

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2023

Bc. Michael Pejskar



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH HYDROGELŮ PRO APLIKACE TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

POLYMERIC HYDROGELS PREPARATION FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michael Pejskar

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

BRNO 2023

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Bc. Michael Pejskar

ID: 196786

Ročník: 2

Akademický rok: 2022/23

NÁZEV TÉMATU:

Příprava polymerních hydrogelů pro aplikace tkáňového inženýrství

POKyny PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte rešerši v oblasti struktury polymerních materiálů a jejich jedinečných aplikací v oblasti tkáňového inženýrství. 2) Seznamte se s metodami přípravy hydrogelů pro výrobu polymerních scaffoldů. Prozkoumejte fyzikálně-chemické vlastnosti hydrogelů, jako jsou mechanické vlastnosti a degradovatelnost hydrogelů. 3) Navrhněte vhodné materiály a metodiku přípravy hydrogelu vhodných vlastností pro tvorbu scaffoldu se zaměřením na buněčnou biokompatibilitu. 4) Připravte hydrogel předpokládaných vlastností a s jeho využitím připravte a vyhotovte scaffold s využitím dostupné biotiskárny. 5) Proveďte analýzu buněčné kompatibility scaffoldu. 6) Dosažené výsledky statisticky zpracujte a diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] Li X, Sun Q, Li Q, Kawazoe N, Chen G. Functional hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering applications. *Frontiers in chemistry*. 2018 Oct 22;6:499.
- [2] Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*. 2001 Jul 11;101(7):1869-80.

Termín zadání: 6.2.2023

Termín odevzdání: 22.5.2023

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

prof. Ing. Valentine Provazník, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá vlastnostmi polymerních hydrogelů, jejich složením a biokompatibilitou. Teoretická část obsahuje popis jednotlivých typů tkáně, popis hydrogelů a biotisku. Praktická část se zabývá přípravou hydrogelů, analýzou jejich vlastností a jejich biotiskem.

Klíčová slova

Biotisk, 3D biotisk, bioinkoust, polymerní hydrogely, tkáně

Abstract

The thesis deals with properties of polymer hydrogels, their composition and biocompatibility. Theoretical part contains description of all types of tissues, description of hydrogels and bioprinting. Practical part contains preparation of hydrogels, analyses of their properties and their bioprinting.

Keywords

Bioprinting, 3D bioprinting, bioink, polymer hydrogels, tissues

Bibliografická citace

Michael Pejskar. **Příprava polymerních hydrogelů pro aplikace tkáňového inženýrství**. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2023. 22.5. příloh. Diplomová práce. Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

Pozn.: Bibliografická citace je generována informačním systémem.

PROHLÁŠENÍ

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení studenta:	Michael Pejskar
VUT ID studenta:	196786
Typ práce:	Diplomová práce
Akademický rok:	2022/23
Téma závěrečné práce:	Příprava polymerních hydrogelů pro aplikace tkáňového inženýrství

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne: 22. května 2023

podpis autora

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	8
ÚVOD	9
1. TKÁNĚ.....	10
1.1 KOSTNÍ TKÁNĚ	13
2. BIOTISK A BIOINKOUST	15
2.1 POLYMERNÍ HYDROGELY	15
2.1.1 Síťování.....	16
2.1.2 Alginát.....	16
2.1.3 Karagen	17
2.1.4 Fibrinogen	17
2.1.5 Kyselina hyaluronová	17
2.1.6 Kolagen.....	18
2.1.7 Želatina	18
2.1.8 Chitosan	18
2.1.9 Akrylové kyseliny a jejich deriváty.....	18
2.2 VLASTNOSTI HYDROGELŮ	19
3. BIOINKOUST PRO KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	20
4. PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ HYDROGELŮ.....	26
4.1 TEST VISKOZITY	26
4.2 TEST TVRDOSTI A PRUŽNOSTI	26
4.3 TEST BIOKOMPATIBILITY	26
4.4 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	27
4.4.1 Příprava hydrogelu z alginátu, želatiny a kolagenu	27
4.4.2 Příprava hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím apatitu.....	27
4.4.3 Příprava hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím SiO ₂	28
4.4.4 Příprava hydrogelu z chitosanu, želatiny a glycerol fosfátu.....	29
4.4.5 Možná vylepšení hydrogelů.....	29
4.5 BIOTISKUTÍ HYDROGELŮ	29
4.5.1 Biotisk hydrogelu z alginátu, želatiny a kolagenu.....	30
4.5.2 Biotisk hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím apatitu	30
4.5.3 Biotisk hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím SiO ₂	30
4.5.4 Biotisk hydrogelu z chitosanu, želatiny a glycerol fosfátu	30
5. ZÁVĚR.....	32
LITERATURA.....	33
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	38

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr 1-1 Schéma stavby kosti.....	14
----------------------------------	----

ÚVOD

Jedním z hlavních účelů tkáňového inženýrství jsou náhrady tkání. Z důvodů zvyšujících se případů nemocí, jako jsou kardiovaskulární onemocnění nebo rakoviny, se tento obor rychle rozvíjí. U těchto onemocnění dochází často k poškození a nekróze tkání a následné snížení nebo úplné ztrátě funkce daného orgánu. A proto je snaha toto poškození opravit a nahradit uměle vytvořenými tkáněmi nebo strukturami, které pomohou ke správné regeneraci tkáně. K tomuto účelu se využívá tzv. scaffold, který slouží jako podpora pro růst, diferenciaci a proliferaci buněk. Scaffold se musí skládat z vhodných materiálů, které jsou co nejpříznivější a nejlépe podporují výše popsané funkce buněk. Pro jeho tvorbu slouží různé techniky jako jsou například vymrazování, decelularizace a biotisk.

Tato práce se zabývá tvorbou scaffoldu z polymerních hydrogelů pro náhradu kostní tkáně. K jejich tvorbě je používán 3D biotisk. První kapitola práce obsahuje popis základních typů tkání. Druhá kapitola se zabývá stručným popisem jednotlivých částí a procesů biotisku a popisem bioinkoustu, především polymerními hydrogely a jejich vlastnostmi. Praktická část práce se zabývá rešerší v oblasti polymerních hydrogelů pro kostní tkáňové inženýrství. Tato část obsahuje zejména rešerši v oblasti hydrogelů z alginátu, želatiny, chitosanu a jejich kombinací. Dále se praktická část práce zabývá přípravou vybraných hydrogelů a jejich analýzu. Nakonec obsahuje stručný popis parametrů biotisku vybraných gelů. V rámci těchto kapitol jsou stručně popsány protokoly přípravy a biotisku.

1. TKÁNĚ

Tkáně jsou soubory buněk, které mají stejný tvar, původ a mají jednu hlavní funkci. Tkáně se dále dělí na epitelové, pojivové, svalové a nervové. Zvláštním typem tkáně je krev. Děj, kterým se nerozlišené buňky tvarově a funkčně stávají buňkami určitých tkání, se nazývá diferenciací.

Epitel je složený z buněk, které jsou pevně a těsně spojeny. Podle autorů v [1] tyto buňky nasedají na vrstvu, která se nazývá bazální membrána. Tato vrstva slouží pro výměnu a regulaci makromolekul mezi epitelem a pojivem, které je uloženo pod ním. Epitely se dělí buď podle tvaru na epitel plošný, trámčitý a retikulární. Nebo podle funkce na krycí (výstelkový), řasinkový, žlázový, resorpční, respirační, svalový a smyslový.

Svalová tkáň je specializovaná na pohyb. V plazmě svalových buněk, která se nazývá sarkoplasma, se nachází kontraktilní vlákna zvaná myofibrily. Tyto vlákna obsahují myofilamenta, která obsahují kontraktilní proteiny aktin a myosin. Svalová tkáň se dělí na tři hlavní typy: svalovina hladká, příčně pruhovaná a srdeční.

Buňky hladké svaloviny se nazývají leiomyocyty. Mají protáhle vřetenovitý tvar a jedno protáhlé jádro. Jejich délka se liší podle orgánu, kterého jsou součástí. Autoři v [1] uvádí, že ve stěně malých cév délka buněk měří 15 μm a ve stěně dělohy až 500 μm . Myofilamenta jsou v buňkách uspořádána do sítě a chybí jejich periodické střídání tlustých a tenkých vláken. Buňky jsou navzájem spojeny mezibuněčným spojením zvaným *gap junction*, které umožňuje přenos podráždění z jedné buňky na druhou. Díky tomuto spojení se svalovina chová jako jedna kontraktilní jednotka. Hladká svalovina je inervována sympatikem a parasympatikem, ale její kontrakce může být vyvolána i pomocí hormonů, například: oxytocinem, estrogenem a vasopresinem.

Základní funkční jednotka příčně pruhované svaloviny je svalové vlákno. Je to mnohoaderný útvar, jehož jádra jsou umístěna pod buněčnou membránou (sarkolemou) a obsahuje podélně orientované myofibrily. Myofibrily se skládají z tenkých aktinových myofilament, tlustých myozinových myofilament a vazebných proteinů. Podle autorů v [1] se ve světelné mikroskopii v této svalovině rozlišují dva proužky: tmavší A a světlejší I proužek. I proužky jsou rozpuštěny tmavou Z linií. Úsek myofibrily od jedné Z linie k druhé se nazývá sarkomera. V A proužku se uprostřed rozlišuje světlejší úsek zvaný H proužek, který je rozpuštěný tmavší M linií. Svalová vlákna se dělí podle rychlosti kontrakce na tři typy: rychlá, pomalá a přechodná. Je inervována mozkomíšními nervy a bez jejich podnětů nefunguje a atrofuje. Příčně pruhované svalstvo se vyskytuje především jako kosterní svalovina.

Posledním typem svaloviny je příčně pruhovaná srdeční svalovina. Skládá se z kardiomyocytů, které mají podobnou stavbu, jako svalová vlákna, ale obsahují pouze jedno jádro. Tyto buňky jsou spojeny interkalárními disky a tvoří tak síť. Interkalární disky umožňují rychlý přenos podráždění z buňky na buňku. Dále jsou v srdeční svalovině přítomny specializované buňky na autonomní tvorbu a rozvod vzruchů. Tento systém se nazývá převodní systém srdeční.

Dalším druhem tkáně je tkáň nervová. Základní funkční jednotkou je neuron. U neuronu se rozlišují dvě hlavní části: tělo (perikaryon) a výběžky. Výběžky se dále dělí na dendrity a axon. Dendrity slouží pro příjem vzruchů a axon slouží pro vysílání impulzů z těla neuronu. Axony se mohou větvit a vytvářet tak struktury zvané telodendrie. Pro převádění vzruchů na další neuron nebo tkáň slouží synapse. Autoři v [1] uvádí, že neurony se dělí podle počtu dendritů na neurony apolární, unipolární, bipolární, pseudounipolární a multipolární. Dále se rozlišují myelinizovaná a nemyelinizovaná vlákna. Myelinizovaná jsou tvořena myelinem, který umožňuje efektivnější a rychlejší přenos vzruchu a je tvořen Schwannovými buňkami nebo oligodendrocyty (v centrální nervové soustavě). Neurony vytváří impulz pomocí akčního potenciálu. Dalším typem buňky nervové tkáně jsou astrocyty, které slouží pro podporu nervové tkáně.

Pojivové tkáně se skládají z buněk a mezibuněčné hmoty, podle které se dále dělí na vazivo, chrupavku a kost. Mezibuněčná hmota obsahuje dvě hlavní složky: amorfni a vláknitou složku. Amorfní složka podle autorů v [1] je složena s protein-polysacharidového komplexu, iontů a vody. Vlákenná složka obsahuje vlákna kolagenní, elastické a retikulární. Mezibuněčná hmota je syntetizována buňkami pojiv ve formě prekurzorů. Buňky poté secernují tyto prekurzory do mezibuněčného prostoru, kde polymerizují v amorfni a vláknité složky mezibuněčné hmoty.

Vazivo je první typ pojivové tkáně, který se za vývoje vytváří. Jeho mezibuněčná hmota obsahuje velké množství vody a malé množství vláknité složky. A proto je vazivo měkké a poddajné. Buněčná složka se skládá z buněk fixních a bloudivých. Buňky fixní jsou trvale usídlené ve vazivu a patří k nim fibroblasty, retikulární buňky (součástí retikulárního vaziva), pigmentové buňky (obsahují melanin) a tukové buňky (hromadí tukové kapénky). Autoři v [1] uvádí, že fibroblasty secernují prekurzory amorfni a vláknité složky mezibuněčné hmoty především bílkoviny, jako je kolagen a elastin, a glykoproteiny. Produkují také růstové faktory, které ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk. Pokud fibroblast přestane produkovat prekurzory mezibuněčné hmoty, setrvává v klidu a je stavebně zapojen do vaziva, stane se fibrocytem, který se může znovu aktivovat ve fibroblast. Bloudivé buňky jsou ve vazivu umístěny volně. Mezi tento typ buněk patří makrofágy, které mají schopnost améboidního pohybu a fagocytózy, dále žírné buňky (produkují heparin a histamin), plazmatické buňky (produkují

imunoglobuliny) a krevní elementy (bílé krvinky). Vlákenná složka mezibuněčné hmoty obsahuje 3 typy vláken: vlákna kolagenní (převážně kolagen I), elastická (elastin) a retikulární (kolagen III).

Vazivo se dělí podle množství buněk, mezibuněčné hmoty a převažujícím typem vláken. První typ vaziva je mesenchym. Podle autorů v [1] je to embryonální tkáň, ze které se vyvíjí ostatní druhy vaziva nebo jiná pojiva. Mezibuněčná hmota mesenchymu je tvořena převážně amorfni složkou a až později ve vývoji se v ní objevují jemná kolagenní vlákna. Další typ je vazivo rosolovitě. Také je to tkáň embryonální a obsahuje kromě buněk kolagenní a retikulární vlákna. Nejrozšířenější je vazivo kolagenní, ve kterém převažují kolagenní vlákna. Dělí se na řídké a tuhé vazivo. Řídké kolagenní vazivo obsahuje všechny typy vláken (kolagenní, elastické a retikulární) a vyplňuje místa uvnitř a mezi jednotlivými orgány a útvary. Účastní se látkové výměny a výživy ostatních tkání, protože kyslík a ostatní látka, které tyto tkáně přijímají z krve, musí řídkým vazivem procházet. Tuhé kolagenní vazivo má převahu tlustých kolagenních vláken nad buňkami a ostatními typy vláken. Mohou být uspořádané, které vytváří vazy, fibrózní blány (*fascie*) nebo okostice, a neuspořádané, které se nachází ve např ve škáře kůže. Dalším typem vaziva je elastické vazivo. Obsahuje velké množství elastických vláken, a proto je se jeví jako žluté. Toto vazivo vytváří některé vazy, jako jsou např. *ligamenta flava* na páteři. Pátým typem vaziva je retikulární vazivo, které tvoří prostorovou síť lymfatických tkání, kostní dřevě a sleziny. Poslední je vazivo tukové, které je vazivo vmezeřené a obsahuje tukové buňky. Tukové buňky syntetizují tuk ze sacharidů a fungují jako rezervoár energie, tepelný izolant a mechanická ochrana. Rozlišuje se bílá a hnědá tuková tkáň.

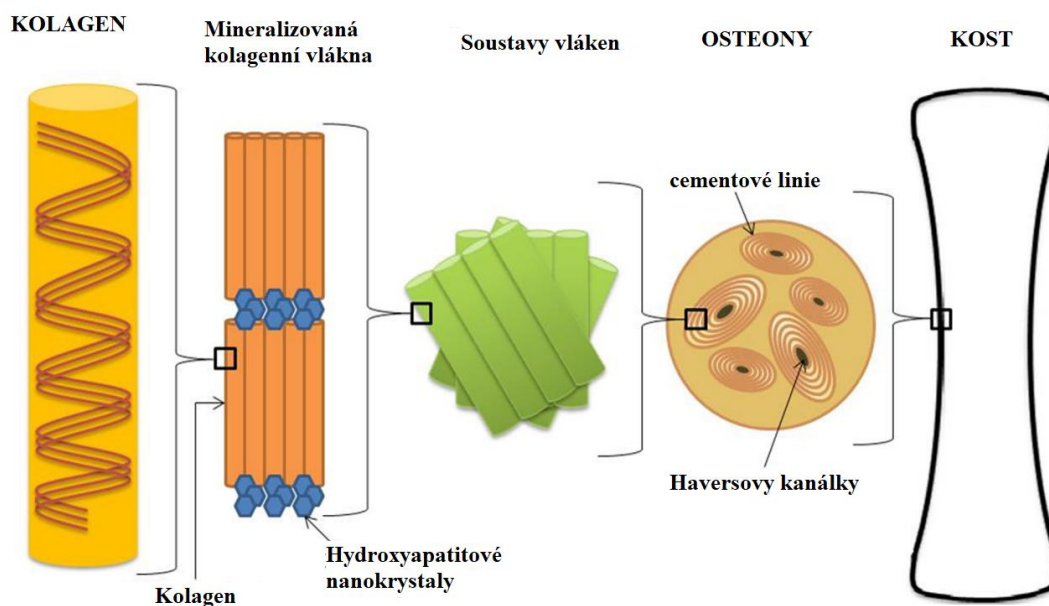
Chrupavka je dalším typem pojivové tkáně. Je pevná a tuhá, ale není tvrdá. Její mezibuněčná hmota, která je průsvitná a tuhá, stejně jako vazivová tkáň obsahuje vláknitou složku. Podle autorů v [1] se skládá převážně s kolagenu typu II, ale i menšího množství ostatních typů, a hydratovaného gelu složeného z glykoproteinů a proteoglykanů. Buněčná složka chrupavky obsahuje chondrocyty, které jsou uloženy v mezibuněčné hmotě, a chondroblasty, které jsou schopné množení. Chondrocyty produkují komponenty mezibuněčné hmoty. Na povrchu chrupavky se nachází vazivová vrstva zvaná perichondrium, která postupně přechází v chrupavku. Tato vrstva obsahuje cévy, které vyživují pomocí difuze chrupavku. V chrupavce rozlišujeme struktury zvané chondrony. Jsou to základní stavební jednotky, které vznikají tak, že z perichondria vystupují svazky vláken do mezibuněčné hmoty a obkružují skupiny buněk. Ty následně fungují jako polštáře, které jsou uzavřené mezi svazky vláken. Tímto uspořádáním se zvyšuje pevnost chrupavky proti tahu a tlaku. Chrupavka se dělí podle množství buněk a mezibuněčné hmoty a podle množství a typu vláken na chrupavku buněčnou, hyalinní, elastickou a vazivovou.

První druh chrupavky je chrupavka buněčná neboli parenchymová. Je to chrupavka embryonální, ze které vznikají ostatní typy. Obsahuje minimální množství mezibuněčné hmoty. Další typem je chrupavka hyalinní, která se skládá z kulovitých nebo ovoidních chondrocytů. Autoři v [1] uvádí, že chondrocyty mohou být jednotlivě nebo v takzvaných isogenetických skupinkách. V hyalinní chrupavce převažuje mezibuněčná hmota a může dosahovat až 95 % jejího objemu. Třetí druh chrupavky je chrupavka elastická. Obsahuje kolagenní a elastická vlákna, kvůli kterým je velmi pružná a nažloutlá. Buňky zde tvoří isogenetické skupiny a jsou rovnoměrně rozprostřené v mezibuněčné hmotě. Posledním druhem je chrupavka vazivová. Skládá se z silných kolagenních vláken (kolagen typu I), mezi kterými jsou malé ostrůvky buněk. A proto je tento typ chrupavky velmi pevný. Nachází se například v meziobratlových discích nebo je součástí menisků.

1.1 Kostní tkáň

Kostní tkáň je nejtvrdějším type pojivové tkáně. Její základní funkce jsou ochrana a opora těla. Mezibuněčná hmota obsahuje složku organickou, která se nazývá osteoid, a anorganická minerální složku. Osteoid obsahuje vlákna kolagenu I, která jsou sjednocena základní amorfni hmotou. Do organické složky se ukládá anorganická složka, která obsahuje krystaly solí. V kostní tkáni se nachází tři základní typy buněk: osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Osteoblasty produkují prekurzory základní hmoty, kterými se postupně obklopují a mění se v osteocyty. Buňky jsou tak uloženy v dutinkách zvané lakuny. Osteocyty mineralizují základní amorfni hmotu a účastní se tak regulace hladiny vápníku v těle. Tento typ buněk se může změnit zpět v osteoblasty nebo buňky retikulární. Výběžky osteocytů vstupují do kanálků zvanými *canaliculi ossium*. Poměr složky organické a anorganické se s věkem mění. Autoři v [1] uvádí, že u novorozenců tvoří anorganická složka přibližně 48 % a v dospělosti se zvyšuje na 60 % a více. Kostní tkáň je tedy v mládí pružnější a postupně s věkem křehne. Kostní tkáň vytváří nepravidelné nebo pravidelné vrstvy zvané lamely. Nejtypičtější uspořádání lamel je Haversův systém, což je až dvacet koncentricky uspořádaných lamel kolem centrálního Haversova kanálu. Schéma stavby kostní tkáně můžeme vidět na Obr 1-1. Dále rozlišujeme dva hlavní typy kostní tkáně: kost hutná (*substantia compacta*) a kost houbovitá (*substantia spongiosa*).

Většinu objemu kosti tvoří mezibuněčná hmota. Jak už bylo zmíněno rozlišujeme v ní organickou a anorganickou složku. Organická složka je tvořena převážně kolagenem typu I. Podle autorů v [1] se v ní nachází glykosaminoglykany, například chondroitinsulfát, keratansulfát a kyselina hyaluronová. A glykoproteiny, jako jsou osteokalcin a kostní silaoprotein. Anorganická složka je převážně tvořena hydroxiapatitem. Dále obsahuje fosforečnan vápenatý a uhličitan vápenatý.



Obr 1-1 Schéma stavby kosti

Buňky obsahují na svém povrchu adhezivní molekuly, což jsou, podle autorů v [2], membránové proteiny, které umožňují mezibuněčnou komunikaci. Rozlišují se čtyři základní skupiny: imunoglobulin podobné molekuly, integriny, cadheriny a selektiny. V imunitním systému hrají důležitou roli pro zahájení a udržení imunitní reakce.

2. BIOTISK A BIOINKOUST

Biotisk je technika, která umožňuje tisknout zároveň živé buňky, biomateriály (hydrogely apod.) a ostatní biomolekuly a vytvářet tak tkáně a orgány. Tisknutí začíná sbíráním dat z pacientů pomocí CT, MRI nebo ostatních zobrazovacích metod. Následuje vytvoření modelu, který má dané rozměry a strukturu. Poté je samotné tisknutí jednotlivých vrstev, které se liší podle typu tisku. Rozlišuje se inkoustový, laserově asistovaný a vytlačující biotisk [5].

Vytlačující biotisk je nejběžnějším typem biotisku z výše popsaných metod. Pomocí této metody lze tisknout různé biomateriály, jako jsou například vysoce viskózní kapaliny, hydrogely a termoplasty, v různých velikostech. Pro vytlačení viskózních látek se využívá pneumatické, pístové a šroubové metody. Pro správné tisknutí je nutné optimalizovat viskozitu látky, použitý tlak, tvar a průměr jehly. V této práci byl použit vytlačující biotisk inkredible+ od firmy CELLINK, který je podrobněji popsán v kapitole 4.5 [5].

Bioinkoust se skládá z materiálů rozpustných ve vodě, jako jsou polymerní hydrogely. Podle autorů v [4] tyto materiály musí být co nejvíc přirozené pro buňky, aby se co nejvíce zvýšila jejich životaschopnost. Dále musí mít dostačující reologické vlastnosti pro jejich tisknutí a aby udržely dostatečně dlouhou dobu svůj tvar. Pokud je hydrogel příliš tuhý dochází při jeho tisknutí ke zvýšenému stresu na buňky, což může způsobit jejich smrt (apoptózu) nebo zamezení jejich migrace. Autoři v [5] uvádí, že bioinkoust se dělí podle jejich použití na funkční, obětní a podpůrný. Funkční bioinkoust slouží jako scaffold pro podporu buněk. Obsahuje elementy pro jejich přichycení a podporu jejich růstu, migrace, proliferace a diferenciací. Podpůrný a obětní bioinkoustu slouží pro podporu funkčních bioinkoustů. Zlepšuje jejich vlastnosti, jako je lepší kvalita tisknutí, mechanická stabilita a podpora struktury. Některé typy lze po vytisknutí odstranit, aniž by se poškodila struktura gelu nebo jeho funkčnost. Pro jejich odstranění se využívá teplota nebo chelatační činidla.

2.1 Polymerní hydrogely

Polymery jsou vysokomolekulární látky, které se skládají ze základních jednotek zvané monomery. Podle původu se dělí na syntetické polymery, jako jsou podle [6] například methakrylát, polyethylen glycol a kyselina polylaktidová, a biopolymery. Mezi biopolymery především patří proteiny a polysacharidy. Polymery tvoří síť pomocí jevu zvaném síťování. Je to spojování jednotlivých řetězců pomocí síťujícího činidla na jednu velkou makromolekulu. Množství síťujícího činidla nepřímo úměrně závisí na velikosti relativní molekulové hmotnosti polymeru. Zesíťované části jsou nerozpustné ve vodě.

Polymer se tak skládá z částí, které jsou rozpustné ve vodě a které nejsou. Hydrogely jsou vodou nabotnané sítě polymerů.

2.1.1 Síťování

Pro zajištění udržení tvaru vytisknutého gelu se podle autorů v [5] používá proces zvaný síťování. Síťování patří především mezi úpravy po vytištění a ovlivňuje stabilitu gelů. Dělí se podle mechanismu působení na iontové (chemické), termální, enzymatické a foto síťování.

Iontové síťování je velmi rychlé a využívá reakci polyelektrolytu nebo specifických iontů s polymery. Při kultivaci buněk dochází k vyluhování iontů, což způsobuje nestabilitu gelů a omezuje tak jeho dlouho době využití. Tento typ síťování se využívá u alginátových gelů (více v kapitole 2.1.2 a 3). Termální síťování využívá termo responzivní vlastnosti polymerů, při kterých se mění ze solu na gel. Polymery mají buď dolní kritickou hodnotu nebo horní kritickou hodnotu roztoku, při kterých dochází k tuhnutí. Materiály, které využívají toto síťování, jsou například kolagen a želatina. Síťování s využitím enzymů vytváří stabilní a nevratné struktury, ale trvá delší dobu než předchozí druhy. Tato metoda je dražší a náročnější, a proto je její využití omezeno. Poslední metodou je foto síťování, která za pomoci UV záření a fotoreaktivních molekul nebo fotoiniciátorů vytváří kovalentní vazby s polymery a vytváří tak struktury. Avšak UV záření a nezreagované fotoiniciátory jsou toxické pro buňky [5].

2.1.2 Alginát

Alginát je nerozvětvený polysacharid. Podle autorů v článku [7] je produkován hnědými řasami (*Phaeophyceae*) nebo bakteriemi a nachází se v jejich buněčných stěnách. Je v hnědých řasách jako gel, který obsahuje sodíkové, vápenaté, hořečnaté, stronciové a barnaté ionty. Především vápenaté ionty jsou zodpovědné za jeho pevnost. Podle článku [5] výhodou alginátu pro tisknutí je jeho flexibilní viskozita, bioinertnost a jednoduché síťování.

Autoři v [9] uvádí, že se alginát skládá z 1,4- β -D kyseliny manuronové (M blok) a 1,4- α -L kyseliny glukuronové (G blok). Tyto monomery se skládají do heterogenních nebo homogenních segmentů, které vytvářejí řetězec polymeru. V článku [7] autoři uvádí, že G bloky vytvářejí tuhé struktury, což způsobuje vyšší houževnatost polymeru. Algináty s vyšším počtem M bloků jsou více imunogenní a vyvolávají produkci cytokininů než algináty s vyšším počtem G bloků. Flexibilita se také mění v závislosti na typu segmentu, kde MG segmenty mají nevyšší a GG nejnižší. Poměr a rozložení segmentů a bloků se liší podle druhu řas a jejich části.

Viskozita alginátu závisí nepřímo úměrně na teplotě, přímo úměrně na koncentraci a nepřímo na molekulové hmotnosti, která je v rozsahu 10 000 – 600 000 g/mol, jak uvádí autoři v [5]. Problém alginátu je, že neobsahuje místa pro připojení buněk, která podporují adhezi, proliferaci, šíření a diferenciaci buněk. Proto se pro zlepšení tohoto nedostatku využívá v kombinaci s ostatními biomateriály nebo molekulami uzpůsobující buněčnou adhezi. Dále nedostatečná viskozita při nižších koncentracích způsobuje tvarové deformace a při vyšších koncentracích je zapotřebí vyššího tlaku při tisknutí.

2.1.3 Karagen

Podobně jako alginát karagen je aniontový sulfátový polysacharid, který se nachází ve stěnách červených mořských řas (*Rhodophyceae*). Podle autorů v [8] se vyskytuje v šesti formách, které se liší v obsahu síranů, rozpustnosti ve vodě a zdroje. Rozlišuje se Kappa (κ), Iota (ι), Lambda (λ), Mí (μ), Ný (ν) a Théta (θ) karagen. Nejpopulárnější jsou κ , ι a λ karageny díky jejich vynikajícímu gelovatění a viskoelastickým vlastnostem. Jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 200 až 800 kDa. Formují hydrogely za přítomnosti mono nebo divalentních kationtů, jako jsou například draselné nebo vápenaté kationty, díky interakcí mezi nimi a sulfátovými skupinami.

2.1.4 Fibrinogen

Fibrinogen je vláknitý plazmatický protein s relativní molekulovou hmotností 340 000, jak uvádí autoři v [7]. Účastní se důležitých procesů, jako jsou homeostáza, trombóza a adheze a shlukování krevních destiček. Fibrinogen se polymerizuje pomocí enzymu serinové proteázy trombin na vláknitou a gelovitou strukturu zvanou fibrin. Fibrin je jednou z hlavních komponent při srážení krve, která slouží pro tvorbu krevních sraženin [5].

2.1.5 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je polysacharid, který se nachází v lidském těle jako součást výplně měkkých tkání. Podle autorů v článku [11] se skládá z disacharidových podjednotek glukuronátu sodného a N – acetylglukosaminu. Její glykosaminoglykanová skupina má stejnou strukturu jak u bakterií, tak u zvířat, a je netoxická pro lidské buňky. Proto existuje velké množství druhů kyseliny hyaluronové. Její molekulová hmotnost se také mění podle druhu organismu. Lidská kyselina hyaluronová má nejvyšší molekulovou hmotnost (5 000 000-10 000 000 Da), zatímco bakteriální má nejnižší (1 500 000 – 2 500 000 Da) a zvířecí má středně velkou (4 000 000 – 6 000 000 Da). Vyšší molekulová hmotnost způsobuje vyšší viskozitu gelů a tím jejich lepší tisknutí. Kyselina hyaluronová slouží jako ligand pro několik membránových receptorů a je tak součástí důležitých buněčných procesů. Příklad receptorů je CD44, který je součástí procesu adheze, cytokinese a buněčného růstu. Kyselina hyaluronová samovolně enzymaticky nebo iontově

negelovatí, a proto je nutné použít vhodné síťování nebo ozáření. Je také mechanicky nestabilní [5].

2.1.6 Kolagen

Kolagen je protein, který se skládá ze tří α řetězců, jak uvádí autoři v [12]. Řetězce jsou v určitých oblastech složeny do sebe a tvoří tak trojitou šroubovicovou (helix) strukturu. Tyto oblasti se skládají z opakující se trojce aminokyselin, kde jedna z nich musí být glycin a ostatní jsou velmi často prolin a hydroxyprolin. Uspořádání a množství těchto oblastí ovlivňuje větvení kolagenu, a proto se rozlišuje až 28 typů kolagenu. Jak je uvedeno v kapitole 1.1, kolagen je součástí mezibuněčné hmoty pojivové tkáně a je tvořen fibroblasty. Obsahuje vazebná místa pro buněčné adheze, proliferace a diferenciaci, a proto je velmi příznivý pro buňky. Dále se účastní buněčné signalizace a transdukce mezi buňkami nebo mezibuněčnou hmotou. Obsahuje také vazebná místa pro integriny. Kolagen se mění ze solu na gel za fyziologických teplot díky jeho termo responzivním vlastnostem. Podle autorů v [5] čistý kolagen nemá dostačující mechanické vlastnosti a nedá se tisknout. A proto se využívá například foto síťování pomocí fotoiniciátoru irgacure a UV záření.

2.1.7 Želatina

Želatina vzniká tepelnou, kyselinovou nebo zásaditou denaturací kolagenu. Podle autorů v [14] její řetězec se skládá z aminokyselin glycin, prolin a 4-hydroxyprolin. Podobně jako kolagen obsahuje buněčné vazebné molekuly. Podle typu denaturace vzniká kyselá nebo zásaditá. Přeměna na gel probíhá už při 30 °C a závisí na koncentraci, rozpouštědle a typu síťování. Velkou výhodou želatiny je jeho vysoká biokompatibilita, degradovatelnost, elasticita a nižší antigenicita než u kolagenu, jak autoři uvádí v [13].

2.1.8 Chitosan

Chitosan je polysacharid, který se získává N-deacetylací chitinu, jak autoři uvádí v [13]. Chitin je základní stavební složkou kutikuly bezobratlých živočichů a je součástí buněčné stěny buněk hub. Skládá se z N – glukosaminu a N – acetyl – D – glukosaminu, které jsou v řetězci náhodně rozprostřené a jsou spojeny β - (1,4) glykosidickými vazbami. Má polyelektrolytový a kationtový charakter, dobrou biodegradabilitu, působí protisrážlivě a hemostaticky, má analgetické účinky a působí antitumorigenicky.

2.1.9 Akrylové kyseliny a jejich deriváty

Mezi nejběžnější syntetické polymery využívané ve tkáňovém inženýrství patří akrylové a methakrylové kyseliny. Jsou to karboxylové kyseliny, které polymerizují. Pro výrobu hydrogelů se kromě jejich esterů využívá 2-hydroxyethylmethakrylát (dále HEMA), jak autoři uvádí v [6]. HEMA lidské tělo dobře snáší a udržuje stálý tvar, a proto se hojně využívá v lékařství např. k výrobě kontaktních čoček a pro aplikace léků. Její propustnost a míra hydrofility závisí na síťovacích činidlech. Dalším derivátem kyseliny akrylové je

methakrylová želatina (dále GelMA). Je složena z anhydridu kyselina akrylové a želatiny a gelovatí za přítomnosti fotoiniciátorů [4].

2.2 Vlastnosti hydrogelů

Jak už bylo v předchozí kapitole 2.1 zmíněno, hydrogely musí mít vhodné reologické vlastnosti pro jejich správné tisknutí. Tyto vlastnosti bioinkoustu jsou měřeny buď stresovým nebo napěťovým reometrem. Jsou charakterizovány parametry, které jsou: úložný modul, ztrátový modul a viskozita. Měření probíhá před a po síťování bioinkoustu. U vytlačujících biotisků je často bioinkoust bez síťování, a proto je viskozita velmi důležitým a nejběžněji používaným parametrem. Střihové ztenčení (vnitřní tření kapalin) je dalším reologickým parametrem, který závisí na viskozitě. U gelů s vyšší viskozitou je nutno vyvinout vyšší tlak při vytlačování, což poškozuje buňky a tiskárnu. Charakterizace reologických vlastností bioinkoustu probíhá ve třech krocích. První krok probíhá u počátečního výtoku bioinkoustu do přístroje a určuje se závislost viskozity na vnitřní třecí síle, které odpovídá mezi průtažnosti. Mez průtažnosti je minimální síla, která je potřebná vyvolat na kapalinu, aby začala téct. Pokud tato síla je příliš vysoká, může dojít k poškození buněk a vybavení. V druhém kroku, který nastává po vytlačení z biotiskárny, se viskozita snižuje se zvyšující se rychlostí proudění, což je vhodné pro nepřetržité vytlačování inkoustu, formování jednotlivých vláken a zlepšení přežití buněk. Avšak viskozita nesmí klesnout pod určitou hodnotu, neboť se z nepřetržitého proudu stanou kapky. Třetí krok je ve fázi obnovy po vytištění. Schopnost obnovy bioinkoustu je charakterizována změnou viskozity v daném čase, která závisí na změně tvaru a rozptýlu buněk. Testováním a analýzou viskozity se dále zabývá kapitola 4.1 [4][13].

Dalšími důležitými vlastnostmi gelů jsou mechanické vlastnosti. Buňky jsou senzitivní na mechanické změny ve svém okolí a mohou tak měnit své chování, a proto je vhodné, aby gel měl určitou tvrdost. Tu lze zvýšit například změnou polymeru nebo zvýšením hustoty síťování. Hlavními parametry mechanických vlastností jsou tedy tvrdost, viskoelasticita, mez průtažnosti a napětí. Hodnoty těchto parametrů by se měly blížit hodnotám dané tkáně. U náhrad kostní tkáně je obzvláště důležité, aby gel měl dostatečnou tvrdost a elasticitu. Tyto parametry nejenom ovlivňují tvar gelu, ale také chování buněk. Testováním těchto vlastností se dále zabývá kapitola 4.2 [4][13].

Hydrogel by měl obsahovat póry o vhodné velikosti. Póry usnadňují vaskularizaci a růst kostní tkáně. Autoři v [13] uvádí, že průměrná velikost póru se pohybuje kolem 300 μm . Větší velikost pórů podporuje tvorbu kostní tkáně díky většímu prostoru pro přísun živin a kyslíku, avšak snižuje tvrdost gelu. Ideální velikost pórů by se měla pohybovat mezi 50 až 900 μm .

3. BIOINKOUST PRO KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Příprava a analýza polymerních hydrogelů v této a následujících kapitolách bude zaměřena pro náhrady kostní tkáně. Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.2, gel pro kostní tkáňové inženýrství musím mít správné vlastnosti. Velký ohled by se měl zejména brát na tvrdost, elasticitu, biokompatibilitu a degradovatelnost. Podle článku [13] je modul pružnosti kortikální kosti 14-20 GPa. Dále musí být brán ohled na viskozitu pro správné tisknutí. Některé gely, které jsou popsány v kapitole 2.1, neobsahují adhezivní a podpůrné molekuly pro buňky kostní tkáně, a proto se do gelů přidávají různá činidla, jako je například fosforečnan vápenatý (viz dále).

Další důležitou vlastností je tisknutelnost gelu a jeho plasticita (viz kapitola 2.2). Tu lze měnit a ovlivňovat několika způsoby. První metodou je změna koncentrace gelu. Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.2 viskozita přímo úměrně závisí na koncentraci, a tedy pro zvýšení viskozity lze jednoduše zvýšit koncentraci gelu. To však nelze použít pro všechny polymery, protože při vyšší koncentraci se zvyšuje hustota vláken polymerů v jeho struktuře a tím se zvyšuje stres na buňky. Polymery mají tedy jistý limit do kdy lze zvyšovat jejich koncentraci, např. pro GelMA je limit 30 w/v%. Další typ regulace je pomocí nanočástic. V této metodě se vkládají nanočástice do hydrogelu, které následně mění jeho mechanické a chemické vlastnosti. Příkladem nanočástic jsou nanovlákná celulózy (viz dále) nebo grafen. Poslední metodou je regulace pomocí reverzibilního síťování. Činidla reverzibilního síťování způsobují zvýšenou aktivitu mezi molekulami v gelu a tím zvyšují jeho viskozitu. Tyto činidla s molekulami gelů vytváří nekovalentní vazby, protože se velmi rychle vytvářejí a rozbíjejí. Příkladem metod jsou iontové koordinování a supermolekulární akce [4].

Jedním z nejběžněji používaných materiálů pro tvorbu hydrogelů pro tisknutí tkání je alginát. Jak už bylo zmíněno v 2.1.2 alginát obsahuje některé vhodné vlastnosti, zejména jednoduché gelování, je netoxický, levný a běžně dostupný. Pro dosažení dostatečné pevnosti je molekulová hmotnost alginátu příliš vysoká a následně v lidském těle velmi špatně degraduje, protože molekulová hmotnost přesahuje limit vstřebávání ledvin. Autoři v [15] připravili dva typy hydrogelů ze sodného alginátu z hnědé řasy *Laminaria hyperborea* a *Macrocystis pyrifera*. Pro jejich gelování byly využity vápenaté ionty z roztoku uhličitanu vápenatého a D – glukanu – δ – laktanu (dále GDL). Bylo zjištěno, že hustota síťování se zvyšuje se snižující se rychlostí gelování a je tedy možné vytvořit stabilní gely s nižší koncentrací vápenatých iontů a alginátu. Dále bylo zjištěno, že modul pružnosti gelů přímo úměrně závisí na koncentraci alginátu a molárním poměru mezi vápenatými ionty a karboxylovými skupinami. V [16] autoři testovali

závislost gelovatění alginátu sodného na typu iontu (zinek a vápník) pro krytí ran s využitím vnitřního gelovatění. Byly využity zinečnaté a vápenaté ionty jako sloučeniny uhličitan zinečnatý s hydroxidem zinečnatým a uhličitan vápenatý. Pro jejich navázání na alginát bylo také využito GDL. Bylo zjištěno, že hydrogely se zinečnatým síťováním lépe zadržují vodu, ale mez pevnosti je nižší než u gelů s vápenatým síťováním. Také jsou méně stabilní ve fosfátovém pufru a musí být chemicky upraveny, například pomocí chloridu vápenatého. Alginát je tedy více specifický pro vápenaté ionty než pro zinečnaté. Dále ve [17] autoři připravili hydrogely z alginátu sodného se síťováním pomocí barnatými, vápenatými a směsí obou iontů. Ionty byly získány ze sloučenin chloridu vápenatého a chloridu barnatého. Pro síťování alginátu bylo využito vnějšího gelovatění pomocí dialyzační trubice. Bylo zjištěno, že síťování pomocí barnatých iontů hůře bobtná, ale udržuje svoji strukturu déle (až 24 hodin) než vápenaté síťování, z důvodu větší velikosti atomů barya než vápníku. Nevýhodou alginátu jsou jeho mechanické vlastnosti, zejména jeho tvrdost, které nejsou dostačující pro úplnou náhradu kostní tkáně. Alginát ale má podobné vlastnosti jako mezibuněčná hmota kostní tkáně, a proto ho lze využít jako doručovací systém pro buňky nebo v kombinaci s dalšími polymery. Methakrylát lze zkombinovat s alginátem pomocí foto síťování a využitím fotoinicátoru (např. irgacure). Po excitaci polymerů a fotoinicátoru UV zářením se vytvářejí kovalentní vazby mezi řetězci polymeru. Tento typ síťování, který byl podrobněji zmíněn v kapitole 2.1.1, může být toxický pro buňky. Dále může dojít k nedokonalému zgelovatění hydrogelu z důvodu nerovnoměrného osvětlení všech částí gelu. Bioaktivní sklo nebo ostatní křemičitany lze také zkombinovat s alginátovými hydrogely. Tyto hydrogely dosahují vyšších tvrdostí a podporují tvorbu krystalů fosforečnanu vápenatého. Autoři v článku [18] vytvořili alginátový hydrogel s příměsí křemíku ve formě tetraethyl orthosilikátu. Bylo zjištěno, že modul pružnosti je blíží modulu pružnosti kosti. V článku [19] autoři provedli studii v oblasti využití alginátu pro vytlačující biotisk. Autoři uvedli, že alginát lze využít v mnoha oblastech tkáňového inženýrství, jako jsou například kostním, chrupavkovém, očním, srdečním a očním tkáňové inženýrství. Jak už bylo výše zmíněno, samotný alginát má nízké mechanické vlastnosti, a proto se nejčastěji používá s dalšími polymery, jako je například želatina a kolagen, a s využitím síťování, například CaCl_2 . Bylo zjištěno, že alginát lze dobře tisknout pomocí vytlačující biotiskárny, protože se vyznačuje dobrými charakteristikami smykového ztenčení a lze vytvářet pórovité scaffoldy, které podporují růst a proliferaci buněk. Dalším hydrogelem z alginátu, který lze tisknout pomocí biotiskárny, připravili autoři v [20]. Hydrogel se skládá z alginátu sodného, želatiny a hydrolyzovaného kolagenu typu I. Bylo použito síťování alginátu pomocí vápenatých iontů z CaCl_2 pro zlepšení stability. Autoři uvádí, že ideální poměr alginátu a želatiny pro dosažení optimálního tisknutí, dostatečných mechanických vlastností a biokompatibility je 1:5, neboli 15 % (w/v) alginátu, 3 % (w/v) želatiny a 0,5 % (w/v) kolagenu typu I. V článku [21] autoři připravili hydrogel z alginátu a želatiny, do kterého byly přidány nano částice SiO_2 , pro zlepšení mechanických vlastností

hydrogelu, a CaCl_2 , jako činidlo pro síťování alginátu. Bylo zjištěno, že viskozita se zvyšuje podle koncentrace SiO_2 nanočástic až po koncentraci 2,5 wt%, a modul tlaku se podstatně zvýšil, ale bobtnání a degradace gelu se zhoršila. Dále bylo zjištěno, že biokompatibilita a osteogeneze se zvýšila po přidání SiO_2 nanočástic. Dalším možným vylepšením hydrogelů z alginátu a želatiny připravili autoři v článku [22]. Při přípravě byla želatina rozpuštěna v Na_2HPO_4 a tím byla dosažena mineralizace. Bylo zjištěno, že Youngův modul pružnosti se výrazně zvýšil a proliferace buněk byla také stimulována [9].

Dalším materiálem pro výrobu hydrogelů je chitosan. Jak už bylo v kapitole 2.1.8 zmíněno chitosan je biokompatibilní a dobře biodegradabilní polysacharid. Chitosanové hydrogely tvoří pórovité struktury, které se podobají kostní tkáni. V [23] autoři připravili hydrogel z čistého chitosanu. Chitosan byl nejprve rozpuštěn v roztoku močoviny a hydroxidu sodného. Poté byl namáčen ve vodě a tepelně zpracován. Bylo zjištěno, že chitosan lze rozpustit také v zásaditých roztocích. Takto rozpuštěný chitosan je termo responzivní a při zvyšující se teplotě gelovatí. Dále bylo zjištěno, že gel má mnohem vyšší tažnou sílu. Autoři v článku [24] připravili methakrylový glykol chitosan s využitím lysozymu, pro urychlení degradace chitosanu a zlepšení porozity gelu. Hydrogel byl zasítován pomocí viditelného světla a příměsí vitamínů (riboflavin apod.). Byla zjištěna zvýšená proliferace buněk, ale podstatně nižší tuhost hydrogelu. Dalším příkladem hydrogelu z chitosanu připravili autoři v článku [25]. Autoři do gelu přidali nano krystaly celulózy pro zvýšení mechanických vlastností. Bylo zjištěno, že viskozita byla po přidání celulózy a buněk vyšší a Youngův modul se také zvýšil. Dále bylo zjištěno, že hydrogel podporuje osteogennou diferenciaci a gelování závisí na hustotě buněk ve směsi.

Chitosan lze stejně jako alginát míchat s ostatními polymery. Želatina a polyakrylát jsou nejtýpější příměsí, které lze využít pro zlepšení funkcí chitosanových hydrogelů. Autoři v [26] připravili hydrogel z chitosanu a želatiny s využitím genipinu jako činidlo pro síťování. Genipin se nachází v rostlinách a reaguje s aminoskupinami proteinů. Bylo zjištěno, že tyto gely celkově absorbují méně vody s rostoucí koncentrací genipinu, ale bobtnání probíhá rychleji. Dále bylo zjištěno, že pórovitost gelu závisí nepřímo úměrně hmotnostnímu procentu chitosanu vůči želatině. Důvodem je, že gely byly připravovány metodou vymrazování, kde při vyšší viskozitě gelu se tvoří menší krystalky ledu a tím se snižuje velikost pórů. Takto připravené gely mají dobré biokompatibilní vlastnosti a lze je využít pro podávání léků. Dalším příkladem chitosan-želatinového hydrogelu připravili autoři v [27], kde pro zlepšení vlastností použili nanomateriály z oxidu křemičitého a zlata. Nejprve byl vytvořen roztok chitosanu, želatiny a methakrylátu a roztok oxidu křemičitého a zlata. Následně bylo vytvořeno několik hydrogelů s různými koncentracemi roztoku oxidu křemičitého a zlata pomocí foto síťování s využitím UV záření a činidla irgacure. Bylo zjištěno, že hydrogely

s využitím oxidu křemičitého a zlata měly lepší mechanické a elektrické vlastnosti než chitosan-želatinové hydrogely. Dále bylo zjištěno, že se zlepšila degradace a bobtnání gelů. Buněčný růst a adheze byla také vyšší. V článku [28] autoři připravili termo senzitivní hydrogel z chitosanu a β -glycerol fosfátu disodného, který gelovatí při teplotě 37 °C. Při přidání glycerol fosfátu do roztoku chitosanu se pH zvýší z důvodu neutralizace fosfátových skupin. Takto vzniklý roztok je za fyziologických hodnot pH v kapalném stavu a gelovatí při teplotě 37 °C. Bylo zjištěno, že teplota, při kterém začíná gelovatění, nezávisí na koncentraci chitosanu a glycerol fosfátu a se zvyšující se koncentrací chitosanu a glycerol fosfátu se snižuje doba gelovatění, ale zvyšuje se cytotoxicita, kde při koncentraci glycerol fosfátu vyšší než 20 % w/v dochází k úmrtí všech buněk ve vzorku. Nejvyšší proliferace buněk nastala při koncentraci 2 % (w/v) chitosanu a 5 % (w/v) glycerol fosfátu. Dalším příkladem hydrogelů z chitosanu a želatiny připravili autoři v článku [29] pro regeneraci spojení mezi šlachou a kostí. Podobně jako v předchozím případě, byl do vzorků přidán glycerol fosfátu. Bylo testováno, zda hydrogely obsahující kolagenázu umožňují lepší regeneraci tkání než hydrogely bez ní. Studie byla provedena na skupině králíků, kteří byli rozděleny do skupin podle času testování regenerace tkání. Bylo zjištěno, že hydrogely obsahující kolagenázu urychlují léčení kostní tkáně. Podobné termo senzitivní hydrogely, složené z chitosanu, želatiny a glycerol fosfátu, které byly popsány výše, připravili autoři v [30] jako bioinkoust pro biotisk. Autoři zjistili, že se zvyšující se rychlostí tisknutí se snižuje velikost vláken polymerů. V článku [31] autoři připravili hydrogel z alginátu, polyakrylamidu, chitosanu a želatiny pomocí metody vzájemného proplétání polymerních sítí. Tato metoda spočívá v tom, že řetězce dvou proteinů jsou mezi sebou propleteny nebo jeden z řetězců polymerizuje v síti druhého. Takto vzniklé struktury mají značnou tvrdost a velikou pevnost v tlaku. Také lze snadno kontrolovat bobtnání a degradaci gelů. Autoři v [31] vytvořili hydrogel z alginátu sodného a polyakrylamidu s přidáním vrstev chitosanu a želatiny. Nejdříve byla vytvořena směs alginátu sodného a polyakrylamidu, do které byly následně přidány komponenty pro iontové síťování alginátu a kovalentní síťování polyakrylamidu. Poté na tento gel byly nanесeny jednotlivé vrstvy chitosanu s pozitivním nábojem a vrstvy želatiny s negativním nábojem. Takto bylo vytvořeno 5 gelů s rozdílným poměrem akrylamidu a alginátu sodného od 40 % z celkové hmotnosti až po 80 %. Bylo zjištěno, že gely s nižším poměrem akrylamidu než 60 % měly dobrou biodegradabilitu a umožňují dostatečnou buněčnou proliferaci a diferenciaci. Důvodem je, že s vyšším podílem akrylamidu se snižuje počet pórů a zhušťují se jejich stěny, a tak dochází ke sníženému přísunu živin k buňkám, ale zlepšují se mechanické vlastnosti gelů. Další hydrogel, který lze tisknout pomocí 3D biotisku, připravili autoři v článku [32]. Byl připraven z alginátu sodného, karboxymethyl chitosanu a želatiny. Pro zlepšení mechanických vlastností bylo využito síťování alginátu pomocí CaCl_2 . Bylo zjištěno, že po přidání karboxymethyl chitosanu do gelu se zlepšily jeho mechanické vlastnosti, bobtnání a biokompatibilita zůstala přibližně stejná. V článku [33] autoři využili irgacure

2959, jako fotoiniciátor pro foto síťování hybridních hydrogelů, které byly připraveny z N, O – malein chitosanu. Malein chitosan byl použit, protože má aniontový charakter a může sloužit, jako spojení pro biologicky aktivní látky nebo jako podpora ukládání anorganických minerálů. Pro usnadnění foto síťování autoři použili polyetylen glykol diakrylát. Bylo zjištěno, že výsledné hydrogely jsou pH senzitivní a mají nízkou cytotoxicitu. Dále bylo zjištěno, že změnou poměru malein chitosanu a polyetylen glykol diakrylátu a změnou molekulové hmotnosti polyetylen glykol diakrylátu lze regulovat bobtnání, mechanické a morfologické vlastnosti gelů.

Karagenan se podobně jako alginát využívá pro dodání léků nebo v tkáňovém inženýrství. Také ho lze kombinovat s dalšími polymery, jako je například GelMA. Autoři v článku [34] připravili hydrogel z κ -karagenu a GelMA s využitím nanosilikátů metodou nano inženýrské iontově kovalentní zapletení. Tato metoda se skládá ze dvou hlavních částí: iontově kovalentní zapletení a nano vyztužení. V tomto případě iontově kovalentní zapletení zprostředkovává síť polymerů κ -karagenu a GelMA. S využitím iontového síťování κ -karagen vytváří křehkou síť podobnou extracelulárnímu matrixu, zatím co GelMA vytváří elastické struktury. Kombinací těchto dvou polymerů vznikají mechanicky pevné a houževnaté hydrogely. Nanosilikáty umožňují vytvářet s polymery nekovalentní elektrostatické vazby a působit tak, jako vratné síťování a mají osteogenní vlastnosti. Autoři zjistili, že ideální koncentrace GelMA, κ -karagenu a nanosilikátu jsou 7,5 %, 1 % a 2 %. Koncentrace nižší, než zvolené hodnoty způsobovaly zhroucení struktury gelu, zatím co koncentrace vyšší způsobovaly ucpání jehly při biotisku.

Příkladem komerčních gelů pro 3D biotisknutí jsou GelXA BONE [35] a CELLINK BONE [36] od firmy CELLINK. Hydrogel CELLINK BONE je složen z alginátu sodného, vysoce hydratovaných nanovláken celulózy, fosforečnanu vápenatého pro zvýšení osteokonduktivity a osteoinduktivity a vhodného pufru. Dále tento produkt obsahuje síťovací činidlo, které obsahuje chlorid vápenatý, D – mannitol a HEPES pufr. GelXA BONE obsahuje GelXA, který je složen z alginátu, GelMA a xanthalové gumy. Obsahuje stejné síťovací činidlo, jako předchozí gel.

Podle výše popsané rešerše byly vybrány materiály, především polymery, síťovací činidlo a další látky, pro tvorbu hydrogelů a scaffoldů, jejich analýzu a biotisk. Vybrané polymery jsou alginát, chitosan a želatina. Alginát byl vybrán, protože je běžně dostupný (nízká cena), lze ho jednoduše síťovat a lze ho míchat s ostatními polymery. Dalším polymerem je želatina, kterou podobně jako alginát, také lze míchat s ostatním. Hlavním rozdílem v jejich vlastnostech je, že želatina má nedostatečné mechanické vlastnosti, ale obsahuje buněčné vazebné molekuly a je tedy biokompatibilní. A proto slouží ve většině případů, jako podpurný polymer pro ostatní. Posledním polymerem je chitosan, který má velmi vhodné mechanické vlastnosti, je biokompatibilní a dobře se tiskne, ale neobsahuje

buněčné vazebné molekuly. A proto se používá v kombinaci s želatinou. V následující kapitole jsou hydrogely připraveny buď z alginátu a želatiny nebo z chitosanu a želatiny z výše popsaných důvodů. Jako podpůrný polymer bude také použit kolagen, který, podobně jako želatina, obsahuje vazebné molekuly a gelovatí v závislosti na teplotě. Dalším možným materiálem je metakrylát, který se vyznačuje vysokou tvrdostí, ale jeho příprava bývá složitá, obtížně se tiskne a síťování je toxické pro buňky. Využívá se tedy nejčastěji s želatinou, jako GelMA, která tyto problémy do jisté míry zlepšuje. Může být tedy použit, jako podpůrný polymer. Z vybraných materiálů je síťován jen alginát, avšak pro zlepšení mechanických vlastností mohou být i ostatní materiály. Pro síťování alginátu je použito CaCl_2 , jako zdroj vápenatých iontů. Pro zlepšení vlastností lze mimo jiné využít i další látky, jako jsou například nanovlákna celulózy nebo nanočástice křemíku či dalšího prvku. V této práci budou připraveny nanočástice křemíku ve formě SiO_2 a glycerol fosfát. Křemík byl vybrán, protože podporuje osteogenezi. Glycerol fosfát umožňuje gelovatění chitosan – želatinových hydrogelů při $37\text{ }^\circ\text{C}$, což je fyziologická teplota těla. Poslední látkou je apatit, který je obsažen v kostní tkáni, jak je uvedeno v kapitole 1.1. Výsledný hydrogel pak podporuje proliferaci buněk a má lepší mechanické vlastnosti. Podle tohoto hodnocení jsou v následující kapitole vybrány 4 hydrogely, které budou připraveny a dále analyzovány. Jedná se o hydrogel z alginátu, želatiny a kolagenu, z alginátu a želatiny s využitím SiO_2 a z alginátu a želatiny s využitím apatitu a síťování obou polymerů. Poslední hydrogel bude připraven z chitosanu a želatiny s využitím glycerol fosfátu.

4. PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ HYDROGELŮ

V této kapitole budou popsány jednotlivé postupy (protokoly) pro přípravu vybraných hydrogelů a jejich testování vlastností. Protokoly obsahují seznam materiálů, použité přístroje a stručný popis přípravy hydrogelů. Poté následuje kapitola o biotisku vybraných gelů, která obsahuje stručný popis parametrů biotisku, jako jsou: rychlost tisku, tlak v jehle, teplota apod. Biotiskárna využitá pro biotisk bude popsána v kapitole 4.5. Hydrogely, které byly vybrány podle předchozí kapitoly pro následující přípravu a testování, jsou z polymerů chitosanu, želatiny a alginátu. Každý bude připraven s různým poměrem a různou koncentrací komponent (polymerů, množství a druh síťovacího činidla a dalších látek) a budou hledány optimální parametry, zejména pro biotisk a biokompatibilitu. Tyto parametry budou v rozsahu a doporučení podle předpokládaných výsledku dle literatury a kapitoly 3. Vlastnosti, které budou testovány, jsou viskozita, tvrdost, pružnost a biokompatibilita. U těchto vlastností bude popsán postup jejich testování a porovnání s předpokládanými výsledky z vybrané literatury. Pro testování biokompatibility budou použity buněčné kultury. Součástí protokolů příprav, které jsou popsány v kapitole 4.4, jsou také postupy síťování polymerů. Jedná se často o úpravy po biotisku, a proto mohou být zmíněné i v kapitole 4.5.

4.1 Test viskozity

Pro vytlačující biotisk je viskozita jedním z nejdůležitějších parametrů. Jak už bylo v kapitole 2.2 zmíněno, hydrogel nesmí mít příliš vysokou viskozitu, aby nedošlo k poškození biotiskárny, ale také nesmí mít příliš nízkou, kvůli udržení vytisknutého tvaru. A proto je vhodné vědět, jakou viskozitu hydrogel má a jestli použít síťování před nebo po tisknutí. Pro testování viskozity se využívá reometr.

4.2 Test tvrdosti a pružnosti

Tvrdost a pružnost patří mezi charakteristické vlastnosti kostní tkáně, jak je v kapitole 0 zmíněno. Hydrogely by proto měly být výrazně tvrdé a pružné. Většina polymerů nevytváří v čisté podobě příliš pevné konstrukce, a proto se využívá síťování (kapitola 2.1.1) kombinace více polymerů nebo využití dalších látek. Tyto vlastnosti podle kapitoly 2.2 také ovlivňují aktivitu buněk.

4.3 Test biokompatibility

Biokompatibilita je další nezbytnou vlastností materiálů používaných v tkáňovém inženýrství. Jak bylo v kapitole 2.2 zmíněno, je nutné, aby hydrogel vytvářel co nejpodobnější a nejpříznivější prostředí (scaffold) pro buňky. Biokompatibilita určuje,

jak jsou buňky rozprostřeny v hydrogelu, jak se chovají a jak jsou aktivní. Tyto parametry také ovlivňují mechanické vlastnosti gelů.

4.4 Příprava hydrogelů

V této kapitole jsou uvedeny jednotlivé postupy přípravy vybraných hydrogelů. Tyto postupy obsahují stručný popis hydrogelu, ideální složení dle dané literatury, seznam materiálů a přístrojů využitých k jejich přípravě, a stručný postup přípravy a síťování polymerů.

4.4.1 Příprava hydrogelu z alginátu, želatiny a kolagenu

První hydrogel, který byl připraven, je vytvořen z alginátu, želatiny a kolagenu. Podle článku [20] je ideální koncentrace alginátu 15 % (w/v), želatiny 3 % (w/v) a kolagenu 0,5 % (w/v) pro jeho ideální tisknutí. Hydrogel byl připraven podle doporučeného protokolu ze článku [20].

Materiály použité pro přípravu hydrogelu jsou: alginát sodný (čistý), želatin (typ B), fosfátový pufr (PBS, pH = 7,4), hydrolyzovaný kolagen (typ I), zdroj vápenatých iontů (CaCl_2). Přístroje, které byly použité pro přípravu, jsou: ohřívač a míchadlo, skříň pro biologickou bezpečnost.

Protokol přípravy hydrogelu: nejprve se želatin rozpustí ve fosfátové pufru, tak aby bylo dosaženo koncentrace 15 % (w/v). Poté se postupně přidává alginát sodný, který je v práškové podobě, do dosažení potřebných koncentrací (3 % w/v). Směs je následně míchána za teploty 70 °C a 100 rpm po dobu 60 min. Směs se nechá zchladit za sterilních podmínek, dokud nedosáhne pokojové teploty. Poté se přidá do směsi hydrolyzovaný kolagen rozpuštěný ve fosfátovém pufru tak, aby se dosáhlo celkové koncentrace kolagenu v roztoku 0.5 %. Pro síťování alginátu se hydrogel nejprve ošetří 3 % roztokem CaCl_2 připravené v destilované vodě po dobu 3-5 minut. Na závěr je opatrně oplachován 2x až 3x fosfátovým pufrem.

4.4.2 Příprava hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím apatitu

Příprava a složení tohoto hydrogelu se podobá předchozímu. Jedná se tedy o jedno z možných vylepšení. Základem je také alginát a želatina. Hlavním rozdílem je absence kolagenu a želatina je rozpuštěna v hydrogen fosforečnanu sodném. Podle autorů v [22] se po použití síťování alginátu, pomocí CaCl_2 , vytváří vrstva apatitu. Důvodem je reakce fosforečnanu s vápenatými ionty. Postup přípravy hydrogelu je podle doporučení autorů v [22].

Materiály použité pro přípravu jsou alginát sodný (čistý), želatin (typ B), Na_2HPO_4 , CaCl_2 , deionizovaná voda, N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiázen (ECD) a N-hydroxysukcinimid (NHS). Přístroje, které byly využity, jsou ohřívač a míchadlo a inkubátor.

Protokol přípravy hydrogelu: nejprve se želatina rozpustí v roztoku 0,5 M Na_2HPO_4 při teplotě 60 °C a za konstantního míchání, tak aby bylo dosaženo koncentrace želatiny 10 % (w/v). Poté se přidá 1 g alginátu sodného do 6 g směsi želatiny a Na_2HPO_4 . Výsledná směs se důkladně míchá do té doby, než vznikne homogenní pasta. Pro síťování alginátu se hydrogel ošetří roztokem 1 M CaCl_2 (pH = 9) po dobu 20 min za pokojové teploty. Poté se opláchne a vysuší. Následně se inkubuje v roztoku 2 % (w/v) ECD a 0,25 % (w/v) NHS přes noc, pro síťování želatiny. Poté je opatrně oplachován 3x deionizovanou vodou.

4.4.3 Příprava hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím SiO_2

Tento hydrogel je podobně, jako v předchozích kapitolách, také složen z alginátu a želatiny. Je zde přidán roztok s nanočásticemi SiO_2 , který podle autorů v [21] podporuje osteogenezi. Jedná se tedy také o možné vylepšení předchozích gelů. Protokol je vytvořen podle autorů v [21] a obsahuje dvě části, kde první je protokol přípravy SiO_2 nanočástic Stöberovou metodou a druhý je protokol přípravy hydrogelu.

Materiály, které jsou použity pro přípravu hydrogelu: alginát sodný (čistý), želatin (typ B), fosfátový pufr (PBS, pH 7,4), tetraethyl ortosilikát (TEOS, 99 %), ethanol (99,98 %), čpavek (30 %), CaCl_2 (3 %) a deionizovaná voda. Použité přístroje: ohřívač, míchadlo a skříň pro biologickou bezpečnost.

Protokol přípravy SiO_2 nanočástic: nejprve smíchá 1,33 g TEOS a 5,5 g ethanolu při pokojové teplotě po dobu 5 min. Poté se přidá roztok obsahující 5,5 g ethanolu, 0,5 g deionizované vody a 0,544 g NH_4OH . Směs se nechá reagovat hodinu při pokojové teplotě. Nakonec se směs filtruje a oplachuje vodou a ethanolem, aby se dosáhlo neutrálního pH, a nechá se přes noc vysušit při 60 °C.

Protokol přípravy hydrogelu: nejprve se smíchá 2,5 % w/v alginátu sodného s roztokem SiO_2 nanočástic (2,5 % w/v) rozpuštěných ve vodě. Následuje míchání směsi při pokojové teplotě, dokud se nedosáhne homogenního roztoku. Poté se do směsi přidá 8 % w/v želatiny za průběžného míchání při 60 °C po dobu jedné hodiny. Postup pro síťování alginátu je stejný, jako v kapitole 4.4.1.

4.4.4 Příprava hydrogelu z chitosanu, želatiny a glycerol fosfátu

Další hydrogel je vytvořen z chitosanu, želatiny a glycerol fosfátu. Podle autorů v [30] je hydrogel termo senzitivní, gelovává při teplotě 37 °C a jeho viskozitu lze upravovat pomocí změny koncentrace chitosanu a želatiny. Dále podle autorů v [28] je ideální koncentrace chitosanu v rozmezí 0,5 až 2 % (w/v) a glycerol fosfátu 5 až 20 % (w/v) pro podporu buněk a správného tisknutí. A proto bude také testována závislost tvrdosti a modulu pružnosti na koncentraci. Protokol je vytvořen podle doporučení autorů v [30]. U tohoto hydrogelu není využito síťování.

Materiály využité pro přípravu hydrogelu: chitosan s nízkou molekulovou hmotností (50 kDa a s 75–85 % deacetylací), želatin (typ A), β – glycerol fosfát, kyselina chlorovodíková (37 %) a deionizovaná voda. Použité přístroje jsou: ohřívač, centrifuga a lednice.

Postup přípravy: směs chitosanu a želatiny se nechá rozpustit v deionizované vodě při teplotě 120 °C po dobu 30 min. Poté se přidá 0.4 ml 37 % kyseliny chlorovodíkové za každý gram chitosanu. Následně se směs centrifuguje (14 000 x g po dobu 90 s) pro odstranění nečistot (např. nerozpuštěný prášek chitosanu nebo želatiny apod.). Poté se přidává do směsi glycerol fosfát (0.56 % w/v) tak, aby celkové pH roztoku bylo 7.4. Je důležité, aby se glycerol fosfát rovnoměrně rozptýlil. Nakonec se výsledný roztok centrifuguje (3000 x g po 60 s). Roztok by měl být chlazen před tisknutím, aby se předešlo samovolnému a předčasnému gelovávání.

4.4.5 Možná vylepšení hydrogelů

Jak už bylo zmíněno, některé hydrogely lze vylepšit různými metodami nebo příměsí, jako je například činidlo použité pro síťování nebo příměs SiO_2 , která je více popsána v kapitole 4.4.3. Tyto možnosti budou testovány a na základě jejich výsledků bude rozhodnuto, které jsou nejvhodnější pro následující biotisk. Možnými vylepšeními jsou například u hydrogelu v 4.4.4 síťování jednoho nebo obou polymerů. Síťování želatiny lze také využít u ostatních.

4.5 Biotisknutí hydrogelů

Tato kapitola obsahuje stručný doporučený postup a parametry biotisku. Jsou zde také popsány úpravy po vytištění, zejména síťování. Hydrogely pro biotisk byly vybrány na základě analýzy jejich vlastností, zejména viskozita a mechanické vlastnosti, v předchozí kapitole. Pro biotisk byla použita biotiskárna inkredible+ od firmy CELLINK. Tato tiskárna má rozlišení 10 μm a tloušťku vrstvy 100 μm . Dále může vytvářet tlak v rozmezí 5 až 400 kPa. Tiskárna obsahuje zdroj záření pro foto vytvrzování o vlnové délce 365 až 405 nm a zahřívání tiskové základny až do 65 °C.

4.5.1 Biotisk hydrogelu z alginátu, želatiny a kolagenu

Tento hydrogel bude připraven podle protokolu v kapitole 4.4.1 pro biotisk. Úprava po vytištění obsahuje postup síťování alginátu pomocí CaCl_2 . Seznam materiálů a přístrojů je také stejný, jako v kapitole 4.4.1. Při tisknutí je nutné kontrolovat teplotu, protože na ní závisí míra gelovatění. Následující protokol biotisku byl vytvořen na základě doporučení autorů v článku [20].

Podmínky a parametry biotisku: rychlost tisknutí je doporučena 15 mm/s a teplota při tisknutí 25-30 °C. Úpravy po vytištění: hydrogel se ošetří 3 % roztokem CaCl_2 připravené v destilované vodě po dobu 3-5 minut. Poté je hydrogel opatrně oplachován 2x až 3x fosfátovým pufrem.

4.5.2 Biotisk hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím apatitu

Podle kapitoly 4.4.2 a autorů v [22] využití apatitu zlepšuje vlastnosti hydrogelu z alginátu a želatiny, především jejich biokompatibilitu. Dále je zde síťován alginát, pomocí CaCl_2 , a želatina, pomocí ECD a NHS. Postup a seznam materiálů je také stejný, jako v kapitole 4.4.2. Protokol biotisku je podle doporučení autorů v [22].

Podmínky a parametry biotisku: rychlost tisknutí 5 mm/s, tlak 0,5 MPa, teplota při tisknutí 55 °C. Úpravy po vytištění: nejprve se hydrogel ošetří roztokem 1 M CaCl_2 (pH = 9) po dobu 20 min za pokojové teploty. Poté se opláchně, vysuší a inkubuje v roztoku 2 % (w/v) ECD a 0,25 % (w/v) NHS přes noc. Poté je opatrně oplachován 3x deionizovanou vodou.

4.5.3 Biotisk hydrogelu z alginátu a želatiny s využitím SiO_2

Posledním hydrogelem z alginátu a želatiny je s využitím nanočástic SiO_2 . Tiskne se celá směs, která je připravena podle protokolu v kapitole 4.4.3, a následně je pouze síťován alginát, pomocí CaCl_2 . Protokol biotisku a úpravy po vytisknutí jsou tedy podobné, jako v kapitole 4.5.1.

Podmínky a parametry biotisku: rychlost tisknutí 10 mm/s, tlak při tisknutí 0,24 MPa, Teplota při tisknutí 25-30 °C. Úpravy po vytištění: nejdříve je hydrogel ošetřen 3 % roztokem CaCl_2 připravené v destilované vodě po dobu 3-5 minut. Poté je opatrně oplachován 2x až 3x fosfátovým pufrem.

4.5.4 Biotisk hydrogelu z chitosanu, želatiny a glycerol fosfátu

Jak už bylo v kapitole 4.4.4 uvedeno, tento hydrogel je termo senzitivní a gelovává při teplotě 37 °C. Viskozitu tohoto gelu lze modifikovat změnou koncentrace jednoho nebo obou polymerů. Nevýhodou jsou poměrně nízké mechanické vlastnosti. To lze upravit například pomocí síťování jednoho nebo obou polymerů pomocí vhodného činidla.

Důležitým parametrem při tisknutí je teplota. Příprava hydrogelu byla uvedena v kapitole 4.4.4 a protokol biotisku byl vytvořen na základě doporučení autorů v [30].

Podmínky a parametry biotisku: je nutné, aby hydrogel byl rovnoměrně ohříván teplotou 37 °C (může být i nižší, ale rychlost a kvalita gelovatění se může snížit) po dobu tisknutí a po tisknutí, kvůli rovnoměrnému gelovatění. Rychlost vytlačování je doporučena v rozmezí 100–480 cm/min (závisí na teplotě).

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce je seznámit čtenáře s polymerními hydrogely, 3D biotiskem a vytvořit polymerní hydrogel, který bude co nejvíce podobný kostní tkáni. V první kapitole se práce zabývá popisem jednotlivých typů tkání a jejich složením. Druhá kapitola obsahuje popis a postup biotisku, popis nejčastěji používaných polymerů pro tvorbu hydrogelů a popis vlastností, které by měly hydrogely splňovat.

První část praktické části diplomové práce obsahuje rešerši polymerních hydrogelů v kostním tkáňovém inženýrství se zaměřením na alginátové, chitosanové a želatinové hydrogelů. Dále následuje příprava, biotisk a analýza hydrogelů. Nejprve budou jednotlivé hydrogely připraveny a analyzovány. Testuje se jejich viskozita, modul pružnosti, tvrdost a biokompatibilita. Bude brán obzvlášť důraz na test viskozity z důvodu biotisku. Následuje biotisk vybraných gelů, které mají dostatečné výše popsané vlastnosti. U vytištěných hydrogelů bude také testován jejich modul pružnosti a tvrdost a také biokompatibilita pomocí zvolených buněčných kultur. Hydrogely, které budou v této práci připravovány, jsou složeny z alginátu a želatiny, chitosanu a želatiny a dalších komponent (kolagen, nanočástice SiO_2 , apatit, glycerol fosfát).

Polymerními materiály pro přípravu a následující testování, jak už bylo výše zmíněno, jsou alginát, chitosan a želatina. Hydrogely, které budou připraveny, jsou z: alginátu a želatiny s kolagenem (4.4.1), alginátu a želatiny s využitím SiO_2 (4.4.3) a z alginátu a želatiny s využitím apatitu (4.4.2). Poslední hydrogel bude vytvořen z chitosanu a želatiny s využitím glycerol fosfátu (4.4.4). Pro přípravu těchto gelů jsou vytvořeny protokoly, které jsou stručně popsány v příslušných kapitolách (4.4). Po analýze vlastností a nalezení optimálních koncentrací budou tyto hydrogely tisknuty pomocí biotiskárny (4.5). Nakonec bude snaha nalézt optimální složení hydrogelu, které bude mít co nejlepší mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. Možná vylepšení jsou uvedena v kapitole 4.4.5 nebo přímo u popisů hydrogelů v kapitolách 4.4 a 4.5. Jedná se zejména o použití síťování jednoho nebo obou polymerů a využití příměsí, jako jsou nanočástice SiO_2 , apatit nebo nanovlákná celulózy apod.

LITERATURA

- [1] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.
- [2] REN, Guangwen, Arthur I. ROBERTS a Yufang SHI. Adhesion molecules. *Cell Adhesion & Migration* [online]. 2014, **5**(1), 20-22 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1933-6918. Dostupné z: doi:10.4161/cam.5.1.13491
- [3] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 08-153-3218-1.
- [4] ZHANG, Tao, Wei ZHAO, Zijie XIAHOU, Xingwang WANG, Kunxi ZHANG a Jingbo YIN. *Bioink design for extrusion-based bioprinting*. *Applied Materials Today*. 2021, **25**(25), 1-19. ISSN 23529407. Dostupné z: doi:10.1016/j.apmt.2021.101227
- [5] BUDHARAJU, Harshavardhan, Anuradha SUBRAMANIAN a Swaminathan SETHURAMAN. Recent advancements in cardiovascular bioprinting and bioprinted cardiac constructs. *Biomaterials Science*. 2021, **9**(6), 1974-1994. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/D0BM01428A
- [6] KAZDA, Tomáš. *Materiály a komponenty pro biomedicínu: Laboratorní úlohy*.
- [7] PEREIRA, Leonel, João COTAS a Miroslav BLUMENBERG, ed. *Alginate - Recent Uses of This Natural Polymer* [online]. 7. Londýn, Spojené Království: IntechOpen, 2020, 150 s. [cit. 2022-12-03]. ISBN 978-1-83968-558-3. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/8019>
- [8] TEIXEIRA, Maria C., Nicole S. LAMEIRINHAS, João P. F. CARVALHO, Armando J. D. SILVESTRE, Carla VILELA a Carmen S. R. FREIRE. A Guide to Polysaccharide-Based Hydrogel Bioinks for 3D Bioprinting Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(12) [cit. 2023-05-18]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23126564
- [9] HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Aurora C., Lucía TÉLLEZ-JURADO a Luis M. RODRÍGUEZ-LORENZO. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, **229** [cit. 2023-01-31]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115514
- [10] KITA, Rio, Atsuo TAKAHASHI, Makoto KAIBARA a Kenji KUBOTA. Formation of Fibrin Gel in Fibrinogen–Thrombin System: Static and Dynamic Light Scattering Study. *Biomacromolecules* [online]. 2002, **3**(5),

- 1013-1020 [cit. 2022-12-13]. ISSN 1525-7797. Dostupné z:
doi:10.1021/bm025545v
- [11] KOH, Ik Soo a Won LEE. Filler Complications. Springer [online]. 2019, 2019, 27 - 39 [cit. 2023-01-01]. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-6639-0
- [12] GORDON, Marion K. a Rita A. HAHN. Collagens. Cell and Tissue Research [online]. 2010, 339(1), 247-257 [cit. 2023-01-02]. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-009-0844-4
- [13] COLLINS, Maurice N., Guang REN, Kieran YOUNG, S. PINA, Rui L. REIS a J. Miguel OLIVEIRA. Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials* [online]. 2021, **31**(21), 1-22 [cit. 2023-01-02]. ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.202010609
- [14] DESHMUKH, K., M. BASHEER AHAMED, R.R. DESHMUKH, S.K. KHADHEER PASHA, P.R. BHAGAT a K. CHIDAMBARAM. Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering. *Biopolymer Composites in Electronics* [online]. Elsevier, 2017, 2017, 27-65 [cit. 2023-01-02]. ISBN 9780128092613. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6
- [15] KUO, Catherine K a Peter X MA. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* [online]. 2001, **22**(6), 511-521 [cit. 2023-02-01]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00201-5
- [16] STRACCIA, Maria Cristina, Giovanna Gomez D'AYALA, Ida ROMANO a Paola LAURIENZO. Novel zinc alginate hydrogels prepared by internal setting method with intrinsic antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **125**, 103-112 [cit. 2023-02-03]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.010
- [17] BAJPAI, M., Priyanka SHUKLA a S.K. BAJPAI. Ca(II) Ba(II) ions crosslinked alginate gels prepared by a novel diffusion through dialysis tube (DTDT) approach and preliminary BSA release study. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2016, **134**, 22-29 [cit. 2023-02-03]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.09.027
- [18] SCHLOSSMACHER, Ute, Heinz C. SCHRÖDER, Xiaohong WANG, Qingling FENG, Bärbel DIEHL-SEIFERT, Sebastian NEUMANN, Anna TRAUTWEIN a Werner E. G. MÜLLER. Alginate/silica composite hydrogel

- as a potential morphogenetically active scaffold for three-dimensional tissue engineering. *RSC Advances* [online]. 2013, **3**(28), 11185-11194 [cit. 2023-02-03]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c3ra23341c
- [19] RASTOGI, Prasansha a Balasubramanian KANDASUBRAMANIAN. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication* [online]. 2019, **11**(4) [cit. 2023-04-17]. ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/ab331e
- [20] BANDYOPADHYAY, Ashutosh, Vimal Kumar DEWANGAN, Kiran Yellappa VAJANTHRI, Suruchi PODDAR a Sanjeev Kumar MAHTO. Easy and affordable method for rapid prototyping of tissue models in vitro using three-dimensional bioprinting. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* [online]. 2018, **38**(1), 158-169 [cit. 2023-04-21]. ISSN 02085216. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbe.2017.12.001
- [21] ROOPAVATH, Uday Kiran, Raghav SONI, Urbashi MAHANTA, Atul Suresh DESHPANDE a Subha Narayan RATH. 3D printable SiO₂ nanoparticle ink for patient specific bone regeneration. *RSC Advances* [online]. 2019, **9**(41), 23832-23842 [cit. 2023-04-18]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C9RA03641E
- [22] LUO, Yongxiang, Yuxiao LI, Xialing QIN a Qingde WA. 3D printing of concentrated alginate/gelatin scaffolds with homogeneous nano apatite coating for bone tissue engineering. *Materials & Design* [online]. 2018, **146**, 12-19 [cit. 2023-04-21]. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2018.03.002
- [23] LU, Zhengbo, Lei ZOU, Xiaoman ZHOU, Di HUANG a Yongjun ZHANG. High strength chitosan hydrogels prepared from NaOH/urea aqueous solutions: the role of thermal gelling. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **297** [cit. 2023-02-03]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.120054
- [24] KIM, Soyon, Zhong-Kai CUI, Bonhye KOO, Jiwen ZHENG, Tara AGHALOO a Min LEE. Chitosan-Lysozyme Conjugates for Enzyme-Triggered Hydrogel Degradation in Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2018, **10**(48), 41138-41145 [cit. 2023-02-03]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.8b15591
- [25] MATURAVONGSADIT, Panita, Lokesh Karthik NARAYANAN, Parth CHANSORIA, Rohan SHIRWAIKER a S. Rahima BENGHABBOUR. Cell-Laden Nanocellulose/Chitosan-Based Bioinks for 3D Bioprinting and Enhanced Osteogenic Cell Differentiation. *ACS Applied Bio Materials* [online].

- 2021, **4**(3), 2342-2353 [cit. 2023-05-17]. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.0c01108
- [26] MOSHAYEDI, Shadi, Hossein SARPOOLAKY a Alireza KHAVANDI. Fabrication, swelling behavior, and water absorption kinetics of genipin-crosslinked gelatin–chitosan hydrogels. *Polymer engineering and science* [online]. 2021, **61**(12), 3094-3103 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0032-3888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.25821
- [27] LIN, Meng, Jiangnan ZHANG, Jun LI, Dechun ZHANG a Tingting MO. A convergent synthetic platform of gold/silica nanomaterials functionalized gelatin/chitosan hydrogel framework for the bone fracture treatment. *Journal of Experimental Nanoscience* [online]. 2022, **17**(1), 451-465 [cit. 2023-04-02]. ISSN 1745-8080. Dostupné z: doi:10.1080/17458080.2022.2087872
- [28] AHMADI, Raheleh a Joost D. DE BRUIJN. Biocompatibility and gelation of chitosan–glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2008, **86A**(3), 824-832 [cit. 2023-04-21]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31676
- [29] HUANG, Yu-Min, Yi-Cheng LIN, Chih-Yu CHEN, et al. Thermosensitive Chitosan–Gelatin–Glycerol Phosphate Hydrogels as Collagenase Carrier for Tendon–Bone Healing in a Rabbit Model. *Polymers* [online]. 2020, **12**(2) [cit. 2023-04-03]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12020436
- [30] ROEHM, Kevin D a Sundararajan V MADIHALLY. Bioprinted chitosan-gelatin thermosensitive hydrogels using an inexpensive 3D printer. *Biofabrication* [online]. 2018, **10**(1) [cit. 2023-04-13]. ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/aa96dd
- [31] CHEN, Xiuqiong, Huiqiong YAN, Chaoling BAO, et al. Fabrication and evaluation of homogeneous alginate/polyacrylamide–chitosan–gelatin composite hydrogel scaffolds based on the interpenetrating networks for tissue engineering. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2022, **62**(1), 116-128 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0032-3888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.25838
- [32] HUANG, Jie, Han FU, Zhiying WANG, et al. BMSCs-laden gelatin/sodium alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel for 3D bioprinting. *RSC Advances* [online]. 2016, **6**(110), 108423-108430 [cit. 2023-05-06]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C6RA24231F

- [33] ZHONG, Chao, Jun WU, C.A. REINHART-KING a C.C. CHU. Synthesis, characterization and cytotoxicity of photo-crosslinked maleic chitosan-polyethylene glycol diacrylate hybrid hydrogels. *Acta Biomaterialia* [online]. 2010, **6**(10), 3908-3918 [cit. 2023-05-11]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2010.04.011
- [34] CHIMENE, David, Logan MILLER, Lauren M. CROSS, Manish K. JAISWAL, Irtisha SINGH a Akhilesh K. GAHARWAR. Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2020, **12**(14), 15976-15988 [cit. 2023-05-18]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.9b19037
- [35] CELLINK. *GelXA BONE. SPS-IK-3X2135. Uděleno 08-APR-2021. Dostupné také z: <https://www.cellink.com/product/gelxa-bone/>*
- [36] CELLINK. *CELLINK® BONE. IKC20800. Dostupné také z: <https://www.cellink.com/product/cellink-bone/>*

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Zkratky:

GeIMA	Methakrylová želatina
HEMA	2-hydroxyethylmethakrylát
GDL	D – glukán – δ – laktan
PBS	Fosfátový pufr
ECD	N-(3-dimethylaminopropyl)-N-etylkarbodiázen
NHS	N-hydroxysukcinimid
TEOS	Tetraethyl ortosilikát