

Využití bioreaktorů v tkáňovém inženýrství

Bc. Darina Zhelezko

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Darina Zhelezko**
Osobní číslo: **T22593**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Využití bioreaktorů v tkáňovém inženýrství**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Vypracujte literární přehled týkající se bioreaktorů a jejich možného využití v tkáňovém inženýrství.
Popište problematiku statické a dynamické kultivace.

II. Praktická část:

Seznamte se s prací v biologických laboratořích.

Naučte se manipulaci s buněčnými liniemi myších fibroblastů a myších embryonálních kmenových buněk.
Provedte dynamickou kultivaci ve Vámi vybraném bioreaktoru (rotační, mechanický, průtokový atd.)

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] PLUNKETT N. a O'BRIEN F. J. "Bioreactors in tissue engineering", *THC*, roč. 19, č. 1, s. 55–69, led. 2011, doi: 10.3233/THC-2011-0605.
- [2] BAYIR E. et al. "Bioreactors in tissue engineering: mimicking the microenvironment", in *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration*, Elsevier, 2020, s. 709–752. doi: 10.1016/B978-0-08-102906-0.00018-0.
- [3] CLEMENTI A. et al. "Cell Culture Conditions: Cultivation of Stem Cells Under Dynamic Conditions", in *Cell Engineering and Regeneration*, J. M. Gimble, D. Marolt, R. Oreffo, H. Redl, a S. Wolbank, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 1–33. doi: 10.1007/978-3-319-37076-7_58-1.
- [4] SALGADO A. J. et al., "Tissue Engineering and Regenerative Medicine", in *International Review of Neurobiology*, Elsevier, 2013, s. 1–33. doi: 10.1016/B978-0-12-410499-0.00001-0.
- [5] JHALA D. a VASITA R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polymer Reviews*, 2015, 55 (4), pp 561–595, doi: <https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1040552>.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Kateřina Skopalová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Bc. Darina Zhelezko

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zaměřuje na komplexní zkoumání využití bioreaktorů v oblasti tkáňového inženýrství, s důrazem na dva klíčové aspekty: 1) scaffold jako základní stavební jednotku pro podporu buněčného růstu a 2) různé typy bioreaktorů, které ovlivňují prostředí pro buněčnou kultivaci.

V teoretické části práce je proveden detailní rozbor technik tkáňového inženýrství, s důrazem na význam scaffoldů v tkáňovém inženýrství. Dále jsou analyzovány různé typy bioreaktorů a jejich role při vytváření optimálních podmínek pro buněčnou kultivaci a tkáňovou regeneraci.

Praktická část práce se zabývá experimentální studií efektivity rotačního perfuzního bioreaktoru při kultivaci buněčných kultur myších embryonálních fibroblastů na kompozitních scaffoldech z polyvinylidenfluorid-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylenu a polykaprolakton (P(VDF-TrFE-CTFE)-PC) v poměru 1:4 a připravených pomocí metody 3D tisk.

Klíčová slova: bioreaktor, tkáňové inženýrství, scaffold, rotační perfuzní bioreaktor, dynamická kultivace, myší fibroblasty.

ABSTRACT

This master's thesis focuses on a comprehensive exploration of bioreactor utilization in the field of tissue engineering, with an emphasis on two key aspects: 1) the scaffold as the fundamental building unit for supporting cell growth and 2) various types of bioreactors that influence the environment for cell cultivation.

The theoretical part of the thesis provides a detailed analysis of tissue engineering techniques, with emphasis on the importance of scaffolds in tissue engineering. Additionally, various types of bioreactors and their roles in creating optimal conditions for cell cultivation and tissue regeneration are examined.

The practical section of the thesis delves into an experimental study of the effectiveness of a rotary perfusion bioreactor in cultivating mouse embryonic fibroblast cell cultures on composite scaffolds made of polyvinylidene fluoride-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylene and polycaprolactone (P(VDF-TrFE-CTFE)-PC) in a ratio of 1:4 and prepared using the 3D printing method.

Keywords: Bioreactor, tissue engineering, scaffold, rotary perfusion bioreactor, dynamic cultivation, mouse fibroblasts.

Chtěla bych vyjádřit svou hlubokou vděčnost paní Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. za její neocenitelnou podporu, odborné rady a trpělivost během mého výzkumu a psaní diplomové práce. Její otevřenost, ochota a vstřícnost přinesly neocenitelný přínos pro mé akademické a profesní rozvoje.

Děkuji také své rodině za jejich neustálou podporu, povzbuzení a pochopení během celého studijního období.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 ZÁKLADY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
1.1 PRINCIPY VYTVÁŘENÍ REKOMBINANTNÍCH MOLEKUL DNA.....	14
1.2 PŘEHLED APLIKACÍ GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ V MEDICÍNĚ A BIOTECHNOLOGII	15
1.3 OBAVY SPOJENÉ S GENETICKÝM INŽENÝRSTVÍM.....	19
1.4 TKÁŇOVÉ VS GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	20
2 ZÁKLADY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	21
2.1 HISTORIE TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ.....	22
2.2 ZÁKLADNÍ POJMY A PRINCIPY.....	23
2.2.1 Typy buněk v tkáňovém inženýrství.....	24
2.2.1.1 Primární buňky.....	24
2.2.1.2 Kmenové buňky.....	25
2.2.1.3. Další typy buněk.....	27
2.3 AKTUÁLNOST A MOŽNOSTI TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ.....	28
2.4 TYPY MATERIÁLŮ VYUŽÍVANÉ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	31
2.4.1 Polymerní materiály.....	31
2.4.1.1 Biopolymery.....	32
2.4.1.1.1 Alginát.....	32
2.4.1.1.2 Kolagen.....	33
2.4.1.1.3 Celulóza.....	33
2.4.1.1.4 Kyselina hyaluronová.....	34
2.4.1.2 Syntetické polymery.....	34
2.4.1.2.1 Polyethylenglykol.....	34
2.4.1.2.2 Polykaprolakton.....	35
2.4.1.2.3 Polyglykolová kyselina.....	35
2.4.2 Bioaktivní keramika.....	36
2.4.3 Kovy.....	36

2.5 SCAFFOLDY.....	37
2.5.1 Autogenní scaffoldy.....	40
2.5.2 Výrobní technologie.....	41
2.5.2.1 3D biotisk bez buněk.....	42
2.5.2.2 3D biotisk s buňkami.....	42
2.5.2.3 Příklady využití 3D biotisku.....	43
3 STATICKÁ KULTIVACE	45
4 DYNAMICKÁ KULTIVACE.....	46
4.1 BIOREAKTORY V TKANOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	46
4.2 CO JSOU BIOREAKTORY A JAK FUNGUJÍ.....	47
4.2.1 Různé typy bioreaktorů používaných při dynamické kultivaci.....	48
4.2.1.1 Spinner flask bioreaktor.....	50
4.2.1.2 Rotační bioreaktor.....	51
4.2.1.3 Perfuzní bioreaktor.....	52
4.2.1.4 Mechanické bioreaktory.....	54
4.3 KONTROLA PROSTŘEDÍ V BIOREAKTORECH PRO RŮST A DIFERENCIACI BUNĚK.....	55
4.4. TECHNOLOGIE A DESIGN BIOREAKTORŮ.....	56
5 VYUŽITÍ BIOREAKTORU PŘI KULTIVACI BUNĚK A TKÁNÍ	58
5.1 EXPERIMENTÁLNÍ A KLINICKÉ APLIKACE BIOREAKTORŮ.....	58
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	60
6 CÍLE PRÁCE	61
7 MATERIÁL A METODIKA.....	62
7.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	62
7.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	62
7.3 POUŽITÝ BIOMATERIÁL.....	62
7.4 PŘIPRAVA SCAFFOLDŮ.....	62
7.4.1 Úprava scaffoldů před použitím.....	63
7.5 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	63
7.5.1 Buněčná linie.....	63
7.5.2 Statická kultivace buněčných kultur.....	62
7.5.3 Dynamická kultivace.....	65

7.5.3.1 Příprava bioreaktoru.....	66
7.5.3.2 Barvení buněk.....	68
7.5.4 Dynamická kultivace - 2. měření	69
7.5.4.1 Kultivace buněk.....	69
8 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	71
8.1 VÝSLEDKY PRVNÍHO MĚŘENÍ.....	71
8.2 VÝSLEDKY DRUHÉHO MĚŘENÍ.....	74
ZÁVĚR	72
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	93
SEZNAM OBRÁZKŮ	94
SEZNAM TABULEK	97

ÚVOD

V oblasti tkáňového inženýrství je využití bioreaktorů klíčovým krokem k efektivnímu a reprodukovatelnému vývoji tkáňových kultur. Spojením pokročilých technik tkáňového inženýrství s principy bioinženýrství a buněčného růstu umožňuje vytvoření funkčních tkání a orgánů pro léčebné, diagnostické a výzkumné účely (Langer, R., & Vacanti, J. P., 1993). Rozsah aplikací tkáňového inženýrství je značný a zahrnuje terapeutický potenciál pro mnoho chorob spojených se stárnutím a životním stylem, které dominují v západních populacích. Základním principem tkáňového inženýrství je implantace buněk do strukturálního scaffoldu, který slouží jako podpůrná struktura. Buňky pak mají možnost transformovat scaffold do tkáně přirozeným způsobem před jeho implantací do těla pacienta (Place et al., 2008).

Využití bioreaktorů přináší významné výhody při kultivaci a proliferaci buněčné kultury na scaffoldu v rámci tkáňového inženýrství. Díky pečlivě řízenému prostředí, které bioreaktory poskytují, je možné dosáhnout optimálních podmínek pro buněčný růst a diferenciaci. Bioreaktory umožňují kontrolovat fyzikální a chemické parametry, jako je například proudění média, koncentrace živin, teplota nebo pH, což vede k dosažení maximálního výkonu buněčného procesu (Moheb et. al., 2023). Přestože dynamická kultivace na scaffoldu může být pro buněčnou kulturu stresující kvůli dynamickému namáhání, je možné pomocí bioreaktorů minimalizovat negativní dopady a optimalizovat prostředí pro buněčný růst. Důležité je také klást důraz na materiálové složení scaffoldu, které hraje klíčovou roli při podpoře buněčné adheze, proliferace a diferenciaci (Kong et. al., 2021).

Na scaffoldu, který slouží jako prostředí pro buněčnou kultivaci, umožňuje využití bioreaktoru dosáhnout homogenní distribuce živin a kyslíku, což má za následek lepší proliferaci a diferenciaci buněk. Díky přesnému řízení podmínek kultivace je také možné eliminovat vznik nepříznivých prostředí, jako jsou lokální hypoxie nebo toxické produkty metabolismu, které by mohly negativně ovlivnit buněčný růst.

Teoretická část předložené práce byla zaměřena především na základy genového a tkáňového inženýrství a dále potom na bioreaktory v těchto oblastech využívané. Na základě získaných poznatků při zpracování teoretické části byla pak provedena praktická část, kdy byl pro kultivaci buněk na scaffoldu využit dynamický reaktor. Konkrétně byl vybrán

perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated. Testovaný scaffold byl získán díky spolupráci s Ústavem fyziky a materiálového inženýrství Fakulty technologické (Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně). Scaffold byl připraven pomocí metody 3D tisk a byl složen z polyvinylidenfluorid-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylenu a polykaprolaktonu (P(VDF-TrFE-CTFE) -PC). Pro vyhodnocení schopnosti proliferace buněk na materiálu v dynamických a statických podmínkách byla využita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

Genové inženýrství (GI) je soubor metod biochemie a molekulární genetiky, pomocí kterých se provádí cílené kombinování genetické informace různých organismů. GI umožňuje překonávat přirozené mezidruhové bariéry bránící výměně genetické informace mezi taxonomicky vzdálenými druhy organismů a vytvářet buňky a organismy s neexistujícími kombinacemi genů s určitými dědičnými vlastnostmi. Hlavním objektem GI je nositel genetické informace – deoxyribonukleová kyselina (DNA), jejíž molekula se obvykle skládá z dvou řetězců (Šělkunov S. N., 1986).

Přísná specifická vzájemného párování purinových a pyrimidinových bazí umožňuje vlastnost komplementarity. Vytvoření nových kombinací genů bylo možné díky zásadní podobnosti struktury molekul DNA u všech druhů organismů a také skutečná univerzálnost genetického kódu zajišťující expresi cizích genů (projev jejich funkční aktivity) v jakýchkoliv typech buněk (Temin et al 1970). K tomu přispělo také nahromadění znalostí v oblasti chemie nukleových kyselin, objevení molekulárních vlastností organizace a funkce genů (včetně stanovení mechanismů regulace jejich exprese a možností podřízení genů působením "cizích" regulačních prvků), vývoj metod sekvenování DNA a objev polymerázové řetězové reakce, což umožnilo rychlou syntézu libovolného fragmentu DNA (Ajala F., 1988 etal).

Důležitým předpokladem pro vznik GI byl objev plazmidů, které jsou schopny autonomní replikace a přenosu genetické informace z jedné bakteriální buňky do druhé (Lederberg, et al., 1946) - přenosu některých genů bakteriofágy, což umožnilo formulovat představu o vektorech: molekulách nesoucích geny (Temin, H. M., et al. 1970). Další velký význam pro rozvoj metodologie GI hrály enzymy účastníci se přeměny nukleových kyselin: restriční endonukleázy (rozpoznávají v molekulách DNA přesně určené posloupnosti – místa – a štěpí dvojitý řetězec v těchto místech), DNA ligázy (kovalentně spojují jednotlivé fragmenty DNA), reverzní transkriptáza (syntetizuje na matrici RNA komplementární kopii DNA, známou jako cDNA) a další (Smith, H. O., et al. 1970). Pouze díky jejich přítomnosti se stala tvorba umělých struktur technicky proveditelným úkolem. Enzymy jsou používány k získávání individuálních fragmentů DNA (genů) a vytváření molekulárních hybridů – rekombinantní DNA (rekDNA) založené na DNA plazmidů a virů. Tyto poslední předávají

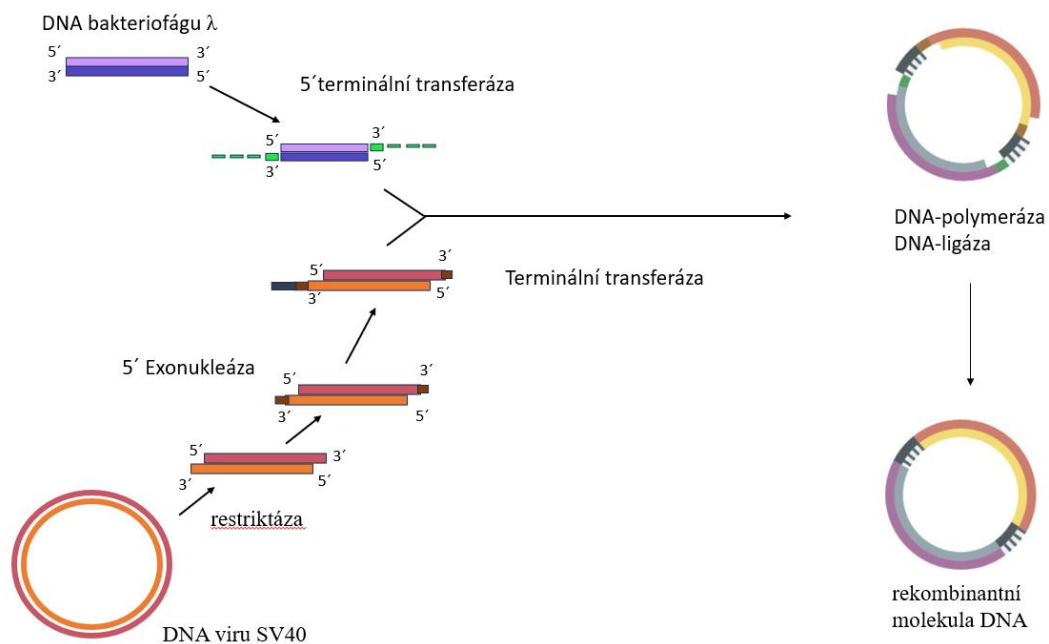
potřebný gen do hostitelské buňky, kde zajišťují jeho reprodukci (klonování) a tvorbu konečného produktu genu (jeho exprese) (Nathans, et al. 1979).

Jedním z klíčových úkolů GI je vytvoření kmenů bakterií, kvasinek nebo buněčných linií zvířat a rostlin, a také transgenních rostlin a zvířat, které by zajistily efektivní expresi klíčových genů, které do nich byly vloženy. Vysoká produkce proteinů je dosažena tím, že geny jsou klonovány do vektorů v mnoha kopiích, což způsobí hojné zastoupení cílového genu v buňce. Důležité je, aby DNA sekvence byla pod kontrolou promotoru, který je účinně rozpoznáván RNA polymerázou buňky, a aby vytvořená mRNA byla relativně stabilní a efektivně využita během translace proteinů. Je důležité zajistit, aby cizí protein syntetizovaný v přijímajících buňkách nebyl rychle degradován intracelulárními proteázami (Šělkunov S. N., 1986).

Genetický kód je univerzální, což znamená, že schopnost exprese genu je určena pouze přítomností signálů pro zahájení a ukončení transkripce a translace, které jsou správně rozpoznány buňkou. Většina genů vyšších eukaryot má rozdělenou exon-intronovou strukturu, což znamená, že při transkripci těchto genů vzniká prekurzor mRNA (pre-mRNA), ze kterého jsou při následném sestřihu (splicing) odstraněny nekódující sekvence – introny – a vytvoří se mRNA. Tyto geny nemohou být exprimovány v bakteriálních buňkách, kde chybí mechanismus splicingu. Aby se toto omezení překonalo, vytvoří se na mRNA molekulách pomocí reverzní transkripce DNA kopie (cDNA), ke které je následně druhý řetězec dokončen pomocí DNA polymerázy. Takové fragmenty DNA, odpovídající kódovým sekvencím genů (které již neobsahují introny), mohou být vloženy do vhodného molekulárního vektoru (Šělkunov S. N., 1986).

1.1 Principy vytváření rekombinantních molekul DNA

Termín GI se začal široce používat po tom, co v roce 1972 Paul Berg a jeho kolegové poprvé získali rekombinantní DNA. Tato rekombinantní DNA je hybrid, který obsahuje fragmenty DNA bakterie *Escherichia coli*, jejího viru (bakteriofág λ) a DNA opičího viru SV40 (obrázek 1) (Šělkunov S. N., 1986). Rekombinace je vysoce účinná a přesná metoda GI DNA. Pomocí rekombinace lze provádět genové náhrady, delece, inserce, inverze a jednoduché a vícenásobné bodové mutace (Sawitzke et al, 2023).

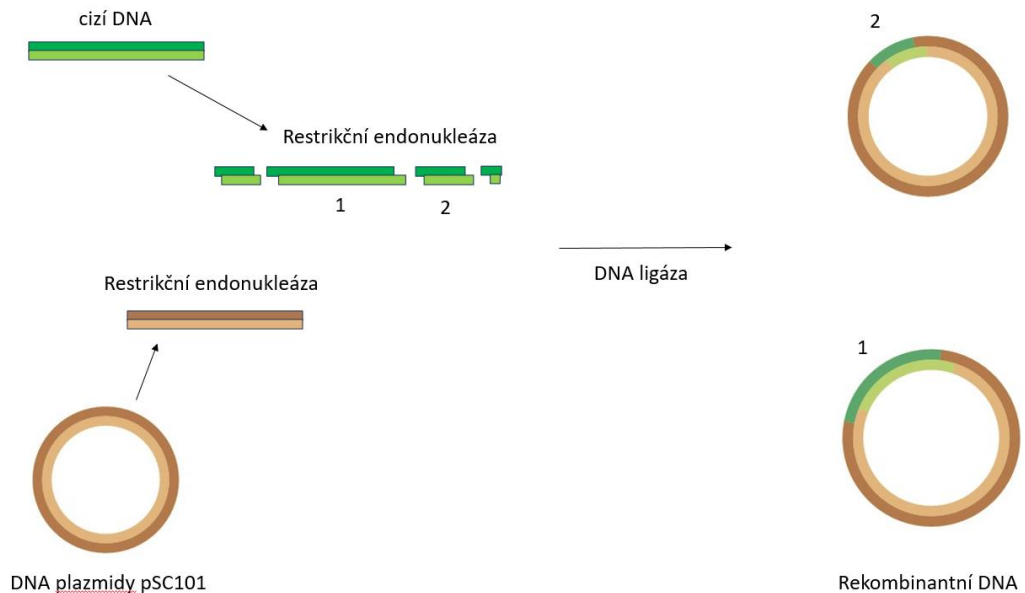


Obrázek 1 -Schéma popisující získání první rekombinantní DNA Peterem Bergem, vlastní obrázek inspirováno (Šelkunov S. N., 2004).

Na obrázku Č.1 je znázorněn postup získání rekombinantní DNA Paulem Bergem a jeho kolegy. Prvně převedli kruhovou molekulu DNA na lineární formu a to tím, že byla kruhová DNA opičího viru SV40 rozštěpená restriční endonukleázou. Pak následovalo odštížení nukleotidů na konci řetězce. Pomocí enzymu 5'-exonukleázy bylo odebráno několik nukleotidů z 5' konce každého lineárního řetězce. Tím vznikly jednořetězcové výčnělky. K těmto výčnělkům byly přidány oligonukleotidy, které obsahovaly přibližně 50 adeninových zbytků. Toto bylo provedeno pomocí enzymu terminální transferáza (koncová transferáza). Obdobným způsobem byl ke konci jednoho z řetězců fragmentu DNA fága lambda, který obsahoval geny bakterie *E. coli*, přidán thymidinový oligonukleotid. Po smíchání těchto molekul DNA obou virů byly jednořetězcové mezery zaplněny chybějícími nukleotidy pomocí DNA-polymerázy. Kovalentní spojení bylo dokončeno díky účasti DNA-ligázy (Ajala F., 1988 etal).

V roce 1973 Stuart Cohen a jeho spolupracovníci použili plazmid pSC101 a restriční enzym (EcoRI), který rozštěpoval plazmid na jednom místě, čímž vytvořil krátké komplementární jednořetězcové "příčky" na koncích dvouřetězcové DNA molekuly. Tyto příčky byly nazývány "sticky ends" (lepivé konce), protože se mohly spojovat (nebo "lepit") dohromady.

Když tuto DNA smísili s fragmenty cizí DNA, které byly také zpracovány stejným restričním enzymem a měly stejné lepivé konce, vytvořily se nové hybridní plazmidy. Každý z těchto plazmidů obsahoval alespoň jeden fragment cizí DNA vložený do restričního místa enzymu (EcoRI) na plazmidu (obrázek 2) (Šělkunov S. N., 1986).



Obrázek 2 - Schéma pro získání rekombinantní DNA podle S. Cohena. Plazmidová DNA byla štěpena restričním enzymem, který produkuje přesahující jednořetězcové komplementární (lepivé) konce. Tato DNA byla smíchána s fragmenty cizí DNA ošetřené stejným restričním enzymem. Lepivé konce různých molekul DNA se znovu spojují v důsledku komplementárních interakcí a DNA ligáza kovalentně zesítuje řetězce do jednotlivých molekul. Vlastní obrázek, inspirováno (Šělkunov S. N., 2004).

Tímto způsobem byly vytvořeny kruhové molekuly DNA obsahující genetický materiál z obou virů, což umožnilo studium a manipulaci s těmito molekulami v laboratoři. Bylo zřejmé, že do těchto plazmidů lze vložit fragmenty různých cizích DNA, které byly získány jak z mikroorganismů, tak i z vyšších eukaryotických organismů (Šělkunov S. N., 1986).

1.2 Přehled aplikací genového inženýrství v medicíně a biotechnologii

Pomocí GI byly výrazně rozšířené hranice molekulární biologie, protože GI umožnilo zavádění cizí DNA do různých typů buněk a zkoumání jejich funkcí, což nám umožnilo sledování přenosu a exprese genetické informace u různých organismů.

Úsilí o syntetickou biologii začalo v jednoduchých jednobuněčných systémech, s nimiž bylo relativně snadné geneticky manipulovat (Cameron et al., 2014). Toto pole v posledních dvou desetiletích exponenciálně rostlo a jednou z nejnovějších hranic jsou syntetické vývojové programy pro mnohobuněčné savčí systémy (Black et al., 2017; Wieland a Fussenegger, 2012) pro genetickou kontrolu vlastností, jako je vzorování nebo morfogeneze. Tyto programy se spoléhají na upravenou komunikaci buňka-buňka, mnohobuněčné genové regulační sítě a efektorové geny.

Tento přístup otevřel možnosti vytváření zcela nových mikrobiologických producentů biologicky aktivních látek a také zvířat a rostlin nesoucích funkčně aktivní cizí geny. Mnoho dříve nedostupných biologicky aktivních proteinů člověka, včetně interferonů, peptidových hormonů a krevních faktorů, začalo být produkováno ve velkém množství v buňkách bakterií, kvasinek nebo savců a široce využíváno v medicíně. Navíc se objevila možnost uměle vytvářet geny kódující chimérické polypeptidy s vlastnostmi dvou nebo více přírodních bílkovin (Black et al., 2017; Teixeira a Fussenegger, 2012).

Hlavními objekty GI jsou bakterie *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* (senová palička), pekařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, různé linie savčích buněk. Rozsah objektů GI se neustále rozšiřuje. Intenzivně se rozvíjejí směry ve výzkumu vytváření transgenních rostlin a zvířat. Metodami GI je vytvářena nová generace vakcín proti různým infekčním agens (první z nich byla vytvořena na základě kvasinek tlumících povrchové proteiny viru hepatitidy B u lidí) (Calixto, 2019).

Velká pozornost je také věnována vývoji klonovacích vektorů na základě savčích virů a jejich použití pro vytváření živých polyvalentních vakcín pro potřeby veterinářství a medicíny, stejně jako molekulární vektory pro genovou terapii rakovinných nádorů a dědičných onemocnění (Calixto, 2019).

V posledních letech byla vyvinuta metoda přímého zavedení do organismu člověka a zvířat rekombinantní DNA, směřující k produkci antigenu různých infekčních agens v jejich buňkách (DNA vakcinace). Nejnovějším směrem GI je vytváření jedlých vakcín na základě transgenních rostlin, jako jsou rajčata, mrkev, brambory, kukuřice, salát a další, produkující imunogenní bílkoviny patogenů infekcí (Rolf D. Schmid, 2015).

GI se svou schopností modifikovat genomy organismů, zaznamenalo rapidní rozvoj, a díky tomu stává se klíčovou disciplínou v oblasti biotechnologie. Například pomocí GI již byly vytvořeny kmeny bakterií, které účinně rozkládají toxické látky znečišťující životní prostředí a které přispívají k urychlení růstu plodin v zemědělství. Dále které kmeny bakterií jsou po úpravě schopny efektivně rozkládat celulózu na nízkomolekulární uhlíkaté sloučeniny a hubit škodlivý hmyz.

Pro efektivní implementaci GI na průmyslové úrovni a ve výzkumu hraje roli nezbytný nástroj, známý jako bioreaktor (fermentor). Bioreaktor je zařízení, které umožňuje například kultivaci mikroorganismů za přísně kontrolovaných podmínek, což zahrnuje kontrolu teploty, pH, kyslíku a dalších faktorů, které ovlivňují jejich růst a produkci. Bioreaktory jsou nezbytné pro průmyslovou výrobu biotechnologických produktů, jako jsou léčiva, enzymy a biopaliva. Bioreaktory jsou nedílnou součástí GI. Poskytují prostředí pro vývoj, testování a produkci geneticky modifikovaných organismů a jejich produktů, což zvyšuje efektivitu a ekonomičnost procesů spojených s genovým inženýrstvím. Jejich role je nezastupitelná pro vědecký a průmyslový rozvoj v této oblasti (Teixeira, 2019).

Existuje mylný názor, že kultivace velkého množství mikroorganismů je rutinním postupem. Nicméně pro úspěšnou výrobu rekombinantních bílkovin v průmyslovém měřítku je třeba kontrolovat mnoho parametrů, které ovlivňují růst těchto mikroorganismů a výši produkce produktů. GI a biotechnologie bezpochyby hrají důležitou roli v inovacích a řešeních v oblasti životního prostředí, zemědělství a lékařství a bioreaktory jsou klíčovými nástroji pro efektivní provádění těchto procesů a produkci biotechnologických produktů (Rolf D. Schmid, 2015).

1.3 Obavy spojené s genetickým inženýrstvím

V souvislosti s pokrokem v oblasti GI se objevuje několik bioetických problémů, především týkajících se zásahů do genetického kódu člověka. Metody této vědy jsou ohodnocené velmi pozitivně v případech léčby některých dědičných nemocí, avšak existuje riziko cíleného zdokonalování lidstva a jeho podstaty s cílem stále větší adaptace na nároky moderní technosféry. Existuje obava, že může dojít ke zneužití genového inženýrství k vytváření "designových" lidí s vybranými genetickými vlastnostmi, což by mohlo vést k nepředvídatelným sociokulturním důsledkům (Chadwick 2016).

Navíc je tu další důležitý problém spočívající v tom, že organismy účastníci se genetických experimentů mohou vyměňovat genetickou informaci s ostatními jedinci. Výsledky takových interakcí mohou vést k nekontrolovatelným mutacím, dříve nepřítomným genetickým vlastnostem, neboť mnoho experimentů v oblasti genového inženýrství svědčí o nepředvídatelnosti jejich blízkých i vzdálených důsledků. Existuje také riziko vytváření geneticky modifikovaných organismů pro vojenské účely, což může vést ke zneužití této technologie ve vojenských konfliktech. Schopnost vytvářet efektivnější nebo na určité bojové podmínky přizpůsobené jednotky může vyvolat obavy z vytváření biologických zbraní (Viktorius 2013).

Existuje také riziko, že genové inženýrství může být dostupné pouze určitým skupinám společnosti, což by mohlo vést k prohlubování sociálních nerovností. To vyvolává etickou otázku, jak zajistit spravedlivý a rovný přístup k těmto technologiím (Chadwik 2016).

1.4 Tkáňové vs Genové inženýrství

Oba přístupy mohou mít vliv na léčbu nemocí a zlepšování zdraví pacientů. I když genové inženýrství se zaměřuje na genetický materiál, zatímco tkáňové inženýrství pracuje s fyzickými tkáněmi a orgány. Genové inženýrství může být zaměřeno i na mikroskopickou úroveň v buňkách, zatímco tkáňové inženýrství se soustředí na vytváření makroskopických struktur. Oba tyto přístupy mohou spolupracovat v oblasti medicíny a výzkumu, například při vytváření geneticky modifikovaných buněk pro tkáňové inženýrství nebo využívání genových terapií pro léčbu onemocnění spojených s tkáněmi (Shpichka 2023, Bates C. 2012).

2 ZÁKLADY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství (TI) je interdisciplinární obor, který kombinuje znalosti a principy z oblastí inženýrství, biologie, materiálové vědy a lékařství, s cílem vyvinout nové metody a technologie pro vytvoření, náhradu nebo opravu biologických tkání a orgánů v lidském těle. Jeho hlavním záměrem je poskytnout pacientům trpícím tkáňovými defekty možnost obnovit funkce jejich poškozených nebo ztracených tkání, což může vést ke zlepšení jejich kvality života a snížení potřeby čekání na vhodné dárce orgánů nebo tkání (Langer, R., & Vacanti, J. P., 1993).

Cílem TI je konstruovat a kultivovat mimo lidský organismus živé, funkční tkáně nebo orgány pro následnou transplantaci pacientovi s cílem nahrazení nebo stimulace regenerace poškozených orgánů či tkání. Jinými slovy, na místě defektu by měla být obnovena trojrozměrná struktura tkáně. Vzhledem k tomu, že poptávka po transplantacích roste každým rokem, tradiční dárcovství není schopno zajistit všechny pacienty potřebující transplantaci (P. Sharma 2022). Kromě toho TI umožňuje snížit počet experimentů na zvířatech. Vše, co je potřeba k testování léků a kosmetiky, mohou vědci nyní vytvářet v laboratoři (Shpichka 2023).

Je důležité zdůraznit, že běžné implantáty z inertních materiálů mohou odstranit pouze fyzické a mechanické nedostatky poškozených tkání, na rozdíl od tkání získaných inženýrským způsobem, které obnovují také biologické (metabolické) funkce. Jinými slovy, dochází k regeneraci tkáně, nikoli pouhému nahrazení syntetickým materiálem (Bates C. 2012).

Nicméně pro rozvoj a zdokonalení metod rekonstrukční medicíny založených na TI je nezbytné správné navrhování nových vysoce biologických funkčních materiálů. Materiály používané pro bioimplantáty měly by se podobat živým tkáním a splňovat následující požadavky (Bates C. 2012):

- Podpora regenerace
- Biokompatibilita
- Schopnost udržovat krevní zásobování
- Adaptace jako reakce na okolní faktory, včetně mechanické zátěže.

2.1 Historie tkáňového inženýrství

TI jako disciplína začalo svoji historii v první polovině 20. století. Základem pro její vznik byly teoretické a praktické výzkumy vytváření "umělých" orgánů a tkání a práce v oblasti transplantace buněk a biologicky aktivních složek na nosičích k obnově poškození různých tkání v organismu (Langer R., Vacanti J.P., 1993).

Základní pochopení fungování lidských tkání vzniklo daleko dříve, než bychom mohli očekávat. Již v době neolitu byly švy používány k uzavírání ran a urychlení hojení. Později civilizace, jako například starověký Egypt, vyvinuly kvalitnější materiály pro šití ran, například lněné nitě. Přibližně kolem 2500 roku před naším letopočtem byly v dávné Indii vytvářeny kožní transplantáty odříznutím kůže z hýždí a jejich přišíváním k místům ran na uchu, nosu nebo rtech. Starověcí Egypťané často přesazovali kůži z těl na živé lidi, a dokonce se pokoušeli používat med jako antibiotikum a tuk jako ochrannou bariéru k prevenci infekce. V I. a II. století našeho letopočtu Gallo-Románci vyvinuli implantáty z kovaného železa (Gluchanová 2021).

S průběhem času a rozvojem technologií se TI neustále vyvíjelo. Na začátku lidé používali vzorky přímo z těl lidí nebo zvířat. Nyní má TI schopnost nahradit mnoho tkání v těle pomocí moderních metod, jako je například trojrozměrný biotisk v kombinaci s buňkami původních tkání (Gluchanová 2021).

V roce 1960 byli Vichterle a Lim prvními, kdo publikovali experimenty s hydrogely pro konstrukci kontaktních čoček. Během následujících dvou desetiletí se práce v této oblasti rozvíjely pomalu, ale později našly podporu, když byly hydrogely přepracovány pro cílené dodávání léků. V roce 1984 Charles Hall vyvinul biotisk, přeměňující inkoustovou tiskárnu Hewlett-Packard na zařízení schopné aplikovat buňky ve 2D (Gluchanová 2021).

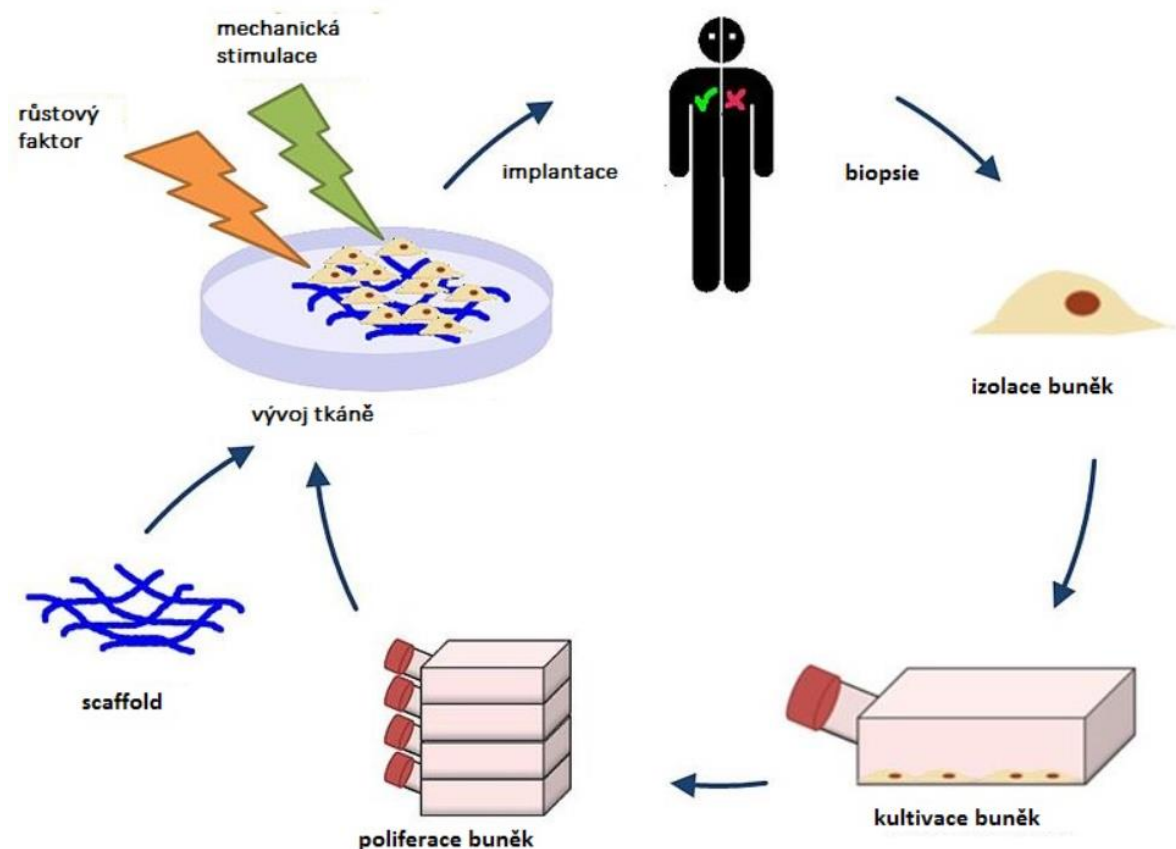
Jamese Thompson pracoval nad kultivací prvních linií lidských kmenových buněk v roce 1998 s následnou transplantací prvních v laboratoři syntetizovaných orgánů v roce 1999 a vytvořením prvního biotisku v roce 2003 na Univerzitě v Missouri. Také v Missouri se vědcům podařilo vytisknout mini-organoidy a orgány na čípech, což prakticky pomohlo

porozumět funkcím lidského těla. Farmaceutické společnosti doteď používají tyto modely k testování léčiv před přechodem k testování na zvířatech. Tým z University v Utahu vytiskl uši a úspěšně je přenesl dětem narozeným s vadami, kvůli kterým zůstaly uši částečně nedovyvinuté (Gluchanová 2021).

2.2 Základní pojmy a principy

V současné době jedna ze strategií tkáňového inženýrství je následující (obrázek 3) (Shpichka 2023):

1. Odběr a kultivace vlastních nebo dárcovských kmenových buněk.
2. Vývoj a navržení speciálního nosiče buněk (matrix) z biokompatibilních materiálů.
3. Aplikace buněčné kultury na matrix a proliferace buněk v bioreaktoru za specifických podmínek kultivace.
4. Přímé zavedení tkáňově inženýrské konstrukce do postižené oblasti orgánu nebo předběžné umístění v oblasti s dobře vyvinutým cévním zásobením pro dozrávání a formování mikrocirkulace uvnitř konstrukce neboli prefabrikace.



Obrázek 3 – Princip tkáňového inženýrství (WikiSkripta, projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlové).

Matrix se po určité době po implantaci do organismu hostitele zcela ztratí (v závislosti na rychlosti růstu tkáně), a na místě defektu zůstane pouze nová tkáň. Je také možné implantovat matrix s již částečně utvořenou novou tkání (biokompozit). Samozřejmě, po implantaci tkáňově inženýrská konstrukce musí zachovat svou strukturu a funkce po dobu dostatečnou k obnovení normálně fungující tkáně na místě defektu a integrovat se s okolními tkáněmi (Shpichka 2023).

2.2.1 Typy buněk v tkáňovém inženýrství

Výroba inženýrské tkáně *in vitro* vyžaduje použití buněk k osídlení matric a k produkci matrice připomínající přirozenou tkáň. Hlavní úspěchy v tomto oboru jsou získané díky použití primárních buněk, odebraných pacientovi pro použití ve spojení s nosiči k vytvoření tkáně pro opětovné zavedení. Tato strategie však má svá omezení kvůli invazivní povaze sběru buněk a možnosti, že se buňky nacházejí v nemocném stavu. Proto se pozornost zaměřila na použití kmenových buněk, včetně embryonálních kmenových (ES) buněk, mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeni (BM-MSCs) a mezenchymálních kmenových buněk z pupečnickové krve (UC-MSCs) (Howard et al., 2008).

2.2.1.1 Primární buňky

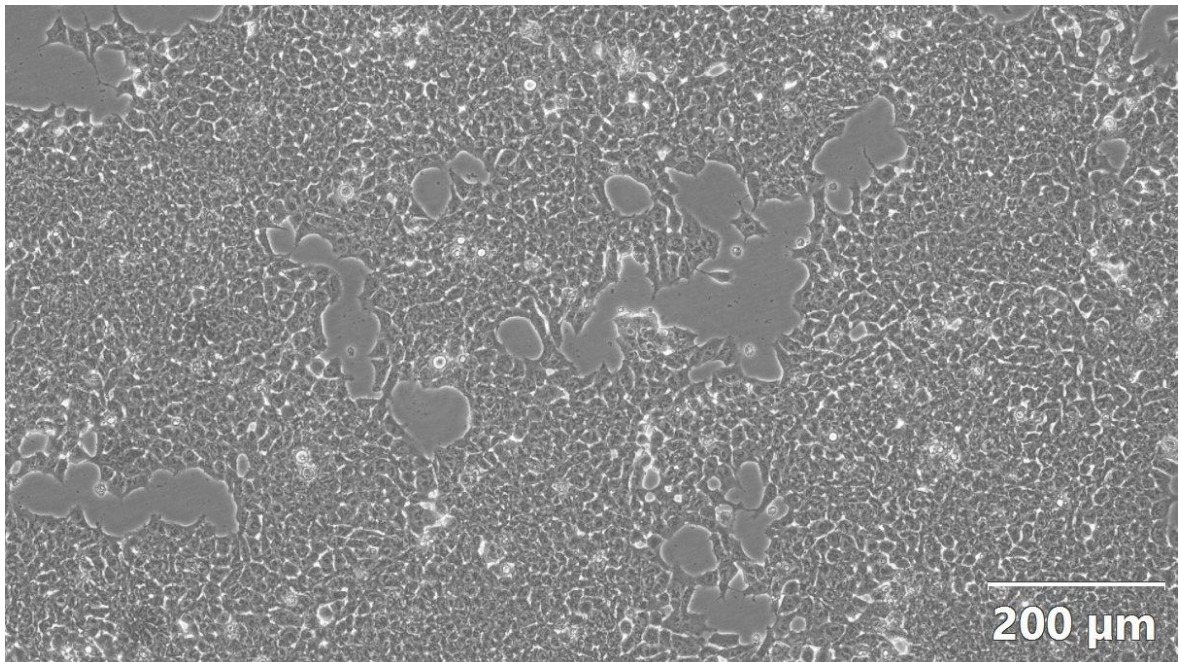
Primární buňky jsou zralé buňky konkrétního typu tkáně, které lze získat přímo z těla dárce (*ex vivo*) chirurgickým způsobem. Pokud jsou primární buňky odebrány od konkrétního organismu-dárce a je později potřeba je implantovat zpět do tohoto organismu jako příjemce, je pravděpodobnost odmítnutí implantované tkáně vyloučena, protože existuje maximální možná imunologická kompatibilita mezi prvními buňkami a příjemcem, takhle je zajištěna autogenita (Shpichka 2023).

Primární buňky mohou procházet dělením, ale velmi limitovaně – jejich potenciál k množení a růstu je nízký. Při kultivaci těchto buněk *in vitro* (prostřednictvím tkáňového inženýrství) může dojít k dediferenciaci některých typů buněk, což znamená ztrátu specifických individuálních vlastností. Například chondrocyty, které jsou zavedeny do kultury mimo tělo, často produkují fibrózní chrupavku namísto průhledné (Shpichka 2023).

Vzhledem k tomu, že primární buňky mohou ztratit své specifické vlastnosti, vznikla potřeba alternativních zdrojů buněk pro rozvoj technologií buněčného inženýrství. Jako alternativa k nim se staly kmenové buňky (Woollacott 2011).

2.2.1.2 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky (Obrázek číslo 4), které mají neomezenou schopnost dělení, samo obnovy a diferenciaci do různých typů specializovaných buněk pod vlivem konkrétních biologických stimulů (Chugunov 2009). Kmenové buňky jsou rozděleny do dvou hlavních kategorií: „dospělé“ (adultní) a „embryonální“. Embryonální kmenové buňky se vytvářejí z vnitřní hmoty embrya v rané fázi vývoje, zatímco dospělé kmenové buňky pocházejí z tkání dospělého organismu, jako je například pupečnicková krev, kostní dřeň, tuková tkáň nebo dokonce plodová tkáň (Woollacott 2011). Existuje ale etický problém spojený s nevyhnutelným zničením lidského embrya při získávání embryonálních kmenových buněk (Chugunov 2008).



Obrázek 4 – Morfologie embryonálních kmenových buněk myši (linie buněk ESR1) při zvětšení 100x, vlastní fotografie pořízená pomocí inverzního mikroskopu (Olympus).

Proto je preferováno získávání buněk z tkání dospělého organismu. Například v roce 2007 objevil Šindža Jamanaka (Shinya Yamanaka) z Univerzity v Kjótu v Japonsku indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC), které se získávají z kůže a dalších povrchových tkání člověka. iPSC jsou speciální typ kmenových buněk, které jsou vytvořeny přeměnou

dospělých buněk, obvykle kůže nebo krevních buněk, zpět na stav podobný embryonálním kmenovým buňkám. Tato přeměna je dosažena v laboratorních podmínkách obvykle za použití kombinace transkripčních faktorů, které jsou schopny reprogramovat diferencované buňky zpět na stav pluripotence. iPSC mají schopnost se neomezeně množit a diferencovat do různých typů buněk těla, což je dělá velmi užitečnými pro výzkum a lékařské aplikace. Jsou považovány za alternativu k embryonálním kmenovým buňkám, které vyvolávají etické a právní otázky (Obokata A Vacanti 2014). iPSC otevírají dosud nevídané možnosti pro regenerativní medicínu (Chugunov 2009).

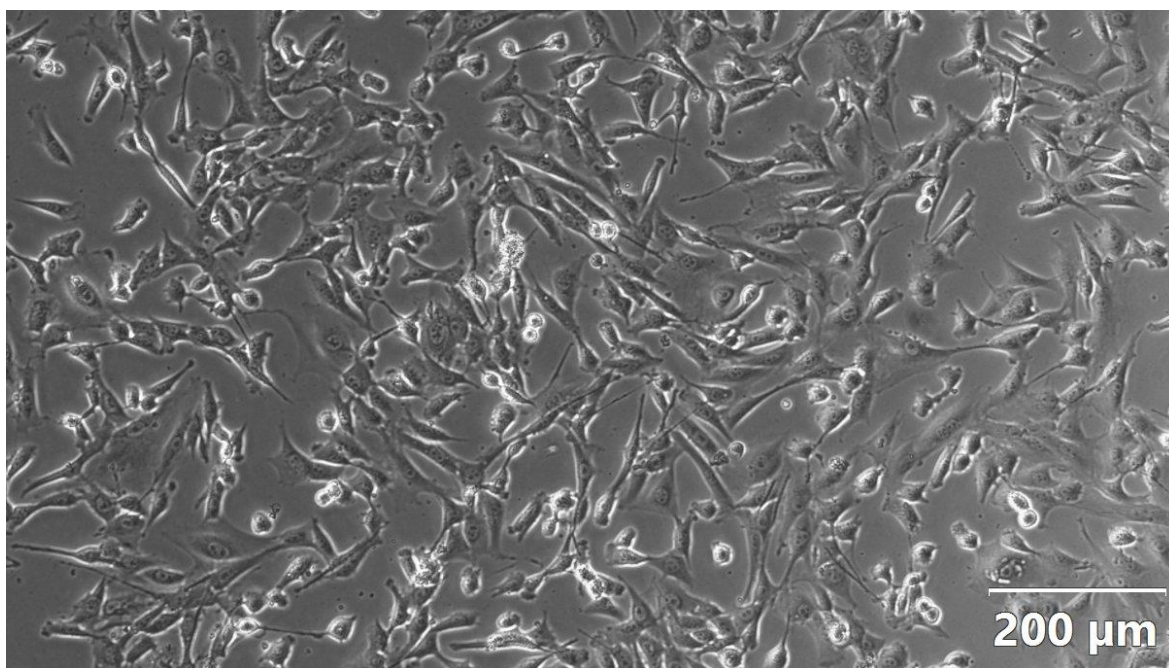
Další možností rozdělení kmenových buněk je na základě jejich diferenciačního potenciálu, pak je dělíme na **totipotentní**, **pluripotentní**, **multipotentní** a **unipotentní**. **Totipotence** je schopnost jedné buňky vytvořit jakýkoli typ diferencované buňky v organismu, zatímco **pluripotence** odkazuje na schopnost jedné buňky diferencovat se do buněk všech tří zárodečných vrstev embrya, ale ne do mimoembryonálních tkání. Nicméně, ve striktním slova smyslu, totipotence se odkazuje na schopnost jediné buňky vyvíjet se do organismu (Dang-Nguyen A Torres-Padilla 2015). Přechod od totipotence k pluripotenci je doprovázen změnami v metylaci DNA (Smallwood et. al., 2011), v modifikacích histonů jako je H3K27me3 a H3K4me3 a v aktivaci retrotransposonů (Santos et. al., 2005). Nicméně, jednou z nejvýraznějších vlastností během těchto stadií je aktivace nově vytvořeného genomu. Současně dochází k zásadním změnám v remodelaci chromatinu během tohoto klíčového vývojového období (Dang-Nguyen A Torres-Padilla 2015).

Multipotentní lidské kmenové buňky se nacházejí v mnoha tkáních těla, jako jsou svaly, chrupavka, kosti, nervový systém, játra a slinivka břišní. Sem řadíme například mezenchymální buňky (MSCs). MSCs mají schopnost diferencovat do různých buněčných typů, včetně osteoblastů (buňky kostí), chondrocytů (buňky chrupavky) a adipocytů (tukové buňky). Jsou klíčové pro proces regenerace a opravy tkání v těle. Mezenchymální buňky mohou modulovat imunitní odpověď tím, že ovlivňují aktivitu imunitních buněk (P. Sharma 2022).

2.2.1.3 Další typy buněk

Ačkoliv jsou kmenové buňky nejvíce diskutované v TI, setkáme se i s využitím již diferencovaných buněk, které plní svoji danou funkci. Výběr typu buněk se pak bude odvíjet od finální aplikace scaffoldu. Řadíme sem například:

- **Fibroblasty** – buňky, které hrají klíčovou roli při tvorbě pojivových tkání, jako jsou šlachy a vazy (Obrázek číslo 5). Fibroblasty jsou odpovědné za tvorbu extracelulární hmoty, která zahrnuje kolagen, elastin a glykoproteiny. Tyto látky poskytují pevnost, pružnost a strukturu tkáním. Fibroblasty mohou reagovat na signály z imunitního systému a zúčastňovat se imunitních reakcí, zejména při zánětlivých procesech. Diferencují do myofibroblastů, které mají vlastnosti hladkého svalstva a jsou klíčové pro kontrakci a smrštění tkání během procesu hojení (P. Sharma 2022).



Obrázek 5 – Myší embryonální fibroblasty (NIH/3T3), vlastní fotografie pořízená pomocí inverzního mikroskopu (Olympus). Zvětšení je 100x.

- **Endoteliální buňky** – tvoří vnitřní vrstvu cév a jsou klíčové pro tvorbu nových cévních struktur při tvorbě umělých cév nebo tkání. Endoteliální buňky tvoří bariéru mezi krví a okolními tkáněmi. Tato bariéra reguluje pohyb látek a buněk mezi krví a tkáněmi. Také hrají roli v regulaci průtoku krve tím, že kontrolují průměr cév a reagují na signály, které ovlivňují dilataci a kontrakci cév (Shpichka 2023). Endoteliální buňky jsou zodpovědné za tvorbu nových cév, což je proces známý jako

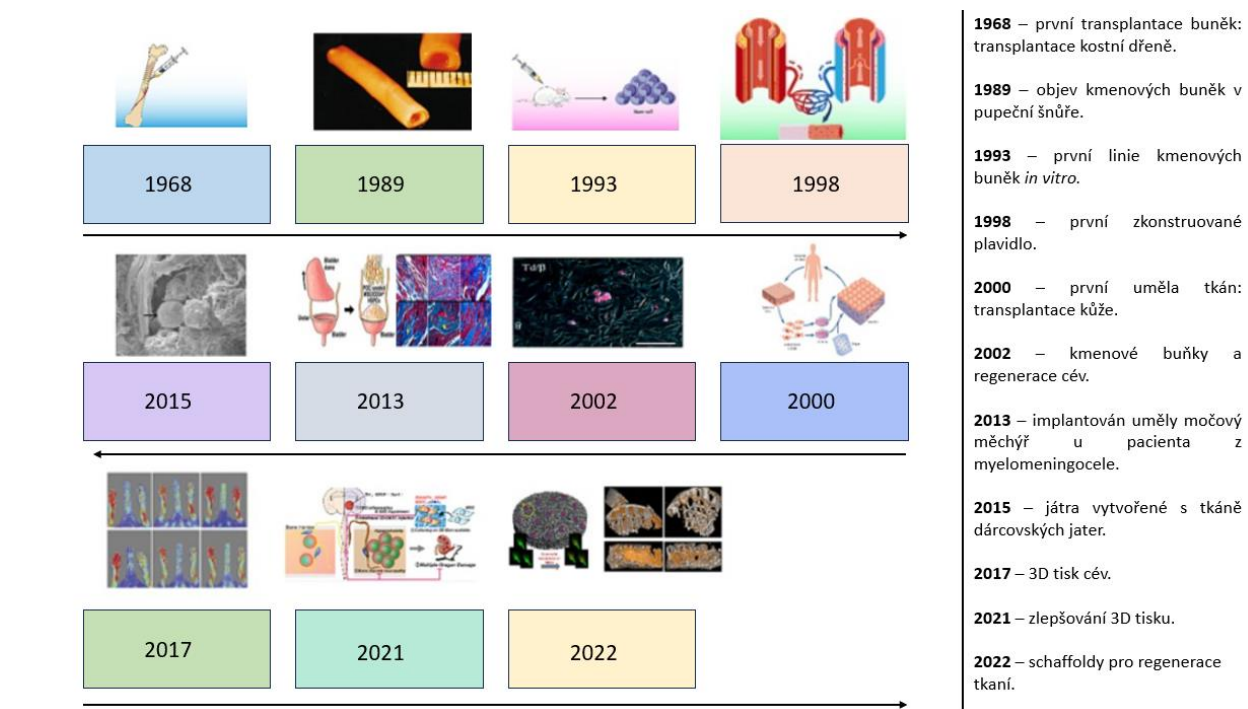
angiogeneze. Tato schopnost je důležitá při hojení ran a při růstu tkání. Endoteliální buňky tvoří vnitřní vrstvu cév a jsou uspořádány tak, aby vytvářely hladký povrch, který minimalizuje tření a odolává tvorbě krevních sraženin. Mají specifické přípojné proteiny a receptory, které umožňují komunikaci s okolními buňkami a regulaci různých fyziologických procesů (P. Sharma 2022).

- **Kardiomyocyty** – srdeční buňky, které jsou důležité pro vytváření umělého srdečního svalu. Kardiomyocyty jsou odpovědné za kontrakci srdce, což zajišťuje pumpování krve do celého těla. Mají vysoký obsah myofibril, což jsou struktury umožňující svalovým vláknům kontrakci. Kontrakce kardiomyocytů je řízena komplexním systémem iontových kanálů a signálních dráh. Kardiomyocyty jsou studovány v oblasti tkáňového inženýrství s cílem vytvořit funkční srdeční tkáň pro transplantace nebo modelování onemocnění (Shpichka 2023).
- **Kožní buňky** – buňky, které jsou používány pro vytváření umělých kůží nebo povrchových vrstev pro různé tkáňově inženýrské aplikace.
- **Hepatocyty** – buňky jaterní tkáně, které jsou důležité pro vytváření umělých jaterních tkání nebo orgánů (E. Woollacott 2011).

2.3 Aktuálnost a možnosti tkáňového inženýrství

TI představuje pokročilý přístup k léčbě pacientů, kteří utrpěli ztrátu nebo selhání tkáně nebo orgánu, s konečnými cíli obnovení tkáně a prodloužení očekávané délky života. Výzkumníci pracují na hledání alternativních řešení pro zvýšenou poptávku po orgánech kvůli nedostatku dárců a dalším lékařským omezením pro transplantace (Umar Aslam Khan et al., 2023).

TI se v posledních letech rozsáhle rozvíjí, a to nejen pro regeneraci tkání, ale také pro regeneraci orgánů (Obrázek 6).



Obrázek 6 - Zjednodušený časový přehled pokroku v technologii tkáňového inženýrství.
Vlastní obrázek, inspirováno (Yasaman et al., 2023).

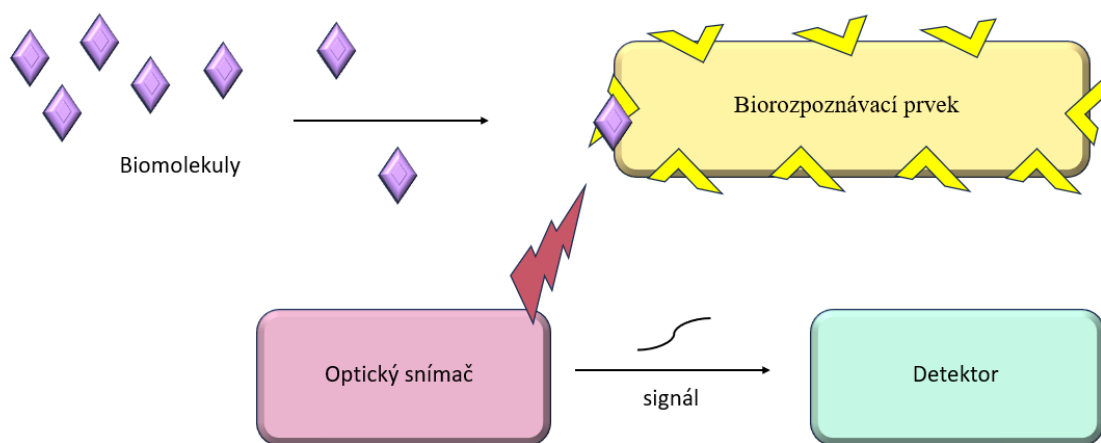
Biosenzory jsou užitečnými nástroji v oblasti TI, které jsou používány k monitorování a hodnocení stavu buněk a tkání během procesu regenerace nebo kultivace. Biosenzory jsou analytická zařízení umožňující detekci molekulárních interakcí a přeměnu těchto interakcí na detekovatelný elektrický signál. Biosenzory zahrnují kombinaci biologických prvků, jako jsou enzymy, DNA, RNA, metabolity, buňky, oligonukleotidy, transduktory, jako jsou elektrochemické, optické, piezoelektrické, akustické a kalorimetrické biosenzory. Schopnost přeměny biochemických interakcí do detekovatelné a kvantifikovatelné elektrické formy je klíčovým prvkem biosenzorů (Mehrotra 2016). Biosenzory získaly svůj význam díky nízkým výrobním nákladům, rychlé době odezvy, přenositelnosti, schopnosti kvantifikovat biologické prvky v nepatrném měřítku, vysoké specifitě a citlivosti (Solaimuthu et al., 2020).

DNA biosenzory byly vytvořeny na základě vlastnosti, že jednořetězcová nukleová kyselina je schopna rozpoznat a vázat se na svůj komplementární řetězec vzorku. Tato interakce je způsobena vytvořením stabilních vodíkových vazeb mezi oběma řetězci nukleových kyselin

(Wang 1998). Magnetické biosenzory: miniaturizované biosenzory detekující magnetické mikro a nano částice v mikrofluidních kanálech s využitím magnetorezistenčního efektu mají velký potenciál z hlediska citlivosti a velikosti (Scognamiglio et al., 2014). Piezoelektrické biosenzory existují ve dvou typech: kvartová mikrováha a povrchové akustické vlnové zařízení. Jsou založeny na měření změn rezonanční frekvence piezoelektrického krystalu v důsledku změn hmotnosti na struktuře krystalu (Mehrotra 2016).

Optický biosenzor je nejběžnějším typem biosenzorů kvůli jeho přímé detekci v reálném čase. Optické senzory převádějí světelnou energii na elektrické signály, které lze číst integrovaným detektorem. Hlavním cílem optického biosenzoru je produkovat signály ekvivalentní měřenému substrátu a získávat signály biosnímácím prvkem (biorozpoznávání), který interaguje s analytem a snímá světelnou interakci (optický převodník) a dále zesilovat signály, které lze číst detektorem (Solaimuthu et al., 2020).

Obrázek číslo 7 představuje schéma generování signálu optickým biosenzorem. Biorozpoznávací prvky se mohou pohybovat od enzymů, protilátek, buněk atd. Snímače používají k detekci signálů povrchovou plazmovou rezonanci (SPR), která vzniká v těsné blízkosti interakce analyt-biorozpoznávací prvek (Solaimuthu et al., 2020).

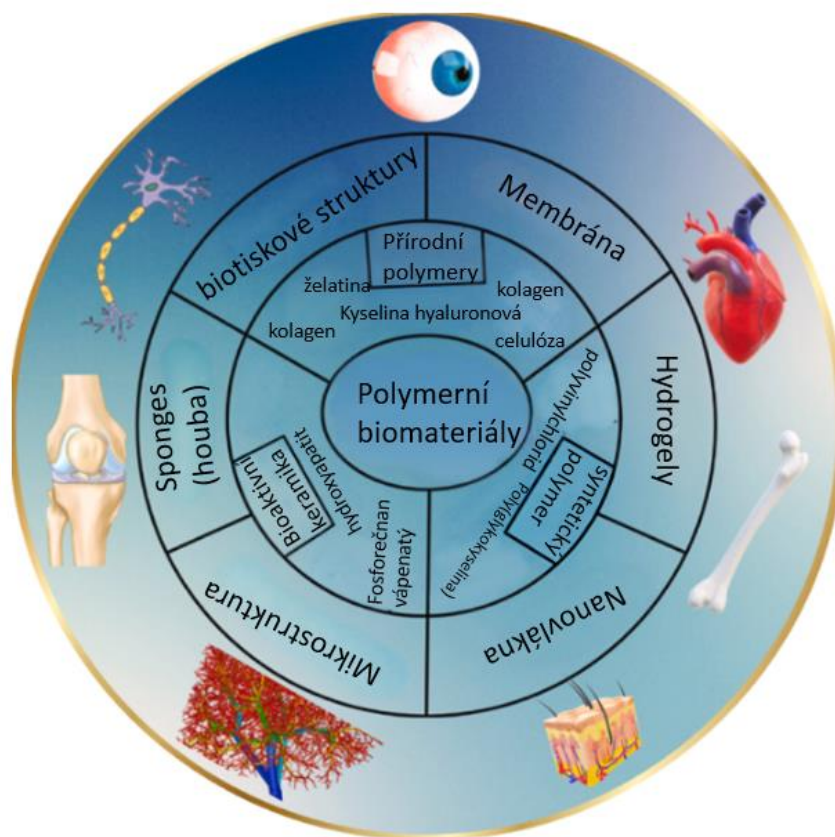


Obrázek 7 – Generování signálu optickým biosenzorem. Vlastní obrázek (Inspirováno Solaimuthu et al., 2020).

2.4 Typy materiálů využívané v tkáňovém inženýrství

2.4.1 Polymerní materiály

Polymerní biomateriály jsou stále oblíbené v aplikacích TI kvůli svým výhodným vlastnostem, jako je přizpůsobivá struktura, vynikající flexibilita, vrozená biokompatibilita, fyziologická aktivita, silná mechanická síla a příznivé biologické prostředí. Polymerní biomateriály mají několik aplikací v oblasti TI, včetně kostí, srdce, kůže, svalů, nervů, ústní dutiny a cév (Umar Aslam Khan et al., 2023) (obrázek č.8).



Obrázek 8 - Využití biomateriálů v tkáňovém inženýrství (přeloženo: Umar Aslam Khan et al., 2023).

Polymerní biomateriály jsou buď síťované nebo zpracované materiály, které mohou mít struktury rozpustné ve vodě. **Síťované polymerní biomateriály** jsou polymery spojené do trojrozměrné sítě pomocí chemických vazeb, což vytváří trvalé spojení mezi jednotlivými řetězci polymerů. Tato síťovaná struktura poskytuje materiálu větší stabilitu a mechanickou pevnost, mají také zlepšenou odolnost vůči degradaci a stabilitu ve srovnání s nesíťovanými polymerními materiály (Umar Aslam Khan et al., 2023). **Zpracované polymerní**

biomateriály jsou materiály, které díky své lineární, či rozvětvené struktuře mají formu rozpustou ve vodě. To znamená, že se mohou dispergovat ve vodě, což umožňuje snadnější interakci s biologickým prostředím, což je výhodné pro určité typy léčebných nebo diagnostických aplikací (Umar Aslam Khan et al., 2023).

Polymerní biomateriály mohou být vyvinuty z přírodních i syntetických polymerů. Také mohou být klasifikovány podle různých parametrů, včetně metody výroby, mechanických, strukturálních, fyzikálně-chemických a biologických charakteristik. Tyto materiály mají potenciální vlastnosti a odezvy, jako jsou teplota, pH, povaha iontů atd., s možnými aplikacemi v oblasti tělesného inženýrství (Liu 2023).

2.4.1.1 Biopolymery

Přírodní polymery získaly v posledních desetiletích značnou pozornost při výrobě biomateriálů v oblasti tkáňového inženýrství. Materiál je vybírán na základě jeho rozpustnosti, struktury, hydrofilnosti, povrchové morfologie, biodegradace a biokompatibility (Khan et al., 2022). Přírodní polymery byly použity k vytvoření biomateriálů pro asistenci s tkáněmi, jako jsou kosti, močový měchýř, chrupavka, rohovky, srdeční chlopně, nervy, slinivka břišní a kůže (Ullah a Chen, 2020). Produkty založené na přírodních polymerech jsou řízeně biodegradovatelné a mají laditelné fyziomechanické chování s žádoucí architekturou a konstrukcí v aplikacích TI. Syntetické polymery jsou oblíbené v oblasti tkáňového inženýrství v několika biomedicínských aplikacích kvůli jejich řízeným a optimalizovaným vlastnostem, jako jsou mechanické, povrchové, velikost pórů a objemové porozity. Nicméně syntetické polymery mají méně možností než přírodní polymery, pokud jde o podporu a udržení mikroprostředí hostitelské biomedicínské lokality. Přírodní polymery poskytují vynikající bioaktivní vlastnosti, které podporují interakci biomateriálu s buňkami a zvyšují účinnost buněk v biologickém systému (Umar Aslam Khan et al., 2023).

2.4.1.1.1 Alginát

Alginát je aniontový polymer, který obvykle pochází z hnědých mořských řas. Získal popularitu díky potenciálním vlastnostem, jako jsou biokompatibilita, cytokompatibilita, antibakteriální aktivita a gelace. Prošel rozsáhlým výzkumem a je používán v různých biomedicínských aplikacích (Safarin et al., 2023). Hydrogelem z alginátu lze vytvářet

různými technikami síťovanou strukturu, protože má strukturální podobnosti s extracelulární matrix (ECM) v biologických tkáních. Jeho gely umožňují mnoho aplikací při transplantaci buněk, léčbě ran a dodávání bioaktivních látek, včetně proteinových molekul, malých molekulových léků (Penglei Cui et al., 2023). Podporuje hojení tkání uchováním fyziologického mikroprostředí vlhkosti a snižováním bakteriálního růstu na místě poškozené tkáně. Gely z alginátu lze také aplikovat injekčně s minimální invazivitou nebo podávat ústně. Tyto techniky umožňují mnoho aplikací v oblasti TI a farmaceutiky (Chia et al., 2022).

2.4.1.1.2 Kolagen

Kolagen je přítomen v mnoha důležitých tkáních a orgánech, včetně kůže, kostí, krevních cév a srdcové tkáně, a často se využívá v oblasti TI pro rekonstrukce a opravy tkání (Bharat Charbe et al., 2022). Kolagen může ovlivňovat morfologii, adhezi, migraci a diferenciaci buněk. Má nízkou imunogenicitu, strukturu s významnou permeabilitou, vynikající biokompatibilitu a biodegradabilitu. Na základě svých vynikajících vlastností je vhodným biomateriálem pro nosiče TI (Pradyumna Kumar a Ganguly 2023). Když jsou kolagenové nosiče hydratované, ztrácejí svou mechanickou odolnost a strukturální stabilitu, což ovlivňuje tkáně, pro které mohou být použity. Fyzikálně nebo chemicky lze použít techniky k překřížení molekul kolagenu, čímž se zlepší mechanické vlastnosti nosiče. Nicméně bylo vyvinuto mnoho kolagenových biomateriálů, do kterých jsou začleněny další látky k zvýšení mechanické odolnosti kolagenových nosičů (Umar Aslam Khan et al., 2023).

2.4.1.1.3 Celulóza

Biomateriály vyrobené z celulózy a jejích derivátů mají zásadní biomedicínské vlastnosti, které zvyšují jejich význam ve srovnání s ostatními přírodními a syntetickými polymery (Ethan Li 2019). Je to biopolymer s všestrannými vlastnostmi díky své funkční úpravě, modifikaci a optimalizaci, což z něj činí potenciální materiál v biomedicínských aplikacích pro vývoj biomateriálů, které připomínají přirozenou ECM. (Hasanin 2022). Vytváří biokompatibilní mikroprostředí pro buňky, které podporuje adhezi, proliferaci, migraci a diferenciaci buněk. Může regulovat a funkcionalizovat tkáně, aniž by vyvolala jakoukoli reakci hostitele na místě tkáně hostitele (Hasanin 2022).

2.4.1.1.4 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je glykosaminoglykan přítomný v mezibuněčné tkáni má několik potenciálních biomedicínských aplikací, včetně substrátů pro kultivaci buněk a kosmetických výrobků (Ucm 2022). Její fyzikální a biologické vlastnosti, ať už ve formě roztoků nebo hydrogelů, jsou lákavé pro různé biomedicínské aplikace v oblasti opravy a regenerace tkání. Získává zájem v biomedicínských aplikacích díky své funkčnosti, mechanismu účinku a schopnosti vytvářet vhodné strukturované biomateriály (Sekar et al., 2023). Předchozí hodnocení kyseliny hyaluronové se zaměřovala na chemické úpravy, biologické procesy a lékařské použití, jako jsou viskosuplementace, léčba ran, cílení a dodávání léčiv (Umar Aslam Khan et al., 2023).

2.4.1.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery jsou uměle vytvořené makromolekulární látky, které mohou být použity v různých odvětvích, včetně biomedicíny a TI. Tyto polymery jsou vytvářeny chemickou syntézou a mají různé vlastnosti, které umožňují jejich použití v různých biomedicínských aplikacích, jako jsou nosiče léčiv, implantáty nebo nosiče pro TI. Mezi příklady syntetických polymerů patří polyethylenglykol (PEG), polyglykolidy (PGA), polykaprolakton (PCL) a polyvinylchlorid (PVC). Tyto polymery mohou být navrženy tak, aby měly určité vlastnosti, jako je biodegradabilita nebo biokompatibilita, podle konkrétních potřeb aplikace (Umar Aslam Khan et al., 2023).

2.4.1.2.1 Polyethylenglykol

PEG je syntetický a biodegradovatelný polymer, je rozsáhle studován pro potenciální aplikace v různých biomedicínských oblastech, TI a regenerativní medicíně. Je dobře známým biomateriálem díky svým výjimečným vlastnostem, včetně mimořádné flexibility, biokompatibility, hydrofilnosti a rozpustnosti ve vodě (Peng et al., 2020). Výroba třírozměrných nosičů, které usnadňují adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk kostní tkáně, může být dosažena pomocí hydrogelů na bázi PEG. Hydrogely mohou replikovat složení a strukturu ECM nalezené v kostní tkáni, usnadňující interakce buněk se nosičem a podporující regeneraci tkáně (Suamte et al., 2023). Hydrogely obsahující buňky mohou generovat bioaktivní molekuly a usnadňovat proces opravy kostní tkáně. Potahy na bázi PEG mohou být využity u lékařských implantátů a ortopedických zařízení. Tyto potahy zvyšují jejich biokompatibilitu a snižují pravděpodobnost imunitních reakcí a dalších souvisejících problémů (Oriňaková et al., 2022). Hydrogely na bázi PEG mohou být kombinovány s

různými látkami, jako jsou jiné polymery nebo keramika, k vytvoření kompozitních nosičů s vylepšenou biologickou a mechanickou funkcionalitou. Materiály nosičů na bázi PEG mohou mít širokou škálu molekulových hmotností, hustoty zesílení a dalších vlastností, které podporují opravu a regeneraci kostí (Umar Aslam Khan et al., 2023).

2.4.1.2.2 Polykaprolakton

PCL získal značný zájem v oblasti regenerace kostí a tkáňového inženýrství díky svým biodegradovatelným a biokompatibilním vlastnostem (Umar Aslam Khan et al., 2023). Výroba porézních nosičů s řízenými průměry pórů, mechanickými vlastnostmi a rychlostmi degradace může být provedena pomocí PCL. Tyto nosiče poskytují trojrozměrnou síť, která usnadňuje přilnavost, proliferaci a diferenciaci osteoblastů tvořících kosti a aktivujících regeneraci tkáně (Chen et al., 2023). Nosiče na bázi PCL jsou často kombinovány s jinými materiály (polymery, kovové nanočástice a keramika), aby se zvýšily jejich biomechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Jejich tuhost a tahová pevnost mohou být upraveny tak, aby splňovaly mechanické požadavky cílové kostní tkáně (Rezania et al., 2022). PCL může obklopovat kmenové nebo osteoblastové buňky, což vede ke vzniku struktur bohatých na buňky, které podporují regeneraci tkáně (Valizadeh et al., 2022). Lee a kolegové syntetizovali tisknutelný polymerní kompozitní materiál z PLA/ β -trikalciumfosfátu k vytvoření 3D nosiče pro tkáňové inženýrství kostí. (Lee et al., 2020).

2.4.1.2.3 Polyglykolová kyselina

PGA je biodegradovatelný polymer s potenciálem pro aplikace regenerace a opravy kostí. Stala se předmětem rozsáhlého výzkumu a využívání v biomedicínských a tkáňových inženýrstvích. Pravidelně se kombinuje s jinými materiály (polymerů a keramiky), aby se zlepšily mechanické vlastnosti PGA, takové jako je například elasticita, rozpustnost ve vodě a pevnost. Lze ji použít k výrobě porézních nosičů s řízenými velikostmi pórů a mechanickými vlastnostmi (Eun Song et al., 2023). Tyto nosiče poskytují dočasný rámec pro přilnutí, růst a tvorbu nové tkáně kostí a pak se rozkládají na glykolovou kyselinu jako vedlejší produkt. Ačkoliv je PGA velmi křehká, její mechanické vlastnosti lze upravit začleněním jiných materiálů do syntetizovaných kompozitů, které připomínají vlastnosti přirozené kostní tkáně. Byla použita pro buněčnou terapii k obalení osteoblastových buněk a injekci do defektních oblastí k podpoře regenerace tkáně (Kunwong et al., 2021). Shuai a kolegové vyrobili bioaktivní nosič z PGA/HAP/poly-l-laktidu (PLLA) se zvýšenou degradací, bioaktivitou a osteogenezí. Také uvedli, že nosiče podporovaly biomineralizaci,

životaschopnost a proliferaci buněk a jsou potenciálními materiály pro regeneraci kostí a kostních aplikací (Shuai et al., 2021).

2.4.2 Bioaktivní keramika

Výroba biomateriálů pro TI, včetně měkkých a tvrdých tkání, zahrnuje aktivní reakci bioaktivní keramiky. Jako aktivní reakce chápeme schopnost materiálu vyvolávat specifické biologické odpovědi nebo interakce v těle, což následovně ovlivní procesy hojení a regenerace tkání a buněk. Bioaktivní keramika interaguje s biofluidy, aby podporovala fyziologické interakce se zvýšenou buněčnou aktivitou. Často používanými bioaktivními materiály jsou hydroxyapatit (HAp), tricalcium fosfát (TCP), skelná keramika a bioaktivní skla jako silikátová a fosfátová skla. Jejich často nedostatečná biokompatibilita a biodegradabilita však omezují jejich potenciál pro aplikaci v klinickém prostředí. Tyto obtíže lze překonat kombinací polymerů nebo použitím kompozitních materiálů, které zlepšují vlastnosti nosiče a umožňují regulovaný rozklad a biologickou kompatibilitu v aplikacích TI. Metodou dosažení konstruované a biologické účinnosti v tvrdých tkáních a měkkých tkáních je výroba polymerních kompozitů s využitím přírodních polymerů a anorganické bioaktivní keramiky (Umar Aslam Khan et al., 2023).

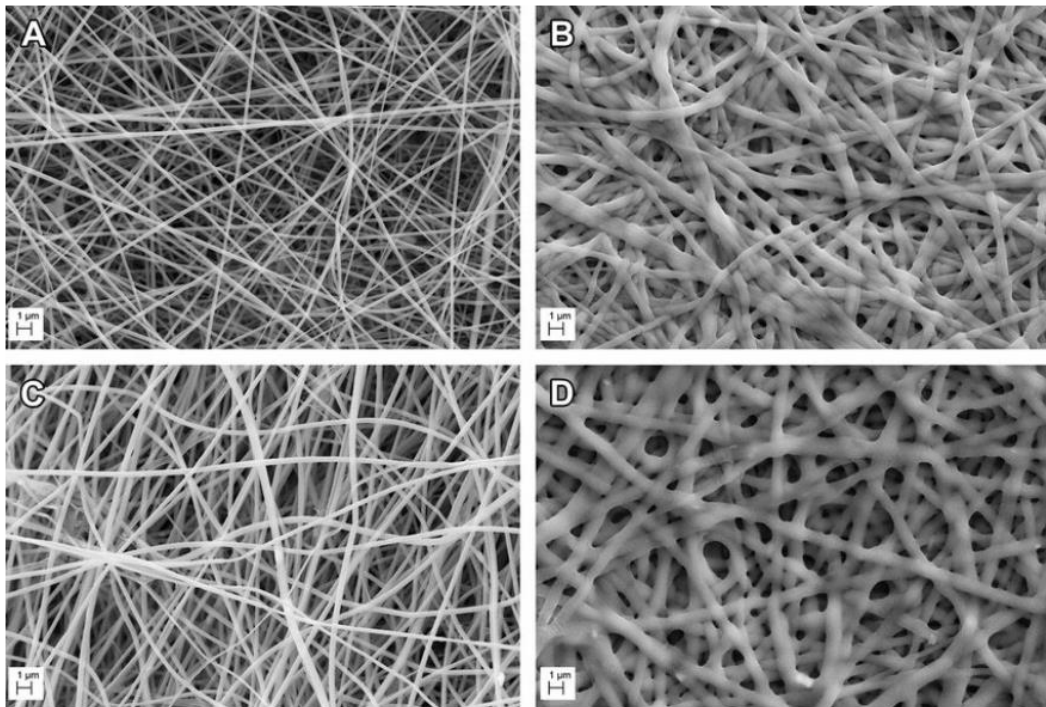
2.4.3 Kovy

Kovy mají v tkáňovém inženýrství několik aplikací a využití, zejména při výrobě implantátů a lékařských prostředků. Kovové materiály, jako je nerezová ocel, titan, kobalt-chromové slitiny a další, jsou běžně používány jako materiál pro výrobu ortopedických implantátů, jako jsou umělé klouby, šrouby, hřebíky a destičky. Některé speciální kovy, jako je hořčík, jsou biodegradovatelné a mohou být použity pro výrobu dočasných implantátů, které se postupně rozkládají a nahrazují se tkáněmi během hojení. Metal-organic frameworks (MOFs) jsou třírozměrné krystalické struktury vytvořené silnými interakcemi mezi kovovými ionty a organickými spojovacími. Pravidelné póry a ultravysoká pórovitost jsou nejdůležitějšími vlastnostmi těchto sloučenin. Tyto významné vlastnosti umožnily MOFs být používány v různých oblastech, jako je technologie senzorů, katalýza, separace plynů a lékařské aplikace. MOFs lze snadno připravit pomocí mechanochemických, sonochemických, elektrochemických a solvochemických postupů (Reza Ramezani et al., 2019).

V posledních letech došlo k rychlému nárůstu použití nanoMOFs nanomateriálů v biosenzorech, biozobrazování, podávání léků, genové terapii. Navíc nanoMOFs získaly velkou pozornost mezi vědeckou komunitou v oblasti regenerativní medicíny a TI. Studie také prokázaly, že nanoMOFs poskytují kmenovým buňkám vodící signály ke zlepšení jejich adheze, proliferace a diferenciaci směrem k požadovaným typům buněk. Modifikace biomateriálů s MOFs a nanoMOFs vede ke změně fyzikálně-chemických vlastností nosičů, včetně hrubosti, funkčních skupin, porézní struktury a hydrofilicity, což jsou pravděpodobně hlavní důvody pro podporu adheze buněk a jejich odpovědi. Kromě toho mohou nanoMOFs sloužit jako nosiče pro zatížení růstovými faktory nezbytnými pro diferenciaci buněk a antibiotiky pro inhibici infekce. Začlenění nanoMOFs s nosiči vede k vyšší kapacitě zatížení léčiva než pouhý polymerní nosič díky vysokému povrchu a vynikající pórovitosti nanoMOFs (Asadniaie Fardjahromi et al., 2022).

2.5 Scaffoldy

Pro organizace, podporu růstu a diferenciaci buněk při procesu rekonstrukce poškozené tkáně je nezbytný speciální nosič buněk – matrix, což je trojrozměrná síť podobná houbě (obrázek 9). K jejich vytvoření se používají biologicky inertní syntetické materiály, materiály založené na přírodních polymerech (chitosan, alginát, kolagen) a biokompozity. Ve TI se 3D struktury, scaffoldy, používají jako nosiče buněk a matrice pro vytvoření tkáňových náhrad. Tyto scaffoldy poskytují fyzickou podporu pro buněčný růst a umožňují těmto buňkám vytvořit třírozměrné tkáňové struktury, které mají podobné vlastnosti jako přirozená tkáň v těle. Například ekvivalenty kostní tkáně jsou získány směrovanou diferenciací kmenových buněk kostní dřevě, pupečnickové krve nebo tukové tkáně na osteoblastech, které jsou pak aplikovány na různé materiály, které podporují jejich dělení (například dárcovská kost, kolagenové matrix atd.) (Shpichka 2023).



Obrázek 9–A) síťované (B) dBECM-gelatin (C) síťované dBECM-gelatin (D) rohože (Baiguera, S., et al., 2014).

Intuitivně by nejlepším scaffoldem pro upravenou tkáň mělo být ECM cílové tkáně v jejím nativním stavu. Nicméně mnoho funkcí, komplexní složení a dynamická povaha ECM v nativních tkáních ztěžují přesné napodobení. Současným konceptem scaffoldu v TI je proto alespoň částečně napodobovat funkce nativního ECM (Chan a Leong 2008).

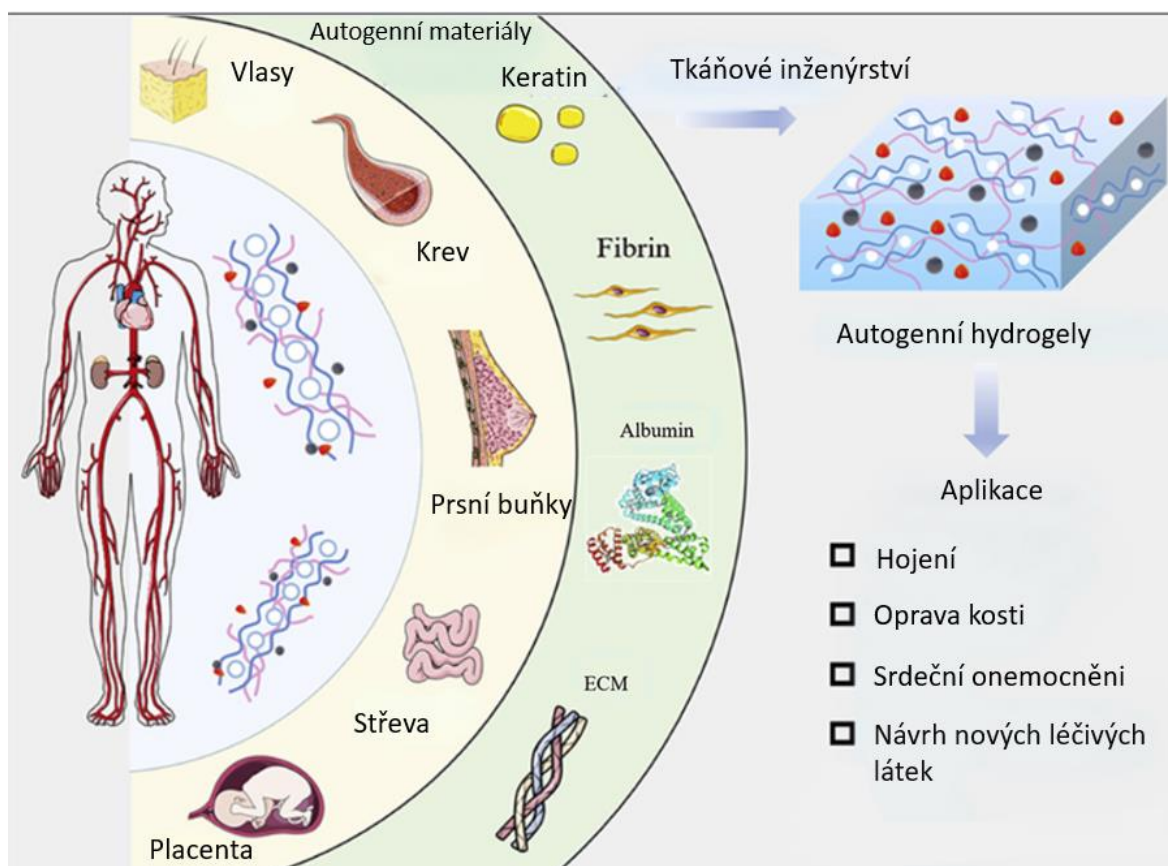
Scaffoldy by měly poskytovat prázdný objem pro vaskularizaci, tvorbu nové tkáně a remodelaci, aby se usnadnila integrace hostitelské tkáně po implantaci. Biomateriály by měly být zpracovány tak, aby poskytly dostatečně porézní strukturu pro účinný transport živin a metabolitů, aniž by došlo k významnému ohrožení mechanické stability scaffoldu. Kromě toho by biomateriály měly být také degradovatelné po implantaci, rychlost odpovídající rychlosti produkce nové vyvíjející se tkáně (tabulka 1) (Chan a Leong 2008).

Tabulka 1: Funkce ECM v nativních tkáních a scaffoldu v uměle vytvořených tkáních (upraveno dle Chan a Leong 2008).

Funkce ECM v nativních tkáních	Analogické funkce scaffoldů v uměle vytvořených tkáních	Architektonické, biologické a mechanické vlastnosti scaffoldu
Poskytuje strukturální podporu (kostru) buňkám.	Poskytuje strukturální podporu pro exogenně aplikované buňky, aby se mohly připojit, růst, migrovat a diferencovat <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> .	Biomateriály s vazebnými místy pro buňky; porézní struktura pro migraci buněk a pro difúzi živin; dočasná odolnost vůči biodegradaci po implantaci.
Přispívá k mechanickým vlastnostem tkání	Poskytuje tvarovou a mechanickou stabilitu tkáňovému defektu a dodává tuhost a pevnost upraveným tkáním.	Biomateriály s dostatečnými mechanickými vlastnostmi vyplňují prázdny prostor defektu a simulují tkáň.
Poskytuje bioaktivní podněty buňkám, aby reagovaly na své mikroprostředí.	Aktivně interaguje s buňkami a usnadňuje činnosti, jako je proliferace a diferenciace.	Biologické podněty, jako jsou buněčná adhezivní vazebná místa; fyzické podněty, jako je topografie povrchu.
Působí jako rezervoáry růstových faktorů a potencuje jejich působení.	Slouží jako transportní prostředek a rezervoár pro exogenně aplikované faktory stimulující růst.	Mikrostruktury a další maticové faktory zadržující bioaktivní látky v scaffoldech.
Poskytuje flexibilní prostředí umožňující remodelaci v reakci na dynamické procesy tkáňe, jako je hojení ran.	Poskytuje objem pro vaskularizaci a tvorbu nové tkáňe během remodelace.	Porézní mikrostruktury pro difúzi živin a metabolitů; maticový design s řízenými degračními mechanismy; biomateriály a jejich degradované produkty.

2.5.1 Autogenní scaffoldy

Biomateriály používané jako nosiče v tkáňovém inženýrství hrají klíčovou roli jako nezávislá terapie při aplikacích regenerace tkání. Avšak syntetické štěpy, xenografty a allografty jsou v lidském těle vnímány jako cizí materiály, což může vést k suboptimálním klinickým výsledkům. Nedávno se začaly uplatňovat autologní materiály z těla pacienta, což získává velkou pozornost v klinickém ošetření a tkáňovém inženýrství. V rámci tkáňového inženýrství má personalizovaná medicína za cíl vytvářet tkáně nebo orgány, které jsou specificky přizpůsobeny genetickým charakteristikám konkrétního pacienta. Tato oblast může v budoucnosti hrát klíčovou roli v léčbě nemocí a poskytování individuálně přizpůsobených léčebných postupů. Navíc autologní nosiče vybavené výhodami tkáňově podobných hydrogelů mají velký potenciál stát se vysoce všestranným nástrojem v podobě personalizovaných hydrogelů pro aplikace ve 3D buněčné kultuře a tkáňovém inženýrství, příklady využití a získání personalizovaných hydrogelů jsou znázorněny na obrázku číslo 10 (Kong et. al., 2021).



Obrázek 10 – Schéma ilustrující zdroj (tkáň/orgány) personalizovaných hydrogelů a jejich využití v oblasti tkáňového inženýrství a reparace (upraveno dle Kong et. al., 2021).

Začíná to analýzou genetického materiálu pacienta. Na základě genetických informací lze pak vytvářet tkáně nebo orgány, které nejen plní potřeby pacienta, ale také pro minimalizaci rizika odmítnutí transplantátu a zvýšení úspěšnosti chirurgického zákroku. Personalizovaná medicína umožňuje lékařům přizpůsobit léčbu každému pacientovi individuálně. To znamená, že léčba může být lépe cílena na konkrétní molekulární nebo genetické charakteristiky onemocnění (Kong et. al., 2021).

2.5.2 Výrobní technologie

Existuje několik metod výroby scaffoldu (Ponamarev 2015):

- **Elektrospinning** – proces, při kterém jsou vlákna z polymerového roztoku vytahována elektrostatickým polem na substrát, kde vytvářejí síťovou strukturu. Tato metoda umožňuje vytvoření tenkých vláken s vysokou povrchovou plochou, což je ideální pro podporu buněčného růstu.
- **Solvent casting (lícování rozpouštědlem)** – rozpuštění polymeru ve vhodném rozpouštědle za vzniku homogenního roztoku. Tento roztok je poté přelit na plochu podložku a následně dochází k odpaření rozpouštědla, tímto vznikne polymerová vrstva. Tato vrstva může být následně zpevněna nebo upravena podle potřeby.
- **Vyluhování částic** – vytvoření porézní struktury v polymeru pomocí částic, které jsou rozpustné nebo odstranitelné. Nejprve se přidají částice (například soli nebo jiné materiály) do polymerového roztoku. Poté, co je vrstva přelita a ztuhne, částice jsou buď vyluhovány nebo odstraněny z polymeru, čímž vznikají dutiny a póry.
- **Fázová separace** – vytvoření pórů v scaffoldech pomocí rozdílných rozpustností složek v polymerovém roztoku. Po ztuhnutí polymeru se nerozpustné fáze odstraní, čímž vzniknou porézní struktury.
- **3D tisk** – přesné vytváření 3D struktur pomocí postupného nanášení materiálu vrstva po vrstvě. Tato metoda poskytuje kontrolu nad geometrií a vnitřní strukturou scaffoldu, což je důležité pro specifické aplikace v tkáňovém inženýrství. Tuhle metodou byl připraven materiál z polycaprolaktonu (PCL) a polyvinylidenfluoridu (PVDF), který byl testován v praktické části práce. Proto bude tato metoda v následujících kapitolách rozepsána podrobněji.

2.5.2.1 3D biotisk bez buněk

Trojrozměrný (3D) biotisk, je špičková technologie pro vytváření biologických struktur s hierarchickou architekturou podobnou těm přirozeným. Vývoj živých funkčních tkání umělým způsobem může vyřešit nesplněnou potřebu v oblasti nahrazování tkání a transplantací orgánů. S tímto pohledem získává biotisk ohromnou akceptaci od lékařů a výzkumníků po celém světě s cílem zlepšit životy pacientů postižených nemocemi (Matai 2020).

Technologie 3D tisku umožňuje vytvářet objekty z plastu nebo kovu, ale pro biologické struktury, jako jsou srdce nebo cévy, jsou potřebné speciální měkké materiály. To představuje výzvu pro tradiční vrstevnatý tisk, protože základem pro nanášení následující vrstvy materiálu musí být předchozí vrstva. Vhodné materiály pro biomedicínu, jako je kolagen a fibrin, se usazují pod svou vlastní váhou. Nyní však vědci našli způsob, jak tento problém obejít, a to pomocí speciálního gelu na bázi mikročástic želatiny. Tento biokompatibilní materiál s nízkým mechanickým odporem zůstává dostatečně hustým. Jako vzorek byly použity detailní 3D obrazy cév a srdce získané pomocí magnetické rezonance (Ponamarev 2015).

3D tiskárna nanáší materiál vrstvu po vrstvě, a v určitých místech se vrstvy chemicky spojují. Nicméně stojí za zmínku, že pro nejmenší kapiláry nejsou třírozměrné tiskárny dostatečně přesné. V této souvislosti se používá metoda multiphotonové polymerizace, která se používá v polymerním průmyslu. Krátké intenzivní laserové impulsy, které zpracovávají materiál (uhlíkový nanovláknitý fotopolymer), tak silně excitují molekuly, že vzájemně interagují a spojují se do dlouhých řetězců. Tímto způsobem se materiál polymerizuje a stává se pevným, ale elastickým, podobně jako přírodní materiály. Tyto reakce jsou tak řízené, že s jejich pomocí lze vytvářet nejjemnější struktury podle trojrozměrného "náčrtu" (Peshkova 2019).

2.5.2.2 3D biotisk s buňkami

Hlavní výhodou buněčného 3D biotisku je prostorové uspořádání živých buněk v přesně strukturované 3D hydrogelové matici napodobující původní tkáň nebo orgán. Nicméně nepravidelné a nekontrolované rozložení buněk v hydrogelovém bioinku může vést k nerovnoměrné regeneraci tkáně ve 3D rozsáhlých nebo komplexních nosičích s rozdílem v biologických a mechanických vlastnostech v konečných fázích (Bhattacharyya et al., 2021).

Dosáhnout homogenity složení matrixu při výrobě rozsáhlých nosičů a jeho biomechanických vlastností je velkou výzvou v oblastech tkáňového inženýrství a 3D biotisku. I když 3D biotisk nabízí možné řešení pro přesné rekonstrukce vrstvených tkáňově inženýrských struktur, komplexní rekonstrukce tkáně bez toxického křížového vazebního činidla je obtížnější dosáhnout pomocí jednoho materiálu (Ravanbakhsh et al., 2021). Požadovaných biomechanických vlastností je dosaženo použitím bioinku, který obsahuje více složek, jako jsou polymery tvořící hydrogel, bioaktivní mikro/nanopartikuly a biomolekuly společně s buňkami tvořícími tkáň (Bhattacharyya, Janarthanan a Noh, 2021). Navíc je vyžadován *in situ* a kontinuální biotisk k minimalizaci poškození buněk během dlouhého tiskového procesu (Bhattacharyya 2023).

3D tisk orgánů s tryskovým systémem probíhá následujícím způsobem: biologický materiál je uchováván v kartridžích, které jsou rozprašovány na hydrogelový substrát. Tato metoda je náchylná k možnému nepřesnému výstřiku kapek a ucpání rozprašovače, což může vést k ztrátě buněčného materiálu. Tenhle způsob není vhodný pro viskózní materiály. Tato metoda se nejčastěji používá k obnově tkání, jako jsou kosti, chrupavka, svaly a kůže (Bhattacharyya 2023).

3D tisk orgánů pomocí mikroextruze: tato metoda se používá při tisku orgánů a využívá mikroextruzi. Materiál je přiváděn pneumaticky do pohyblivé hlavy extruderu, která pevně ukládá buňky. Oproti tryskovému tisku zahyne při této metodě více buněk. Mikroextruze se využívá zejména při 3D tisku orgánů s vysokou hustotou, a lze jemně naladit podávání materiálu pomocí regulace tlaku (Bhattacharyya 2023).

2.5.2.3 Příklady využití 3D biotisku

V TI jsou buňky vysévány do 3D nosičů vyrobených z přírodních, syntetických nebo smíšených složek, aby vytvořily konkrétní tkáň s konečným cílem implantace do těla k obnovení funkce u pacientů. Například pro systém srdce na nosiči (Gu et al., 2024). Vysoká úmrtnost z důvodu srdečního selhání vyžaduje účinné terapeutické strategie a *in vitro* kardiologické modely (Zhang et al., 2021). Moderní přístupy v TI srdeční tkáň dosáhly pokroků ve vývoji vysoce spolehlivých a fyziologicky relevantních *in vitro* kardiologických modelů, aby porozuměly fyziologickým/patologickým mechanismům srdce a urychlily farmakologický výzkum týkající se srdce. V posledních letech byly *in vitro* kardiologické

modely kombinovány s technologiemi lab-on-a-chip, což podporuje růst systémů srdce-nosič (Ma et al., 2021). Systémy srdce-nosič jsou hlavně složeny z mikrofluidních čipů a kardiálních tkání na nosiči. Mikrofluidní nosič umožňuje vytváření požadovaných *in vitro* mikroprostředí, včetně kontrolovaného kultivačního média a dodávky plynu, aby podporoval a reguloval kardiální mikrotkaně na nosiči dynamickým způsobem (Bhatia a Ingber 2014). Režim kultivace na vyžádání poskytovaný systémy srdce-nosič umožňuje přesné reprodukování procesů vývoje srdce a progresu onemocnění *in vitro*. Navíc jsou vynaloženy významné úsilí na integraci různých biosenzorů do systémů srdce-nosič pro online monitorování fyziologických, patologických a farmakologických reakcí v kardiálních tkáních na nosiči. Sledování v reálném čase je slibné pro přesný sběr informací o událostech probíhajících v kardiálních tkáních na nosiči na úrovni buněk (mechanické, elektrické a biochemické chování) (Gu et al., 2024).

Jako další příklad použití biotisku lze uvést vytváření cév. Aby vytvořené cévy mohly interagovat s buňkami organismu, jsou do nich integrovány modifikované biologické struktury (například heparin) a proteiny potřebné pro ukotvení materiálu. Na dalším stupni jsou do systému vytvořených "trubiček" připojeny endotelové buňky (jednovrstevný plášť plochých buněk, vyplňující vnitřní povrch krevních cév) - aby se složky krve nelepily ke stěnám cévního systému a zároveň se volně po něm přepravovaly (Peshkova 2019).

3 STATICKÁ KULTIVACE

Statická kultivace se využívá při pěstování buněk a tkání bez mechanického míchání nebo proudění média. V oblasti TI se jako první pro statickou kultivaci začal využívat tkáňový plastik jako jsou například Petriho misky, lahve T75 a další nádoby, ve kterých jsou buňky a kultivační médium umístěny v nepohyblivém stavu. V těchto systémech jsou buňky umístěny v uzavřeném prostoru, který poskytuje optimální podmínky pro růst, včetně teploty, vlhkosti a koncentrace CO₂. Statická kultivace je často využívána v malých měřítkách, například pro výzkumné účely. Tento přístup může být výhodný pro studium specifických biologických procesů nebo pro získání tkání s vyššími organizačními vlastnostmi. Nicméně statická kultivace může být omezená v rychlosti růstu a difuzi živin, zejména u větších objemů kultur. Pro větší objemy nebo pro zajištění lepších podmínek pro buněčný růst a diferenciaci se často upřednostňuje dynamická kultivace s aktivním mícháním nebo průtokem média (Kanda et al., 2016).

Zásadním přínosem kultivace za statických podmínek na tkáňovém plastiku je její široká dostupnost na komerčním trhu a jednoduchá manipulace. Uplatnění najdeme při provádění vysoce kapacitního screeningu farmakologických složení. Schopnost poskytnout stabilní a reprodukovatelné podmínky kultivace je klíčová pro efektivní hodnocení biologické aktivity testovaných látek. Tímto způsobem statické kultivace přispívá k rychlému a systematickému vývoji nových léčivých přípravků a farmakologických terapií (Kanda et al., 2016).

Při statické kultivaci mají buňky stabilní přísun živin, vzduchu, stabilní teplotu a vlhkost a jsou obvykle subkultivovány za stejných podmínek. Nicméně, tyto podmínky se výrazně liší od těch, které panují v těle (*in vivo*). Většina studií prováděných s trojrozměrným (3D) kultivačním systémem stále využívá statické podmínky. Buňky v těchto systémech přežívají pouze díky metabolizaci živin a kyslíku, protože jim chybí mechanická stimulace a dostatečné smykové napětí tekutin (Wong et al., 2019). Pro napodobení co nejpřirozenějšího prostředí *in vivo* v *in vitro* podmínkách je vhodné využívat dynamickou kultivaci, které bude věnována následující rozsáhlá kapitola.

4 DYNAMICKÁ KULTIVACE

Dynamická kultivace představuje proces pěstování buněk v kultivačním prostředí, kde dochází k neustálému pohybu nebo míchání kultivačního média. Míchání pomáhá udržovat homogenitu kultivačního média, což zajišťuje rovnoměrné rozložení živin a kyslíku pro buňky. Pro získání trojrozměrného funkčního tkáňového štěpu je statická kultivace neúčelná kvůli omezením v hustotě buněk, výživě a podpoře kyslíku. Dynamická kultivace v bioreaktorovém systému může překonat tato omezení, a navíc poskytnout možnost řídit prostředí s ohledem na pH, obsah kyslíku a teplotu (Diederichs et al., 2009).

Dynamická kultivace nabízí několik výhod oproti statické kultivaci, například dynamické prostředí napodobuje fyziologické podmínky v těle lépe než statická kultivace, což může vést k lepší diferenciaci buněk a vývoji specializovaných buněčných funkcí. Také nepřetržité míchání v kultivačním médiu zlepšuje interakce mezi buňkami a mezi buňkami a extracelulární matrix, což je důležité pro tvorbu tkání a orgánů (Diederichs et al., 2009).

4.1 Bioreaktory v tkáňovém inženýrství

Bioreaktory umožňují měřitelný posun od laboratorního výzkumu směrem k průmyslové produkci, a to vše zahrnuje možnost měnit objemy produkce od malých vzorků na laboratorním stole až po masovou výrobu v průmyslovém měřítku. Bioreaktory také poskytují izolované a sterilní prostředí pro práci s geneticky modifikovanými organismy, což je důležité pro zachování bezpečnosti a také jsou často plně automatizovány, což zjednodušuje provoz a umožňuje dlouhodobé experimenty bez neustálé lidské přítomnosti (Rolf D. Schmid, 2015).

V potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu jsou bioreaktory aktivně využívány k fermentaci organických látek za přítomnosti bakterií, hub nebo enzymů. A také ke kultivaci a řízení mikroorganismů nebo živých buněk za účelem výroby různých produktů, včetně enzymů, bílkovin, protilátek, biologicky aktivních látek a dalších biologicky důležitých komponent. Jako příklad lze uvést průmyslovou výrobu erytromycinu, antibiotika získaného z mikroorganismu *Saccharopolyspora erythraea* fermentací za aerobních podmínek. Mikrobiální fermentace se také využívá při výrobě vitaminů, jako je riboflavin, beta-karoten a vitamin B12 (Calixto, 2019). Některé bílkoviny klíčové pro lékařství a tkáňové inženýrství, lze produkovat v aktivní formě pouze v živočišných buňkách. Podobně jako při mikrobiální fermentaci je důležité zajistit efektivní promíchávání

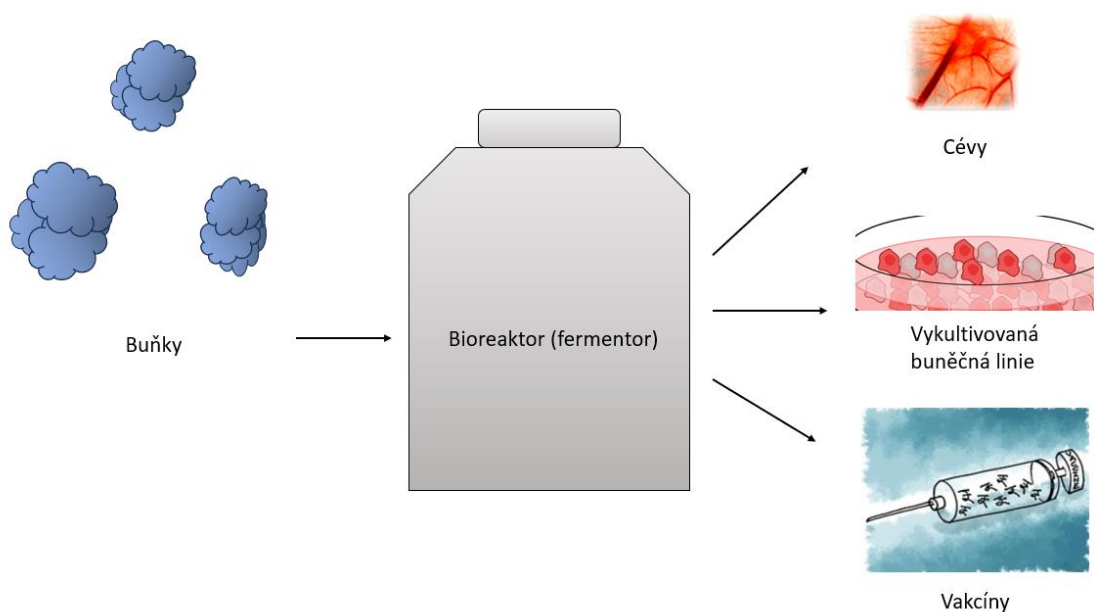
a dodávání kyslíku do buněčné suspenze, což má vliv na růst a kvalitu produkovaných bílkovin. Po získání těchto bílkovin z živočišných buněk následuje pečlivý proces čištění. Během tohoto procesu jsou odstraňovány nečistoty, jako jsou jiné bílkoviny, a také stopy DNA a RNA, zejména retrovirového původu. Tím se zajistí čistota a kvalita výsledných proteinů (Rolf D. Schmid, 2015).

Jelikož fermentační procesy jsou extrémně citlivé i na vnější faktory je údržba a provoz bioreaktoru extrémně náročný proces a vyžaduje vysoké hygienické standardy. Hygienické standardy v kontextu fermentačních procesů zahrnují soubor opatření a postupů, které jsou navrženy tak, aby minimalizovaly riziko kontaminace a zahrnují sterilizaci bioreaktorů a příslušného zařízení, čisté pracovní prostředí, monitorování procesu, ochranu před vzdušnou kontaminací, školení personálu a důkladnou dokumentaci a sledování, aby se zajistila bezpečnost a čistota výsledného produktu (Rolf D. Schmid, 2015).

4.2 Co jsou to bioreaktory a jak fungují?

Laboratorní bioreaktory, jsou komory, ve kterých probíhá kultivace buněčných kultur a mikroorganismů. Vnější fermentor/bioreaktor představuje hermetickou nádobu vybavenou elektrickým míchadlem a aerační trubicí, který zajišťuje pravidelný přísun sterilního vzduchu dovnitř. (Vzboltay 2019). Bioreaktory jsou nezbytným nástrojem v oblasti výzkumu tkáňového inženýrství. Cílem používání těchto zařízení je vytváření funkční tkáňové konstrukce, kterou lze aplikovat v klinické medicíně, zkoumání biologických mechanismů tvorby tkání a také ke zlepšování parametrů produkce buněk (Moheb et. al., 2023).

Význam bioreaktorů spočívá v jejich schopnosti efektivně vyrábět širokou škálu produktů. Používají se v průmyslových odvětvích: výroba potravin, farmacie, biopaliva a bioplasty. Bioreaktory mohou produkovat enzymy, proteiny, mikrobiální biomasu, vakcíny, biopaliva (Obrázek 11) (Microbiologynote 2023).



Obrázek 11 – Využití bioreaktoru pro genové inženýrství (vlastní obrázek).

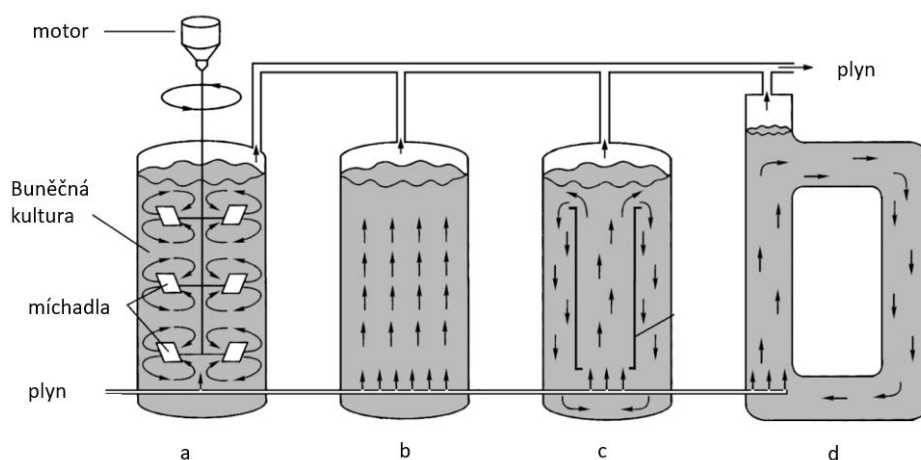
Bioreaktor obsahuje nádobu nebo komoru, kde se buňky nebo mikroorganismy kultivují. V bioreaktoru se obvykle nachází míchadlo, které zajišťuje rovnoměrné rozložení buněk a živin ve vodním médiu. To je důležité pro optimalizaci růstu a produktivity. Bioreaktory jsou vybaveny mechanismy pro udržování konstantní teploty, což je klíčové pro biologické procesy. pH také hraje důležitou roli v biologických procesech, a proto bioreaktory mají systémy pro udržování konstantní hodnoty pH. Moderní bioreaktory jsou vybaveny senzory a monitorovacími systémy, které sledují různé parametry, jako jsou koncentrace metabolitů, hustota buněk nebo koncentrace produktů (Moheb et. al., 2023).

4.2.1 Různé typy bioreaktorů používaných při dynamické kultivaci.

1. Reaktory s mechanickým mícháním (Obrázek 12–a). Tato zařízení jsou navržena tak, aby umožňovala účinné a konstantní míchání ve vnějším prostoru reaktoru. Existuje několik typů míchadel, včetně kotoučových, propelerových nebo turbínových. Pohon míchadel může být elektrický, mechanický nebo hydraulický (Ogurcov 2012).
2. Reaktory s kolonami, do kterých je pro promíchání obsahu vpravován vzduch nebo jiný plyn (Obrázek 12–b). Jsou to většinou vertikální kolony, ve kterých je kultivační médium nebo reakční směs promíchávána pomocí plynu, který je vpravován do

spodní části kolony. To vytváří množství drobných bublin, které podporují míchání obsahu (Ogurcov 2012).

3. Erlenmeyerové reaktory s vnitřní (Obrázek 12–c) nebo vnější cirkulací (Obrázek 12–d). Tyto nádoby mají charakteristický kuželovitý tvar, připomínající Erlenmeyerovu baňku, tento tvar umožňuje efektivní míchání a umístění zátky nebo membrány, což usnadňuje manipulaci s obsahem reaktoru (Moheb et. al., 2023).



Obrázek 12 – Základní typy bioreaktorů: a – mechanické míchání, b – míchání pomocí plynu, c – vnitřní cirkulace plynu, d – vnější cirkulace plynu (přeloženo Ogurcov 2012).

Míchání a cirkulace kultivačního média v erlenmeyerových reaktorech jsou zajišťovány tokem plynu, obvykle vzduchu, díky kterému vzniká hustotní gradient mezi horní a dolní vrstvou kultivačního média. Nejčastěji se používají bioreaktory prvního typu, protože oni mají následující výhody (Ogurcov 2012):

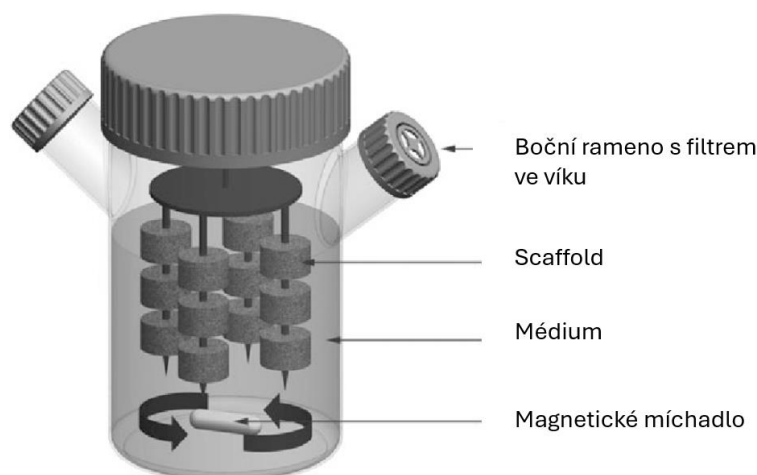
- Snadná úprava technologických podmínek.
- Tyto reaktory jsou vždy k dispozici na trhu.
- Mají vysoký objemový koeficient hmotnostní výměny, což zajišťuje efektivní dodávku plynu k rostoucím buňkám.

Erlenmeyerové bioreaktory a reaktory s kolonami mají několik konstrukčních výhod oproti reaktorům s mechanickým mícháním. Pneumatické reaktory jsou ekonomičtější, protože míchání v nich probíhá pomocí vzestupného proudu vzduchu, nikoli pomocí mechanické míchačky, která spotřebovává mnoho energie. Kromě

toho s absencí mechanické míchačky odpadá možnost pronikání cizích mikroorganismů do bioreaktoru. Také v pneumatických reaktorech nedochází k tak výrazným hydrodynamickým perturbacím (posunutí vrstev tekutiny relativně k sobě), přičemž v erlenmeyerových bioreaktorech probíhá míchání rovnoměrněji po celém objemu. Snížení perturbačního účinku je velmi důležité z několika důvodů: buňky rekombinantních mikroorganismů jsou křehčí než buňky netransformované, protože část energetických zdrojů je spotřebována na syntézu cizorodých proteinů, což vede k tvorbě méně pevné buněčné stěny; nejběžnější odpověď buňky na vnější vliv je snížení množství všech syntetizovaných proteinů, včetně rekombinantních. V důsledku posunů vrstev mohou být ovlivněny fyzikální a chemické vlastnosti buněk, může dojít k nárůstu vrstvy polysacharidů na povrchu buněk, což povede k zhoršení podmínek pro jejich vylučování a lýzi, a také může ztížit čištění rekombinantního proteinu (Ogurcov 2012).

4.2.1.1 *Spinner flask bioreaktor*

Spinner flask bioreaktor patří mezi jednodušší návrhy bioreaktorů. Konkrétně jsou nosiče (scaffoldy) osázené specifickými buňkami konvekcí připevněny k jehlám visícím z víka láhve (obrázek číslo 13). Do láhve se přidává médium tak, aby pokrylo konstrukci buňka-nosič, a každých pár dní se médium mění, pro zajištění vysoké koncentrace živin. Během celého procesu kultivace je médium ve sklenici neustále mícháno magnetickým míchačem na dně sklenice, aby se vytvořily konvektivní síly umožňující nepřetržité míchání média kolem nosičů, což způsobuje promíchání živin a aeraci v celém médiu a snížilo koncentrační vrstvu na povrchu konstrukce (Sikavitsas et al., 2002). Nevyhnutelné mechanické míchání ale může generovat turbulentní víry nebo vyvolávat nechtěné gradienty smykového napětí v nádobě reaktoru, což je ale škodlivé pro vývoj tkáně (Niu et al., 2023).



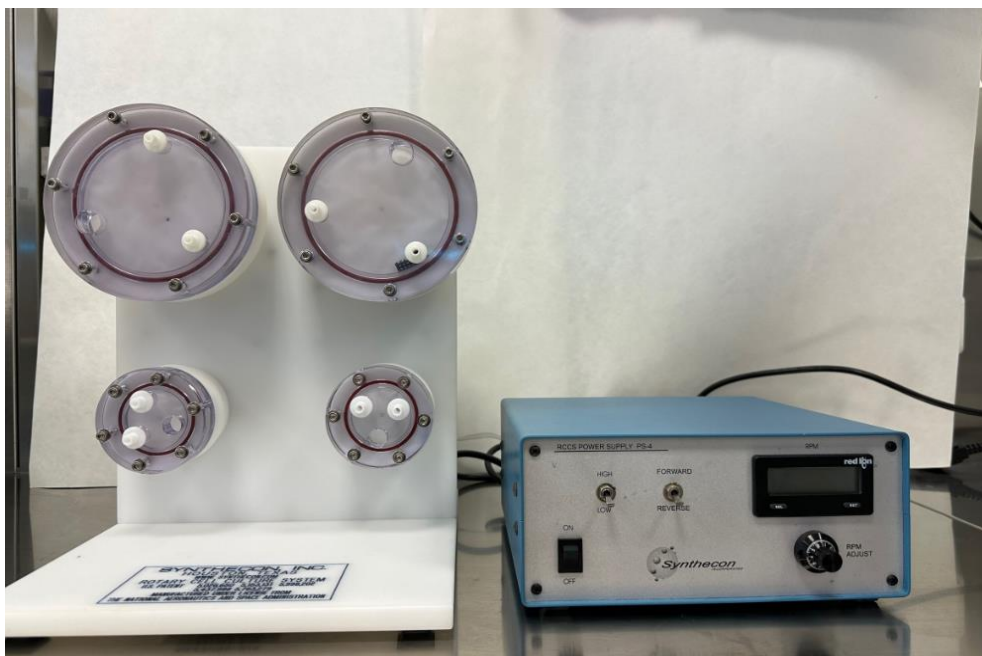
Obrázek 13 - Schematický nákres bioreaktoru spinner flasks (upraveno dle Rauh 2024).

V těchto typech bioreaktorů se scaffold fixuje nebo se nechá plavat a kultivační médium se mění v určitých intervalech. Využívají nízký mechanický odpor k udržení buněk v suspendaci a zároveň brání jejich usazování. Tyto nádoby se pomalu otáčejí, vytvářející nepřetržité šetrné podmínky pro buněčnou 3D kultivaci. Nicméně buněčný růst a mineralizace v takových bioreaktorech jsou omezeny na vnější část scaffoldu, protože nejsou eliminována omezení vnitřního transportu živin jako například je nesteromerná distribuce kyslíku a živin, což má za následek, že buňky se usazují převážně na periferii scaffoldu (Kanda et al., 2016).

4.2.1.2 Rotační bioreaktor

Rotační bioreaktor (Obrázek číslo 14) je zařízení používané pro kultivaci buněk nebo tkání za podmínek, které simulují přirozené prostředí. Tento typ bioreaktoru využívá rotace nebo míchání, aby zajistil rovnoměrné distribuce živin, kyslíku a dalších důležitých složek médií a zároveň minimalizoval tvorbu gradientů v tekutině (Ogurcov 2012). Rychlý rozvoj kosmického inženýrství také způsobil rostoucí zájem vědců o výzkum prováděný ve vesmírném prostředí. Tento výzkum byl také podpořen národní agenturou, například Národní úřad pro letectví a vesmír (NASA) podporoval výzkum založený na studiu nulové gravitace na morfologii buněk. Tato snaha vedla k vývoji speciálních zařízení a technik, které umožňují vědcům simulovat podmínky vesmírného prostředí, zejména nulovou gravitaci, na Zemi. Jedním z těchto zařízení je rotační reaktor, který se používá k otáčení

buněčných kultur a vytváření podobných podmínek, jako je stav beztlíže ve vesmíru (Chaudhuri, 2005).



Obrázek 14 – Rotační bioreaktor (RCCS-4) od společnosti Synthecon Incorporated. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).

Integrace dynamických bioreaktorových systémů, jako jsou rotační baňky nebo míchané tankové reaktory, by mohla připravit cestu pro robustní, škálovatelnou objemovou expanzi agregátů MSC nebo extracelulárních vezikul odvozených od MSC. Bylo prokázáno, že terapeutické účinky MSC, MSC kondicionovaného média nebo agregátů odvozených od MSC podporují regeneraci po poranění orgánů a tkání. Strategie předběžného kondicionování *in vitro* mohou zlepšit přežití a parakrinní vlastnosti MSC, a proto optimalizovat jejich terapeutický potenciál (Egger et al., 2018).

4.2.1.3 Perfuční bioreaktor

Dalším příkladem je perfuční bioreaktor, ve kterém jsou scaffoldy upevněné a médium nepřetržitě cirkuluje po komorách (Kanda et al., 2016).

Perfuční bioreaktory jsou navrženy tak, aby co nejpřesněji simulovaly procesy hmotnostního transportu, které probíhají v živém organismu. Typický perfuční bioreaktor se skládá z čerpadla a inkubační komory, které jsou propojeny s flexibilními trubkami do otevřeného nebo uzavřeného obvodu. Čerpadlo vytváří mírný nadtlak, který umožňuje neustálý tok

tekutého média skrz tkáně a nosné struktury, což napodobuje přirozený proud tekutin v těle (Kanda et al., 2016).

Bioreaktor s radiálním průtokem je jedním typem perfuzního bioreaktoru. Tento typ má schopnost udržovat ideální prostředí pro buněčné kultury díky radiálnímu poskytování média. Kromě toho perfuzní bioreaktor nabízí vysoce funkční 3D kultivaci. Aby bylo umožněno rovnoměrné rozložení kyslíku, je médium čerpáno do středu komory z periferie za nízkého smykového napětí (Kanda et al., 2016).

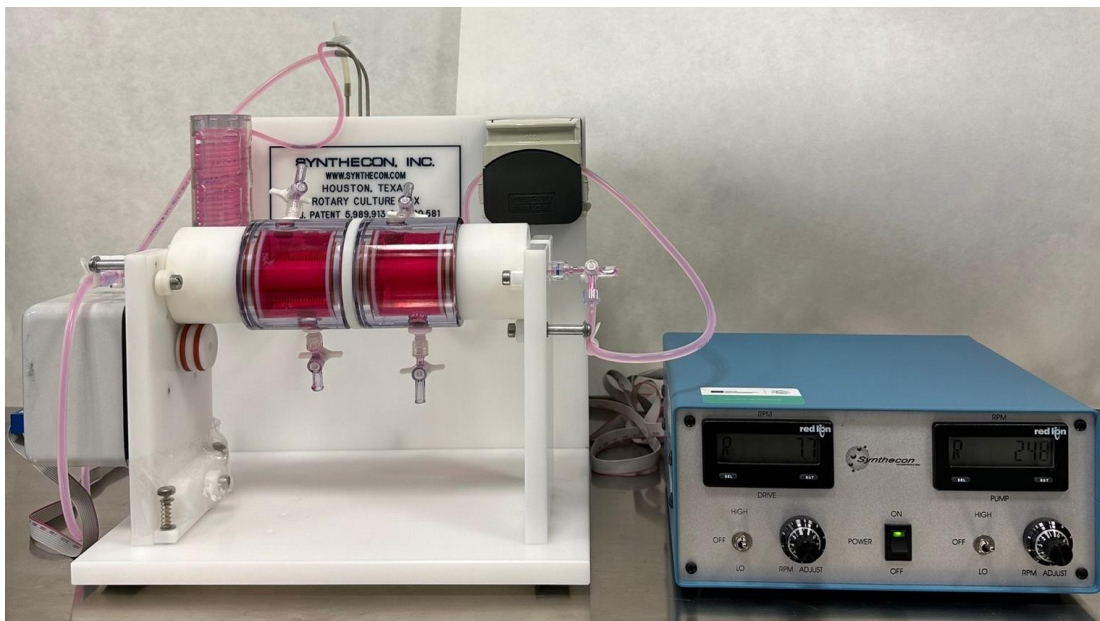
I přesto pouze několik studií dosud hlášených však využilo dynamické podmínky pro trojrozměrnou agregovanou kultivaci většina experimentu popisuje dynamickou kultivaci mezenchymálních kmenových buněk (MSC) (Egger et al., 2018).

Perfuzní rotační bioreaktor

Perfuzní rotační bioreaktor je specifický typ zařízení navržený ke kultivaci buněk nebo tkání za použití kombinace perfuze kultivačního média a rotace kultivační nádoby. Tento bioreaktor je konstruován tak, aby umožnil kontinuální proudění kultivačního média skrz buněčné nebo tkáňové struktury, zatímco rotace nádoby napomáhá kvalitnějšímu promíchání média a zajišťuje rovnoměrné prostředí pro buněčný růst (Chaudhuri, 2005).

V podstatě se perfuzní rotační bioreaktor skládá z inkubační komory (Obrázek číslo 15), ve které jsou umístěny buňky nebo tkáně spolu s nosným materiálem (scaffold), který slouží jako podpora pro buněčný růst. Tato komora je propojena s externím zdrojem kultivačního média, které je poháněno do komory pomocí perfuzního systému, jako je například peristaltické čerpadlo. Současně je inkubační komora připevněna k rotačnímu mechanismu, který umožňuje rotaci kolem osy. Tím se zajišťuje neustálé míchání kultivačního média a lepší distribuce živin do buněčných nebo tkáňových struktur (Chaudhuri, 2005).

Perfuzní rotační reaktor byl zvolen pro experimentální část předložené práce.



Obrázek 15 – Perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated,. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).

Významnou výhodou bioreaktoru s perfuzí kultivačního média, je minimalizace koncentračního gradientu a efektivní podpora živin. Namísto míchání kultivačního média je kontinuálně perfuzováno médium přes nosnou strukturu osázenou buňkami (Chaudhuri, 2005). Nosná struktura je pevně umístěna uvnitř komory bioreaktoru, což omezuje její pohyb a zajišťuje správnou funkci bioreaktoru. Zohar a jeho kolegové studovali účinky přímého průtoku média skrz porézní 3D nosnou strukturu s předkultivovanými buňkami. Pro tento účel využili typický perfuzní bioreaktor, který se skládal z držáku nosné struktury, oxygenátoru, zásobníku média a peristaltického čerpadla. Ve svém výzkumu popisovali podmínky, které podporují 3D neovaskularizaci za proudových podmínek (Zohar, Blinder et al., 2018).

4.2.1.4 Mechanické bioreaktory

V posledních letech byly vyvinuty různé systémy bioreaktorů pro podporu růstu a vývoje konkrétních typů tkání. Například v oblasti TI zabývající se chrupavčitou tkání využití bioreaktorů poskytlo možnost mechanické stimulace pomocí hydrostatického tlaku a komprese, což je prospěšné pro napodobování mechanického prostředí *in vivo* (Moheb et al., 2023).

V kontextu s chrupavčitou tkání připravenou *in vitro* je mechanická stimulace klíčová, protože přírodní chrupavka je vystavena mechanickým silám *in vivo*, jako je tlak při pohybu kloubu. Bioreaktory mohou aplikovat hydrostatický tlak na rozvíjející se tkáň chrupavky. Tím se napodobuje síla zatěžování a odlehčování, kterou chrupavka zažívá v kloubech, a podporuje se tvorba extracelulární matrix s fyziologicky relevantními vlastnostmi. Kontrolovaná komprese může být použita k napodobení mechanické zátěže, která nastává během aktivit, jako je chůze nebo pohyb kloubu. To pomáhá s orientací kolagenových vláken a celkovou organizací tkáně (Nikolova a Chavali 2019).

4.3 Kontrola prostředí v bioreaktorech pro růst a diferenciaci buněk.

Bioreaktory poskytují jedinečnou příležitost zkoumat chování buněk v kontrolovaném fyziologickém prostředí, na rozdíl od jednoduchých kultur ve formě monovrstev či 3D kultur využívajících ne fyziologické statické podmínky. Například bioreaktory mohou být použity k vystavení buněk různým stimulům, včetně hydrostatického tlaku, elektromagnetických polí, napětí, teplotních změn a smykových a tlakových sil (Sugimoto et al., 2017).

V reaktorech s mechanickým mícháním je plyn, obvykle vzduch, přiváděn do kultivačního média pod tlakem prostřednictvím aerátorů, tak vznikají malé bublinky vzduchu, což zajišťuje jejich rovnoměrnější rozložení (Moheb et. al., 2023). Nicméně často se používají plastové trubky, i když vytvářejí větší bubliny než aerátory, protože jsou méně náchylné k ucpávání (Ogurcov 2012). Pro rovnoměrnou aeraci po celém objemu bioreaktorů se používají míchadla – jedno nebo více. Míchadla rozdělují velké bublinky vzduchu, rozptylují je po celém reaktoru a zvyšují dobu setrvání v kultivačním médiu. Aerace závisí především na typu míchadla, počtu otáček a fyzikálně-chemických vlastnostech médií (Ogurcov 2012). V tkáňové kultuře je nutné monitorovat mnoho klíčových parametrů pro hodnocení jejího vývoje. Mezi tyto parametry také patří spotřeba živin a kyslíku, hypoxie, apoptóza a někdy i specifická sekrece proteinů. Většina těchto parametrů může být v principu monitorována pomocí obrazových technik převzatých z biomedicínských a lékařských oblastí, aniž by docházelo k rušení normálního růstu tkáně. Navíc stejný vzorek může být použit jako jeho vlastní reference pro denní sledování (Dubois et al., 2011).

Velikost bioreaktoru je omezena jeho schopností efektivně odvádět teplo, které se uvolňuje v důsledku míchání. Pokud není odvádění tepla dostatečné, teplota médií může překročit

kritickou hodnotu, což může snížit výtěžnost produktu. K odvádění tepla se používá chladicí plášť nebo hadice umístěné uvnitř reaktoru. Vnitřní chlazení je sice účinnější, ale hadice se často pokrývají vrstvou rostoucích buněk, což ztěžuje chlazení a někdy snižuje intenzitu míchání kultivačního média (Ogurcov 2012).

Je známo, že buňky a tkáně reagují na externí mechanické podněty, které mohou zahrnovat gravitační a hydrostatické tlaky, stejně jako smykové síly způsobené prouděním tekutiny (Niu et al., 2023).

4.4 Technologie a design bioreaktorů.

Existuje několik typů bioreaktorů, včetně dávkovacích reaktorů, které se používají pro dávkování přesně kontrolovaných množství živin do kultivačního média, kontinuálních reaktorů – uměle udržují konstantní průtok médií, což umožňuje dlouhodobý proces bez přerušení, erlenmeyerových reaktorů, které jsou vhodné pro sledování růstu mikroorganismu (Ogurcov 2012).

Bioreaktory mohou být vyrobeny z různých materiálů, včetně nerezové oceli, skla, plastů nebo hybridních materiálů, v závislosti na požadavcích procesu a povaze kultury (Microbiologynote 2023). Například sklo se používá zejména pro experimenty, kde je sledování procesu vizuálně důležité. Plasty se používají pro jednorázové nebo krátkodobé procesy, jsou lehké, ale mohou být citlivé na teplotu a chemikálie. Volba materiálu závisí na nárocích konkrétního biotechnologického procesu, jeho parametrech, délce procesu a hygienických požadavcích. Každý materiál má své vlastní výhody a omezení, a je důležité vybrat takový, který nejlépe splňuje specifické požadavky dané aplikace (Ogurcov 2012).

Většina bioreaktorových systémů je používána v kombinaci s inkubátorem pro kultivaci buněk. Proto často není potřeba navrhovat systémy pro kontrolu základních environmentálních parametrů, jako je teplota (37 °C), vlhkost (100 % pro minimalizaci vypařování kultivačního média), tlak (atmosférický) a hladina CO₂ (5 %), uvnitř bioreaktoru. V těchto bioreaktorových systémech je však nezbytné zahrnout ventilační otvor (se sterilním filtrem pro zabránění kontaminace), který usnadňuje vyrovnání prostředí média s okolními podmínkami uvnitř inkubátoru (Yilgor et al., 2015). Mnoho kultivačních médií jsou velmi agresivní a pro prevenci koroze nebo mechanického poškození stěn bioreaktorů se běžně

vyrábí z nerezové oceli nebo skla. Skleněné části se obvykle používají pouze v rotačních reaktorech s objemem menším než 50 litrů (Ogurcov 2012).

Aerace je kritický prvek pro okysličování kultury. Používají se různé typy aeračních systémů, včetně tryskačů, membránových difuzorů a vířivých aeračních systémů. Míchání kultivačního média je také klíčové pro rovnoměrné distribuování živin a plynu. Míchadla mohou být mechanická nebo vzduchová. Většina bioreaktorů je vybavena systémy pro udržování optimální teploty a pH, což jsou důležité parametry pro růst a produkci biomasy. Moderní bioreaktory jsou vybaveny senzory a systémy řízení, které umožňují sledování a optimalizaci parametrů procesu (Ogurcov 2012).

5 VYUŽITÍ BIOREAKTORŮ PŘI KULTIVACI BUNĚK A TKÁNÍ

5.1 Experimentální a klinické aplikace bioreaktorů.

V bioreaktoru lze kultivovat nádorové buňky společně s okolními tkáněmi, jako jsou cévy, a sledovat, jak nádorové buňky reagují na změny v mikroprostředí. V bioreaktoru jsou umístěny jak uměle vytvořené cévy, tak nádorové buňky a dochází ke sledování změn buněčného chování během různých změn v okolním prostředí. To může zahrnovat simulaci faktorů, jako jsou variace koncentrace kyslíku (kombinace umělých cév a nízké koncentraci kyslíku k napodobování podmínek v těle onkologického pacienta, který má nízkou saturaci krve), živin, nebo mechanických sil. Výzkum v oblasti onkologie v bioreaktorech může poskytnout informace o mechanismech růstu nádorů a jejich interakcích s okolím. To může vést k objevu nových cílů pro terapeutické intervence a testování účinnosti léčiv před klinickými zkouškami. Bioreaktory tak slouží jako nástroj pro vývoj perspektivních terapeutických strategií v boji proti rakovině (Ogurcov 2012).

Dále mohou být bioreaktory využívány ke zkoumání vlivu různých fyzikálně-chemických signálů na chování kmenových buněk, což je klíčové pro pochopení a optimalizaci procesu diferenciací (An et al., 2015). Kromě toho bioreaktory nabízejí velký potenciál pro vytváření nových systémů pro dodávání léčiv. Tyto systémy mohou simulovat fyziologické podmínky, což umožňuje výzkumníkům studovat kinetiku uvolňování a biologickou odezvu léčiv v *in vitro* prostředí. Tento přístup může výrazně zlepšit vývoj a optimalizaci systémů pro dodávání léčiv, protože umožňuje hodnocení účinnosti a bezpečnosti léčiv před provedením studií na zvířatech a klinických testů (Moheb et. al., 2023).

Bioreaktory jsou klíčovým nástrojem pro zkoumání a testování nových biomateriálů určených pro tkáňové inženýrství. Tyto materiály mohou zahrnovat různé polymerní scaffoldy, hydrogely nebo kombinace materiálů, které mají poskytovat vhodné podmínky pro růst a diferenciaci buněk. V bioreaktorech lze testovat interakce buněk s novými materiály pod kontrolou různých parametrů, jako jsou teplota, koncentrace živin, a proudění médií. To umožňuje výzkumníkům sledovat, jak se nové materiály chovají v prostředí simulujícím tělesné podmínky. Vlastnosti těchto materiálů lze upravit tak, aby reagovaly na konkrétní vnější podněty, což umožňuje manipulaci s funkcionalitou nosičů (Shen et. al., 2022). Nízká toxicita stimulačně reagujících materiálů (Například termoregulační polymery,

keré se mohou smršťovat nebo rozpínat při změnách teploty) ve srovnání s jinými polymery je důležitým kritériem, které je činí vhodnými pro biomedicínské aplikace. To je zvláště důležité v TI, kde je třeba, aby nosiče poskytovaly příznivé prostředí pro růst buněk a regeneraci tkání (Yuan et. al., 2022).

Kromě toho mohou stimulačně reagující nosiče napodobovat dynamickou povahu původních tkání, reagovat na změny vnějších podnětů, jako jsou teplota, pH a mechanické síly. Tato schopnost reakce umožňuje řízené vyvolávání dodávky bioaktivních molekul na vyžádání a modulaci vlastností nosičů, což vede ke zlepšení kontroly nad uvolňováním léčiv a procesy regenerace tkání. Celkově použití stimulačně reagujících materiálů při návrhu nosičů nabízí obrovský potenciál pro pokrok v oblasti tkáňového inženýrství a strategií doručování léčiv, což usnadňuje rozvoj přesnějších a účinnějších biomedicínských aplikací (Moheb et. al., 2023).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

- Osvojení technik kultivace buněčných linií v laboratořích buněčné biologie.
- Testování proliferace myších embryonálních fibroblastů na scaffoldu připraveném pomocí 3D tisku ve statických podmínkách.
- Výběr vhodného bioreaktoru pro experiment na základě získaných znalostí z teoretické části.
- Testování proliferace myších embryonálních fibroblastů na scaffoldu připraveném pomocí 3D tisku v dynamických podmínkách.

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Použité chemikálie

P(VDF-TrFE-CTFE) (Polyvinylidenfluorid-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylene) (Arkema, France), (PC) Polycaprolactone Purasorb® PC12 (Corbion, Nizozemsko), NN-dimethylformamide (Sigma Aldrich, USA), calf Serum (Biosera, Francie), fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, BioSera, Francie), médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA Laboratories GmbH, Rakousko), penicillin/streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie), trypsin (Biosera, Francie), triton™ X-100 (Sigma Aldrich, USA), formaldehyd 36–38 % (Penta s. r. o., Česká republika), ActinRed™ 555 (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA), Hoechst 33258 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA).

7.2 Použité přístroje

Centrifuga 5702 R (Eppendorf, ČR), inkubátor Heracell™ 150i (ThermoFisher Scientific, USA), inverzní mikroskop IX51 (Olympus, Japonsko), konfokální mikroskop (Olympus, Japonsko), laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko), perfuzní rotační bioreaktor (Synthecon Incorporated, USA).

7.3 Použitý biomateriál

Testování bylo zaměřeno na piezoelektrický materiál – kombinace polykaprolaktonu a polyvinylidenfluorid-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylenu (piezoelektrický) (P(VDF-TrFE-CTFE)-PC). Výhodou piezoelektrického materiálu je schopnost generovat elektrické napětí při působení mechanického tlaku na materiál nebo naopak mechanický tlak vyvíjet při aplikaci elektrického napětí.

7.4 Příprava scaffoldů

Testovaný materiál byl připraven studentem programu Materiály a technologie na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně Lukášem Kameníkem, pod vedením Ing. Markéty Kadlečkové, Ph.D. Scaffoldy byly připraveny pomocí 3D tisku na tiskárně BIO X (Cellink, USA). Výhodou 3D biotisku je preciznost, která umožňuje vyrábět různé tvary scaffoldů. Výsledný materiál je složen z polymerů P(VDF-TrFE-CTFE) a PC v poměru 1:4. Roztok polymerů byl připraven v NN-dimethylformamidu o koncentraci 30 hm. % (w/v).

7.4.1 Úprava scaffoldů před použitím

Materiál použitý při kultivaci musí být stabilní při teplotě 37 °C, aby nedocházelo k jeho deformaci během kultivace v termostatu. Je klíčové, aby materiál zachovával svou strukturální integritu a pevnost za fyziologických podmínek, aby nedocházelo k nepředvídatelným změnám nebo poškození tkáně během experimentů. Tato stabilita je zásadní pro zachování konzistence výsledků a validitu experimentálních dat.

Pro zajištění aseptické práce a sterility je nezbytné, aby námi testovaný materiál prošel sterilizačním procesem. Nejprve byl materiál ponořen do 70% roztoku ethanolu po dobu 20 minut. Tato sterilizační látka je účinná při eliminaci potenciálních mikroorganismů a kontaminantů, které by mohly narušit experimentální výsledky nebo ohrozit bezpečnost kultivovaných buněk.

Následně byla každá strana materiálu vystavena UV záření po dobu 30 minut. Tento krok slouží jako další ochrana proti mikrobiálním kontaminantům a zajišťuje kompletní sterilizaci povrchu scaffoldu.

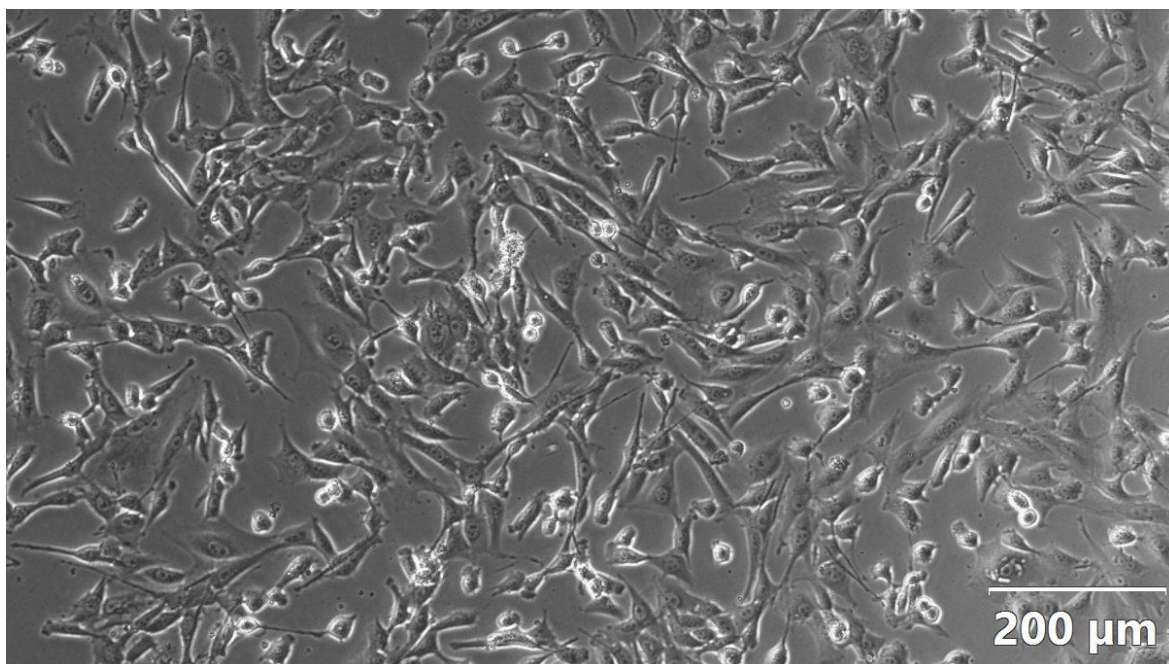
Dále byly testovány dvě sady materiálu, přičemž jedna sada byla potažena 0,1 % želatinou a druhá sada nebyla želatinou ošetřena. Želatina na povrchu materiálu podporuje adhezi buněk.

7.5 Biologický materiál

7.5.1 Buněčná linie

Pro náš účel byla zvolena linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, American Type Culture Collection, ATCC) (Obrázek č.16). Fibroblasty jsou skupinou heterogenních rezidentních buněk mezenchymálního původu, které mají různá umístění, různý vzhled a charakteristické aktivity. Myší fibroblasty jsou buňky, které hrají klíčovou roli v tvorbě pojivových tkání a podílejí se na procesech, jako je hojení ran a tvorba extracelulární matrix. Buněčné linie myších fibroblastů jsou často využívány k porozumění buněčným procesům, studiu onemocnění a testování léčiv. Tyto buněčné linie jsou schopné nekonečného dělení v laboratorních podmínkách, což usnadňuje opakované experimenty a studie. Při studiu buněk myších fibroblastů lze jednoduše získat informace o buněčné

proliferaci, migraci, adhezi a dalších procesech, které jsou klíčové pro porozumění buněčné biologie a patologie (Qiu et al., 2016).



Obrázek 16 – Použitá linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Vlastní fotografie. Zvětšení 100x.

7.5.2 Statická kultivace buněčných kultur

Buněčná linie myších embryonálních fibroblastů byla před pasażováním zkontrolována pomocí mikroskopu. Buňky byly kultivovány v živném médiu, jehož složení je následující: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10 % calf séra a 100 U·ml⁻¹ penicillin/streptomycin Statická kultivace

Po provedení kontroly zvolených buněčných linií a sterilizaci scaffoldu (P(VDF-TrFE-CTFE) -PC proběhla statická kultivace na 12-jamkové destičce pro tkáňové kultury. Vždy do každé jamky byl vložen jeden vzorek. Statická kultivace byla zhotovena ve třech opakováních. Nejprve je nutné osadit scaffold buňkami. Počáteční hustota a distribuce buněk má významný vliv na konečnou strukturu scaffoldu. U porézních či velkých scaffoldů je distribuce buněk obtížná a dosažení reprodukovatelnosti je náročné. Nejběžnější metodou pro osazení buněk je tzv. statické setí (static seeding). Tento postup zahrnuje aplikaci koncentrované buněčné suspenze na scaffold pomocí pipety (Van Blitterswijk, 2008).

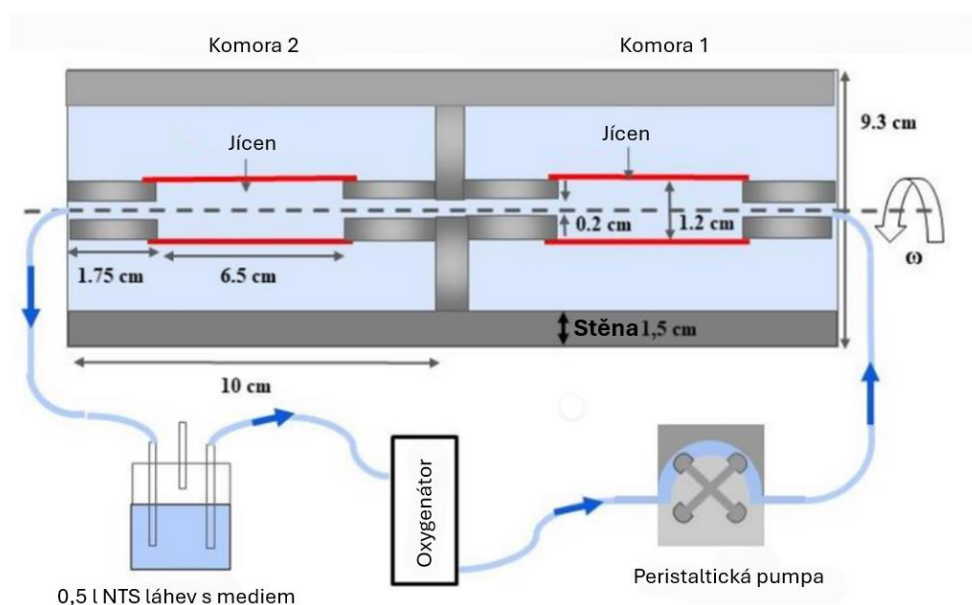
Statická kultivace proběhla v inkubátoru za stále teploty 37 °C v kultivačním médiu a byla ukončena po 48 hodinách. Jako reference byla použita prázdná jamka.

Buňky byly nasazeny v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml pro první měření. Pro druhé měření pak byla použita koncentrace nižší a to $5 \cdot 10^4$ buněk/ml, jelikož buňky na povrchu během prvního měření přerostly a nešla tak dobře pozorovat jejich morfologie.

7.5.3 Dynamická kultivace

Pro dynamickou kultivaci jsme použili perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated. Volba perfuzního rotačního bioreaktoru pro dynamickou kultivaci přináší několik výhod. První z nich spočívá v lepší distribuci živin a plynných látek dovnitř scaffoldu díky mechanismu rotace. Tento proces zajišťuje rovnoměrnější růst buněk. Dále perfuzní systém umožňuje efektivní odstranění metabolických odpadů a toxických produktů buněčného metabolismu, čímž vytváří lepší prostředí pro buněčný růst. Rotace bioreaktoru může také poskytovat mechanickou stimulaci buněk, což napomáhá k lepší diferenciaci a vývoji funkčních vlastností tkáně (Cherry a Papoutsakis, 1998).

Schéma zapojení a parametrů bioreaktoru je znázorněno na obrázku 17:



Obrázek 17 – Schematické znázornění průběhu dynamické kultivace. Přeloženo Lesieur et al., 2021.

Dynamické kultivaci předcházela na 24 hodin kultivace statická jejíž postup je uveden výše (viz. Kapitola 7.5.2). Po 24 hodinách byly scaffolds osázené buňkami vloženy do perfuzního bioreaktoru a kultivace probíhala dalších 24 hodin.

7.5.3.1 Příprava bioreaktoru

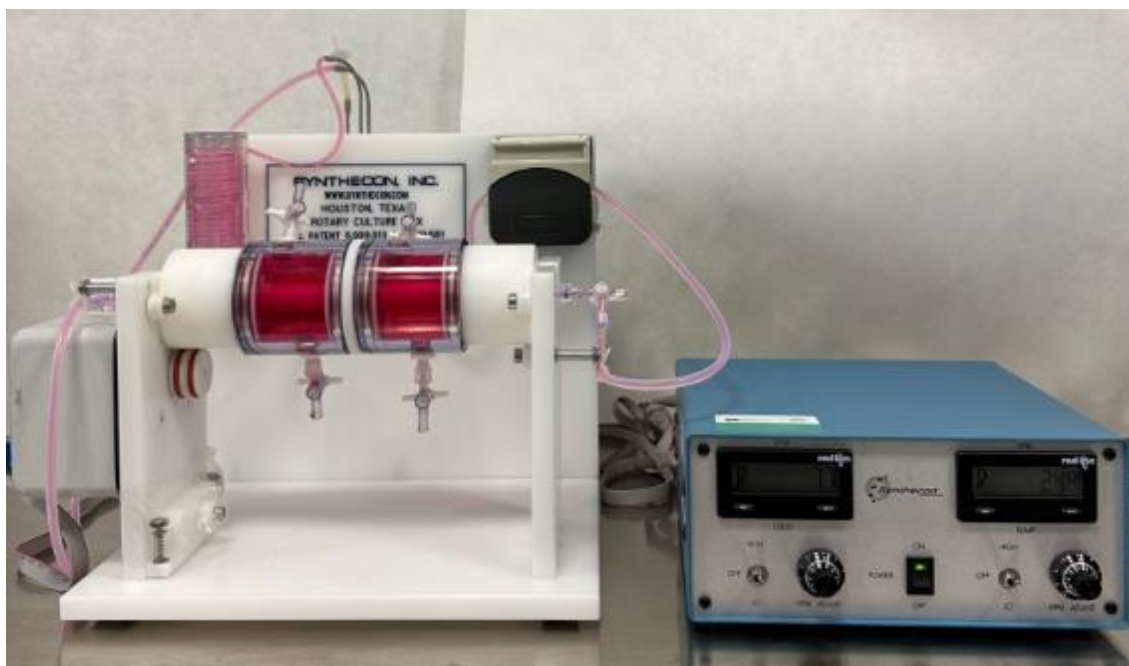
Před kultivací buněk je nezbytné provést důkladnou sterilizaci bioreaktoru (Obrázek 18). Části bioreaktoru, které jsou odolné vůči vysokým teplotám a mohou být sterilizovány pomocí autoklávu, jsou podrobeny tomuto procesu. Autoklavování je spolehlivá metoda sterilizace, která zajišťuje eliminaci škodlivých mikroorganismů a zabezpečuje sterilní prostředí pro kultivaci buněk. Ostatní části bioreaktoru, které nejsou vhodné pro autoklavaci, jsou sterilizovány jinými metodami. V našem případě byly tyto části vydezinfikovány ponořením do 70 % roztoku ethanolu (sterilizace kohoutů, špuntů a šroubů). Ethanol je běžně používaná dezinfekční látka, která efektivně ničí mikroorganismy a zajišťuje čistotu povrchu.



Obrázek 18 – Díly, ze kterých se skládá perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated, který byl použit v praktické části. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).

Tímto sterilizačním procesem je zajištěna bezpečnost a sterilita bioreaktoru před zahájením kultivace buněk. Sterilní prostředí je klíčové pro úspěšnou kultivaci buněk a minimalizaci rizika kontaminace. Zapojení a sestavení bioreaktoru pak probíhá ve sterilním prostředí laminárního boxu. Proces skládání bioreaktoru musel být prováděn rychle a za aseptických podmínek v biohazard boxu s třídou čistoty A, který zajišťuje laminární proudění vzduchu. Je důležité poznamenat, že scaffold byl rychle ponořován do kultivačního média, protože buňky myších fibroblastů nemohou být dlouho bez živin.

Poskládaný a zapojený bioreaktor se scaffoldem následovně byl umístěn do inkubátoru pro zabezpečení kultivační teploty 37 °C (napodobování fyziologických podmínek – teplota těla) a zapojen do peristaltické pumpy pro zajištění rotací a perfuze kultivačního media (Obrázky 19 a 20). Rychlost otáček byla nastavena na 7,7 rpm a pumpa na 248 rpm.



Obrázek 19 – Perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated, naplněný kultivačním médiem se scaffoldem a zapojený do peristaltické pumpy. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).



Obrázek 20 – Nádoba bioreaktoru, naplněna kultivačním médiem se scaffoldem. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).

Na obrázku č. 19 je bioreaktor po jeho plném sestavení a zapojení. Takto poskladaný bioreaktor byl umístěn do inkubátoru nastaveným na kultivační teplotu 37°C.

Obrázek číslo 20 znázorňuje umístění scaffoldu ve druhé komoře bioreaktoru. Lze vidět, že scaffold se který nebyl během prvního měření zafixován se volně pohyboval v kultivačním médiu v komoře. Dynamická kultivace probíhala po dobu 24 hodin. Po ukončení experimentu bylo kultivační médium opatrně odstraněno z kultivačních komor v biohazard boxu a scaffold s buňkami byl nabarven dle postupu popsánem v kapitole 6.4.3.2 Barvení vzorku.

Bioreaktor byl rozmontován na jednotlivé díly, které byly důkladně vydezinfikované a sterilizované, tímto byly jednotlivé díly přichystané k dalšímu použití.

7.5.3.2 Barvení buněk

Pro vyhodnocení schopnosti proliferace myších fibroblastů na materiálu byly buňky fluorescenčně nabarveny. Přičemž nabarvena byla vždy i reference. Po ukončení

experimentu bylo odsáto kultivační médium a buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrům. Následně byly buňky zafixovány pomocí 4 % formaldehydu (nechal se působit 15 minut) a buněčná membrána byla permeabilizována pomocí 0,5 % tritonu (nechal se působit 5 minut). Poté byly buňky opět důkladně opláchnuty pufrům (celkem 3x). V posledním kroku byl do jamek přidán 1 ml pufru a barviva: Hoechst 33258 v koncentraci $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a kapka barviva ActinRedTM 555. Barvivo Hoescht se váže na DNA buněk, díky čemuž můžeme pozorovat buněčná jádra a barvivo ActinRed barví aktinová vlákna, která jsou součástí buněčného cytoskeletu. Buňky byly i s barvivem ponechány 30 minut ve tmě. Po 30 minutách se naposledy odsál pufr a přidal se nový 1 ml. Morfologie buněk byla následně pozorována pomocí konfokálního mikroskopu. Vyhodnocení schopnosti proliferace bylo provedeno pořízením mikrofotografií.

7.5.4 Dynamická kultivace – 2. měření

7.5.4.1 Kultivace buněk

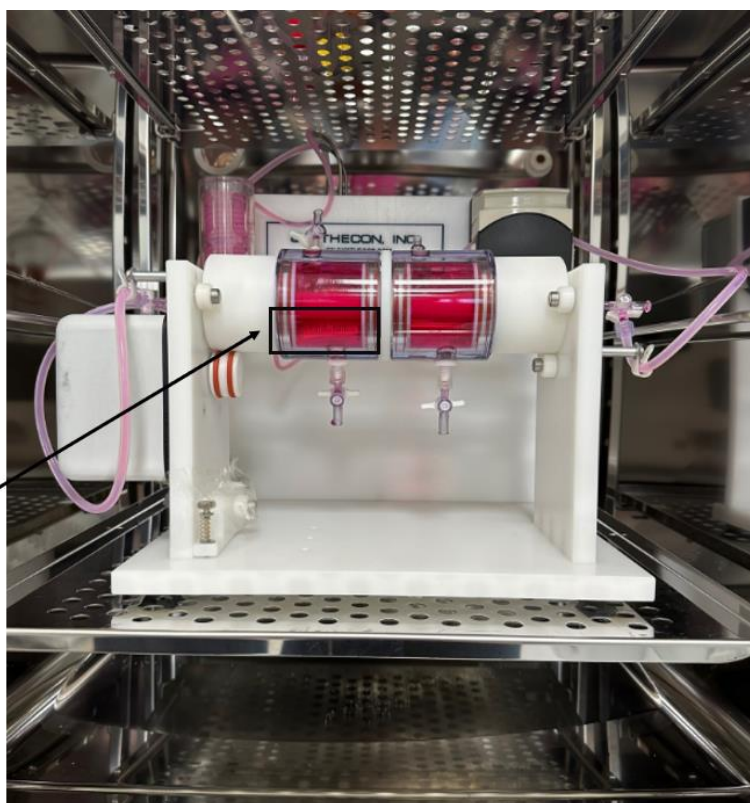
Kultivace buněk probíhá podobně jako při prvním pokusu dynamické kultivace (viz kapitola 7.5.3 Dynamická kultivace) ale na rozdíl od prvního pokusu tentokrát scaffold byl vložen do plastové kazety a rychle ponořen do kultivačního média (obrázek 21).



Obrázek 21 - Nádoba bioreaktoru, naplněna kultivačním médiem se scaffoldem vloženým do plastové kazety pro minimalizaci kontaktu s kyslíkem. Zdroj: Laboratoř buněčné

biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).

Následně byl poskládaný a zapojený bioreaktor se scaffoldem umístěn do inkubátoru, kde byla zajištěna kultivační teplota 37 °C (obrázek 22). Bioreaktor byl také zapojen do peristaltické pumpy, která zajišťovala rotaci a perfuzi kultivačního média. Rychlost otáček bioreaktoru byla nastavena na 7,7 rpm a rychlost pumpy na 248 rpm. Tento důkladně promyšlený postup zabezpečil optimální podmínky pro dynamickou kultivaci buněk a minimalizoval možnost styku scaffoldu a buněk se vznikajícími vzduchovými bublinami a také bylo zabráněno, aby se vzorek samovolně pohyboval v komoře.



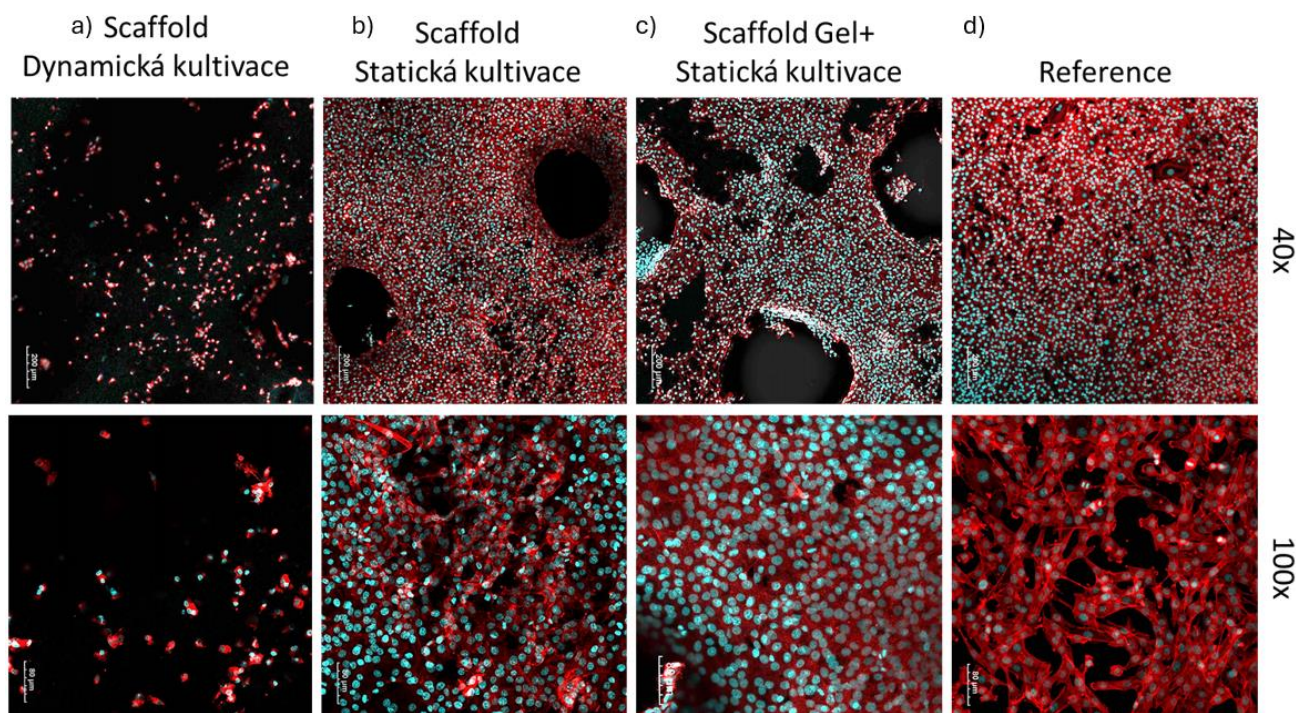
Plastová kazeta
se scaffoldem

Obrázek 22 - Perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated, naplněný kultivačním médiem se scaffoldem, vložený do plastové kazety, umístěný v inkubátoru pro následující kultivaci. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie).

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Výsledky prvního měření

Interakce buněk s povrchem materiálu závisí především na fyzikálních a chemických charakteristikách daného povrchu. Akceptace nebo odmítnutí implantovaného materiálu je poté determinováno jeho povrchovými vlastnostmi, jež ovlivňují interakci s prostředím. Kombinace polykaprolaktonu a polyvinylidenfluorid-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylene jako scaffoldu poskytuje zajímavé vlastnosti, jelikož se jedná o piezoelektrický materiál a buňky tak mohou být stimulovány elektrickým proudem. Polykaprolakton obecně vykazuje dobrou cytocompatibilitu pro testované buňky myších fibroblastů. Polykaprolakton je biodegradovatelný polymer s dobrými mechanickými vlastnostmi a pomalou degradací, což ho činí vhodným pro dlouhodobou podporu buněčného růstu. Má také nízkou teplotní tvrdost, což umožňuje snadnou tvarovatelnost a přizpůsobení různým formám a strukturám. Polyvinylidenufluorid je termoplastický a piezoelektrický fluoropolymer s vysokou chemickou odolností a dobrou biokompatibilitou (Umar Aslam Khan et al., 2023). Následující obrázek číslo 23 ukazuje výsledky statické a dynamické kultivace myších fibroblastů na scaffoldu v porovnání s referencí.



Obrázek 23 – Buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 po kultivaci za a) dynamických podmínek, b) statických podmínek, c) statických podmínek s úpravou materiálu pomocí

želatiny, d) reference za statických podmínek. Buněčná jaderná DNA (tyrkysová barva) a aktinová vlákna (červená barva). Zvětšení fotografií je 40x a 100x.

Buňky byly u prvního měření nasazeny v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml, a to jak na referenci, tak i na scaffold.

Obrázek 23-d) znázorňuje výsledek statické kultivace myších fibroblastů na referenčním tkáňovém plastiku po 48 hodinách. Na obrázku lze vidět hojný narůst buněk v kultivačním mediu.

Na obrázcích 23-b) a 23-c) jsou uvedené výsledky proliferace myších fibroblastů na povrchu P(VDF-TrFE-CTFE) -PC scaffoldu pro statickou kultivaci která probíhala po stejnou dobu jako v případě reference, tedy 48 hodin. Na obrázku 23-b) jsou snímky ze statické kultivace na materiálu který nebyl nijak povrchově upraven. Na obrázku 23-c) jsou pak snímky ze statické kultivace kdy byl materiál ošetřen potažením 0,1% želatinou (Gel+), pro případné zlepšení adheze fibroblastů. Z obrázku si lze všimnout že na materiálu ošetřeném želatinou je lehce vyšší počet buněk, tento rozdíl je však zanedbatelný. Scaffold tedy podporoval adhezy a proliferaci buněk i bez ošetření želatinou. Proliferace je zároveň i srovnatelná s referencí. Stejně tak je morfologie buněk stejná jak na vzorcích, tak na referenci.

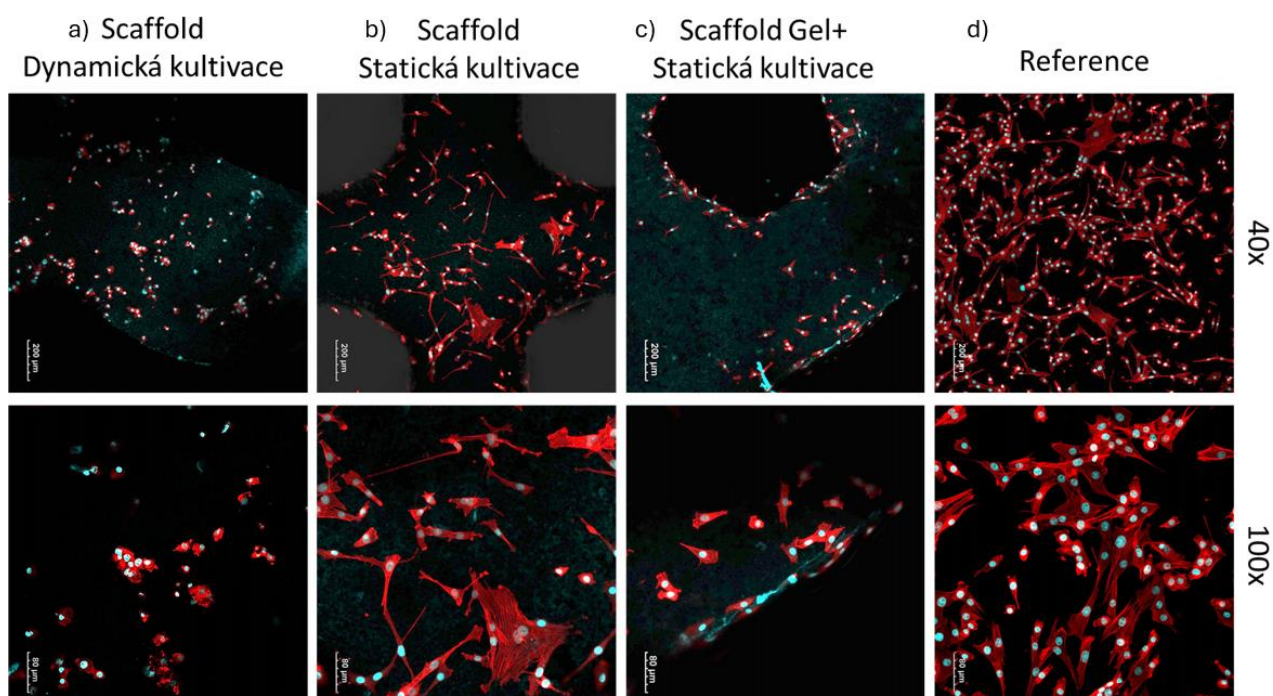
Dynamická kultivace v rotačním perfuzním reaktoru probíhala 24 hodin, čemuž ale předcházela 24 hodinová kultivace ve statických podmínkách, aby měly buňky čas na materiál naadherovat a osídlit jej. Po uplynutí kultivační doby za dynamických podmínek bylo médium opatrně odstraněno z kultivačních komor bioreaktoru v biohazard boxu a scaffold byl opatrně vyjmut, aby mohl být nabarven pro vizualizaci morfologie buněk. Výsledky, které přinesla dynamická kultivace nesplnily naše očekávání. I přes naše očekávání a výborné výsledky statické kultivace jsou výsledky dynamického procesu horší, což znázorňuje snímek 23-a). Na obrázku je patrná pouze minimální míra buněčné proliferace a výrazně nižší počet buněk než u reference a vzorků ze statické kultivace. Ve srovnání se statickou kultivací buňky měly horší schopnost proliferace, změnily morfologii a je vidět méně stresových vláken – buňky mají méně protáhlý tvar. Tato nepříznivá reakce při dynamické kultivaci naznačuje významný vliv dynamických podmínek na chování buněk a jejich schopnost adheze a proliferace na povrch materiálu.

Dalším možným důvodem takového výsledku může být přítomnost vzduchových bublin v kultivačním médiu v horní části komory, které byly v kontaktu i se scaffoldem. Vzniku a přítomnosti vzduchových bublin je potřeba během manipulace s bioreaktorem předcházet a případně je odstranit, nicméně občas se během doby experimentu objeví, a ne vždy je v možnostech výzkumníka, aby je odstranil, vzhledem k časové náročnosti, kdy běží experiment nepřetržitě i v nočních hodinách. Proto byl při druhém měření scaffold ukotven do plastových kazet, aby bylo zajištěno plné ponoření materiálu do kultivačního média. Tím se sníží riziko přítomnosti vzdušných bublin a umožní se lepší interakce mezi buňkami a scaffoldem, což by mělo vést k lepším výsledkům v buněčné proliferaci. Tento přístup nám umožní lépe kontrolovat prostředí, ve kterém buňky rostou, a snížit potenciální faktory, které by mohly ovlivnit výsledky kultivačního procesu.

Martina Kašparová ve své diplomové práci popisuje sérii pokusů dynamické kultivace s využitím perfuzního rotačního bioreaktoru firmy Synthecon a sledování buněčné proliferace myších embryonálních fibroblastů na scaffoldu, vyrobeného ze směsi keramického prášku (Al_2O_3), pojivového systému (Licomont EK583) a KCl. Výsledkem její experimentální části byla fotografická analýza. Z této analýzy vyplývá, že během aderenčního procesu a buněčné proliferace bylo pozorováno vyšší množství buněk na scaffoldech s velikostí pórů vyšší než $250\ \mu\text{m}$ (Kašparová, 2019). Na základě našich experimentálních výsledků lze konstatovat, že námi použitý P(VDF-TrFE-CTFE)-PC scaffold pravděpodobně nebyl dostatečně porézní nebo neměl požadovanou velikost pórů. Tento závěr je podpořen tím, že v práci Kašparové na scaffoldech s menšími póry bylo pozorováno nižší množství buněk při vyhodnocení adheze a proliferace, což naznačuje nedostatečnou propustnost námi zvoleného scaffoldu. Během budoucího zkoumání testovaného materiálu bude určitě vhodné se zaměřit na stanovení velikosti pórů. Sledování velikosti pórů bylo ale nad rámec této předložené práce.

8.2 Výsledky druhého měření

Po uplynutí kultivační doby za dynamických podmínek (stejně jako u prvního měření - 24 hodin) bylo médium opatrně odstraněno z kultivačních komor biorektoru v biohazard boxu a scaffold s buňkami byl nabarven dle postupu popsáném v kapitole 6.5.3.2 Barvení buněk. Je důležité zdůraznit, že při druhé kultivaci buněk, jak na referenci, tak i s použitím scaffoldů, byla použita nižší koncentrace buněčné suspenze ($5 \cdot 10^4$ buněk/ml namísto $1 \cdot 10^5$ buněk/ml), proto je i výsledná proliferace na referenci a na vzorcích menší. Nicméně co se týče scaffoldu bez želatiny (Obrázek 24-b)), tak proliferace ve srovnání s referencí (Obrázek 24-d)) byla dobrá, téměř srovnatelná.



Obrázek 24 – Druhé měření: Buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 po kultivaci za a) dynamických podmínek, b) statických podmínek, c) statických podmínek s úpravou materiálu pomocí želatiny, d) reference za statických podmínek. Buněčná jaderná DNA (tyrkysová barva) a aktinová vlákna (červená barva). Zvětšení fotografií je 40x a 100x.

Nižší koncentrace buněk u druhého měření byla použita záměrně, aby bylo možné lépe pozorovat morfologii jednotlivých buněk na materiálu i na referenci.

Na obrázku 24-c) je představen výsledek statické kultivace s úpravou materiálu pomocí želatiny. Je zajímavé pozorovat, že na vzorku potaženém želatinou byly buňky pouze na

okrajích materiálu, což je dobře patrné i na fotografiích. Zdá se, že buňky nepronikly dovnitř materiálu a adherovaly pouze na jeho povrch. Existuje několik možných vysvětlení tohoto jevu. Jedním z nich může být skutečnost, že buňky pronikly skrze mřížku materiálu, čímž nedošlo k jejich adhezi na vnitřní strukturu. Dalším možným důvodem může být horší manipulace s buněčnou linií během experimentu, jelikož buňky na práci výzkumníka reagují velmi citlivě. Nicméně bylo očekáváno že se dosáhne stejných výsledků jako v případě prvního měření, tedy že materiál potažený želatinou bude podporovat adhezi a proliferaci myších fibroblastů.

Je pozoruhodné, že vzorky bez přidání želatiny (obrázek 24-b)) kultivované ve statických podmínkách jsou téměř srovnatelné s referenčními vzorky (obrázek 24-d)), což naznačuje pěknou úroveň buněčné proliferace. Toto pozorování naznačuje, že daný materiál poskytuje příznivé podmínky pro adhezi a růst buněk i bez přídavku želatiny.

Výsledkem dynamické kultivace je obrázek číslo 24-a), který naznačuje, že dynamické podmínky nejsou pro buňky ideální. Vysvětlením takového výsledku může být nedostatečná porozita vzorku, což brání správnému prostupu živin a kyslíku dovnitř materiálu a omezuje interakci buněk s jejich prostředím (potíže během 3D tisku). Druhým možným faktorem může být stres způsobený manipulací během zapojování bioreaktoru.

Je důležité brát v úvahu, že i když morfologie buněk na fotografiích nemusí vypadat ideálně, výsledky naší dynamické kultivace naznačují, že k určité buněčné proliferaci dochází. Pozorujeme minimální přítomnost buněk na povrchu materiálu a nedostatečnou tvorbu buněčných shluků. Tento jev naznačuje, že buňky neproliferují tak efektivně, jak bychom očekávali. Některé výzkumné studie dokonce ukazují, že i když morfologie není dokonalá, může to být stále považováno za úspěšnou proliferaci. Během další práce by bylo dobré zefektivnit rychlost manipulace během sestrojování bioreaktoru, či volba jiné rychlosti otáček.

Experimentální část předložené diplomové práce je zaměřena na konkrétní typ bioreaktoru, který byl dosud málo prozkoumán v literatuře. Bylo zjištěno, že existuje nedostatečné množství článků, které by se zabývaly perfuzními rotačními bioreaktory firmy Synthecon. Konkrétně jsem narazila na nedostatek informací o experimentech a kultivačních pokusech s využitím myších kmenových fibroblastů v rotačních perfuzních bioreaktorech. Tato skutečnost ukazuje potenciál pro studium buněčných procesů s využitím tohoto typu reaktoru. Zároveň bylo zjištěno, že existuje omezené množství studií, které zkoumají využití

rotačních perfuzních bioreaktorů spolu s 3D scaffoldy pro kultivaci myších kmenových fibroblastů.

V rámci této diskuse byly hledány relevantní studie, v tomto kontextu může být zmíněna práce Krista M. Fridleyho a kolegů, která poskytuje důležité poznatky o diferenciaci myších embryonálních kmenových buněk v rotačních a perfuzních tankových bioreaktorech. Jejich experimenty se zaměřovaly na hodnocení vlivu různých kultivačních podmínek na vývoj embryonálních tělísek v odstředivých baňkách a statických systémech, včetně rotačních lahví a bioreaktorů od firmy Synthecon. Výsledky naznačují, že bioreaktor od firmy Synthecon nenabízí jednoznačné výhody ve srovnání s ostatními testovanými systémy pro tvorbu embryoidních tělísek a na základě poskytnutých výsledků a závěrů lze říci, že bioreaktor od firmy Synthecon není ideální volbou pro tento konkrétní typ pokusu (Fridley et al., 2010).

V pokusu Krista M. Fridleyho a kolegů, podobně jako u nás při dynamické kultivaci, došlo k poklesu koncentrace buněk. Tento společný výsledek naznačuje, že bioreaktor od firmy Synthecon není optimální volbou pro podporu buněčného růstu nebo proliferace v tomto konkrétním experimentálním kontextu (Fridley et al., 2010). Tato skutečnost podtrhuje důležitost zohlednění specifických potřeb buněčných typů a optimalizaci kultivačních podmínek pro dosažení požadovaných biologických odpovědí.

Bioreaktor RCCS od společnosti Synthecon se jeví jako vhodné zařízení pro buněčnou kulturu a inženýrství jícnu. Jeho schopnost kombinovat průtokovou perfuzi s rotací umožňuje řízenou mechanickou stimulaci, což je klíčové pro úspěšné kultivace buněk tohoto typu. V bioreaktoru jsou buňky udržovány ve suspendovaném stavu, což zajišťuje optimální přenos živin, kyslíku a odpadních látek. Díky minimalizaci sil působících na buňky vzniká prostředí s nízkým smykovým napětím, což je výhodné pro udržení buněčné integrity. Tento přístroj je tedy dobře přizpůsoben pro výzkum a aplikace v oblasti kultivace buněk jícnu, jak naznačuje práce Agnès Drochon (Drochon et al., 2022). Je možné, že nízká buněčná proliferace myších fibroblastů na scaffoldu za dynamických podmínek pozorována v experimentální části předložené práce může být způsobena vyšší citlivostí fibroblastů na silné mechanické podněty. Myší fibroblasty mohou být náchylnější k dynamickému namáhání a reagovat na něj citlivěji než buňky jícnu. Je možné, že výsledný útlum proliferace byl důsledkem intenzivního mechanického stresu, kterému byly buňky vystaveny.

ZÁVĚR

Teoretická část reflektuje hlavní body získané během literární rešerše. Zdůrazňuje rozdíl mezi genovým inženýrstvím a tkáňovým inženýrstvím, čímž je podtržena specifčnost a význam obou těchto disciplín. Tím se vytváří základní rámec pro porozumění jednotlivým oblastem a jejich vzájemnému propojení. V rámci tkáňového inženýrství je pak podrobněji popsán princip, historie a typy buněk využívané v této disciplíně.

Následně se práce detailně zabývá scaffoldy. Zaměření na scaffoldy pro tkáňové inženýrství iniciovalo definicí klíčových pojmů. Následně byla podrobena diskuzi morfologická struktura scaffoldů a technologie jejich výroby, čímž se přispělo k pochopení jejich fyzikálních a mechanických vlastností. Velký důraz byl kladen na výběr vhodných biomateriálů, které jsou klíčovým prvkem při výrobě scaffoldů. Kategorizace biomateriálů a jejich možné modifikace poskytly důležité informace pro optimalizaci interakce mezi scaffoldem a buňkami.

Dalším významným tématem byla problematika statické a dynamické kultivace buněk. Zde se ukázalo, že dynamická kultivace s využitím bioreaktorů představuje efektivní přístup k simulaci fyziologického prostředí a optimalizaci buněčného růstu a diferenciaci. Bylo zásadní podrobně vysvětlit, co bioreaktory jsou, jak fungují a jaké typy existují, aby bylo dosaženo plného porozumění jejich role v tkáňovém inženýrství.

Celkově tedy práce poskytuje komplexní přehled o scaffoldech pro tkáňové inženýrství, zdůrazňuje významné aspekty vývoje a aplikace těchto struktur a přispívá k lepšímu porozumění této oblasti vědeckého výzkumu.

Praktická část práce byla zaměřena na aplikaci získaných teoretických poznatků v experimentální studii. V rámci experimentu byl testován piezoelektrický materiál – kombinace polykaprolaktonu a polyvinylidenfluorid-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylenu (P(VDF-TrFE-CTFE)-PC). Dále byly připraveny scaffoldy pomocí 3D tisku na tiskárně BIO X. Scaffoldy byly vyrobeny z polymerů P(VDF-TrFE-CTFE) a PC v poměru 1:4.

Během experimentu byla důkladně upravena a sterilizována struktura scaffoldů. Sterilita je zásadní pro úspěch kultivace buněk a minimalizaci rizika kontaminace. Pro kultivaci buněk testování proliferace na scaffoldu byla zvolena linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Kultivace buněk probíhala staticky na 12-jamkové destičce pro tkáňové kultury a následně dynamicky v perfuzním rotačním bioreaktoru.

Dynamická kultivace v perfuzním rotačním bioreaktoru přináší výhody jako lepší distribuci živin do kultivačního media efektivní odstranění metabolických odpadů a mechanickou stimulaci buněk pro lepší diferenciaci a vývoj tkáně. Kultivace buněk byla důkladně připravena a monitorována pomocí různých experimentálních technik, včetně fluorescenčního barvení buněk a pozorování morfologie pomocí konfokálního mikroskopu.

V závěru naší studie jsme zjistili, že interakce buněk s povrchem materiálu je zásadní pro akceptaci či odmítnutí implantovaného materiálu. Naše experimenty s použitím dynamické kultivace v perfuzním rotačním bioreaktoru od firmy Synthecon naznačují, že tato metoda není dosud dostatečně prozkoumána a nemáme k dispozici dostatečné relevantní výsledky, na které bychom se mohli spolehnout. Na základě našich zkušeností a znalostí z teoretické části jsme očekávali opačné výsledky. Testovaný materiál (P(VDF-TrFE-CTFE)-PC) podporoval proliferaci myších fibroblastů, avšak jen při kultivaci za statických podmínek. Materiál má tedy potenciál pro využití v tkáňovém inženýrství, jelikož nijak negativně neovlivňuje buněčnou proliferaci. Během dynamické kultivace bylo dosaženo horších výsledků, což může být způsobeno strukturou scaffoldu (nedostatečná porozita), dlouhá doba sestrojování bioreaktoru, manipulací se vzorkem apod. Nicméně se dynamická kultivace jeví jako slibná možnost pokročilejšího biologického testování materiálů v oblasti tkáňového inženýrství a naše experimenty naznačují potřebu dalšího výzkumu v této oblasti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AJALA F., KAJGER DZH. Moderní genetika: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988., ил.
2. An introduction to genetic analysis. Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.
3. AN, Jia; EE MEI TEOH, Joanne; SUNTORNNOND, Ratima a KAI CHUA, Chee. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. Online. Engineering. 2015, č. 1, s. 261-268. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.15302/J-ENG-2015061>. [cit. 2023-12-15].
4. ASADNIAYE FARDJAHROMI, M.; NAZARI, H.; AHMADI TAFTI, S.M.; RAZMJOU, A.; MUKHOPADHYAY, S. et al. Metal-organic framework-based nanomaterials for bone tissue engineering and wound healing. Online. Materialstoday. 2022, č. 23, article 100670. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100670>. [cit. 2024-03-02].
5. BAIGUERA, Silvia; DEL GAUDIO, Costantino; LUCATELLI, Elena; KUEVDA, Elena; BOIERI, Margherita et al. Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. Online. PubMed. 2014, roč. 2013, č. 8, article PMID: 24215734. Dostupné z: PubMed, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.060>. [cit. 2023-12-11].
6. BARRY, Seán a O'RIORDAN, Alan. Electrochemical nanosensors: advances and applications. Online. 2016, s. 1-14. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/RIE.S80550>. [cit. 2024-02-06].
7. BATES, C. (2012). "Patients will 'grow' new organs from their own cells to replace failing body parts, says pioneering surgeon." Daily Mail.
8. BHARAT CHARBE, Nitin; TAMB UWALA, Murtaza; SRIVATSA PALAKURTHI, Sushesh; WAROKAR, Amol; HROMIĆ-JAHJEFENDIĆ, Altijana et al. Biomedical applications of three-dimensional bioprinted craniofacial tissue engineering. Online. Bioengineering & translational medicine. 2022, roč. 2023, article e10333. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/btm2.10333>. [cit. 2024-02-04].
9. BHATIA, Sangeeta N a INGBER, Donald E. Microfluidic organs-on-chips. Online. Nature Biotechnology. 2014, č. 32, s. 760–772. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt.2989>. [cit. 2024-02-06].

10. BHATTACHARYYA, Amitava; HAM, Hyeong-wook; SONH, JiAe; GUNBAYAR, Marla; JEFFY, R. et al. 3D bioprinting of complex tissue scaffolds with in situ homogeneously mixed alginate-chitosan-kaolin bioink using advanced portable biopen. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2023, č. 317, article 121046. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121046>. [cit. 2023-12-11].
11. BHATTACHARYYA, Amitava; JANARTHANAN, Gopinathan a Noh, Insup. Nano-biomaterials for designing functional bioinks towards complex tissue and organ regeneration in 3D bioprinting. Online. *Additive Manufacturing*. Roč. 2021, article 101639. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101639>. [cit. 2023-12-11].
12. BHATTACHARYYA, Amitava; JANARTHANAN, Gopinathan; TRAN, Hao Nguyen; HAM, Hyung Jun; YOON, JeongHyun et al. Bioink homogeneity control during 3D bioprinting of multicomponent micro/nanocomposite hydrogel for even tissue regeneration using novel twin screw extrusion system. Online. *Chemical Engineering Journal*. Roč. 2021, č. 128971. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128971>. [cit. 2023-12-11].
13. BLACK, J.B., et al. "Mammalian synthetic biology: engineering biological systems." *Annu Rev Biomed Eng* (2017).
14. CALIXTO, J.B. "The role of natural products in modern drug discovery." *An. Acad. Bras. Cienc.*, 91 (2019), Article e20190105.
15. CAMERON, D.E., et al. "A brief history of synthetic biology." *Nat Rev Microbiol* (2014).
16. DANG-NGUYEN, Thanh Quang a TORRES-PADILLA, Maria-Elena. How cells build totipotency and pluripotency: nuclear, chromatin and transcriptional architecture. Online. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015, s. 9-15. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.006>. [cit. 2024-02-06]
17. DIEDERICHS, Solvig; RÖKER, Stefanie; MARTEN, Dana; PETERBAUER, Anja; SCHEPER, Thomas et al. Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform. Online. *Biotechnol Prog*. 2009, s. 1762-1771. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/btpr.258>. [cit. 2024-03-04].
18. DROCHON, Agnès; LESIEUR, Romane a DURAND, Marlène. Fluid dynamics characterisation of a rotating bioreactor for tissue engineering. Online. *Medical*

- Engineering & Physics. 2022, roč. 105, article 103831. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2022.103831>. [cit. 2024-04-15].
19. DUBOIS, J.; MARTIN, Y.; CHOUINARD, J.A.; LECOMTE, R. a VERMETTE, P. 2.28 - Bioreactors for Tissue Engineering: Design, Applications, and Monitoring. Online. Reference Module in Life Sciences Comprehensive Biotechnology (Second Edition). 2011, s. 383-399. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00105-7>. [cit. 2024-02-09].
20. E, Woollacott. Artificial blood vessels made through 3D printing. TechGuru Daily. 2011.
21. EGGER, D.; TRIPISCIANO, C.; WEBER, V.; DOMINICI, M. a KASPER, C. Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. Online. Bioengineering (Basel). Roč. 2018. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.3390/bioengineering5020048>. [cit. 2024-03-04].
22. ESMAEILI, Yasaman; BIDRAM, Elham; BIGHAM, Ashkan; ATARI, Mehdi; NASR AZADANI, Reyhaneh et al. Exploring the evolution of tissue engineering strategies over the past decade: From cell-based strategies to gene-activated matrix. Online. Alexandria Engineering Journal. 2023, roč. 2023, č. 81, s. 137-169. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aej.2023.08.080>. [cit. 2024-02-03].
23. ETHAN LI, Yi-Chen. Sustainable Biomass Materials for Biomedical Applications. Online. ACS Biomater. Sci. Eng. Roč. 2019, s. 2079–2092. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01634>. [cit. 2024-02-04].
24. EUN SONG, Jeong; HOON LEE, Dae; KHANG, Gilson a YOON, Sun-Jung. Accelerating bone regeneration using poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite scaffolds containing duck feet-derived collagen. Online. International Journal of Biological Macromolecules. 2023, s. 486-495. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.296>. [cit. 2024-02-04].
25. FRIDLEY, Krista M.; FERNANDEZ, Irina; LI, Mon-Tzu Alice; B. KETTLEWELL, Robert a ROY, Krishnendu. Unique Differentiation Profile of Mouse Embryonic Stem Cells in Rotary and Stirred Tank Bioreactors. Online. Tissue Eng Part A. 2010, article PMC2965195, s. 3285–3298. Licence: 20528675. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1089/ten.tea.2010.0166>. [cit. 2024-04-15].
26. GLUCHANOVÁ, Olga. Navrhování nových materiálů pro tkáňové inženýrství. Online. 2021. Dostupné z: <https://minobrнауки.gov.ru/press-center/news/nauka/28588/>. [cit. 2024-02-03].

27. GU, Bingsong; HAN, Kang; CAO, Hanbo; HUANG, Xinxin; LI, Xiao et al. Heart-on-a-chip systems with tissue-specific functionalities for physiological, pathological, and pharmacological studies. Online. *Materials Today Bio*. 2024, č. 24, article 100914. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100914>. [cit. 2024-02-06].
28. H. Ravanbakhsh, V. Karamzadeh, G. Bao, L. Mongeau, D. Juncker, Y.S. Zhang, Emerging technologies in multi-material bioprinting, *Advanced Materials*, 33 (49) (2021), p. 2104730.
29. HASANIN, Mohamed S. Cellulose-Based Biomaterials: Chemistry and Biomedical Applications. Online. 2022, article 2200060. ISSN 00389056. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/star.202200060>. [cit. 2024-02-04].
30. HOWARD, Daniel; BUTTERY, Lee D.; SHAKESHEFF, Kevin M a ROBERTS, Scott J. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. Online. *Journal of Anatomy*. 2008, article 18422523, s. 66–72. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>. [cit. 2024-02-06].
31. CHADWICK, R. Ethics and Genetically Modified Crops. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2016, roč. 2016, č. 2, s. 8-12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00035-6>.
32. CHAN, B. P. a LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. Online. 2008, s. 467–479. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>. [cit. 2024-02-09].
33. CHAUDHURI, J. A.-R., Mohamed (2005). *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*, Springer Netherlands. ISBN: 978-1-4020-3740-5.
34. CHEN, Zhihao; ZHANG, Zihao; OUYANG, Yuanyong; CHEN, Yun; YIN, Xiaoshuang et al. Electrospinning polycaprolactone/collagen fiber coatings for enhancing the corrosion resistance and biocompatibility of AZ31 Mg alloys. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2023, č. 662, article 131041. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131041>. [cit. 2024-02-04].
35. CHERRY, R. S. a PAPOUTSAKIS, E. T. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. Online. *Biotechnol Bioeng*. 1998, article 18587818. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1002/bit.260320808>. [cit. 2024-04-02].

36. CHIA, J.J.; SHAMELI, K.; YUSEFI, M.; Ali, R.R.; BALASUNDRAM, V. et al. Preparation and application of cross-linked alginate nanoparticles as drug carrier: a review. Online. *Journal of Research in Nanoscience and Nanotechnology*. Roč. 2022, s. 1-11. Dostupné z: <https://akademiabaru.com/submit/index.php/jrnn/article/view/4492>. [cit. 2024-02-03].
37. CHUGUNOV, Anton. Kmenové buňky. Online. 2008. Dostupné z: *Biomolekula*, <https://biomolekula.ru/articles/shchadiashchie-stvolovye-kletki>. [cit. 2023-12-11].
38. CHUGUNOV, Anton. Přeměna jednoduché buňky na buňku kmenovou. Online. 2009. Dostupné z: *Biomolekula*, <https://biomolekula.ru/articles/byla-kletka-prostaia-stala-stvolovaia>. [cit. 2023-12-11].
39. JESKE, Richard; LEWIS, Shaquille; TSAI, Ang-Chen; SANDERS, Kevin; LIU, Chang et al. Agitation in a microcarrier-based spinner flask bioreactor modulates homeostasis of human mesenchymal stem cells. Online. *Biochemical Engineering Journal*. 2021, č. 168, article 107947. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X21000231>. [cit. 2024-03-25].
40. KANDA, Yuuhei; NISHIMURA, Itsurou; SATO, Toru; KATAYAMA, Aiko; ARANO, Taichi et al. Dynamic cultivation with radial flow bioreactor enhances proliferation or differentiation of rat bone marrow cells by fibroblast growth factor or osteogenic differentiation factor. Online. *Regenerative Therapy*. 2016, s. 17-24. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.06.001>. [cit. 2024-02-09].
41. KANDA, Yuuhei; NISHIMURA, Itsurou; SATO, Toru; KATAYAMA, Aiko; ARANO, Taichi et al. Dynamic cultivation with radial flow bioreactor enhances proliferation or differentiation of rat bone marrow cells by fibroblast growth factor or osteogenic differentiation factor. Online. *Regenerative Therapy*. 2016, č. 5, s. 17-24. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.06.001>. [cit. 2024-03-04].
42. KAŠPAROVÁ, Martina. Biologické vlastnosti scaffoldů studovaných pomocí bioreaktorů. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati, 2019.
43. KHAN, Muhammad Umar Asalm; RAZAK, Saiful Izwan Abd; REHMAN, Sarish; HASAN, Anwarul; QURESHI, Saima et al. Bioactive scaffold (sodium alginate)-g-

- (nHAp@SiO₂@GO) for bone tissue engineering. Online. 2022, č. 222, s. 462-472. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.153>. [cit. 2024-02-03].
44. KONG, F; MEHWISH, N; NIU, X; Lin, M; RONG, X et al. Personalized hydrogels for individual health care: preparation, features, and applications in tissue engineering. Online. Materialstoday Chemistry. 2021, č. 22, article 100612. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100612>. [cit. 2023-12-13].
45. KUNWONG, Natsuda; TANGJIT, Nathaphon; RATTANAPINYOPITUK, Kasem; DECHKUNAKORN, Surachai; ANUWONGNUKROH, Niwat et al. Optimization of poly (lactic-co-glycolic acid) -bioactive glass composite scaffold for bone tissue engineering using stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Online. Archives of Oral Biology. 2021, article 105041. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105041>. [cit. 2024-02-04].
46. LANGER, R., & VACANTI, J. P. (1993). "Tissue engineering." *Science*, 260(5110), 920-926.
47. LEDERBERG, J., & TATUM, E. L. (1946). "Gene recombination in *Escherichia coli*." *Nature*, 158(4016), 558.
48. LEE, Sanghoon; CHOI, Dami; SHIM, Jin-Hyung a NAM, Woong. Efficacy of three-dimensionally printed polycaprolactone/beta tricalcium phosphate scaffold on mandibular reconstruction. Online. Scientific Reports. 2020, article 4979. ISSN 20452322. Dostupné z: PubMed, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61944-w>. [cit. 2024-02-04].
49. LESIEUR R., DURAND M., DROCHON A. Mechanical characterization of a rotating bioreactor for tissue engineering. Biomat Congress 2021, Oct 2021, Bourg-Saint-Maurice, France. fahal-03358466v2
50. LIU, S. et al. (2023). Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications.
51. LURIA, S. E., & HUMAN, M. L. (1952). "A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses." *Journal of Bacteriology*, 64(4), 557-569.
52. MA, Qingming; MA, Haixia; XU, Fenglan; WANG, Xinyu a SUN, Wentao. Microfluidics in cardiovascular disease research: state of the art and future outlook.

- Online. *Microsyst Nanoeng.* 2021, č. 7. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41378-021-00245-2>. [cit. 2024-02-06].
53. MATAI, Ishita; KAUR, Gurvinder; SEYEDSALEHI, Amir; MCCLINTON, Aneesah a Laurencin, Cato T. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. Online. *Biomaterials.* 2020, article 119536. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536>. [cit. 2023-12-11].
54. MEHROTRA, Parikha. Biosensors and their applications – A review. Online. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research.* Roč. 2016, č. 13, article 3, s. 153-159. ISSN 2212-4268. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>. [cit. 2023-12-09].
55. Mirobiologynote. Typy bioreaktorů, konstrukce, díly, aplikace, omezení. Online. 2023, 29.6.2023. Dostupné z: https://microbiologynote.com/cs/bioreaktor/#What_is_a_Bioreactor. [cit. 2023-12-13].
56. *Modern genetic analysis/ Griffiths et al. – Freeman and company.* New York. 1999. – 675 p.
57. MOHEB AFZALI, Amirreza; AMIN KHERADMAND, Mohammad a MORTEZA NAGHIB, Seyed. Bioreactor design-assisted bioprinting of stimuli-responsive materials for tissue engineering and drug delivery applications. Online. *Bioprinting.* 2023, č. e00325. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00325>. [cit. 2023-12-13].
58. MOW, Van C.; RATCLIFFE, Anthony a POOLE, A. Robin. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. Online. *Biomaterials.* 1992, č. 13, s. 67-97. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90001-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90001-5). [cit. 2024-02-09].
59. NATHANS, D., SMITH, H. O., & ARBER, W. (1979). "Restriction endonucleases, simian virus 40 DNA, and recombination." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), 5269-5273.
60. NIKOLOVA, Maria P. a CHAVALI, Murthy S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. Online. *Bioactive Materials.* 2019, č. 4, s. 271-292. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>. [cit. 2023-12-13].

61. NIU, Xiaolian; XU, Zhiwei; DI, Mingzhao; HUANG, Di a LI, Xiaoming. Bioreactor strategies for tissue-engineered osteochondral constructs: Advantages, present situations and future trends. Online. *Composites Part B: Engineering*. 2023, article 110736. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110736>. [cit. 2024-02-09].
62. OBOKATA, Haruko a A. VACANTI, Charles. Chapter 31 - Stem Cells in Tissue Engineering. Online. *Principles of Tissue Engineering*. 2014, s. 595-608. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00031-8>. [cit. 2024-02-06].
63. OGURCOV, A.N. *Molekulární biotechnologie*. 1. Charkov: Charkov NTU "XPI", 2012. ISBN 978-617-05-0004-5.
64. ORIŇAKOVÁ, Renáta; GOREJOVÁ, Radka; ORSÁGOVÁ KRÁLOVÁ, Zuzana; HAVEROVÁ, Lucia; ORIŇAK, Andrej et al. Evaluation of mechanical properties and hemocompatibility of open cell iron foams with polyethylene glycol coating. Online. *Applied Surface Science*. 2022, č. 505, article 144634. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144634>. [cit. 2024-02-04].
65. P. SHARMA, Chandra; CHANDY, Thomas; G. THANKAM, Finosh a thomas, Vinoy. *Tissue Engineering, Current Status and Challenges*. Online. 1. Copyright © 2022 Elsevier Inc. All rights reserved., 2022. ISBN 978-0-12-824064-9. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2020-0-01183-7>. [cit. 2023-11-30].
66. PENG, Zhili; JI, Chunyu; ZHOU, Yiqun; ZHAO, Tianshu A LEBLANC, Roger M. Polyethylene glycol (PEG) derived carbon dots: Preparation and applications. Online. *About the journal Applied Materials Today*. 2020, article 100677. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100677>. [cit. 2024-02-04].
67. PENGLEI, Cui; PANPAN, Pan; LING, Qin; XINLUAN, Wang; XIAODONG, Chen et al. Nanoengineered hydrogels as 3D biomimetic extracellular matrix with injectable and sustained delivery capability for cartilage regeneration. Online. *Bioactive Materials*. 2023, č. 19, s. 487-498. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.032>. [cit. 2024-02-03].
68. PESHKOVA, Anastazie. Tkanové inženýrství představuje fascinující a perspektivní oblast moderní medicíny. Online. *Biomolekula*. 2019. Dostupné z: <https://biomolekula.ru/articles/tkanevaia-inzheneriia-okno-v-sovremennuiu-meditsinu#source-11>. [cit. 2023-12-11].

69. PLACE, Esli S. et al., 2008. Synthetic polymer scaffolds for Tissue engineering. *Chemical Society Reviews* [online]. 38(4), 1139-51 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1039/b811392k.
70. PONAMAREV, Alexander. Cévy na 3D tiskárně. Online. 2015. Dostupné z: <https://www.techinsider.ru/science/227061-krovenosnye-sosudy-napechatannye-na-3d-printere/>. [cit. 2023-12-11].
71. PRADYUMNA KUMAR, Sasmal Pradyumna A GANGULY, Somenath. Polymer in hemostasis and follow-up wound healing. Online. *Journal of Applied Polymer Science*. Roč. 2023, č. 140, article e53559. ISSN 00218995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.53559>. [cit. 2024-02-04].
72. Princip tkáňového inženýrství: ISN1804-6517. Online. In: WikiSkripta, projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy, příspěvek UK k výukovým zdrojům sítě lékařských fakult. 11. 1. 2019. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Tk%C3%A1%C5%88ov%C3%A9_in%C5%BEen%C3%BDrstv%C3%AD. [cit. 2023-12-11].
73. Principles of genetics. SNUSTAD P., SIMMONS M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
74. QIU, Lian-Qun; LAI, Wi S.; STUMPO, Deborah J. a BLACKSHEAR, Perry J. Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. Online. *Bio Protoc*. 2016. Dostupné z: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1859>. [cit. 2024-03-25].
75. RAUH, Julian. *Researchgate*. Online. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-view-of-a-spinner-flask-bioreactor-The-cell-scaffold-constructs-are-attached_fig2_51053899. [cit. 2024-03-25].
76. REDAKCE MN. *Microbiologynote.com*. Online. 2023, 6. 2023. Dostupné z: https://microbiologynote.com/cs/bioreaktor/#google_vignette. [cit. 2024-02-09].
77. REZA RAMEZANI, Mohammad; ANSARI-ASL, Zeinab; HOVEIZI, Elham a KIASAT, Ali Reza. Polyacrylonitrile/Fe(III) metal-organic framework fibrous nanocomposites designed for tissue engineering applications. Online. *Materials Chemistry and Physics*. 2019, č. 229, s. 242-250. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.03.031>. [cit. 2024-03-02].
78. REZANIA, Naghme; ASADI-EYDIVAND M., Asadi-Eydivand, Mitra; ABOLFATHI, Nabiollah; BONAKDAR, Shahin; MEHRJOO, Morteza et al. Three-

- dimensional printing of polycaprolactone/hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds mechanical properties and biological behavior. Online. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2022, article 35267105. ISSN 09574530. Dostupné z: PubMed, <https://doi.org/10.1007/s10856-022-06653-8>. [cit. 2024-02-04].
79. ROSSER, J. a Thomas, D.J. 10 - Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue. Online. *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery. Techniques and Applications*. 2018, s. 191-215. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101103-4.00010-7>. [cit. 2023-12-15].
80. SANTORELLI, M., et al. "Synthetic development: building mammalian multicellular structures with artificial genetic programs." *Curr. Opin. Biotechnol.*, 59 (2019), pp. 130-140.
81. SANTOS, Fátima; PETERS, Antoine H.; OTTE, Arie P.; REIK, Wolf a DEAN, Wendy. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. Online. *Developmental Biology*. 2005, s. 225–236. ISSN 00121606. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.025>. [cit. 2024-02-06].
82. SAWITZKE, J.A., BARENGHI, A., THOMASONOVÁ, L., COSTANTINO, N., COURT, D. " Recombineering: A Modern Approach to Genetic Engineering." Reference Module in Life Sciences, 2023. DOI: 10.1016/B978-0-12-822563-9.00100-1.
83. SCOGNAMIGLIO V., ARDUINI F., PALLESCHI G., Rea G. Biosensing technology for sustainable food safety. *Trends Anal Chem*. 2014; 62:1–10, [cit. 2024-02-04]
84. SEKAR, Muthu Parkkavi; SURESH, Shruthy; ZENNIFER, Allen; SETHURAMAN, Swaminathan A SUNDARAMURTHI, Dhakshinamoorthy. Hyaluronic Acid as Bioink and Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering Applications. Online. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2023, s. 3134–3159. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00299>. [cit. 2024-02-04].
85. SERAFIN, Aleksandra; CULEBRAS, Mario A COLLINS, Maurice N. Synthesis and evaluation of alginate, gelatin, and hyaluronic acid hybrid hydrogels for tissue engineering applications. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, č. 223, article 123438. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123438>. [cit. 2024-02-03].

86. Shen, Yong; LI, Dong; KOU, Xinhui; WANG, Rui; LIU, Fusheng et al. Ultrafast ring-opening copolymerization of lactide with glycolide toward random poly(lactico-glycolic acid) copolymers by an organophosphazene base and urea binary catalysts. Online. Royal society of chemistry. Polymer Chemistry. 2022, č. 13, s. 1861-1868. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/d1py01653a>. [cit. 2023-12-15].
87. SHMID, Rolf D. TASCHENATLAS der Biotechnologie und Genetechnik. 2. Moskva: binom laboratorie znaniy, 2015. ISBN 978-5-9963-2407-1.
88. SHPICHKA, Anastazie. Jak se vytváří umělé orgány. Online. RBK. RBK. 2023, 16.01.2023. Dostupné z: <https://trends.rbc.ru/trends/innovation/61ee9a699a794713f2a809bd>. [cit. 2023-11-30].
89. SHUAI, Cijun; YANG, Wenjing; FENG, Pei; PENG, Shuping a PAN, Hao. Accelerated degradation of HAP/PLLA bone scaffold by PGA blending facilitates bioactivity and osteoconductivity. Online. Bioactive Materials. 2021, s. 490-502. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.09.001>. [cit. 2024-02-04].
90. SIKAVITSAS, Vassilios I.; BANCROFT, Gregory N. a MIKOS, Antonios G. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. Online. 2002. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.10150>. [cit. 2024-02-09].
91. SMALLWOOD, Sébastien A.; TOMIZAWA, Shin-Ichi; KRUEGER, Felix; RUF, Nico; CARLI, Natasha et al. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. Online. Nature Genetics. 2011, s. 811 - 814. ISSN 15461718. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ng.864>. [cit. 2024-02-06].
92. SMITH, H. O., & WILCOX, K. W. (1970). "A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties." Journal of Molecular Biology, 51(2), 379-391.
93. SOLAIMUTHU, Anbuthiruselvan; VIJAYAN, Ane Nishitha; MURALI, Padmaja a korrapati, PURNA Sai. Nano-biosensors and their relevance in tissue engineering. Online. Current Opinion in Biomedical Engineering. Roč. 2020, č. 13, s. 84-93. ISSN 2468-4511. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.12.005>. [cit. 2023-12-09].

94. SUAMTE, Laldinthari; TIRKEY, Akriti A JAYASEKHAR BABU, Punuri. Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications. Online. *Smart Materials in Medicine*. 2023, č. 4, s. 243-256. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smaim.2022.09.005>. [cit. 2024-02-04].
95. SUGIMOTO, Asuna; MIYAZAKI, Aya; KAWARABAYASHI, Keita; SHONO, Masayuki; AKAZAWA, Yuki et al. Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells. Online. *Scientific Reports*. 2017, article 17696. ISSN 20452322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18089-0>. [cit. 2024-02-09].
96. ŠĚLKUNOV, S. N. Modelování hybridní DNA. - Novosibirsk: Věda, 1987.- 168 s.
97. TEIXEIRA, A.P., FUSSENEGGER, M. "Engineering mammalian cells for disease diagnosis and treatment." *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 55, 2019, pp. 87-94.
98. TEMIN, H. M., & MIZUTANI, S. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." *Nature*, 226(5252), 1211-1213.
99. UCM, Ruschoni; AEM, Mera; LHB, Zamudio; KUMAR, Vinod; Taherzadeh, Mohammad J. et al. Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid: status, innovation, market and applications. Online. 2022, article 35436410, s. 9645–9661. ISSN 21655979. Dostupné z: PubMed, <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2057760>. [cit. 2024-02-04].
100. ULLAH, Saleem a CHEN, Xin. Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. Online. 2020, č. 20, article 100656. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100656>. [cit. 2024-02-03].
101. UMAR ASLAM KHAN, Muhammad; AZHAR ASLAM, Muhammad; BIN ABDULLAH, Mohd Faizal; HASAN, Anwarul; A. SHAH, Saqlain et al. Recent perspective of polymeric biomaterial in tissue engineering— a review. Online. *MATERIALSTODAY CHEMISTRY*. Roč. 2023. ISSN 101818. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2023.101818>. [cit. 2023-12-09].
102. VALIZADEH, Nasrin; SALEHI, Roya; ROSHANGAR, Leila; AGBOLAGHI, Samira a MAHKAM, Mehrdad. Towards osteogenic bioengineering of human dental pulp stem cells induced by incorporating *Prunus amygdalus dulcis* extract in polycaprolactone-gelatin nanofibrous scaffold. Online. *Journal of Applied*

- Polymer Science. 2022, article e52848. ISSN 00218995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.52848>. [cit. 2024-02-04].
103. VAN BLITTERSWIJK C. Tissue engineering. 1st ed. London: Academic, 2008. ISBN 978-012-3708-694. [cit. 2024-03-04].
104. VIKTORIOUS. Mýty naše doby: Geneticky modifikované organismy. Online. 2013. Dostupné z: <https://habr.com/ru/articles/171273/>. [cit. 2023-11-13].
105. Vzboltay. Co je fermentor? Jaký by měl být? Online. 11.2019. Dostupné z: <https://vzboltay.com/alkohol/vodka/1590-fermenter-cto-eto.html>. [cit. 2023-12-13].
106. WANG, J. DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review. Online. 1998. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(98\)00039-6](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(98)00039-6). [cit. 2024-02-04].
107. WHITNEY, GA; JAYARAMAN, K; DENNIS, JE a Mansour, JM. Bezvazné chrupavčité tkáně, vystavené tření a tlaku, ukazují poškození v podobě praskání a oddělování povrchu. Online. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Roč. 2017, s. 412–424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002 / term.1925>. [cit. 2024-02-03].
108. WIELAND, M., et al. "Engineering molecular circuits using synthetic biology in mammalian cells." Annu Rev Chem Biomol Eng (2012).
109. WONG, Tzyy-Yue; CHANG, Sheng-Nan; JHONG, Rong-Chang; TSENG, Ching-Jiunn; SUN, Gwo-Ching et al. Closer to Nature Through Dynamic Culture Systems. Online. Cells. 2019, roč. 8, article PMC6769584. Licence: PMID: 31438519. Dostupné z: <https://doi.org/doi: 10.3390/cells8090942>. [cit. 2024-04-11].
110. YILGOR HURI, Pinar; TEMPLE, Joshua P.; HUNG, Ben P.; COOK, Colin A. a GRAYSON, Warren L. Chapter 9 - Bioreactor Technology for Oral and Craniofacial Tissue Engineering. Online. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. 2015, s. 117-130. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00011-4>. [cit. 2024-02-09].
111. YUAN, Zhiang; DING, Junjie; ZHANG, Yu; HUANG, Bin; SONG, Zhaohui et al. Components, mechanisms and applications of stimuli-responsive polymer gels. Online. European Polymer Journal. 2022, č. 177, article 111473. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111473>. [cit. 2023-12-15].

112. ZHANG, Feng; QU, Kai-Yun; ZHOU, Bin; LUO, Yong; ZHU, Zhen et al. Design and fabrication of an integrated heart-on-a-chip platform for construction of cardiac tissue from human iPSC-derived cardiomyocytes and in situ evaluation of physiological function. Online. Biosensors and Bioelectronics. 2021, article 113080. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113080>. [cit. 2024-02-06].
113. Zohar, B., Y. Blinder, D. J. Mooney and S. Levenberg (2018). "Flow-Induced Vascular Network Formation and Maturation in Three-Dimensional Engineered Tissue." ACS Biomaterials Science & Engineering 4(4): 1265-1271.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

GI – genetické inženýrství

TI – tkáňové inženýrství

ECM – extracelulární matrix

PEG – polyethylenglykol

PGA – polyglykolidy

PCL – polykaprolakton

PVC – polyvinylchlorid

ES – embryonální kmenové buňky

BM-MSCs - mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě

UC-MSCs - mezenchymální kmenové buňky z pupečnickové krve

MOFs - Metal-organic frameworks

PCL - polykaprolakton

PVDF - polyvinylidenufluorid

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 -Schéma popisující získání první rekombinantní DNA Peterem Bergem, vlastní obrázek inspirováno (Šělkunov S. N., 2004).	16
Obrázek 2 - Schéma pro získání rekombinantní DNA podle S. Cohena. Plazmidová DNA byla štěpena restriční enzymem, který produkuje přesahující jednořetězcové komplementární (lepivé) konce. Tato DNA byla smíchána s fragmenty cizí DNA ošetřené stejným restričním enzymem. Lepivé konce různých molekul DNA se znovu spojují v důsledku komplementárních interakcí a DNA ligáza kovalentně zesítuje řetězce do jednotlivých molekul. Vlastní obrázek, inspirováno (Šělkunov S. N., 2004).	17
Obrázek 3 – Princip tkáňového inženýrství (WikiSkripta, projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlové).	23
Obrázek 4 – Morfologie embryonálních kmenových buněk myši (linie buněk ESR1) při zvětšení 100x, vlastní fotografie pořízená pomocí inverzního mikroskopu (Olympus).	25
Obrázek 5 – Myši embryonální fibroblasty (NIH/3T3), vlastní fotografie pořízená pomocí inverzního mikroskopu (Olympus). Zvětšení je 100x.	27
Obrázek 6 - Zjednodušený časový přehled pokroku v technologii tkáňového inženýrství. Vlastní obrázek, inspirováno (Yasaman et al., 2023).	29
Obrázek 7 – Generování signálu optickým biosenzorem. Vlastní obrázek (Inspirováno Solaimuthu et al., 2020).	30
Obrázek 8 - Využití biomateriálů v tkáňovém inženýrství (přeloženo: Umar Aslam Khan et al., 2023).	31
Obrázek 9 –A) síťované (B) dBECM-gelatin (C) síťované dBECM-gelatin (D) rohože (Baiguera, S., et al., 2014).....	38
Obrázek 10 – Schéma ilustrující zdroj (tkáň/orgány) personalizovaných hydrogelů a jejich využití v oblasti tkáňového inženýrství a reparace (upraveno dle Kong et. al., 2021).	40
Obrázek 11 – Využití bioreaktoru pro genové inženýrství (vlastní obrázek).	48
Obrázek 12 – Základní typy bioreaktorů: a – mechanické míchaní, b – míchaní pomocí plynu, c – vnitřní cirkulace plynu, d – vnější cirkulace plynu (přeloženo Ogurcov 2012).	49
Obrázek 13 - Schematický náčrt bioreaktoru spinner flasks (upraveno dle Rauh 2024).	51

- Obrázek 14** – Rotační bioreaktor (RCCS-4) od společnosti Synthecon Incorporated. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 52
- Obrázek 15** – Perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated,. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 54
- Obrázek 16** – Použitá linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Vlastní fotografie. Zvětšení 100x. 64
- Obrázek 17** – Schematické znázornění průběhu dynamické kultivace. Přeloženo Lesieur et al., 2021. 65
- Obrázek 18** – Díly, ze kterých se skládá perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated, který byl použit v praktické části. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 66
- Obrázek 19** – Perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated, naplněný kultivačním médiem se scaffoldem a zapojený do peristaltické pumpy. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 67
- Obrázek 20** – Nádoba bioreaktoru, naplněna kultivačním médiem se scaffoldem. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 68
- Obrázek 21** - Nádoba bioreaktoru, naplněna kultivačním médiem se scaffoldem vloženým do plastové kazety pro minimalizaci kontaktu s kyslíkem. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 69
- Obrázek 22** - Perfuzní rotační bioreaktor od společnosti Synthecon Incorporated, naplněný kultivačním médiem se scaffoldem, vloženým do plastové kazety, umístěný v inkubátoru pro následující kultivaci. Zdroj: Laboratoř buněčné biologie, Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (vlastní fotografie). 70

Obrázek 23 – Buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 po kultivaci za a) dynamických podmínek, b) statických podmínek, c) statických podmínek s úpravou materiálu pomocí želatiny, d) reference za statických podmínek. Buněčná jaderná DNA (tyrkysová barva) a aktinová vlákna (červená barva). Zvětšení fotografií je 40x a 100x.
..... 71

Obrázek 24 – Druhé měření: Buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 po kultivaci za a) dynamických podmínek, b) statických podmínek, c) statických podmínek s úpravou materiálu pomocí želatiny, d) reference za statických podmínek. Buněčná jaderná DNA (tyrkysová barva) a aktinová vlákna (červená barva). Zvětšení fotografií je 40x a 100x.
..... 74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Funkce ECM v nativních tkáních a scaffoldu v uměle vytvořených tkáních (Chan a Leong 2008).	39
--	----

