



## **Bakalářská práce**

# **Výroba hydrogelových scaffoldů v kombinaci s vláknými nosiči pro tkáňové inženýrství**

*Studijní program:*

B0519A270001 Bioinženýrství

*Autor práce:*

**Štěpán Matějů**

*Vedoucí práce:*

Mgr. Kateřina Strnadová, Ph.D.

Katedra chemie

Liberec 2024



## Zadání bakalářské práce

# Výroba hydrogelových scaffoldů v kombinaci s vláknennými nosiči pro tkáňové inženýrství

*Jméno a příjmení:*

**Štěpán Matějů**

*Osobní číslo:*

P21000711

*Studijní program:*

B0519A270001 Bioinženýrství

*Zadávající katedra:*

Katedra chemie

*Akademický rok:*

2022/2023

## Zásady pro vypracování:

Práce se bude zabývat návrhem a přípravou hydrogelových scaffoldů, jejich propojením s vláknennými nosiči a následnou obrazovou analýzou a testováním in vitro.

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava scaffoldu
3. Testování scaffoldu
4. Zpracování výsledků

*Rozsah grafických prací:* dle potřeby dokumentace  
*Rozsah pracovní zprávy:* 40 až 50 stran  
*Forma zpracování práce:* tištěná/elektronická  
*Jazyk práce:* čeština

### **Seznam odborné literatury:**

1. Bacakova M, Pajorova J, Broz A, Hadraba D, Lopot F, Zavadakova A, Vistejnova L, Beno M, Kostic I, Jencova V, Bacakova L. A two-layer skin construct consisting of a collagen hydrogel reinforced by a fibrin-coated polylactide nanofibrous membrane. *Int J Nanomedicine*. 2019 Jul 8;14:5033-5050. doi: 10.2147/IJN.S200782.
2. Ho TC, Chang CC, Chan HP, Chung TW, Shu CW, Chuang KP, Duh TH, Yang MH, Tyan YC. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*. 2022 May 2;27(9):2902. doi: 10.3390/molecules27092902.
3. Ratner, Buddy D et al. (2013). *Biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine*. 4th edition. Amsterdam: Academic Press, p. 1616, ISBN: 012816137X.

*Vedoucí práce:* Mgr. Kateřina Strnadová, Ph.D.  
Katedra chemie

*Datum zadání práce:* 30. června 2023  
*Předpokládaný termín odevzdání:* 24. dubna 2024

prof. RNDr. Jan Pícek, CSc.  
děkan

L.S.

doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková,  
Ph.D.  
garant studijního programu

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

# Výroba hydrogelových scaffoldů v kombinaci s vláknennými nosiči pro tkáňové inženýrství

## Abstrakt

Jedním z klíčových faktorů tkáňového inženýrství (TI) je návrh biologicky aktivních scaffoldů s optimálními vlastnostmi pro danou tkáň. V poslední době se hydrogely těší značnému zájmu jako materiály pro přípravu scaffoldů pro TI díky své jedinečné kompoziční a strukturální podobnosti s přirozenou extracelulární matrix. Vyvinout scaffoldy pro regeneraci nervové tkáně je pro vědce velkou výzvou. Jedním z možných přístupů v tomto směru je využití právě hydrogelů. Ovšem díky velké komplexnosti nervové tkáně a velmi slabé přirozené regeneraci je nutné takovéto scaffoldy dále funkcionalizovat. V rámci této bakalářské práce je představena výroba hydrogelového scaffoldu na bázi želatiny síťovaného  $\beta$  zářením v kombinaci s orientovanými strukturami mikrovláken z poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL). K přípravě želatinového hydrogelu byla využita prasečí želatina s hodnotou Bloom 300, která byla síťována  $\beta$  zářením dávkou 25 kGy, což je zároveň i sterilizační dávka v biomedicínské praxi. K výrobě mikrovláken byl využit PCL o molekulové hmotnosti 80 000 Da a zařízení na výrobu polymerních vláken tažením. Úspěšně se podařilo připravit kompozitní scaffold na bázi želatiny s mikrovláknem PCL na povrchu. Scaffold byl osazen buňkami. Experimenty ukázaly, že želatina síťovaná zářením  $\beta$  je v porovnání s želatinou síťovanou glutaraldehydem biokompatibilnější. Fluorescenční mikroskopie dále ukázala, že buňky na materiálu proliferují. Dále byla patrná preference mikrovláken buňkami a orientace buněk podél orientovaných mikrovláken, nicméně došlo i k migraci po hydrogelu. Tyto výsledky naznačují, že vytvořený kompozitní scaffold by mohl sloužit jako základ pro materiál využívaný v tkáňovém inženýrství nervové tkáně.

**Klíčová slova:** tkáňové inženýrství, hydrogely, drawing, želatina, polykaprolakton, síťování  $\beta$  zářením

## Abstract

One of the key factors in tissue engineering (TI) is the design of biologically active scaffolds with optimal properties for a given tissue. Recently, hydrogels have received considerable interest as materials for the preparation of scaffolds for TI due to their unique compositional and structural similarity to the natural extracellular matrix. Developing scaffolds for nerve tissue regeneration is a major challenge for scientists. One possible approach in this direction is the use of hydrogels. However, due to the high complexity of nerve tissue and the very poor natural regeneration, such scaffolds need to be further functionalized. This bachelor thesis presents the production of a gelatin-based hydrogel scaffold crosslinked by  $\beta$  radiation combined with oriented microfibre structures made of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL). Porcine gelatin with a Bloom value of 300 was used to prepare the gelatin hydrogel, which was cross-linked with  $\beta$  radiation at a dose of 25 kGy, which is also the sterilization dose in biomedical practice. PCL with a molecular weight of 80,000 Da and equipment for the production of polymer fibers by drawing were used to produce microfibrils. A gelatin-based composite scaffold with PCL microfibrils on the surface was successfully prepared. The Scaffold was seeded with cells. Experiments showed that radiation cross-linked  $\beta$  gelatin is more biocompatible compared to glutaraldehyde cross-linked gelatin. Fluorescence microscopy further showed that cells proliferate on the material. Furthermore, the preference of the microfibrils by the cells and the orientation of the cells along the oriented microfibrils was evident; however, migration along the hydrogel also occurred. These results suggest that the composite scaffold created could serve as the basis for a material used in neural tissue engineering.

**Keywords:** tissue engineering, hydrogels, drawing, gelatin, polycaprolactone,  $\beta$  cross-linking

## Poděkování

Rád bych poděkoval v první řadě Mgr. Kateřině Strnadové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost, cenné rady, připomínky a hlavně čas, který mi věnovala jak při psaní této práce, tak v laboratoři. Mé poděkování dále patří Ing. Šárce Hauzerové za její hodnotnou pomoc v laboratoři či u mikroskopů. Můj vděk si dále zaslouží Ing. Jaroslav Mikule a Ing. Divan Coetzee, kteří společnými silami vytvořili silikonovou formu pro odlévání hydrogelových vzorků. Děkuji také Ing. Martinu Stuchlíkovi za opětovnou lyofilizaci hydrogelových vzorků. Nemohu opomenout svoji rodinu, a to jak pokrevní, tak i tu složenou z přátel, kteří mi denně připomínají to hezké a podstatné na světě. Tímto bych vám chtěl poděkovat za neutuchající podporu a zázemí, které mi poskytnete a radost, kterou se mnou sdílíte.

# Obsah

Seznam zkratek . . . . .	7
<b>1 Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2 Tkáňové inženýrství</b>	<b>10</b>
2.1 Základní principy tkáňového inženýrství . . . . .	10
2.2 Materiály pro vytváření scaffoldů . . . . .	11
2.2.1 Organické materiály pro vytváření scaffoldů . . . . .	12
2.2.2 Syntetické materiály pro vytváření scaffoldů . . . . .	14
2.3 Metody pro vytváření scaffoldů . . . . .	17
2.3.1 Solvent casting a particle leaching . . . . .	17
2.3.2 Sušení mrazem . . . . .	18
2.3.3 Additive manufacturing techniky . . . . .	18
2.3.4 Techniky výroby netkaných textilií . . . . .	19
2.4 Tkáňové inženýrství nervové tkáně . . . . .	23
2.4.1 Strategie léčby poranění PNS . . . . .	25
2.4.2 Strategie léčby poranění CNS . . . . .	27
2.4.3 Mechanické vlastnosti nervové tkáně . . . . .	28
<b>3 Hydrogely v tkáňovém inženýrství</b>	<b>31</b>
3.1 Želatinové hydrogely . . . . .	32
3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti želatiny . . . . .	33
3.1.2 Síťování želatiny . . . . .	34
3.2 Hydrogely ve spojení s nanovláknny . . . . .	37
<b>4 Materiály a metody</b>	<b>39</b>
4.1 Chemikálie . . . . .	39
4.2 Kultivační média a používané roztoky . . . . .	40
4.3 Technické vybavení . . . . .	40
4.4 Příprava želatin . . . . .	41
4.5 Síťování . . . . .	41
4.6 Sterilizace . . . . .	42
4.7 Pasážování buněk . . . . .	42
4.8 Testování cytotoxicity . . . . .	42
4.9 Testování biokompatibility . . . . .	43
4.10 Fluorescenční barvení . . . . .	43



4.11	Váhové úbytky želatiny . . . . .	43
4.12	BCA analýza . . . . .	44
4.13	Příprava kompozitního scaffoldu . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>46</b>
5.1	Příprava a výběr želatin . . . . .	46
5.2	Testování cytotoxicity . . . . .	47
5.3	Testování biokompatibility . . . . .	48
5.4	Studium interakce GTA s CCK-8 . . . . .	50
5.5	Váhové úbytky . . . . .	51
5.6	Příprava kompozitního scaffoldu . . . . .	53
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>56</b>



## Seznam zkratek

<b>AC</b>	Střídavé napětí
<b>AM</b>	Additive manufacturing
<b>CCK-8</b>	Kit na analýzu viability
<b>CNS</b>	Centrální nervová soustava
<b>DAPI</b>	4,6-diamidin-2-fenylindol
<b>DC</b>	Stejnoseměrné napětí
<b>DIC</b>	Diferenciální interferenční mikroskopie
<b>DMA</b>	Dynamická mechanická analýza
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>ECM</b>	Extracelulární matrix
<b>FBS</b>	Fetální bovinní sérum
<b>FGF-1</b>	Fibroblastový růstový faktor
<b>FLM</b>	Fluorescenční mikroskopie
<b>GA</b>	Kyselina glykolová
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykan
<b>GelMA</b>	Želatinový metakrylátový hydrogel
<b>GFAP</b>	Gliální fibrilární protein
<b>GTA</b>	Glutaraldehyd
<b>HA</b>	Kyselina hyaluronová
<b>HaCaT</b>	Aneuploidní buněčná linie lidských keratinocytů
<b>HRP</b>	Křenuvová peroxidáza
<b>hMSC</b>	Lidské mezenchymální kmenové buňky
<b>hNSC</b>	Lidské neurální kmenové buňky
<b>LA</b>	Kyselina mléčná
<b>MMA</b>	Methymethakrylátu
<b>NGC</b>	Nervový vodící kanál
<b>NPC</b>	Nervová progenitorová buňka
<b>PANI</b>	Poly(anilin)
<b>PBS</b>	Fyziologický roztok s fosfátovým pufrům

## Seznam zkratek

<b>PCL</b>	Poly( $\epsilon$ -kaprolakton)
<b>PEDOT</b>	Poly(3,4-ethylenedioxythiofen)
<b>PEG</b>	Poly(ethylenglykol)
<b>PEO</b>	Poly(ethylenoxid)
<b>PET</b>	Poly(ethylentereftalát)
<b>PGA</b>	Kyselina poly(glykolová)
<b>pHEMA</b>	Poly(2-hydroxyethylmetakrylát)
<b>PLA</b>	Kyselina poly(mléčná)
<b>PLGA</b>	Kyselina poly(mléčná-glykolová)
<b>PP</b>	Poly(propylen)
<b>PPy</b>	Poly(pyrrol)
<b>PNI</b>	Poranění periferních nervů
<b>PNS</b>	Periferní nervová soustava
<b>PTh</b>	Poly(thiofen)
<b>ROP</b>	Polymerizace s otevíráním kruhu
<b>RT</b>	Pokožová teplota
<b>SCI</b>	Poranění míchy
<b>SCPL</b>	Solvent casting a particle leaching
<b>SLA</b>	Stereolitografie
<b>SN-38</b>	7-ethyl-10-hydroxy kamptotecin
<b>TBI</b>	Traumatické poranění mozku
<b>TD</b>	Testovací den
<b>TI</b>	Tkáňově inženýrství
<b>UV</b>	Ultrafialové záření

# 1 Úvod

Tkáňové inženýrství (TI) je rozvíjející se interdisciplinární obor zahrnující vědu o biomateriálech, buněčnou biologii, interakce mezi buňkami a materiály a charakterizaci povrchů. Cílem výzkumu v této oblasti je obnovit, zachovat nebo zlepšit funkce tkání, které jsou nemocné, poškozené, nebo byly ztraceny v důsledku nehod či onemocnění. TI tak nabízí alternativu k orgánové transplantaci, oblasti, která dlouhodobě trpí nedostatkem dárců.

Jednou ze zkoumaných oblastí je TI nervové tkáně, zaměřující se na léčbu a regeneraci poškození nervů a centrální nervové soustavy (CNS). Nervová onemocnění, včetně akutních poranění, představují značný problém ve zdravotnictví, a to z důvodu vysokého počtu postižených osob, vážné situace po úrazech a značných finančních nákladů spojených s životem po úrazu.

Značná pozornost je proto věnována vývoji nových scaffoldů a materiálů, které by se podílely na procesu hojení nervové tkáně. Vzhledem k omezené regenerační schopnosti nervové tkáně je v nervovém TI žádoucí navrhovat scaffoldy, které budou aktivně podporovat proliferaci, orientované prodlužování axonů a myelinizaci. S ohledem na požadavky se hydrogely jeví jako jedna ze slibných tříd biomateriálů pro TI nervové tkáně. Příklady vhodných charakteristik hydrogelu mohou být strukturální a mechanická podobnost s nativní extracelulární hmotou či vysoká porozita umožňující účinnou výměnu látek mezi poškozenou tkání a okolním prostředím. Regeneraci nervové tkáně lze dále podpořit například vytvářením orientovaných vlákněných struktur. U těch bylo ukázáno, že nervové buňky dávají přednost orientovaným mikrovláknům před nanovláknem při elongaci a proliferaci podél vláken.

V rámci této bakalářské práce je studován kompozitní materiál na bázi želatiny ve spojení s mikrovláknem z poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL). Jsou porovnávány různé koncentrace želatiny z hlediska manipulovatelnosti a rozpustnosti při 37 °C. Dále je porovnán vliv dvou různých technik síťování hydrogelu z hlediska cytotoxicity, biokompatibility a váhových úbytků. Nakonec je pozorováno chování buněk na kompozitním scaffoldu. V teoretické části jsou předneseny základní principy TI. Dále je pozornost věnována TI nervové tkáně a strategiím léčby poranění periferní a centrální nervové soustavy. V neposlední řadě je jedna kapitola věnována hydrogelům v tkáňovém inženýrství. V experimentální části je popsána příprava želatinového hydrogelu, jeho fyzikální síťování, sterilizace a následně provedené analýzy cytotoxicity, biokompatibility, včetně fluorescenční mikroskopie (FLM), a váhových úbytků. Také je přednesen proces výroby kompozitního materiálu z želatinového hydrogelu s mikrovláknem PCL vyrobenými metodou drawing, kterého je nasnímána viabilita buněk pomocí FLM. Součástí je také vyhodnocení dat ze zmíněných analýz.

## 2 Tkáňové inženýrství

V roce 1988 napsal tým J. P. Vacantiho článek s názvem *Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices* (Vacanti et al., 1988). V tomto článku bylo popsáno osazení biologicky odbouratelných polymerů hepatocyty, pankreatickými buňkami a buňkami tenkého střeva potkanů a myši. Materiály byly následně implantovány do zvířat, kde buňky vykazovali životaschopnost, schopnost se dělit a vaskularizovat okolní buněčnou tkáň. Tento koncept byl nazván „chimerická neomorfogeneze“ (chimeric neomorphogenesis) a poskytl základ pro to, co se dnes označuje jako tkáňové inženýrství.

Tkáňové inženýrství (TI) můžeme definovat jako interdisciplinární obor, který využívá principy inženýrství a přírodních věd k vývoji a užití biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci tkání (Langer and Vacanti, 1993).

S příchodem klinické transplantace orgánů, mnoha pokroky v medicíně, molekulární biologii, imunologii se objevila možnost druhé šance na život pro mnoho tisíc pacientů, jelikož dlouhodobý trend poukazuje na nedostatek dárců orgánů. Například v roce 2017 postačovaly darované orgány na zhruba 10 % transplantací (Manyalich et al., 2018).

TI je stále se rozvíjející obor, který by v budoucnu mohl nabídnout alternativu k orgánové transplantaci a potenciál pro zmírnění diskrepance mezi počtem dárců a příjemců orgánů.

### 2.1 Základní principy tkáňového inženýrství

Cílem TI je vyvíjet materiály, které mohou sloužit jako biologické náhražky tím, že napodobují tkáň. Tyto materiály nazýváme scaffoldy, překladem lešení, jelikož jejich funkcí je podporovat prorůstající buňky. Základní principy a terapeutické strategie léčby tkání zahrnují: (1) implantace čerstvě izolovaných nebo kultivovaných buněk, (2) implantace tkání sestavených *in vitro* z buněk a scaffoldů a (3) regenerace tkání *in situ* za použití pouze scaffoldů (Griffith and Naughton, 2002).

Biologické transplantáty je možné dále dělit na *autotransplantáty* - biologické konstrukty vytvořené z vlastních buněk pacienta, *alotransplantáty* - biologické konstrukty z jiného geneticky neidentického jedince a *xenotransplantáty* - konstrukty z jiného, než lidského živočišného druhu (Lu et al., 2003).

Scaffoldy jsou struktury, které mají replikovat přirozené trojrozměrné prostředí tkání, tj. extracelulární matrix (ECM), aby se buňky mohly množit a uspořádat do tkání nebo orgánů, které si tak mohou zachovat svou specializovanou konfiguraci

a morfologii. Mohou být vyrobeny z přírodních (např. kolagen, decelularizované matrice) nebo syntetických materiálů (poly(vinylalkohol), polymer kyseliny mléčné). Scaffoldy dále musí být biokompatibilní jak s tkáňově specifickými typy buněk, tak s místním prostředím v lidském těle (Shafiee and Atala, 2017).

Různé uměle vytvořené tkáně nebo orgány proto vyžadují jedinečné konstrukce a materiály, tudíž musí být scaffoldy vyrobeny se specifickými vlastnostmi, jako je velikost pórů, geometrie, propustnost a prostorové rozložení. Objemové a povrchové vlastnosti materiálů mohou také ovlivnit chování buněk. Degradace materiálu je odvislá od složení materiálu a podmínek panujících v místě implantace. Pokud je žádoucí, aby byl scaffold degradovatelný, je vhodné, aby byla degradace scaffoldu vyrovnávána produkcí ECM buňkami, prorůstáním buněk scaffoldem a degradační produkty byly netoxické (Khademhosseini et al., 2006).

## 2.2 Materiály pro vytváření scaffoldů

Výběr materiálu je klíčovým krokem při vytváření scaffoldu, a to z důvodu komplexity parametrů, jenž má scaffold naplnit. Zde je několik parametrů, které ovlivňují výběr správného materiálu:

- **Biokompatibilita** - materiál nesmí mít negativní vliv na buňky, které mají být na něm kultivovány, tj. umožní kultivaci buněk, adhezi, proliferaci, diferenciaci a migraci buněk.
- **Vhodné fyzikální vlastnosti** - materiál musí mít odpovídající mechanické a fyzikální vlastnosti, a to jak v původním stavu, tak ve stavu, v jakém se bude nacházet ve tkáni. Dále by měl být snadno vyrobitelný a manipulovatelný.
- **Toxicita** - materiál, včetně všech meziproductů rozkladu, nesmí být toxický pro okolní tkáň, případně nesmí vyvolat nežádoucí imunitní reakci a být škodlivý jak v těle, tak po vyloučení z těla.
- **Etika** - materiál by měl být v ideálním případě získán z etického, udržitelného zdroje
- **Náklady na materiál** - buď jako přímé náklady nebo nepřímé náklady, a to i prostřednictvím modifikací dalšími aditivami nebo spojené s balením a skladováním (Garrod and Chau, 2016).

Při výběru materiálu dále rozlišujeme, zdali je materiál syntetického, či organického původu. Následné vytváření kompozitních materiálů může poskytnout optimalizaci vlastností materiálů (vhodnější mechanické vlastnosti, řízená degradace, lepší biokompatibilita, aj.). Obecně se jedná o vytváření kombinací přírodních a syntetickým polymerů, ke kterým je možné přidat například i keramické a skleněné minerály (Wubneh et al., 2018). Materiály lze také funkcionalizovat i biologicky aktivními látkami, jako jsou růstové faktory, buňky či lentivirové částice, které mohou například podpořit specifickou genovou expresi (Martins et al., 2017; Avilés and Shea, 2010).

## 2.2.1 Organické materiály pro vytváření scaffoldů

Organické materiály se využívají v TI, jelikož bývají většinou přirozeně biokompatibilní a vyvolávají menší imunitní odezvu. Umožňují tak, aby došlo k příslušným interakcím mezi buňkami a materiálem, které nakonec vedou k expresi odpovídajících buněčných nebo biologických vlastností. Organické materiály ovšem většinou postrádají potřebné mechanické vlastnosti. Bývají zejména vhodné pro výrobní procesy jako je například hydrogelace, kryogelace či fotopolymerizace. Dále je nutné poznamenat, že získávání biologických materiálů bývá často spojeno s lidskými a/nebo zvířecími zdroji, což s sebou nese úskalí kvůli variabilitě jednotlivých šarží, omezené dostupnosti dárců a etickým otázkám (Garrod and Chau, 2016; Wubneh et al., 2018).

### Kolagen

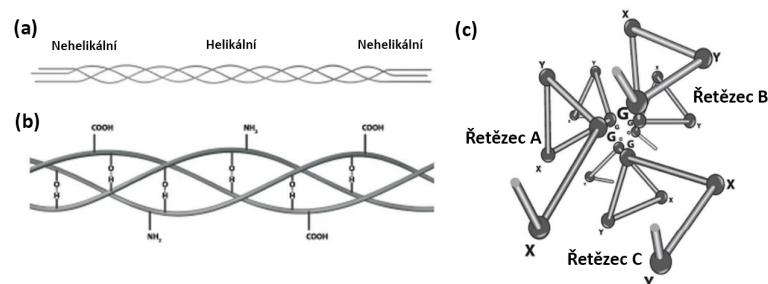
Hojně využívaným organickým polymerem je kolagen. Kolagen je vláknitý protein, který tvoří většinu ECM všech živočichů. Molekula kolagenu se skládá z trojitě šroubovice a dvou nehelikálních oblastí na obou koncích šroubovice. Trojitá šroubovice je určujícím strukturním prvkem všech kolagenů. (Soruschanova et al., 2018).

Kolagen plní významnou roli při udržování biologické a strukturální integrity ECM. Kolagen v ECM je součástí dynamického procesu, prochází neustálou remodelací pro správné fyziologické funkce (Aszódi et al., 2006). Při snaze regenerovat tkáň se zdá proto vhodným cílem obnovit jak strukturální integritu, tak proces remodelace nativní ECM, zejména pak obnovit jemné kolagenové síť, v jejichž rámci probíhá normální fyziologická regenerace (Cen et al., 2008).

Kolagen je například klíčovým materiálem druhé vrstvy lidské kůže (dermis) a hraje důležitou roli při hojení ran. Kolagen je schopen poskytnout vhodné lůžko pro fibroblasty, které podporují proliferaci buněk v ráně a tím zvyšují rychlost její hojení. Kromě proliferace buněk je kolagen užitečný i pro další fáze procesu hojení rány, jako je hemostáza, zánětlivá reakce a remodelace (Subhan et al., 2020). Biomateriály na bázi kolagenu jsou dále využívány pro náhradu a léčbu např. chrupavek (Irawan et al., 2018), kostí (O'Brien, 2011) a šlach (Soruschanova et al., 2018). Kolagen se dá využít v kombinaci s jinými přírodními polymery, jako je fibroin, chitosan, kyselina hyaluronová pro získání ideálnějšího složení matric, aniž by byly obětovány žádoucí vlastnosti kolagenu (např. buněčná adheze a biokompatibilita). Z těchto materiálů se následně dají vytvářet například hydrogely, houbovitě 3D struktury, ale i netkané vláknenné scaffoldy (Irawan et al., 2018).

Rozšířenou alternativou kolagenu je želatina, která bývá označována za jednu z nejpoužívanějších látek s netoxickými a biodegradabilními vlastnostmi v potravinářském i nepotravinářském průmyslu (Andreazza et al., 2023). Želatina je směsí vláknitých peptidů a proteinů, které lze získat denaturací a částečnou hydrolyzou kolagenu typu I získaného z pojivových tkání, kůže a kostí zvířat (Catoira et al., 2019). Želatina je také hojně studována v oblasti biomedicínských aplikací (Mohanto et al., 2023) a jejímu využití v oblasti TI se proto věnuje kapitola 3.1.



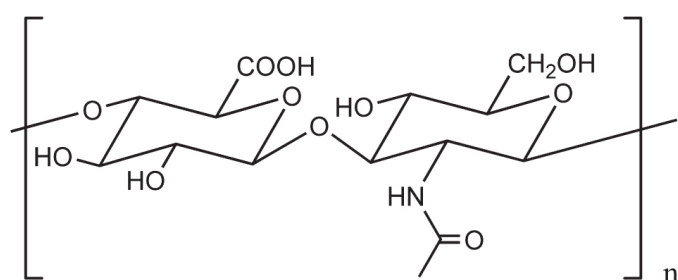


Obrázek 2.1: Schématické zobrazení struktur kolagenu. (a) Trojitá šroubovice kolagenu. (b) Vodíkové vazby v trojité šroubovici kolagenu. (c) Průřez trojitou šroubovicí kolagenu. *Upraveno a převzato z: (Sorushanova et al., 2018)*

## Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA), nazývaná také hyaluronan či hyaluronát, je jediný nesulfátový glykosaminoglykan (GAG), který se skládá ze střídajících se disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a D-N-acetylglukosaminu, které jsou spojeny střídavými  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidickými vazbami (Mao et al., 2003). HA je jednou z hlavních složek extracelulární matrix v kůži, chrupavce a sklivci (Cai et al., 2005).

HA byla kombinována s alginátem (Nam et al., 2006), poly-lyzinem (Ren et al., 2009) nebo poly(ethylenglykolem) (PEG) funkcionalizovaným akrylátem k vytvoření scaffoldů např. pro regeneraci nervů (Mjahed et al., 2008) a opravy míchy (Horn et al., 2007). Bohužel mechanické vlastnosti HA byly nedostatečné pro použití v tvrdém tkáňovém inženýrství (např. při opravě chrupavky). Proto se řada výzkumných skupin zabývala vývojem kompozitů na bázi HA, které obsahují syntetické polymery, jako je kyselina polymléčná-glykolová (PLGA) (Chang et al., 2009) a poly(propylen fumarát) (Liao et al., 2007). Kromě porézních scaffoldů z HA byly vyvinuty i „mikrokoračky“ a nanovláknna na bázi GAG pomocí fázové separace, respektive elektrospinningu (Vlierberghe et al., 2011).



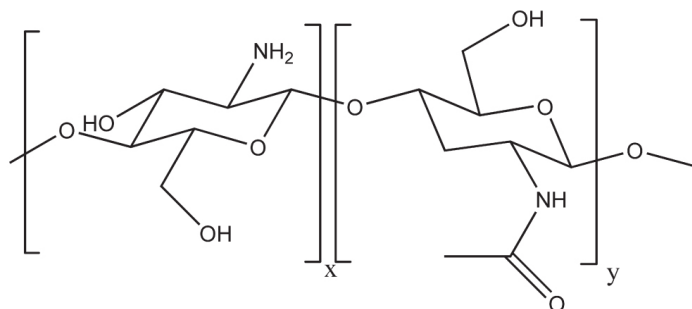
Obrázek 2.2: Chemická struktura HA *Převzato z: (Vlierberghe et al., 2011)*

## Chitosan

Chitosan je částečně deacetylovaná forma chitinu získávaná především z exoskeletu koryšů (Huang et al., 2005). Chitosan mezi biomateriály vyniká díky svému rozšíření, univerzálnosti a vlastnostem, mezi něž patří biologická odbouratelnost, biokompatibilita, hydrofilita, antibakteriální a protiplísňové vlastnosti a podpora hojení ran (Sencadas et al., 2012). Existence  $\beta$ -(1,4) glykosidických vazeb mezi D-glukosaminem a N-acetyl-D-glukosaminem navíc umožňuje chemické modifikace. Tím můžeme dosáhnout vyšší elasticity, pružnosti a vyvolat nižší zánětlivou reakci (Gu et al., 2013). Rozkladem chitosanu navíc vznikají aminocukry, které se mohou v lidském těle zcela vstřebat. Tato kritéria proto činí z chitosanu dobrého kandidáta pro širokou škálu biomedicínských aplikací, jako jsou nosiče léčiv, chirurgické nitě, hojení ran a pro tkáňové inženýrství (Islam et al., 2020).

Vodíkové vazby v molekulární struktuře chitosanu jej činí tuhým a transformovatelným do filmů s vysokou mechanickou pevností. Praktické využití chitinu je však omezené kvůli jeho špatné rozpustnosti. Ovšem aminoskupiny D-glukosaminových zbytků chitosanu mohou být protonované, a tím se stát rozpustné ve zředěných kyselých vodných roztocích ( $\text{pH} < 6$ ). Tato závislost rozpustnosti chitosanu na  $\text{pH}$  umožňuje zpracování za mírně kyselých podmínek (Dey et al., 2016).

Biomateriály založené na chitosanu zatím našly své uplatnění např. při vytváření náhrad kostí a chrupavek, meziobratlových plotének a krevních cév (Islam et al., 2020).



Obrázek 2.3: Chemická struktura chitosanu. Převzato z: (Vlierberghe et al., 2011)

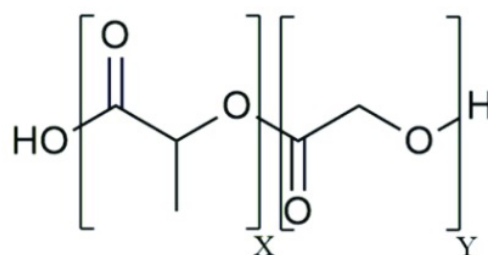
### 2.2.2 Syntetické materiály pro vytváření scaffoldů

Syntetické materiály jsou kandidáty pro biomedicínské aplikace díky relativně snadné přípravě scaffoldů a možnosti manipulace a kontroly jejich chemicko-fyzikálních vlastností tak, aby vyhovovaly konkrétní aplikaci. Syntetické materiály se však vyznačují horší biokompatibilitou a degradační produkty bývají často kyselého charakteru (Garrod and Chau, 2016; Wubneh et al., 2018). Mezi rozšířené a využívané polymery patří kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA) (Martins et al., 2017), poly(ethylenglykol) (PEG) (Gravert and Janda, 1997), poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) (Agarwal, 2010) a další (Garrod and Chau, 2016).

## Kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)

Kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA) patří mezi biodegradabilní alifatické amorfní polymery. Syntéza kopolymeru PLGA může přímo zahrnovat kyselinu mléčnou a glykolovou nebo jejich cyklické diestery, laktid a glykolid. Co se týče poměru kyseliny mléčné (LA) a kyseliny glykolové (GA), nejčastěji používaný typ PLGA je 50:50, což odpovídá 50 % LA a 50 % GA ve struktuře kopolymeru. Poměr LA:GA je velmi důležitý, jelikož se od něj odvíjejí fyzikálně-chemické vlastnosti (Martins et al., 2017). V současné době existují dva klasické přístupy k syntéze PLGA: (1) přímá polykondenzační reakce a (2) polymerace s otevřením kruhu nebo polyadice (Erbetta, 2012).

Nemodifikované PLGA ve formě vláknité membrány je hydrofobní, vyvolává nespecifickou adsorpci bílkovin a nepřispívá k výlučnému rozpoznávání buněk a bioaktivaci. Proto je nutné vlákna PLGA modifikovat, aby získala bioaktivitu a specifickou funkci. Způsob funkcionalizace se poté odvíjí od požadovaných vlastností a využití. PLGA může být modifikováno např. fosforečnanem vápenatým, kolagenem, HA, atp. Tyto látky se používají například ke zlepšení osteokondukcce a osteoindukce PLGA vláken, tudíž k inženýrství kostní tkáně (Jin et al., 2021). Vláknité scaffolds na bázi PLGA se hojně využívají i v jiných oblastech tkáňového inženýrství, jako je inženýrství nervů, rohovky, vazivových tkání a krevních cév (Zhao et al., 2016).



Obrázek 2.4: Chemická struktura PLGA

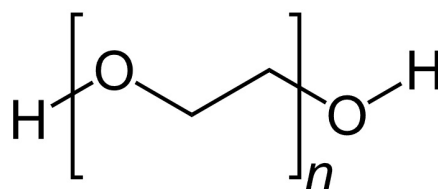
## Poly(ethylenglykol)

Poly(ethylenglykol) (PEG), někdy poly(ethylenoxid) (PEO), s molekulovou hmotností vyšší než 20 kDa je hydrolyticky nerozložitelný polymer s vynikající rozpustností ve vodě a v mnoha různých organických rozpouštědlech (Gravert and Janda, 1997). Vzhledem k tomu, že PEG je hydrolyticky neštěpitelný a podléhá pouze omezenému metabolismu v těle, jsou celé polymerní řetězce vylučovány ledvinami (<30 kDa) (Veronese and Pasut, 2005) nebo případně enzymaticky zpracovány játry (>30 kDa) (Webster et al., 2007). V aplikacích tkáňového inženýrství se obvykle využívá PEG s molekulovou hmotností nižší než 50 kDa, aby se zajistilo jeho úplné vyloučení z těla (Yamaoka et al., 1994).

PEG je hydrofilní a nenabitý, tudíž vytváří na povrchu biomateriálu vysoce hydratované polymerní spirály, které účinně odpuzují proteiny. Stlačení hydratovaných

polymerních spirál molekulou proteinu vyžaduje energii k odstranění navázaných molekul vody. Při tomto procesu navíc PEG ztrácí entropii, což činí proces adsorpce proteinu termodynamicky nevýhodným (Gombotz et al., 1991). Tohoto efektu lze využít k vytvoření inertních polymerních povrchů, které lze následně modifikovat vhodnými molekulárními skupinami (např. peptidy nebo proteiny) k dosažení specifických buněčných interakcí s biomateriály (Tessmar and Göpferich, 2007). Modifikací materiálů pomocí PEG (tzv. PEGylací) lze rovněž využít k vytvoření dlouho cirkulujících nosičů léčiv či neznečišťujících povlaků, které zabraňují růstu bakterií nebo adhezi buněk na katétry a lékařské implantáty (Vittaz et al., 1996; Zhang et al., 1998).

PEG se využívá v kombinaci s materiály jako například PCL, PLA či chitosanem (Tessmar and Göpferich, 2007; Chaudhari et al., 2016) pro vytváření scaffoldů pro TI kostí (Tessmar and Göpferich, 2007), kožní tkáně (Tsao et al., 2014) či jako součást moderních nosičů léčiv (Cho et al., 2016).



Obrázek 2.5: Chemická struktura PEG. Převzato z: (Zarrintaj et al., 2020)

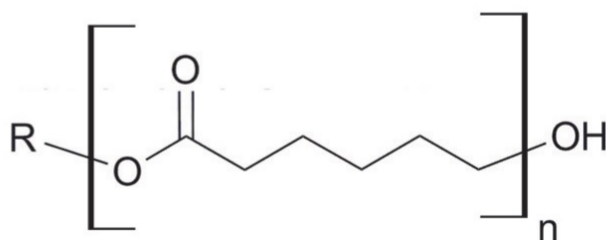
### Poly( $\epsilon$ -kaprolakton)

Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) je alifatický polyester složený z opakujících se jednotek hexanové kyseliny, který je možný syntetizovat polykondenzací kyseliny 6-hydroxykapronové (6-hydroxyhexanové) a polymerizací s otevíráním kruhu (ROP) monomeru  $\epsilon$ -kaprolaktonu (Agarwal, 2010). ROP poskytuje polymer s nižší polydisperzitou a vyšší molekulovou hmotností, proto je považována za vhodnější metodu syntézy PCL (Kim and Kim, 2015). PCL je rozpustný za pokojové teploty v organických rozpouštědlech (Sinha et al., 2004).

PCL se vyznačuje pomalejší biodegradací (v řádu měsíců až nižších roků), což je způsobeno zejména hydrofobicitou pěti opakujících se  $\text{CH}_2$  jednotek (Siddiqui et al., 2018). Navrhovaným mechanismem degradace PCL je hydrolytické štěpení esterových skupin, která způsobuje náhodné rozštěpení řetězce (Johnstone et al., 2013).

Vysoká mechanická pevnost, pomalá degradace a neimunogenita z PCL činí vhodný biomateriál pro regeneraci měkkých i tvrdých tkání. Ačkoliv hydrofobní povahy, jeho role v aplikacích tkáňového inženýrství je zásadní díky možnostem tvořit různé formy, jako jsou vlákna (Kim and Kim, 2015), povlaky (Yao et al., 2017) či porézní struktury (Lee et al., 2016) a možnostem syntézy s mnoha dalšími syntetickými, přírodními i keramickými materiály (Siddiqui et al., 2018). PCL v kombinaci s alginátem bylo využito například při výrobě materiálů pro TI chrupavky (Kundu

et al., 2013), PCL v kombinaci s polypyrrolem se využívá v TI nervové tkáně (Shafei et al., 2016), či v kombinaci s polyamidem 6 pro TI cév (Abdal-hay et al., 2017).



Obrázek 2.6: Chemická struktura PCL. Převzato z: (Labet and Thielemans, 2009)

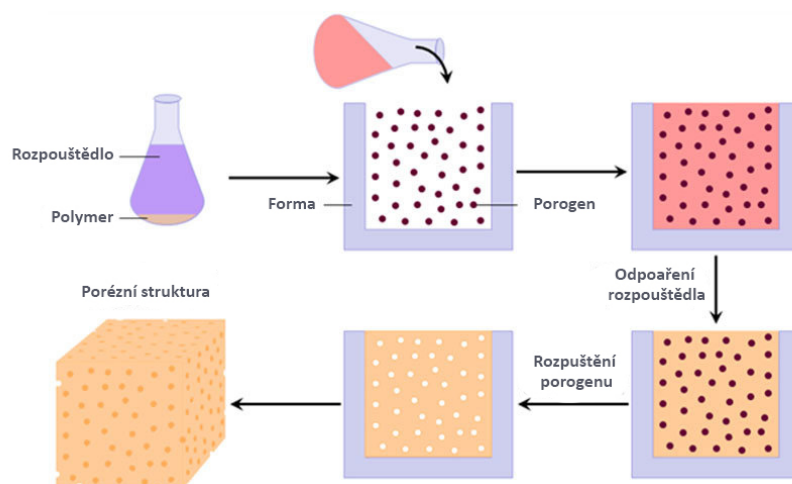
## 2.3 Metody pro vytváření scaffoldů

Rozvoj nových přístupů v biomedicíně v posledních dvou desetiletích vyvolal potřebu vývoje nových technologií využitelných při zpracování biodegradabilních polymerních materiálů s přizpůsobenými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a degradačními vlastnostmi. To vedlo k vývoji řady nových technik a metodik umožňujících výrobu mikro- a nanostrukturních biodegradabilních scaffoldů vhodných pro aplikace v TI a regenerativní medicíně. V závislosti na materiálu scaffoldu a strategii TI byly vyvinuty různé techniky a metody zpracování s cílem optimalizovat konečné vlastnosti scaffoldu z hlediska vnějšího tvaru a velikosti, morfologie povrchu a vnitřní architektury pro jednotlivé tkáně (Mota et al., 2012).

V této podkapitole je nastíněn přehled základních a běžných metod vytváření scaffoldů pro TI, a to jak pro vytváření 3D porézních struktur, tak vláknenných nosičů.

### 2.3.1 Solvent casting a particle leaching

Solvent casting a particle leaching (SCPL) je relativně jednoduchá technologie výroby porézního polymerní 3D struktury. Polymer se rozpouští v organickém rozpouštědle. Do roztoku se pak přidávají částice, především soli, se specifickými rozměry (odpovídající požadované velikosti pórů). Směs se vytvaruje do konečné geometrie. Lze ji například odlít na skleněnou desku a vyrobit membránu nebo do trojrozměrné formy a vyrobit 3D scaffold. Když se rozpouštědlo odpaří, vytvoří strukturu kompozitního materiálu sestávajícího z částic spolu s polymerem. Kompozitní materiál se poté umístí do lázně, která částice rozpustí a zanechá po sobě porézní strukturu (Liao et al., 2001).



Obrázek 2.7: Schematické zobrazení SCPL. Upraveno a převzato z: (Chahal et al., 2019).

### 2.3.2 Sušení mrazem

Technika sušení mrazem je univerzální metodou pro výrobu porézních polymerních scaffoldů, která nevyžaduje použití porogenů. Při této metodě dochází ke zmrazení vodného roztoku polymeru, což vede k tvorbě ledových krystalů, kolem kterých dochází k agregaci polymeru (G.V et al., 2021). Odstranění rozpouštědla následně probíhá vytvořením podtlaku, což vede k sublimaci. Výsledkem jsou propojené porézní scaffoldy. Možná rozpouštědlová rezidua se odstraňují sekundárním sušením a desorpcí (Lu et al., 2013). Směr zmrazování má vliv na morfologii pórů scaffoldů a může vyústit například k vytvoření směrově orientovaných pórů. Tato technika zahrnuje výrobu široké škály porézních struktur a částicových materiálů s použitím polymerů ve formě emulze, roztoku a koloidní suspenze (Qian and Zhang, 2010).

### 2.3.3 Additive manufacturing techniky

Additive manufacturing (AM) označuje skupinu výrobních technik založených na vytváření pevného objektu z dat trojrozměrného (3D) modelu spojováním materiálů, obvykle vrstvu po vrstvě. Mezi výhody AM technik patří dosažení složitých tvarů a mikrostruktur s vysokým stupněm automatizace, přesností a reprodukovatelností. Mezi výhody dále patří možnost výroby scaffoldů splňujících specifické požadavky pacienta, pokud jde o velikost a geometrii tkáňového defektu a autologní biologické vlastnosti (Mota et al., 2012).

Jednou z metod, která spadá pod AM techniky je stereolitografie (SLA). SLA je technika, která využívá ultrafialové (UV) světlo nebo laser k selektivní polymeraci vrstev fotosenzitivního polymeru. Po polymerizaci jedné vrstvy se konstrukční plošina spustí o danou vzdálenost a na vytvořenou vrstvu se nanese nová rovnoměrná vrstva pryskyřice. Aby se zabránilo delaminaci mezi sousedními vrstvami, polymerace vrstvy se provádí překrytím určitého procenta předchozí vybudované vrstvy. Postup se po vrstvách opakuje, dokud není vytvořen 3D objekt. Další kroky

zpracování zahrnují odstranění nepolymerizované pryskyřice a dodatečné vytvrzení za účelem zlepšení polymerizace mezi vrstvami a snížení nerovností povrchu (Melchels et al., 2010). Přímé využití SLA k výrobě scaffoldů bylo možné až po vývoji nových biokompatibilních a biologicky odbouratelných materiálů, jelikož příprava fotosíťovatelných kapalných pryskyřic obvykle vyžaduje toxická rozpouštědla (Elo-maa et al., 2011) a komerčně dostupné pryskyřice (na bázi epoxidů nebo akrylátů) vhodné pro SLA jsou málo biokompatibilní a biodegradabilní (Melchels et al., 2010). Řada studií prokázala potenciál těchto materiálů a struktur jako implantátů prostřednictvím *in vitro* analýz a *in vivo* studií, nicméně jen velmi málo scaffoldů vyrobených pomocí SLA bylo prozatím použito v klinických studiích (Skoog et al., 2013).

3D tisk je další z metod AM. Je založen na řízeném nanášení materiálu na vrstvu po vrstvě pomocí inkoustové hlavy. Nespojitě části materiálu slouží jako podpora pro budovaný objekt. Po zhotovení každé vrstvy se konstrukční plošina posune směrem dolů o vzdálenost odpovídající tloušťce nanesené vrstvy, nebo inkoustová hlava o stejnou vzdálenost výš. Proces pokračuje vrstvu po vrstvě, dokud není 3D objekt vytvořen. Díky vysoké rychlosti výroby a možnosti získat velkorozměrové modely při nízkých nákladech je tento proces zajímavý pro průmyslové aplikace (Mota et al., 2012). Pro výrobu scaffoldů pomocí 3D tisku byly zkoumány polymerní, keramické a kompozitní materiály (Butscher et al., 2011).

### 2.3.4 Techniky výroby netkaných textilií

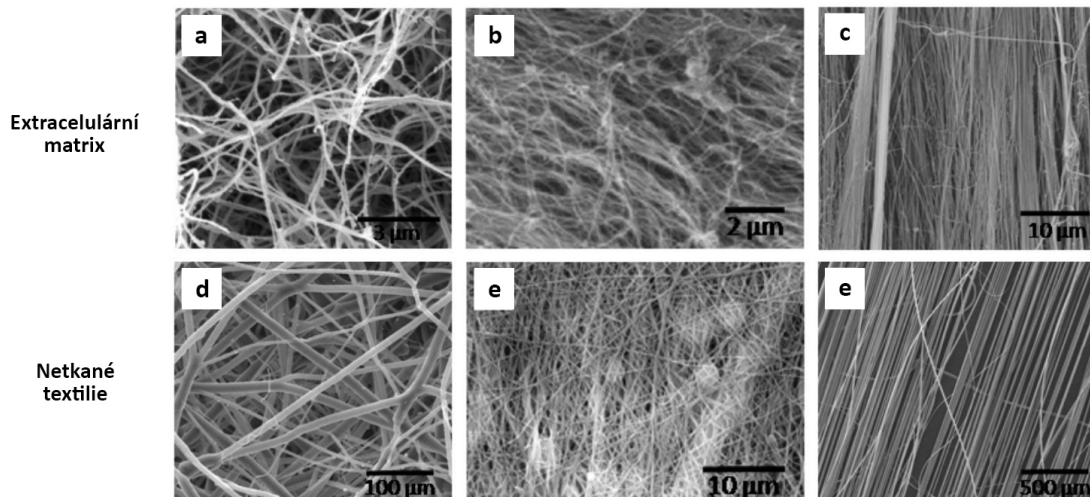
Netkané scaffoldy se primárně vyznačují vláknitou a vysoce porézní strukturou, která z nich činí slibné materiály pro použití v tkáňovém inženýrství (Tuin et al., 2016). Netkané textilie napodobují nativní ECM a vzhledem ke své univerzálnosti jsou hojně využívány při výrobě scaffoldů. Netkané textilie lze dále funkcionalizovat tak, aby poskytovaly specifické funkce vhodné pro regeneraci tkání. Mezi nejrozšířenější techniky výroby netkaných scaffoldů se řadí elektrohydrodynamické techniky (elektrospinning, elektrospraying) a melt blown (Trevisol et al., 2019).

#### Elektrospinning a elektrospraying

Elektrohydrodynamické techniky jsou založeny na působení elektrického pole na polymerní roztoky. Základní sestava se skládá z vysokonapěťového zdroje, zásobníkové soupravy (např. injekční stříkačka a jehla s tupým hrotem, pumpa) a vodivý kolektor. Napájecí zdroj může být stejnosměrný (DC) nebo střídavý (AC). Jednou z nejrozšířenějších elektrohydrodynamických technik je elektrospinning (Bhushan et al., 2022).

Elektrospinning je proces, který využívá vysoké napětí k výrobě mikro/nanovláken z roztoku polymeru nebo roztavené kapaliny (Huang et al., 2003). Rozlišujeme DC elektrospinning a AC elektrospinning.

DC elektrospinning vede k tvorbě trysek polymerního roztoku s jedinou polaritou (buď kladnou, nebo zápornou). Pro sběr vláken je zapotřebí elektricky aktivní kolektor (Pokorný et al., 2014). U jednoduché sestavy se kapalný roztok polymeru



Obrázek 2.8: Porovnání snímků ECM a netkaných textilií z elektronové mikroskopie. a) Fibrinové sraženiny (měřítko  $3\ \mu\text{m}$ ). b) ECM decelularizované bovinní rohovky (měřítko  $2\ \mu\text{m}$ ) c) ECM decelularizované šlachy (měřítko  $10\ \mu\text{m}$ ) d) Vlákna PCL připravené metodou melt blown (měřítko  $100\ \mu\text{m}$ ) e) Vlákna PCL připravené metodou elektrospinning (měřítko  $100\ \mu\text{m}$ ) f) Vlákna PCL připravené metodou drawing (měřítko  $500\ \mu\text{m}$ ). Upraveno a převzato z: (Strnadová, 2021).

přivádí do injekční stříkačky a na hrotu jehly se vytváří kapičky v důsledku povrchového napětí. Po přivedení vysokého elektrického napětí elektrostatické odpuzování překoná povrchové napětí a kapalina vytváří na hrotu tzv. „Taylorův kužel“. Z Taylorova kužele se posléze vytvoří nabitá tryska polymerního roztoku. Vzniklé trysky jsou unášeny ke kolektoru, za letu dochází k odparu rozpouštědla a dlužení polymerních vláken. Na kolektoru se shromažďují již pouze vlákna, čímž vzniká plošný vláknitý útvar. Vlákna mají obvykle průměry ve škálách stovek nanometrů až jednotek mikrometrů (Bhushan et al., 2022; Xue et al., 2019; Sun et al., 2014).

Při AC elektrospinningu podléhá roztok současně přitažlivé i odpudivé coulombické síle, protože na něj působí kladná i záporná polarita náboje. Následuje vytvoření elektrického větru nebo virtuálního kolektoru v důsledku ionizace vzduchu v okolí elektrody elektrickým polem (kladným a záporným), které vzniká mezi elektrodou a okolním plynem (Pokorný et al., 2014). Tyto ionizované plyny se při každém voltážním půlcyklu dostanou do kontaktu s vystupujícími nabitými segmenty trysek. Současně jsou tyto opačně nabitě segmenty vzájemně přitahovány, což působí na neutralizaci celkového náboje neseného tryskou. Tento vláknitý proud je pak elektrickým větrem posouván vertikálně od elektrody, což umožňuje sběr vláken na elektricky neaktivním kolektoru (Sivan et al., 2022).

Výhody AC elektrospinningu oproti DC elektrospinningu spočívají ve vyšším stupni hydrodynamické nestability polymerní kapaliny a vytvoření kompaktního vláknitého svazku, který poskytuje odlišné možnosti sběru vláken. Kromě toho lze na zásobníkovou soustavu přivádět střídavé napětí v různých tvarech (nebo vlnách) a při různých frekvencích, což ovlivňuje zvláknitelnost různých polymerních roztoků

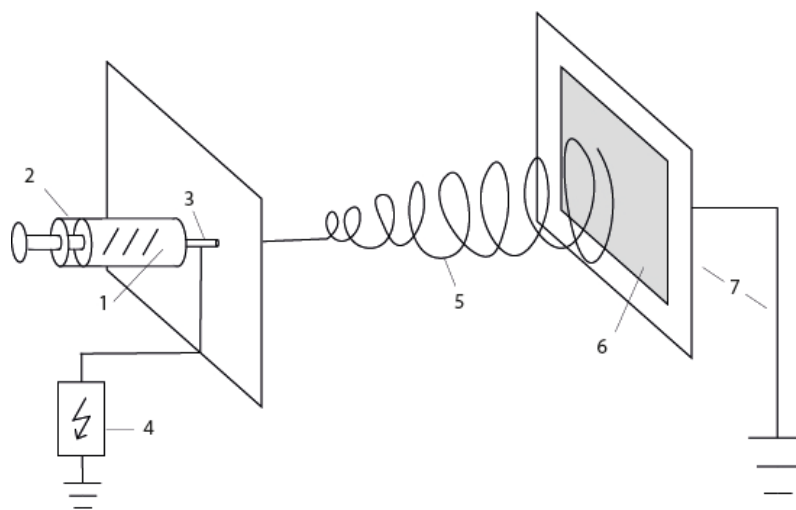


(Sivan et al., 2022).

Ve srovnání s jinými konvenčními metodami výroby scaffoldů jsou elektrospinnová nanovláknina považována za ideální scaffold pro tkáňové inženýrství díky své komplexní povrchové topologii napodobující ECM, velkému povrchu a snadné funkcionalizaci (Xue et al., 2019). Existuje několik parametrů, které ovlivňují velikost nanovláken, jako je molekulová hmotnost polymeru, vodivost a viskozita roztoku, povrchové napětí, průtoková rychlost, napětí a vzdálenost mezi hrotem trysky a kolektorem (Bhushan et al., 2022).

Při electro sprayingu dochází na kolektoru k tvorbě kapek sférického tvaru. Princip je podobný elektrospinningu, zamezí se však dlužení polymerního řetězce a tvorbě vláken. Namísto vláken se vytváří sférické struktury. Změnou parametrů jako je vodivost, napětí, koncentrace a povrchové napětí roztoku polymeru je tedy možné ovlivnit přechod z tvorby kapek na tvorbu vláken (Hartman et al., 1999). Kromě toho se při zvýšení hustoty, průtoku a viskozity stříkaného polymerního roztoku průměr částic zvětšuje (Yao et al., 2008). Electro spraying nachází využití například v aplikacích pro řízené dodávání léčiv (Chakraborty et al., 2009).

Elektrospinning a elektro spraying mají však i nevýhody, které ztěžují použití těchto metod v průmyslovém měřítku. Mnoho polymerů vyžaduje použití organických rozpouštědel škodlivých pro životní prostředí, které jsou potřeba k výrobě polymerních zvlákňovacích roztoků. Výroba scaffoldů vyžaduje použití vysokého napětí a je navíc časově náročná (Dzierzkowska et al., 2021).



Obrázek 2.9: Schematické zobrazení jehlového DC elektrického zvlákňování. 1...polymerní roztok; 2...dávkovací injekční stříkačka; 3...jehla; 4...zdroj vysokého napětí; 5...oblast odparu rozpouštědla a dlužení polymeru; 6...podkladový materiál; 7...uzemněný kolektor.

## Melt blown

Další metoda výroby netkaných textilií, melt blown, přináší alternativu k hydrodynamickým technikám. Proces melt blown, vyfukování taveniny, je jednostupňový

proces, při kterém se polymerní tavenina přeměňuje na netkanou textilii s nízkým průměrem vláken a povětšinou náhodnou orientací. Spřádaná vlákna jsou urychlována pomocí horkého, rychle proudícího vzduchu, který je přímo vháněn na pohybující se podklad, čímž vzniká propojená tkanina. Teplota horkého vzduchu se blíží teplotě použité taveniny. Dosažený průměr vláken je ve srovnání například s procesem elektrospinningu přibližně o řád vyšší, tedy 1-5  $\mu\text{m}$ . Hlavním omezením v tomto ohledu je dosavadní možná využitelná rychlost vháněného vzduchu (Geus, 2016). Modifikacemi melt blownu bylo však již dosaženo výroby submikronových vláken, a to s produkcí vyšší, než je možné při elektrospinningu v průmyslovém měřítku (Bhat, 2015).

Jednou z výhod technologie meltblown je schopnost zpracovávat i směsi polymerů. V procesu dále odpadají problémy s manipulací s toxickými rozpouštědly a se znečištěním životního prostředí. Melt blown je ovšem vhodný pouze pro termoplastické polymery, což může být omezující. Mezi běžně využívané termoplastické polymery se řadí například PP, PET nebo PLA (Bhat, 2015).

Melt blown se jednak využívá na výrobu vysoce kvalitních filtrů, membránových separací, separátorů baterií, chirurgických roušek a plášťů a ochranných oděvů (Kara and Molnár, 2021). V oblasti biomedicínských aplikací lze melt blown využít například v systémech řízeného dodávání léčiv (Balogh et al., 2015) a v TI kožní (Gazzola et al., 2019) a kostní (Erben et al., 2015) tkáně. Jednou z prvních studií charakterizující viabilitu lidských kožních fibroblastů byla například studie od Gazzola et al., kde ukázali slibnou proliferaci, migraci a produkci ECM *in vitro* na scaffoldu z PLA (Gazzola et al., 2019).

## Drawing

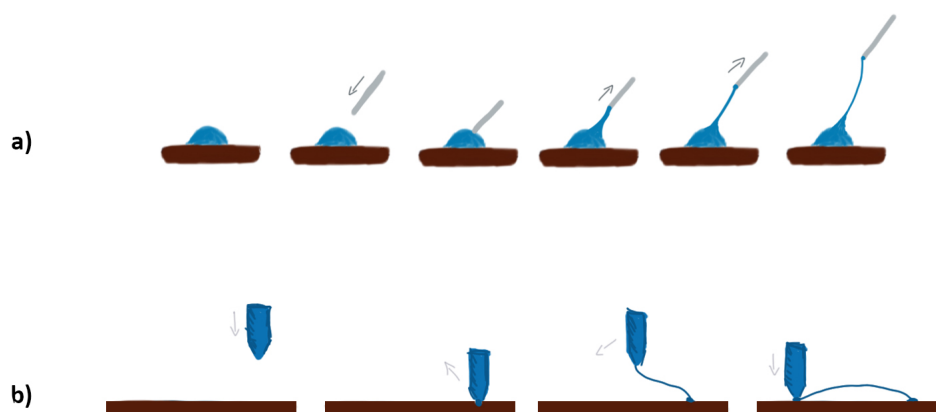
Další metodou výroby netkaných textilií je drawing. U drawingu dochází k vytažení jednoho vlákna z kapky polymerního roztoku bez použití elektrického pole. Tato metoda vyžaduje pouze ostrý hrot nebo mikropipetu, což se dá považovat za hlavní výhodu této techniky. Při této metodě se ostrý hrot používá k vytažení vlákna z kapky předem naneseného roztoku polymeru, případně taveniny. Poté se rozpouštědlo odpaří díky velkému povrchu, což způsobí tuhnutí kapalných vláken. Místo ostrého hrotu lze použít i duté skleněné mikropipety s kontinuálním dávkováním polymeru, aby se předešlo problému objemového smršťování, které omezuje kontinuální tažení vláken a ovlivňuje jejich průměr (Beachley and Wen, 2010).

Ostrý hrot či mikropipeta se po ponoření do roztoku jemně vytáhne z kapaliny/taveniny a pohybuje se rychlostmi v rozmezí přibližně 0,1 - 5 m/s. V důsledku toho se vlákna vytáhnou a dlouží na požadovanou délku a na konci trajektorie se uloží na povrch dotykem konce mikropipety. Tento proces se obvykle několikrát opakuje. Na každé úvratí je možné opětovné dávkování polymeru při dotknutí se podložky (Alghoraibi and Alomari, 2018).

Touto metodou lze vyrobit orientovaná mikro/nanovlákna téměř v libovolném uspořádání. Během výroby vláken, lze kontrolovat (měnit) parametry výroby, jako je rychlost tažení, trajektorie nebo délka tažených vláken. Tyto parametry dále ovlivňují vlastnosti vznikajících vláken, především průměr. Tato výrobní technika

je prozatím omezena na laboratorní měřítko. Ačkoliv je tento proces jednoduchý, nanovlákná se tvoří pouze po jednom, tudíž se jedná o diskontinuální proces s malou produktivitou. Produktivita by se však dala zvýšit škálováním množství hrotů a pipet (Alghoraibi and Alomari, 2018), či například změnou designu metody, viz metoda „brush spinning“ (Tokarev et al., 2015). Při „brush spinningu“ se však ztrácí možnost orientace jednotlivých vláken do různých směrů a struktur, kterou například využívá Yuan k tvorbě složitých sítí (Yuan et al., 2015). Při drawingu lze také použít pouze viskoelastický materiál, který odolává napětí vznikajícímu při tažení a lze vyrábět pouze vlákna o relativně vyšším průměru (Alghoraibi and Alomari, 2018).

Přestože první zmínky o drawingu jsou již z konce 19. století (Boys, 1887), není drawing hojně využívanou metodou v TI, a to kvůli své značné specifitě a omezením. Své uplatnění by však mohl najít ve výrobě scaffoldů pro specifické tkáně s orientovanou extracelulární matrix a buňkami. Svaly, šlachy a nervová tkáň mohou být příkladem takové tkáně. Nervová tkáň jako nervy má vysoce orientovanou strukturu. I samotné nervové buňky, konkrétně jejich axony, musí být prodlouženy a orientovány určitým směrem (Strnadová, 2021). Bylo například ukázáno, že orientované scaffoldy zlepšují prodlužování a orientaci axonů podél vláken (Novikova et al., 2008). Dále bylo ukázáno, že nervové buňky dávají přednost mikrovláknům před nanovláknem (Wang et al., 2010).



Obrázek 2.10: Schematické zobrazení metody drawing. a) Vytahování vlákna z kapky polymerního roztoku pomocí hrotu. b) Vytahování vlákna z kapky pomocí dávkovací mikropipety.

## 2.4 Tkáňové inženýrství nervové tkáně

Nervový systém obratlovců se skládá ze dvou hlavních částí: centrálního nervového systému (CNS) a periferního nervového systému (PNS) (Schmidt and Leach,

2003). Nervový systém je tvořen nervovými buňkami, neurony, které jsou zodpovědné za přenos akčního potenciálu (nervového signálu), a podpůrnými buňkami zvané neuroglie. Neuroglie jsou také specifické pro CNS (mikroglie, astrocyty, oligodendrocyty, ependymální buňky) a pro PNS (Schwannovy buňky, satelitní buňky) (Rea, 2015). Ty zachovávají fyzikální a biochemickou strukturu nervové tkáně. CNS funguje jako nosič a interpretátor signálů a zároveň jako generátor vzruchů pro PNS. Pět hlavních složek CNS tvoří mozek, mícha, optický, čichový a sluchový systém (Schmidt and Leach, 2003). Spojnicí mezi CNS a periferními strukturami je PNS, jejímž prostřednictvím se přenášejí senzorké a excitační signály oběma směry (z míchy nebo do míchy). PNS je zodpovědná za inervaci svalové tkáně (Tian et al., 2015).

Neurony CNS jsou do jisté míry schopny regenerace poškozených axonů, ale tato schopnost je velmi omezená (von Euler et al., 2002). PNS se po poranění dokáže do určité zregenerovat a opravit. Regenerace je však často pomalá a neúplná, protože prodlužování axonů závisí na syntéze a transportu intracelulárních látek a rychlost regenerace je podobná rychlosti transportu axonů, přibližně 1-3 mm/den (Scheib and Höke, 2013).

Nervová onemocnění, včetně akutních poranění, jako je poranění periferních nervů (PNI), poranění míchy (SCI), traumatické poranění mozku (TBI) a chronická neurodegenerativní onemocnění mohou způsobit různé poruchy funkce nervového systému, týkající se například řeči, paměti a vykonávání pohybů (Zhang et al., 2005). SCI a TBI, jakožto nejzávažnější poranění, přitahují velkou pozornost společnosti, a to z důvodu vysokého počtu postižených osob, vážné situace po úrazech a značných finančních nákladů spojených s životem po úrazu (Tian et al., 2015). Jen v Evropské unii se odhaduje, že TBI má na svědomí 57 000 úmrtí a 1,5 milionu hospitalizací ročně (Majdan et al., 2017).

Strategie TI nervové tkáně se v mnohém shodují s obecnými zákonitostmi TI. Vzhledem k omezené regenerační schopnosti nervové tkáně je v nervovém TI žádoucí navrhovat scaffoldy, které budou podporovat uchycení buněk, propojení buněk (což zahrnuje také proliferaci a orientované prodlužování axonů) a myelinizaci (Strnadová, 2021).

Podpory propojení buněk lze dosáhnout různými způsoby. Jedním z možných přístupů je vytváření orientovaných struktur. Například Corey *et al.* vytvořili scaffold z orientovaných nanovláken osazený dorzálními ganglii. Na orientovaných vlákních vyrůstaly neurity radiálně ven z ganglií a při kontaktu s vlákny se za nimi otáčely. Neurity také nikdy neopouštěly vlákna a nerostly na okolním krycím sklíčku. Takovéto přístupy by mohly vést k opětovnému propojení přerušovaných axonů a k funkčnímu obnovení (Corey et al., 2007).

Dále bylo prokázáno, že nervové buňky dávají přednost mikrovláknům před nanovláknem. Podél mikrovláken se axony prodlužují, zatímco u nanovláken buňky rozprostírají své axony do všech směrů. Orientovaná vlákna také podporují migraci Schwannových buněk, které jsou klíčové pro regeneraci myelinu v PNS (Wang et al., 2010). Myelinizace je velmi důležitá pro obnovu regenerované nervové tkáně a její následnou správnou funkci, proto je nutné vytvářet scaffoldy podporující obnovu myelinové pochvy (Strnadová, 2021).

Je potřeba dodat, že vodivost hraje významnou roli při regeneraci nervové tkáně.

Zásadní funkcí nervové tkáně je vedení akčního potenciálu, což je elektrochemický proces, proto se v některých studiích v oblasti nervového tkáňového inženýrství a léčby neurodegenerativních onemocnění využívají vodivé substráty a scaffolds, aby se zvýšila diferenciace buněk a regenerace tkáně. Nejčastěji používanými vodivými polymery v tkáňovém inženýrství jsou polypyrrol (PPy), polyanilin (PANI), polythiofen (PTh) a poly(3,4-ethylenedioxythiofen) (PEDOT) (Vijayavenkataraman et al., 2019).

### 2.4.1 Strategie léčby poranění PNS

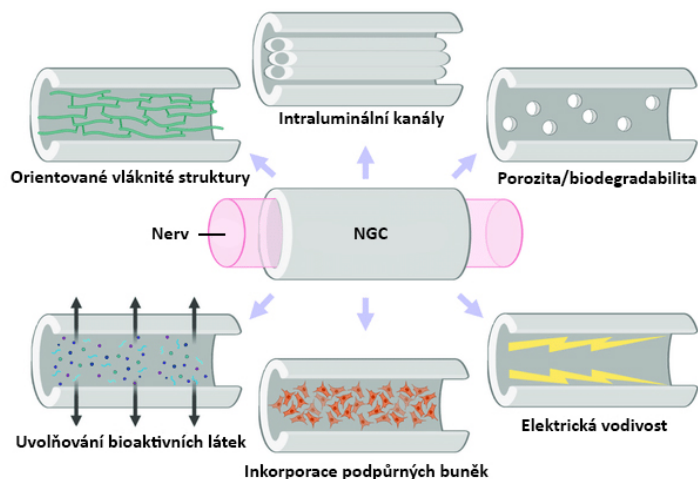
Strategie léčby se podle typu nervové soustavy liší. U menších PNI se běžně přistupuje k chirurgickému přepojení. Nedokonalé přepojení s sebou však nese riziko negativního vlivu na obnovu funkce nervu. Pokud je poranění periferní tkáně rozsáhlejší, tak se běžně operují nervové autotransplantáty. Transplantace nervové tkáně s sebou nese značná omezení. Mezi nevýhody tohoto přístupu patří možná ztráta citlivosti a motorických funkcí v dárcovském místě, nedostatečná dostupnost vlastního dárcovského nervu a celková nutnost dalšího operačního zákroku (Mackinnon and Hudson, 1992). Za alternativu se považují také alografty a xenografty, ale výsledná imunitní odezva omezuje jejich použití (Evans et al., 1994; Platt et al., 1990). Objevení alternativy k autolognímu nervovému štěpu a eliminace dvou operací a odběru tkáně od pacienta jsou považovány za výzvu při poraněních PNS.

Současným možným řešením je návrh a vývoj umělých „nervových vodicích kanálů“ („nerve guidance channels“; NGC), které fyzicky vedou regeneraci poškozeného nervu spolu s lézemi. Obecně se NGC skládá z trubicového zařízení s jedním lumenem, které funguje jako přemostující zařízení pro opravu poškozených periferních nervů tím, že izoluje regenerující axony od jizvy a chrání je před kompresí okolní tkáně. NGC jsou výhodné v tom, že by mohly omezovat růst jizevnaté tkáně v místě poranění, přispívají k proudění axonů z proximálního nervu, centralizují růstové faktory vylučované poškozenými konci nervů a přispívají k rozvoji axonů z proximálního nervu (Lackington et al., 2017).

Doposud bylo představeno několik různých konstrukcí NGC, zahrnující:

- Jednoduché duté porézní nebo neporézní NGC, které se skládají z podélně orientovaných drážek na povrchu těla biomateriálu, které mohou být modifikovány bioaktivními molekulami. Taková uspořádání nemusí poskytovat úplnou reinervaci, a to v důsledku disperze axonů nebo polyinervace různých cílů axony téhož motorického neuronu. Je možné jich využít například pro malé léze (< 30 mm) v sensorických nervech.
- Porézní nebo neporézní NGC s jedním lumenem se skládají z výplní (porézní houby, gely a orientovaná vlákna), které podporují rehabilitaci tím, že napodobují endoneurální strukturu autologních nervových štěpů. Výplně by dále měly napodobovat morfologii a složení intraluminální matrix na bázi ECM proteinů, tudíž podporovat opravu poškozených nervů.

- Vícekanálové NGC napodobují přirozenou kompartmentovou strukturu nervů. Tato vedení mají ve srovnání s NGC s jedním lumenem několik výhod, včetně snížení rozptylu axonů, větší plochy povrchu pro modifikaci, migraci a uchycení buněk. Na druhou stranu jejich hlavní nevýhody, jako je snížená propustnost a mechanická pružnost, omezují jejich použití pro nervové tkáňové inženýrství (Amani et al., 2019).



Obrázek 2.11: Zobrazení a vlastnosti ideálního NGC. Upraveno a převzato z: (Doblado et al., 2021).

Jedním z příkladů takového přístupu může být práce od Matsumoto *et al.*, kteří vyrobili PGA-kolagenovou trubičku naplněnou kolagenovými vlákny potaženými lamininem. Použili sítku PGA k vyztužení nervového vodícího kanálu, aby zabránili rychlé degradaci kanálu a zachovali potřebný prostor pro axiální prodloužení. Po přerušení periferního nervstva v levém peroneálním nervu (12 psů plemene bígl; sekce 80 mm) a implantaci materiálu došlo po 10-12 měsících k obnově chůze bez zátěže na téměř normální úroveň. U kontrol nebylo dosaženo ani elektrofyziologického, ani histologického obnovení (Matsumoto et al., 2000).

Dále k porovnání vlivu vodivosti například Shafei *et al.* vytvořili vodivá nanovlákná z PCL/PPy. Materiál byl nejdříve otestován na biokompatibilitu pomocí buněčné linie L929. Následně byla na materiálu testována buněčná linie PC12, modelové buňky pro diferenciaci neuronů a neurosekreci. Byla pozorována diferenciace buněk PC12 a růst neuritů, ke kterým došlo po 4 dnech kultivace na scaffoldech. Ve srovnání s PCL bez povlaku byly buňkami pokryty výrazně větší plochy PCL potaženého PPy. Získané výsledky z barvení vláken naznačily vysoký potenciál vodivého scaffoldu pro použití v nervovém tkáňovém inženýrství (Shafei et al., 2016).

## 2.4.2 Strategie léčby poranění CNS

Současné léčebné postupy pro obnovu a regeneraci CNS po úrazech mají značná omezení. Počáteční poškození má za následek rychlý průběh akutních primárních poranění a účelem stávajících léčebných postupů je zabránit sekundárnímu poškození (Bracken *et al.*, 1990). U TBI, podobně tak i u SCI, je účelem a strategií léčby minimalizace dalšího poškození vzhledem k nevratnému počátečnímu poškození mozku. Dostatečné zásobování kyslíkem, průtok krve a tlak působící na okolní tkáň jsou tři nejdůležitější parametry pro okamžitou léčbu, jejichž kontrolou lze udržet životaschopnost orgánů. V případě, že se jedná o závažnější poranění, je nutný chirurgický zákrok k odstranění hematomů a opravě pohmožděnin (Ziebell and Morganti-Kossmann, 2010).

Vzhledem k omezené schopnosti organismu regenerovat axonální dráhy vyvstává potřeba biomimetických přístupů, které budou schopny překlenout nervovou lézi a zároveň budou poskytovat optimální morfologické, chemické a biologické podněty pro obnovu nervové tkáně. U poranění spojených s CNS je navíc potřeba zabránění inhibice regeneračních schopností neuronů okolní tkáně (Tian *et al.*, 2015).

Zabránění inhibice může být zprostředkováno řadou faktorů. Mezi ně patří naváděcí molekuly (guidance molecules) a adhezivní faktory. Následné prodlužování neuritů směrem k příslušným růstovým látkám v jejich okolí se nazývá chemotaxe. Tyto chemické signály jsou gradienty difúzních trofických faktorů, ale mohou to být také chemické látky vázané na povrch buněk nebo ECM (Lundborg, 1988).

Mechanické vlastnosti materiálu jsou také důležité pro růst neuritů. Ku příkladu práce skupiny Bellamkonda *et al.* poukázala na vztah mezi velikostí hydrogelových pórů a růstem neuritů (Bellamkonda *et al.*, 1995).

Obecnou strategií léčby poranění CNS z pohledu TI je tedy design vhodného biomateriálu s inkorporovanými aktivními látkami, které podporují proliferaci nové tkáně, či alespoň zabraňují inhibici regenerace okolní tkáně (Oliveira *et al.*, 2018). Byly například vytvořeny kanály z poly(2-hydroxyethylmetakrylát) a methylmethakrylátu (pHEMA-MMA) naplněné fibroblastovým růstovým faktorem 1 (FGF-1) použité nejprve k překnutí transekcce sedacího nervu (Midha *et al.*, 2003) a poté s odlišným, upraveným designem k překnutí míchy (Katayama *et al.*, 2006). Axony překonaly 10 mm lézi mezi zcela oddělenými pahýly nervu (Midha *et al.*, 2003). Hlavním problémem kanálků pHEMA a pHEMA-MMA však byl částečný kolaps po implantaci. Tento problém byl vyřešen implantací cívky vyztužených kanálků pHEMA-MMA/pHEMA, s FGF-1, které poskytovaly rovnocennou regeneraci při úplné transekcce míchy v porovnání s autotransplantáty (Katayama *et al.*, 2006).

Harris a jeho spolupracovníci vyvinuli složitější systém nervových sítí vytvořených mikrotkáňovým inženýrstvím. Obsahoval primární kortikální neurony a dlouhé axonální dráhy zachycené na hydrogelových mikrotubulech. Toto uspořádání napodobuje šedou a bílou hmotu. Autoři materiál dále optimalizovali přidáním tenké vrstvy karboxymethylcelulózy s nízkou viskozitou, aby získali měkký materiál podobný konzistenci mozku a také aby umožnili jeho bezjehlové podání. Scaffold podporoval viabilitu neuronů a dlouhodobou axonální cytoarchitekturu po dobu 22 dnů a přidáním karboxymethylcelulózy se zvýšila tuhost, což umožnilo minimálně invazivní

bezjehlovou implantací do mozku potkanů (Harris et al., 2016).

V neposlední řadě skupina Zou et al., která se dlouhodobě zabývá funkcionalizovanými kolagenovými scaffoldy pro kompletní opravu poraněné míchy, navrhla kolagenový scaffold s orientovanými elektrospinningovými PCL vlákny. Scaffold byl dále funkcionalizovaný. Na scaffoldy byly nasazeny buď lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSC) nebo lidské neurální kmenové buňky (hNSC) a implantovány potkanům s kompletně přerušenu míchou. Zatímco oba typy 3D-inženýrských konstrukcí účinně snižovaly tvorbu gliové jizvy, po implantaci hNSC scaffoldu bylo v lézi nalezeno více regenerujících neuronů a nervových vláken (Zou et al., 2020).

### 2.4.3 Mechanické vlastnosti nervové tkáně

Mechanické vlastnosti jsou zásadním faktorem pro každý biomateriál implantovaný do tkáně. Tuhost místního tkáňového mikroprostředí se podílí na chování buněk, a je proto nedílnou součástí pro určení účinnosti biomateriálů regenerativní medicíny. Mechanické vlastnosti biomateriálu určují reakci hostitelské tkáně. Například astrocyty jsou vysoce mechanosenzitivní a špatně přizpůsobené mechanické vlastnosti způsobují hypertrofii buněk, zvýší produkci gliálního fibrilárního proteinu (GFAP) a fenotypovou odpověď podobnou té, která je pozorována po poranění CNS (Bartlett et al., 2020).

Mechanické vlastnosti dále mohou ovlivnit reakci a fenotyp terapeutických buněk. Bylo například ukázáno, že tuhost materiálu mění diferenciaci, adhezi a migraci kmenových buněk (Clause et al., 2010). Mechanické vlastnosti substrátu nebo tkáně také ovlivňují chování neuronů, včetně rychlosti prodlužování neuritů (Balgude, 2001), směru axonálního růstu (Flanagan et al., 2002) a rozsahu větvení neuritů (Koch et al., 2012). V neposlední řadě jakékoli nepřiměřené síly vyskytující se na rozhraní biomateriál-tkáň naruší strukturální kontinuitu a brání procházení buněk nebo axonů. Navíc změny mechanických vlastností hostitelské tkáně CNS při poranění mohou mít významné důsledky pro regeneraci neuronů. Tyto změny však dosud nebyly plně charakterizovány (Bartlett et al., 2020).

Mechanické vlastnosti biomateriálů pro opravu CNS jsou stále nedostatečně charakterizovány. Důvodem je především obtížná kvantifikace mechanických vlastností tkáně CNS související například se změnou vlastností tkáně post-mortem, variace vlastností dle anatomické oblasti a následné přímé porovnání s biomateriály pro opravu CNS (Bartlett et al., 2016).

Můžeme však určit některé základní parametry pro porovnání. Mezi hlavní typy mechanické analýzy patří deformace v tahu, tlaku, smyku a krutu. Měření můžeme dále rozdělit na statická a dynamická (Guimarães et al., 2020). Mezi ně se dá zařadit:

- **Tuhost** – míra, do jaké může předmět odolávat vnější deformaci.
- **Deformace** - odezva systému na aplikované napětí, které je kvantifikováno velikostí deformace v materiálu vzhledem k jeho počáteční referenční velikosti.
- **Youngův modul pružnosti (E)** - vyjadřuje poměr mezi mechanickým napětím v tahu a poměrným prodloužením pod napětím.



- **Modul pružnosti ve smyku ( $G$ )** - vyjadřuje poměr mezi smykovým napětím a poměrným zkosením (Guimarães et al., 2020).
- **Viskoelasticita** – termín používaný k popisu substrátů, které vykazují jak viskózní (tekuté), tak elastické (pevné) deformační charakteristiky.
- **Elastický modul pružnosti ( $E'$ )** – elastická složka komplexního modulu související s konstantou pružiny a podobná Youngovu modulu. Určeno fázovou složkou cyklu dynamické mechanické analýzy (DMA).
- **Ztrátový modul pružnosti ( $E''$ )** – viskózní složka komplexního modulu způsobená chováním podobným kapalině. Souvisí s tlumením (ztráta/ztráta mechanické energie) a je určen mimofázovou složkou cyklu DMA.
- **Komplexní modul pružnosti ( $E^*$ )** – celková indikace tuhosti, složená z kompozitu akumulárního a ztrátového modulu.
- **Tan  $\delta$**  - poměr ztrátového a elastického modulu. Představuje mechanické tlumení nebo vnitřní tření viskoelastického systému. Vysoká hodnota indikuje, že materiál má významnou nepružnou deformační složku a naopak (Bartlett et al., 2016).

V závislosti na použitém měření a anatomické oblasti nervové tkáně je možné v literatuře najít různé hodnoty mechanických vlastností. Pro míchu lze například dohledat hodnoty  $E$  v rozmezí 0,5 - 1,5 kPa (Saxena et al., 2012), hodnoty  $E = 1,19 \pm 0,13$  MPa pro tahovou deformaci (Oakland et al., 2006) a komplexní modul pružnosti v rozmezí 6 - 9 kPa při dynamickém testování. Je třeba opět zdůraznit, že mechanické vlastnosti tkání CNS se liší výrazně podle anatomické oblasti. Hrudní mícha vykazuje významně tužší chování než krční nebo bederní. Tkáně také mohou vykazovat anizotropní vlastnosti (Bartlett et al., 2016). Hodnoty  $E$  pro samotný nerv se *in vivo* mohou pohybovat v okolí 50 kPa (Ma et al., 2013), pro mozek se pak modul pružnosti v tahu pohybuje v okolí 1 - 3 kPa (Guimarães et al., 2020).

Jak již bylo naznačeno, mechanické vlastnosti scaffoldů jsou pro nervové TI zásadní. Scaffoldy musí napodobovat mechanické vlastnosti tak, aby umožnily uchycení a správný vývoj buněk (Villanueva-Flores et al., 2023). Například mechanické napětí, kterému je vystavena neuronální membrána podél povrchového rozhraní scaffoldu, určuje růst a směr axonů (Madhusudanan et al., 2020).

S ohledem na požadavky na mechanické vlastnosti nervové tkáně se hydrogely jeví jako jedna ze slibných tříd biomateriálů pro nervové TI. Hydrogely jsou materiály vyráběné z přírodních a syntetických polymerů s vysokým obsahem vody, vysokou pórovitostí a mechanickými vlastnostmi podobnými vlastnostem nativní tkáně (Politrón-Zepeda et al., 2024). Díky tomu lze hydrogely strukturně a mechanicky upravit tak, aby napodobovaly různé tkáně a přispívaly k regeneraci prostřednictvím mechanické podpory tkáně (Bertsch et al., 2022). Bylo například prokázáno, že kortikální neurony kultivované v hydrogelu vykazují lepší viabilitu buněk a prodloužení neuronů, pokud se modul pružnosti hydrogelu blíží modulu pružnosti ECM

(Politrón-Zepeda et al., 2024). Nakonec, vzhledem k omezené schopnosti regenerace nervového systému se hydrogely hojně používají v aplikacích, které zahrnují uvolňování neurotrofních faktorů a dalších látek podporujících nervový růst (Madhusudanan et al., 2020).

### 3 Hydrogely v tkáňovém inženýrství

Hydrogely jsou fyzikálně nebo chemicky zesíťované polymerní sítě, které jsou schopny absorbovat velké množství vody. Podle často využívané definice jsou hydrogely vodou nasáklé, zesíťované polymerní struktury obsahující:

- **kovalentní vazby** - vzniklé reakcí jednoho nebo více komonomerů,
- **fyzikální příčné vazby** - způsobené propletením řetězců,
- **slabé vazebné interakce** - včetně vodíkových vazeb nebo silných van der Waalsových interakcí mezi řetězci nebo
- **krystaly** - spojující dva nebo více makromolekulárních řetězců (Peppas, 2000).

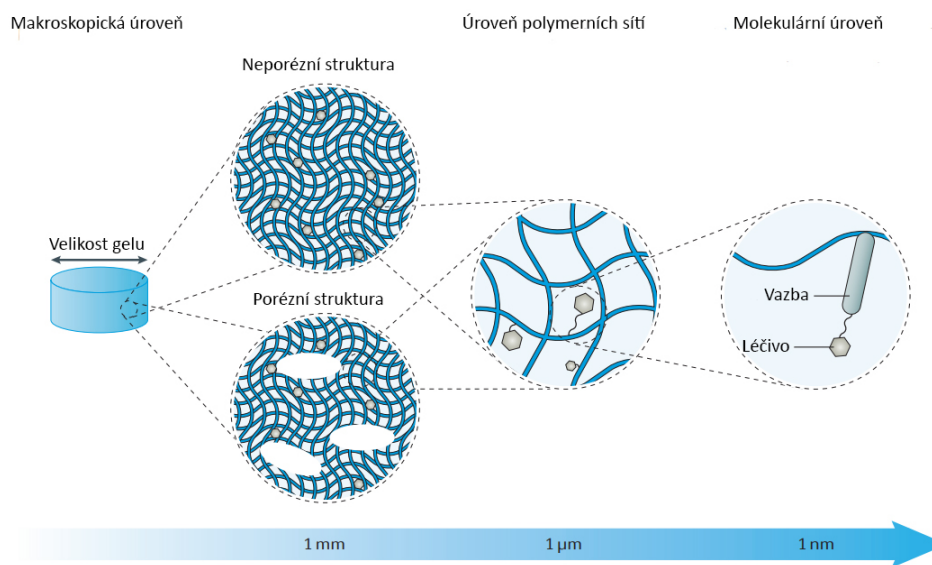
Jedno z prvních využití se datuje do roku 1960, kdy Wichterle a Lím představili využití hydrofilních sítí zesíťovaného pHEMA jako materiálu pro měkké kontaktní čočky (Wichterle and Lím, 1960).

Hydrogely lze dělit v závislosti na různých parametrech, jako jsou metody přípravy, celkový náboj a mechanické a strukturní vlastnosti. Na základě metody přípravy lze rozlišit hydrogely homopolymerní a kopolymerní. Hydrogely lze klasifikovat jako neutrální, aniontové nebo kationtové v závislosti na nábojích základních stavebních jednotek. Dále lze provést klasifikaci podle fyzikální struktury na amorfni, semi-krytalické, s vodíkovou vazbou, supramolekulární nebo hydrokoloidní (Vlierberghe et al., 2011).

Hydrogely jsou vhodné pro různé aplikace ve farmaceutickém a zdravotnickém průmyslu. Díky své měkké a gumovité konzistenci a schopnosti zadržovat velké množství vody se podobají živým tkáním. Navíc jejich vysoký obsah vody přispívá také k jejich biokompatibilitě (Ovsianikov et al., 2011). Kromě toho lze do matic hydrogelů inkorporovat léčiva či růstové faktory, které se následně uvolňují podle různých profilů uvolňování v závislosti na vlastnostech hydrogelu. Hydrogely tak mohou fungovat jako nosiče léčiv (Cai et al., 2005).

Hydrogely také vykazují minimální tendenci adsorbovat proteiny z tělních tekutin, protože mají nízké mezifázové napětí. Je však třeba poznamenat, že přírodní polymery včetně kolagenu, želatiny, GAG a jejich derivátů mají často vysokou afinitu k proteinům přítomným v séru (Vlierberghe et al., 2011). Přírodní polymery dále mají přirozená vazebná místa, která jsou zodpovědná za zvýšenou interaktivitu mezi buňkami a hydrogely. Lze je také modifikovat k zajištění lepších regeneračních vlastností (Politrón-Zepeda et al., 2024).

Přírodní hydrogely, zejména pak hydrogely z kolagenu, chitosanu a celulózy se využívají i v TI nervové tkáně (Politrón-Zepeda *et al.*, 2024). Mofrad a Shamloo vyrobili termoreaktivní chitosanový hydrogel s vodivými orientovanými nanovláknky složenými z PCL/želatiny/jednotěnných uhlíkových nanotrubiček (Mozhdehbakhsh Mofrad and Shamloo, 2023). Významnou roli v TI nervové tkáně hraje i želatina. Například Fan *et al.* vytvořili 3D želatinový metakrylátový (GelMA) hydrogel v kombinaci s hNSC, který pomohl zarůstání, potlačil tvorbu gliových jizev a podpořil axonální regeneraci (Fan *et al.*, 2018).



Obrázek 3.1: Schematické zobrazení hydrogelů. *Upraveno a převzato z: (Li and Mooney, 2016).*

### 3.1 Želatinové hydrogely

Želatina je jednou z nejpoužívanějších látek s netoxickými a biodegradabilními vlastnostmi v potravinářském i nepotravinářském průmyslu. Používá se například k podpoře želírování, stabilizaci, zahušťování, emulgaci a tvorbě filmů. Tradiční želatina je živočišného původu a vyrábí se z kostí, chrupavek, šlach, vazů a kůže zvířat, jako je skot, prasata, ryby nebo kuřata (Andreazza *et al.*, 2023).

Želatinové hydrogely jsou směsí vláknitých peptidů a proteinů a lze je získat denaturací a částečnou hydrolýzou kolagenu typu I získaného z pojivových tkání, kůže a kostí zvířat. V závislosti na způsobu získání existují dva základní typy želatiny: želatina A zpracovaná kyselinami (pH 1-3) a želatina B zpracovaná alkalickými roztoky, přičemž typ A je pro TI výhodnější (bývá méně kovalentně zesíťovaný) (Catoira *et al.*, 2019). Želatina může být také získávána enzymatickou degradací kolagenu díky sekvencím citlivým na metaloproteinázy na jeho matici (Suvarnapathaki *et al.*, 2019). Kromě toho je želatina atraktivní díky vlastnostem jako jsou

anfoterismus, rozpustnost ve vodě (při 37 °C), neimunogenicita, buněčná adheze, funkční skupiny umožňující síťování a relativně levná pořizovací cena (Qiu et al., 2020).

Želatina má nevhodné mechanické vlastnosti pro náhradu většiny tkání a pomalou rychlost degradace, zejména za určitých fyziologických podmínek, což způsobuje problémy při strukturování hydrogelů a scaffoldů ze želatiny. K nápravě tohoto problému se želatina zpracovává fyzikálním, enzymatickým nebo chemickým zesíťováním a vytváří 3D síť (Mohanto et al., 2023).

### 3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti želatiny

Charakterizace fyzikálně-chemických vlastností materiálu je nedílnou součástí vyhodnocení jeho utility. Z chemického hlediska se želatina skládá z 18 druhů komplexních aminokyselin, z nichž zhruba 57 % tvoří glycin, prolin a hydroxyprolin. Zbývajících asi 43 % zastupují další významné skupiny aminokyselin, jako je kyselina glutamová, alanin, arginin a kyselina asparagová (Sultana et al., 2018). Želatina se skládá z 25,2 % kyslíku, 6,8 % vodíku, 50,5 % uhlíku a 17 % dusíku (Nur Hanani et al., 2014). Strukturálně se želatina skládá z různých polypeptidových řetězců, jako jsou  $\alpha$ -řetězce (jeden polymer/jediný řetězec),  $\beta$ -řetězce (dva kovalentně zesíťené  $\alpha$ -řetězce) a  $\gamma$ -řetězce (tři kovalentně zesíťené  $\alpha$ -řetězce) o molární hmotnosti přibližně  $90 \cdot 10^3$ , respektive  $180 \cdot 10^3$  a  $300 \cdot 10^3$  g/mol (Alipal et al., 2021).

Při tepelném zpracování se želatina rozpouští na koloidy, ale při teplotě nižší než 35 až 40 °C gelovatí (Williams and Phillips, 2003). Při dlouhodobém varu je možné vlastnosti změnit v důsledku degradace, gel by se po ochlazení nereformoval. Kromě toho se viskozita a gelovitost želatiny mění s relativním rozložením molekulové hmotnosti, přičemž ji lze ovlivnit stavem elektrolytů, pH a teplotou (Alipal et al., 2021).

Parametrem, který je také potřeba při pracování s želatinou pro účely TI zohlednit, je izoelektrický bod. Izoelektrický bod želatiny (8,0 typu A; 4,9 typu B) je vlastnost, která ovlivňuje celkový čistý náboj částic želatiny (Bello et al., 2020).

V závislosti na použití se fyzikální vlastnosti želatinových hydrogelů mohou charakterizovat na základě mechanických vlastností, rychlosti degradace a bobtnání. Z hlediska mechanických vlastností jsou hydrogely charakterizovány modulem pružnosti a modulem viskozity. Hydrogely jsou považovány viskoelastické materiály. Jejich mechanická pevnost závisí na hustotě zesíťování, avšak čím je gel pevnější, tím méně může absorbovat vodu (Catoira et al., 2019).

Mechanické vlastnosti jsou částečně reprezentovány hodnotou „Bloom“. Bloom je přímo úměrný želirovacímu potenciálu, a tím i pevnosti želatiny, přičemž komerčně dostupná želatina má obvykle hodnotu Bloom 50 až 300 (Bello et al., 2020). Za účelem stanovení standardní hodnoty Bloomu se po 18 hodinách od uložení gelu při teplotě 10 °C vyhodnocuje síla potřebná ke stlačení povrchu 6,67% gelu pístem o konkrétním tvaru a velikosti 4 mm. Bloom (relativní molekulová hmotnost extrahované želatiny) je závislý na fázích extrakce, přičemž Bloom je vyšší v počátečních fázích extrakce ve srovnání s těmi, které procházejí úplnou hydrolyzou (Karim and

Bhat, 2008; Alipal et al., 2021).

Moduly pružnosti jsou u želatin silně ovlivněny teplotou v okolí fyziologických teplot, jelikož zde dochází k přechodu sol-gel. Se zvyšující se teplotou klesá  $E^*$ , toho se dá také využít ke stanovení bodu tání. U dynamického měření modulů pružnosti u želatin běžně platí, že se zvyšující se frekvencí oscilací narůstá  $E'$  i  $E''$  nezávisle na teplotě. Hodnoty  $E'$  nesítovaných želatin se běžně za teploty 0 °C pohybují okolo 1 kPa, hodnoty  $E''$  pak v rozmezí 10 - 100 Pa (Ahmed, 2017).

Patrné rozdíly jsou i mezi různými druhy želatin. Například Sarbon *et al.* porovnávali  $G'$  kuřecí a hovězí želatiny. Hodnoty  $G'$  pro kuřecí želatinu byly vyšší než pro hovězí želatinu při všech koncentracích, což naznačuje, že mezimolekulární interakce hovězí želatiny je slabší než u želatiny kuřecí. Gely kuřecí i hovězí želatiny při koncentraci 3 % (w/v) vykazovaly mírnou závislost  $G'$  na oscilační frekvenci DMA, zatímco při koncentraci 5, 7 a 10 % (w/v) byly gely kuřecí i hovězí želatiny téměř nezávislé na oscilační frekvenci (Sarbon et al., 2013).

Fyzikální síť želatiny obvykle drží pohromadě vodíkové vazby mezi jednotlivými segmenty. Želatinové gely však nejsou při fyziologické teplotě (a vyšší) stabilní kvůli tepelné reverzibilitě (při teplotě 37 °C se konformace trojšroubovice opět vrací do svinutého stavu a gel se tak reverzibilně rozpustí do roztoku) (Guo et al., 2018). To omezí použití pro tkáňové inženýrství nebo podávání léčiv, kde se vyžaduje, aby gely byly stabilní po určitou dobu při fyziologických podmínkách (Bello et al., 2020). Řešením tohoto problému může být stabilizace želatinových gelů chemickým, fyzikálním nebo enzymatickým síťováním (Alipal et al., 2021).

### 3.1.2 Síťování želatiny

Zahříváním želatiny se rozpouští koloidní struktura. Při teplotách nižších než 35 až 40 °C dochází ke gelaci, jelikož teploty tání/tuhnutí želatin se pohybují v rozmezí 31,7 °C až 34,2 °C. Stálost želatiny a její mechanické vlastnosti lze však zlepšit síťováním. Síťování hydrogelů můžeme rozdělit na dva základní přístupy, tj. na fyzikální a chemické metody síťování. Fyzikální síťování představuje fyzikální interakce mezi polymerními řetězci, zatímco chemické síťování představuje vytváření nových kovalentních vazeb mezi polymerními strukturami v hydrogelovém systému (Mohanto et al., 2023).

Síťování upravuje mechanické vlastnosti želatin. Pomocí síťování je možné zvýšit bod tání a ovlivnit moduly pružnosti. V práci Kosaraju *et al.* ukázali, že pomocí chemického síťování byly schopni dosáhnout hodnot  $E'$  na přibližně 10 kPa a  $E''$  na více než 100 Pa (obě hodnoty jsou uvedeny při teplotě 0 °C). To je přibližně o řád výš, než u nesítovaných protějšků. Teploty tání bylo tímto zvednuta na fyziologickou (Kosaraju et al., 2010).

#### Síťování chemickými činidly

Chemicky zesíťované hydrogely jsou tvořeny kovalentně zesíťovanou strukturou s využitím alespoň jednoho síťovacího činidla. Mezi hlavní výhody patří mechanická odolnost, odolnost vůči ředění a zabránění difúzi těchto hydrogelů ve srovnání s fy-

zikálním síťováním (Lu et al., 2018). V posledních letech bylo popsáno několik modifikovaných metod chemického síťování, tj. síťování vyvolané polymerací volných radikálů, tvorba Schiffových bází, síťování pomocí enzymů atd. pro přípravu mechanicky pevných a laditelných biokompatibilních hydrogelů na bázi želatiny pro biomedicínské aplikace (Mohanto et al., 2023).

Z chemických síťovacích činidel se zdaleka nejčastěji používá glutaraldehyd (GTA), a to díky jeho vysoké účinnosti stabilizace kolagenních materiálů. Zesíťování kolagenních vzorků pomocí GTA zahrnuje reakci volných aminoskupin lysinových nebo hydroxylysinových aminokyselinových zbytků polypeptidů řetězce s aldehydovými skupinami GTA (Olde Damink et al., 1995). GTA je dostupný, levný a jeho vodné roztoky mohou účinně zesíťovat kolagenní tkáň v relativně krátké době (Bigi et al., 2001). Na druhou stranu je GTA cytotoxický, s velmi problematickými účinky na lidské zdraví, jako je chronická bronchitida, dokonce možná genetická aktivita (Ehrmann, 2021). Jako alternativa ke GTA se k zesíťování materiálů na bázi kolagenu nabízejí různé alternativy, včetně karbodiimidů, epoxidových sloučenin a genipinu (Bigi et al., 2001). Ačkoli se některé z těchto látek zdají být vhodnější ke snížení rizika cytotoxicity, nedokáží se vyrovnat GTA ve stabilizaci kolagenu (Sung et al., 1999). Biokompatibilitu kolagenních materiálů zesíťovaných GTA lze údajně zlepšit snížením koncentrace roztoků GTA (Goissis et al., 1999). Materiál zesíťovaný pomocí GTA se obvykle ošetřuje roztokem glycinu, aby se inaktivovala aldehydová skupina zbytkového GTA. Při pozdějším promývání materiálu se však mohou molekuly glycinu uvolnit, což vede k expozici aldehydové skupiny, která může způsobit poškození buněk (Yang et al., 2018).

Méně cytotoxickou alternativou může být enzymatické síťování. Enzymatické zesíťování je považováno jako jedna z nejvíce biokompatibilních metod hydrogelového zesíťování (Nezhad-Mokhtari et al., 2019). V současnosti se při syntéze různých typů hydrogelů využívá například enzymů transglutaminázy (protein glutamin  $\gamma$ -glutamyltransferáza), tyrosinázy a křemové peroxidázy (HRP) a peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ), a to díky jejich mírným reakčním podmínkám, účinnosti síťování a vynikající cytokompatibilitě (Moreira Teixeira et al., 2012).

Transglutaminázy jsou rodinou thiolových enzymů, které katalyzují tvorbu kovalentní vazby mezi g-karboxamidovou skupinou glutaminu vázaného na peptid a volnými aminovými skupinami proteinu nebo lysinu vázaného na peptid. Reakce síťování jsou poměrně rychlé (5 až 20 minut) a výsledné kovalentní vazby jsou odolné vůči proteolýze (Nezhad-Mokhtari et al., 2019).

Nejčastěji používanou peroxidázou při syntéze hydrogelu je HRP. HRP je jednořetězcový  $\beta$ -typ hemoproteinu, který katalyzuje konjugaci derivátů fenolu a anilinu v přítomnosti  $H_2O_2$ . V této reakci se HRP rychle spojí s  $H_2O_2$  a vytvořený komplex může oxidovat hydroxyfenylové skupiny. Takové skupiny jsou přítomny například v tyrosinu a kyselině 4-hydrofenyloctové (Bae et al., 2014).

Pomocí enzymatického síťování například Choi *et al.* úspěšně připravili hydrogely z chitosanu/želatiny katalyzované pomocí tyrosinázy tolerantní vůči kyselinám, tyrosinázy-CNK. Získaný hydrogel vykazoval vysokou pórovitost a vhodné mechanické vlastnosti k využití hydrogelu jako scaffoldu (Choi et al., 2018).

Alternativou k výše zmíněným metodám jsou procesy výroby zesíťovaných žela-

tinových hydrogelů bez použití chemických činidel pomocí fyzikálního síťování.

## Fyzikální síťování

Fyzikálně zesíťované hydrogely se na molekulární úrovni mohou tvořit prostřednictvím nekovalentních i kovalentních vazeb. Nekovalentně zesíťované spoje bývají krátkodobé, ale postačují k tomu, aby se hydrogely staly nerozpustnými ve vodném prostředí. Spoje vzniklé v důsledku propletení polymerních řetězců zahrnují iontové, vodíkové vazby nebo hydrofobní interakce (H. Gulrez *et al.*, 2011).

Výhodou tohoto typu síťování je, že se nepoužívají chemické síťovací látky, tudíž vzniklé hydrogely mají nižší toxicitu a více biokompatibilních vlastností než většina technik chemického síťování. Metody fyzikálního síťování zahrnují různé mechanismy, tj. síťování iontovými interakcemi, vodíkovou vazbou, hydrofobními interakcemi, termoreverzibilní gelací, zmrazováním a rozmrazováním (Mohanto *et al.*, 2023).

Jednou z využívaných metod je síťování opakovaným mražením a rozmrazováním (freeze-thaw). Proces obvykle zahrnuje zmrazení roztoku polymeru při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , které je následně doprovázeno ohřátím polymeru na pokojovou teplotu. Vlastnosti hydrogelu se upravují kontrolou délky zmrazování, rychlosti rozmrazování, pH, počtu cyklů rozmrazování a teploty (Lu *et al.*, 2018). Touto metodou se mimo jiné obvykle připravují gely na bázi polysacharidů (Zhang *et al.*, 2013). Pomocí freeze-thaw vyrobili například Ren *et al.* hydrogel z PVA a želatiny s myšlenkou vytvoření lepšího nosiče léčiv pro obvazy na rány (Ren *et al.*, 2020).

K předejití pouze lokálnímu síťování lze využít také opakované chemické a fyzikální síťování a jejich kombinací (Mohanto *et al.*, 2023). Například kombinace dvou technik poskytla týmu Wang *et al.* hydrogel jednak s vysokými mechanickými vlastnostmi, tak i s antibakteriální aktivitou. Vytvořili samoobnovitelný želatinový hydrogel pomocí vodíkových vazeb a trojmocných železitých iontů. Tyto hydrogely vykazovaly zlepšené mechanické vlastnosti modulací koncentrace kovových iontů, teploty reakce a doby namáčení, což vedlo ke zlepšení antibakteriální aktivity vůči *E. coli* a *S. aureus* (Wang *et al.*, 2020).

Další možností je ionizující ozařování pomocí záření  $\gamma$ , UV záření nebo elektrovaného svazku. Ozařování může být provozně rychlé a nevyžaduje přísady, změnu pH a ani přísné podmínky, které by mohly deformovat strukturu materiálu (Anjum *et al.*, 2003). Vysoká energie ozařování může způsobit zesíťování i degradaci materiálu a změnit fyzikální a chemické vlastnosti materiálu prostřednictvím štěpení a zesíťování hlavních řetězců. Po ozáření vznikají reaktivní meziprodukty, ionty a volné radikály, a tyto aktivní centra vytvářejí nové vazby a mění vlastnosti materiálu v důsledku iniciace nebo volné reakce mezi polymerním řetězcem (Benbettaieb *et al.*, 2016).

K zesíťování dochází, když se dva radikály vyvolané ozářením spojí a vytvoří kovalentní vazbu, což vede ke zvýšení molekulové hmotnosti. Naproti tomu degradace vzniká v důsledku vysoké energie převyšující přitažlivé síly mezi atomy, čímž dochází k přetržení chemických vazeb a poklesu molekulové hmotnosti. V důsledku těchto reakcí souvisí ionizující záření se životností materiálů prostřednictvím zesíťo-



vání a štěpení řetězců (Lee et al., 2017).

Ionizující záření je navíc jednou z technik používaných ke sterilizaci v medicíně (Singh et al., 2016). Materiály citlivé na teplo, jako je želatina, nelze sterilizovat např. autoklárováním a materiály obsahující vodu nelze sterilizovat ethylenoxidem (Yoo, 2018). Proto se obvykle sterilizují pomocí ionizujícího záření, jelikož představuje účinnou a zároveň biologicky a ekologicky šetrnou (bez použití toxických plynů) metodu sterilizace materiálů (Dorpema, 1990). Je tedy výhodné využít ionizující záření jednak jako síťovací činidlo, a i jako sterilizační metodu. Toho se navíc dá docílit v jednom kroku, jelikož běžná sterilizační dávka, 25 kGy, (Singh et al., 2016) je dostatečná k zesíťování želatiny.

### 3.2 Hydrogely ve spojení s nanovláknky

Kompozity nanovláken a hydrogelů kombinují vynikající biochemické vlastnosti hydrogelu s biomimetickou povahou vláken vytvořených například pomocí elektrospinningu. Kompozity mohou díky svým laditelným mechanickým vlastnostem napodobovat mikrostrukturu ECM různých tkání a mikroprostředí různých buněk. Existují různé druhy metod výroby kompozitů z vláken a hydrogelů, od laminace, přes tvorbu koaxiálních elektrospinningových vláken ve spojení s hydrogely až k elektrospinningu v kombinaci s 3D tiskem a další (Zhang et al., 2023).

Hydrogelů a nanovláken jako kompozitních materiálů je již využíváno v mnoha odvětvích TI. Například Zhu *et al.* vyrobili scaffoldy pomocí elektrospinningu PCL v kombinaci s želatinou, které umožňují přímé zavedení do mozku a podporují trvalé uvolňování 7-ethyl-10-hydroxy kamptotecinu (SN-38), chemoterapeutika, které vyvolává buněčnou smrt nádorových buněk. Autoři testovali scaffoldy s různou koncentrací SN-38, protože mechanické vlastnosti scaffoldu se v závislosti na těchto koncentracích lišily. Pozorovali, že se zvyšující se koncentrací SN-38 se zvyšovalo bobtnání vláken a drsnost povrchu. Dále se snižovala rychlost degradace a krystalinita, což naznačuje, že SN-38 působí v tomto scaffoldu jako plastifikátor. Kromě toho byla optimální koncentrace scaffoldu schopna působit cytotoxicky na 251 ošetřených nádorových buněk tak, že usmrtila téměř 50 % populace, aniž by způsobila nežádoucími účinky (Zhu et al., 2015).

Své uplatnění našly kompozity hydrogelů a nanovláken i v léčbě ran a poranění kůže. Dvouvrstvé kožní scaffoldy se těší zájmu výzkumníků, protože mohou lépe napodobovat kožní tkáň, která se skládá převážně z epidermis a dermis. Epidermis je složena z keratinocytů a ECM na bázi keratinu (mimikováno vláknennými strukturami), zatímco dermis je tkáň bohatá na kolagen (podobná hydrogelu). Takto byl vyroben scaffold z mixu vláknenného keratinu/chitosanu a hydrogelu z želatiny s methakrylátem. Pro vyhodnocení viability materiálu pro účely TI byly lidské fibroblasty zapouzdřeny do hydrogelové vrstvy a na nanovláknenné vrstvě byly kultivovány buňky HaCaT (aneuploidní buněčná linie lidských keratinocytů). Byly společně kokultivovány po dobu 10 dnů. Výsledkem byly zapouzdřené lidské fibroblasty, které proliferovaly v hydrogelové matrici a buňky HaCaT vytvořily buněčnou vrstvu na horní straně scaffoldu, což napodobovalo dermis a epidermis kožní tkáň (Kim et al.,

2017).

Nanovláknenné/hydrogelové kompozity se používají i jako cévní scaffoldy. Cévy jsou díky třívrstvé struktuře vybaveny výjimečnými nelineárními mechanickými vlastnostmi, díky kterým jsou schopné opakované expanze a kontrakce (Mi et al., 2019). Napodobení těchto vlastností a přidání například antitrombogenních vlastností představuje však velkou výzvu (Zhang et al., 2023). Norouzi *et al.* vytvořili dvouvrstvý heparinizovaný cévní transplantát, který dokázal napodobit strukturální a mechanické vlastnosti koronární tepny. Tento scaffold také zlepšil uchycení a proliferaci endoteliálních buněk, čímž se snížila adheze krve na scaffold a zabránilo se trombóze (Norouzi and Shamloo, 2019).

Na základě získaných poznatků se tato práce věnuje vývoji hydrogelového scaffoldu na bázi želatiny v kombinaci s orientovanými mikrovláknny z PCL, který by mohl sloužit jako materiál pro náhradu nervové tkáně, především pak míchy.

## 4 Materiály a metody

Cílem této práce bylo připravit kompozitní scaffold z želatiny a orientovaných mikrovláken a otestovat tento scaffold na biokompatibilitu *in vitro*. Scaffold by mohl dále sloužit jako základ pro další vývoj kompozitního implantátu pro regeneraci nervové tkáně.

### 4.1 Chemikálie

4,6-diamidin-2-fenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific
Antibiotika (Pen./Strep./Amph. B)	Lonza
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
DMEM (s vysokým obsahem glukózy)	Sigma Aldrich
Destilovaná voda (dH <sub>2</sub> O)	Destilační zařízení laboratoře
Ethanol 96%	Penta
Fetální bovinní sérum (FBS)	Gibco
Fyziologický roztok s fosfátovým pufrům (PBS)	Penta (míchaný v laboratoři)
Glutaraldehyd 25% roztok	Sigma Aldrich
Glycin	Sigma Aldrich
Chloroform 100%	Penta
Kit na analýzu viability CCK-8	Dojindo Laboratories
Methanol	Penta
Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) ( $M_w = 80\ 000$ Da)	Sigma Aldrich
Propidium jodid (PI)	Sigma Aldrich
Tekutý silikon a katalyzátor HT 33	Havel Composites
Trypsin	Lonza
Želatina (prasečí, Bloom 300)	Sigma Aldrich

## 4.2 Kultivační média a používané roztoky

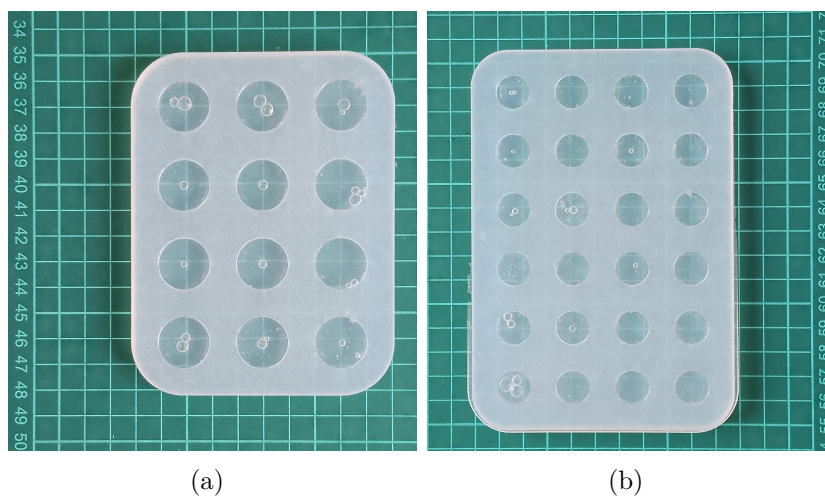
Roztok	Složení	Poznámky
DMEM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 89 ml DMEM (s vysokým obsahem glukózy)</li> <li>• 10 ml FBS</li> <li>• 1 ml antibiotik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vše připravovat sterilně v laminárním boxu.</li> <li>• FBS je inaktivován po dobu 30 minut při 55 °C.</li> <li>• Skladujte při teplotě 4 °C. Před použitím zahřejte na 37 °C.</li> </ul>
10x PBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 80 g NaCl</li> <li>• 2 g KCl</li> <li>• 20,06 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O</li> <li>• 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nechat všechny složky rozpustit v 800 ml dH<sub>2</sub>O.</li> <li>• Upravit pH na 7,4 pomocí HCl.</li> <li>• Sterilizovat autoklávem a rozdělit na alikvóty.</li> <li>• Zředit na 1x PBS a uchovat při pokojové teplotě</li> </ul>
GTA (0,5% v/v)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,88 ml 25% GTA</li> <li>• 43,12 ml dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pečlivě promíchat.</li> <li>• Uchovat při RT.</li> </ul>
GTA (0,05% v/v)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 ml 0,5% GTA</li> <li>• 36 ml dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pečlivě promíchat.</li> <li>• Uchovat při RT.</li> </ul>
DAPI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Roztok 1 mg/ml v dH<sub>2</sub>O.</li> <li>• Ředěn 1:1000 v PBS.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uchovávat v mrazáku.</li> <li>• Uchovat v lednici.</li> </ul>
Glycin (100 mM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,600 g glycinu.</li> <li>• 80 ml dH<sub>2</sub>O.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nechat míchat do úplného rozpuštění.</li> <li>• Uchovat v lednici.</li> </ul>
PCL (12% w/w)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,2 g PCL</li> <li>• 8,8 g chloroformu.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pečlivě promíchat.</li> <li>• Uchovat při RT.</li> </ul>

## 4.3 Technické vybavení

Autokláv Tuttinauer 2840EL	Tuttinauer
Destilační zařízení AQUAL 2X	Aqual
Fluorescenční mikroskop Axio Observer	Zeiss
Inkubátor Heracell VIOS 160i CO <sub>2</sub> , 165 l	Thermo Fisher Scientific
Laminární flowbox Telstar Bio II Advance Plus	Telstar
Lyofilizátor Benchtop 4KZL	VirTis
Mikroskop Olympus DSX1000	Olympus
Original Prusa i3 MK3S+	PrusaResearch
Přístroj na počítání buněk EVE	NanoEnTek
Spektrofotometr Spark multimode	Tecan
Zařízení na výrobu polymerních vláken tažením	KSA TUL

## 4.4 Příprava želatin

Byly připravovány želatiny o hmotnostní koncentraci 2, 4, 6, 8, 10 a 12 % (w/w) v dH<sub>2</sub>O. Navážky byly pečlivě rozmíchány do úplného rozpuštění na magnetické míchačce při 300 rpm a 40 °C. Následně bylo odebráno vždy po 1 ml a napipetováno do silikonové formy. Návrh silikonové formy byl vytvořen Ing. Jaroslavem Mikule, který následně na 3D tiskárně vytiskl i šablonu pro odlití formy. Forma byla navržena tak, aby vyrobené vzorky pasovaly do 24-jamkové kultivační destičky. Formu následně odlil ze silikonu (HT 33; Havel Composites) Ing. Divan Coetzee z FT TUL. Vzorky byly ponechány při RT či 4°C do úplného zatuhnutí. Poté byly z formy vyloupané, ihned použity, či přesunuty k následnému použití do Petriho misky/mikrotitrační destičky, které byly utěsněny parafilmem.



Obrázek 4.1: Snímky silikonových forem. (a) Forma na 12-jamkové disky. (b) Forma na 24-jamkové disky.

## 4.5 Síťování

Vzorky želatin po odlití byly máčeny v 0,5% roztoku GTA po 2 h za stálého třepání. Následně byly další 2 h za stálého třepání máčeny v roztoku glycinu. Vzorky byly poté ihned použity, či přesunuty k následnému použití do Petriho misky/mikrotitrační destičky, které byly utěsněny parafilmem a uchovány při 4 °C.

Pro některé experimenty byly připraveny i vzorky želatin, které byly po odlití máčeny v 0,05% roztoku GTA po 24 h za stálého třepání. Následně byly další 2 h za stálého třepání máčeny v roztoku glycinu. Vzorky byly poté ihned použity, či přesunuty k následnému použití do Petriho misky/mikrotitrační destičky, které byly utěsněny parafilmem a uchovány při 4 °C.

Vzorky síťované  $\beta$  zářením byly vystaveny dávce 25 kGy monoenergetického svazku elektronů na pracovišti ústavu fyziky plazmatu AV ČR. Vzorky byly sterilně uzavřeny v mikrotitračních destičkách a při 4 °C do jejich využití.

## 4.6 Sterilizace

Vzorky síťované  $\beta$  zářením byly sterilizované pomocí dávky 25 kGy. Vzorky síťované GTA byly sterilizovány 30 min v 70% ethanolu, následně opláchnuty po 20 min v PBS.

## 4.7 Pasážování buněk

Pasážování buněk probíhalo následujícím způsobem. Buněčná kolonie byla v kultivační lahvi (kultivační plocha 25 cm<sup>2</sup>) vyndána z inkubátoru a prohlédnuta pod mikroskopem. Následně byla přesunuta do laminárního boxu a práce probíhala za sterilních podmínek. Zde bylo odsáto přebytečné médium (DMEM) a buněčná kolonie promyta PBS (přibližně 4 ml). Dále bylo do kultivační lahve napipetováno po 1 ml trypsinu a lahev byla přesunuta na přibližně 10 minut do inkubátoru. Po vyjmutí z inkubátoru byla lahev opět omyta ethanolem a přesunuta do laminárního boxu. Do lahve bylo napipetováno po 3 ml DMEM a směs promíchána pipetou. Následně bylo odebráno v poměru 1:10 (400  $\mu$ l) do nové kultivační lahve, které byla doplněna přibližně 6 ml DMEM, vložena do inkubátoru a kultivována do dalšího pasážování při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

## 4.8 Testování cytotoxicity

Na testování cytotoxicity byly použity vzorky 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením, 0,5 % GTA a 0,05 % GTA.

Na výluh bylo 5 disků od každého vzorku zalito 5 ml kompletního DMEM a inkubováno spolu s negativní kontrolou (pouze kompl. DMEM bez vzorků) v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 24 h.

Do 96-jamkové destičky byly v den nasazení výluhu nasazeny buňky 3T3-NIH (11. pasáž; P11) v koncentraci  $1 \cdot 10^4$  buněk na jamku v celkem 100  $\mu$ l média. Celkem bylo připraveno 5 řad po 12-ti jamkách: 1. řada - pozitivní kontrola (PC; kompletní DMEM, předinkubované v výluhy), 2. řada - negativní kontrola (NC; médium s 0,5% Tritonem X100), 3. – 5. - řada médium z výluhu vzorků. Destička byla po dobu 24 h inkubována při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24 h byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a bylo odsáto médium po řadách a do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l výluhu nebo PC a NC. Destička byla vložena do inkubátoru na 24 h při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Následující den byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem, médium bylo po jednotlivých řadách odsáto a bylo přidáno 100  $\mu$ l 10% CCK-8 v kompletním DMEM. Vzorky byly inkubovány po dobu 3 h při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté bylo odebráno 90  $\mu$ l roztoku, přepipetováno do čisté jamky a vzorky byly změřeny na spektrofotometru při 460 nm.

## 4.9 Testování biokompatibility

Byly použity vzorky 8% želatiny (5 + 1 na CCK-8, 2 na FLM) síťované  $\beta$  zářením a 0,5% GTA. Velikost disků byla přibližně 1,35 cm, tj. disky vhodné do 24-jamkové kultivační destičky.

Experiment byl připraven na 4 testovací dny (TD; 1, 3, 7, 14 TD). Na vzorky bylo nasazeno  $1 \cdot 10^4$  buněk (3T3-NIH, P11) na jamku v celkem 1 ml média. Inkubace probíhala při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Vzorky na CCK-8 byly v jednotlivé testovací dny přeneseny do sterilní kultivační destičky a následně inkubovány 3 h s 10% CCK-8 v kompletním DMEM (500  $\mu$ l). Poté bylo měřeno v 96-ti jamkové destičky po 100  $\mu$ l objemu.

Vzorky na FLM byly připraveny dle výše popsání protokolu, viz 4.10.

## 4.10 Fluorescenční barvení

Vzorky byly přeneseny do čistých jamek a poláchnuty v PBS (2x). Následně byly fixovány 15 min vymraženým methanolem při 4 °C. Vzorky byly poté opět opláchnuty v PBS (2x) a barveny přibližně 10 min při RT roztokem DAPI. Po obarvení došlo k oplachu v PBS (2x). Vzorky byly uchovávány v PBS při 4°C před následnou mikroskopií na fluorescenčním mikroskopu.

## 4.11 Váhové úbytky želatiny

Byly použity vzorky 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením a 0,5% GTA. Vzorky byly následně vymrazeny na -80 °C a lyofilizovány na 0,03 mBar po dobu min 48 h nebo do úplného zlyofilizování.

Od každého materiálu bylo připraveno 5 vzorků na 1 odběrový den (celkem 10 od každého). Vzorky byly umístěny do plastových Petriho misek na parafilm, vymrazeny na -80 °C a zlyofilizovány. Po lyofilizaci byly jednotlivé vzorky zváženy, vloženy do 24-jamkových destiček a zality 1,5 ml sterilního PBS pufru s 0,02 % azidem sodným (pH 7,4). Do zbylých neobsazených jamek bylo napipetováno PBS. Destička byla umístěna do uzavíratelné krabičky a do krabičky vložena kádinka s dH<sub>2</sub>O pro omezení odparu PBS ze vzorků. Celá krabička byla následně přesunuta do inkubátoru na dobu 7 a 14 dní při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky vyjmuty z PBS, vloženy do 12-jamkové kultivační destičky s parafilmem a v případě potřeby mírně osušeny filtračním papírem a zamrazeny na - 80 °C, zlyofilizovány a nakonec zváženy. Váhy byly porovnány s původní navázkou. Dále bylo odebráno i PBS do zkumavek, ve kterém se vzorky inkubovaly a byla na něm provedena analýza proteinů pomocí BCA analýzy.

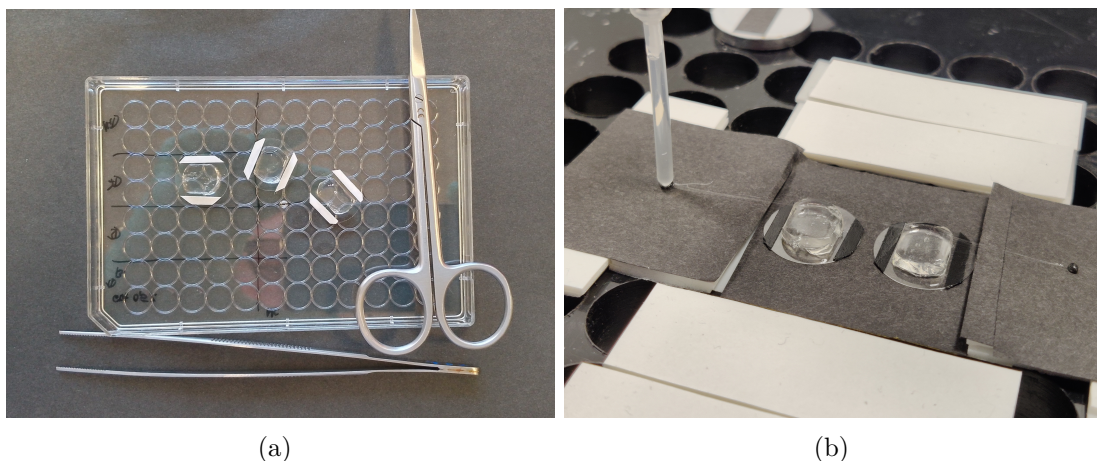
## 4.12 BCA analýza

Na základě přiloženého návodu byly napipetovány standardy kalibrační řady (BSA) a připraven pracovní roztok (PR) pro měření v mikrotitračních destičkách. Následně bylo do mikrotitračních destiček napipetováno 25  $\mu\text{l}$  vzorků kalibrační řady BSA a vzorků materiálů. Do každé jamky bylo následně přidáno 200  $\mu\text{l}$  PR, destička byla zakryta víčkem a inkubována po dobu 30 min při 37 °C za stálého míchání. Destička byla zchlazena na RT a absorbance měřena při 562 nm na spektrofotometru.

## 4.13 Příprava kompozitního scaffoldu

V laminárním boxu byly na sterilní kulatá laboratorní sklíčka nalepeny dva úzké (cca 1,0 mm) ústřížky uhlíkové pásky pro elektronovou mikroskopii ve vzdálenosti přibližně 1,2 cm. Mezi tyto pruhy byl položen disk 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením. Ten byl následně oříznut podél pásky tak, aby pasoval mezi nalepené pruhy.

Následně byl pod laboratorní zařízení pro výrobu vláken tažením z kapky polymerního roztoku (sestrojil Ing. Andrii Shynakrenko, PhD., KSA TUL) připevněn plastový rámeček, na který byla vytahována vlákna z roztoku PCL. Zařízení na výrobu vláken bylo nastaveno na 200 vláken o délce 100 mm pro jednu sadu vzorků, na délku 80 mm pro druhou sadu vzorků. Vzdálenost mezi vlákny byla nastavena na 0,1 mm. Rychlost pohybu přístroje byla nastavena na 20 000 mm/min (0,33 m/s). Rámeček s nataženými vlákny byl poté přesunut do laminárního boxu. Zde byla jak vlákna, tak připravené vzorky želatiny sterilizovány UV zářením po dobu 20 minut.



Obrázek 4.2: Příprava kompozitního scaffoldu. (a) Upravené želatinové disky na laboratorním sklíčku. (b) Natahování vláken PCL na želatinový disk pomocí zařízení pro výrobu vláken metodou *drawing*. Obrázek je ilustrativní, jelikož postup byl modifikován pro potřebu sterility vzorku na testování.



Vlákna byla následně (sterilně) připevněna na želatiny, přilepena k teflonovým páskám a odstřižena od rámečku. Kompozitní vzorky byly přeneseny do 12-ti jamkové destičky a podvrstveny pár kapkami sterilního roztoku PBS, aby se zabránilo vyschnutí. Vzorky byly uchovány v lednici přes noc.

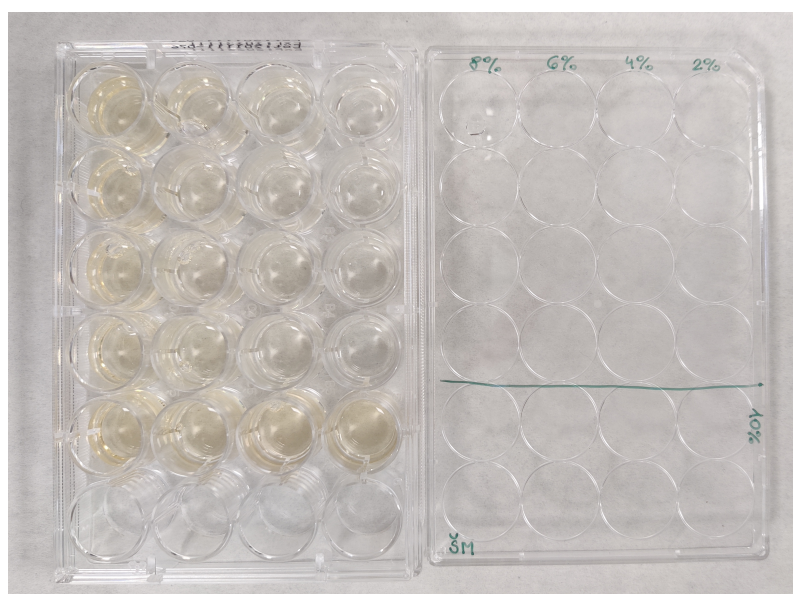
Následující den byly na vzorky nasazeny buňky (3T3-NIH, P10). Experiment byl připraven na 2 TD (1, 3). Na vzorky bylo nasazeno  $5 \cdot 10^4$  buněk na jamku v celkem 2 ml média. Nasazování probíhalo po kapkách. Inkubace probíhala při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Vzorky byly každý TD fixovány vymraženým methanolem a obarveny pomocí DAPI.

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Příprava a výběr želatin

Cílem experimentu bylo zjistit koncentraci, při které bude želatina dobře manipulovatelná, nebude se rozpadat a rozpouštět při 37 °C. Byla připravena koncentrační řada želatin o koncentracích 2, 4, 6, 8, 10 a 12 % (w/w) v dH<sub>2</sub>O, které byly následně síťované v GTA. Na základě práce s disky a s výsledky předběžných cytotoxických testů byla pro další experimenty vybrána koncentrace 8 % (w/w) síťovaná 0,5% a 0,05% roztokem GTA.

Síťování pomocí GTA bylo nejprve provedeno na základě protokolu uvedeného v (Yang et al., 2018). Protokol byl však modifikován, jelikož želatina tuhla nehomogenně, a to buď již v pipetě, nebo ihned v kádince po přidání roztoku GTA. GTA tedy nebyl přidáván do roztoku želatin, želatinové disky byly nejprve odlity a poté máčeny v roztoku GTA při RT.



Obrázek 5.1: Koncentrační řada želatin síťovaných pomocí 0,5% GTA

Síťování pomocí  $\beta$  záření proběhlo nejprve v dávkách 2, 5, 10, 25 a 50 kGy. Cílem bylo zjistit optimální dávku pro řadu želatin o koncentracích 2, 4, 6, 8, 10 a 12 % (w/w). Na základě analýzy rozpustnosti, chování disků želatin a porovnání síťování GTA, byla vybrána koncentrace 8 % a dávka 25 kGy. Tato dávka je zároveň běžná

sterilizační dávka (Singh et al., 2016), což s sebou nese zefektivnění pracovního procesu. Podrobnější popis vlastností želatin ozařovaných jednotlivými dávkami je zpracován v tabulce 5.1.

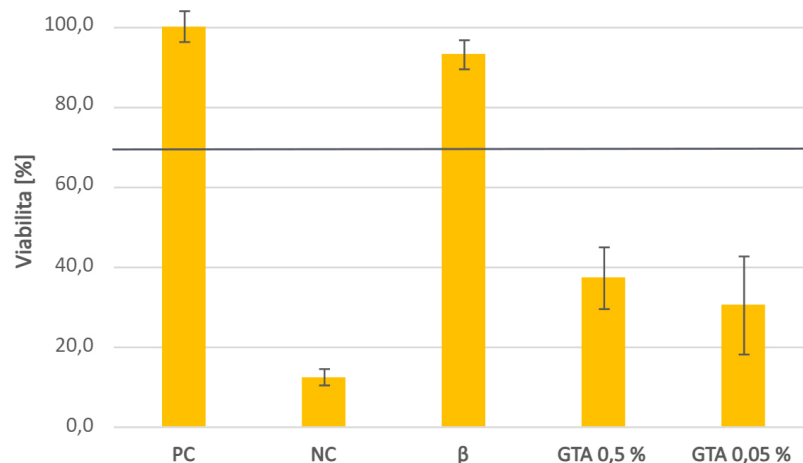
Dávka [kGy]	Koncentrace [hm. %]					
	2	4	6	8	10	12
2	rozpuštěné	rozpuštěné	rozpuštěné	rozpuštěné	rozpuštěné	rozpuštěné
5	gelovité	gelovité	gelovité	nabobtnalé, kompaktní, měkké	nabobtnalé, křehké	nabobtnalé, křehké
10	zmenšený objem, kompaktní	zmenšený objem, kompaktní	nabobtnalé (1,5x), pevné, kompaktní	nabobtnalé (1,5x), pevné, kompaktní	nabobtnalé (2x), pev- né, kom- paktní	nabobtnalé (2,5x), pevné, lepkavé
25	zmenšený objem, kompaktní, pevné	kompaktní, pevné	kompaktní, pevné, tu- hé	mírně na- bobtnalé, pevné, tuhé	nabobtnalé (1,5x), pevné, tuhé	nabobtnalé (1,5x), pevné, tuhé
50	zmenšený objem (0,5x), pevné	zmenšený objem (0,75x), pevné	mírně zmenšený objem, křehké	křehké	křehké	křehké

Tabulka 5.1: Vlastnosti želatinových disků po ozáření různými dávkami  $\beta$  záření.

## 5.2 Testování cytotoxicity

Cílem experimentu bylo zjistit cytotoxicitu výluhů z želatinových disků. Byly použity vzorky 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením, 0,5 % GTA a 0,05 % GTA. Naměřená data byla zpracována do grafu na obrázku 5.2.

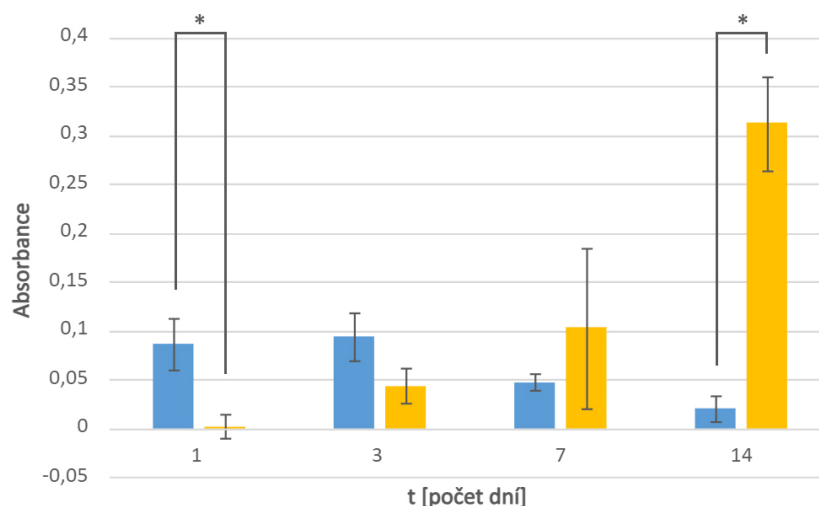
Z naměřených spektrofotometrických dat (obrázek 5.2) vyplývá, že jediným vzorkem, který splňuje kritéria stanovená normou ISO 10993-5 byl vzorek 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením. Z porovnání vzorků síťovaných roztokem GTA se zdá, že viabilita klesá s koncentrací roztoku. GTA je cytotoxická látka (Ehrmann, 2021), bylo předpokládáno, že nízké hodnoty viability mohly být způsobené nedostatečným vymytím GTA ze vzorků při přípravě a jeho následným uvolněním do DMEM. Předpoklad by však naznačoval pokles viability se zvýšením koncentrace, avšak výsledky naznačovaly opak. Obdobný problém vyvstal i u testování biokompatibility, tudíž jeho možné vysvětlení je předneseno v podkapitole 5.4.



Obrázek 5.2: Graf viability výluhů vzorků želatiny. *PC* - pozitivní kontrola; *NC* - negativní kontrola;  $\beta$  - vzorky síťované  $\beta$  zářením; *GTA 0,5 %* - vzorky síťované 0,5% roztokem *GTA*; *GTA 0,05 %* - vzorky síťované 0,05% roztokem *GTA*. V grafu je dále vyznačena hranice 70% viability - hranice stanovená normou ISO 10993-5.

### 5.3 Testování biokompatibility

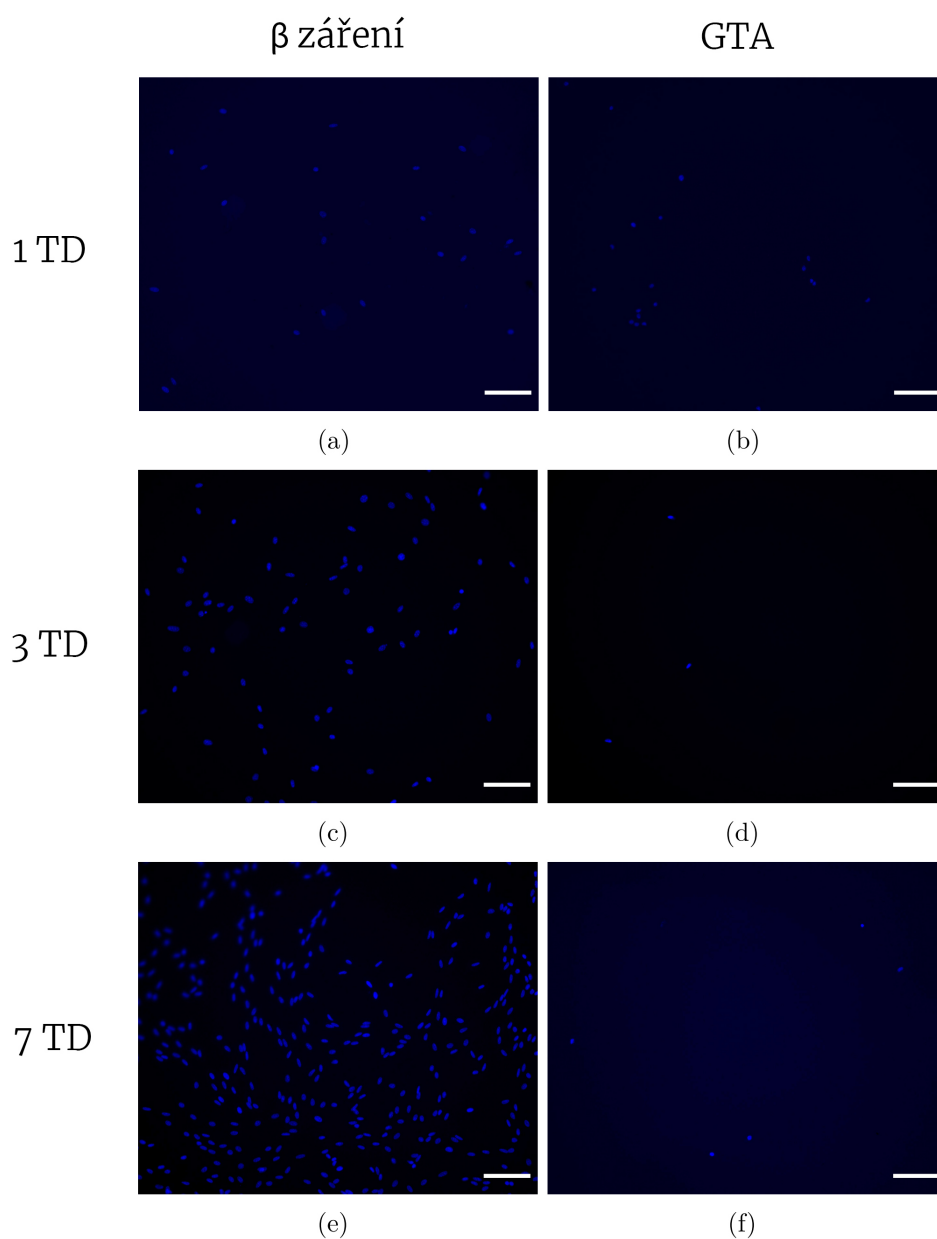
Cílem experimentu bylo zjistit biokompatibilitu výluhů z želatinových disků v kontaktu s buňkami. Byly použity vzorky 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením a 0,5 % *GTA*. Data z měření byla zpracována do grafu na obrázku 5.3.



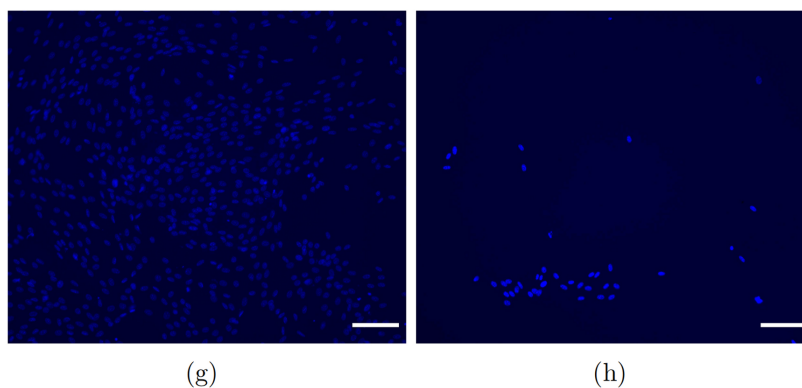
Obrázek 5.3: Graf biokompatibility vzorků želatiny. *Modrá* - vzorky síťované 0,5% roztokem *GTA*; *žlutá* - vzorky síťované  $\beta$  zářením. \* = *p* menší než 0,05. Byla využita 2-way ANOVA (Šídák's multiple comparison test; GraphPad Prism 10.2.2.).

Z analýzy spektrofotometrických dat (obrázek 5.3) vyplývá, že v prvotních dnech se buňkám více dařilo na materiálech síťovaných pomocí GTA. Avšak od 7. dne se viabilita buněk na tomto materiálu snižovala, zatímco na materiálech síťovaných  $\beta$  zářením docházelo ke graduálnímu nárůstu viability.

Úvodní vyšší míra absorpance nekoreluje s výsledky cytotoxicity, kde želatina síťovaná pomocí GTA vykazovala nižší míru viability, než vzorky síťované  $\beta$  zářením. Dále, snímky z FLM (obrázek 5.4) poukazovaly, že buňky více adherovaly a proliferovaly na materiálech síťovaných  $\beta$  zářením. Na těch došlo k výrazně většímu namnožení buněk a kolonizaci celého materiálu v průběhu 14 TD oproti GTA vzorkům.



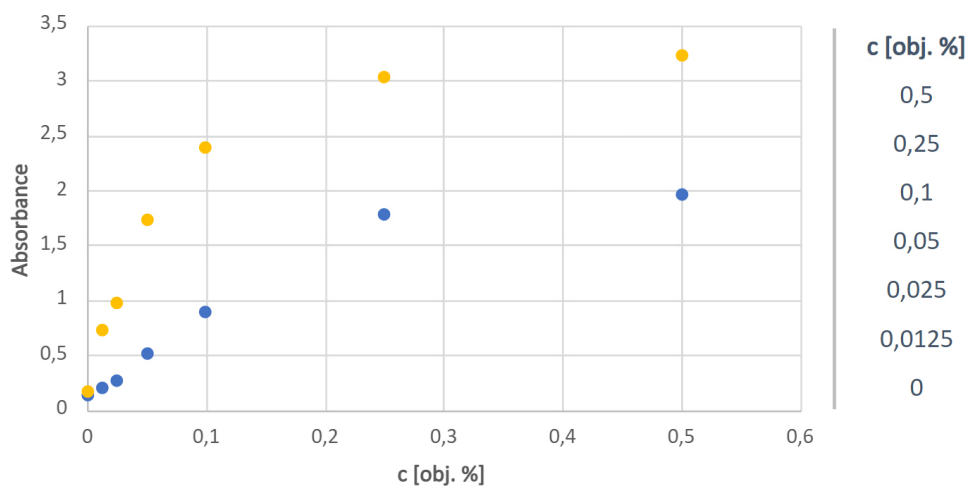
14 TD



Obrázek 5.4: Snímky z FLM barvené pomocí DAPI. *Levý sloupec zachycuje buňky na discích sítovaných  $\beta$  zářením. Pravý sloupec zachycuje buňky na discích sítovaných roztokem GTA. TD jsou seřazeny podle řádků. Měřítko 100  $\mu\text{m}$ .*

## 5.4 Studium interakce GTA s CCK-8

Po zhodnocení snímků z FLM (obrázek 5.4) došlo k revizi výsledků cytotoxicity a biokompatibility pomocí CCK-8. Bylo předpokládáno, že dochází k ovlivnění spektrofotometrického měření interakcí GTA s CCK-8. Na základě toho byl proveden experiment, ve kterém byl pozorován vývoj roztoku CCK-8 s různými koncentracemi roztoku GTA v čase. Výsledky spektrofotometrického měření jsou zachyceny na obrázku 5.5.



Obrázek 5.5: Graf vlivu koncentrace GTA v roztoku CCK-8 na absorbanci. *Modrá - absorbance v čase 0 min; žlutá - absorbance v čase 10 min.*

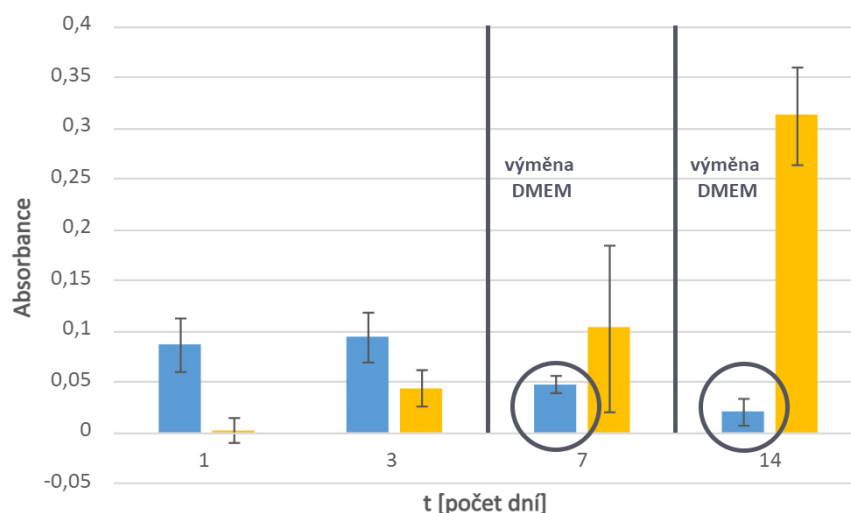
Z grafu je patrné, že všechny koncentrace GTA v roztoku zvýšily absorbanci oproti čistému roztoku CCK-8. V grafu je znázorněn vývoj z 0 minut na 10 minut. Je zde značný nárůst v absorbanci oproti čistému roztoku CCK-8. Vzorke se v CCK-8 inkubují po dobu 3 h, zdá se, že dokonce po i relativně krátké inkubaci

CCK-8 s GTA dochází k nárůstu absorbance a tudíž nelze výsledky z analýz CCK-8 s GTA (cytotoxicita a biokompatibilita) považovat za signifikantní.

Výsledky cytotoxicity, v první řadě vyšší hodnota viability u vzorků síťovaných 0,5% roztokem GTA oproti 0,05% roztoku, kde bychom očekávali vyšší hodnotu viability (obrázek 5.2), mohou být vysvětleny vyšší koncentrací GTA vyplaveného z disků želatiny, ta následně pravděpodobně ovlivnila měření absorbance CCK-8.

Následně by tento jev mohl vysvětlit i nesrovnalosti mezi výsledky biokompatibility a snímky z FLM. Hodnoty z 1. a 3. dne u vzorků síťovaných GTA naznačovaly vysokou míru biokompatibility. Avšak hodnoty nekorelovaly se snímky a počtem buněk na materiálech. Tuto nesrovnalost lze vysvětlit množstvím GTA vyplaveného do roztoku CCK-8 během inkubace. Koncentrace GTA pak pravděpodobně ovlivnila spektrofotometrická měření.

V období mezi 3. a 7. dnem došlo k výměně DMEM u vzorků, což mohlo vést k poklesu absorbance. Po výměně média pravděpodobně nedošlo k tak markantnímu vymytí GTA při následné inkubaci s CCK-8, což mohlo vést k poklesu absorbance, spíše než k jejímu očekávanému zvýšení. Obdobně lze vysvětlit jev mezi 7. a 14. dnem, kdy opět došlo k výměně DMEM.

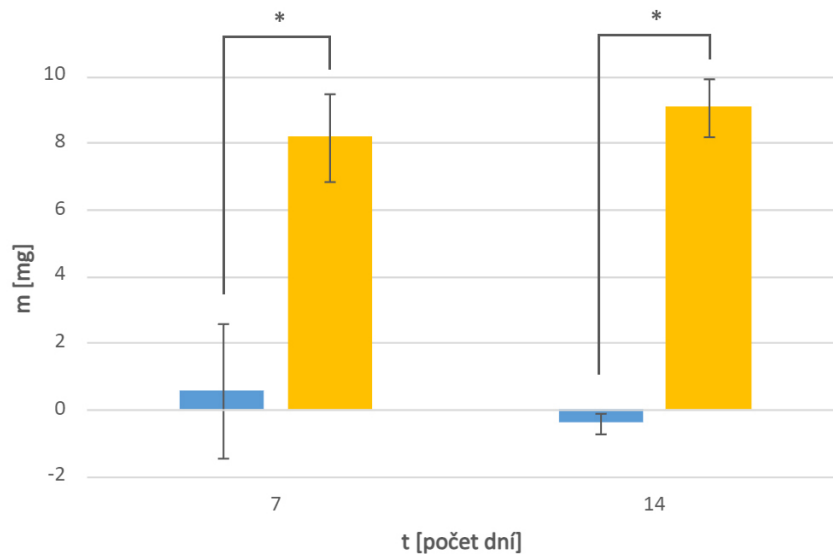


Obrázek 5.6: Graf biokompatibility vzorků želatiny se zvýrazněním výměny média. *Svislé čáry znázorňují čas výměny DMEM, kruhy poukazují na pokles absorbance vzorků.*

## 5.5 Váhové úbytky

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zdali se v průběhu času uvolňuje želatina do okolního roztoku. Byly porovnány vzorky 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením a 0,5 % GTA. Váhové úbytky jsou zaznamenány v grafu na obrázku 5.7.

Z naměřených dat vyplývá, že u vzorků síťovaných pomocí GTA dochází k minimálním váhovým úbytkům. U  $\beta$  síťovaných vzorků dochází k výrazným úbytkům,



Obrázek 5.7: Graf váhových úbytku disků želatin. Modrá - vzorky síťované 0,5% roztokem GTA; žlutá - vzorky síťované  $\beta$  zářením. \* =  $p$  menší než 0,05. Byla využita 2-way ANOVA (Šídák's multiple comparison test; GraphPad Prism 10.2.2.).

v průměru přibližně 8 mg, respektive 9 mg po 7. a 14. TD. To je přibližně 20 a 23 % původní váhy. Zdá se, že nejprve dojde k prvotnímu vyplavení velkého množství hmoty. Následně již nedochází k tak markantnímu úbytku váhy v průběhu času, což naznačuje, že zbytek scaffoldu je pravděpodobně stabilní. Pro přesnější stanovení by bylo zapotřebí sledovat vzorky po delší dobu. Ale pro tuto práci byly zvoleny intervaly 7 a 14 dní, což je i celková doba trvání biologických experimentů v této práci.

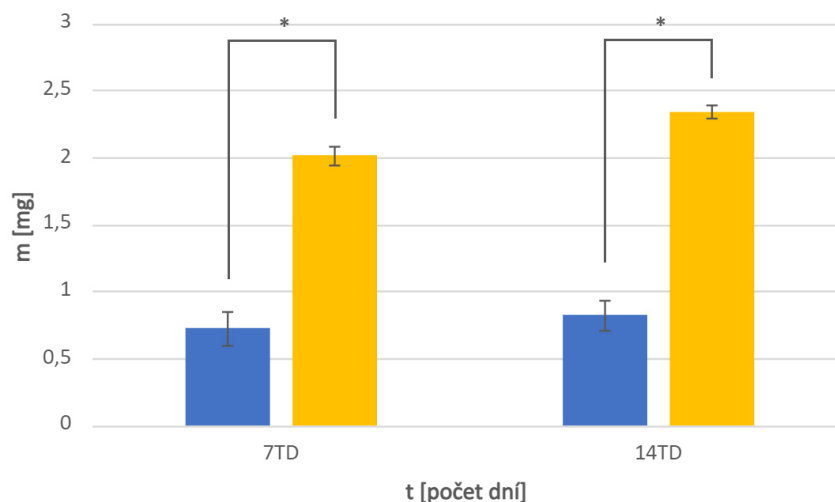
Roztoky, ve kterých byly želatiny inkubovány 7 a 14 dní k analýze váhových úbytků, byly následně analyzovány pomocí BCA analýzy na koncentraci proteinů pomocí. Výsledky jsou zaneseny v grafu na obrázku 5.6.

Z analýzy dat vyplývá, že dochází k většímu vyplavení proteinů v případě  $\beta$  síťovaných vzorků, což odpovídá měření váhových úbytků. Avšak nebylo detekováno takové množství, které by kompenzovalo celkový váhový úbytek proteinů. Dále pak množství detekovaných proteinů u GTA síťovaných želatin je vyšší, než váhový úbytek.

Při makroskopickém porovnání byly  $\beta$  síťované disky menšího průměru, po lyofilizaci následně i nižší hmotnosti. Výsledky naznačují, že  $\beta$  síťované vzorky mohou být neúplně zesíťované, či částečně zdegradované monoenergičtým svazkem elektronů. To následně může ústít v prvotní nárazový úbytek hmotnosti, kdy se část proteinů uvolní do okolního roztoku. Přesnou příčinu však zatím není možné jednoznačně určit.

Vyplavení proteinů z GTA vzorků je pravděpodobně zapříčiněno neúplným síťováním želatiny. Je možné, že i zde interaguje GTA s provedenou analýzou, tento fakt by bylo nutné experimentálně ověřit.





Obrázek 5.8: Graf hmotnosti vyplavených proteinů. Modrá - vzorky síťované 0,5% roztokem GTA; žlutá - vzorky síťované  $\beta$  zářením. \* =  $p$  menší než 0,05. Byla využita 2-way ANOVA (Šídák's multiple comparison test; GraphPad Prism 10.2.2.).

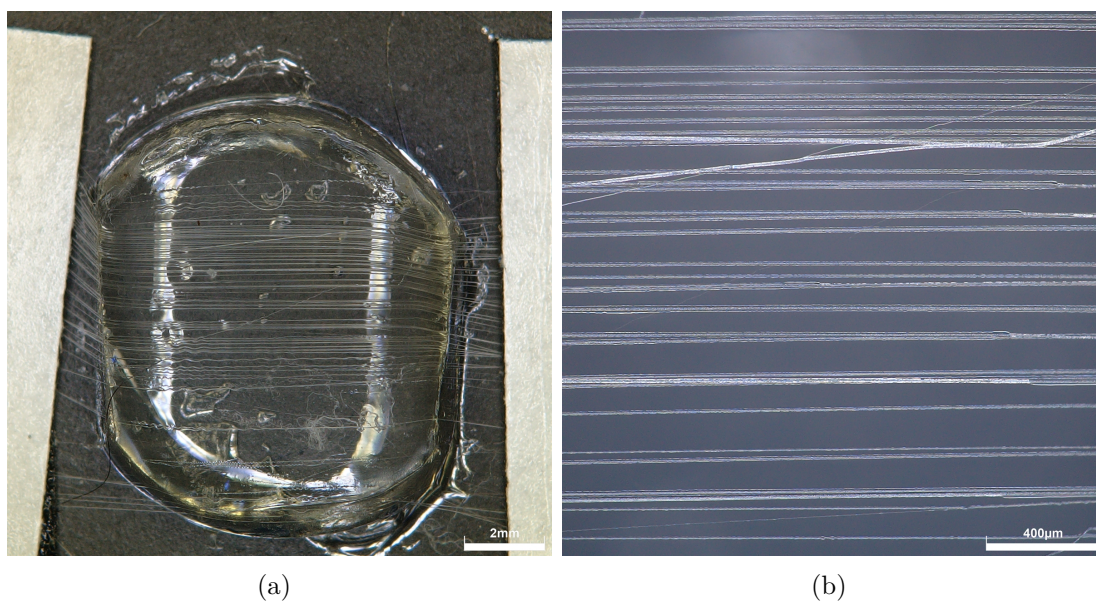
Tento experiment byl uskutečněn poprvé a vzhledem k výsledkům by bylo vhodné některé parametry experimentu poupravit a experiment zopakovat.

## 5.6 Příprava kompozitního scaffoldu

Cílem tohoto experimentu bylo připravit kompozitní scaffold, osadit ho buňkami a pomocí FLM zhodnotit chování buněk na scaffoldu. Byly použity vzorky 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením a orientovaná vlákna vyrobená metodou drawing z 12% PCL .

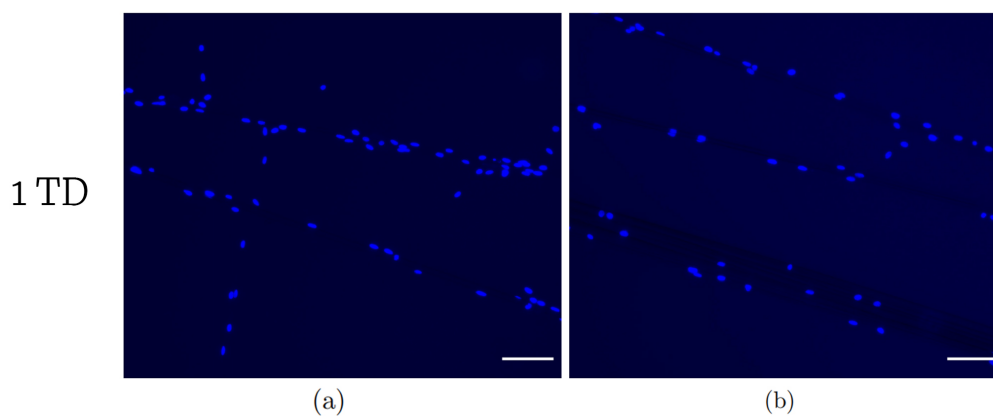
Nejprve byly želatinové disky připevněny na laboratorní sklička a upraveny. Následně bylo otestováno natahování vláken na želatinový disk pomocí zařízení pro výrobu vláken tažením z kapky polymerního roztoku (obrázek 4.2). Postup byl poté upraven pro potřeby sterility vzorků (viz kapitola 4.13). Vytvořené kompozitní materiály byly nasnímány na optickém mikroskopu (obrázek 5.9).

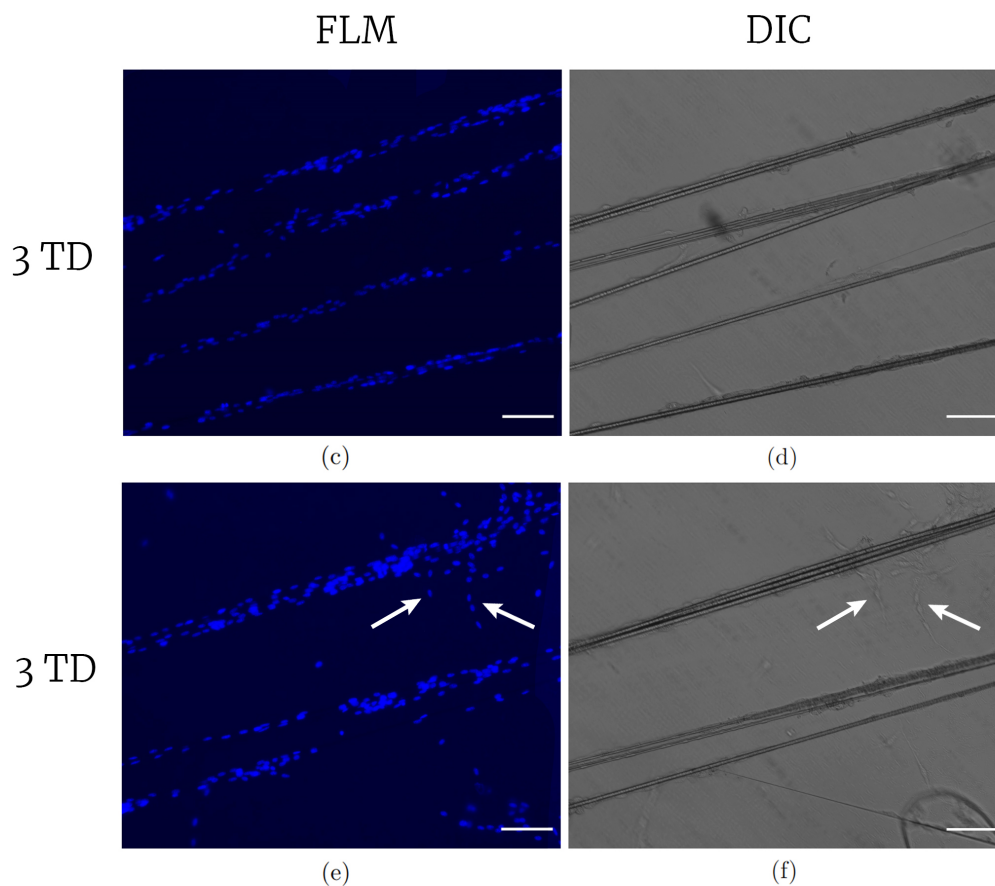
Poté byly připraveny vzorky, které byly sterilně osazeny buňkami. Vzorky byly připraveny na 2 TD (1. a 3.) a poté připraveny na FLM. Snímky z FLM jsou vyobrazeny na obrázku 5.10.



Obrázek 5.9: Snímky kompozitního materiálu. (a) Makroskopický snímek kompozitu želatiny a PCL vláken (měřítko 2 mm). (b) Snímek mikrovláken PCL natažených na želatině (měřítko 400  $\mu\text{m}$ ).

Na snímcích FLM (obrázek 5.10) je patrná preference mikrovláken buňkami. Dále se dá tvrdit, že buňky na materiálu proliferují, migrují dále po materiálu a mezi vlákny. Preference mikrovláken je žádoucí efekt, jelikož vlákna mohou buňkám určovat směr růstu a elongace, což je nezbytná součást scaffoldů pro TI nervové tkáně. Buňky jsou barvené pomocí DAPI, která barví jádra buněk. Ze snímků je patrný oválný charakter jader ve směru orientace vláken. To naznačuje, že jsou buňky protáhlé ve směru orientace vláken, protože tvar buňky a cytoskelet buňky ovlivňuje i tvar jádra.





Obrázek 5.10: FLM a DIC snímky kompozitního materiálu. (a, b) FLM snímky 1. TD (měřítko  $100\ \mu\text{m}$ ). (c, e) FLM snímky 3. TD (d, f) Snímky diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC) ze stejné pozice. Bílé šipky označují buňky migrující po hydrogelu. Měřítko  $100\ \mu\text{m}$ .

Tyto výsledky naznačují, že takto vytvořený kompozit by mohl sloužit jako základ pro materiál TI nervové tkáně. V budoucnu by bylo vhodné se v práci dále zaměřit na:

- Detailnější analýzu váhových úbytků a původ odmyté frakce.
- Studium nasákavosti materiálů.
- Studium mechanických vlastností kompozitního scaffoldu.
- Testy biokompatibility kompozitního scaffoldu.
- Návrh a realizace výroby nového kompozitního scaffoldu ve stylu NGC.

## 6 Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium kompozitního materiálu založeného na hydrogelu ze želatiny a mikrovláknech z poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL). Práce zkoumá různé koncentrace želatiny z hlediska manipulovatelnosti a rozpustnosti při 37 °C a porovnává vliv dvou různých technik síťování hydrogelu na cytotoxicitu, biokompatibilitu a váhové úbytky. Teoretická část popisuje chování buněk na kompozitním scaffoldu a teoretické principy tkáňového inženýrství (TI), zejména s ohledem na nervovou tkáň a strategie léčby poranění nervové soustavy. Experimentální část obsahuje popis přípravy želatinového hydrogelu, jeho fyzikálního síťování, sterilizace a provedené analýzy cytotoxicity, biokompatibility a váhových úbytků. Dále je představen proces výroby kompozitního materiálu a vyhodnocení dat z provedených analýz, včetně fluorescenční mikroskopie.

Cílem této bakalářské práce bylo připravit hydrogelový scaffold v kombinaci s vláknennými nosiči pro tkáňové inženýrství nervové tkáně.

- Na experimenty byla použita prasečí želatina s hodnotou Bloom 300 a PCL o molekulové hmotnosti 80 000 Da. Želatinové hydrogely byly analyzovány za účelem vyhodnocení biokompatibility, cytotoxicity a váhových úbytků.
- Nejprve byla připravena koncentrační řada želatinových disků (2, 4, 6, 8, 10, 12 % (w/w)), ze které byla na základě manipulovatelnosti a rozpustnosti při 37 °C vybrána koncentrace 8 hm. %.
- Želatinové disky o koncentraci 8 hm. % byly následně síťovány dvěma metodami. Vzorky byly síťovány pomocí dvou různých koncentrací glutaraldehydu (GTA, 0,5%, 0,05%), nebo pomocí různých dávek  $\beta$  záření (2, 5, 10, 25 a 50 kGy). Pro následné porovnání cytotoxicity byly vybrány vzorky síťované pomocí 0,5% a 0,05% roztoku GTA a vzorky síťované dávkou 25 kGy. Dávka 25 kGy byla zvolena na základě manipulovatelnosti, rozpustnosti a dále z důvodu, že 25 kGy je i běžná sterilizační dávka v biomedicínské praxi.
- Cytotoxicita byla hodnocena pro vzorky síťované pomocí 0,5% a 0,05% roztoku GTA a vzorky síťované dávkou 25 kGy. Z naměřených dat vyplývá, že jediným vzorkem, který splňuje kritéria stanovená normou ISO 10993-5 (tj. 70% a vyšší viabilita oproti pozitivní kontrole) byl vzorek 8% želatiny síťované  $\beta$  zářením, zatímco oba GTA vzorky byly cytotoxické. Z porovnání vzorků síťovaných roztokem GTA se zdá, že viabilita klesala se snižující se koncentrací roztoku. To bylo v rozporu s předpokladem, jelikož GTA je cytotoxická látka, tudíž

by měla být vyšší koncentrace více toxická. Tento fakt lze vysvětlit interakcí GTA s CCK8, která byla prokázána experimentálně později.

- Analýza viability byla hodnocena pro vzorky síťované pomocí 0,5% roztoku GTA a vzorky síťované dávkou 25 kGy. Výsledky měření viability poukázaly, že v prvotních dnech se buňkám více dařilo na materiálech síťovaných pomocí GTA. Avšak od 7. dne se viabilita buněk na tomto materiálu snižovala, zatímco na materiálech síťovaných  $\beta$  zářením docházelo ke graduálnímu nárůstu viability. Snímky z fluorescenční mikroskopie (FLM) poukázaly, že buňky více adherovaly a proliferovaly na materiálech síťovaných  $\beta$  zářením. Úvodní vyšší míra viability buněk na materiálech síťovaných pomocí GTA dále nesouhlasila s výsledky cytotoxicity, kde želatina síťovaná pomocí GTA vykazovala nižší míru viability. Na základě této diskrepance výsledků byla studována možná interakce GTA s kitem na analýzu viability CCK-8.
- Poté byla studována interakce GTA a CCK-8. GTA v roztoku CCK-8 zvýšil absorbanci oproti čistému roztoku CCK-8. Byl studován vývoj absorbance z 0 minut na 10 minut. Byl zaznamenán značný nárůst v absorbanci oproti čistému roztoku CCK-8 (již koncentrace 0,0125 obj. % zvýšila po 10 minutách absorbanci více než 2x). Tímto mohou být vysvětleny výsledky cytotoxicity. Při nich se po 24 h inkubaci vyplaví GTA do výluhu, který je nasazen na buňky. I když je výluh poté odsát, nelze ovšem odsát veškeré množství. Následně se přidá DMEM a CCK-8. Kvůli zbytkovým množstvím GTA pravděpodobně dochází ke zkreslení výsledků CCK-8.
- Nesrovnalosti mezi výsledky biokompatibility a snímky z FLM mohou být vysvětleny množstvím GTA vyplaveného do roztoku CCK-8 během inkubace. Koncentrace GTA pak pravděpodobně ovlivnila spektrofotometrická měření. V období mezi 3. a 7. dnem a 7. a 14. dnem došlo k výměně DMEM u vzorků. Po výměně média pravděpodobně nedošlo k tak velkému vymytí GTA při následné inkubaci s CCK-8, což mohlo vést k pozorovanému poklesu absorbance.
- Měření váhových úbytků dále naznačilo, že u vzorků síťovaných pomocí GTA dochází k minimálním váhovým úbytkům, zatímco u  $\beta$  síťovaných vzorků dochází k výrazným úbytkům, v průměru přibližně 8 mg, respektive 9 mg po 7. a 14. testovacím dni. To je přibližně 20 a 23 % původní váhy. Zdá se, že nejprve dojde k prvotnímu vyplavení velkého množství hmoty. Následně již nedochází k tak markantnímu úbytku váhy v průběhu času, což naznačuje, že zbytek scaffoldu je pravděpodobně stabilní, což koreluje i s výsledky BCA analýzy. BCA analýza roztoků váhových úbytků poukázala, že dochází k většímu vyplavení proteinů v případě  $\beta$  síťovaných vzorků. Avšak nebylo detekováno takové množství, které by kompenzovalo celkový váhový úbytek proteinů. Dále pak množství detekovaných proteinů u GTA síťovaných želatin je vyšší, než váhový úbytek. Je možné, že i zde interaguje GTA s provedenou analýzou, tento fakt by bylo nutné experimentálně ověřit.

- Při makroskopickém porovnání byly  $\beta$  síťované disky menšího průměru, po lyofilizaci následně i nižší hmotnosti. Výsledky naznačují, že  $\beta$  síťované vzorky mohou být neúplně zesíťované, či částečně zdegradované monoenergetickým svazkem elektronů. Přesnou příčinu prvotního uvolnění proteinů však zatím není možné jednoznačně určit a bude nutné se na tuto analýzu zaměřit v budoucnu. Vyplavení proteinů z GTA vzorků je pravděpodobně zapříčiněno neúplným síťováním želatiny.
- V neposlední řadě byl připraven kompozitní scaffold z 8% želatinového hydrogelu síťovaného pomocí  $\beta$  záření s mikrovláknem z PCL připravených metodou drawing. Scaffold byl osazen myšími fibroblasty a byl nasnímán v 1. a 3. testovacím dni na FLM. Na snímcích FLM byla v 1. TD patrná preference mikrovláken buňkami. Při porovnání snímků z 3. TD je vidět, že buňky na materiálu na materiálu proliferovaly, migrovaly dále po materiálu a mezi vlákna. Preference mikrovláken je žádoucí efekt, jelikož vlákna mohou buňkám určovat směr růstu. To by v případě nervové tkáně mohlo napomoci i elongaci axonů nervových buněk, což je nezbytná součást scaffoldů pro TI nervové tkáně. Ze snímků byl patrný oválný charakter jader ve směru orientace vláken, což naznačuje, že jsou buňky protáhlé ve směru orientace vláken. Tyto výsledky naznačují, že takto vytvořený kompozit by mohl sloužit jako základ pro materiál TI nervové tkáně.

Z námi naměřených dat vyplývá, že želatina síťovaná beta zářením je necytotoxická a vykazuje dobrou biokompatibilitu v průběhu našeho experimentu. Zároveň v kombinaci s orientovanými vlákny se ukazuje, že buňky rostou primárně po vlákněch, ale zároveň jsou schopny přelézat i mezi vlákna po želatině, což naznačuje, že takto připravený materiál by mohl sloužit jako materiál TI nervové tkáně. Dále by bylo vhodné provést testy biokompatibility s kompozitními scaffoldy. Bylo by také vhodné se pokusit zachytit migraci buněk do objemu scaffoldu. Nezbytnou součástí jsou také mechanické testy. Jak bylo ukázáno v jiných studiích, mechanika scaffoldu ovlivňuje například diferenciaci, adhezi a migraci buněk (Clause et al., 2010). Na základě výsledků mechanických testů by bylo nutné materiál dále optimalizovat pro zlepšení výše zmíněných faktorů a přizpůsobit ho pro buňky nervového aparátu. Dále by bylo nutné upravit design scaffoldu. V tomto uspořádání se mikrovláknem nacházejí na povrchu želatiny, avšak výhodné by bylo, vytvořit strukturu podobnou výše zmíněným NGC (Lackington et al., 2017), to je vytvořit vodivé kanály v objemu želatiny, které by byly vystlány mikrovláknem. Dále, scaffoldy pro TI nervové tkáně je potřebné tvarově optimalizovat podle poranění. K tomu jsou hydrogely výhodné, jelikož je lze relativně snadno tvarově optimalizovat. Zde by klíčovou roli mohl hrát 3D tisk, který by pomohl vytvořit přesný požadovaný tvar materiálu. V neposlední řadě by bylo nutné pokračovat s rozsáhlejšími *in vitro* testy, například na buněčných liniích NSC. Při úspěšných *in vitro* testech a optimalizovaném designu a výrobě scaffoldu by bylo možné přistoupit na *in vivo* testy.

## Literatura

- Abdal-hay, A., Memic, A., Hussein, K. H., Oh, Y. S., Fouad, M., Al-Jassir, F. F., Woo, H.-M., Morsi, Y., Mo, X., and Ivanovski, S. (2017). Rapid fabrication of highly porous and biocompatible composite textile tubular scaffold for vascular tissue engineering. *European Polymer Journal*, 96:27–43.
- Agarwal, S. (2010). Chemistry, chances and limitations of the radical ring-opening polymerization of cyclic ketene acetals for the synthesis of degradable polyesters. *Polymer Chemistry*, 1(7):953.
- Ahmed, J. (2017). *Rheological Properties of Gelatin and Advances in Measurement*, page 377–404. Elsevier.
- Alghoraibi, I. and Alomari, S. (2018). *Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication*, page 1–46. Springer International Publishing.
- Alipal, J., Mohd Pu'ad, N., Lee, T., Nayan, N., Sahari, N., Basri, H., Idris, M., and Abdullah, H. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42:240–250.
- Amani, H., Kazerooni, H., Hassanpoor, H., Akbarzadeh, A., and Pazoki-Toroudi, H. (2019). Tailoring synthetic polymeric biomaterials towards nerve tissue engineering: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1):3524–3539.
- Andreazza, R., Morales, A., Pieniz, S., and Labidi, J. (2023). Gelatin-based hydrogels: Potential biomaterials for remediation. *Polymers*, 15(4):1026.
- Anjum, N., Chevlot, Y., Gupta, B., Leonard, D., Mathieu, H., Pruitt, L., Ruiz-Taylor, L., and Scholz, M. (2003). *Radiation effects on polymers for biological use*, volume 162. Springer Science & Business Media.
- Aszódi, A., Legate, K. R., Nakchbandi, I., and Fässler, R. (2006). What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1):591–621.
- Avilés, M. O. and Shea, L. D. (2010). Hydrogels to modulate lentivirus delivery in vivo from microporous tissue engineering scaffolds. *Drug Delivery and Translational Research*, 1(1):91–101.

- Bae, J. W., Choi, J. H., Lee, Y., and Park, K. D. (2014). Horseradish peroxidase-catalysed in situ-forming hydrogels for tissue-engineering applications: Hrp-catalysed in situ-forming hydrogels. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11):1225–1232.
- Balgude, A. (2001). Agarose gel stiffness determines rate of drg neurite extension in 3d cultures. *Biomaterials*, 22(10):1077–1084.
- Balogh, A., Farkas, B., Faragó, K., Farkas, A., Wagner, I., Van assche, I., Verreck, G., Nagy, Z. K., and Marosi, G. (2015). Melt-blown and electrospun drug-loaded polymer fiber mats for dissolution enhancement: A comparative study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(5):1767–1776.
- Bartlett, R. D., Choi, D., and Phillips, J. B. (2016). Biomechanical properties of the spinal cord: implications for tissue engineering and clinical translation. *Regenerative Medicine*, 11(7):659–673.
- Bartlett, R. D., Eleftheriadou, D., Evans, R., Choi, D., and Phillips, J. B. (2020). Mechanical properties of the spinal cord and brain: Comparison with clinical-grade biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 258:120303.
- Beachley, V. and Wen, X. (2010). Polymer nanofibrous structures: Fabrication, bio-functionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science*, 35(7):868–892.
- Bellamkonda, R., Ranieri, J. P., Bouche, N., and Aebischer, P. (1995). Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(5):663–671.
- Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H., and Lee, S.-H. (2020). Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(2):164–180.
- Benbettaieb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.-H., and Debeaufort, F. (2016). Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chemistry*, 195:11–18.
- Bertsch, P., Diba, M., Mooney, D. J., and Leeuwenburgh, S. C. G. (2022). Self-healing injectable hydrogels for tissue regeneration. *Chemical Reviews*, 123(2):834–873.
- Bhat, G. (2015). Melt blown polymeric nanofibers for medical applications-an overview. *Nanoscience amp; Technology: Open Access*, 2(1).
- Bhushan, S., Singh, S., Maiti, T. K., Sharma, C., Dutt, D., Sharma, S., Li, C., and Tag Eldin, E. M. (2022). Scaffold fabrication techniques of biomaterials for bone tissue engineering: A critical review. *Bioengineering*, 9(12):728.



- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., and Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22(8):763–768.
- Boys, C. V. (1887). On the production, properties, and some suggested uses of the finest threads.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., Eisenberg, H. M., Flamm, E., Leo-Summers, L., Maroon, J., Marshall, L. F., Perot, P. L., Piepmeier, J., Sonntag, V. K., Wagner, F. C., Wilberger, J. E., and Winn, H. R. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: Results of the second national acute spinal cord injury study. *New England Journal of Medicine*, 322(20):1405–1411.
- Butscher, A., Bohner, M., Hofmann, S., Gauckler, L., and Müller, R. (2011). Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomaterialia*, 7(3):907–920.
- Cai, S., Liu, Y., Shu, X. Z., and Prestwich, G. D. (2005). Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26(30):6054–6067.
- Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., and Boccafoschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(10).
- Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., and Cao, Y. (2008). Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. *Pediatric Research*, 63(5):492–496.
- Chahal, S., Kumar, A., and Hussian, F. S. J. (2019). Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(14):1308–1355.
- Chakraborty, S., Liao, I.-C., Adler, A., and Leong, K. W. (2009). Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12):1043–1054.
- Chang, N., Yeh, M., and Jhung, Y. (2009). Fabricating PLGA sponge scaffold integrated with gelatin/hyaluronic acid for engineering cartilage. In *2009 IEEE 35th Annual Northeast Bioengineering Conference*. IEEE.
- Chaudhari, A., Vig, K., Baganizi, D., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S., and Pillai, S. (2016). Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12):1974.

- Cho, H., Gao, J., and Kwon, G. S. (2016). Peg-b -pla micelles and plga-b -peg-b -plga sol-gels for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 240:191–201.
- Choi, Y. R., Kim, E. H., Lim, S., and Choi, Y. S. (2018). Efficient preparation of a permanent chitosan/gelatin hydrogel using an acid-tolerant tyrosinase. *Biochemical Engineering Journal*, 129:50–56.
- Clause, K. C., Liu, L. J., and Tobita, K. (2010). Directed stem cell differentiation: The role of physical forces. *Cell Communication amp; Adhesion*, 17(2):48–54.
- Corey, J. M., Lin, D. Y., Mycek, K. B., Chen, Q., Samuel, S., Feldman, E. L., and Martin, D. C. (2007). Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A(3):636–645.
- Dey, S. C., Al-Amin, M., Rashid, T. U., Ashaduzzaman, M., and Shamsuddin, S. M. (2016). pH induced fabrication of kaolinite-chitosan biocomposite. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 68:1–9.
- Doblado, L. R., Martínez-Ramos, C., and Pradas, M. M. (2021). Biomaterials for neural tissue engineering. *Frontiers in Nanotechnology*, 3.
- Dorpema, J. (1990). Review and state of the art on radiation sterilization of medical devices. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 35(1–3):357–360.
- Dzierzkowska, E., Scisłowska-Czarnecka, A., Kudzin, M., Boguń, M., Szatkowski, P., Gajek, M., Kornaus, K., Chadzinska, M., and Stodolak-Zych, E. (2021). Effects of process parameters on structure and properties of melt-blown poly(lactic acid) nonwovens for skin regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(1):16.
- Ehrmann, A. (2021). Non-toxic crosslinking of electrospun gelatin nanofibers for tissue engineering and biomedicine—a review. *Polymers*, 13(12):1973.
- Elomaa, L., Teixeira, S., Hakala, R., Korhonen, H., Grijpma, D. W., and Seppälä, J. V. (2011). Preparation of poly(-caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Acta Biomaterialia*, 7(11):3850–3856.
- Erben, J., Pilarova, K., Sanetrnik, F., Chvojka, J., Jencova, V., Blazkova, L., Havlicek, J., Novak, O., Mikes, P., Prosecka, E., Lukas, D., and Kuzelova Kostakova, E. (2015). The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Materials Letters*, 143:172–176.
- Erbetta, C. D. C. (2012). Synthesis and characterization of poly(d, l-lactide-co-glycolide) copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 03(02):208–225.
- Evans, P. J., Midha, R., and Mackinnon, S. E. (1994). The peripheral nerve allograft: A comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Progress in Neurobiology*, 43(3):187–233.

- Fan, L., Liu, C., Chen, X., Zou, Y., Zhou, Z., Lin, C., Tan, G., Zhou, L., Ning, C., and Wang, Q. (2018). Directing induced pluripotent stem cell derived neural stem cell fate with a three-dimensional biomimetic hydrogel for spinal cord injury repair. *ACS applied materials & interfaces*, 10(21):17742–17755.
- Flanagan, L. A., Ju, Y.-E., Marg, B., Osterfield, M., and Janmey, P. A. (2002). Neurite branching on deformable substrates. *NeuroReport*, 13(18):2411–2415.
- Garrod, M. and Chau, D. Y. S. (2016). An overview of tissue engineering as an alternative for toxicity assessment. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 19(1):31.
- Gazzola, W. H., Benson, R. S., and Carver, W. (2019). Meltblown polylactic acid nanowebs as a tissue engineering scaffold. *Annals of Plastic Surgery*, 83(6):716–721.
- Geus, H.-G. (2016). *Developments in manufacturing techniques for technical nonwovens*, page 133–153. Elsevier.
- Goissis, G., Marcantonio, E., Marcantônio, R. A. C., Lia, R. C. C., Cancian, D. C., and Carvalho, W. M. d. (1999). Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials*, 20(1):27–34.
- Gombotz, W. R., Guanghui, W., Horbett, T. A., and Hoffman, A. S. (1991). Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(12):1547–1562.
- Gravert, D. J. and Janda, K. D. (1997). Organic synthesis on soluble polymer supports: liquid-phase methodologies. *Chemical Reviews*, 97(2):489–510.
- Griffith, L. G. and Naughton, G. (2002). Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295(5557):1009–1014.
- Gu, Z., Xie, H., Huang, C., Li, L., and Yu, X. (2013). Preparation of chitosan/silk fibroin blending membrane fixed with alginate dialdehyde for wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58:121–126.
- Guimarães, C. F., Gasperini, L., Marques, A. P., and Reis, R. L. (2020). The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(5):351–370.
- Guo, T., Zhang, N., Huang, J., Pei, Y., Wang, F., and Tang, K. (2018). A facile fabrication of core-shell sodium alginate/gelatin beads for drug delivery systems. *Polymer Bulletin*, 76(1):87–102.
- G.V, Y. D., Prabhu, A., Anil, S., and Venkatesan, J. (2021). Preparation and characterization of dexamethasone loaded sodium alginate-graphene oxide microspheres for bone tissue engineering. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64:102624.

- H. Gulrez, S. K., Al-Assaf, S., and O, G. (2011). *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*. InTech.
- Harris, J. P., Struzyna, L. A., Murphy, P. L., Adewole, D. O., Kuo, E., and Cullen, D. K. (2016). Advanced biomaterial strategies to transplant preformed micro-tissue engineered neural networks into the brain. *Journal of Neural Engineering*, 13(1):016019.
- Hartman, R., Brunner, D., Camelot, D., Marijnissen, J., and Scarlett, B. (1999). Electrohydrodynamic atomization in the cone-jet mode physical modeling of the liquid cone and jet. *Journal of Aerosol Science*, 30(7):823–849.
- Horn, E. M., Beaumont, M., Shu, X. Z., Harvey, A., Prestwich, G. D., Horn, K. M., Gibson, A. R., Preul, M. C., and Panitch, A. (2007). Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 6(2):133–140.
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., and Madihally, S. V. (2005). In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(36):7616–7627.
- Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15):2223–2253.
- Irawan, V., Sung, T.-C., Higuchi, A., and Ikoma, T. (2018). Collagen scaffolds in cartilage tissue engineering and relevant approaches for future development. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(6):673–697.
- Islam, M. M., Shahruzzaman, M., Biswas, S., Sakib, M. N., and Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-a review. *Bioactive Materials*, 5(1):164–183.
- Jin, S., Xia, X., Huang, J., Yuan, C., Zuo, Y., Li, Y., and Li, J. (2021). Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 127:56–79.
- Johnstone, B., Alini, M., Cucchiaroni, M., Dodge, G., Eglin, D., Guilak, F., Madry, H., Mata, A., Mauck, R., Semino, C., and Stoddart, M. (2013). Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art. *European Cells and Materials*, 25:248–267.
- Kara, Y. and Molnár, K. (2021). A review of processing strategies to generate melt-blown nano/microfiber mats for high-efficiency filtration applications. *Journal of Industrial Textiles*, 51(1<sub>suppl</sub>) : 137S – –180S.
- Karim, A. and Bhat, R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science amp; Technology*, 19(12):644–656.

- Katayama, Y., Montenegro, R., Freier, T., Midha, R., Belkas, J. S., and Shoichet, M. S. (2006). Coil-reinforced hydrogel tubes promote nerve regeneration equivalent to that of nerve autografts. *Biomaterials*, 27(3):505–518.
- Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., and Vacanti, J. P. (2006). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8):2480–2487.
- Kim, J. W., Kim, M. J., Ki, C. S., Kim, H. J., and Park, Y. H. (2017). Fabrication of bi-layer scaffold of keratin nanofiber and gelatin-methacrylate hydrogel: Implications for skin graft. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105:541–548.
- Kim, Y. B. and Kim, G. H. (2015). Pcl/alginate composite scaffolds for hard tissue engineering: Fabrication, characterization, and cellular activities. *ACS Combinatorial Science*, 17(2):87–99.
- Koch, D., Rosoff, W. J., Jiang, J., Geller, H. M., and Urbach, J. S. (2012). Strength in the periphery: Growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophysical Journal*, 102(3):452–460.
- Kosaraju, S. L., Puvanenthiran, A., and Lillford, P. (2010). Naturally crosslinked gelatin gels with modified material properties. *Food Research International*, 43(10):2385–2389.
- Kundu, J., Shim, J.-H., Jang, J., Kim, S.-W., and Cho, D.-W. (2013). An additive manufacturing-based pcl-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering: Pcl-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11):1286–1297.
- Labet, M. and Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12):3484.
- Lackington, W. A., Ryan, A. J., and O’Brien, F. J. (2017). Advances in nerve guidance conduit-based therapeutics for peripheral nerve repair. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 3(7):1221–1235.
- Langer, R. and Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110):920–926.
- Lee, J. B., Ko, Y.-G., Cho, D., Park, W. H., and Kwon, O. H. (2017). Modification and optimization of electrospun gelatin sheets by electron beam irradiation for soft tissue engineering. *Biomaterials Research*, 21(1).
- Lee, J. W., Choi, Y.-J., Yong, W.-J., Pati, F., Shim, J.-H., Kang, K. S., Kang, I.-H., Park, J., and Cho, D.-W. (2016). Development of a 3d cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. *Biofabrication*, 8(1):015007.
- Li, J. and Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12).

- Liao, C., Chen, C., Chen, J., Chiang, S., Lin, Y., and Chang, K. (2001). Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(4):676–681.
- Liao, E., Yaszemski, M., Krebsbach, P., and Hollister, S. (2007). Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen i hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Engineering*, 13(3):537–550.
- Lu, H. H., El-Amin, S. F., Scott, K. D., and Laurencin, C. T. (2003). Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, 64A(3):465–474.
- Lu, L., Yuan, S., Wang, J., Shen, Y., Deng, S., Xie, L., and Yang, Q. (2018). The formation mechanism of hydrogels. *Current Stem Cell Research amp; Therapy*, 13(7):490–496.
- Lu, T., Li, Y., and Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, page 337.
- Lundborg, G. (1988). *Nerve injury and repair*. Churchill Livingstone, London, England.
- Ma, Z., Hu, S., Tan, J. S., Myer, C., Njus, N. M., and Xia, Z. (2013). In vitro and in vivo mechanical properties of human ulnar and median nerves. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(9):2718–2725.
- Mackinnon, S. E. and Hudson, A. R. (1992). Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 90(4):695–699.
- Madhusudanan, P., Raju, G., and Shankarappa, S. (2020). Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, 17(162):20190505.
- Majdan, M., Plancikova, D., Maas, A., Polinder, S., Feigin, V., Theadom, A., Rusnak, Brazinova, A., and Haagsma, J. (2017). Years of life lost due to traumatic brain injury in europe: A cross-sectional analysis of 16 countries. *PLOS Medicine*, 14(7):e1002331.
- Manyalich, M., Nelson, H., and Delmonico, F. L. (2018). The need and opportunity for donation after circulatory death worldwide. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 23(1):136–141.
- Mao, J. S., liu, H. F., Yin, Y. J., and Yao, K. D. (2003). The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials*, 24(9):1621–1629.

- Martins, C., Sousa, F., Araújo, F., and Sarmiento, B. (2017). Functionalizing PLGA and PLGA derivatives for drug delivery and tissue regeneration applications. *Advanced Healthcare Materials*, 7(1):1701035.
- Matsumoto, K., Ohnishi, K., Kiyotani, T., Sekine, T., Ueda, H., Nakamura, T., Endo, K., and Shimizu, Y. (2000). Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (pga)–collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*, 868(2):315–328.
- Melchels, F. P., Feijen, J., and Grijpma, D. W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31(24):6121–6130.
- Mi, H.-Y., Jiang, Y., Jing, X., Enriquez, E., Li, H., Li, Q., and Turng, L.-S. (2019). Fabrication of triple-layered vascular grafts composed of silk fibers, polyacrylamide hydrogel, and polyurethane nanofibers with biomimetic mechanical properties. *Materials Science and Engineering: C*, 98:241–249.
- Midha, R., Munro, C. A., Dalton, P. D., Tator, C. H., and Shoichet, M. S. (2003). Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *Journal of Neurosurgery*, 99(3):555–565.
- Mjahed, H., Porcel, C., Senger, B., Chassepot, A., Netter, P., Gillet, P., Decher, G., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Benkirane-Jessel, N., and Boulmedais, F. (2008). Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(l-lysine)–hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering. *Soft Matter*, 4(7):1422.
- Mohanto, S., Narayana, S., Merai, K. P., Kumar, J. A., Bhunia, A., Hani, U., Al Fatease, A., Gowda, B. J., Nag, S., Ahmed, M. G., Paul, K., and Vora, L. K. (2023). Advancements in gelatin-based hydrogel systems for biomedical applications: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253:127143.
- Moreira Teixeira, L. S., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J., and Karperien, M. (2012). Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 33(5):1281–1290.
- Mota, C., Puppi, D., Chiellini, F., and Chiellini, E. (2012). Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs: Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(3):174–190.
- Mozhdehbakhsh Mofrad, Y. and Shamloo, A. (2023). The effect of conductive aligned fibers in an injectable hydrogel on nerve tissue regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 645:123419.
- Nam, H. S., An, J., Chung, D. J., Kim, J.-H., and Chung, C.-P. (2006). Controlled release behavior of bioactive molecules from photo-reactive hyaluronic acid-alginate scaffolds. *Macromolecular Research*, 14(5):530–538.

- Nezhad-Mokhtari, P., Ghorbani, M., Roshangar, L., and Soleimani Rad, J. (2019). Chemical gelling of hydrogels-based biological macromolecules for tissue engineering: Photo-and enzymatic-crosslinking methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139:760–772.
- Norouzi, S. K. and Shamloo, A. (2019). Bilayered heparinized vascular graft fabricated by combining electrospinning and freeze drying methods. *Materials Science and Engineering: C*, 94:1067–1076.
- Novikova, L. N., Pettersson, J., Brohlin, M., Wiberg, M., and Novikov, L. N. (2008). Biodegradable poly- $\gamma$ -hydroxybutyrate scaffold seeded with schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials*, 29(9):1198–1206.
- Nur Hanani, Z., Roos, Y., and Kerry, J. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71:94–102.
- Oakland, R. J., Hall, R. M., Wilcox, R. K., and Barton, D. C. (2006). The biomechanical response of spinal cord tissue to uniaxial loading. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 220(4):489–492.
- O’Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3):88–95.
- Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., and Feijen, J. (1995). Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6(8):460–472.
- Oliveira, E. P., Silva-Correia, J., Reis, R. L., and Oliveira, J. M. (2018). *Biomaterials Developments for Brain Tissue Engineering*, page 323–346. Springer Singapore.
- Ovsianikov, A., Deiwick, A., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Möller, L., Dräger, G., and Chichkov, B. (2011). Laser fabrication of three-dimensional cad scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering. *Biomacromolecules*, 12(4):851–858.
- Peppas, N. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1):27–46.
- Platt, J. L., Vercellotti, G. M., Dalmaso, A. P., Matas, A. J., Bolman, R., Najarian, J. S., and Bach, F. H. (1990). Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunology Today*, 11:450–456.
- Pokorny, P., Kostakova, E., Sanetnik, F., Mikes, P., Chvojka, J., Kalous, T., Bilek, M., Pejchar, K., Valtera, J., and Lukas, D. (2014). Effective ac needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(48):26816–26822.



- Politrón-Zepeda, G. A., Fletes-Vargas, G., and Rodríguez-Rodríguez, R. (2024). Injectable hydrogels for nervous tissue repair—a brief review. *Gels*, 10(3):190.
- Qian, L. and Zhang, H. (2010). Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(2):172–184.
- Qiu, L., Qi See, A. A., Steele, T. W. J., and Kam King, N. K. (2020). Bioadhesives in neurosurgery: a review. *Journal of Neurosurgery*, 133(6):1928–1938.
- Rea, P. (2015). *Introduction to the Nervous System*, page 1–50. Elsevier.
- Ren, T., Gan, J., Zhou, L., and Chen, H. (2020). Physically crosslinked hydrogels based on poly (vinyl alcohol) and fish gelatin for wound dressing application: Fabrication and characterization. *Polymers*, 12(8):1729.
- Ren, Y.-J., Zhou, Z.-Y., Cui, F.-Z., Wang, Y., Zhao, J.-P., and Xu, Q.-Y. (2009). Hyaluronic acid/polylysine hydrogel as a transfer system for transplantation of neural stem cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24(1):56–62.
- Sarbon, N. M., Badii, F., and Howell, N. K. (2013). Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food hydrocolloids*, 30(1):143–151.
- Saxena, T., Gilbert, J., Stelzner, D., and Hasenwinkel, J. (2012). Mechanical characterization of the injured spinal cord after lateral spinal hemisection injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 29(9):1747–1757.
- Scheib, J. and Höke, A. (2013). Advances in peripheral nerve regeneration. *Nature Reviews Neurology*, 9(12):668–676.
- Schmidt, C. E. and Leach, J. B. (2003). Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5(1):293–347.
- Sencadas, V., Correia, D., Ribeiro, C., Moreira, S., Botelho, G., Ribelles, J. G., and Lanceros-Mendez, S. (2012). Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats. *Polymer Testing*, 31(8):1062–1069.
- Shafei, S., Foroughi, J., Stevens, L., Wong, C. S., Zabihi, O., and Naebe, M. (2016). Electroactive nanostructured scaffold produced by controlled deposition of ppy on electrospun pcl fibres. *Research on Chemical Intermediates*, 43(2):1235–1251.
- Shafiee, A. and Atala, A. (2017). Tissue engineering: Toward a new era of medicine. *Annual Review of Medicine*, 68(1):29–40.
- Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., and Rao, S. (2018). Pcl-based composite scaffold matrices for tissue engineering applications. *Molecular Biotechnology*, 60(7):506–532.

- Singh, R., Singh, D., and Singh, A. (2016). Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World Journal of Radiology*, 8(4):355.
- Sinha, V., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., and Trehan, A. (2004). Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1):1–23.
- Sivan, M., Madheswaran, D., Valtera, J., Kostakova, E. K., and Lukas, D. (2022). Alternating current electrospinning: The impacts of various high-voltage signal shapes and frequencies on the spinnability and productivity of polycaprolactone nanofibers. *Materials and Design*, 213:110308.
- Skoog, S. A., Goering, P. L., and Narayan, R. J. (2013). Stereolithography in tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(3):845–856.
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., and Zeugolis, D. I. (2018). The collagen suprafamily: From biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced Materials*, 31(1).
- Strnadová, K. (2021). Drawing: Příprava scaffoldů pro regeneraci nervové tkáně. *Online, disertační práce*.
- Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., and Wahid, F. (2020). A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(6):1027–1037.
- Sultana, S., Ali, M. E., and Ahamad, M. N. U. (2018). *Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients*, page 215–239. Elsevier.
- Sun, B., Long, Y., Zhang, H., Li, M., Duvail, J., Jiang, X., and Yin, H. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*, 39(5):862–890.
- Sung, H.-W., Huang, D.-M., Chang, W.-H., Huang, R.-N., and Hsu, J.-C. (1999). Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research*, 46(4):520–530.
- Suvarnapathaki, S., Nguyen, M. A., Wu, X., Nukavarapu, S. P., and Camci-Unal, G. (2019). Synthesis and characterization of photocrosslinkable hydrogels from bovine skin gelatin. *RSC Advances*, 9(23):13016–13025.
- Tessmar, J. K. and Göpferich, A. M. (2007). Customized peg-derived copolymers for tissue-engineering applications. *Macromolecular Bioscience*, 7(1):23–39.
- Tian, L., Prabhakaran, M. P., and Ramakrishna, S. (2015). Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules. *Regenerative Biomaterials*, 2(1):31–45.

- Tokarev, A., Asheghali, D., Griffiths, I. M., Trotsenko, O., Gruzd, A., Lin, X., Stone, H. A., and Minko, S. (2015). Touch- and brush-spinning of nanofibers. *Advanced Materials*, 27(41):6526–6532.
- Trevisol, T. C., Langbehn, R. K., Battiston, S., and Immich, A. P. S. (2019). Nonwoven membranes for tissue engineering: an overview of cartilage, epithelium, and bone regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(12):1026–1049.
- Tsao, C.-T., Leung, M., Yu-Fong Chang, J., and Zhang, M. (2014). A simple material model to generate epidermal and dermal layers in vitro for skin regeneration. *J. Mater. Chem. B*, 2(32):5256–5264.
- Tuin, S. A., Pourdeyhimi, B., and Lobo, E. G. (2016). Creating tissues from textiles: scalable nonwoven manufacturing techniques for fabrication of tissue engineering scaffolds. *Biomedical Materials*, 11(1):015017.
- Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., and Langer, R. (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal of Pediatric Surgery*, 23(1):3–9.
- Veronese, F. M. and Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10(21):1451–1458.
- Vijayavenkataraman, S., Kannan, S., Cao, T., Fuh, J. Y. H., Sriram, G., and Lu, W. F. (2019). 3d-printed pcl/ppy conductive scaffolds as three-dimensional porous nerve guide conduits (ngcs) for peripheral nerve injury repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.
- Villanueva-Flores, F., Garcia-Atutxa, I., Santos, A., and Armendariz-Borunda, J. (2023). Toward a new generation of bio-scaffolds for neural tissue engineering: Challenges and perspectives. *Pharmaceutics*, 15(6):1750.
- Vittaz, M., Bazile, D., Spenlehauer, G., Verrecchia, T., Veillard, M., Puisieux, F., and Labarre, D. (1996). Effect of pco surface density on long-circulating pla-pco nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials*, 17(16):1575–1581.
- Vlierberghe, S. V., Dubruel, P., and Schacht, E. (2011). Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules*, 12(5):1387–1408.
- von Euler, M., Janson, A. M., Larsen, J. O., Seiger, ., Forno, L., Bunge, M. B., and Sundström, E. (2002). Spontaneous axonal regeneration in rodent spinal cord after ischemic injury. *Journal of Neuropathology amp; Experimental Neurology*, 61(1):64–75.
- Wang, H. B., Mullins, M. E., Cregg, J. M., McCarthy, C. W., and Gilbert, R. J. (2010). Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and schwann cell migration. *Acta Biomaterialia*, 6(8):2970–2978.

- Wang, J., Fan, X., Liu, H., and Tang, K. (2020). Self-assembly and metal ions-assisted one step fabrication of recoverable gelatin hydrogel with high mechanical strength. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 59(17):1899–1909.
- Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel, N. R., Stadler, J. K., Tilbury, L. F., and Smith, D. A. (2007). Pegylated proteins: Evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 35:16 – 9.
- Wichterle, O. and Lím, D. (1960). Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185(4706):117–118.
- Williams, P. and Phillips, G. (2003). *GUMS / Food Uses*, page 3001–3007. Elsevier.
- Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., and Uludağ, H. (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 80:1–30.
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y., and Xia, Y. (2019). Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical Reviews*, 119(8):5298–5415.
- Yamaoka, T., Tabata, Y., and Ikada, Y. (1994). Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(4):601–606.
- Yang, G., Xiao, Z., Long, H., Ma, K., Zhang, J., Ren, X., and Zhang, J. (2018). Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports*, 8(1).
- Yao, J., Kuang Lim, L., Xie, J., Hua, J., and Wang, C.-H. (2008). Characterization of electrospraying process for polymeric particle fabrication. *Journal of Aerosol Science*, 39(11):987–1002.
- Yao, Q., Cosme, J. G., Xu, T., Miszuk, J. M., Picciani, P. H., Fong, H., and Sun, H. (2017). Three dimensional electrospun pcl/pla blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*, 115:115–127.
- Yoo, J.-H. (2018). Review of disinfection and sterilization – back to the basics. *Infection amp; Chemotherapy*, 50(2):101.
- Yuan, H., Cambron, S. D., and Keynton, R. S. (2015). Prescribed 3-d direct writing of suspended micron/sub-micron scale fiber structures via a robotic dispensing system. *Journal of Visualized Experiments*, (100).
- Zarrintaj, P., Saeb, M. R., Jafari, S. H., and Mozafari, M. (2020). *Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields*, page 511–537. Elsevier.
- Zhang, H., Zhang, F., and Wu, J. (2013). Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze–thaw technique. *Reactive and Functional Polymers*, 73(7):923–928.

- Zhang, M., Desai, T., and Ferrari, M. (1998). Proteins and cells on peg immobilized silicon surfaces. *Biomaterials*, 19(10):953–960.
- Zhang, M., Xu, S., Wang, R., Che, Y., Han, C., Feng, W., Wang, C., and Zhao, W. (2023). Electrospun nanofiber/hydrogel composite materials and their tissue engineering applications. *Journal of Materials Science amp; Technology*, 162:157–178.
- Zhang, N., Yan, H., and Wen, X. (2005). Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Research Reviews*, 49(1):48–64.
- Zhao, W., Li, J., Jin, K., Liu, W., Qiu, X., and Li, C. (2016). Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 59:1181–1194.
- Zhu, X., Ni, S., Xia, T., Yao, Q., Li, H., Wang, B., Wang, J., Li, X., and Su, W. (2015). Anti-neoplastic cytotoxicity of sn-38-loaded pcl/gelatin electrospun composite nanofiber scaffolds against human glioblastoma cells in vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(12):4345–4354.
- Ziebell, J. M. and Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Involvement of pro-and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1):22–30.
- Zou, Y., Zhao, Y., Xiao, Z., Chen, B., Ma, D., Shen, H., Gu, R., and Dai, J. (2020). Comparison of regenerative effects of transplanting three-dimensional longitudinal scaffold loaded-human mesenchymal stem cells and human neural stem cells on spinal cord completely transected rats. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(3):1671–1680.