



Středoškolská technika 2018

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Scaffoldy na bázi hydrogelů připravovaných z derivátů kyseliny hyaluronové

Kristýna Čížková

Gymnázium, Pardubice, Mozartova 449
Pardubice, Mozartova 449, 530 09

Poděkování

Chtěla bych poděkovat oddělení tkáňového inženýrství pod vedením pana PharmDr. Martina Pravdy, PhD. za čas a ochotu, se kterou mi pomáhali nejen při zpracovávání mé práce, ale i během celé mé stáže ve firmě Contipro a.s.

Dále děkuji svému gymnáziu za možnost zúčastnit se této práce, která je pro mě neocenitelnou zkušeností, a jmenovitě děkuji paní RNDr. Květě Sýkorové za podporu v průběhu celé práce.

Anotace

Ve své práci jsem se zabývala vývojem scaffoldů, na bázi hydrogelů připravovaných ze speciálně upravených derivátů kyseliny hyaluronové. Cílem mé práce bylo najít vhodný gel, který by na svém povrchu umožňoval adhezi a proliferaci buněk. Součástí práce byla příprava dvou typů hydrogelů, jeden s přidavkem fibrinogenu a druhý bez něj a jejich charakterizace za pomoci jejich času gelace a elastického modulu. Dále jsem dané hydrogely ve sterilním prostředí nanesla v tenké vrstvě na jamky kultivačních panelů a do takto připravených panelů jsem nasadila buňky z buněčné linie 3T3, která je běžně využívána při laboratorních experimentech. U buněk jsem sledovala jejich adhezi k daným materiálům, jejich morfologii a proliferaci. Na závěr jsem vyhodnotila růstu buněk stanovením ATP tj. luminiscenčního signálu.

Klíčová slova

extracelulární matrix; adheze buněk; scaffold; hydrogel

Obsah

Úvod.....	5
1 Tkáňové inženýrství	6
2 Buňky v tkáňovém inženýrství.....	6
2.1 Typy buněčných kultur	6
2.2 Kultivační podmínky	7
2.3 Kultivační médium	7
2.4 Počet buněk.....	7
3 Extracelulární matrix.....	8
3.1 Buněčná adheze	9
3.2 Kyselina hyaluronová	9
3.3 Srážení krve	10
3.4 Fibrinogen.....	10
4 Scaffoldy	10
4.1 Biokompatibilita	10
4.2 Biodegradabilita.....	11
4.3 Mechanické vlastnosti a struktura	11
4.4 Typy scaffoldů	11
5 Reometrie	12
6 Experimentální část	13
7 Výsledky a diskuze.....	15
Závěr.....	19
Použitá literatura	20
Seznam použitých obrázků a grafů	22

Úvod

Tkáňové inženýrství je zaměřené na oblast léčby tkáňových defektů, regenerace nebo transplantace orgánů apod. Obsahuje základní poznatky funkcí a složení zdravých a poškozených tkání a vývoj jejich biologických náhrad, za účelem vylepšení, nahrazení, opravení nebo podpory jejich funkce. Terapie v tkáňovém inženýrství musí být založena na specifitě daných orgánů a tkání.

Jedním z úkolů tkáňového inženýrství je vývoj tzv. scaffoldů – umělých náhrad mezibuněčné hmoty, které umožňují růst, rozmnožování a popř. i diferenciaci buněk. Tyto struktury mohou sloužit ke kultivaci buněk mimo organismus (ex vivo/in vitro) popř. jsou určeny k implantaci do organismu pacienta, kde mohou dočasně převzít funkci poškozené tkáně, případně urychlit přirozené hojení tkáňového defektu.

To vše za pomoci kombinace buněk a tzv. biomateriálů, vedoucí k umělému vytvoření a imitace přirozeného prostředí buněk pro jejich kultivaci, proliferaci a diferenciaci.

Využití buněk pro terapeutické účely je podmíněno volbou správného typu buněk a dodržáním optimálních kultivačních podmínek.

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární vědní obor. Tkáňové inženýrství spojuje dohromady znalosti hned z několika oborů: biologie, chemie, fyziky, inženýrství, medicíny atd. Jeho součástí je výzkum a vývoj v rámci materiálů, buněčné biologie a genetiky, biomechaniky, povrchů nebo např. z oblasti buněčné interakce s materiály.

V tkáňovém inženýrství můžeme rozlišit tři základní typy léčby. Prvním z nich je buněčná terapie, kdy jsou na místo defektu transplantovány pouze buňky, druhým je využití pouze materiálů (scaffoldů) bez začleněných buněk a třetím je využití spojení buněk a scaffoldů popř. biologicky aktivních látek a scaffoldů, nejlépe ovšem všech tří složek.

Buněčná terapie je založena na tom, že buňky jsou na místo potřeby aplikovány většinou pouze injekčně (vpíchnutím do místa defektu), což je obrovskou výhodou. Dochází tím ke zvýšení možnosti úspěšné léčby a k snížení výskytu nežádoucích reakcí. Nevýhodou je však častá migrace buněk z místa aplikace (nejsou nijak fixovány), popř. snížení funkčnosti buněk, jelikož potřebují správnou výživu a prostředí pro růst (zprostředkováváno mezibuněčnou hmotou), bez ní mohou buňky zemřít.

Alternativou je využití samostatných bezbuněčných materiálů, které nemusíme izolovat nebo kultivovat, ikdyž má také pouze omezené možnosti aplikace. Bohužel u většiny tkání není tato léčba také dostatečně efektivní, protože nedochází k tvorbě nové mezibuněčné hmoty, kterou zabezpečují právě zde nepřítomné buňky.

Kvůli tomu je hlavním cílem tkáňového inženýrství výzkum a vývoj právě buněčných scaffoldů. Například u léčby defektů kloubní chrupavky, která je založena pouze na buněčné terapii, nedochází k výraznému zlepšení hojení, jelikož buňky migrují a v místě defektu se uchytí pouze malé procento. Implantace nebuněčných materiálů podporujících regeneraci tkáně má také svá omezení, protože efektivní léčby a hojení je dosaženo pouze u defektů menších než 5–6 mm. Při poranění chrupavky jsou defekty ale častokrát větší. Proto je zde s výhodou využíváno právě scaffoldů se zabudovanými buňkami, vedoucích ke slibným výsledkům v rámci léčby a regeneraci poškozené tkáně.

2 BUŇKY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Aby mohly být buňky nadále využity pro terapeutické účely musí být zvoleny v závislosti na jejich cílovém umístění. Dále je nutné dodržet vhodné kultivační podmínky.

Buňky se k dalšímu použití volí v závislosti na jejich výsledném umístění (např. fibroblasty do kůže, osteoblasty do kostí nebo chondrocyty do chrupavky). Druhou možností je využití kmenových buněk, které mají vysoký potenciál k proliferaci a diferenciaci.

Obecně se dají tělní buňky získávat buď z tělních tekutin (jejich odstředěním a následnou izolací), nebo odběrem z tuhých tkání (např. z kostní dřevě) [9].

2.1 Typy buněčných kultur

Primární kultura jsou buňky či tkáně čerstvě odebrané z organismu. Nazývá se také jako primokultura. Zdrojem buněk pro založení kultury je laboratorní zvíře nebo člověk (méně často se používají kultury buněk hmyzu a rostlinné buněčné kultury).

Buněčné linie 3T3 jsou zavedené buněčné kultury, které mají schopnost proliferovat na neurčitou dobu. Tyto buněčné linie vznikly tak, že při proliferaci docházelo každé 3 dny k přenosu vzorku, dokud nárůst buněk nedosáhl množství 300 000 buněk na misce. Základy těchto linií byly přejaty od různých kmenů myší [11] [12] [15].

2.2 Kultivační podmínky

Aby pěstované buňky za podmínek in vitro přežívaly a proliferovaly, je nutné jim zajistit vyhovující podmínky. Mezi nejdůležitější patří složení kultivačního média, povrch kultivační nádoby a další vlastnosti prostředí, jako je třeba teplota. Většina buněčných kultur je adherentní, tj. buňky rostou na vhodném kultivačním povrchu. Používají se i další adhezí faktory, např. fibronectin či laminin. Buňky se převážně kultivují při teplotě, která je blízká tělesné teplotě zdrojového organismu, většinou tedy při 37 °C.

2.3 Kultivační médium

Jedná se o vodné roztoky obsahující mnoho, někdy i několik desítek složek. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří anorganické soli, pufrý, glukosa a případně i jiné zdroje energie, vitamíny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy a stopové prvky. Velké množství látek, jako jsou růstové faktory, stopové prvky, vitamíny apod.

Kultivované buňky rostou v médiu, které co nejblíže napodobuje extracelulární tekutinu. Kultivační médium zpravidla vytváří tenkou vrstvu kapaliny nad adherovanými buňkami. Obsahuje dostatečné množství živin, které umožňuje růst buněk po několik dní. Médium se mění zpravidla dvakrát až třikrát do týdne. Kultivační médium musí mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a musí také obsahovat ve vhodné koncentraci látky, které buňky potřebují pro život a následné dělení.

Do média se může dodat přídatkem krevního séra spousta potřebných látek. Rozdělení médií podle toho, zda jejich součástí je či není sérum, je asi nejvýznamnějším klasifikačním kritériem. Určitým přechodem mezi médii se sérem a bez něj jsou média s nízkým obsahem séra (kolem dvou procent ve srovnání s obvyklými deseti procenty u médií se sérem).

Významnou složkou přidávanou do kultivačního media je sérum, protože tím doplníme velkou řadu biologicky významných organických látek, jako jsou růstové faktory, inhibitory proteáz či některé látky významné pro adhezi buněk. Sérum je také významným zdrojem stopových prvků (Zn, Se, Cu, Mn a další), vitamínů, růstových faktorů aj. látek.

Obecně můžeme říci, že přídatkem séra do média dodáme několik stovek biologicky významných sloučenin, z nichž velká část má zásadní vliv na růst buněčné kultury.

2.4 Počet buněk

Určení počtu buněk patří mezi základní postupy jak při jejich samotném pěstování (například pro stanovení hustoty buněk nasazovaných po pasáži), tak v pokusech s kultivovanými buňkami. Používá se řada postupů.

Stanovení počtu odhadem nebo semikvantitativně – odhad počtu buněk v zorném poli pod mikroskopem při určitém zvětšení, nebo u adherentních buněk kolik procent kultivačního povrchu je pokryto buňkami apod.

Pro přesné stanovení počtu buněk je nejčastější postup počítání v cytometrické komůrce. Je sice přesná, ale za to je pracná a časově náročná.

Rychlejší metodou je průtoková cytometrie. Nevýhodou, kromě potřeby poměrně drahého přístroje, je ovšem nutnost kalibrovat přístroj na každý buněčný typ.

Chceme-li buňky počítat opakovaně a za přesně definovaných podmínek, můžeme využít rozptylu světla na buněčné suspenzi a měřit hustotu suspenze turbidimetricky (měření stupně zákalu).

Další možností je stanovení koncentrace některých buněčných součástí – nejčastěji se měří množství celkové bílkoviny ve vzorku (je ovšem nutné zabránit zkreslení bílkovinami séra, které se přidává do kultivačního média) nebo koncentrace DNA.

Někdy se také využívá stanovení aktivity vhodných enzymů. V úvahu připadá také stanovení celkové metabolické aktivity buněk.

Měřením viability buněk můžeme sledovat jejich měnící se počet a tvar, jejich umístění a poměr živých a mrtvých buněk v průběhu celého pokusu. Viabilitu buněk lze stanovit několika způsoby.

Například metodou Live/Dead. Jde o rozlišení živých od mrtvých buněk za pomoci fluorescenčních barviv a následným pozorováním pod mikroskopem. Je založena na principu rozdílné propustnosti membrán pro různá barviva. Calcein-AM (AM = acetoxymethyl ester) je lipofilní nefluorescenční barvivo schopné procházet difuzně do buněk, kde jsou činností vnitrobuněčných esteráz odštěpeny AM skupiny. Calcein po odštěpení AM skupin fluoreskuje a současně již nemůže difundovat ven z buňky. Použití barviva. Propidium jodid je fluorescenční barvivo nesoucí náboj, které proniká pouze do buněk s porušenou cytoplazmatickou membránou (porušení cytoplazmatické membrány je považováno za fatální). V nich se naváže na DNA a díky tomu několikanásobně zvýší intenzitu své fluorescence.

Při luminiscenční metodě ATP (adenosintrifosfát) jde o spočítání živých buněk pomocí luminiscenčního signálu. Podstatou této metody je změření intenzity luminiscenčního záření vzniklého při chemické reakci v buňkách. Intenzita záření odpovídá původnímu množství ATP v buňkách, a tedy množství živých buněk ve vzorku.

3 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Extracelulární matrix neboli mezibuněčná hmota je materiál, který se nachází v prostorech mezi buňkami. Každá tkáň má svoji vlastní složením specifickou ECM. Buňky jsou k extracelulárnímu matrix přichyceny pomocí integrinů. Skládá se především z kolagenu, hyaluronanu, proteoglykanů, multiadhesivních molekul a glykoproteinů [3].

Napomáhá vzájemné vazbě buněk, při mezibuněčné komunikaci, výměně látek mezi buňkami a při morfogenezi a hojení defektů. Představuje většinový objem v pojivových tkáních. Velkým producentem ECM jsou například fibroblasty (buňky vaziva). Extracelulární matrix je sice buňkami produkována, ale není v nich umístěna.

Fyzikální vlastnosti extracelulární matrix se liší podle vlastnosti a funkce příslušné tkáně. Kosti a hlavně zuby mají extracelulární matrix velmi tvrdou způsobenou značnou kalcifikací. Pórovitá extracelulární matrix je ve chrupavce a pojivové tkáni kůže. Ve šlachách je pružná. Extracelulární matrix krve tvoří krevní plasma, která je tekutá [4].

Integriny jsou membránové receptory, které se vážou na extracelulární matrix nebo na jiné buňky. Tak umožňují přilnutí buněk k podkladu (buněčnou integritu) a také migraci buněk. Účastní se některých signalizačních kaskád, při nichž se navázání ligandu na integrin přenáší do nitra buňky jako signál, který reguluje např. fosforylaci proteinů, genovou expresi, růst a smrt buněk apod. Integriny se často podílejí na podpoře růstu buněk, přežití buněk a proliferace buněk [5] [6].

3.1 Buněčná adheze

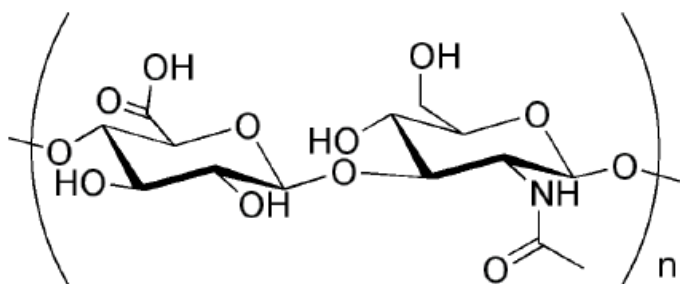
Adheze znamená přilnavost (např. vzájemná přilnavost buněk v tkáni) buněk organismu. Buňky v těle vždy musí k něčemu adherovat - k extracelulární hmotě nebo k sobě navzájem. Každá tkáň je organizovaným seskupením buněk držených pohromadě buněčnými adhezemi, ECM nebo oběma. Bílkoviny ECM obsahují sekvence aminokyselin, které interagují s buněčnými receptory integriny. Většina buněčných linií přilne k podkladu a roste v jedné vrstvě. Zdravé adherentní buňky jsou protáhlé a neuvolňují se do média. Buněčná adheze je zprostředkována receptory na cytoplazmatické membráně, které se váží na různé molekuly mimo buňku. Buňky in vitro musí mít povrch, který umožňuje adhezi. Průběh adheze po nasazení: 1. přichycení, 2. adheze (buňka se rozšiřuje, přibývá vazeb), 3. rozšiřování buňky (přeskupování cytoskeletu) [1] [10].

3.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (zkratka HA; obrázek č. 1) je nesulfonovaný glykosaminoglykan, který je přirozenou složkou extracelulárního matrixu. Můžeme ji najít např. v pojivových tkáních, kůži, očích (sklivec) atd. Na jejich syntéze se podílejí především fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. Pro svou biokompatibilitu je často používán ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Aktivně se účastní imunologických procesů jako signální molekula a ovlivňuje mobilitu, adhezivitu buněk v rámci jejich proliferace a diferenciace. Urychluje hojení a epitelizaci.

Z chemického pohledu jde o lineární polysacharid složený z opakujících se jednotek disacharidu D-glukorové kyseliny a N-acetylglukosaminu spojených β -1,3-glykosidickou vazbou.

Na rozdíl od jiných glyksaminoglykanů zastoupených v mezibuněčné hmotě není sulfatován. Velikost řetězců se pohybuje v rozmezí od 0,2 do 10 MDa, přičemž je nejčastější velikost 2–5 MDa. Hyaluronát se rozpouští ve vodě za vzniku viskoelastického roztoku [13].



3.3 Srážení krve

Hemokoagulace je soubor enzymatických reakcí, jejichž výsledkem je proměna tekuté krve v nerozpustný gel. Je důležitým procesem hemostázy (zástavy krvácení), chrání jedince před vykrvácením. Při poranění cévy začne do okolní tkáně vytékat krev a dojde ke stahu drobných cév, které tím sníží průtok krve postiženou částí těla. Dojde k rozpadu trombocytů a uvolnění trombokinázy do plasmy. Vlivem trombokinázy dojde k přeměně protrombinu v trombin. Načež se rozpustný fibrinogen změní na nerozpustný fibrin, který ze svých vláken vytvoří síť, do které se zachytávají erytrocyty a leukocyty až vytvoří červený trombus (krevní sraženinu), který ucpe trhlínu v cévě.

Koagulační faktory (srážecí faktory) jsou přirozeně přítomné v krevní plazmě. Jsou zodpovědné za proces srážení krve díky tvorbě enzymatické kaskády. Jsou to glykoproteiny řadící se mezi globuliny. Tvoří se v játrech, jejich syntéza je závislá na vitamínu K a jejich funkce na iontech vápníku [7] [8] [14].

3.4 Fibrinogen

Je koagulačním faktorem – prekurzorem fibrinu. Fibrin se významně podílí na tvorbě dočasné náhrady EMC při poškození tkáně, a proto se může využít při výrobě scaffoldů. Dále také podporuje adhezi buněk. Produkují ho jaterní buňky spolu s dalšími srážecími faktory. Jeho hladina v krvi stoupá např. po vzniku zánětu [2] [16].

4 SCAFFOLDY

Scaffoldy jsou bioaktivní a biodegradabilní produkty imitující přirozené prostředí buněk. Materiály pro výrobu scaffoldů jsou a) biologické b) syntetické. Scaffoldy vytvářejí umělou mezibuněčnou hmotu, která se nachází okolo buněk a tak spolu vytváří tkáň. Tak zabezpečuje chemické a fyziologické podmínky pro buněčnou proliferaci a diferenciaci, transport potřebných látek k buňkám, odvádění metabolických látek apod. Dále mohou tvořit ochrannou bariéru a nosnou matici pro růstové faktory a jiné látky podporující růst nové tkáně, anebo jako dočasná výplň některých defektů a opora pro růst nové tkáně indukované organismem.

Ve většině případů není použití bezbuněčných scaffoldů dostatečně efektivní, stejně tak jako přímá aplikace samostatných buněk. Proto je výhodnější a úspěšnější léčba s použitím buněk a podpůrných látek, které začleníme do vhodného scaffoldu, kterými postupně prorůstají nebo obrůstají jejich povrch, tvoří ECM a tím dochází k tvorbě nové tkáně.

Spolu s ochrannou funkcí buněk a jejich mechanické podpory, slouží scaffoldy také k ukotvení buněk a jejich doručení na potřebné místo tkáňového defektu. Využívané materiály pro scaffoldy musí být vybírány podle přísných požadavků tak, aby se výsledný scaffold co nejvíce podobal přirozené mezibuněčné hmotě daných buněk. Scaffold (materiál) musí splňovat a mít určité vlastnosti.

4.1 Biokompatibilita

Například biokompatibilita znamená, že materiál ani scaffold nesmí být toxický, nebo jakkoliv negativně ohrožovat buňky a po aplikaci do tkáně nesmí vyvolávat protizánětlivé reakce organismu. Materiál musí být kompatibilní s buňkami cílené tkáně a umožnit jim

adhezi na povrchu scaffoldů, nebo migraci buněk dovnitř scaffoldů bez negativního ovlivnění jejich funkce.

4.2 Biodegradabilita

Dále musí mít vlastnost biodegradability. Což znamená, že jsou schopny se kompletně biologicky rozložit. Jelikož scaffoldy nejsou trvalými implantáty v defektu, ale slouží pouze jako dočasná výplň, dokud nedojde k vytvoření nové mezibuněčné hmotě zabudovanými buňkami. Měli by umožnit zabudovaným buňkám růst a výrobu jejich vlastní ECM. Scaffoldy proto musí být biodegradabilní a produkty jejich degradace musí být také biokompatibilní a netoxické. Nemělo by dojít k rozkladu scaffoldu dřív, než bude vytvořena nová tkáň, ale také ani moc pozdě ji aby scaffold nebránil v růstu nové tkáně.

4.3 Mechanické vlastnosti a struktura

Také vhodné mechanické vlastnosti a struktura jsou důležité. Příkladem těchto mechanických vlastností může být tvrdost, pevnost, ohebnost. Stavba a struktura scaffoldu by se měla co nejvíce podobat struktuře cílené tkáně přirozenému prostředí buněk. Je nutné najít rovnováhu mezi mechanickými vlastnostmi a vlastnostmi podporujícími inkorporaci materiálu in vivo (na živém).

Jednou z klíčových vlastností je například porozita. Scaffoldy by měly mít propojené póry v dostatečné hustotě, tak aby byl zajištěn rozptyl živin a odstraňování metabolitů buněk. Také je důležitá velikost pórů, kvůli migraci buněk do struktury scaffoldu a jejich případné adhezi, k níž jsou potřeba specifické ligandy na povrchu scaffoldů. Scaffoldy připravené z materiálů běžně se vyskytujících v ECM (např. kolagen nebo hyaluronan) ve většině případů již mají na svém povrchu tyto ligandy, na rozdíl od scaffoldů připravených ze syntetických materiálů, které vyžadují cílené přidání (včlenění) těchto ligandů.

V neposlední řadě je pro scaffoldy důležité, aby byli dostupné a nepotřebovali před aplikací náročnou či speciální úpravu.

Pro přípravu scaffoldů se používají tzv. biomateriály. Hlavním kritériem při výběru polymerů jsou jejich vlastnosti. Jsou na výběr i další polymery např.: keramické polymery, sice tyto materiály podporují a zvyšují diferenciaci a proliferaci osteoblastů, nicméně jsou křehké a těžko tvarovatelné; dále třeba scaffoldy z přírodních materiálů, ty mají vysokou biokompatibilitu, za to ale mohou pomáhat ke stimulaci imunitního systému a tím k přenosu nemocí, a také jejich mechanické vlastnosti jsou častokrát nepředvídatelné. Nejvíce jsou využívány bílkovinné polymery (př.: fibrinogen, elastin, kolagen). Mají velmi dobré mechanické vlastnosti, ale jsou živočišného původu (předchozí rostlinného původu).

Hlavní dělení je podle vlastností a struktury scaffoldu, dělí se na houby, hydrogely a vlákna.

4.4 Typy scaffoldů

Hydrogely (ilustrace 2) jsou snadno tvarovatelné, čímž jsou skvělým kandidátem na vyplňování různě nepravidelně velikých a tvarovaných defektů. Díky jejich struktuře se do nich snadno dají zabudovat buňky a jiné bioaktivní látky. Hydrogely jsou na bázi materiálů schopných síťovat ve vodním prostředí a tvořit tak gel. K zesílení polymerů může obecně

docházet např. změnou teploty (termoreverzibilní gely), změnou pH, fotochemicky nebo za pomoci jiných chemických činidel.

Jejich aplikace je různá, buď se na dané místo aplikují buňky s gelotvorným roztokem a nové tkáň vzniká „in vivo“ (v živém), anebo se scaffoldy implantují v pevné formě, kde ke kultivaci buněk dochází „in vitro“ (ve zkumavce).

Jejich vlastnosti závisí především na koncentraci a druhu použitého biomateriálu. Hydrogely podporují přenos živin a metabolitů buněk. Dokáží napodobovat přirozené prostředí buněk. Mají ale slabší mechanické vlastnosti. Ze syntetických biodegradabilních polymerů jsou v této oblasti nejhojněji využívány lineární alifatické estery. Z přírodních materiálů se pak nejvíce využívá např. kolagen a želatina, alginát, chitosan, dextran nebo kys. Hyaluronová.

Hydrogely obsahují velké množství vody až 99 %, jsou značně hydrofilní. Patří mezi viskoelastické látky, což znamená, že jsou tvořeny elastickou a viskózní složkou. Ty lze charakterizovat pomocí elastického G' a viskózního G'' modulu.

Porézní scaffoldy svojí strukturou připomínají pěnu nebo houbu. Velikost a charakteristika pórů ovlivňuje výsledné chování produktu. Zvolením vhodných postupů můžeme připravit materiály s orientovanými póry. Pro jejich přípravu je možné použít např. chitosan, hyaluronovou kyselinu a jiné.

Vláknité scaffoldy jsou třetí typ scaffoldů na bázi textilně zpracovatelných materiálů. Je možné připravit tkaná, netkaná vlákna a textilie. Při výrobě lze nastavit průměr vláken (nano vs. mikro rozměry). Lze zvolit také velikost a hustotu vláken a tím i průměr vzniklých pórů. Povrch netkaných textilií se dobře hodí pro regeneraci tkání. Tkané materiály mají větší pevnost a mohou být připraveny s různou velikostí pórů.

5 REOMETRIE

Reometrie je vědní obor čerpající z teoretických základů reologie, která se zabývá studiem toku a deformace většinou kapalných materiálů. Reometrie umožňuje zjišťovat hodnoty viskozity při konkrétním působení vnějších sil. Tyto poznatky se využívají ve velkém množství odvětví při výběru, testování či formulaci vhodných látek. Viskozita souvisí s teplotou, proto je nutné ji udržovat stálou v průběhu celého měření (používají se teploty blízké teplotám aplikačním, v závislosti na formě aplikace od 20 do 37 °C). K experimentálnímu stanovení viskozity a jiných reologických parametrů slouží reometry. Reologické vlastnosti polymerů (např. viskozita) jsou důležitou znalostí pro vytváření nových materiálů se specifickými vlastnostmi vhodnými pro daný účel nebo pro konečný výrobek (např. kloubní náhrady) [17].

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Připravené roztoky

HAox3 vše v 0,9% NaCl (9 g NaCl/1 l demineralizované vody)

- 25 ml 2% roztoku (nesterilní) -> 500 mg/25 ml
- 25 ml 2,2% roztoku (nesterilní) -> 550 mg/25 ml + 2,77 ml fibrinogenu
- 20 ml 2% roztoku (sterilní) -> 400 mg/20 ml
- 20 ml 2,2% roztoku (sterilní) -> 440 mg/20 ml + 2,22 ml fibrinogenu

Všechny typy gelů byly připraveny podle stejného postupu.

Připravila jsem si roztok POA a následně roztok fibrinogenu. Potřebné množství jsem vypočítala tak, že v materiálu C, D byl 1 mg/ml fibrinogenu, POA bylo dávkováno v objemu 750 μ l a HAox v objemu 5 ml. Dala jsem si rozpustit fibrinogen a mezitím jsem si připravila sterilní stříkačky a nádobí pro 4 typy materiálů.

Měla jsem 3 ml stříkačky, v jedné byl roztok derivátu kyseliny hyaluronové a ve druhé byl roztok síťovacího činidla POA. Tyto dva roztoky jsem dvoucestnou stříkačkou pomocí statického mixéru smíchala. Vzniklý roztok jsem dávkovala do válcovité teflonové formy a od každého materiálu vytvořila 3 kusy větších (17,5 mm) gelů. Ty jsem nechala zrát 4,5 hodiny.

U materiálů o daném složení jsem naměřila kinetiku gelace na reometru TA instruments AR-G2. Výsledky měření elastického a viskózního modulu v závislosti na čase jsou znázorněny v kapitole Výsledky a diskuze.

V laminárním boxu ve sterilním prostředí jsem měla 6 ml stříkačky. V jedné byl roztok derivátu kyseliny hyaluronové a ve druhé byl roztok síťovacího činidla POA. Tyto dva roztoky jsem dvoucestnou stříkačkou pomocí statického mixéru smíchala. Vzniklý roztok jsem okamžitě nanášela v tenkých vrstvách na jamky (po 4 jamkách/materiál na 2 panelech). Nechala jsem je zrát při pokojové teplotě.

Pasáž

- Buňky 2x opláchneme pomocí 5 ml PBS
- Vylijeme PBS a přidáme 1 ml Trypsinu/EDTA 1x, dáme do inkubátoru přibližně na 1 min. Průběžně kontrolujeme, zda se buňky uvolňují.
- Jakmile se buňky začnou uvolňovat, přeneseme lahev zpět do laminárního boxu. Uvolníme buňky poklepáním na lahev a přidáme kultivační médium.
- Uvolněné buňky v kultivačním médiu přeneseme do zkumavky. Odebereme 100 ml na počítání na přístroji CASY.
- Buněčnou suspenzi centrifugujeme při 1200 rpm 5 min.
- Pelet resuspendujeme v kultivačním médiu a nasadíme na jamky.

Vyhodnocení růstu buněk

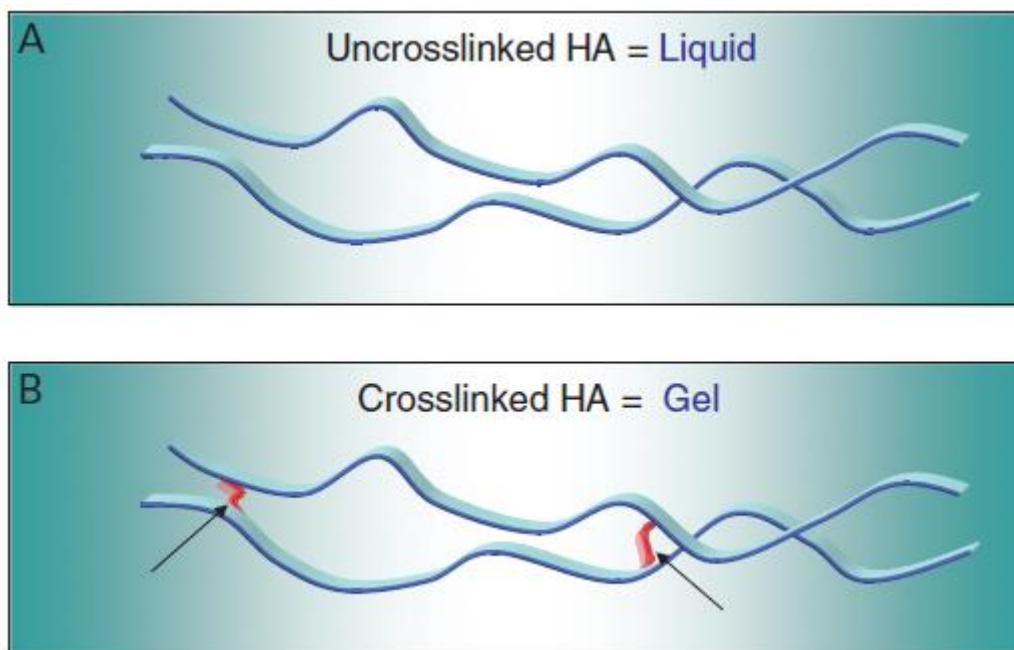
Připravíme barvicí roztok LD. Ze všech jamek odsajeme 500 μ l média a přidáme 500 μ l roztoku LD. Poté inkubujeme ve tmě 15 min.

Vyhodnocení růstu buněk

- Připravíme roztok Cell-Titer.
- Ze všech jamek odsajeme médium, opláchneme 1x pomocí 1 ml PBS. Odsajeme PBS.
- Přidáme 240 μ l roztoku Cell-Titer.
- Panel zabalíme do alobalu a inkubujeme na třepačce 15 min při rychlosti 200 rpm. Poté sundáme z třepačky a inkubujeme dalších 10 min.
- Z každé jamky pipetujeme 2x 100 μ l roztoku do černého 96-jamkového panelu. Panel vložíme do přístroje Tecan a změříme luminiscenční signál.

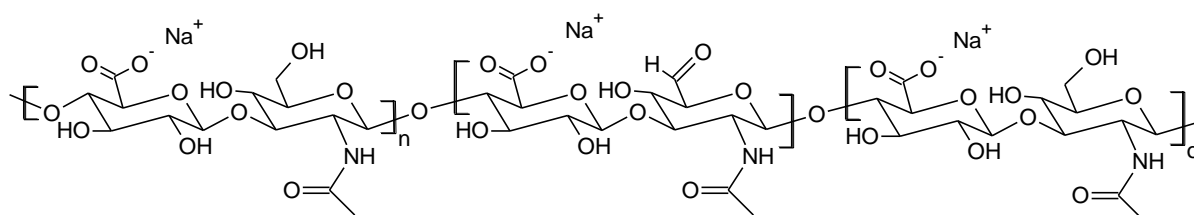
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

V mojí práci jsem se zaměřila na přípravu biomateriálů umožňujících na svém povrchu 2D kultivaci buněk. Zvolila jsem hydrogely, protože se díky vysokému obsahu vody a mechanickým vlastnostem podobají mezibuněčné hmotě. Jako gelotvornou složku jsem zvolila hyaluronovou kyselinu, neboť ta je hojně přítomná v mezibuněčné hmotě. Nativní kyselina hyaluronová ve vodném prostředí tvoří viskoelastický roztok nebo fyzikálně zesítený gel, který by neposkytoval dostatečnou mechanickou oporu pro růst buněk. Mechanicky odolné hydrogely lze z hyaluronanu, popř. jeho derivátů, připravit chemickou reakcí vedoucí k prostorovému zesílení původně k lineárním řetězcům hyaluronanu (obrázek č.2).

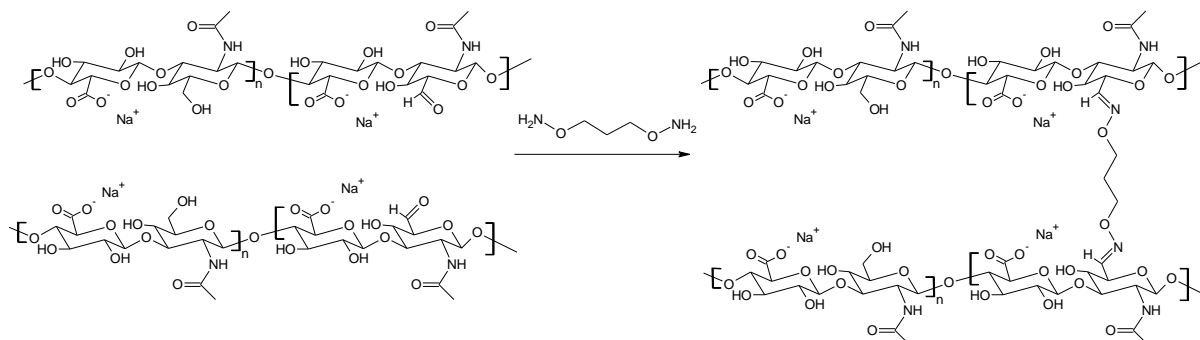


Obrázek 2: Vznik hydrogelu zesítním lineárních řetězců hyaluronanu

Za účelem vytvoření chemicky zesítněného gelu s vhodnými mechanickými vlastnostmi jsem použila polyaldehydický derivát HA (obrázek č.3), který podstupuje síťovací reakci (obrázek č.4) pomocí dvojfunkčního činidla O,O'-1,3-Propandiylbishydroxylaminu (POA) schéma 1.



Obrázek 3: Schéma řetězce upravené HA

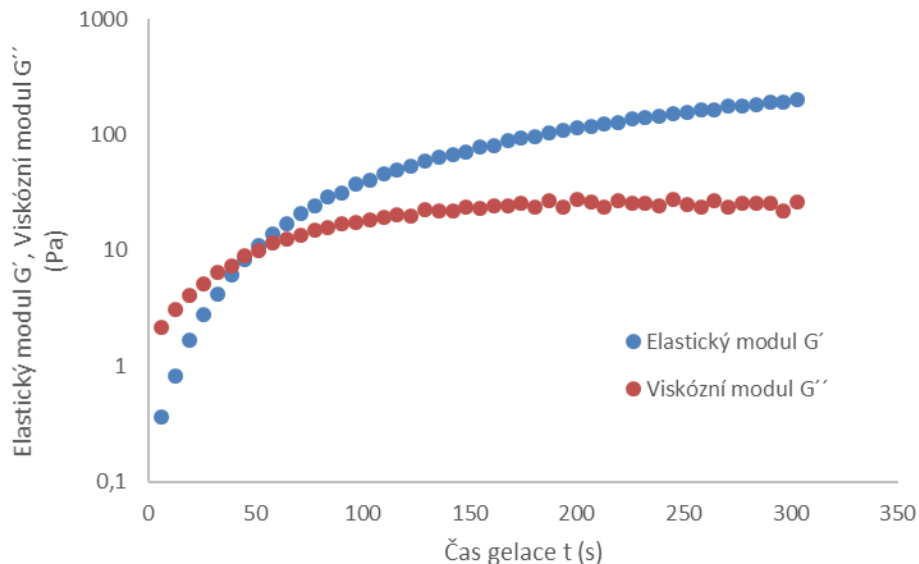


Obrázek 4: Schéma síťovací reakce HA zprostředkované POA

Tento systém umožňuje tvorbu kovalentně zesíťovaných hydrogelů za fyziologických podmínek, a to i v případě kontaktu s živou tkání. Aby byla umožněna adheze buněk, bylo potřeba do hydrogelu zabudovat molekuly podporující adhezi buněk. Jednou z vhodných molekul je fibrinogen, který je přirozenou složkou mezibuněčné hmoty a buňky jsou schopné k němu adherovat pomocí receptorů integrinů.

V rámci svého experimentu jsem chtěla dokázat vliv přítomnosti fibrinogenu na adhezi buněk k hydrogelu. Připravila jsem si dva typy hydrogelů, přičemž první byl s fibrinogenem a druhý bez něj.

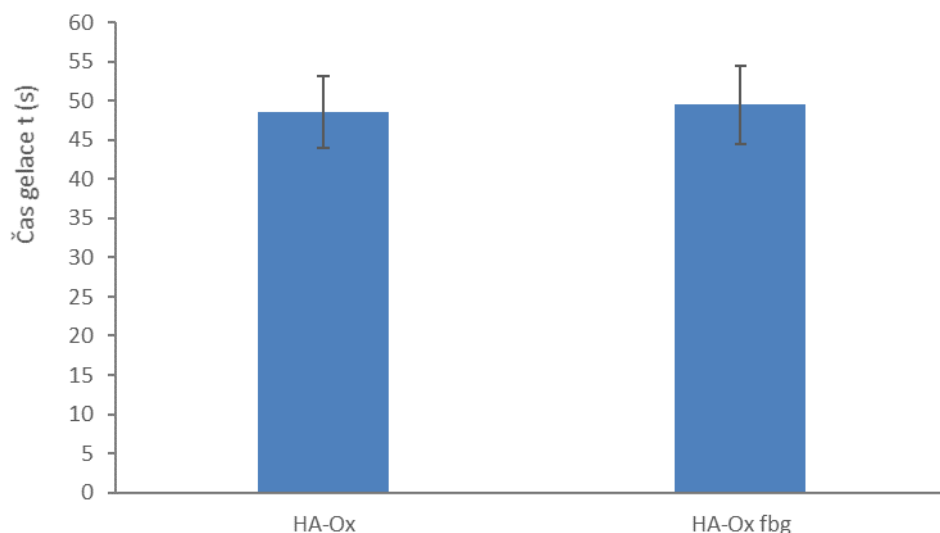
Důležitým parametrem pro charakterizaci biomateriálů je rychlost vzniku polymerní sítě. Proto jsem u připravených hydrogelů měřila a srovnávala kinetiku gelace na rotačním reometru. Stanovován byl čas gelace neboli bod kdy se elastický G' a viskózní modul rovnají.



Graf 1: Průběh kinetiky gelace – závislost elastického a viskózního modulu na čase

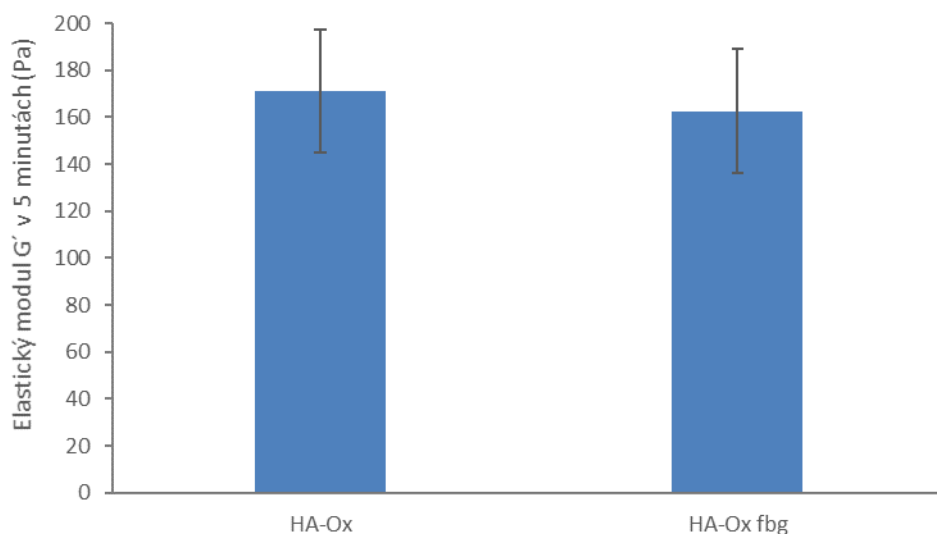
Porovnáván byl vzorek HAox/POA bez fibrinogenu a s obsahem této adhezivní molekuly 1 mg/ml (graf č.1).

Materiál s fibrinogenem dosáhl bodu gelace za $48,5 \pm 4,6$ s (graf č.2), materiál bez fibrinogenu dosáhl bodu gelace za $49,5 \pm 5,0$ s (graf č.2). Z naměřených hodnot vyplývá, že přítomnost fibrinogenu nemá vliv na rychlost gelace.



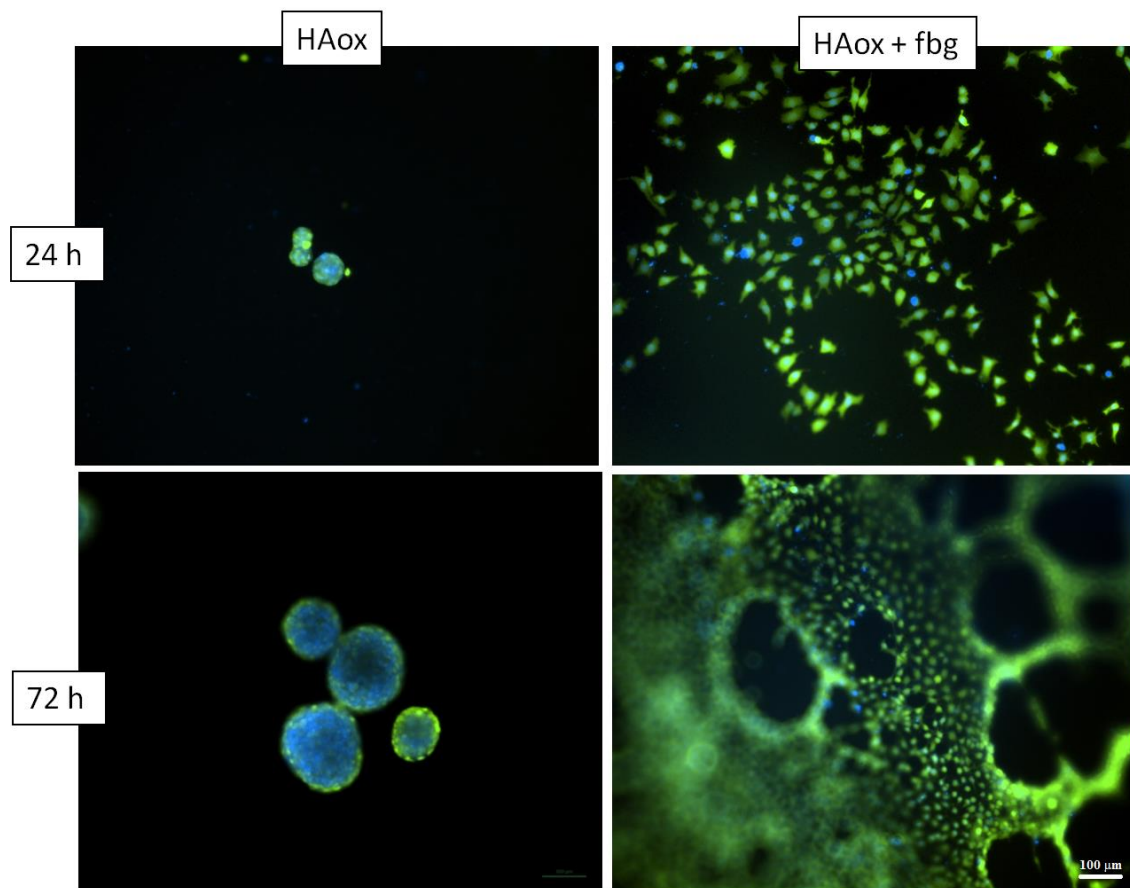
Graf 2: Čas gelace vzorků na bázi HAox/POA bez a s fibrinogenem

Dalším parametrem pro charakterizaci biomateriálů je elastický modul G' , který charakterizuje tuhost sítě. Hodnoty daného modulu pro oba materiály byly stanovovány v rámci kinetiky gelace a jeho hodnota byla odečtena v čase 5 minut. Hodnota pro materiál s fibrinogenem byla $162,6 \pm 20,3$ s (graf č.3), pro materiál bez fibrinogenu $171,1 \pm 26$ s (graf č.3). Výsledky měření ukázaly, že elastický modul v 5 minutách u obou typů hydrogelů je srovnatelný v rámci statistické chyby.

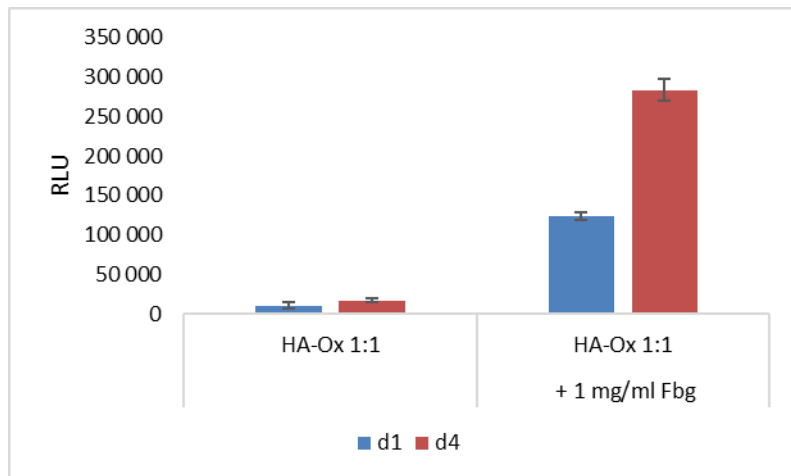


Graf 3: Elastický modul

Posledním krokem byla příprava testu adheze buněk na srovnávané hydrogely. Ve sterilním prostředí jsem potáhla jamky kultivačního panelu tenkou vrstvou hydrogelu a poté na ně nasadila buňky. Pracovala jsem s buněčnou linií 3T3, která je běžně využívána při laboratorních experimentech. U buněk jsem sledovala jejich adhezi k daným materiálům, jejich morfologii a proliferaci (obrázek č.5).



Obrázek 5: Proliferace a adheze buněk 24h a 72h



Graf 4: Luminiscenční signál

Buňky na materiálu bez fibrinogenu nebyly schopny adherovat, protože jim chyběly adhezní místa. Namísto toho, aby adherovaly k hydrogelu, adherovaly k sobě navzájem, což se projevilo vytvořením velkých vícebuněčných shluků uprostřed jamky. Na materiálu s fibrinogenem se buňky rovnoměrně přichytily k materiálu, měli adherentní morfologii a proliferovaly, což bylo potvrzeno jak mikroskopicky, tak stanovením ATP.

ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo dokázat vliv přítomnosti fibrinogenu na adhezi buněk k hydrogelu. V rámci svého experimentu jsem připravila dva typy hydrogelů, první byl s fibrinogenem a druhý bez něj. Stanovila jsem čas gelace a elastický modul a dále sledovala buněčnou adhezi k připraveným materiálům. Veškerá charakterizace materiálů byla prováděna na 3 vzorcích od každého materiálu. Cíl práce byl dosažen, prokázala jsem, že k tomu, aby buňky k materiálu adherovaly, je potřeba do materiálu zabudovat adhezní molekuly. Dále bylo prokázáno, že fibrinogen je k tomuto účelu vhodný, neboť umožňuje adhezi buněk a nemá vliv na kinetiku gelace u připravených hydrogelů.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Buněčné adheze [online]. [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2012/Bi7070/4_Bunecne_adheze_upravene.txt
- [2] Fibrinogen. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fibrinogen>
- [3] Extracelulární matrix. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi [online]. [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JMACC.htm>
- [4] Extracelulární matrix. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-01-10]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Extracelul%C3%A1rn%C3%AD_matrix
- [5] Molecular Biology of the Cell: Integrins [online]. New York: Garland science, 2002 [cit. 2018-01-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26867/#A3602>
- [6] Integrin. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Integrin>
- [7] Srážení krve. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Sr%C3%A1%C5%BEen%C3%AD_krve
- [8] Koagulační faktory. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Koagula%C4%8Dn%C3%AD_faktory
- [9] Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe: Expres v tkáňových kulturách [online]. Grada Publishing [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=wCR0AgAAQBAJ&pg=PA35&lpg=PA35&dq=biologick%C3%A1+adheze&source=bl&ots=AwYvnfV7Tb&sig=QlrOl3_f8jv2P-EBMb308wdWJ1A&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwi8lNb32p3ZAhVEhqQKHe8ODY4Q6AEIMjAC#v=onepage&q=biologick%C3%A1%20adheze&f=false
- [10] Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK: Adheze [online]. [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=adheze>
- [11] Buněčné kultury [online]. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze Kateřinská 32, 121 08 Praha 2 [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [12] 3D buněčná kultura 101: Úvod do nástrojů a technik 3D buněčné kultury: Úvod. Sigma-Aldrich [online]. Darmstadt, Germany: Merck, 2018 [cit. 2018-02-11]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/3d-biomatrix-white-paper-3d-cell-culture-101.html>

- [13] Čivy: Ústrojí zraku. Základy anatomie nervový systém a čivy: Fakulta sportovních studií Masarykovy univerzity [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2014 [cit. 2018-02-11]. Dostupné z :
:"https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_IV/pages/civy.html"[learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_IV/pages/civy.html](https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_IV/pages/civy.html)
- [14] What is the mechanism of blood clotting? Quora [online]. 2017 [cit. 2018-02-11]. Dostupné z: [hHYPERLINK "https://www.quora.com/What-is-the-mechanism-of-blood-clotting"](https://www.quora.com/What-is-the-mechanism-of-blood-clotting)<https://www.quora.com/What-is-the-mechanism-of-blood-clotting>
- [15] Buňky 3T3. Symptomy [online]. 2017 [cit. 2018-02-11]. Dostupné z: <https://www.symptomy.cz/mesh/kod?id=D016475>
- [16] Fibrinogen v plazmě [online]. Použito z programu SLP: Eva Fenclová [cit. 2018-02-20]. Dostupné z: [.pdf"https://www.prevedig.cz/pict/fotogalerie/Odborne_texty/Fibrinogen%20v%20plazm%C4%9B.pdf](https://www.prevedig.cz/pict/fotogalerie/Odborne_texty/Fibrinogen%20v%20plazm%C4%9B.pdf)
- [17] Vliv plastifikace na reologické vlastnosti oligoesteru kyseliny mléčné a glykolové větveného dipentaerythritolem [online]. Hradec Králové, 2014 [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/120172843>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Klára Bílková.

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázek 1: Kyselina hyaluronová	9
Obrázek 2: Vznik hydrogelu zesítním lineárních řetězců hyaluronanu	15
Obrázek 3: Schéma řetězce upravené HA	15
Obrázek 4: Schéma síťovací reakce HA zprostředkované POA	16
Obrázek 5: Proliferace a adheze buněk 24h a 72h	18
Graf 1: Průběh kinetiky gelace – závislost elastického a viskózního modulu na čase.....	16
Graf 2: Čas gelace vzorků na bázi HAOx/POA bez a s fibrinogenem	17
Graf 3: Elastický modul	17
Graf 4: Luminiscenční signál	18