahŕňala testy preukazujúce maximálne napätie, ktorým možno na štruktúru pôsobiť bez toho, aby došlo k jej rozpadu a testy, vďaka ktorým bolo možné určiť pomer jednotlivých modulov viskoelastických látok, ktoré vypovedajú o schopnosti hydrogélu tlmiť vibrácie a o pevnostných vlastnostiach biomateriálu.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 TKANIVOVÉ INŽINIERSTVO

Tkanivové inžinierstvo obecne zahŕňa využitie materiálov a buniek v snahe o vytvorenie nových životaschopných tkanív alebo orgánov. [1] Dôležitým faktorom je pochopenie funkcie a správania tkanív, čo vyžaduje dlhodobý výskum v mnohých oblastiach. Niektoré z týchto oblastí zahŕňajú skúmanie bunky samotnej, teda biológiu kmeňových buniek, výskum zdrojov buniek a ich následnú kultiváciu či diferenciaciu. Ďalšou skúmanou oblasťou je embryológia, ktorá umožňuje pochopiť vznik tkanív pri embryonálnom vývoji, teda aj princíp, akým ich možno vytvoriť *in vitro*. Zároveň je tiež nutná znalosť materiálových vied, či biotechnológií. [2]

Jedným z najpodstatnejších doposiaľ zistených faktov je, že správanie buniek je mimoriadne ovplyvnené extracelulárnym matrixom, na ktorý bunky v organizme adherujú. Napodobiť extracelulárny matrix, na ktorý by bunky správne reagovali je však veľmi náročné, preto sa tkanivové inžinierstvo mimo iné zaoberá aj skúmaním fyzikálnych a chemických vlastností rôznych materiálov, ktoré by mohli mať potenciálne využitie pre náhradu konkrétneho tkaniva. Materiály, ktoré sú v tkanivovom inžinierstve využívané najčastejšie, zahŕňajú prírodné a degradabilné polyméry, ale aj biokeramiku. [2]

Ďalším dôležitým činiteľom pri vývoji biomateriálov je kompatibilita s tkanivami, ktorá je kritická pre bezpečné použitie v organizme a správnu interakciu s bunkami či proteínmi nachádzajúcimi sa v tele. Na záver sa tkanivové inžinierstvo taktiež zaoberá vývojom tzv. inteligentných biomateriálov, ktoré napríklad dokážu reagovať na rôzne externé podnety, čo môže zohrávať významnú rolu pri uvoľňovaní liečiv a iných látok v cieľovom tkanive alebo orgáne. [3]

1.1 História

Už v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia sa doktor W. T. Green pokúsil o vytvorenie chrupavky zasadením chondrocytov do kostnej štiepky, ktorá bola následne implantovaná myši. Aj napriek tomu, že zákrok nebol úspešný, jeho predpoklady o výhodách biokompatibilného materiálu, na ktorý by bolo možné zasadiť bunky a vytvoriť tým tkanivo, boli správne. Pár rokov po prvotných snahách doktora Greena bola vytvorená

syntetická náhrada kože pomocou dermálnych fibroblastov nasadených do kolagénového matrixu, či vrstvy keratinocytov použité pri pacientoch s popáleninami. [4]

Všetky popísané experimenty jednoznačne prispeli ku vzniku tkanivového inžinierstva, no kľúčová bola práca doktora Josepha Vacantiho v osemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia, ktorý prišiel s myšlienkou navrhnutia umelo vytvorenej opornej štruktúry (tkanivového nosiča), ktorá by mimikovala prirodzené prostredie, a ktorá bude bunky dopravovať do cieľovej destinácie, miesto sadenia buniek na dostupné, prirodzene vyskytujúce sa nosiče, ktorých fyzikálnymi či chemickými vlastnosťami nemožno manipulovať, teda zapríčiňujú nepredvídateľné výsledky experimentov. Doktor Vacanti zaviedol štúdiu, ktorej cieľom bolo vytvoriť funkčné náhrady tkanív za využitia biokompatibilných a biodegradabilných syntetických polymérov s nasadenými životaschopnými bunkami. V snahe preskúmať toto odvetvie podrobnejšie, bolo v Európe aj Spojených Štátoch založených mnoho výskumných centier a laboratórií, ktoré sa začali téme biomateriálov a tkanivového inžinierstva naplno venovať. V druhej polovici deväťdesiatych rokov dvadsiateho storočia boli inštitúcie venujúce sa tejto vedeckej oblasti takmer v každej rozvinutej krajine sveta. [5]

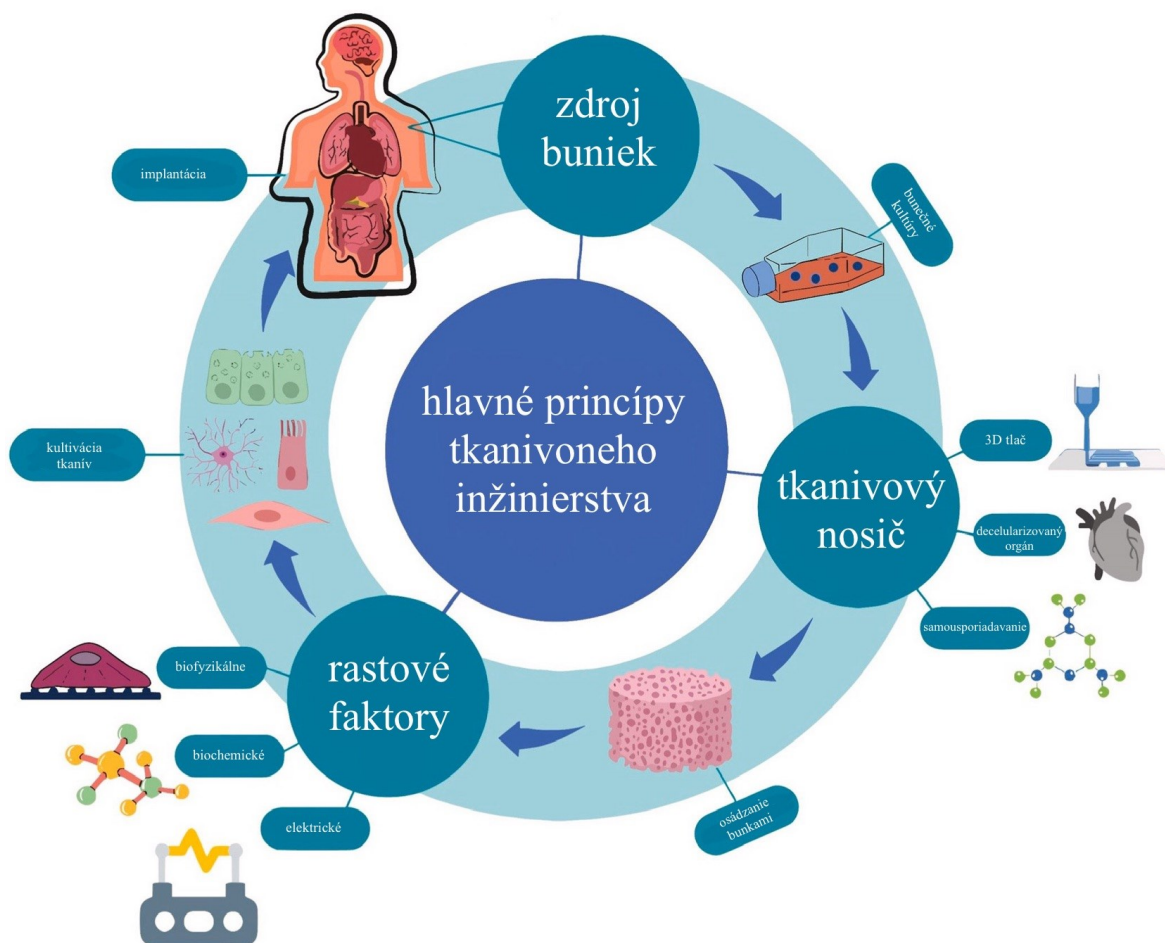
1.2 Princíp

Princípy tkanivového inžinierstva sa stali predmetom diskusie až v neskorých osemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia, kedy sa vedci, ale aj inžinieri a lekári začali zaoberať možnosťou vytvorenia nového tkaniva, čím by znížili akútny nedostatok orgánov na transplantáciu. Bez ohľadu na to, aké tkanivo alebo orgán je cieľom vytvoriť, základné princípy tkanivového inžinierstva zahŕňajú získanie zdroja buniek, ich izoláciu a následnú proliferáciu, výrobu tkanivového nosiča a zabezpečenie vhodných podmienok pre kultiváciu buniek. [6]

Na vytvorenie nového tkaniva možno použiť tri zdroje buniek, a to autológne bunky pochádzajúce od samotného recipienta, ktoré sú imunitne kompatibilné, ale ich dostupnosť je obmedzená. Ďalším zdrojom sú bunky alogénne pochádzajúce od darcu, ktoré sú dostupnejšie, ale menej kompatibilné. Tretím zdrojom sú bunky xenogénne, ktoré pochádzajú od iného živočíšneho druhu, pri ktorých nastáva problém s kompatibilitou aj prenosom vírusových ochorení. Po výbere požadovaného zdroja buniek je možné vykonať

genetické úpravy, vďaka ktorým možno dosiahnuť inhibíciu imunitnej odpovede, či zvýšenie sekrécie biologicky aktívnych látok. [7]

Ďalším z hlavných pilierov tkanivového inžinierstva je výroba správneho nosiča, ktorý bunkám poskytuje podmienky napodobujúce extracelulárny matrix, teda podporujú adhéziu a proliferáciu buniek, zabezpečujú výmenu živín, metabolitov a plynov, zatiaľ čo sú biodegradabilné, netoxické a spôsobujú minimálnu zápalovú reakciu. Po osadení tkanivového nosiča bunkami prichádza rad na vytvorenie podmienok podobných podmienkam v ľudskom organizme, čo možno dosiahnuť pomocou bioreaktorov. Bioreaktory zabezpečujú homogénnu distribúciu buniek na 3D štruktúre, neustálu výmenu média a celkovo kontrolované prostredie. Vďaka presne definovaným podmienkam je možné zabezpečiť diferenciaciu buniek, čím dosiahneme vytvorenie požadovaného tkaniva. [6]



Obrázok 1 - základné princípy tkanivového inžinierstva (upravené podľa [5])

2 TKANIVOVÉ NOSIČE

Strata funkcie tkaniva alebo orgánu spôsobená zraneniami alebo inými vplyvmi, predstavuje pre človeka značnú komplikáciu zdravotného stavu, ale aj zníženie kvality života. Najrozvinutejšou formou nápravy straty funkcie tkaniva alebo orgánu je v súčasnosti transplantácia, ktorá okrem samotného nedostatku darcov a náročného zaistenia kompatibility tkanív donora a recipienta, prichádza s rizikom infekcie a odumierania transplantovaného tkaniva. Ďalšie možnosti liečby ako chirurgická rekonštrukcia, terapia alebo syntetické protézy, na rozdiel od transplantácií nie sú limitované dostupnosťou, ale funkčnosťou, pretože spravidla nahradia funkciu tkaniva alebo orgánu iba čiastočne. [8]

Vďaka vyspelým technológiám a dlhodobým výskumom sa však čoraz častejšie začínajú využívať biomateriály, nahrádzajúce funkciu poškodeného orgánu alebo tkaniva, či tkanivové nosiče (scaffoldy) podporujúce hojenie rán.

Tkanivové nosiče predstavujú podporné štruktúry pre bunky, ktoré podmieňujú ich rast v snahe nahradiť poškodené tkanivo alebo orgán. Úlohou scaffoldu je bunkám poskytnúť dočasnú podporu, vďaka ktorej proliferujú aj na miestach, v ktorých by prirodzenými mechanizmami neboli schopné chýbajúce tkanivo nahradiť. Po vykonaní svojej primárnej funkcie alebo počas procesu hojenia, musí tkanivový nosič samostatne degradovať, teda musí byť odstrániteľný bez vonkajšieho chirurgického zásahu. Výsledkom procesu náhrady tkaniva je produkt s požadovaným tvarom a vlastnosťami či funkciami. [9]

Biodegradabilita tkanivového nosiča predchádza potrebe opätovného zásahu do organizmu, ale aj mnohým vedľajším účinkom spôsobeným zanechaním trvalých podporných materiálov v tele. Pre jej dosiahnutie je preto potrebné, aby použitý scaffold spĺňal špecifické mechanické, fyzikálne a chemické požiadavky, ktoré zabezpečia bunečnú difúziu, a tým formovanie 3D tkanivových štruktúr. [10]

Pri vývoji tkanivového nosiča sa často vedci inšpirujú extracelulárnym matrixom (ECM), ktorý je značne biodegradabilný a biokompatibilný. Dve hlavné triedy makromolekúl tvoriace extracelulárny matrix sú proteoglykány a fibrilárne proteíny. Najviac zastúpeným fibrilárnym proteínom v ECM je kolagén, ale nachádzajú sa v ňom aj proteíny ako elastín alebo fibronektín. Látky zastúpené v extracelulárnom matrixe zabezpečujú bunkám

biochemickú aj mechanickú podporu a zároveň prispievajú k riadeniu ich regenerácie. Väčšina spomenutých polymérov, prirodzene sa vyskytujúcich v extracelulárnom matrici, je využívaných práve na výrobu tkanivových nosičov, pretože sú schopné reagovať na rôzne chemické vplyvy produkciou derivátov. Vzniknuté deriváty potom môžu ovplyvňovať adhéziu buniek, ale aj spôsob degradácie materiálu a jeho sieťovanie. Pri výrobe scaffoldov je teda dôležité využívať materiály napodobujúce ECM, najmä proteíny ako fibrín, fibrinogén či kolagén a zároveň polysacharidy zahrňujúce kyselinu hyalurónovú, celulózu a algináty. Nemenej dôležité je vytvoriť podmienky približujúce sa skutočnému daniu a interakciám v organizme. [11]

2.1 Požadované vlastnosti

Ideálny tkanivový nosič sa zvyčajne definuje ako trojrozmerná štruktúra slúžiaca ako bunková podpora. Aby boli tkanivové nosiče použiteľné v organizme, musia mať vyhovujúce biologické, ale aj materiálové vlastnosti. Ideálny scaffold musí byť schopný dopomôcť k náprave poškodeného tkaniva. [12] Detailné materiálové vlastnosti nie je možné jasne definovať pre všetky tkaninové nosiče. Závisia predovšetkým na type tkaniva pre ktoré sú určené. Avšak existujú obecné vlastnosti, ktoré by mali spĺňať všetky tkaninové nosiče a budú popísané ďalej.

2.1.1 Biologické vlastnosti

Základnou biologickou vlastnosťou scaffoldu je biokompatibilita a netoxickosť, čo znamená, že bunky musia na tkanivový nosič adherovať, musia byť schopné proliferácie a diferenciácie, pričom majú vykazovať normálne fungovanie. Nemenej podstatná je schopnosť biodegradability a bioresorbovateľnosti, ktorá umožňuje súčasnú tvorbu nového tkaniva a úbytok dočasného nosiča. [13] Pri otázke degradability je však dôležitý najmä vek recipienta. Keďže hojenie rán u starších ľudí prebieha pomalšie, aj rýchlosť degradability musí byť nižšia. [14] Netoxické musia byť v neposlednom rade aj degradačné produkty vznikajúce pri odbúravaní scaffoldu, ktoré majú byť vylúčené z organizmu bez hromadenia sa, či akéhokolvek zásahu do iného orgánu alebo tkaniva. Tkanivové nosiče musia byť navrhnuté a vyrobené tak, aby nespustili imunitnú reakciu hosťovského organizmu. Zároveň musia byť schopné komunikovať s okolitým prostredím a bunkami, aby bola zabezpečená

migrácia a diferenciácia buniek, či formovanie nových tkanív, a to bez nežiaducich prejavov ako sú jazvy. Tieto aspekty materiálových vlastností zahŕňa bioaktivita. [13]

2.1.2 Štruktúrne a mechanické vlastnosti

Tkanivá predstavujú 3D štruktúry s veľmi komplexnými mechanickými funkciami. Vytvoriť takúto zložitú štruktúrnu sieť je veľmi obtiažne, a preto sa v rámci tkanivového inžinierstva využívajú v nosičoch bunky, proteíny a gény, ktoré podporujú prirodzenú rekonštrukciu tkaniva. Mechanické vlastnosti scaffoldov by teda mali zodpovedať vlastnostiam anatomického prostredia, v ktorom ich chceme využiť. Z praktického hľadiska by mali byť dostatočne pevné na to, aby vydržali zaobchádzanie počas procesu implantácie. Medzi štruktúrne vlastnosti scaffoldov patrí aj porozita, ktorá ovplyvňuje migráciu buniek, ale aj absorpciu vody a telesných tekutín, no rovnako zabezpečuje prechod kyslíka tkanivovým nosičom. Veľkosť pórov však musí byť prispôbena typom buniek nachádzajúcich sa v cieľovom tkanive, pre väčšinu tkanív je optimálna veľkosť pórov v rozmedzí 100 až 300 μm . Okrem veľkosti pórov je veľmi významný faktor i prepojenosť pórov. V prípade, že by póry v tkanivovom nosiči neboli vzájomne prepojené, nebola by umožnená bunková migrácia, či proliferácia a taktiež by bola značne obmedzená výmena živín v rámci nosiča. [11] Nemenej dôležité sú aj reologické vlastnosti ako viskoelasticita, ktorá odpovedá schopnosti materiálu tlmiť mechanické vibrácie. Predstavuje odozvu materiálu na striedavé namáhanie v tlaku a ťahu, čo je pri materiáli, ktorý má byť umiestnený v ľudskom tele, kde dochádza k rôznym druhom namáhania veľmi významné. [15]

2.1.3 Chemické vlastnosti

Chemické zloženie tkanivových nosičov má za následok materiálové vlastnosti a teda veľký vplyv na to, či bude umožnená absorpcia proteínov na nosič a tým nasledovaná bunečná adhézia a proliferácia. Často využívané substráty na prípravu scaffoldov sú prírodné a syntetické materiály ako polyméry, hybridné materiály alebo biokeramiky. Syntetické polyméry, napríklad polyanhydrid alebo polycaprolaktón môžu byť vyrobené tak, aby svojím tvarom prispievali k jednoduchšiemu naviazaniu záporne nabitých skupín, teda prispievali aj k jednoduchšiemu spojeniu sa s bunkami. Zároveň by mohli byť schopné viazať vodu, a teda doručiť veľké množstvo rozpustných molekúl. [11] Na povrchový náboj a zmáčavosť povrchu majú funkčné skupiny vyskytujúce sa na povrchu. Napríklad metylové

skupiny majú za následok hydrofóbnejší povrch. [16] Taktiež bolo dokázané, že prítomnosť karboxylových skupín ovplyvňuje bunkový rast a ich následnú morfológiu. Čo sa týka chemického zloženia materiálov, existuje veľmi mnoho možností, ktoré ovplyvňujú ako materiálové, tak biologické vlastnosti výsledného materiálu a nie je možné ich spomenúť všetky. [17]

2.2 Biomateriály využívané na prípravu scaffoldov

Na prípravu tkanivových nosičov sú využívané biomateriály, teda materiály vytvorené za účelom výroby zariadení, ktoré nahrádzajú časť alebo funkciu orgánu či tkaniva v ľudskom tele. Vytvorené biomateriály musia byť spoľahlivé, bezpečné a fyziologicky odpovedajúce svojmu účelu. [18] Najčastejšie sú na prípravu tkanivových nosičov využívané tri skupiny biomateriálov, a to keramické biomateriály, prírodné polyméry a syntetické polyméry. [19] Každá z týchto skupín má značné výhody, ale aj nevýhody, preto sa ich použitie líši v závislosti na cieľovom tkanive. Jednotlivé skupiny budú popísané v nasledujúcich kapitolách. Keďže všetky druhy materiálov využívaných na prípravu tkanivových nosičov vykazujú isté komplikácie, tkanivové inžinierstvo sa čoraz viac zaoberá výskumom scaffoldov vytvorených z viacerých fáz, teda kombináciou rôznych druhov materiálov. Doposiaľ prebehlo niekoľko pokusov o zavedenie keramických biomateriálov do scaffoldov na báze polymérov, ale aj pridanie prírodných polymérov k syntetickým polymérom v snahe zlepšiť ich biologické vlastnosti. Napriek všetkým snahám vyvinutým k príprave vhodného biomateriálu je doposiaľ najčastejšie využívaným substrátom pre tkanivové nosiče kolagén. [14]

2.2.1 Keramické biomateriály

Biokeramické materiály sa vyznačujú skvelou biokompatibilitou, vysokou chemickou i teplotnou stabilitou, či pevnosťou. Medzi najčastejšie využívané biokeramiky patria hydroxyapatit alebo fosforečnan vápenatý, ktoré sú často využívané v aplikáciách pre regeneráciu kostných tkanív. Umožňujú to ich mechanické vlastnosti ako veľmi nízka pružnosť, tvrdý a krehký povrch, ale hlavne pevnosť. Z pohľadu kosti sú vhodným materiálom, pretože keramika napodobňuje štruktúru minerálov obsiahnutých v kostiach. Interakcie keramiky s kostnými bunkami prispievajú k proliferácii a diferenciacii osteoblastov. Aj napriek tomu, že je biokeramika na prípravu kostných tkanivových nosičov

vhodná, narážame pri nej na problémy, medzi ktoré patrí náročné tvarovanie, či zložitá regulácia rýchlosti degradácie. [14][20]

2.2.2 Syntetické polyméry

Množstvo syntetických polymérov využívaných na prípravu biomateriálov v poslednej dekáde značne vzrástlo najmä vďaka rozvoju technológií ako mikrovýroba alebo nanotechnológie. Výhodou syntetických polymérov je možnosť prípravy s homogénnou distribúciou, či možnosť prispôbiť ich konkrétnej požadovanej aplikácii v organizme vďaka širokému spektru dosiahnuteľných fyzikálnych a chemických vlastností. [22] Medzi syntetické polyméry využité v snahe pripraviť tkanivové nosiče patrí napríklad kyselina polyglykolová (PGA) alebo kyselina polymliečna (PLA). Aj napriek tomu, že materiály z týchto látok môžu byť pripravené so štruktúrou a vlastnosťami presne podľa potreby, ich nevýhodou je riziko odmietnutia materiálu organizmom kvôli nízkej bioaktivite. Ďalšou prekážkou vo využívaní PLA a PGA v tkanivových nosičoch je ich spôsob degradácie, ku ktorému dochádza hydrolýzou. Hydrolýza spôsobuje lokálne okyslenie znížením pH, čo môže viesť k nekróze buniek aj tkanív. [14]

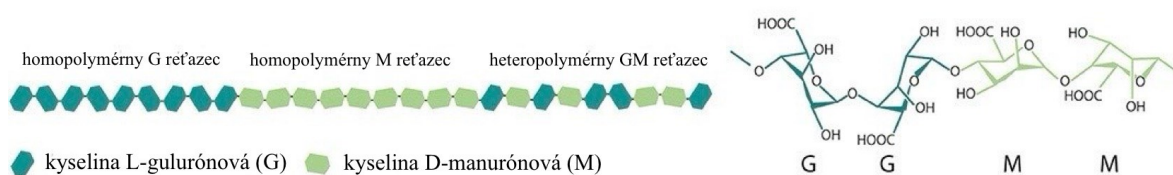
2.2.3 Prírodné polyméry

Ďalšou skupinou materiálov využívaných na prípravu scaffoldov sú biologické materiály, do ktorých spadajú proteoglykány, kolagén, chitozán a substráty na báze alginátu. Medzi ich najvýznamnejšie prednosti patrí prirodzená biokompatibilita a biodegradovateľnosť. Vďaka svojmu prírodnému pôvodu sú tieto látky bioaktívne, čím podmieňujú adhéziu buniek a proliferáciu. Medzi nevýhody patrí ich ťažie definovateľné zloženie vyplývajúce z izolácie z prírodných zdrojov. Z toho vyplýva, že výzvou pri prírodných polyméroch je príprava scaffoldu s homogénnou štruktúrou, ktorú by bolo možné reprodukovat'. [23] Keďže je táto bakalárska práca zameraná na prípravu tkanivových nosičov na báze alginátu, nasledujúca kapitola sa bude podrobnejšie venovať danému prírodnému polyméru.

3 ALGINÁTY

Alginát je prírodný polysacharid nachádzajúci sa v bunkovej stene rôznych druhov hnedých rias ako *Laminaria hyperborea* alebo *Lessonia*. Možno ho syntetizovať pomocou baktérií. Algináty obsahujú lineárne reťazce, ktoré sú zložené z opakujúcich sa monomérnych jednotiek kyseliny α -L-gulurónovej (G) a 1→4-viazaných epimérov kyseliny β -D-manurónovej (M) uložených do blokov, pričom obe nesú voľné hydroxylové (-OH) a karboxylové (-COOH) funkčné skupiny. [24] Bloky M zaujímajú lineárnu štruktúru, ktorá je pružná, zatiaľ čo ich väzba s blokmi kyseliny gulurónovej vytvára okolo karboxylových skupín stericnú zábranu, čo spôsobuje skladanú konformáciu blokov G, zodpovednú za tuhosť reťazcov v bloku. Algináty s vysokým obsahom M blokov sú imunogénne, teda produkujú väčšie množstvo cytokínov zodpovedných za úspešný priebeh imunitnej reakcie, ako algináty s vysokým obsahom blokov G. [25] Pomer monomérov kyseliny α -L-gulurónovej a β -D-manurónovej a ich usporiadanie v reťazci, teda či je reťazec homopolymérny alebo heteropolymérny, ale aj molekulová hmotnosť reťazca sú závislé na zdroji alginátu, podmienkach rastu rias a spôsobe ich spracovania. [24]

Algináty získané z rôznych druhov hnedých rias zvyčajne obsahujú vysoký obsah blokov kyseliny gulurónovej, zatiaľ čo algináty vyprodukované pomocou baktérie *Pseudomonas Aeruginosa* G blokmi nedisponujú. Bakteriálne produkované algináty sa odlišujú takisto prítomnosťou acetylácie na druhom alebo treťom kyslíku, ktorú pozorujeme v alginátoch získaných z hnedých rias iba po cielej chemickej úprave. [26]

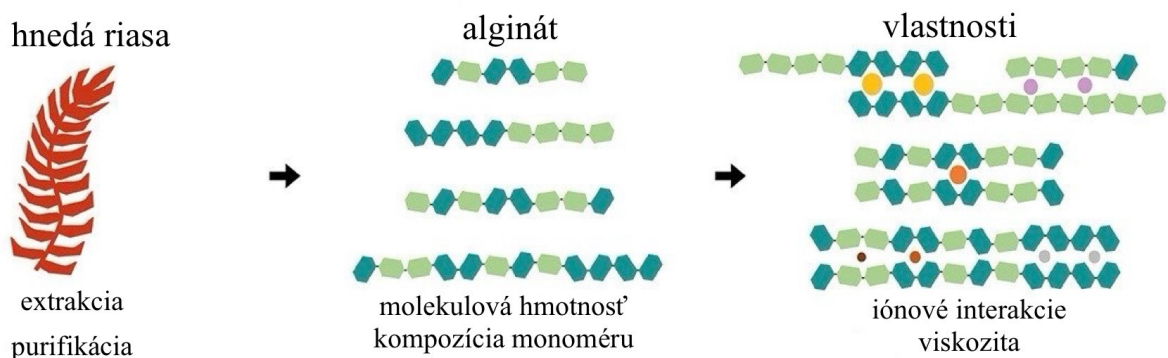


Obrázok 2 - štruktúrne usporiadanie reťazcov alginátu (upravené podľa [17])

3.1 Získavanie

Ako už bolo vyššie spomínané, alginát je polymér získavaný z hnedých rias. Rôzne druhy hnedých rias obsahujú až do 40 % prírodného polysacharidu alginátu. Riasy obsahujúce tento polysacharid sa nachádzajú najmä v Austrálii, Číne a Čile, ale aj v rôznych prímorských krajinách Európy, či v Južnej Afrike. Väčšina svetovej produkcie alginátov je

získavaná práve zo spomínaných rias, no môžu byť extrahované aj z baktérií druhu *Azobacter* a *Pseudomonas*. Presné zloženie alginátu sa odvíja od konkrétneho zdroja, pričom doposiaľ bolo z prírody extrahovaných a identifikovaných približne 200 druhov. Proces získavania alginátu obnáša niekoľko krokov. Riasy prvotne absolvujú proces čistenia, sušenia a rozomletia na prášok. Prášok je následne rehydratovaný s pridaním chemikálií slúžiacich k odstráneniu nechcených zložiek. Ďalej proces pokračuje úpravou, ktorá spôsobí narušenie rastlinných bunkových stien a vo vode rozpustný alginát je extrahovaný pomocou uhličitanu sodného. Výsledný produkt je najčastejšie izolovaný vo forme alginátu sodného. [27]



Obrázok 3 - získavanie alginátu - interakcia reťazcov navzájom a s inými látkami závisí na molekulovej hmotnosti a kompozícii alginátu, ktorý sa líši v závislosti od konkrétneho zdroja (upravené podľa [17])

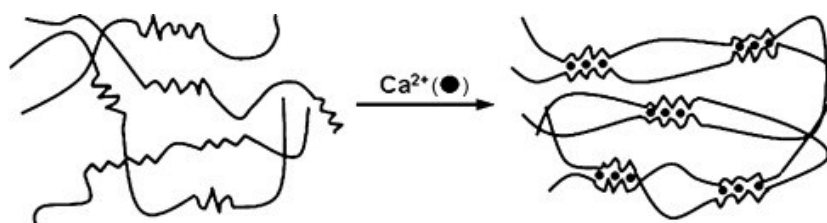
3.2 Vlastnosti

Vlastnosti alginátu majú významnú rolu v závislosti na konkrétnej požadovanej aplikácii. Hlavným činiteľom ovplyvňujúcim vlastnosti alginátu je molekulová hmotnosť, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 32 000-400 000 g/mol. Vyššia molekulová hmotnosť zabezpečuje lepšie fyzikálne vlastnosti a vyššiu pevnosť vzniknutých gélových štruktúr, avšak zároveň spôsobuje vyššiu viskozitu, ktorá môže byť vnímaná negatívne pri miešaní v procese výroby. Veľký vplyv na mechanicko-fyzikálne vlastnosti a tým pádom na výslednú stabilitu hydrogéllov, má pomerové zastúpenie G- a M- blokov. [28] Mnoho štruktúrnych vlastností je ovplyvnených presným zložením, ktoré je závislé predovšetkým na konkrétnom zdroji alginátu. Na pôvode alginátu je závislá aj biokompatibilita výslednej štruktúry. Keďže algináty sú získavané z prírodných zdrojov, dochádza k častej kontaminácii rôznymi

nečistotami ako sú ťažké kovy, preto je pri využívaní alginátov pre účely biomateriálov veľmi dôležité dbať na ich pôvod, ale aj spôsob spracovania a čistenia. [25]

3.3 Siet'ovanie

Bežná príprava alginátov zahŕňa iónové zosiet'ovanie pomocou dvojmocných katiónov. Interakcia katiónov s gulurónovými blokmi alginátu zapríčiňuje vznik iónových mostíkov. Zatiaľ čo bloky kyseliny malurónovej vykazujú v roztoku dvojmocných katiónov slabé väzby, spojenia s blokmi monomérov G sú pevné. Mechanizmus väzby s blokmi kyseliny gulurónovej spočíva v koordinácii dvojmocných katiónov a štyroch karboxylových (-COOH) skupín za vzniku usporiadania tzv. „egg-box“. Iónové siet'ovanie zahŕňa dva rôzne spôsoby prípravy hydrogéllov, a to vonkajšie gélovanie a vnútorné gélovanie. [26]



Obrázok 4 – iónové siet'ovanie alginátu (dostupné z [18])

V prípade vnútornej gelácie dochádza k pridaniu nerozpustnej formy vápnika (CaCO_3) k vodnému roztoku alginátu. Následne je k roztoku pridaná slabá kyselina, ktorá zabezpečí postupné uvoľňovanie vápenatých iónov, čo spôsobí geláciu. [29] Týmto mechanizmom sa vytvárajú gély, ktoré vykazujú vyššiu homogenitu, avšak tiež vykazujú nižšiu hustotu a zvyčajne obsahujú väčšie póry. [30] Pri externej gelácii sa k vodnému roztoku alginátu pridáva rozpustná forma vápnika (CaCl_2), čo vedie k rýchlej tvorbe gélu s nižšou homogenitou. Vďaka odlišnému mechanizmu jednotlivých metód gelácie majú výsledné gély rozdielnu štruktúru aj vlastnosti. [29]

3.4 Využitie

Alginát má široké využitie v mnohých druhoch priemyslu, ale aj v biomedicínskych aplikáciách. Vo farmaceutickom priemysle sú algináty často využívané ako zahusťovadlá a stabilizátory, v súčasnosti však nachádzajú využitie hlavne v oblasti liečiv

s kontrolovaným uvoľňovaním. Čoraz viac vo farmaceutickom priemysle dochádza aj k využívaniu alginátových hydrogélů ako lokálne nosiče liečiv pre tkanivá. Ďalšie využitie alginátů zahŕňa krytie rán, pričom gélové alginátové obväzy vyrobené iónovým sieťovaním sú lyofilizované a po priložení na ranu absorbujú tekutiny, čo spôsobí opätovné vytvorenie gélovej štruktúry. Táto štruktúra potom zabezpečuje vlhké fyziologické prostredie a zároveň minimalizuje vznik bakteriálnych infekcií. Veľký potenciál má alginát v neposlednom rade pre výrobu tkanivových nosičů, pri ktorých môže vďaka nízkej adsorpcii proteínů na alginát, ale aj neprítomnosti receptorů rozpoznávajúcich alginát v bunkách cicavců slúžiť ako modifikovateľný základ. Veľkou výhodou alginátových hydrogélů je, že ich štruktúra je veľmi podobná prirodzenému ECM. [31] Využitie nachádza pri regenerácii tkanív, ciev, kostí a potenciálne aj svalů či nervů. [25]

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bola príprava hydrogélů na báze alginátu aj s pridaním želatíny a ich následná materiálová charakterizácia spočívajúca v skúmaní reologických vlastností a biologická charakterizácia zahrňujúca testy cytotoxicity v priamom kontakte a z extraktu, ale aj testy proliferácie na povrchu hydrogélů, či migrácie do pórov v objeme 3D štruktúry.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Použité prístroje a pomôcky

V praktickej časti boli na prípravu alginátových hydrogélů využité analytické váhy Radwag AS 220.R2 a magnetické miešadlá Arex digital Pro. Na prácu s bunkovými kultúrami bol využitý laminárny box (flow-box) Alpina BIO130, inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific), centrifuga Eppendorf 5702 R, membránová výveva KNF N86, fluorescenčný mikroskop Olympus IX 81, fotometer Tecan Infinite 200 PRO, orbitálna trepačka IKA KS 130 basic, inkubátor BMT Incucell 404, systém pre výrobu ultračistej vody VWR Purity TU3 a vodný kúpeľ Memmert WNB. Na reologické testy vykonané na pripravených biomateriáloch sa použil reometer Anton Paar MCR 502 s geometriou doska-doska.

5.2 Bunkové kultúry

Pri všetkých testoch zameraných na biologické hodnotenie bola využitá línia myších embryonálnych fibroblastov NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658TM). Bunky boli kultivované v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (Biosera), ku ktorému bolo pridané 1 % antibiotík Penicillin-Streptomycin Solution 100X (Biosera) a 10 % teľacieho séra Calf Serum (Biosera). Podrobný postup kultivácie je popísaný nižšie.

5.3 Experiment

V nasledujúcej časti budú popísané všetky kroky experimentov vykonaných v praktickej časti bakalárskej práce, ktoré boli potrebné pre prípravu, posúdenie cytotoxicity a proliferácie a zistenie reologických vlastností pripravených vzoriek alginátových hydrogélů. Všetky testy cytotoxicity *in vitro* boli vykonané v súlade s normou ČSN EN ISO 10993-5. [32]

5.3.1 Príprava alginátových hydrogélů

Na výrobu hydrogélů boli využité dva rôzne druhy pevných alginátů, a to Sodium alginate W201502 od výrobcu SIGMA – ALDRICH a Alginic acid sodium salt from brown algae 71238 od výrobcu SIGMA. Dané algináty sa líšia najmä molárnou hmotnosťou, pričom alginát 71238 má približne desaťnásobne vyššiu molárnu hmotnosť ako alginát W201502. Podľa údajů od výrobcu sa molárna hmotnosť alginátu W201502 pohybuje v rozmedzí 12

000-40 000 Da, zatiaľ čo pri algináte 71238 sa pohybuje v rozmedzí 100 000 až 200 000 Da. Z oboch alginátov boli pripravené vodné roztoky s koncentráciou 10 hmotnostných % (Obrázok 5). Po rozpustení alginátov bolo vytvorených šesť rôznych vzoriek, ktoré boli ďalej testované. Vzorka SA₁ obsahovala už pripravený alginát W201502 s koncentráciou 10 hmotnostných %, zatiaľ čo vzorka SA₂ obsahovala alginát 71238 s rovnakou koncentráciou. Vzorky SA₁G₂₅ a SA₂G₂₅ obsahovali 75 % alginátov SA₁ a SA₂ pričom zvyšných 25 % tvoril roztok želatíny z hovädzej kože Gelatin from bovine skin Type B G9391 od výrobcu SIGMA s koncentráciou 10 hmotnostných % . Piata a šiesta vzorka SA₁G₅₀ a SA₂G₅₀ boli tvorené z 50 % alginátmi SA₁, pre vzorku SA₁G₅₀, a SA₂, pre vzorku SA₂G₅₀ a z 50 % pripraveným roztokom želatíny. Zloženie jednotlivých vzoriek je uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 - zloženie jednotlivých vzoriek pripravených hydrogélom

Vzorka	Zloženie
SA ₁	100 % alginátu (12-14 kDa)
SA ₂	100 % alginátu (100-200 kDa)
SA ₁ G ₂₅	75 % alginátu (12-14 kDa) + 25 % želatíny
SA ₂ G ₂₅	75 % alginátu (100-200 kDa) + 25 % želatíny
SA ₁ G ₅₀	50 % alginátu (12-14 kDa) + 50 % želatíny
SA ₂ G ₅₀	50 % alginátu (100-200 kDa) + 50 % želatíny

Všetky vzorky boli v kvapalnom stave riadne zhomogenizované a prevedené do foriem, na ktoré boli z dvoch strán pripevnené dialyzačné membrány (cut-off 14 000 g/mol). Všetky vzorky boli umiestnené do 0,1M roztoku dihydrátu chloridu vápenatého (CaCl₂·2H₂O) po dobu 24 hodín, ktorý zabezpečil ich zosieťovanie. Vytvorené hydrogély mali po vybratí z foriem na dotyk rôznu tuhosť a boli narezané na veľkosti vyhovujúce jednotlivým testom. Pred vykonaním daných testov boli vzorky hydrogélom sterilizované v 70% roztoku etanolu po dobu jednej hodiny. Po sterilizácii boli vzorky premyté a následne po celý čas uchovávané v ultračistej vode, čo je znázornené na Obrázku 6.



Obrázok 5 - roztoky alginátou s koncentraciou 10 hm. %



Obrázok 6 - pripravené vzorky alginátových hydrogélou v ultračistej vode

5.3.2 Pasážovanie a kultivácia buniek

Na pasážovanie boli využité myšie embryonálne fibroblasty z bunkovej línie NIH/3T3, ktoré boli predom kultivované do dosiahnutia približne 80 % konfluencie, čo bolo overené pomocou mikroskopu. Využitá bunková kultúra v kultivačnej nádobe je znázornená na Obrázku 7. Vo flow-boxe bolo z kultivačnej nádoby najprv odsaté médium, pričom bolo dôležité dbať na opatrné zaobchádzanie, ktorým možno predísť poškodeniu kultivovaných buniek. K bunkám v kultivačnej nádobe bol následne pipetovaný fosfátový pufr (PBS) v objeme 4 ml, ktorý je využívaný na premývanie buniek, za účelom odstránenia zvyškov média. Následne bolo PBS odsaté a k bunkám boli pridané 3 ml trypsínu, zabezpečujúceho enzymatické oddelenie jednotlivých buniek od seba navzájom a zároveň aj od povrchu kultivačnej nádoby, na ktorý bunky adherujú. Kultivačná nádoba obsahujúca bunky s trypsínom bola inkubovaná po dobu 3 minút. K suspenzii buniek a trypsínu bolo pipetovaných 5 ml média na zriedenie. Suspenzia bola premiestnená do centrifugačnej skúmavky a následne odstredovaná v centrifuge temperovanej na 37 °C pri otáčkach 1100 otáčok/min po dobu 3 minút. Po odstredení skúmavka obsahovala bunky v podobe sedimentu a supernatant zložený z trypsínu a média, ktorý bol odsatý, pričom

k sedimentu tvorenému bunkami bol pipetovaný 1 ml média. Médium s bunkami sa následne homogenizovalo pomocou mikropipety. Výsledná suspenzia mala koncentráciu $2 \cdot 10^7$ buniek v 1 ml média. Časť pripravenej suspenzie bola pre získanie koncentrácie $2 \cdot 10^6$ buniek v 1 ml média a $2 \cdot 10^5$ buniek v 1 ml média desaťnásobne a stonásobne zriedená. Pripravená suspenzia s koncentráciou $2 \cdot 10^5$ buniek v 1 ml média bola dávkaná v objeme 100 μ l do plátov s 96 jamkami a v objeme 1 ml do plátov s 24 jamkami (Obrázok 8), ktoré boli umiestnené do inkubátora a následne, pri dosiahnutí konfluencie približne 80 %, využívané na jednotlivé testy. Časť pripravenej suspenzie bola tiež použitá na injektovanie do vzoriek hydrogélů, či test proliferácie buniek na povrchu hydrogélů.



Obrázok 7 - kultivačná nádoba obsahujúca bunky línie NIH/3T3



Obrázok 8 – dávkovanie kultivačného média do plátu s bunkami

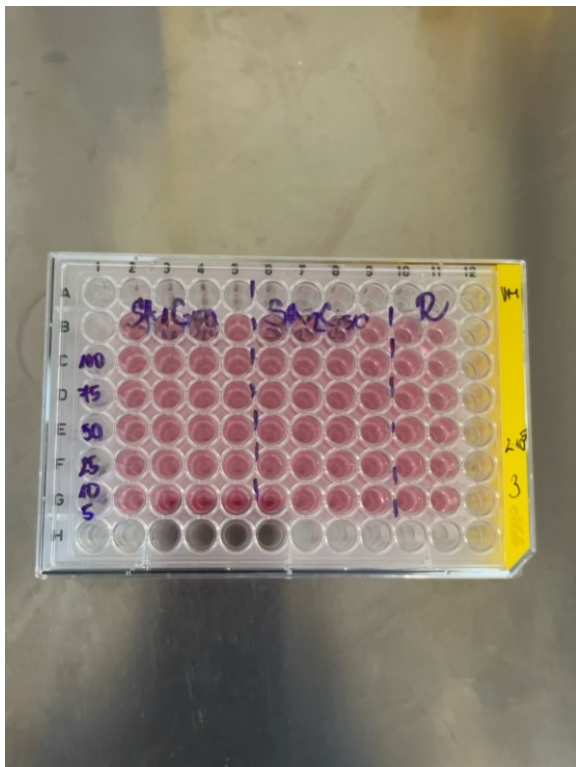
5.3.3 Príprava extraktov

Extraktý na testovanie cytotoxicity boli pripravené podľa normy ČSN EN ISO 10993-12. [33] Na prípravu extraktov boli do sterilných skúmaviek pomocou pinzety umiestnené jednotlivé vzorky alginátových hydrogélů, pričom ich hmotnosť sa pohybovala

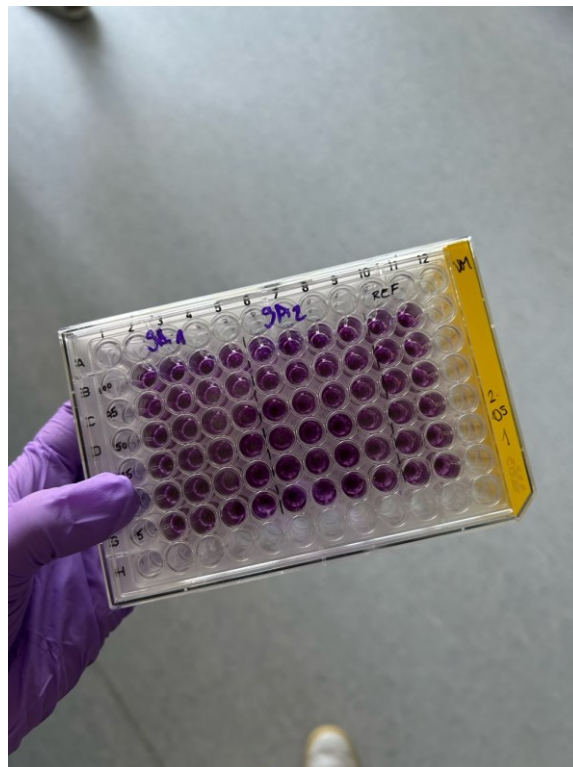
vždy okolo 0,2 g. Pipetovaný objem média potrebného na prípravu extraktu bol vypočítaný na základe presnej hmotnosti vzorky tak, aby bola výsledná koncentrácia každého extraktu 0,1 g vzorky/1 ml média. Skúmavky boli následne trepané a inkubované pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín.

5.3.4 Test cytotoxicity z extraktu

Na vykonanie testu cytotoxicity z extraktu boli využité tri predom pripravené 96-jamkové pláty, v ktorých bunky dosiahli približne 80 % konfluencie a extrakty jednotlivých vzoriek alginátových hydrogélů (Obrázok 9). Konfluencia buniek bola overená pomocou optického mikroskopu. Médium bolo z jednotlivých plátov opatrne odsaté a nahradené novým médiom a extraktom s celkovým objemom 100 μ l. Každý plát bol rozdelený tak, aby koncentrácia extraktu v jednotlivých jamkách po riadkoch nadobúdala 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % a 5 %. Extrakt z každej vzorky hydrogélu bol do jamiek multikanálovou pipetou pipetovaný v štyroch opakovaníach pre jednu koncentráciu. Každý plát obsahoval okrem extraktov dvoch rôznych vzoriek s uvedenými koncentraciami alginátov aj 12 jamiek slúžiacich pre referenciu, do ktorých bolo pipetovaných 100 μ l kultivačného média. Pláty boli následne umiestnené do inkubátora na 24 hodín pri 37 °C, pričom po uplynutí inkubačnej doby bola cytotoxicita extraktov vyhodnotená pomocou metódy MTT (Obrázok 10)



Obrázok 9 - 96-jamkový plát obsahujúci suspenziu buniek a rôzne koncentrácie extraktov vzoriek



Obrázok 10 - plát obsahujúci MTT premenené na formazán

5.3.5 MTT test

MTT je kolorimetrický test založený na premene MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) žltej farby, na fialové nerozpustné kryštáliky formazánu. Túto premenu sú schopné uskutočniť iba životaschopné bunky, preto je test jedným z najrozšírenejších spôsobov zisťovania bunecnej viability. Vďaka priamej úmernosti množstva MTT premeneného na formazán k počtu životaschopných buniek, je možné test vyhodnotiť pomocou merania absorbancie. Na prevedenie testu boli využité pláty s 96 jamkami, ktoré obsahovali suspenziu buniek a rôzne koncentrácie extraktov vyrobených hydrogélom. Po uplynutí inkubačnej doby boli pláty odsaté a do každej jamky bolo pipetovaných 100 μ l roztoku MTT v médiu s koncentráciou 0,5 mg/ml. Pláty boli umiestnené do inkubátora na 4 hodiny pri 37 °C. Po uplynutí inkubačnej doby bolo odsaté médium a vzniknuté kryštáliky formazánu boli rozpustené pridaním 80 μ l DMSO. Následne bola spektrofotometrom meraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 570 nm, čo odpovedá vlnovej dĺžke, pri ktorej MTT absorbuje. Referenčná vlnová dĺžka predstavovala 690 nm .

5.3.6 Test cytotoxicity v priamom kontakte

Test cytotoxicity v priamom kontakte bol vykonaný s použitím tenkých koliesok jednotlivých vzoriek a 24-jamkových plátov s bunkami, ktorých stav bol vopred overený mikroskopom. Z plátu bolo najprv opatrne odsaté médium a do jamiek boli na adherovanú vrstvu buniek položené tenké kolieska jednotlivých vzoriek vždy v dvoch opakovaniach. Pri pokladaní koliesok vzoriek bolo potrebné dbať na to, aby nedošlo k strhnutiu vrstvy buniek. Do všetkých jamiek plátu, vrátane referenčných, ktoré neobsahovali žiadne vzorky bol následne pipetovaný 1 ml kultivačného média. pláty obsahujúce vzorky boli inkubované pri 37 °C po dobu 24 hodín (Obrázok 11). Následne boli bunky fixované a farbené pre vyhodnotenie optickými metódami.



Obrázok 11 - plát obsahujúci suspenziu buniek a hydrogél využitý na test cytotoxicity v priamom kontakte

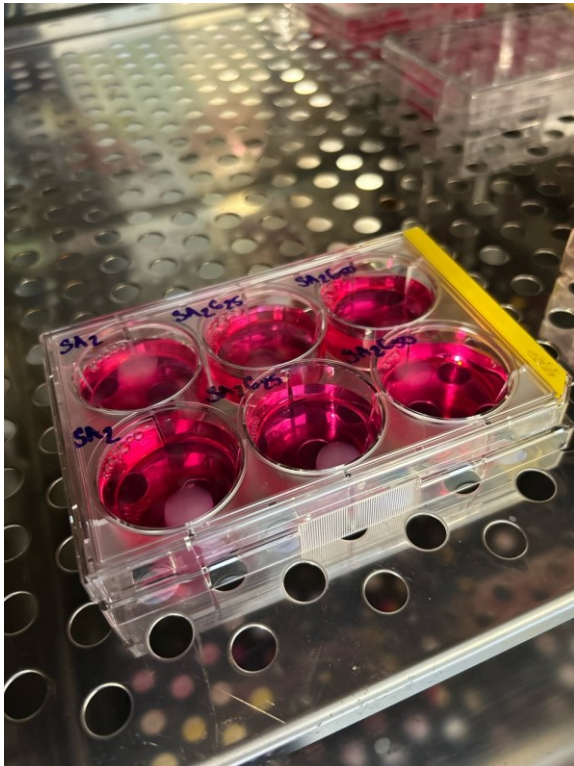
5.3.7 Test proliferácie na povrchu

Pre test proliferácie na povrchu boli využité čisté 24-jamkové pláty, do ktorých boli pinzetou vložené vzorky pripravených alginátových hydrogélů, rovnako v dvoch opakovaniach. Na povrch koliesok jednotlivých vzoriek hydrogélů boli pomocou mikropipety dávkované

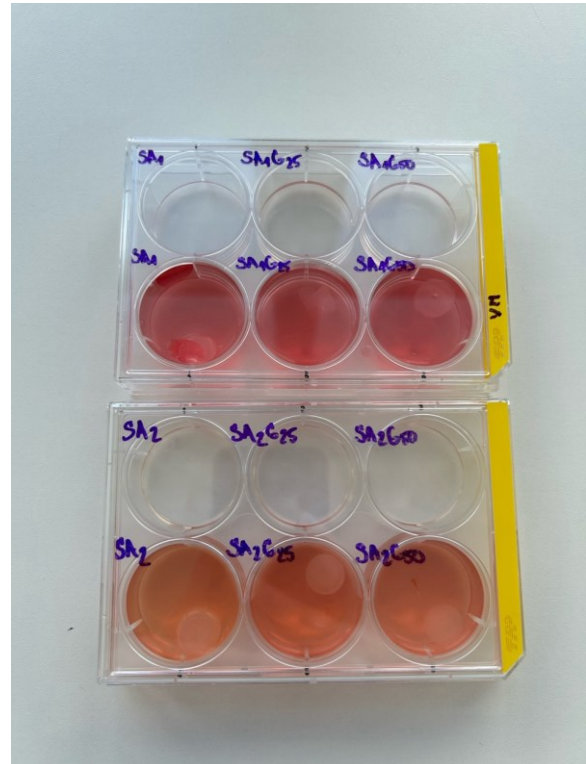
kultivované bunky v koncentrácii $2 \cdot 10^6$ buniek v 1 ml média v objeme 100 μ l s cieľom vytvoriť na povrchu prisadnutú kvapku. S plátom sa pri prenose a umiestňovaní do inkubátoru manipulovalo obzvlášť opatrne, aby bolo predídene skĺznutiu kvapiek z povrchu vzoriek. Pláty s bunkami na povrchu boli inkubované najprv po dobu 1 hodiny pri 37 °C, čo zabezpečilo adhéziu buniek na povrch hydrogélu. Po uplynutí inkubačnej doby bolo do každej jamky pridané médium v konečnom objeme 1 ml, ktoré bunkám dodávalo živiny potrebné pre proliferáciu. Pláty boli opäť inkubované po dobu 5 dní pri teplote 37 °C, pričom kultivačné médium bolo pravidelne menené. Proliferácia bola následne vyhodnocovaná pomocou fluorescenčného mikroskopu. Vyhodnoteniu predchádzalo fixovanie a farbenie jadier a cytoskeletov buniek.

5.3.8 Test vrastania buniek do objemu hydrogélů

Test proliferácie skrz štruktúru hydrogélů spočíval v injektovaní suspenzie kultivovaných buniek s koncentraciou $2 \cdot 10^6$ buniek v 1 ml média do vytvorených hydrogélů. Vyrobené vzorky hydrogélů boli pomocou pínzety umiestnené do dvoch plátů so šiestimi jamkami, pričom pre každú vzorku boli vykonané dve opakovania (Obrázok 12). Injektovanie bolo prevedené pomocou injekčnej striekačky s ihlou a do každého kolieska hydrogélů bolo zavedených 500 μ l suspenzie. Na každej vzorke bolo vykonaných 6 rovnomerne rozmiestnených vpichů. Po zavedení suspenzie do hydrogélů boli vzorky inkubované po dobu 1 hodiny pri 37 °C a následne k nim bolo pridané kultivačné médium, pričom bolo dôležité zabezpečiť ponorenie celého objemu alginátového hydrogélů. Vzorky boli opäť umiestnené do inkubátoru s teplotou 37 °C, v ktorom pri pravidelnej výmene média zotrvali približne 5 dní. Test bol vyhodnotený pomocou optických metód.



Obrázok 12 - plát obsahujúci vzorky hydrogélom, na ktorých bol vykonaný test vrastania buniek do objemu hydrogélom (bezprostredne po dávkovaní suspenzie)

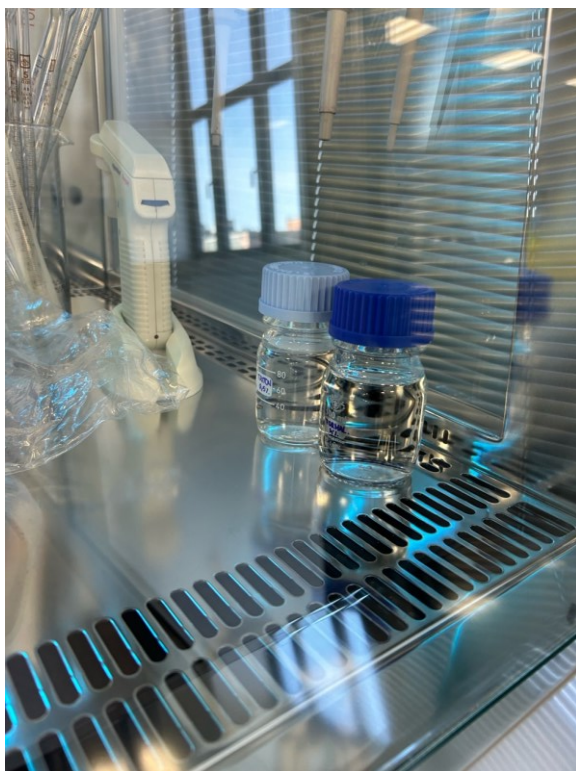


Obrázok 13 - pláty obsahujúce vzorky hydrogélom pre test vrastania buniek do objemu hydrogélom (v čase vyhodnotenia)

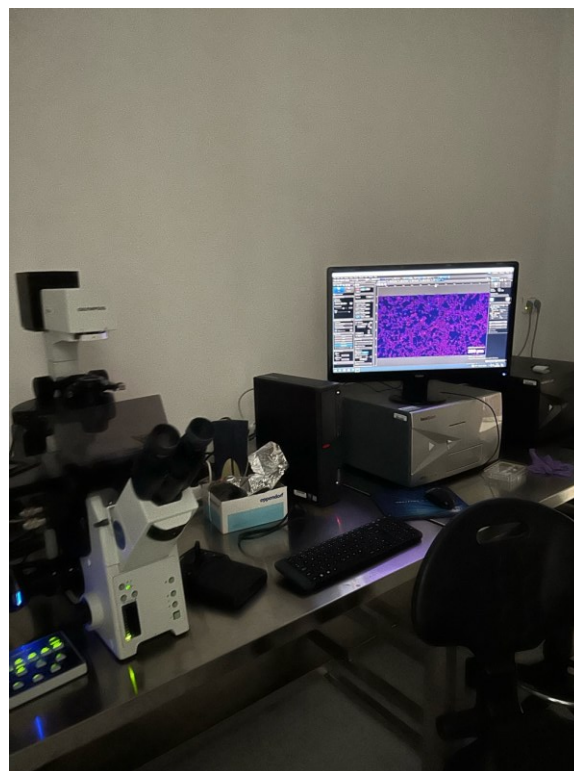
5.3.9 Fixácia a farbenie buniek

Fixácia a farbenie sú dôležité pre vylepšenie možnosti pozorovania morfológie buniek po vykonaní testov. Farbenie umožňuje pomocou fluorescenčného mikroskopu rozlíšiť jednotlivé časti ako cytoskelet alebo jadrá buniek, ktoré by boli bez použitia farbív ťažko pozorovateľné. Fixácii a farbeniu boli podrobené všetky vzorky s bunkami, ktoré boli vyhodnocované optickými metódami. Na zafixovanie vzoriek bolo z plátov so 6 a 24 jamkami opatrne odsaté médium a následne bol do jamiek pridaný 4% formaldehyd, pripravený zriedením vypočítaného množstva 37% formaldehydu s ultračistou vodou. Po 15 minútach bol formaldehyd odsatý, jamky boli prepláchnuté pufrom PBS a následne bol pipetovaný 0,5% Triton X-100, ktorý účinkoval 5 minút. Triton X-100 bol odsatý a jamky boli trikrát prepláchnuté PBS. Po treťom prepláchnutí bolo do plátov pridané ďalšie PBS spolu s dvoma kvapkami farbiva ActinRedTM 555, ktoré zabezpečuje zafarbenie stresových vlákien cytoskeletu a 5 µg/ml farbiva Hoechst 33258, ktoré zvýrazní jadrá buniek. Pláty s pridanými farbivami boli uložené na tmavom mieste po dobu 15 minút.

Po uplynutí potrebného času bol obsah jamiek opäť odsatý, jamky boli najprv prepláchnuté pufrom a na záver bol pufor pipetovaný do jamiek. V tomto štádiu boli pláty obsahujúce bunky pripravené na samotné vyhodnotenie mikroskopom (Obrázok 15). Zásobné roztoky formaldehydu a Triton X-100 sú uvedené na Obrázku 14.



Obrázok 14 - pripravené roztoky 4% formaldehydu a 0,5% Tritonu X-100 použitých na fixáciu buniek



Obrázok 15 - vytváranie snímok nafarbených buniek konfokálnym mikroskopom s fázovým kontrastom

5.3.10 Reologické testy

Reologické testy na vyrobenom alginátovom hydrogéle sú dôležité pre zaistenie možnosti dobrej manipulácie pri implantácii hydrogélu, ale aj pre zaistenie dostatočnej pevnosti a pružnosti materiálu pri neustálom namáhaní v ľudskom tele. Na meranie viskoelastických vlastností boli využité vzorky hydrogelov v tvare tenkých koliesok. Pri každej vzorke hydrogélu boli vykonané dynamické cyklické skúšky, pri ktorých je sledovaný vplyv mechanického namáhania na vlastnosti látky. Meranie amplitúdy deformácie, teda rozsah, v ktorom materiál dokáže odolávať deformácii bez jeho poškodenia bolo vykonané

v podmienkach vynútených mechanických kmitov. Viskoelastické látky sa skladajú z ideálne elastickej zložky, nazývanej dynamický modul, ktorá predstavuje odpor materiálu proti deformácii. Druhou, imaginárnou časťou, je stratový modul, ktorý odpovedá miere mechanických strát a predstavuje energiu, ktorá bola v materiáli premenená na teplo. Veľkosť mechanických strát je vyjadrená pomerom stratovej a elastickej zložky a odpovedá hodnote tangens delta (δ). [34] Predmetom reologických testov bolo preto aj meranie podielu viskózneho a elastickej zložky vzoriek, ktorý vypovedá o stabilite materiálu. Všetky merania boli uskutočnené s použitím reometra (Obrázok 16) s geometriou doska-doska ($\varnothing 15$ mm) (Obrázok 17), ktorá disponuje zdrsneným povrchom zabraňujúcim sklzu vzorky pri meraní. Merania boli vykonané pri teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázok 16 - reometer Anton Paar



Obrázok 17 - geometria použitá na reologické testy

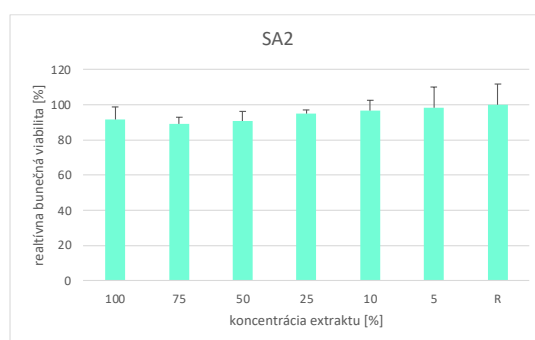
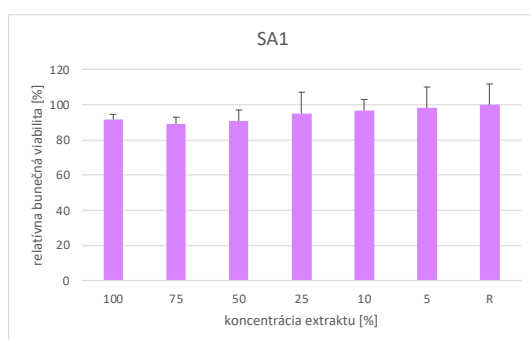
6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

6.1 Biologické vlastnosti

Testy vykonané pomocou bunecných línií sú jedným z prvých krokov pri zabezpečovaní funkčnosti biomateriálov. Sú dôležité pre zistenie cytotoxicity daného biomateriálu a v prípade negatívneho výsledku, aj schopnosti buniek adherovať a proliferovať na hydrogéle. Na účely testovania pripraveného alginátového tkanivového nosiča boli využité štyri rôzne testy, a to test cytotoxicity z extraktu, test cytotoxicity v priamom kontakte, test proliferácie na povrchu hydrogélu a test vrastania buniek po injektovaní do hydrogélu. V nasledujúcich podkapitolách budú diskutované výsledky vyššie spomínaných testov.

6.1.1 Test cytotoxicity z extraktu

Na uskutočnenie daného testu boli využité extrakty 6 vzoriek vyrobených alginátových hydrogélů s rôznymi koncentraciami, ktoré boli skúmané v prítomnosti myších fibroblastov a následne vyhodnotené pomocou metódy MTT. Zo získaných údajov boli zostrojené grafy závislosti relatívnej buncnej viability na koncentrácii extraktu, ktoré sú uvedené v Obrázku 18.



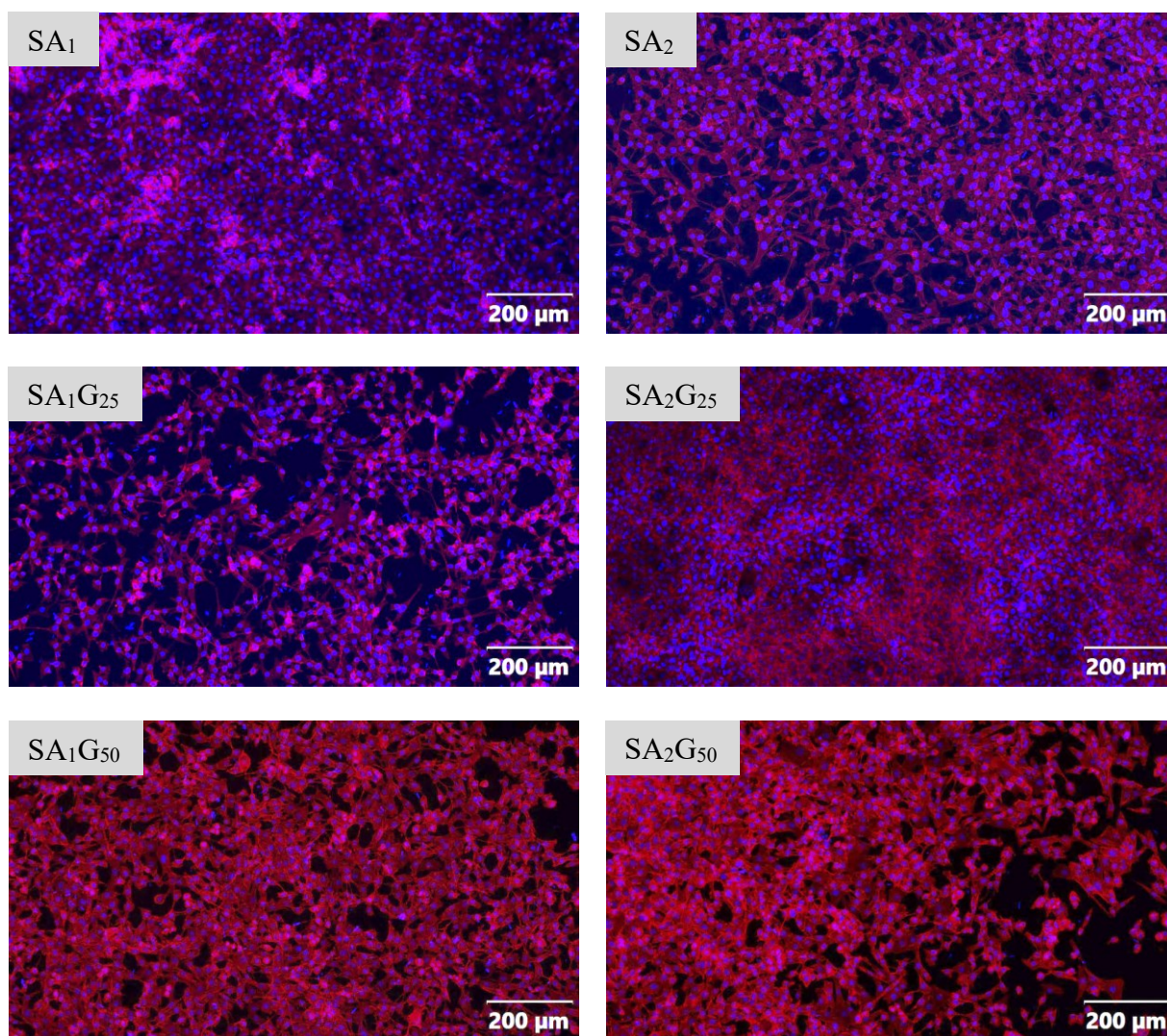


Obrázok 18 – grafy závislosti relatívnej bunečnej viability na koncentrácii extraktu pre jednotlivé vzorky pripravených hydrogélů; referencia predstavuje viabilitu 100 %

Materiál sa považuje za netoxický pre bunky v prípade, že viabilita (životaschopnosť) buniek je minimálne 70 %. Vďaka priamej úmernosti medzi absorbanciou a bunkovou viabilitou, môže byť životaschopnosť buniek určená pomerom priemernej absorbancie v jamkách, v ktorých bunky neboli vystavené extraktom (referencia, zodpovedajúca 100% viabilite) a priemernej absorbancie v jamkách s rôznymi koncentráciami jednotlivých extraktov. V prípade všetkých testovaných extraktov bolo zistené, že cytotoxicitu nevykazujú ani pri ich 100% koncentrácii. Z grafov vyplýva, že v niektorých prípadoch bunky, na ktoré pôsobili extrakty, vykazovali vyššiu viabilitu ako referenčné jamky obsahujúce bunky s kultivačným médiom. Toto zvýšenie viability však možno vo všetkých prípadoch považovať za zanedbateľné. Hodnoty viability sa výrazne nemenia ani zvýšením koncentrácie želatíny v alginátovom hydrogéle, z čoho vyplýva, že toxická nie je žiadna z látok obsiahnutých vo vzorkách. Tieto výsledky potvrdzujú skutočnosti zistené inými vykonanými štúdiami, že alginát je vhodný na používanie v biomedicínskych aplikáciách z dôvodu jeho necytotoxického povahy. O vhodnosti alginátu ako biomateriálu pre aplikácie regeneratívnej medicíny pojednáva napríklad rešeršná práca od autorov Sun a Tan, kde potvrdili necytotoxickú povahu alginátových hydrogélů. [35]

6.1.2 Test cytotoxicity v priamom kontakte

Test cytotoxicity v priamom kontakte bol vykonaný opatrným umiestnením koliesok vzoriek hydrogéllov na bunky adherované v jamkách plátov. Po uplynutí inkubačnej doby boli bunky zafixované, nafarbené a sledované metódou fluorescenčnej mikroskopie. Pre každý typ alginátu bola vytvorená snímka zvýraznených jadier a cytoskeletov buniek, ktoré boli následne pomocou softvéru zlúčené. Jednotlivé snímky sú uvedené nižšie.



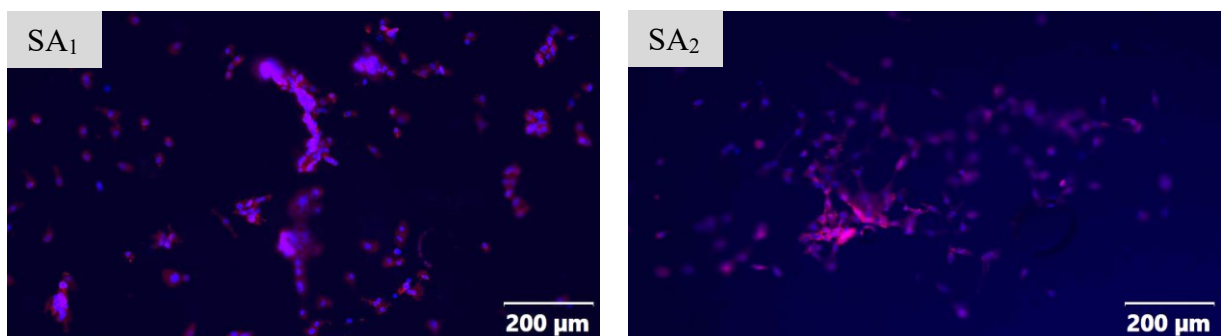
Obrázok 19 – snímky myších embryonálnych fibroblastov v priamom kontakte s jednotlivými vzorkami pripravených hydrogéllov; červenou je označený bunkový cytoskelet a modrou jadrá buniek

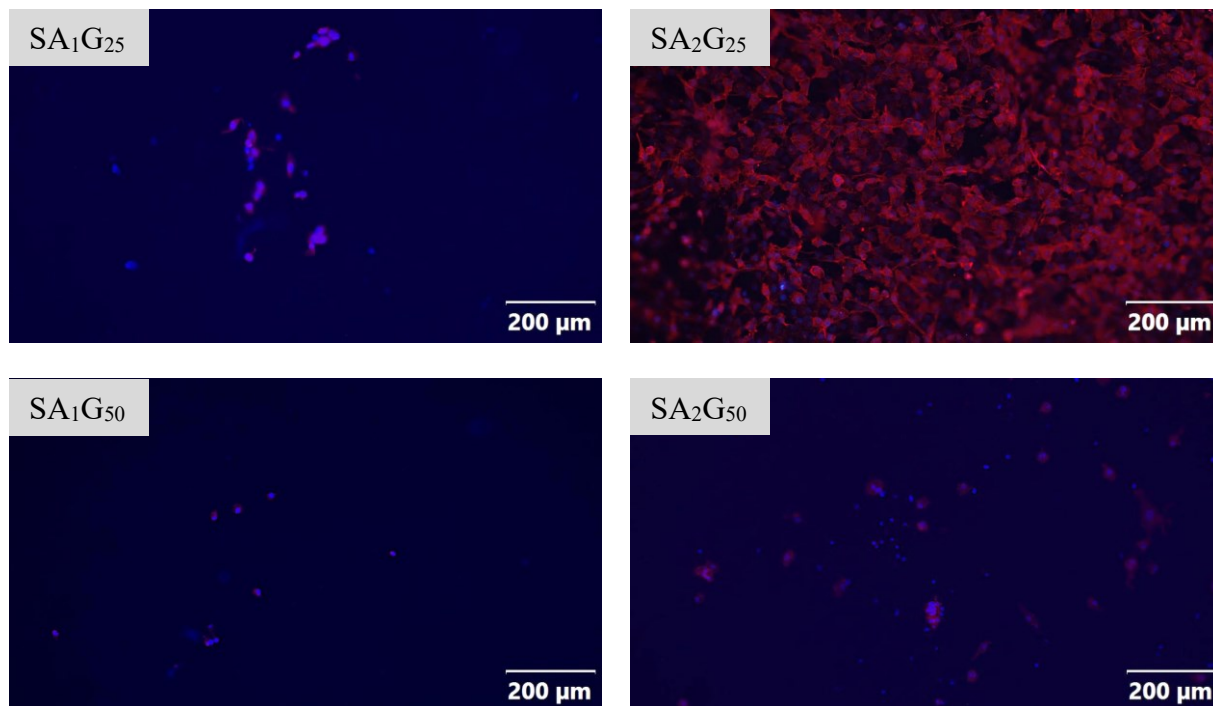
Na Obrázku 19 možno pozorovať, že množstvo buniek v jamkách so vzorkami SA₁ a SA₂G₂₅ je vyššie ako množstvo buniek na ostatných vzorkách. V prípade vzorky SA₂ možno

konštatovať najviac homogénnu distribúciu buniek, aj keď nezaberajú celú plochu sledovaného povrchu. Aj napriek nadpriemernému rastu buniek na vzorke SA₂G₅₀ sú tu sledované miesta, ktoré bunky neobsahujú. Vakantné miesta boli pravdepodobne spôsobené čiastočným strhnutím vrstvy adherovaných buniek pri pokladaní vzorky hydrogélú do jamky, nie sú teda výsledkom cytotoxicity daného biomateriálu. Vo všeobecnosti môžeme konštatovať, že test neprekázal cytotoxicitu v prípade žiadnej vzorky vyrobeného materiálu. Distribúcia a miera konfluencie buniek je závislá najmä na manipulácii so vzorkou a homogenite suspenzie pri kultivovaní buniek. Zároveň je možné konštatovať, že neboli pozorované žiadne morfológické deformity a bunky si zachovávali svoj typický pretiahnutý fyziologický charakter. Preto je možné zhrnúť, že testovanie cytotoxicity v priamom kontakte potvrdilo výsledky z testovania cytotoxicity pomocou extraktov.

6.1.3 Test proliferácie na povrchu a test vrastania buniek do objemu hydrogélú

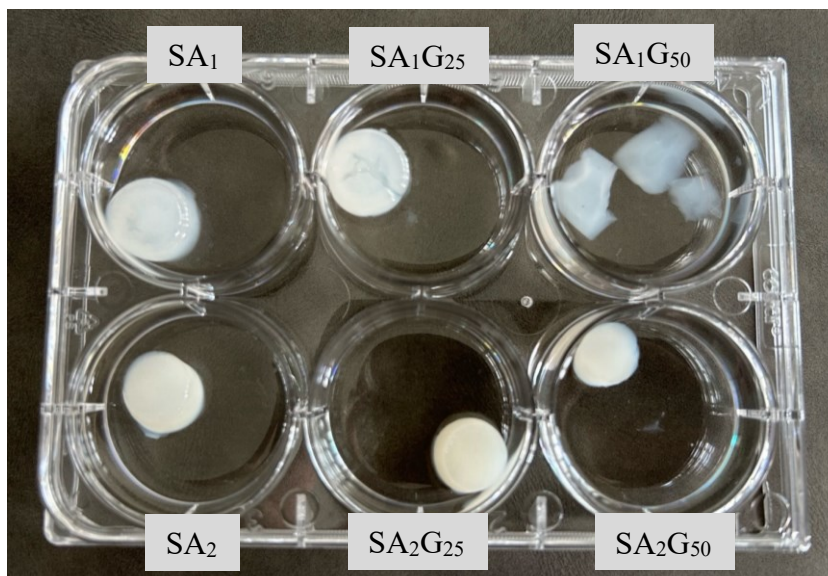
Po vykonaní testov cytotoxicity a zistení, že biomateriály pre bunky toxické nie sú, boli vykonané testy proliferácie dvoma spôsobmi. Jedným zo spôsobov bol test proliferácie na povrchu, pri ktorom bola na testovanom hydrogélú vytvorená prisadnutá kvapka bunkovej suspenzie. Pri teste proliferácie po injektovaní bolo pozorované, či budú bunky prirodzene migrovať do pórov hydrogélú. Oba testy boli vyhodnotené mikroskopickými metódami, ktorým znovu predchádzalo fixovanie a farbenie buniek. Snímky vytvorené s použitím fázového kontrastu pre test proliferácie na povrchu sú uvedené na Obrázku 20.





Obrázok 20 - snímky myších embryonálnych fibroblastov na povrchu jednotlivých vzoriek vyrobených hydrogélom; červenou je označený bunkový cytoskelet a modrou jadrá buniek

Na snímkach vytvorených fluorescenčným mikroskopom boli sledované jednotlivé vzorky hydrogélom, ktorých povrchy boli pokryté suspenziou buniek v médiu. Vo všetkých prípadoch, okrem vzorky SA₂G₂₅ došlo ku sklúznutiu prisadnutej kvapky skôr ako stihlo dôjsť k adhézii buniek na hydrogél, čo spôsobilo, že na povrchu sa nachádzalo minimálne množstvo buniek. V prípade vzorky SA₂G₂₅ možno vidieť homogénne pokrytie povrchu bunkami, ale aj ich migráciu do objemu 3D štruktúry. Vzorky obsahujúce alginát s nižšou molekulovou hmotnosťou (SA₁, SA₁G₂₅, SA₁G₅₀) boli nestabilné, pričom vzorka SA₁G₅₀ vykazovala najhoršiu konzistenciu a dochádzalo k jej rozpadu, čo značne sťažovalo manipuláciu. Spoločným znakom správania buniek v prítomnosti jednotlivých hydrogélom je ich migrácia do objemu 3D štruktúry a pórov, čoho výsledkom bola neschopnosť zaostrenia celej plochy vzorky.



Obrázok 21 – vzorky hydrogéllov využitých na test vrastania buniek do objemu hydrogéllov v čase vyhodnocovania

Rovnaký problém nastal pri vyhodnocovaní testu proliferácie po injektovaní suspenzie buniek do hydrogélu, v prípade ktorého z dôvodu nestability 3D štruktúry a migrácie buniek do pórov nebolo možné danou metódou vytvoriť snímky zobrazujúce výsledky. Test proliferácie po injektovaní by preto mohol byť predmetom diplomovej práce, avšak metodika jeho spracovania a analytická metóda použitá na vyhodnotenie by musela byť pozmenená. Jedna z možností lepšieho vyhodnotenia a zaoštrienia by bolo pre vyhodnotenie používať konfokálny mikroskop, ktorý disponuje oveľa lepším rozlíšením ako fluorescenčný mikroskop použitý v rámci tejto bakalárskej práce.

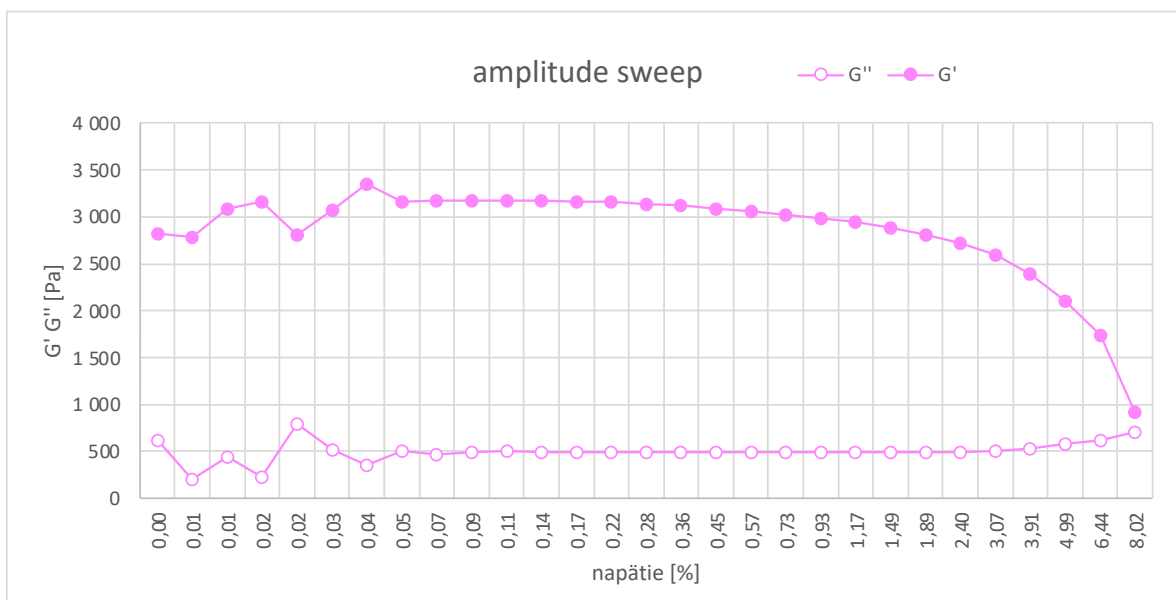
Vo všeobecnosti je v literatúre rozšírený fakt, že na neupravenom čistom alginátovom hydrogéle bunky nie sú schopné proliferovať. Prídavok želatíny do matrice by mohol práve adhézii a následnej proliferácii dopomôcť. [36] Napriek tomu, že najlepší výsledok bol sledovaný pri vzorke SA₂G₂₅, nemožno túto domnienku potvrdiť ani vyvrátiť. Ako je spomenuté vyššie, výsledky boli ovplyvnené povahou hydrogéllov a na overenie proliferácie by bolo vhodné vylepšiť metodiku testovania. Celkovo je však možné konštatovať, že bunky boli schopné adherovať a viac, či menej sa rozrastať v štruktúre hydrogéllov a to dokonca i v prípade samotných alginátových hydrogéllov.

6.2 Materiálové vlastnosti

Okrem biokompatibility tkanivových nosičov, sú pre úspech pri podpore regenerácie tkaniva rozhodujúce aj materiálové vlastnosti. Pri príprave nosiča je nutné dbať na jeho porozitu, prepojenosť pórov i jeho mechanické vlastnosti. [37] Ako bolo spomínané v teoretickej časti, vhodné materiálové vlastnosti závisia od konkrétneho tkaniva, pre ktoré je nosič zamýšľaný. V rámci bakalárskej práce boli otestované mechanické, konkrétne viskoelastické vlastnosti pripravených hydrogélův.

6.2.1 Reologické testy

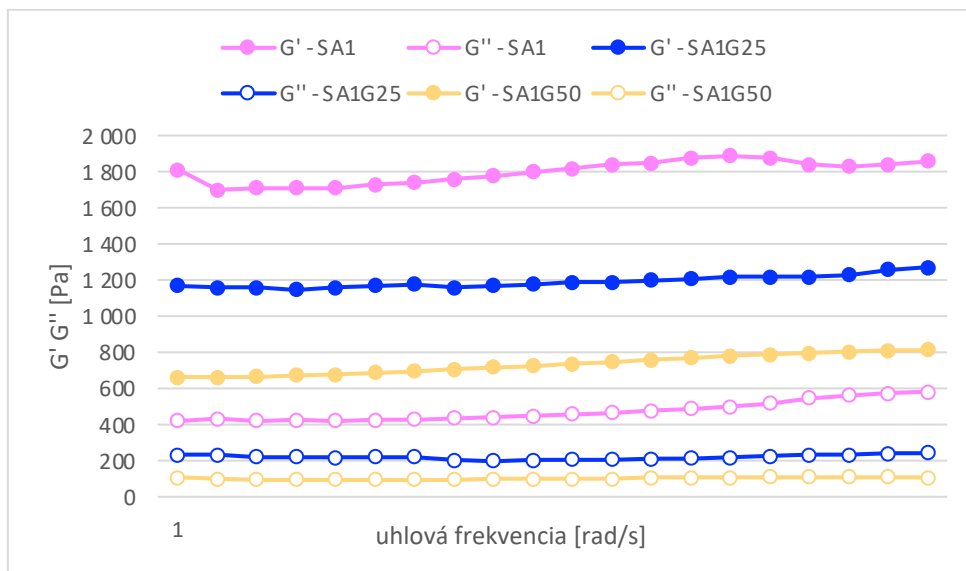
Na vykonanie reologických testov bol využitý reometer s geometriou doska-doska so zdrsneným povrchom a bol využitý oscilačný mód. V prvej časti testu bola zmeraná amplitúda deformácie, pri ktorej dochádzalo k zvyšovaniu napätia pôsobiaceho na biomateriál a pozoroval sa moment, v ktorom hydrogél nebol naďalej schopný odolávať namáhaniu a došlo k jeho rozpadu (amplitude sweep). Test bol vykonaný pri fyziologickej teplote 37 °C, ktorej dosiahnutie bolo zabezpečené prítomnosťou Peltierovho článku v prístroji. Výsledky testu amplitude sweep sú uvedené v grafe závislosti dynamického a stratového modulu na napätí v Obrázku 22.



Obrázok 22 - graf zobrazujúci test deformácie v závislosti na napätí; veličina G' predstavuje dynamický modul, veličina G'' stratový modul

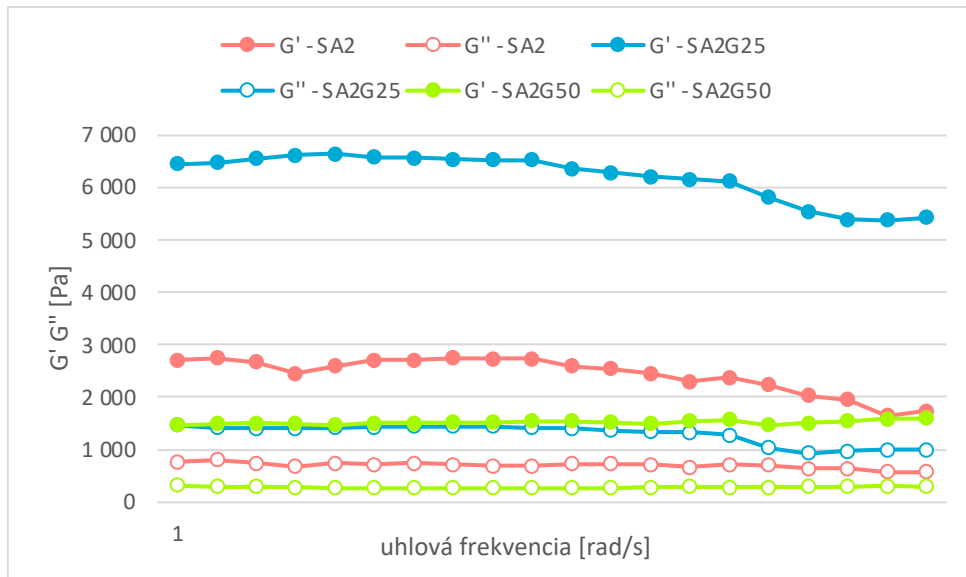
Z grafu vyplýva, že pri hodnote približne 3,91 % pôsobiaceho napätia došlo k rozpadu štruktúry, pretože hydrogél nebol naďalej schopný deformácii odolávať.

V ďalšom kroku bolo meraním zistené, aké je zastúpenie elastickej a viskózne zložky v jednotlivých hydrogélach. Elastická (reálna) zložka charakterizuje pevnostné vlastnosti materiálu, zatiaľ čo viskózna (imaginárna) zložka odpovedá schopnosti materiálu tlmiť mechanické vibrácie. V grafoch závislosti stratového a dynamického modulu na konštantnej uhlovej frekvencii boli porovnané hydrogély rovnakej skupiny s rôznou koncentráciou želatíny (Obrázok 23).



Obrázok 23 - graf závislosti stratového a dynamického modulu na konštantnej uhlovej deformácii pre skupinu hydrogélů SA₁

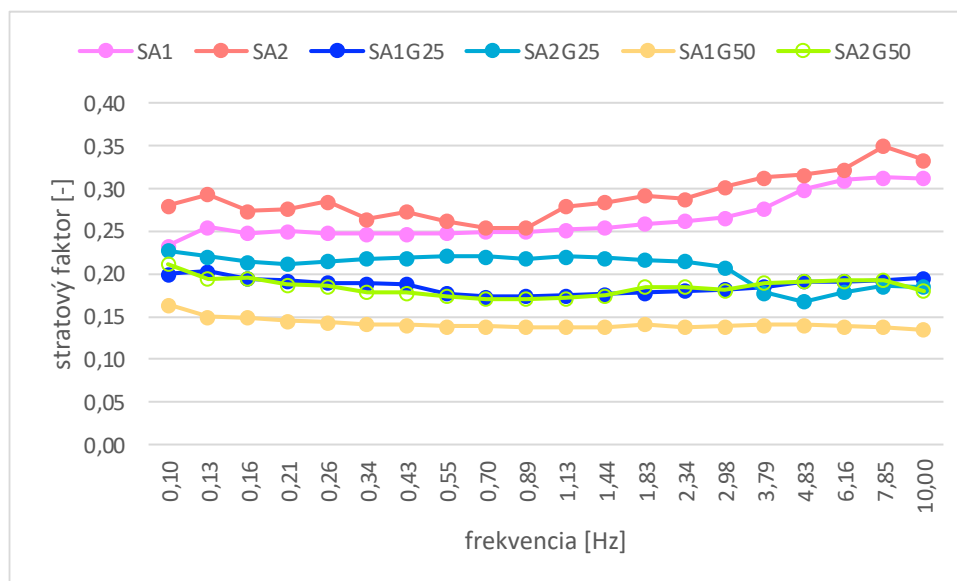
Z grafu vyplýva, že najvyšší podiel elastickej zložky sa prejavuje pri vzorke SA₁, zatiaľ čo najnižší podiel obsahuje vzorka SA₁G₅₀. Na rozdiel od alginátových hydrogélů skupiny SA₂ uvedených nižšie, pri skupine SA₁ podiel elastickej zložky so zvyšujúcou sa koncentráciou želatíny v hydrogèle klesá ako sme predpokladali.



Obrázok 24 - graf závislosti stratového a dynamického modulu na konštantnej uhlovej deformácii pre skupinu hydrogélů SA₂

Na Obrázku 24 možno pozorovať, že alginát SA₂G₅₀ vykazuje najnižší podiel elastického modulu, čo môže byť spôsobené nedostatočným sieťovaním alginátu so želatínou z dôvodu jej príliš vysokej koncentrácie roztoku. K danej skutočnosti došlo iba v skupine vzoriek SA₂, nie v prípade vzoriek skupiny SA₁, čoho dôvodom je približne desaťnásobne vyššia molekulová hmotnosť v prípade alginátu SA₂.

Na záver bola zistená hodnota stratového faktoru ($\text{tg}(\delta)$) (Obrázok 25), ktorá zodpovedá pomeru stratovej a elastickej zložky hydrogélu a vypovedá o celkovej stabilite.



Obrázok 25 – graf závislosti stratového faktoru na frekvencie pre všetky pripravené vzorky hydrogélů

Ak sú hodnoty stratového faktoru blízke nule, prevažujú elastické vlastnosti hydrogélů, kdežto ak hodnoty stúpajú, väčšie zastúpenie majú tlmiace schopnosti, teda vo viskoelastických látkach prevláda viskózná zložka. Vďaka tomu môžeme usúdiť, že alginát SA₁G₅₀ má najhoršie pevnostné vlastnosti, čo bolo potvrdené aj pri testoch s bunkami, kde danú vzorku nebolo možné opticky vyhodnotiť z dôvodu jej rozpadu. Najvyšším stratovým faktorom sa vyznačuje vzorka SA₂, ktorá vo všeobecnosti vykazovala najväčšiu pevnosť.

Podľa odbornej literatúry sa hodnoty elastického modulu mäkkých tkanív a orgánov pohybujú v širokom rozmedzí, a to od 100 Pa až do 1 000 kPa. [38] Pri ďalšej aplikácii materiálov je preto nutné dbať na konkrétne tkanivo, pre ktoré by hydrogély boli využité. Všeobecne je ale možné konštatovať, že všetky vzorky, okrem SA₁G₅₀ vykazovali vhodné mechanické vlastnosti pre ďalšie aplikácie ako tkaninové nosiče.

ZÁVER

Najvyužívanejším spôsobom náhrady tkaniva a orgánu, či ich funkcie je v súčasnosti transplantácia, ktorá je značne obmedzená nedostatočným počtom darcov, ale aj kompatibilitou darcu a recipienta. Okrem samotného problému s kompatibilitou dochádza často aj k odmietnutiu transplantovaného tkaniva, preto sa v posledných rokoch do povedomia dostávajú biomateriály, z ktorých možno vytvoriť štruktúry osídlené vlastnými bunkami recipienta, čím sa v značnej miere predíde spomínaným problémom.

Cieľom praktickej časti bakalárskej práce bolo vytvoriť alginátový hydrogél – 3D štruktúru, ktorá by po osídlení bunkami a transplantácii mohla nahrádzať funkciu mäkkých tkanív. Alginátové hydrogély sú výhodné vďaka svojim vlastnostiam, ako je biokompatibilita a biodegradabilita, a zároveň dobrej dostupnosti. Po vyrobení šiestich vzoriek hydrogélů s odlišným zložením na nich boli vykonané testy cytotoxicity, proliferácie, ale aj reologických vlastností.

Vzorky boli pripravené zo sodných alginátů s dvoma rôznymi molekulovými hmotnosťami, pričom pripravené boli vzorky z čistého alginátu, aj z alginátu s prídavkom želatíny.

Testy cytotoxicity boli vykonané dvoma spôsobmi, a to testovaním extraktů hydrogélů, ktorý bol vyhodnotený metódou MTT, ale aj priamym kontaktom vzorky biomateriálov s bunkami, ktorý bol sledovaný opticky. Bunková viabilita pri pridaní rôznych koncentrácií extraktů sa pohybovala v rozmedzí 89-100 %, čo značí, že žiaden z vytvorených hydrogélů nevykazuje cytotoxické účinky. Skutočnosť bola potvrdená aj optickým vyhodnotením testu cytotoxicity v priamom kontakte.

V ďalšej časti práce boli vykonané testy proliferácie na povrchu a po injektovaní buniek do štruktúry hydrogélů. Výsledky, získané týmito testami potvrdili schopnosť buniek proliferovať na povrchu biomateriálu, aj migrovať do pórov v objeme 3D štruktúry, no analytickú metódu použitú na ich vyhodnotenie aj metodiku samotného testu by pre získanie lepších výsledkov bolo potrebné prehodnotiť a pozmeniť, čo môže byť potenciálnym predmetom výskumu diplomovej práce.

Na záver boli vykonané reologické testy, vďaka ktorým boli posúdené elastické a viskózne vlastnosti vzoriek. Z testu deformácie vyplynulo, že maximálne napätie, pri ktorom dochádza k nevratnej deformácii vzoriek je v rozmedzí 1,49-1,89 %. V teste porovnávajúcim dynamický a stratový modul jednotlivých vzoriek bolo zistené, že zastúpenie elastickej zložky zabezpečujúcej pevnosť materiálu v prípade vzoriek SA₁ so zvyšujúcou sa koncentráciou želatíny klesá. Vďaka stratovému, ktorý vypovedá o pomere elastických a viskózných zložiek bolo určené, že najhoršie pevnostné vlastnosti vykazuje vzorka SA₁G₅₀.

Záverom možno konštatovať, že pripravené hydrogély vykazovali vhodné biologické vlastnosti pre využitie v tkanivovom inžinierstve. Taktiež, až na vzorku SA₁G₅₀, ich reologické vlastnosti zodpovedajú vlastnostiam prirodzených tkanív. Takto pripravené materiály môžu byť vhodným adeptom na inkorporáciu rôznych bioaktívnych zložiek či liečiv a byť predmetom ďalšieho výskumu.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] F. Marga, A. Neagu, I. Kosztin, a G. Forgacs, “Developmental biology and tissue engineering”, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, roč. 81, č. 4, s. 320–328, 2007, doi: 10.1002/bdrc.20109.
- [2] J. D. Boer *et al.*, *Tissue Engineering*. Elsevier, 2008.
- [3] M. Ebara *et al.*, *Smart Biomaterials*. Springer, 2014.
- [4] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering”, *J. R. Soc. Interface*, roč. 3, č. 10, s. 589–601, apr. 2006, doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [5] C. A. Vacanti, “The history of tissue engineering”, *J. Cell. Mol. Med.*, roč. 10, č. 3, s. 569–576, júl. 2006, doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
- [6] B. Bakhshandeh, F. Mohammadipanah, M. S. Mirtaleb, M. M. Gazani, S. S. Nateghi, a P. Abbasi, “Bacterial biopolymers in tissue engineering and regenerative medicine; current applications and future perspective”, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, roč. 54, s. 102928, nov. 2023, doi: 10.1016/j.bcab.2023.102928.
- [7] A. K. Saxena, “Tissue engineering and regenerative medicine research perspectives for pediatric surgery”, *Pediatr. Surg. Int.*, roč. 26, č. 6, s. 557–573, jún. 2010, doi: 10.1007/s00383-010-2591-8.
- [8] R. Lanza, R. Langer, J. P. Vacanti, a A. Atala, *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, 2020.
- [9] P. Tomlins, *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. Elsevier, 2015.
- [10] K. N. Bitar a E. Zakhem, “Design Strategies of Biodegradable Scaffolds for Tissue Regeneration”, *Biomed. Eng. Comput. Biol.*, roč. 6, s. 13–20, máj. 2014, doi: 10.4137/BECB.S10961.
- [11] A. Eltom, G. Zhong, a A. Muhammad, “Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review”, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, roč. 2019, s. e3429527, mar. 2019, doi: 10.1155/2019/3429527.
- [12] A. D. Augst, H. J. Kong, a D. J. Mooney, “Alginate Hydrogels as Biomaterials”, *Macromol. Biosci.*, roč. 6, č. 8, s. 623–633, 2006, doi: 10.1002/mabi.200600069.
- [13] L. Roseti *et al.*, “Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives”, *Mater. Sci. Eng. C*, roč. 78, s. 1246–1262, sep. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [14] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering”, *Mater. Today*, roč. 14, č. 3, s. 88–95, mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [15] T. Gargulák, “Viscoelastic Behaviour of Materials”. [Online]. Available at: <http://hdl.handle.net/10563/12476>

- [16] C. S. Leung, S. S. F. Leung, J. Tirado-Rives, a W. L. Jorgensen, “Methyl Effects on Protein–Ligand Binding”, *J. Med. Chem.*, roč. 55, č. 9, s. 4489–4500, máj. 2012, doi: 10.1021/jm3003697.
- [17] Y. Arima a H. Iwata, “Preferential adsorption of cell adhesive proteins from complex media on self-assembled monolayers and its effect on subsequent cell adhesion”, *Acta Biomater.*, roč. 26, s. 72–81, okt. 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.08.033.
- [18] J. Park a R. S. Lakes, *Biomaterials: An Introduction*. Springer New York, 2007. [Online]. Available at: https://books.google.sk/books?id=bb68wb0R_EAC
- [19] S. G. K. bar, C. Laurencin, a M. Deng, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Newnes, 2014.
- [20] S. Punj, J. Singh, a K. Singh, “Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future perspectives”, *Ceram. Int.*, roč. 47, č. 20, s. 28059–28074, okt. 2021, doi: 10.1016/j.ceramint.2021.06.238.
- [21] S. Kalsi, J. Singh, S. S. Sehgal, a N. K. Sharma, “Biomaterials for tissue engineered bone Scaffolds: A review”, *Mater. Today Proc.*, roč. 81, s. 888–893, jan. 2023, doi: 10.1016/j.matpr.2021.04.273.
- [22] D. S. Kohane a R. Langer, “Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering”, *Pediatr. Res.*, roč. 63, č. 5, s. 487–491, máj. 2008, doi: 10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7.
- [23] S. O. Ebhodaghe, “Natural Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, roč. 32, č. 16, s. 2144–2194, nov. 2021, doi: 10.1080/09205063.2021.1958185.
- [24] M. I. Neves, L. Moroni, a C. C. Barrias, “Modulating Alginate Hydrogels for Improved Biological Performance as Cellular 3D Microenvironments”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, roč. 8, jún. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00665.
- [25] K. Y. Lee a D. J. Mooney, “Alginate: Properties and biomedical applications”, *Prog. Polym. Sci.*, roč. 37, č. 1, s. 106–126, jan. 2012, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- [26] A. C. Hernández-González, L. Téllez-Jurado, a L. M. Rodríguez-Lorenzo, “Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review”, *Carbohydr. Polym.*, roč. 229, s. 115514, feb. 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115514.
- [27] S. Saji, A. Hebden, P. Goswami, a C. Du, “A Brief Review on the Development of Alginate Extraction Process and Its Sustainability”, *Sustainability*, roč. 14, č. 9, Art. č. 9, jan. 2022, doi: 10.3390/su14095181.
- [28] Z. Li, Y. Fu, D. J. McClements, a T. Li, “Impact of alginate block type on the structure and physicochemical properties of curcumin-loaded complex biopolymer nanoparticles”, *LWT*, roč. 162, s. 113435, jún. 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2022.113435.
- [29] J. Shu, D. J. McClements, S. Luo, J. Ye, a C. Liu, “Effect of internal and external gelation on the physical properties, water distribution, and lycopene encapsulation properties

of alginate-based emulsion gels”, *Food Hydrocoll.*, roč. 139, s. 108499, máj. 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.108499.

[30] L. W. Chan, H. Y. Lee, a P. W. S. Heng, “Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system”, *Carbohydr. Polym.*, roč. 63, č. 2, s. 176–187, feb. 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.07.033.

[31] D. R. Sahoo a T. Biswal, “Alginate and its application to tissue engineering”, *SN Appl. Sci.*, roč. 3, č. 1, s. 30, jan. 2021, doi: 10.1007/s42452-020-04096-w.

[32] 14:00-17:00, “ISO 10993-5:2009”, ISO. Cit: 13. máj 2024. [Online]. Available at: <https://www.iso.org/standard/36406.html>

[33] 14:00-17:00, “ISO 10993-12:2021”, ISO. Cit: 16. máj 2024. [Online]. Available at: <https://www.iso.org/standard/75769.html>

[34] “POLYMERY-Po-RECENZII.pdf”. Cit: 13. máj 2024. [Online]. Available at: <http://kmi2.uniza.sk/wp-content/uploads/2009/10/POLYMERY-Po-RECENZII.pdf>

[35] J. Sun a H. Tan, “Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications”, *Materials*, roč. 6, č. 4, s. 1285–1309, mar. 2013, doi: 10.3390/ma6041285.

[36] M. B. Łabowska, K. Cierluk, A. M. Jankowska, J. Kulbacka, J. Detyna, a I. Michalak, “A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting”, *Materials*, roč. 14, č. 4, s. 858, feb. 2021, doi: 10.3390/ma14040858.

[37] M. Krishani, W. Y. Shin, H. Suhaimi, a N. S. Sambudi, “Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review”, *Gels*, roč. 9, č. 2, s. 100, jan. 2023, doi: 10.3390/gels9020100.

[38] J. Liu, H. Zheng, P. S. P. Poh, H.-G. Machens, a A. F. Schilling, “Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks”, *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 16, č. 7, s. 15997–16016, júl. 2015, doi: 10.3390/ijms160715997.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

ECM	extracelulárny matrix
3D	trojrozmerný
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymliečna
DMSO	dimetylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	fosfátový pufor
MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 - základné princípy tkanivového inžinierstva (upravené podľa [5])	13
Obrázok 2 - štruktúrne usporiadanie reťazcov alginátu (upravené podľa [17])	19
Obrázok 3 - získavanie alginátu - interakcia reťazcov navzájom a s inými látkami závisí na molekulovej hmotnosti a kompozícii alginátu, ktorý sa líši v závislosti od konkrétneho zdroja (upravené podľa [17])	20
Obrázok 4 – iónové sieťovanie alginátu (dostupné z [18])	21
Obrázok 5 - roztoky alginátou s koncentráciou 10 hm. %	27
Obrázok 6 - pripravené vzorky alginátových hydrogélou v ultračistej vode	27
Obrázok 7 - kultivačná nádoba obsahujúca bunky línie NIH/3T3	28
Obrázok 8 – dávkovanie kultivačného média do plátu s bunkami	28
Obrázok 9 - 96-jamkový plát obsahujúci suspenziu buniek a rôzne koncentrácie extraktov vzoriek	30
Obrázok 10 - plát obsahujúci MTT premenené na formazán	30
Obrázok 11 - plát obsahujúci suspenziu buniek a hydrogél využitý na test cytotoxicity v priamom kontakte	31
Obrázok 12 - plát obsahujúci vzorky hydrogélou, na ktorých bol vykonaný test vrastania buniek do objemu hydrogélou (bezprostredne po dávkovaní suspenzie)	33
Obrázok 13 - pláty obsahujúce vzorky hydrogélou pre test vrastania buniek do objemu hydrogélou (v čase vyhodnotenia)	33
Obrázok 14 - pripravené roztoky 4% formaldehydu a 0,5% Tritonu X-100 použitých na fixáciu buniek	34
Obrázok 15 - vytváranie snímok nafarbených buniek konfokálnym mikroskopom s fázovým kontrastom	34
Obrázok 16 - reometer Anton Paar	35
Obrázok 17 - geometria použitá na reologické testy	35
Obrázok 18 – grafy závislosti relatívnej buncenej viability na koncentrácii extraktu pre jednotlivé vzorky pripravených hydrogélou; referencia predstavuje viabilitu 100 %	37
Obrázok 19 – snímky myších embryonálnych fibroblastou v priamom kontakte s jednotlivými vzorkami pripravených hydrogélou; červenou je označený bunkový cytoskelet a modrou jadrá buniek	38
Obrázok 20 - snímky myších embryonálnych fibroblastou na povrchu jednotlivých vzoriek vyrobených hydrogélou; červenou je označený bunkový cytoskelet a modrou jadrá buniek	40
Obrázok 21 – vzorky hydrogélou využitých na test vrastania buniek do objemu hydrogélou v čase vyhodnocovania	41
Obrázok 22 - graf zobrazujúci test deformácie v závislosti na napätí; veličina G' predstavuje dynamický modul, veličina G'' stratový modul	42

Obrázok 23 - graf závislosti stratového a dynamického modulu na konštantnej uhlovej deformácii pre skupinu hydrogélův SA₁.....43

ZOZNAM TABULIEK

<i>Tabuľka 1 - zloženie jednotlivých vzoriek pripravených hydrogélou</i>	<i>26</i>
--	-----------

