

Produkce kolagenu pomocí *in vitro* buněčných kultur

Jolana Pešková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Jolana Pešková
Osobní číslo: T21901
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Produkce kolagenu pomocí in vitro buněčných kultur

Zásady pro vypracování

Studentka vypracuje literární rešerši na téma produkce kolagenu pro biomedicínské aplikace s důrazem na různé typy kolagenu i jejich vlastností a osvojí si základní techniky práce v laboratoři buněčné biologie. Praktická část tématu bude založena na schopnosti buněčné samo-sestavě extracelulární matrix (CAM) fibroblastovými buňkami in vitro při dlouhodobé kultivaci.

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

Seznam doporučené literatury:

1. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, J. M., 2017. *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN: 978-80-210-8613-5.
2. ALBERTS, B., *et al.*, 2014. *Molecular Biology of the Cell. Sixth Edition*. W. W. Norton & Company. ISBN: 978-0-8153-4464-3.
3. Kawiecki F., *et al.* 2022. Inter-donor variability of extracellular matrix production in long-term cultures of human fibroblasts. *Biomaterials Science*. (14): doi: 10.1039/d1bm01933c.
4. Torres Y., *et al.* 2021. Cell-assembled extracellular matrix (CAM) sheet production: Translation from using human to large animal cells. *Journal of Tissue Engineering*. (12): doi:10.1177/2041731420978327.
5. Assuncao M., *et al.*, 2020. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (8): doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602009>.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kristýna Valášková**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Jolana Pešková

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Bakalářská práce pojednává o jedné z nejdůležitější složek extracelulární matrix – kolagenu – a její produkci pomocí buněčných kultur *in vitro*. Kolagen se v současné době stal díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a skvělým mechanickým vlastnostem velmi žádaným biomateriálem. Využití našel v mnoha oblastech, mezi které patří tkáňové inženýrství, regenerativní medicína, farmaceutický či kosmetický průmysl a další. V této práci byl za pomoci buněčné linie lidských dermálních fibroblastů vytvořen CAM sheet, po jehož devitalizaci a decelularizaci byl proveden proliferační test sloužící k poskytnutí informace, zda je buňkami vytvořený CAM sheet vhodným scaffoldem pro růst jiných typů buněčných linií. Vyhodnocení proběhlo sledováním nabarvených buněčných struktur pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Klíčová slova: kolagen, CAM sheet, extracelulární matrix, tkáňové inženýrství, růstová křivka

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with one of the most important components of the extracellular matrix – collagen – and how it is produced using cell cultures *in vitro*. Collagen has nowadays become a highly desirable biomaterial due to its biocompatibility, biodegradability and excellent mechanical properties. It has found applications in a wide range of fields, including tissue engineering, regenerative medicine, the pharmaceutical and cosmetic industry, and others. In this work, a CAM sheet was produced using the human dermal fibroblast cell line. After devitalization and decellularization, a proliferation assay was performed to provide information on whether the cell-derived CAM sheet was a suitable scaffold for the growth of other cell line types. The evaluation was performed by observing the stained cell structures using a fluorescence microscope.

Keywords: collagen, CAM sheet, extracellular matrix, tissue engineering, growth curve

Ráda bych poděkovala především vedoucí této práce Ing. Kristýně Valáškové za její odborný dohled, cenné rady, ochotu a trpělivost během tvorby mé bakalářské práce. Taktéž děkuji Centru polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za možnost využití jejich laboratoří. Velký dík patří také mé rodině a přáteli, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KOLAGEN	11
1.1 STRUKTURA KOLAGENU	11
1.1.1 Primární a sekundární struktura kolagenu.....	11
1.1.2 Terciární a kvartérní struktura kolagenu	12
1.1.3 Atelokolagen	13
1.2 BIOSYNTÉZA KOLAGENU	13
1.3 TYPY KOLAGENŮ.....	16
1.4 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI KOLAGENU.....	18
1.4.1 Stabilita kolagenu.....	18
1.4.2 Rozpustnost kolagenu	19
1.4.3 Mechanické vlastnosti	20
1.4.4 Denaturace kolagenu	20
1.4.5 Degradace kolagenu	21
1.4.6 Chemické modifikace.....	22
2 BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE KOLAGENU	25
2.1 REGENERATIVNÍ MEDICÍNA A TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	25
2.1.1 Lékařské implantáty a náhrady tkání	25
2.1.2 Regenerace a hojení ran	27
2.2 KOSMETICKÝ A FARMACEUTICKÝ PRŮMYSL	29
2.2.1 Systém cíleného podávání léků.....	29
2.3 VÝHODY A NEVÝHODY BIOMEDICÍNSKÝCH APLIKACÍ	30
3 IN VITRO SAMOSESTAVENÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX	31
3.1 STRUKTURA A SLOŽENÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX.....	31
3.2 FUNKCE ECM V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMECH	33
3.3 KOLAGEN JAKO KLÍČOVÁ SLOŽKA ECM	33
3.4 <i>IN VITRO</i> ECM A JEHO APLIKACE V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
4 MATERIÁL A METODY	37
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	37
4.2 POUŽITÉ SOUPRAVY, CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	38
4.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ.....	40
4.4 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY.....	41
4.4.1 Růstová křivka	41
4.4.2 Produkce CAM <i>in vitro</i>	43
4.4.3 Zpracování CAM devitalizací/decelularizací.....	44

4.4.4	Fluorescenční mikroskopie produkovaných CAM	44
4.4.5	Test proliferace H9C2 buněčné linie.....	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	RŮSTOVÁ KŘIVKA	47
5.2	PRODUKCE CAM <i>IN VITRO</i>	48
5.3	ZPRACOVÁNÍ CAM DEVITALIZACÍ/DECELULARIZACÍ.....	50
5.4	TEST PROLIFERACE H9C2 BUNĚČNÉ LINIE.....	51
6	DISKUZE	54
	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK.....	69

ÚVOD

Kolagen jakožto nezbytný heterogenní protein má zásadní vliv na řízení buněčných procesů a regeneraci tkání. Jeho hlavní funkcí v lidském těle je poskytovat tkáním strukturní rámec, a proto mezi jeho největší přednosti patří právě výborné biomechanické vlastnosti a mechanická odolnost. (Zhao *et al.*, 2021; Owczarzy *et al.*, 2020; Silver *et al.*, 2003). V současné době je však známo mnoho typů kolagenu (přibližně 29), z nichž každý má své specifické vlastnosti a funkce. Tyto typy můžeme dále rozdělit na fibrilární a nefibrilární kolageny. Do prvního typu řadíme například kolagen typu II, III, V nebo kolagen typu I, který má v lidském těle nejvyšší podíl zastoupení. Nefibrilární kolageny jsou oproti fibrilárním zastoupeny v těle pouze z 10 %; z hlediska vlastností a lokalizace jsou však mnohem rozmanitější. (Owczarzy *et al.*, 2020; Sorushanova *et al.*, 2019; Hulmes, 2002; Żbikowska and Czubak, 2014)

Produkce kolagenu je pro lidské tělo nezbytná. Pokud si však náš organismus v určité situaci (například při úrazu či nemoci) nedokáže kolagenové buňky syntetizovat sám, přichází na řadu tkáňové inženýrství a regenerativní medicína. (Tissue engineering and regenerative medicine, © 2013) Tradičně se kolagen získává z živočišných zdrojů, což s sebou bohužel nese určité nevýhody – příkladem může být přenos nemocí ze zvířete na člověka spojený s jeho obtížnou sterilizací. (Mathew-Steiner *et al.*, 2021) Vývoj *in vitro* buněčných kultur proto nabízí slibné alternativy pro produkci kolagenu.

Tato práce se zaměřuje na schopnosti fibroblastových buněk vytvářet samosestavenou extracelulární matrix neboli CAM. Některé buňky (v tomto případě buněčná linie HDF) jsou schopny CAM produkovat a vytvářet tak CAM sheet. (Torres *et al.*, 2021) Tento biomateriál je pak možno používat v tkáňovém inženýrství jako scaffold pro kultivaci a proliferaci jiných buněčných linií. (Potart *et al.*, 2023; Chaudhari *et al.*, 2016)

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOLAGEN

Kolagen je heterogenní protein nacházející se v extracelulární matrix savců. Vyskytuje se ve většině tkání, jako je například tkáň pojivová, kůže, šlachy, kosti a chrupavky. Jeho nejdůležitějšími aspekty jsou jednak jeho vynikající mechanické vlastnosti, a jednak jeho důležitá role při řízení buněčného růstu, buněčné diferenciaci, migraci a regeneraci tkání. (Zhao *et al.*, 2021; Owczarzy *et al.*, 2020)

1.1 Struktura kolagenu

1.1.1 Primární a sekundární struktura kolagenu

Kolagen řadíme mezi proteiny, proto je jeho struktura na molekulární úrovni sestavena z uspořádané sekvence aminokyselin (AMK) v peptidovém řetězci. Peptidová vazba je poté tvořena vazbou, která vzniká mezi aminoskupinou (NH_2) jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinou ($-\text{COOH}$) jiné. Takto sestavená primární struktura proteinu je lineární a její chemické vlastnosti se odvíjí podle pořadí přítomných AMK. Základní molekula kolagenu obsahuje tři polypeptidové řetězce, z nich každý se skládá z opakujících se sekvencí více jak 1000 AMK. Opakuje se vždy série tří AMK představovaná sekvencí $(\text{Gly-X-Y})_n$. Sekvence je nutná pro vznik trojitě šroubovice ve vyšších strukturách. Největší podíl (cca 30 %) zde zastupuje aminokyselina glycin, která je na každé třetí pozici v trojšroubovici α – řetězce, zbylé aminokyseliny (pozice X a Y) mohou být libovolné, kde každá 100. AMK v pozici X představuje prolin a zhruba 100. AMK v pozici Y představuje hydroxyprolin a hydroxylysin. Právě díky zmíněnému hydroxyprolinu a hydroxylysinu (které se mimo jiné tvoří po předchozí interakci prolinu s lysinem) vznikají mezi polypeptidovými řetězci různé vazebné interakce, jako jsou například vodíkové můstky, kovalentní vazby, nebo van der Waalsovy síly. (Zhao *et al.*, 2021; Friess, 1998)

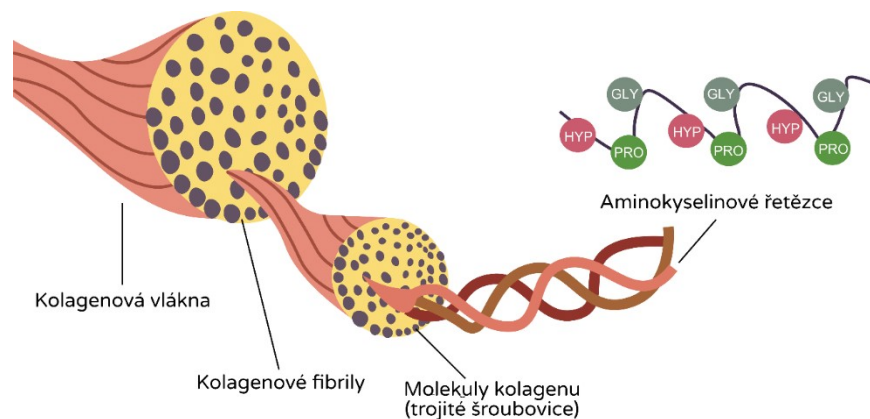
Sekundární strukturou kolagenu je zmíněná levotočivá α -šroubovice (neboli α -helix) tvořená z jednotlivých aminokyselin. Tato struktura následně vytváří polypeptidovou podjednotku vyšší terciární struktury. Stabilitu šroubovicové struktury zajišťují vodíkové vazby mezi aminokyselinovými zbytky. (Zhao *et al.*, 2021; Owczarzy *et al.*, 2020)

1.1.2 Terciární a kvartérní struktura kolagenu

Ze struktury sekundární nám vzniká struktura terciární. Tato struktura se nazývá tropokolagen a je zároveň považována za základní strukturální jednotku kolagenu. Její délka dosahuje velikosti 300 nm a její průměr činí 1,5 nm. Tropokolagen je pravotočivá trojšroubovice (v anglické literatuře známá jako triple helix) složená ze tří levotočivých α -řetězců. Dva α -řetězce jsou identické, třetí se mírně liší ve své aminokyselinové sekvenci, struktura má tedy dva $\alpha 1$ a jeden $\alpha 2$ řetězec. Samotná tyčinkovitá trojšroubovice má průměrnou molekulovou hmotnost přibližně 300 kDa. Takto mimořádné poměry rozměrů tropokolagenu zajišťují vysokou viskozitu v roztocích i pohyblivost v elektrickém poli.

Nutným požadavkem pro vytvoření superhelixu je zmíněná opakující se sekvence Gly-X-Y a vzájemné prostorové uspořádání aminokyselin. Uvnitř trojitě spirály se nachází glycinové zbytky, které jsou dostatečně malé pro obsazení vnitřního prostoru, a tím umožňují těsné semknutí α -řetězců do finálního kolagenového superhelixu. Následně kruhová konstrukce prolinu dovolí tvorbu levotočivé konformace každého α -řetězce včetně třech aminokyselinových zbytků na otáčku. Důležitým faktorem pro stabilitu této struktury je přítomnost sekundárních vazeb, jako jsou například vodíkové vazby mezi NH skupinou v molekule glycinu, nebo také vazby kovalentní. (Zhao *et al.*, 2021; Owczarzy *et al.*, 2020; Shoulders *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2005)

Podstatou poslední, kvartérní struktury kolagenu, je zjednodušeně spojení většího množství kolagenových monomerů (neboli molekul tropokolagenu) do stabilních mikrofibril. Tato mikrovláknna se spojují k sobě a následně tvoří kolagenová vlákna, která se uspořádávají do svazků. Nakonec je díky vzájemnému propletení svazků kolagenových vláken vytvořena hustá trojrozměrná síť kolagenu. (Zhao *et al.*, 2021; Brass *et al.*, 1974) Jednoduché grafické zpracování struktury kolagenu je znázorněno na **Obrázku 1**.



Obrázek 1: Struktura kolagenu (převzato z Kolagen a jeho účinky, © 2022)

1.1.3 Atelokolagen

Speciální formou kolagenu je tzv. atelokolagen, který vzniká enzymatickým odstraněním telopeptidových částí tropokolagenu (respektive jeho N- a C- konců). Jako enzym se zde využívá pepsin. Důvodem odstranění těchto koncových částí řetězce kolagenu je jejich velký vliv na vyvolávání imunitní reakce organismu. Jeho fyzikální vlastnosti jsou téměř totožné s vlastnostmi přirozeného nerozpustného kolagenu. Atelokolagen má však další příznivé vlastnosti, které se v přírodní formě kolagenu nenacházejí. Je známo, že kolagen má velmi nízkou antigenicitu, tj. vyvolání odpovědi imunitního systému. To je dáno zmíněnou strukturou aminokyselinové sekvence Gly-X-Y, která se jen málo liší i mezi různými živočišnými druhy. Předpokládá se, že mírné množství antigenicity kolagenu je způsobeno telopeptidy připojenými ke každému konci molekuly kolagenu, které neobsahují tuto sekvenci. Vzhledem k tomu, že telopeptidy nejsou přítomny v atelokolagenu, je antigenicita atelokolagenu dokonce nižší než antigenicita kolagenu. Enzymatický postup používaný k odstranění telopeptidů nemění schopnost kolagenu agregovat struktury a v podstatě se zachovávají nezměněné přirozené vlastnosti původních molekul, jako je především stabilita v kontaktu s biologickými tekutinami. Tato vlastnost je výhodná v rámci bezpečnosti při komerčním použití těchto produktů. Výsledný atelokolagen je tedy velmi bezpečný biomateriál používaný do medicínských implantátů, nebo také jako nosič léčiv. (Hanai *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2013; Ruozi *et al.*, 2007)

1.2 Biosyntéza kolagenu

Biosyntéza kolagenu je složitý vícestupňový proces probíhající uvnitř i vně buňky. Tento děj zahrnuje nejen regulovanou expresi řady genů podílejících se na tvorbě molekuly kolagenu, ale i komplexní interakce mezi primárními produkty translace a několika kotranslačními a posttranslačními modifikujícími enzymy. Pravděpodobný počet genů podílejících se na kódování kolagenových peptidů není přesně stanoven, jejich počet se však odhaduje mezi 10 až 20. Kolagenové geny jsou charakterizovány jako velmi velké, tj. cca 40 000 bází dlouhé, a navíc obsahují velké množství (více než 50) intervenujících nekódujících sekvencí. Vzhledem k této skutečnosti zahrnuje celková syntéza molekul kolagenové mRNA zahrnuje velký počet RNA sestřihů. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Olsen, 1981)

Počáteční fáze biosyntézy probíhá v intracelulárním prostředí a v závislosti na typu kolagenu a izoformě zahrnuje transkripci molekul mRNA, kódovaných odlišnými třířetězcovými kombinacemi různých genů pro α -řetězce, a následnou tvorbu trojšroubovice.

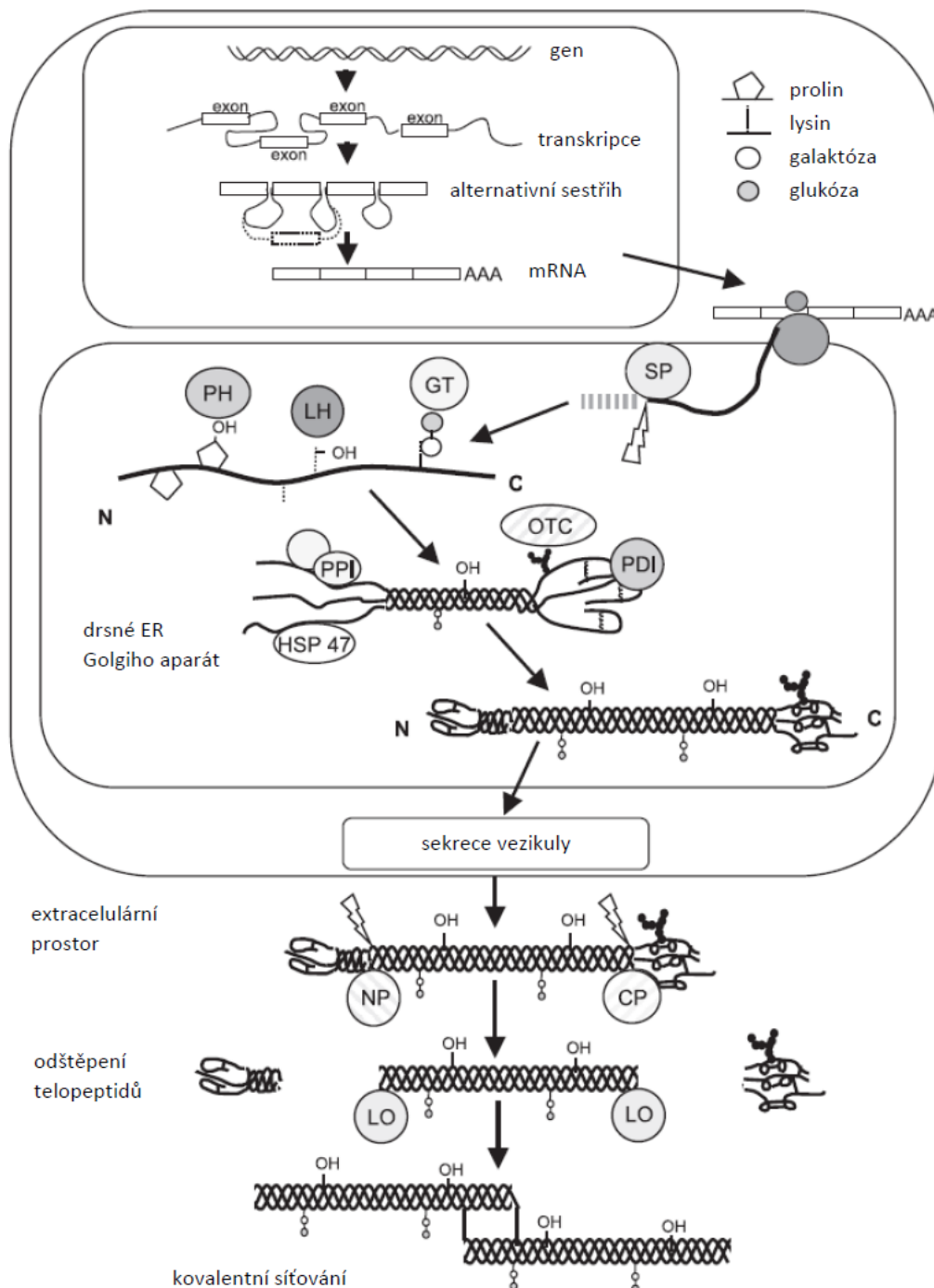
Po přepisu genetické informace v buněčném jádře tedy nejprve vzniká transkript v podobě α -řetězce, který následně putuje do buněčné dutiny (lumen) endoplazmatického retikula (ER), v němž dochází k překladu neboli translaci genetické informace. Tímto procesem nám vzniká molekula pre-prokolagen, která obsahuje jednak fragment signálního peptidu (který má na starost doručení polypeptidu na určité místo v ER), a jednak fragmenty terminální, které bývají uloženy na obou koncích řetězce a jejich funkcí je například zabránit předčasné tvorbě kolagenových fibril. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Kavitha and Thampan, 2008; Raghunath *et al.*, 1994)

Následující fází je posttranslační modifikace, která probíhá v ER a skládá se ze tří kroků: odstranění signálního peptidu, hydroxylace a glykosylace. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Raghunath *et al.*, 1994)

Samotný pre-prokolagen s N-koncem je poté přeměněn na prokolagen odstraněním signálního peptidu, a to díky speciálnímu enzymu – signální peptidáze. Dalším pozoruhodným rysem biosyntézy kolagenu je syntéza začínající na N-konci, zatímco tvorba trojitě šroubovice začíná na C-konci. To vyžaduje, aby pro- α -řetězce zůstaly nezamotané po dobu potřebnou k dokončení translace řetězce, při které se tři pro- α -řetězce přesně zarovnají na C-konci před začátkem tvorby trojitě šroubovice. Regulací proti zamotání je v tomto procesu několik chaperonových proteinů, včetně prolyl-4-hydroxylázy (P4-H), proteinu disulfidové izomerázy (PDI) nebo homologu proteinu tepelného šoku (Hsp). Enzymy lysinhydroxyláza, prolyl-4-hydroxyláza a prolyl-3-hydroxyláza mají za úkol zmíněnou hydroxylaci aminokyselin lysinu (Lys) a prolinu (Pro). Nejdůležitější z těchto enzymů je právě prolyl-4-hydroxyláza (nacházející se v buněčné dutině ER), která katalyzuje Pro za vzniku aminokyseliny charakteristické pro kolagen – hydroxyprolinu (Hyp). Množství vzniklého Hyp je zásadní pro tvorbu intramolekulárních vodíkových vazeb, které stabilizují prostorovou strukturu tohoto proteinu, a tím ovlivňují i jeho tepelnou stabilitu. Posledním krokem posttranslační modifikace je glykosylace, probíhající za katalýzy enzymy glukosyltransferázy a galaktosyltransferázy. Po navázání glukózy a galaktózy na zbytky Hyp se nově vznikající polypeptidové řetězce shlukují k sobě a vytváří novou strukturu – prokolagen. Podobnému mechanismu jako Hyp zde podléhá i hydroxylysin (Hyl), který vzniká působením lyselhydroxylázy na Lys. Opět dochází k navázání cukerných složek na zbytky Hyl a následnému vzniku agregovaných struktur. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Koide and Nagata, 2005)

Posledním krokem biosyntézy je proteolytické štěpení kolagenu, které se již přesouvá z buňky do ECM. Zde se trimer prokolagenu mění na tropokolagen působením N-proteinázy a C-proteinázy, které slouží k odstranění koncových N- a C- propeptidů prokolagenu. Vše probíhá za přítomnosti Ca^{2+} iontů. Vznikající molekuly tropokolagenu jsou schopny se navzájem spojovat a vytvářet tak konečný produkt biosyntézy – kolagenní fibrily. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Kessler *et al.*, 1996)

Kompletní přehled biosyntézy kolagenu je uveden na **Obrázku 2**.



Obrázek 2: Biosyntéza kolagenu (upraveno podle Gelse *et al.*, 2003)

1.3 Typy kolagenů

V současné době je známo 29 druhů kolagenu. Tato rozmanitost je dána rozdíly v jejich struktuře, vlastnostech a lokalizaci. Jednotlivé typy se navíc liší kombinací tří α -šroubovic. Pokud molekula kolagenu obsahuje tři identické α -šroubovice, nazýváme ji homotrimerním proteinem; pokud se však skládá ze dvou totožných a jednoho rozdílného řetězce, nebo jsou dokonce všechny řetězce odlišné, pak tuto molekulu označujeme jako heterotrimerní. Velká spousta kolagenových typů se vyskytuje pouze v homotrimerní formě (například kolagen typu II, III nebo VII), jiné existují jako izoformy, což znamená, že mohou vznikat homo- i heteromery. Tuto vlastnost má právě kolagen typu I, který je nejčastěji složen ze dvou řetězců $\alpha 1$ a jednoho řetězce $\alpha 2$, ale může se také objevovat v homotrimerní podobě při složení tří $\alpha 1$ řetězců. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Hulmes, 2002)

Rodinu kolagenních proteinů lze klasifikovat různými způsoby, nejjednodušší je ale rozdělení na fibrilární a nefibrilární kolageny. Jak už název napovídá, kolageny fibrilárního typu sestávají z fibril, které tvoří zhruba 90 % veškerého kolagenu v lidském těle, a jsou často kombinací různých typů kolagenu. Do této kategorie patří kolagen typu I, II, III, V, XI, XIV a XXVII. Jejich společným znakem je příčně pruhovaná struktura a přítomnost trojitě šroubovice s nepřerušenými úseky Gly-X-Y s délkou 300 nm. Výskyt jednotlivých typů fibrilárního kolagenu je uveden v **Tabulce 1**. (Owczarzy *et al.*, 2020; Soroushanova *et al.*, 2019; Żbikowska and Czubak, 2014)

*Tabulka 1: Typy a výskyt fibrilárních kolagenů
(převzato od Owczarzy *et al.*, 2020)*

Typ kolagenu	Výskyt
I	kůže, kosti, šlachy, rohovka
II	chrupavka, sklivec
III	kůže, cévy, střeva, děloha
V	kůže, kosti, rohovka, placenta
XI	chrupavka, meziobratlové ploténky
XXIV	kosti, rohovka
XXVII	chrupavka

Naproti tomu nefibrilární kolagen je z hlediska vlastností, struktury a umístění mnohem rozmanitější. I přes jeho malé zastoupení v lidském těle (cca 10 %) je nedílnou součástí mnoha orgánů. Veškeré typy kolagenu patřící do této skupiny, včetně jejich výskytu

v lidském těle, jsou zaznamenány v **Tabulce 2.** (Owczarzy *et al.*, 2020; Żbikowska and Czubak, 2014)

*Tabulka 2: Typy a výskyt nefibrilárních kolagenů
(převzato od Owczarzy et al., 2020)*

Typ kolagenu	Výskyt	Typ kolagenu	Výskyt
IV	bazální membrána, kapiláry	XVII	kůže
VI	kosti, cévy, kůže, rohovka, chrupavka	XVIII	ledviny, plíce, játra
VII	sliznice, kůže, močový měchýř, pupeční šňůra, plodová voda	XIX	kůže, ledviny, játra, placenta, slezina, prostata
VIII	kůže, mozek, srdce, ledviny, cévy, kosti, chrupavka	XX	rohovkový epitel
IX	rohovka, sklivec, chrupavka	XXI	žaludek, ledviny, cévy, srdce, placenta, kosterní svalstvo
X	chrupavka	XXII	tkáň
XII	chrupavka, šlachy, kůže	XXIII	metastatické karcinogenní buňky
XIII	kosterní svalstvo, srdce, oči, kůže, endotelové buňky	XXV	oči, mozek, srdce, varlata
XIV	cévy, oči, nervy, šlachy, kosti, kůže, chrupavka	XXVI	varlata, vaječníky
XV	kapiláry, vaječníky, srdce, varlata, kůže, placenta, ledviny	XXVIII	buňky nervového systému
XVI	srdce, kůže, ledviny, hladké svalstvo	XXIX	kůže

1.4 Fyzikálně chemické vlastnosti kolagenu

Mezi fyzikálně chemické vlastnosti kolagenu řadíme například jeho stabilitu, rozpustnost, degradaci a další. Tyto vlastnosti jsou určeny především jeho molekulární strukturou. (Owczarzy *et al.*, 2020)

1.4.1 Stabilita kolagenu

Pojem „stabilita kolagenu“ se může vztahovat buď obecně ke stabilitě šroubovicové struktury, anebo ke stabilitě tepelné. Obě možnosti spolu úzce souvisí. V prvním případě mají na stabilitu trojšroubovice vliv různé typy vazeb. Jedná se o vnitro- a meziřetězcové vazby, nebo zesílení mezi specifickými skupinami řetězců. Například obsažený glycin zvyšuje stabilitu molekuly vytvářením vodíkových vazeb mezi třemi řetězci superhelixu struktury kolagenu. AMK (jako například hydroxyprolin a prolin) tvoří vodíkové vazby nebo vodíkem vázané vodíkové můstky v každém řetězci. Naopak stabilitu trojšroubovice mají za úkol lysin a hydroxylysin – svou alicyklickou povahou zpevňují α -řetězec a tvoří vodíkové vazby omezující rotaci. Kromě toho existují kovalentní intramolekulární vazby, které spojují dva nebo tři peptidové α -řetězce téže molekuly a vedou ke vzniku β - (2 α -řetězců) a γ - (3 α -řetězců) složek. Intramolekulární vazby však nemají žádný vliv na stabilitu fibril kolagenu (Woodhead-Galloway, 1980). Dalšími mezimolekulárními nekovalentními silami hrajícími důležitou roli jsou například síly elektrostatické, van der Waalsovy síly nebo hydrofobní interakce. Nejdůležitější jsou však vodíkové vazby mezi α -šroubovicemi, včetně vodíkové vazby N-H (Gly) \cdots O=C (X) nebo vodíkové vazby zprostředkované vodou. (Zhang *et al.*, 2020; Brodsky and Persikov, 2005)

Pokud jsou tyto vazby vystaveny většímu množství tepla, dochází k jejich štěpení a následnému smrštění vlákna zhruba o 1/3 jeho délky. Pro charakterizaci tohoto jevu se používá veličina nazývaná jako teplota smrštění (T_s), která je považována za teplotu tání kolagenu v krystalických oblastech. Jakmile teplota přesáhne teplotu denaturace (T_d), dochází k rozpadu kolagenu na želatinu. S rostoucími hodnotami T_s a T_d se zvyšuje i tepelná stabilita kolagenu. Tohoto lze dosáhnout například větším zesíťováním kolagenových vláken. (Peterková and Lapčík, 2000; Zhang *et al.*, 2020; Burjanadze and Veis, 2009)

1.4.2 Rozpustnost kolagenu

Vlastnost rozpustnosti kolagenu je způsobena jednak strukturou, kdy nejběžnější typy kolagenu jsou ve formě vláken (fibril), a jednak kovalentními vazbami propojujícími molekuly právě v kolagenových fibrilách (Vate *et al.*, 2023). Rozpustnost kolagenu také závisí na prostředí, ve kterém se kolagen právě nachází. Například ve vodě je kolagen téměř nerozpustný díky své šroubovicové struktuře a schopnosti zadržovat vodu – s tím souvisí také jeho odolnost vůči trávicím enzymům jako je pepsin, trypsin, nebo chymotrypsin.

V roztocích s nižším či vyšším pH se rozpustnost kolagenu zvyšuje. Je známo, že některé kolageny je možné rozpustit ve zředěné kyselině octové nebo v jiných organických kyselinách o nízké koncentraci. V takových roztocích potom kolagen vypadá jako protáhlá tenká tyčinka s délkou 280 nm a průměrem 1,6 nm. Po určitém zpracování se nerozpustný kolagen mění na želatinu, která již rozpustná je, ale zato ztrácí některé základní vlastnosti kolagenu, jako například jeho pevnost. Kolagen lze rozpustit také ve studených roztocích solí se zásaditým nebo neutrálním pH. Bylo zjištěno, že pro použití kolagenu jako biomateriálu je vhodnější použít alkalickou úpravu, protože – na rozdíl od úpravy kyselé – kladně ovlivňuje tepelnou stabilitu kolagenu a zabraňuje tvorbě fibril při neutrálním pH. (Owczarzy *et al.*, 2020; Telis *et al.*, 2006; Peterková and Lapčík, 2000)

Protože kolagen patří k přechodným koloidním soustavám (gelům), začne kolagenové vlákno po ponoření do vody bobtnat, přičemž se mění jeho objem, délka a pružnost. Bobtnání můžeme rozdělit na osmotické (nábojové) a lyotropní. V prvním případě dochází k průchodu vody díky gradientu osmotického tlaku, který vzniká vlivem rozdílu koncentrací iontů mezi vnitřní fází (gelem) a vnější fází (roztokem). Jakmile je bobtnací tlak vyrovnán, nastává tzv. Donnanova membránová rovnováha. V případě lyotropního bobtnání dochází působením lyotropních činidel k porušení stabilizujících vazeb, a rovnováha se ustaví až při vyšší míře nabotnání. (Mládek, 1971; Peterková and Lapčík, 2000)

Voda se může v nabotnalém kolagenu nacházet volně, vázaně, nebo ve výjimečných případech interfibrilárně – mezi vlákny. Zároveň zde u vody rozlišujeme dva typy – vodu bobtnací odstranitelnou mechanicky, a vodu hydratační, kterou lze odstranit pouze sušením. (Lloyd *et al.*, 1933; Peterková and Lapčík, 2000)

1.4.3 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti tkání (jako jsou šlachy, vazy a kosti) přímo souvisí s uspořádáním jejich součástí. Vzhledem k tomu, že kolagen (typu I) je nejhojnějším proteinem v těchto tkáních, označujeme ho jako hlavní složku nesoucí tahové napětí těchto tkání. Tuto vlastnost tkáně získávají právě typickým uspořádáním kolagenové trojitě šroubovice, kde jsou sestaveny do fibril a zesíťovány prostřednictvím aminokyselin lysinu a hydroxylysinu přítomných v jejich telopeptidových oblastech. Proto je hlavní funkcí fibrilotvorných kolagenů poskytovat strukturní rámec a biomechanické vlastnosti tkání (Silver *et al.*, 2003). Za mechanické vlastnosti kolagenu označujeme jeho vynikající pevnost v tahu a pružnost. Tyto aspekty, včetně vysoké hustoty zesíťování vláken, chrání tkáň před poškozením mechanickými silami a zvyšují celkovou odolnost kolagenu. Naopak vyšší stáří vláken tuto odolnost snižuje. (Owczarzy *et al.*, 2020; Meyer, 2019)

Obecně se dá říci, že průměr fibril má vliv na mechanické vlastnosti kolagenu. Větší fibrily (s širším průřezem) zlepšují jejich pevnost v tahu, naopak fibrily menšího průřezu jsou zodpovědné za mezibuněčnou vazbu a vyšší síťování vláken. Oba druhy fibril tedy plní svoji mechanickou funkci. (Ottani *et al.*, 2001)

1.4.4 Denaturace kolagenu

Denurací kolagenu se obecně rozumí změna jeho původních vlastností a molekulární struktury vlivem vnějších faktorů, nejčastěji působením tepla nebo chemikálií. Tato změna může být reversibilní či ireversibilní.

K reversibilní neboli vratné denuraci může dojít například účinkem malého množství tepla, jehož vliv dočasně přeruší menší počet vodíkových vazeb, což způsobí rozbalení vláken kolagenu. Po obnovení počáteční teploty se struktura kolagenu opět vrátí do původního stavu. Pokud je však kolagen vystaven vlivu většího množství tepla či chemikálií, dojde k denuraci nevratné neboli ireversibilní, což znamená, že struktura kolagenu již nikdy zcela nedosáhne svého původního stavu. Produktem tohoto typu denurace je v případě kolagenu želatina. (Wright *et al.*, 2002; Peterková and Lapčík, 2000; Privalov, 1982)

Víme, že základní strukturní jednotkou kolagenu je tropokolagen složený ze tří levotočivých α -šroubovic. Kolagen, stejně tak jako jiné proteiny, může narušit proces denurace a destruovat tak jeho sekundární, terciární, popřípadě kvartérní strukturu. Denurační proces však není natolik silný, aby narušil strukturu primární, tj. peptidové vazby mezi aminokyselinovými zbytky (Zhang *et al.*, 2006). Při ireversibilní denuraci

dojde nejprve k rozpadu jednotky tropokolagenu, tzn. k rozpojení všech šroubovic od sebe, což je s největší pravděpodobností způsobeno přerušením velkého množství vodíkových vazeb zajišťujících stabilitu makromolekuly kolagenu (sekundární struktura). Následně se tropokolagen svine do statického klubka – zde jsou polypeptidové řetězce ještě stále navzájem propojeny. Zanedlouho se toto klubko rozpadne na tři frakce α , β , a γ , které jsou tvořeny různým počtem polypeptidových řetězců: frakce α je tvořena jedním řetězcem, frakce β dvěma řetězci, a frakci γ tvoří tři polypeptidové řetězce původní šroubovice. Dochází tedy k narušení trojrozměrné organizace kolagenu – terciární struktury. Proces denaturace lze také zvrátit v opačný proces zvaný renaturace; v tomto případě se jedná o dlouhodobé působení nízké teploty na denaturovaný roztok tropokolagenu. (Wright *et al.*, 2002; Peterková and Lapčík, 2000; Zhang *et al.*, 2006)

1.4.5 Degradace kolagenu

Pro degradaci kolagenu se obecně udává teplotní rozmezí od 5 do 50 °C, které závisí na molekulární struktuře a podmínkách reakce, jako je pH, koncentrace solí či elektrolytů, nebo také množství hydroxyprolinových zbytků v molekule kolagenu. (Owczarzy *et al.*, 2020) Dalším faktorem je také stáří kolagenu. Bylo totiž zjištěno, že starší kolageny jsou méně náchylné k degradaci než kolageny nově syntetizované, a to z důvodu, že se v jejich fibrilách již stačilo vytvořit větší množství kovalentních příčných vazeb, čímž byla zajištěna lepší stabilita a odolnost molekuly. (Laurent, 1987)

Degradace může probíhat třemi různými způsoby – hydrolyticky, enzymaticky a oxidačním štěpením. K prvnímu způsobu dochází v případě, že se kolagen nachází v roztoku. Dochází zde k rozpadu příčných kovalentních a peptidických vazeb. Rychlost hydrolyzy v tomto případě závisí hlavně na teplotě (při jejímž zvyšování rychlost degradace roste) a pH roztoku. Za neutrálního pH se degradace šíří relativně pomalu, ale čím zásaditější (či kyselější) roztok je, tím je degradace rychlejší. (Mládek, 1971; Peterková and Lapčík, 2000)

Druhým typem je již zmiňovaná degradace zprostředkovaná enzymy, které primárně působí na vazby s aromatickými zbytky, peptidové vazby, estery a amidy. Bylo zjištěno, že kolagenová vlákna jsou ve většině případů velmi odolná vůči působení proteolytických enzymů. Tato podmínka však přestává platit za zvýšené teploty, kdy dochází k rozpadu sekundární struktury kolagenu, a kolagen se tedy stává více náchylným na působení enzymů. (Peterková and Lapčík, 2000) Jedním takovým proteolytickým enzymem je živočišná

kolagenáza, která se prokazatelně nachází v každé tkáni, kde k degradaci dochází. Má schopnost rozštěpit všechny tři řetězce kolagenové trojšroubovice na jednom místě. Prvním krokem takovéto degradace je štěpení kolagenového vlákna v extracelulárním prostoru kolagenázou, popřípadě také tkáňovými elastázami. Tímto dojde k rozpadu vlákna na malé fragmenty, které jsou endocytovány makrofágy, a po spojení s lysozomy dojde ke vzniku trávicích vakuol. Uvnitř makrofágů probíhá intracelulární fáze degradace, a to především působením lysozomálních katepsinů, díky kterým dojde na závěr k rozkladu kolagenového řetězce na jednotlivé aminokyseliny či peptidy. (Etherington, 1977)

Oxidační štěpení, které je třetím typem degradace, je daleko složitější než degradace enzymatická, a to z důvodu, že různá oxidační činidla reagují s kolagenem velmi odlišně. Obecně však můžeme říct, že toto štěpení je založeno na působení příslušného oxidačního činidla na sacharidy nacházející se v kolagenu. (Peterková and Lapčík, 2000; Ramachandran, 1967)

1.4.6 Chemické modifikace

Principem chemické modifikace je zavedení funkčních skupin do molekuly kolagenu, což výrazně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti původní kolagenové struktury, jako například tepelnou a mechanickou stabilitu, degradaci, konformaci molekuly a další. Hlavním cílem chemických modifikací je usnadnit vznik intra- a intermolekulárních chemických vazeb, které zvyšují míru zesíťování a stabilitu molekuly, díky čemuž následně dochází k výraznému zpomalení biodegradace materiálu. K tomuto používáme různá chemická činidla, jako například aldehydy (kam patří glutaraldehydy a dialdehydové sloučeniny), genipiny, karbodiimidy, rostlinné třísloviny (taniny), acylazidy a polyepoxidové sloučeniny. (Yu *et al.*, 2016; Rýglová *et al.*, 2017)

Aldehydy

Glutaraldehyd (GA) je alifatická sloučenina o pěti uhlících, která má na obou koncích svého řetězce aldehydovou skupinu. Díky své nízké ceně, vysoké reaktivitě a vysoké rozpustnosti ve vodném roztoku je hojně využíván jako síťovací činidlo. Využití nachází při přípravě srdečních chlopní, umělé kůže, nebo elastických chrupavek. Adicí GA na volné primární aminy v bílkovinách (které mají ve své molekule postranní řetězce lysinu, případně argininu), nebo na karboxylovou skupinu glutaminu, vznikají nové molekuly. Samotné síťování je poté zprostředkováno reakcí aldehydové skupiny GA s lysinovými nebo

hydroxylysinovými zbytky. Tato reakce vede ke vzniku meziprojektu Schiffovy báze. (Adamiak and Sionkowska, 2020; Yu *et al.*, 2016; Rýglová *et al.*, 2017)

V souvislosti s GA jsou často uváděna rizika spojená s jeho použitím. Můžeme zmínit například jeho cytotoxické vlastnosti, které jsou způsobeny přítomností zbytkového GA v zesíťovaném materiálu. Tento zbytkový GA lze však odstranit promytím scaffoldu deionizovanou vodou, ošetřením lyofilizovaného scaffoldu ve vakuu, nebo snížením pH při průběhu reakce, jelikož při kyselém pH se jej tvoří méně. Druhým rizikem je fakt, že GA scaffoldy implantované do lidského těla mohou podléhat kalcifikaci, a tím způsobovat záněty či zpomalovat hojení dané tkáně. (Adamiak and Sionkowska, 2020; Yu *et al.*, 2016; Rýglová *et al.*, 2017; Nimni *et al.*, 1987)

Jiným aldehydem používaným k zesíťování kolagenu je dialdehydový škrob neboli D, L-glyceraldehyd. Je to netoxická a biologicky odbouratelná molekula přírodního původu schopná vytvořit intra- a intermolekulární chemické vazby mezi trojšroubovicemi kolagenu. (Rýglová *et al.*, 2017)

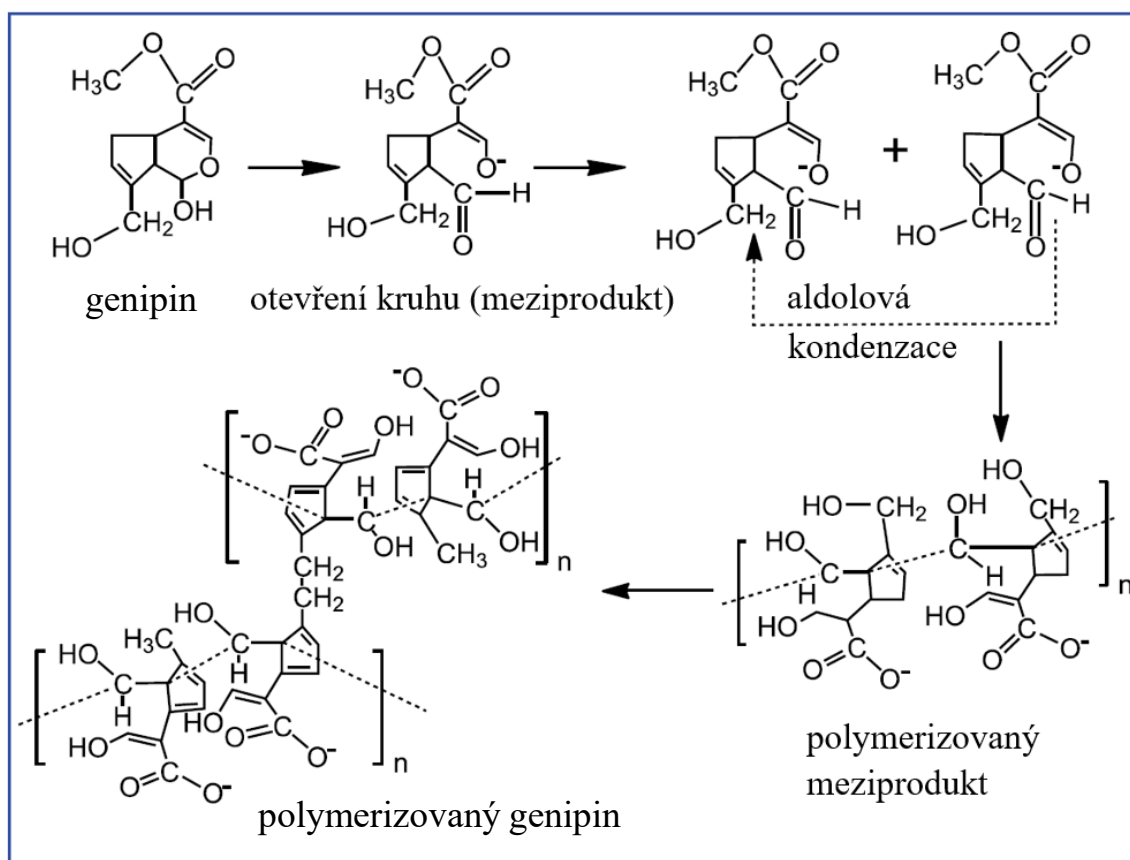
Genipin

Další sloučeninou určenou k chemickým modifikacím je genipin (GP). Tato přírodní chemická látka, získávaná z plodů gardénie jasmínovité (*Gardenia jasminoides*), se používá jako chemické síťovadlo pro bílkoviny, kolagen, či želatinu. Vyznačuje se antimikrobiálními, protinádorovými a protizánětlivými účinky. GP je také méně toxický než GA, ovšem za předpokladu, že je použit při koncentraci nižší než 5 mM (obecně se doporučuje používat GP v koncentraci 1 mM). Protože GP reaguje s volnými NH₂ skupinami v kolagenu, dochází nejen ke tvorbě tmavě modrých pigmentů, ale také ke tvorbě sekundárně aktivované formy GP, která je schopna polymerace s ostatními molekulami GP. Tento děj je schematicky zobrazen na **Obrázku 3**, a kromě vzniku příčných vazeb má na svědomí také následné zvýšení odolnosti kolagenu vůči enzymatické degradaci.

Mechanismus působení GP na kolagen spočívá v nukleofilním ataku primárních aminoskupin na C3 atom GP, přičemž dochází k otevření dihydropyranového šestičlenného kruhu, kam se na místo atomu kyslíku zabuduje terciární dusík GP.

Je známo, že GP dokáže snižovat pórovitost a měnit uspořádání vláken kolagenu. Bylo také zjištěno, že při použití GP jako síťovacího činidla vznikají látky s autofluorescencí, čehož se využívá například při sledování buněčné adheze, migrace nebo proliferace. I přes jeho široké spektrum využití byly vzneseny otázky týkající se jeho použití v budoucnosti,

protože extrakce GP z gardénie je poměrně cenově nákladný proces. (Adamiak and Sionkowska, 2020; Yu *et al.*, 2016; Rýglová *et al.*, 2017)



Obrázek 3: Mechanismus polymerizace genipinu (upraveno podle Yu *et al.*, 2016)

Taniny

Taniny, nazývané také jako polyfenoly, jsou třísloviny extrahované z kořenů, stonků a listů rostlin. Jsou používány ke zvýšení stability kolagenu a dělíme je na hydrolyzovatelné, které jsou schopny vytvářet kyselinu gallovou, a kondenzované třísloviny, které jsou odvozeny od flavanolů. Jejich molekula obsahuje spoustu aktivních skupin, z nichž nejznámější je právě fenolová skupina, která díky vazbě na karboxylové, aminové, či jiné skupiny v kolagenu tvoří pomocí vodíkových můstků příčné vazby. Síťování pomocí taninů je však považováno za reverzibilní reakci a stabilita kolagenu vůči enzymatické degradaci není při použití taninů tak vysoká, jako u ostatních látek. (Mao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2016)

2 BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE KOLAGENU

2.1 Regenerativní medicína a tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína, zkráceně TERM, jsou vědecké obory využívající inženýrských a biologických principů. (Dzobo *et al.*, 2018) Cílem této disciplíny je obnovovat nebo léčit poškozené tkáně a orgány, ať už s využitím vlastního systému těla, či za pomoci různých biologických materiálů. (Tissue engineering and regenerative medicine, © 2013)

V tomto oboru je kolagen jako biomateriál používán především díky své schopnosti vytvářet velice pevná a stabilní vlákna za základě síťování a autoagregace. Ve srovnání s ostatními přírodními či syntetickými polymery vykazuje skvělou biokompatibilitu a biologickou odbouratelnost, je dobrým povrchově aktivním činidlem a disponuje nízkou antigenicitou. (Maeda *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001) V závislosti na shodě s biologickými vlastnostmi nativního kolagenu, který se již vyskytuje v tělesném systému, může kolagen sloužit jako buněčná konstrukce. Tato biokompatibilita s nativním kolagenem zdůrazňuje jeho potenciální úlohu při vytváření biomateriálů, které mohou ovlivňovat a definovat vlastnosti většiny kolagenem závislých tkání. Jakožto univerzální biomateriál se vyskytuje v různých formách, a proto nalézá své využití v oblastech regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Jeho použitelnost v aplikacích TERM má v posledních desetiletích intenzivní vzrůst. Biomateriály založené na kolagenu obecně podporují opravu tkání (především kožní tkáně, kostí, vaziva a pojivové tkáně) a mohou být využity také pro náhrady umělých krevních cév a chlopní (Cen *et al.*, 2008; Muthukumar *et al.*, 2018).

2.1.1 Lékařské implantáty a náhrady tkání

Využití kolagenu v lékařství je velmi obsáhlé. Mezi oblastmi, ve kterých se můžeme v rámci lékařských implantátů a náhrad pohybovat, patří například oblast kardiovaskulární, náhrady kožní tkáně, regenerace kostí či parodontální oblast. V následující části textu jsou jednotlivé kategorie popsány podrobněji.

Pokud budeme chtít použít kolagen za účelem tkáňových či kožních náhrad, je nutné, aby tento biomateriál splňoval určitá kritéria: musí být účinný, bezpečný k implantaci, a musí být snadné jej aplikovat. (Mohd Hilmi *et al.*, 2015) Pro kožní náhrady se nejčastěji využívá kolagen ve formě tzv. kolagenové houby (z anglického „collagen sponge“). Tato forma kolagenu je pro obnovu kůže velmi účinná, a proto se začaly vyrábět další typy umělé kůže

na podobném principu. Jiný způsobem, používaným k regeneračním účelům, je kultivace umělé kůže na kolagenové mřížce, která slouží jako podpora pro růst buněk. Aby nedocházelo ke kontaminaci vytvořeného biomateriálu, používají se zde různá antimikrobiální léčiva, která zároveň urychlují hojení kožních ran. (Lee *et al.*, 2001)

Kolagenové houby jsou často připravovány kombinací více látek – například želatiny s fibrilárním kolagenem, nebo také želatiny s gelovou pěnou, čehož se využívá při regeneraci chrupavky. Protože tento způsob s sebou nese některá omezení, začalo se využívat kombinace kolagenu s různými proteiny, jako je glykosaminoglykan, fibrin a biotin. Například kožní membrány připravené z kolagenu a glykosaminoglykanu nacházejí široké využití při kultivaci lidských keratinocytů. (Boyce *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2001)

Kolagenu lze také využít při řízené tkáňové regeneraci parodontálního vaziva – tzv. GTR, což je terapie, jejíž cílem je obnovit ztracené parodontální tkáň či kosti. V GTR se používají membrány, které zabraňují migraci buněk dásňového epitelu do rány. Tyto membrány mohou být neresorbovatelné (jejichž nevýhodou je však nutnost provedení sekundárního chirurgického zákroku), anebo resorbovatelné, které jsou díky své vstřebatelnosti podstatně vhodnější k použití. Jako materiál pro bioresorbovatelné membrány zde slouží kyselina polyglykolová, polymléčná, nebo právě kolagen, který v prostředí udržuje homeostázu, podporuje růst cév a tkání a funguje jako bariéra proti migrujícím buňkám. (Patino *et al.*, 2002)

Mezi další významné implantáty patří umělé srdeční chlopně. Před samotným použitím je nutné tyto biomateriály stabilizovat, k čemuž se používá nejčastěji GA, který s sebou však nese omezení v podobě kalcifikace tkáň. Proto byl vyvinut produkt odvozený z hovězího perikardu s názvem CardioCelTM, který byl stabilizován za nízkého obsahu GA a vysokých teplot, což redukovalo kalcifikaci na minimum. Díky tomuto procesu bylo možné řízeně ovlivnit vlastnosti tohoto scaffoldu (jako je vysoká pórovitost nebo flexibilita), což následně umožnilo nasazení mezenchymálních kmenových buněk na CardioCelTM sloužících k produkci kolagenu. (Ramshaw, 2016) Kolagen hraje v použití umělých cév a chlopní velkou roli, protože má hemostatické vlastnosti podporující srážlivost krve. Ke zmíněné srážlivosti dochází na základě zprostředkování agregace krevních destiček kolagenem, což vede ke tvorbě krevní sraženiny neboli trombu. Díky tomu kolagen urychluje celkovou obnovu tkání. (Lee *et al.*, 2001)

Jinými lékařskými přípravky mohou být také výše zmíněné kostní náhrady. Tyto scaffoldy mají za úkol poskytnout dočasnou mechanickou oporu a tvořit vysokoporézní strukturu,

kteřá umožní migraci kostních buněk do scaffoldu, čímž podpoří novotvorbu kosti. Kostní scaffold by měl opět splňovat určitá kritéria: měl by být sterilizovatelný, měl by uvolňovat požadované molekuly či léčiva, a následně by se měl dokázat rozložit takovým způsobem, aby u tohoto procesu nevznikaly žádné vedlejší degradační produkty, které by byly toxické nebo jinak nebezpečné pro zdraví pacienta. Pro výrobu kostních náhrad byly zkoumány jak přírodní, tak syntetické biomateriály. K těm přírodním se pochopitelně řadí také kolagen, který je pro tyto aplikace atraktivní hlavně díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a schopnosti interagovat s buňkami. (Ferreira *et al.*, 2012) Kolagen se zde uplatňuje jako nosič proteinů napomáhajících tvorbě nové kostní tkáně. V kombinaci s jinými látkami je používán k léčbě ortopedických defektů, ale díky svým osteoindukčním vlastnostem může být použit i samostatně. Po demineralizaci a následné kombinaci s hydroxyapatitem najde využití ve výrobě kostních štěpů sloužících k léčbě vrozených i získaných vad pohybového aparátu. Bylo také zjištěno, že kombinací kolagenu a kyseliny retinové dochází k lepšímu propojení kostní tkáně a rychlejší regeneraci v místě defektu. (Lee *et al.*, 2001; Sela *et al.*, 2000) Nevýhodou kolagenu a obecně přírodních biomateriálů je však jejich možné botnání či denaturace při zpracovávání, dále imunogenita, nebo obtížná zpracovatelnost. (Ferreira *et al.*, 2012)

2.1.2 Regenerace a hojení ran

Hojení ran je považováno za složitý, ale zato velmi důležitý proces, který se skládá z několika za sebou jdoucích dějů. Běžně jej dělíme na čtyři hlavní fáze (hemostázu, zánět, proliferaci a remodelaci), které se vzájemně překrývají. První fáze zahrnuje srážení krve, které je zprostředkováno trombocyty. Následně do rány vstupují neutrofilly, monocyty a T-lymfocyty, čímž se proces hojení plynule přesouvá do fáze zánětu. Tato fáze je důležitá z toho důvodu, aby se organismus vyhnul případnému vzniku infekce. Velkými pomocníky jsou zde právě neutrofilly, které slouží primárně k odstranění cizorodých částic či bakterií nacházejících se v ráně. Poté začíná fáze proliferační, při níž dochází k tvorbě nového pojiva, cév a fibrózní tkáně, které společně tvoří základ pro poslední, remodelační fázi. Výsledkem remodelace je kolagenní jizva. Přestože tato fáze může trvat až 12 měsíců, ve většině případů celkové hojení probíhá v rámci dnů až týdnů. (Diller and Tabor, 2022; Mathew-Steiner *et al.*, 2021)

Kolagen zastává v procesu hojení ran několik funkcí. Během srážení a koagulace krve je aktivován trombocyty, a následně napomáhá vzniku fibrinové sraženiny. Bylo zjištěno, že kolagen vyvolává fázi zánětu, při níž shlukuje imunitní buňky, a tím zajišťuje plynulý

přechod do proliferační fáze. Podporuje také migraci keratinocytů, přispívá k pevnosti a elasticitě tkání, a slouží jako scaffold pro uchycení tkáňových buněk. Významnou roli hraje při novotvorbě krevních kapilár. (Diller and Tabor, 2022; Mathew-Steiner *et al.*, 2021; El Masry *et al.*, 2019)

Zdrojem kolagenu jsou v tomto případě nejčastěji produkty živočišného původu (např. hovězí, ptačí, či koňský kolagen), které s sebou však nesou určitá rizika. Mezi tyto nevýhody řadíme alergické reakce, mikrobiální kontaminace a přenos prionových chorob. Z tohoto důvodu se zvažuje používání jiných, ať už přírodních (mořský kolagen) či syntetických alternativ. (Mathew-Steiner *et al.*, 2021) Dalším zdrojem může být také lidská kolagenová membrána, která se využívá pro tvorbu výše zmíněných kolagenových hub. Tento typ biomateriálu je vhodný především k léčbě těžkých popálenin, bércových vředů a proleženin. Výhodou kolagenových hub je jejich schopnost těsně přilnout k místu rány, udržovat její nízkou vlhkost a chránit ji před mechanickými vlivy a bakteriemi. Přes tyto výhody je však jejich použití ztíženo nízkou mechanickou pevností a neschopností léčit infikované rány. (Yannas, 1990; Lee *et al.*, 2001)

2.2 Kosmetický a farmaceutický průmysl

Využití našel kolagen i v dalších odvětvích včetně kosmetického a farmaceutického průmyslu. V oblasti kosmetiky patří mezi hlavní složky kosmetických přípravků díky svým jedinečným vlastnostem: zvlhčuje, vyhlazuje a regeneruje pokožku, snižuje transepidermální ztrátu vody (TEWL) a napomáhá zadržování vody v pokožce. Ve formě injekcí je v estetické medicíně aplikován podkožně za účelem redukce vrásek a známek stárnutí. (Sionkowska *et al.*, 2020) K využití ve farmaceutickém průmyslu se řadí nejen aplikace zmíněné v kapitole 2.1.1., ale také systém cíleného podávání léků, který je podrobněji rozebrán v následující kapitole.

2.2.1 Systém cíleného podávání léků

Systém cíleného podávání léků, zkráceně DDS (z anglického „drug delivery system“) je technologie sloužící k dodávání léčiva do cílového místa v organismu. DDS na bázi kolagenu existují v mnoha formách – patří sem kolagenový film/list, kolagenový štít, kolagenová houba, gel a hydrogel, pelety a nanočástice. (Khan and Khan, 2013; Friess, 1998)

V případě kolagenových filmů jsou léčiva uchycena pomocí vodíkových či kovalentních vazeb. Využití nacházejí při léčbě různých tkáňových infekcí, rakoviny jater, či jako nosiče antibiotik. Jejich výhodou je možnost sterilizace. Pokud je film vytvořen kombinací kolagenu a elastinu, je možné jej použít také pro řízené podávání léčiv při kardiovaskulárních onemocněních. (Khan and Khan, 2013; Minabe *et al.*, 1989)

Kolagenové štíty jsou vhodné pro výrobu postupně se rozpouštějících kontaktních čoček při onemocnění epitelu oční rohovky. Princip jejich fungování je takový, že slzy zvlhčující oko rozpouštějí kolagenové štíty, čímž se tvoří kolagenový roztok. Tento roztok následně napomáhá lubrikovat povrch oka a chrání rohovku před mrkáním očních víček. Výhodou tohoto biomateriálu je jednoduchost použití i v pohodlí domova. (Khan and Khan, 2013; Podos *et al.*, 1972)

Dalším typem DDS jsou již zmiňované kolagenové houby, které se osvědčily při léčbě těžkých popálenin a ran. Kromě toho je lze použít jako nosiče steroidů či kyseliny retinové, využívající se při léčbě prekancerózy (neboli přednádorového stavu děložního hrdla) u žen. (Khan and Khan, 2013)

Gely či hydrogely tvořené kolagenem jsou díky své kapalnosti využívány především pro podávání léků ve formě injekcí. Uplatňují se také v očním lékařství jako kapalné preparáty pro podávání protizánětlivých či antibiotických léčiv měnící se po aplikaci do oka na gel. Gely mohou fungovat i jako nosiče nových chondrocytů při poruchách a poraněních chrupavky. (Khan and Khan, 2013)

Dále existují tzv. minipelety, což jsou malé tyčinky připravené z roztoků kolagenu, které je možné aplikovat pod kůži injekční jehlou. Tímto způsobem se do těla dostávají například látky zvané minocykliny určené ke zmírnění příznaků parodontitidy. (Khan and Khan, 2013; Friess, 1998)

A na závěr do DDS řadíme nanočástice, jejichž cílem je vycytávat různé látky (například léky proti HIV) a dopravovat je do ostatních buněk. Slouží také k transportu cytotoxických sloučenin. (Khan and Khan, 2013)

2.3 Výhody a nevýhody biomedicínských aplikací

S použitím kolagenu jako biomateriálu pro biomedicínské aplikace souvisí i jeho výhody a nevýhody. K hlavním výhodám řadíme často zmiňovanou biologickou odbouratelnost, biokompatibilitu, snadnou dostupnost a velkou pevnost v tahu. Nevyvolává v těle imunitní reakci a není toxický; podporuje srážení krve, čímž urychluje hojení ran, a je také kompatibilní s jinými biomateriály. Na druhou stranu je hydrofilní a bobtná, což nemusí být u některých biomedicínských aplikací žádoucí. Další nevýhodou je skutečnost, že kolagen je obtížné sterilizovat, s čímž se pojí riziko přenosu nemocí při použití kolagenu z živočišných zdrojů. Výhody kolagenu však převažují jeho nevýhody, což z něj dělá velice žádaný biomateriál s širokým spektrem využití. (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010; Collagen Uses, © 2019)

3 IN VITRO SAMOSESTAVENÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Extracelulární matrix (ECM) je nebuněčná složka tkání a orgánů, která se díky své vlastnosti propojovat buňky a držet je pohromadě často přirovnává k trojrozměrné komplexní síti poskytující především strukturální podporu. Důležitou roli hraje také při iniciaci různých buněčných procesů, mezi které řadíme proliferaci, diferenciaci a migraci buněk. (Frantz *et al.*, 2010; Kular *et al.*, 2014)

3.1 Struktura a složení extracelulární matrix

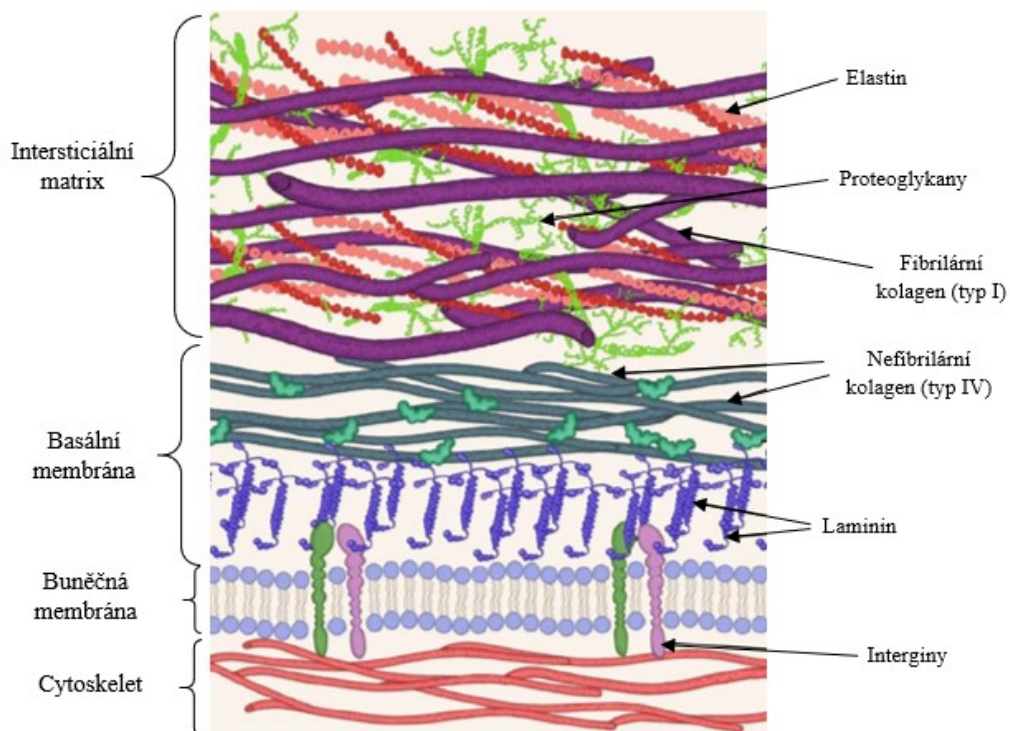
Hlavní složkou ECM jsou proteiny, které lze rozdělit na strukturální a nestrukturní (známé také jako glykoproteiny). Do skupiny strukturálních proteinů řadíme kolagen a elastin; mezi nestrukturní proteiny patří fibronectin, lamininy a tenasciny. Dalšími důležitými složkami jsou růstové faktory (GF) a matrixové metaloproteinázy (MMP). Veškeré informace zahrnující funkci, výskyt či strukturu těchto makromolekul jsou uvedeny v **Tabulce 3**. Jelikož je kolagen podrobněji rozebrán v kapitole 3.3, nebude v následující tabulce uveden. (Kular *et al.*, 2014; Frantz *et al.*, 2010; Bosman and Stamenkovic, 2003)

Tabulka 3: Složení ECM (upraveno podle Kular *et al.*, 2014 a Diller and Tabor, 2022)

Název složky	Funkce	Výskyt	Struktura
Elastin	navrací tkáň po natažení do původního stavu	kůže, šlachy, cévy atd.	je složen z podjednotek tropoelastinu, které jsou provázány mikrofibrilami fibrilinu
Fibronectin	důležitý pro buněčnou adhezi, migraci, hojení ran a embryonální vývoj; hraje roli v uspořádání intersticiální ECM	bazální membrána	uspořádán do sítě fibril s tloušťkou v rozmezí 10-1000 nm
Lamininy	hrají roli při buněčné migraci, diferenciaci, buněčné adhezi; důležité pro vývoj nervů a cév	mnoho oblastí výskytu - svalové buňky, epitelální buňky atd.	jsou to trimery skládající se ze tří řetězců (α , β , γ)
Tenasciny	vyskytují se v pěti modifikacích, z nichž každá má jinou funkci; obecně jsou ale spojovány s migrací a proliferací	pojivové tkáň, kůže, mozek	každá z modifikací má jinou strukturu
GF	hojení ran, remodelace, vývoj a diferenciacie tkání	obecně ECM	-
MMP	rozkládají matrix v souvislosti s remodelací ECM; začnou působit v případě zvýšení aktivity GF – jsou však regulovány, aby nedošlo k poškození ECM	obecně ECM	-

Nesmíme zapomenout také na důležité receptory obsažené v ECM, mezi které řadíme primárně integriny. Jejich funkce spočívá v propojení ECM s buňkami a cytoskeletem. Můžeme je považovat za obousměrné vodiče, které přenášejí signály mezi intra- a extracelulárními tekutinami. (Yue, 2014)

ECM se dá považovat za strukturní 3D síť sestávající z makromolekul, kterou dělíme na dvě formy – pericelulární a intersticiální matrix. Typem pericelulární matrix je bazální membrána (BM), která se vyskytuje v epitelových tkáních, endotelových tkáních a v cévách, a jejím rozdílem oproti intersticiální matrix je vyšší hustota a nižší porozita. BM se skládá převážně z lamininu, fibronektinu a kolagenu typu IV, jehož úkolem je stabilizovat celkovou strukturu ECM. Složení intersticiální matrix je však odlišné. Tato forma ECM obsahuje ve své struktuře různé typy kolagenů, elastin a fibronektin, který uspořádává strukturu matrix. Výskyt intersticiální matrix je totožný s BM, avšak najdeme ji i ve šlachách. (Kular *et al.*, 2014; Theocharis *et al.*, 2016) Zjednodušená struktura ECM je vyobrazena na následujícím **Obrázku 4.**



Obrázek 4: Struktura ECM (upraveno podle Bandzerewicz and Gadomska-Gajadhur, 2022)

3.2 Funkce ECM v biologických systémech

ECM zastává v organismu mnoho důležitých úloh – funguje jako opěrný systém, odděluje tkáň, a je nezbytná pro buněčný růst či hojení ran. (Kumar *et al.*, 2005) Mezi funkce vyplývající z fyzikálních vlastností ECM řadíme například její vliv na migraci buněk. Během tohoto procesu se ECM může chovat jako dráha pohybu buněk, nebo také jako kotevní místo, které je důležité během buněčného dělení. Je schopna migraci usnadňovat, nebo jí naopak zcela zabránit vytvořením fyzické bariéry. ECM slouží jako zásobárna růstových faktorů a díky svým biochemickým vlastnostem dokáže ovlivňovat způsob komunikace buněk s jejich extracelulárním prostředím. (Kular *et al.*, 2014; Yue, 2014)

3.3 Kolagen jako klíčová složka ECM

Kolagen je v ECM zastoupen přibližně z 50 – 90 %, což z něj dělá velmi důležitý strukturální protein. Jeho primární funkcí je zajišťovat pevnost v tahu, organizovat tvar a uspořádání tkání, a podílet se na různých buněčných procesech jako je adheze či migrace. Zmíněná pevnost v tahu je dána strukturou kolagenu, čili jeho uspořádáním do fibril. Bylo zjištěno, že tvorba fibril může být regulována ostatními molekulami nacházejícími se v ECM - například dekorinem, fibromodulinem či integriny. Kolagen je syntetizován fibroblasty a najdeme jej především v pojivových tkáních (šlachy či kůže). Existuje několik typů kolagenu, přičemž nejvíce dominantní formou je kolagen typu I, který se nachází obecně ve všech tkáních. Jednotlivé tkáň jsou tvořeny směsicí kolagenových typů; jeden z nich však vždy převládá (příkladem může být kolagen typu II v chrupavce či kolagen typu III v cévních stěnách). (Dillar and Tabor, 2022; Kular *et al.*, 2014; Yue, 2014; Frantz *et al.*, 2010)

3.4 *In vitro* ECM a jeho aplikace v tkáňovém inženýrství

ECM odvozená z buněk (CAM) částečně odráží složitý biologický aparát přirozené tkáň. CAM pro využití na scaffold lze získat z lidských buněčných kultur prostřednictvím jemné decelularizace. Tento proces zachovává bioaktivitu a zároveň odstraňuje imunogenní složky. *In vitro* příprava umožňuje výběr vhodných typů buněk produkujících ECM, genetickou modifikaci a vystavení specifickým stimulům, což usnadňuje vytvoření ECM s požadovanými vlastnostmi. Lze také regulovat chování buněk, včetně jejich migrace, proliferace či diferenciací. Proces navíc zachovává obsah bioaktivních složek a signálních drah, a proto biomateriály na bázi decelularizované ECM mohou sloužit jako struktury pro

růst a adhezi buněk. (Assunção *et al.*, 2020; Peiyao *et al.*, 2024) V důsledku toho se stal CAM významným materiálem v tkáňovém inženýrství, a to především díky svému potenciálu vytvářet více biomimetických a funkčních tkáňových konstruktů. ECM odvozenou z buněk lze nasadit do hydrogelů nebo scaffoldů, čímž se vytvoří hybridní materiály na bázi ECM. Alternativně lze CAM generovat kultivací buněk bez podpory jiného materiálu ve 2D a 3D kulturách. (Assunção *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2021)

V oblasti tkáňového inženýrství by se měl v rámci přeměny implantátu hostitelským tělem na funkční tkáň vyvinout takový scaffold, který odpovídá strukturálním, fyzikálně-chemickým a mechanickým vlastnostem nativní tkáně. Právě pro splnění biochemických vlastností a významné roli interakce mezi buňkami a scaffoldem byly vyvinuty různé biomateriály syntetické (např. kys. polymléčná či polyglykolová) i přírodní (např. chitosan, alginát a kolagen). V případě syntetických biomateriálů lze jako výhodné vlastnosti považovat jak přesnou kontrolu nad složením, tak i jejich geometrii a strukturu. Často jim však při využití brání nevýhody, mezi které patří nepředvídatelná rychlost degradace, chronický zánět a omezená biologická aktivita. Naopak přirozeně se vyskytující materiály jsou typicky odvozeny z celých ECM nebo purifikovaných jednotlivých složek, jako je kolagen, laminin, či fibronectin. Poskytují inherentní fyziologické interakce buňka - scaffold, které usnadňují regeneraci tkání. Syntetické scaffoldy by tedy mohly být nahrazeny ECM syntetizovanou buňkami kultivovanými *in vitro*. Tyto snahy vyvrcholily vývojem příslušných implantátů tkáňového inženýrství, jejichž výsledkem byly scaffoldy s vhodnými mechanickými vlastnostmi. (Eltom *et al.*, 2019; Mangan *et al.*, 2020).

Po ECM jako biomateriálu je tedy v tkáňovém inženýrství i regenerativní medicíně čím dál větší poptávka (Assunção *et al.*, 2020). Využití nachází v mnoha oblastech při regeneraci kostí, cév, kůže, ledvin a mnoha dalších orgánů. (Yi *et al.*, 2017) Jednotlivé aplikace spolu s praktickými příklady použití jsou uvedeny v následující **Tabulce 4**.

Tabulka 4: Aplikace ECM (upraveno podle Yi et al., 2017)

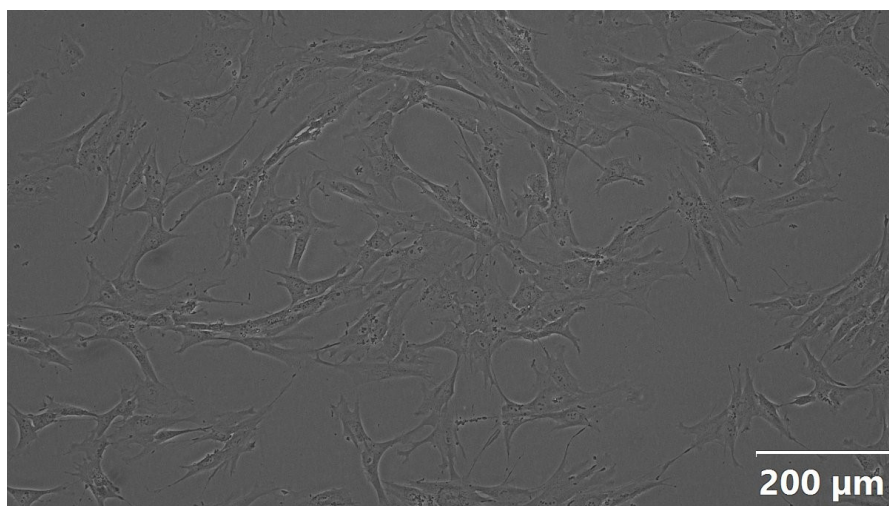
Oblast použití	Příklady
Kůže	léčba rozsáhlých poranění a těžkých popálenin
Kosterní soustava a chrupavka	decelularizace prasečích chondrocytů → vznik ECM scaffoldu pro podporu regenerace chrupavky
Nervová soustava	ECM scaffold vytvořený z prasečího optického nervu, míchy a mozku → pozitivní vliv na diferenciaci nervových kmenových buněk
Cévní soustava	využití hydrogelu vyrobeného z ECM prasečího myokardu → léčba infarktu u prasat a celkové zlepšení funkce srdce
Dýchací soustava	transplantace náhrady průdušnice vyrobené za pomoci kmenových buněk
Játra	nasazení hepatocytů na decelularizovaný prasečí ECM jater → možnost využití při nevratném poškození či selhání jater (alternativa při nedostatku dárcovských jater)
Ledviny	scaffold vyrobený z ECM ledviny využívaný při závažném onemocnění ledvin, které vyžaduje transplantaci (slouží opět jako alternativa při nedostatku dárců)
Tenké střevo	na modelu psa byla pro defekt tenkého střeva použita záplata z ECM tenkého střeva

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

HDF je adherentní buněčná linie odvozená od dospělé kůže nebo dermis juvenilní předkožky (kat. č.: 106-05n, Cell Sigma-Aldrich). Tato buněčná linie, použitá ve všech experimentech praktické části bakalářské práce, byla kultivována v kultivačních lahvích (TPP Trasadigen, Švýcarsko) v inkubátoru při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a v 5% CO₂ atmosféře. Pro kultivaci buněk bylo použito médium BME (Sigma Aldrich, USA) s 1% přídavkem antibiotik penicilin – streptomycin (GE Healthcare HyClone, United Kingdom) a 10% fetálního bovinního séra (FBS, BioSera, France). Buněčná linie HDF, která byla pozorována pomocí inverzního mikroskopu, je zobrazena na následujícím **Obrázku 5**.



Obrázek 5: Buněčná linie HDF (zvětšení Z: 100×)

Buněčná linie byla dvakrát týdně zpasážována, aby se zvýšila její životnost. Dalším krokem bylo vyloučení kontaminace za použití inverzního světelného mikroskopu IX51 (Olympus Japan, Japonsko). Celý objem média byl vylit z kultivační lahve, buňky byly 2x promyty fosfátovým pufrem (PBS, Biosera, France), a následně byl přidán Trypsin/EDTA (Biosera, France). Po inkubaci a uvolnění buněk ode dna kultivační nádoby bylo přidáno kompletní kultivační médium, díky čemuž vznikla buněčná suspenze. Pomocí Bürknerovy komůrky byla stanovena viabilita a počet buněk. Linie byly pasážovány v poměru 1: 4 až 1: 6.

4.2 Použité soupravy, chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- ActinGreen™ 488 (kat. č.: R37110, ThermoFisher Scientific, USA)
- ActinRed™ 555 ReadyProbes™ Reagent (kat. č.: R37112, ThermoFisher Scientific, USA)
- Askorbát sodný (Cat. N.: A4034, Sigma Aldrich, USA)
- Basal Medium Eagle (BME, kat. č.: B9639-10L, Sigma Aldrich, USA)
- CELLPURE® sterilní roztok Phosphate Buffered Saline (kat. č.: R.9143.2, Carl Roth, Německo)
- Dodecylsírán sodný (kat. č.: 151-21-3, Sigma-Aldrich, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM, kat.č.: D5648; Sigma-Aldrich, USA)
- F12 Nut Mix (kat. č.: 21700-018, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS kat. č.: FB-1280; Biosera, Francie)
- Formaldehyd 36–38 % (kat. č.: 14150-11000, Penta s. r. o., Česká republika)
- Formaldehyd 36-38% (kat. č.:1415,-11000, Penta s. r. o, Česká republika)
- Fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, kat. č.:LM-S2041/500, BioSera, Francie)
- Hoechst 33258 (kat. č.: H1398, ThermoFisher, Scientific, USA)
- Hydrogenuhličitan sodný (kat. č.: 28000-31000; Penta Chemicals, Česká republika)
- Penicillin-Streptomycin 100X (kat. č.: XC-A4122/100; Biosera, Francie)
- Rat Tail Collagen Coating Solution (kat. č.: 122-20, Cell Applications, USA)
- Triton™ X-100 solution (kat. č.: 93443-100ML, Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin/EDTA 10X (kat. č.: XC-T1717/100; Biosera, France)
- Želatina (kat. č.: 28650-30500, Penta chemicals, Česká republika)

Použité roztoky a jejich příprava

Příprava 0,66% roztoku SDS

K přípravě tohoto roztoku si na analytických vahách do kádinky navážíme 0,66 g práškového SDS a rozpustíme v malém množství destilované vody. Roztok kvantitativně převedeme do 100ml Erlenmayerovy baňky a doplníme destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,1% roztoku želatiny

K přípravě tohoto roztoku si na analytických vahách do kádinky navážíme 0,1 g želatiny a rozpustíme v malém množství destilované vody. Roztok kvantitativně převedeme do 100ml skleněné lahve. Po přípravě musí roztok projít procesem autoklávování, aby byl sterilní.

Příprava 0,37M roztoku askorbátu sodného

K přípravě tohoto roztoku si na analytických vahách navážíme 50 mg L-askorbátu sodného a následně rozpustíme v 1 ml destilované vody.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- 0,22 μm stříkačkové filtry (kat. č.: 99722, TPP – Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Centrifuga 5702 R chlazený model pro vzorky závislé na teplotě (Eppendorf, ČR)
- Digestoř odtahovaná MERCI G NextGen (MERCİ s. r. o., ČR)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastem (OLYMPUS Japan, Japonsko)
- Inkubátor s příslušenstvím Heracell™ 150i (Thermo Scientific, USA)
- Inverzní mikroskop IX51 (OLYMPUS Japan, Japonsko)
- Jednorázové injekční stříkačky Injekt (Braun, Spolková republika Německo)
- Laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko)
- Ultrazvuk Elmasonic S 70 H s ohřevem (Elma, Spolková republika Německo)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Růstová křivka

Růstová křivka je graf, který nám ukazuje, jak se v různých časových intervalech mění počet buněk v dané buněčné kultuře v průběhu růstového cyklu. Tento cyklus má obecně čtyři fáze, přičemž první je klidová (lag) fáze, za ní následuje exponenciální (log) fáze, stacionární fáze, a na závěr nastupuje buněčná smrt neboli apoptóza. (Growth curve, © 2019; Vunjak-Novakovic and Freshney, 2005)

První (klidová) fáze trvá zpravidla 12 – 24 hodin, obecně však může trvat od několika hodin až po 48 hodin. Během tohoto časového období buňky obnovují svůj cytoskelet, zotavují se z trypsinizace a vylučují extracelulární matrix, díky čemuž se dokáží mezi sebou vzájemně propojit a rozprostřít se na substrátu. Tyto zmíněné procesy poté vedou k opětovnému započetí buněčného cyklu. (Assanga, 2013; Vunjak-Novakovic and Freshney, 2005)

Následně buňky vstupují do tzv. log fáze neboli fáze exponenciálního růstu. Zde dochází ke zdvojnásobování buněk, jehož rychlost se liší podle typu buněčné linie. Tuto rychlost označujeme jako DT (z anglického „doubling time“). Jakmile se buňky namnoží natolik, že je jimi obsazen celý substrát, přeruší svůj buněčný cyklus a vstupují do další fáze. (Assanga, 2013; Vunjak-Novakovic a Freshney, 2005) Tuto fázi nazýváme stacionární (což znamená, že se buněčná proliferace téměř úplně zastaví), a může být způsobena například vyčerpáním růstových faktorů v médiu nebo vysokou hustotou buněčné populace. Některé buňky přejdou do G0 fáze, kde se již dále nedělí, zastavují svůj buněčný cyklus, ale zůstávají životaschopné; některé mohou naopak ve stacionární fázi diferencovat. (Vunjak-Novakovic and Freshney, 2005)

Vysoká hustota buněčné populace zapříčiní změnu tvaru, povrchu a extracelulární matrix buněk, dále také dochází k vypotřebování peptidových růstových faktorů a k omezení průtoku živin mezi buňkami. Působením všech předchozích faktorů nastává u běžných buněčných linií vyřazení z buněčného cyklu, u transformovaných buněk však toto končí většinou buněčnou smrtí neboli apoptózou. (Vunjak-Novakovic and Freshney, 2005)

V této části experimentu jsem pro sestavení růstové křivky sledovala navyšování koncentrace HDF buněk v buněčné suspenzi, přičemž jsem prováděla dvě měření vedle sebe.

Buňky HDF jsem nejprve zpasážovala, čímž jsem získala buněčnou suspenzi pro zjištění koncentrace buněk pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Zde se jedná o manuální počítání buněk v celkovém objemu 10 μl a jejich pozorování pomocí inverzního mikroskopu při zvětšení 40x. Za použití následující **Rovnice 1** jsem stanovila koncentraci buněk v 1 ml buněčné suspenze:

$$c = \frac{p \times z \times 10^4}{1} \quad (1)$$

Kde c je koncentrace buněk, p je průměrný počet buněk ve čtverci a z je zředovací faktor. Faktor 10^4 se rovná poměru 1 000 mm^3 (1 ml) a 0,1 mm^3 (objem definovaný jedním čtvercem). Výsledná buněčná suspenze měla tedy koncentraci 1×10^4 buněk na 1 ml.

Následně jsem do jednotlivých Petriho misek napipetovala 3 ml buněčné suspenze a umístila jsem je do inkubátoru při teplotě 37 °C a koncentraci CO_2 5 % na 24 hodin. Po uplynutí této doby jsem duplikát Petriho misek zpasážovala a buňky spočítala stejným způsobem, jak je uvedeno výše. Tento postup jsem opakovala i v následujících intervalech, tj. 3, 5 a 9 dní; kdy výměna kultivačního média probíhala každých 72 hodin. Ze získaných hodnot obou řad byl pro každý den stanoven průměr. Tyto průměry koncentrace byly následně použity pro tvorbu růstové křivky.

K výpočtu času potřebného ke zdvojnásobení počtu buněk (tzv. doubling time – DT) jsem použila následující **Rovnici 2**:

$$DT = \frac{\Delta t}{\log_2\left(\frac{\Delta N}{N_0 + 1}\right)} \quad (2)$$

Kde Δt je celkový čas kultivace, ΔN je nárůst buněčné koncentrace během kultivace a N_0 je počáteční koncentrace buněk.

4.4.2 Produkce CAM *in vitro*

CAM – z anglického „cell-assembled extracellular matrix“ – znamená v doslovném překladu něco jako „extracelulární matrix sestavená z buněk“. CAM sheet (neboli list CAM) je v současné době relativně žádaný biomateriál, díky kterému se například povedlo zcela úspěšně implantovat cévní bypass do těla pacientů. (Potart *et al.*, 2023)

Při tvorbě CAM sheetu jsem použila adherentní buněčnou linii HDF. Tato linie byla při hustotě 1×10^4 buněk \cdot cm⁻² nasazena do osmi kultivačních lahví T-25 o kultivační ploše 25 cm² a následně byla kultivována v inkubátoru po dobu osmi týdnů v médiu DMEM/12 s přidavkem 20% fetálního bovinního séra (FBS) a 1% antibiotika penicilin – streptomycin. Na dosažení struktury v podobě tenkého listu (plátku) během samosestavování ECM fibroblastových buněk má vliv synergického efektu kultivace s přidavkem kyseliny askorbové jako kolagenového stimulantu (Sato *et al.*, 2017). Proto bylo do média přidáno 500 μ M askorbátu sodného (Sigma Aldrich, USA). Výměnu média jsem prováděla třikrát týdně.

Po uplynutí osmi týdnů jsem pláty extracelulární matrix z kultivačních lahví stáhla pomocí pinzety, rozprostřela na Petriho misky a vzorky CAM uschovala v mrazáku při teplotě -80 °C pro další analýzu. Na následujícím **Obrázku 6** je zpracován jednoduchý grafický přehled postupu produkce CAM *in vitro*.



Obrázek 6: Postup produkce CAM *in vitro*

4.4.3 Zpracování CAM devitalizací/decelularizací

Pokud budeme chtít CAM sheet použít, musíme jej nejprve upravit devitalizací. Jedná se o rozmrazení vzorků, jejich promytí ultračistou vodou (UPW) a proschnutí v laminárním flowboxu po dobu 1 h. V případě potřeby jsou znovu hydratovány fosfátovým pufrem. Pro zjištění struktury CAM byly vzorky tímto způsobem upraveny a vloženy do Petriho misky s 3 ml PBS a v tomto roztoku ponechány do druhého dne.

Proces decelularizace je hojně používaný v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně k odstranění buněčných složek z biologických tkání nebo orgánů při zachování struktury a složení ECM. Cílem decelularizace je vytvořit scaffold z orgánu, který může být znovu osídlen novými buňkami, což umožňuje regeneraci funkčních tkáňových nebo orgánových konstruktů (Neishabouri *et al.*, 2022).

Samotná decelularizace byla provedena pomocí roztoku SDS o výsledné koncentraci 0,66 %. V případě chemického odstraňování buněčné složky (solubilizace cytoplazmatické membrány, lipidů a DNA) se alternativně využívají iontové detergenty. Byl použit iontový detergent SDS, který je ve srovnání s deoxycholátem nebo Tritonem X-100 neúčinnější (Schmidt *et al.* 2017). Tato látka byla naaplikována na vzorek CAM v objemu 5 ml a perfuze trvala po dobu 1 hodiny. Po uplynutí 1 h jsem CAM sheet 5x promyla 5 ml PBS, přičemž po každém promytí jsem CAM sheet v PBS ponechala po dobu 30 minut. Takto decelularizovaný CAM sheet byl uschován v lednici v 5 ml PBS do následného dne k použití. Pro kontrolu správnosti těchto postupů jsem zvolila metodu fluorescenčního barvení.

4.4.4 Fluorescenční mikroskopie produkovaných CAM

Fluorescenční mikroskopie využívá fyzikálního jevu zvaného fluorescence. Při tomto jevu dochází k absorpci světelného záření o určitých vlnových délkách molekulami, čemuž se jinými slovy říká excitace. Část takto získané energie se opět vyzáří, čili dojde k emisi světla o delší vlnové délce, které je poté možno pozorovat mikroskopem. (Becker, 2012)

Fluorescenci dělíme na primární fluorescenci (autofluorescenci) a sekundární (nepřímou) fluorescenci. První typ se vyskytuje u látek, které jsou schopny fluoreskovat samostatně; druhý typ můžeme pozorovat, pokud na nefluoreskující látku navážeme fluorescenční barvivo. Látky, které k takovému barvení používáme, se nazývají fluorochromy. Jsou to organické látky aromatického charakteru, v jejichž molekule se nacházejí reaktivní skupiny (například protilátky nebo řetězce nukleových kyselin) sloužící k interakci s námi požadovanými strukturami. (Becker, 2012) Fluorochromy mohou být vnitřní (například

fenylalanin, tyrosin nebo tryptofan), anebo vnější, které jsou používány častěji a podle typu tvořící vazby se dělí na fluorescenční značky a sondy. (Kočárek *et al.*, 2010)

Jak již bylo zmíněno, metodu fluorescenčního barvení jsem použila za účelem kontroly správnosti provedení decelularizace CAM sheetu. Nejprve jsem opatrně odsála PBS z Petriho misek, ve kterých byly vzorky CAM – jeden upraven devitalizací a druhý procesem decelularizace. Fixace vzorků byla provedena 4% formaldehydem. Po 15 minutách byl obsah Petriho misek odsát a promyt PBS. Přidala jsem 0,5% Triton X-100, který jsem nechala 5 minut působit. Objem Petriho misky s látkou byl opět odsát a CAM sheet byl 3x promyt PBS. Pro barvení struktury CAM sheetu byl přidán PBS, do něhož byla přidána 1 kapka $\cdot\text{ml}^{-1}$ barviva Actin RedTM 555 a cca $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Hoechst 33258 barviva. Takto připravené vzorky CAM byly ponechány 30 minut v inkubátoru ve tmě. Na závěr jsem roztok v misce odsála, pipetou přidala k CAM sheetu PBS, a pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 jsem vzorek nafotila.

4.4.5 Test proliferace H9C2 buněčné linie

Proliferací se obecně rozumí novotvorba, množení, nebo růst buněk. Proliferační test byl proveden za účelem zjištění, zda je buňkami vytvořený CAM sheet dobrým scaffoldem pro růst jiné buněčné linie. Pro tuto metodu jsem zvolila buněčnou linii H9C2 (myší kardiomyocyty), která se kultivuje v DMEM médiu s přidavkem 10% FBS, 1% penicilin-streptomycinu a 1% přidavkem L-glutaminu.

Tento test jsem prováděla souběžně ve třech různě povrchově upravených Petriho miskách. Typy povrchových úprav použitých pro tuto část experimentu, společně s potřebným množstvím látek a jejich dobou inkubace po povrchové úpravě, jsou uvedeny v **Tabulce 5**. Jako reference byla zvolena čistá Petriho miska.

Tabulka 5: Typy povrchových úprav

Číslo misky	Povrchová úprava	Množství	Doba inkubace
1	Reference (bez úprav)	-	-
2	Kolagen	3 ml	30 min
3	Želatina	3 ml	30 min
4	Decelularizovaný CAM sheet	-	-

Dalším krokem byla příprava samotné buněčné suspenze, kterou jsem provedla zpasážením buněk H9C2. Následně bylo nutné zjistit koncentraci buněčné suspenze pomocí počítání buněk Bürkerovou komůrkou, výsledná koncentrace byla zvolena v počtu 1×10^5 buněk \cdot cm⁻². Takto vytvořenou buněčnou suspenzi H9C2 jsem napipetovala do již připravených Petriho misek v objemu 5 ml. Petriho misky jsem inkubovala po dobu 48 hodin v inkubátoru. Po inkubačním čase jsem provedla vyhodnocení pomocí fixace buněk H9C2 v 4% formaldehydu a provedení metody fluorescenčního barvení.

Postup fluorescenčního barvení byl totožný jako v případě vyhodnocení správného postupu decelularizace CAM sheetu, viz kapitola 4.4.4.

5 VÝSLEDKY

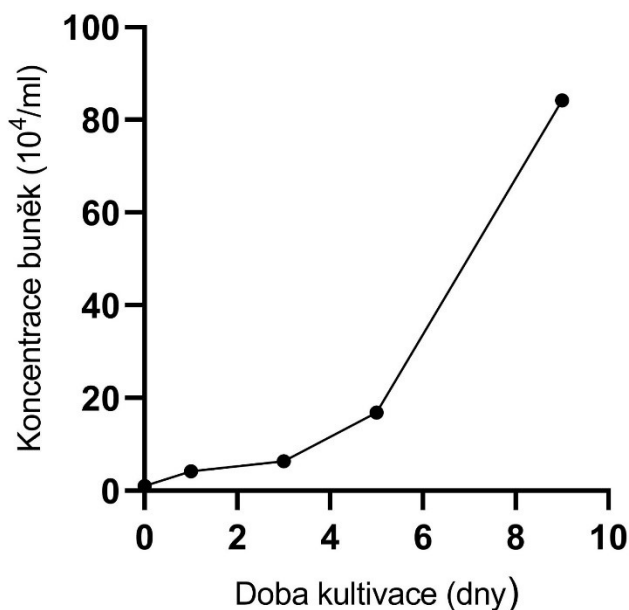
5.1 Růstová křivka

Pro sestrojení růstové křivky byla provedena dvě měření vedle sebe. První, třetí, pátý a devátý den byla vypočítána koncentrace buněk v jednotlivých duplikátech, z nichž byl následně stanoven průměr koncentrace pro jednotlivé dny. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v **Tabulce 6**.

Tabulka 6: Koncentrace buněk v jednotlivých dnech experimentu

Doba kultivace [dny]	Koncentrace buněk [10^4]
0	1
1	4,2
3	6,4
5	16,9
9	84,2

Z hodnot v předchozí tabulce byla sestrojena růstová křivka závislosti koncentrace HDF buněk na době kultivace (**Graf 1**).



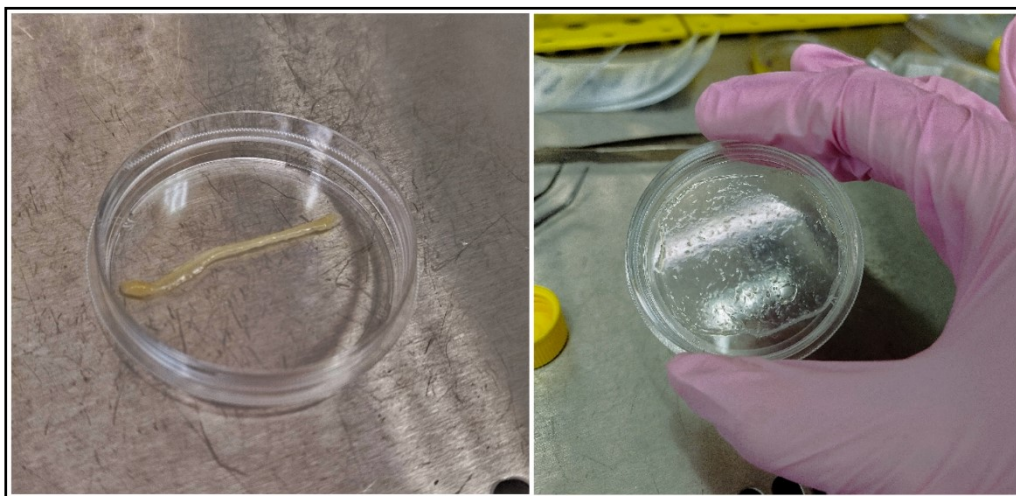
Graf 1: Růstová křivka

Dle teorie popsané v kapitole 4.4.1. lze z této růstové křivky vyčíst, že mezi 1. a 3. dnem byly HDF buňky v klidové (lag) fázi. Obecně tato fáze trvá až 48 hodin, v našem případě však tato doba vzrostla na 72 hodin. Od třetího dne již buňky vstoupily do log fáze neboli fáze exponenciálního růstu. Lze vidět, že v tomto případě stacionární fáze ani apoptóza neproběhly.

Za použití **Rovnice 2** jsem vypočítala doubling time na 50,81 hodin.

5.2 Produkce CAM *in vitro*

K produkci CAM plátek byly přednostně použity fibroblasty odvozené z lidské kůže, označené jako HDF buněčná linie. HDF v kultivační lahvi s povrchem o velikosti 25 cm² vytvořily soudržnou živou vrstvu po 8 týdnech kultivace. Takto vytvořený CAM sheet vypadal jako homogenní, tenká, poloprůhledná fólie/blána. Vyprodukovaný CAM sheet jsem následně z kultivační lahve přesunula pinzetou na Petriho misku, kde jsem jej za pomoci pinzety a preparačních jehel rovnoměrně rozprostřela. Tento proces lze vidět na **Obrázku 7**.

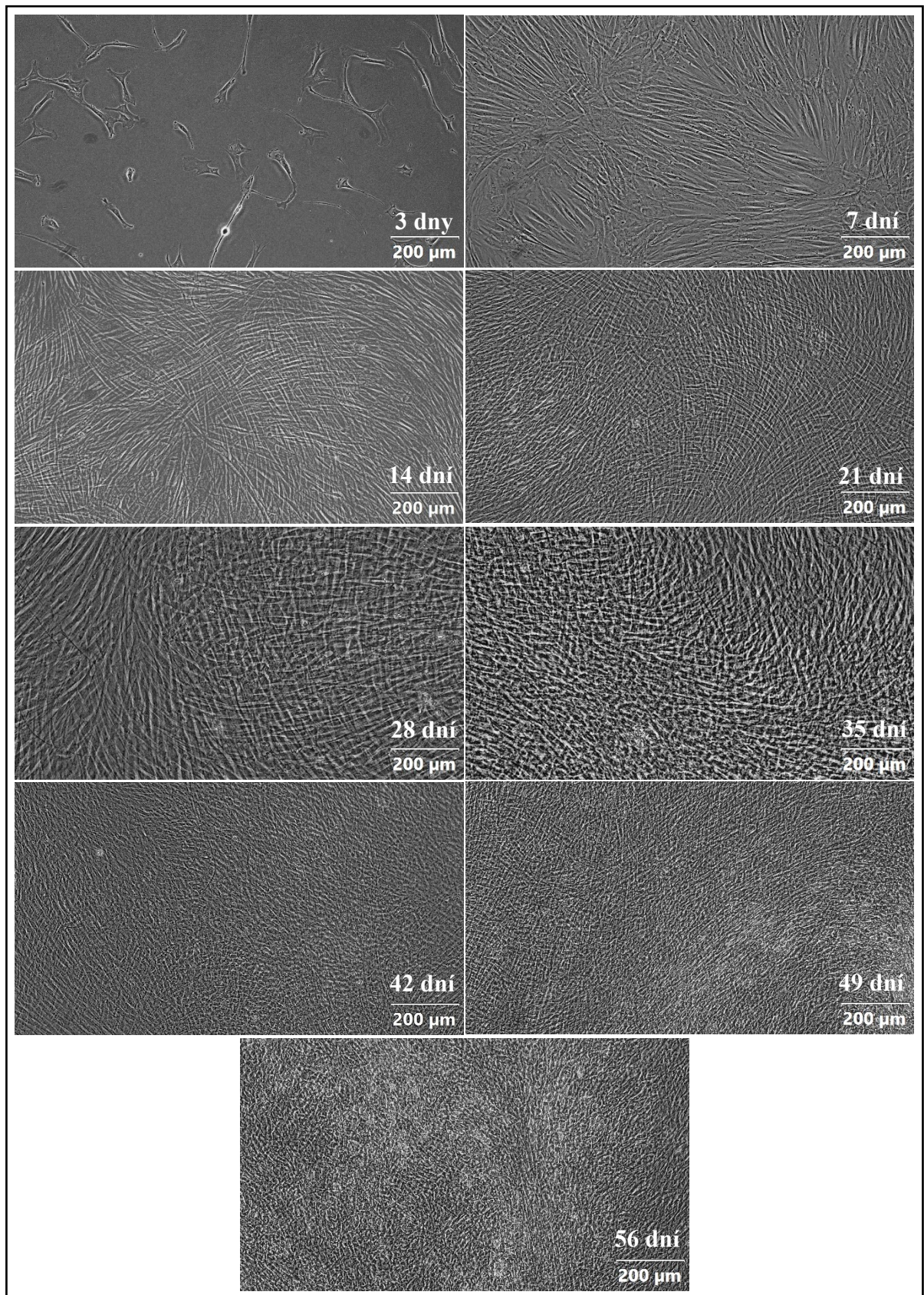


Obrázek 7: CAM sheet na Petriho misce

Celkový 8týdenní proces kultivace a nárůst HDF buněk byl průběžně pozorován pomocí inverzního mikroskopu s fotoaparátém při zvětšení 100x. První pozorování bylo provedeno 3 dny po nasazení buněčné linie, druhé pozorování proběhlo 7. den. Následně jsem postupně samosestavování CAM analyzovala vždy jednou za 7 dní, a to po dobu osmi týdnů. Fotodokumentace tvorby CAM sheetu lze vidět na **Obrázku 8**.

Nejvyšší nárůst buněčné koncentrace proběhl mezi 3. a 7. dnem. Na fotce pořízené třetí den můžeme pozorovat HDF buňky samostatně, zato 7. den již buňky vytvořily propletenou

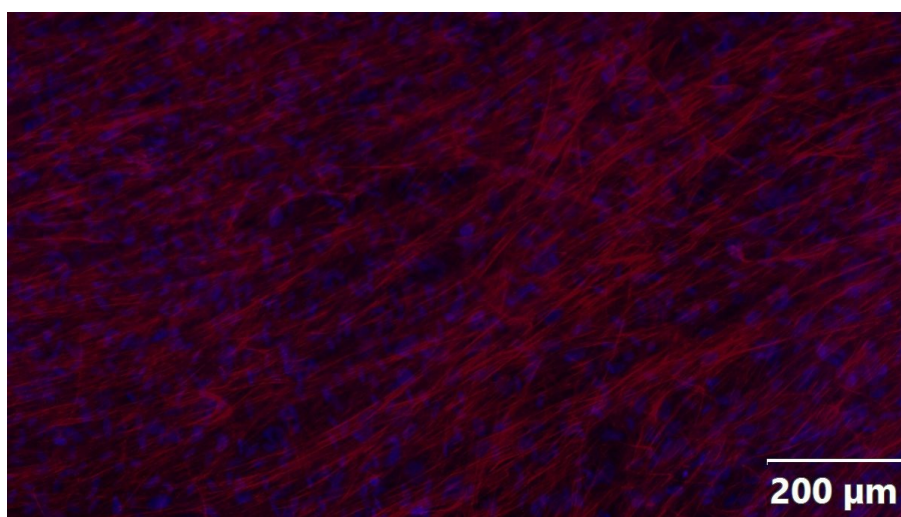
strukturu, která s přibývajícím dnem stále narůstala. V závěru kultivační periody byla již sestavena hustá endogenní extracelulární matrix vytvořená pouze z fibroblastů.



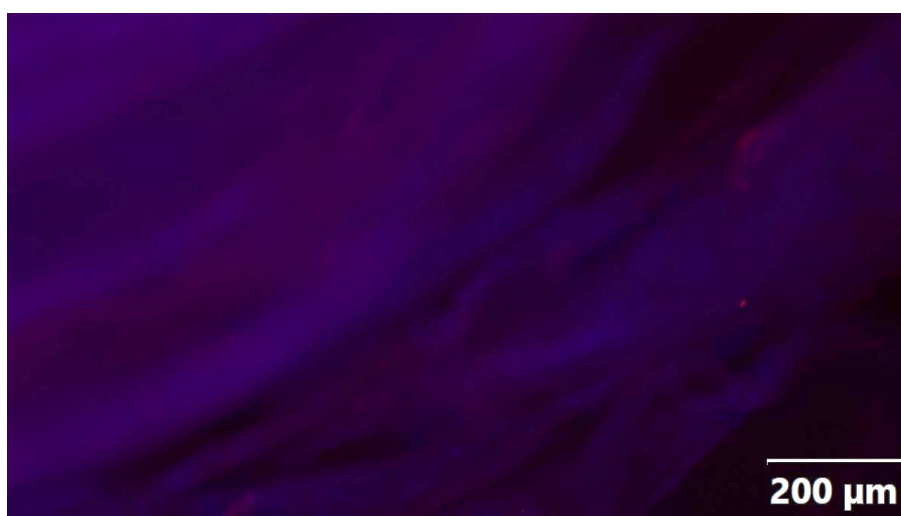
Obrázek 8: Produkce CAM in vitro (Z: 100×)

5.3 Zpracování CAM devitalizací/decelularizací

Samotné připravené CAM sheety lze použít ihned po zpracování v případě, že chceme využít živé fibroblasty pro konkrétní aplikaci. Avšak v tomto případě jsme použili proces devitalizace za pomoci dehydratace. Jedná se o netraumatickou metodu pro uložení vzorků CAM. Devitalizovaný vzorek si zachovává původní strukturu včetně buněčných komponent. Pro následující experiment proliferace jiné buněčné linie bylo nutné odstranit procesem decelularizace buněčnou část a zachovat pouze extracelulární matrix. Procesem působení 0,66% detergentu SDS jsem získala silnou homogenní strukturu bez potřeby jakékoli vnější podpory. Oba procesy, devitalizaci a decelularizaci CAM sheetů, jsem ověřila a vyhodnotila pomocí kontrastního fluorescenčního barvení (**Obrázek 9 a 10**).



Obrázek 9: Devitalizovaný CAM sheet (Z: 100×)

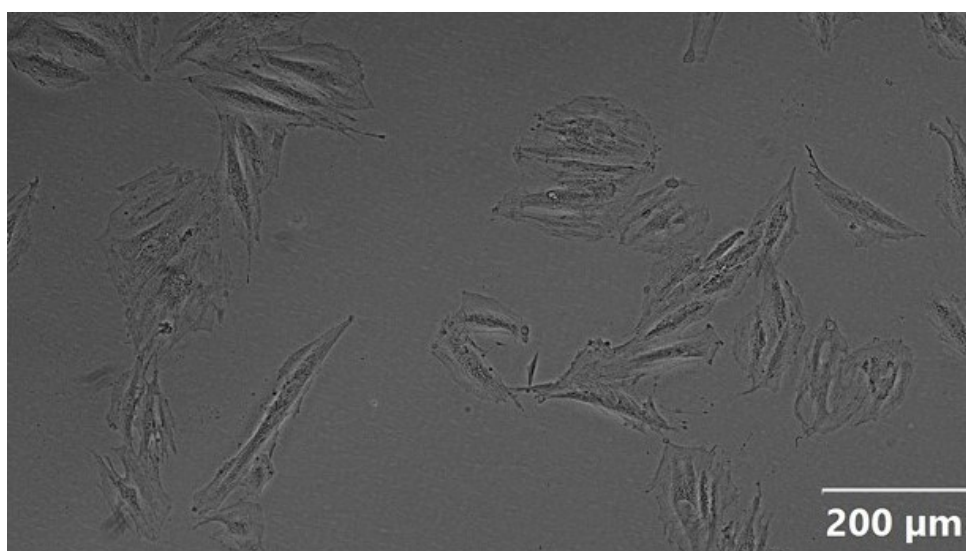


Obrázek 10: Decelularizovaný CAM sheet (Z: 100×)

Na devitalizovaném vzorku je červeně zobrazen cytoskelet buněk; modro-fialově jsou zabarvena buněčná jádra. Naopak na druhém, decelularizovaném vzorku byly veškeré buněčné komponenty odstraněny, tím pádem lze na fotce vidět pouze čistý CAM sheet bez buněk. Lze tedy konstatovat, že proces decelularizace je účinný pro odstranění buněčné složky. Tento krok zachoval složitou architekturu extracelulární matrix, a takto upravený CAM sheet je možné využít jako modelový biologický scaffold pro nasazení a proliferaci dalších buněčných linií.

5.4 Test proliferace H9C2 buněčné linie

Předpokládá se, že CAM sheet poskytuje vhodné prostředí pro adhezi a proliferaci buněk a má potenciál jako scaffold v oblasti tkáňového inženýrství. Posouzení možné interakce mezi povrchem a buněčnou linií lze provést *in vitro* metodou proliferace. Buněčná linie H9C2, odvozená z embryonální srdeční tkáně, byla kultivována na vzorku CAM sheetu a 2 povrchových úpravách – želatina a kolagen. Její morfologie, pozorovaná inverzním mikroskopem, je viditelná na **Obrázku 11**.

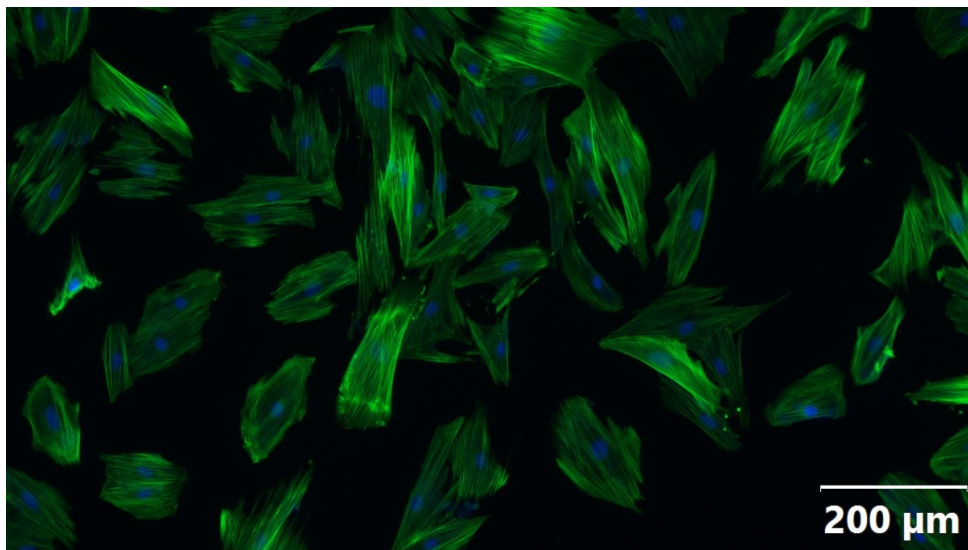


Obrázek 11: Buněčná linie H9C2 (Z: 100×)

Schopnost buněčné linie H9C2 proliferovat na vzorku CAM sheetu a dalších povrchových úpravách byla hodnocena po 48 hodinách provedením fluorescenčního barvení buněčné kultury. Všechny mikrofotografie, pořízené fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81, lze vidět na **Obrázku 12 – 15**. Buněčná linie H9C2 na površích byla nabarvena fluorescenčními barvivy ActinGreen™ 488 a Hoechst 33258 s cílem zvýraznit a zlepšit

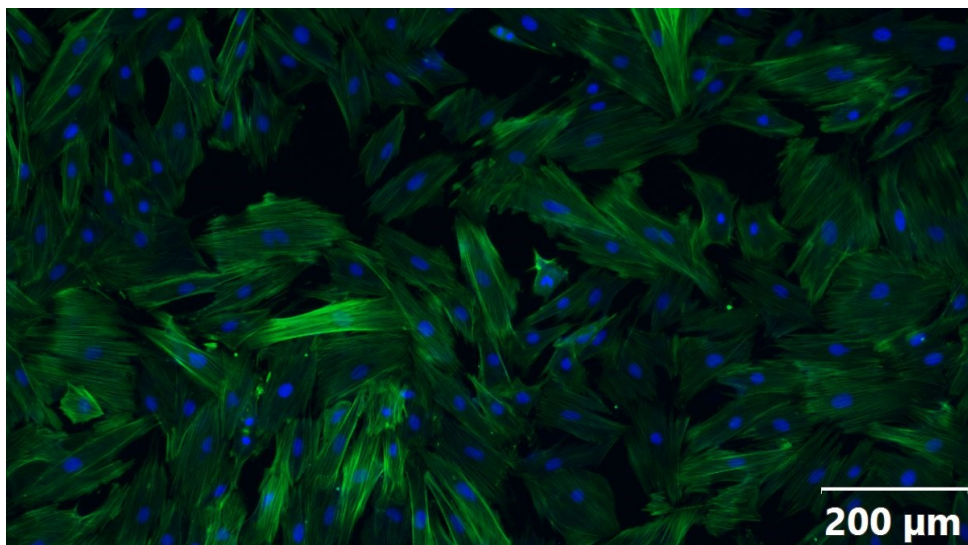
vizualizaci buněčné morfolgie a proliferace. Barvivo ActinGreen™ 488 je vhodné pro zobrazení struktury a funkce cytoskeletu, zatímco Hoechst 33258 slouží jako kontrastní barvivo pro zvýraznění nukleových kyselin.

Na **Obrázku 12** jsou myší myoblasty kultivované klasicky na dvourozměrném povrchu Petriho misky bez modifikovaného povrchu. Z hlediska morfolgie jsou buňky H9C2 na referenčním vzorku malé, místo až oválné, s jedním jádrem uprostřed.

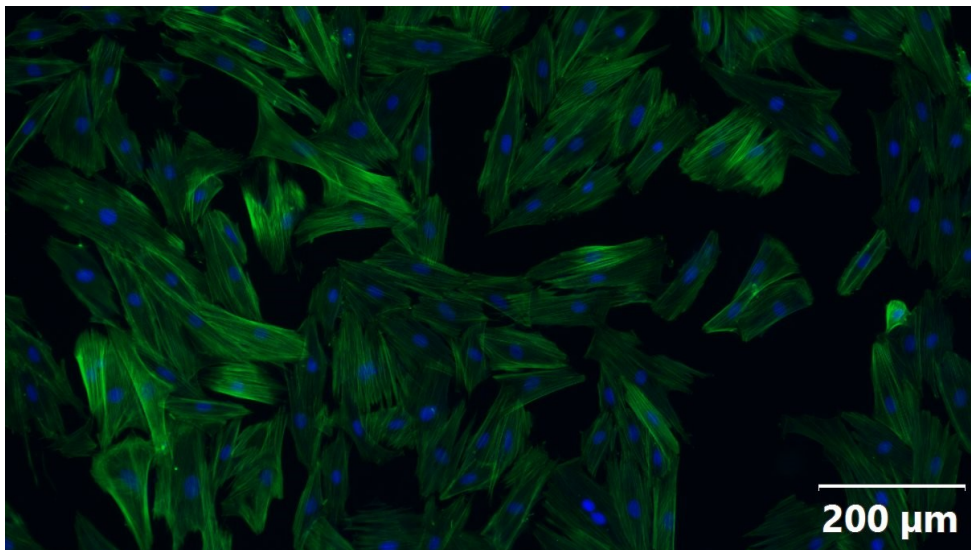


Obrázek 12: Proliferace – reference

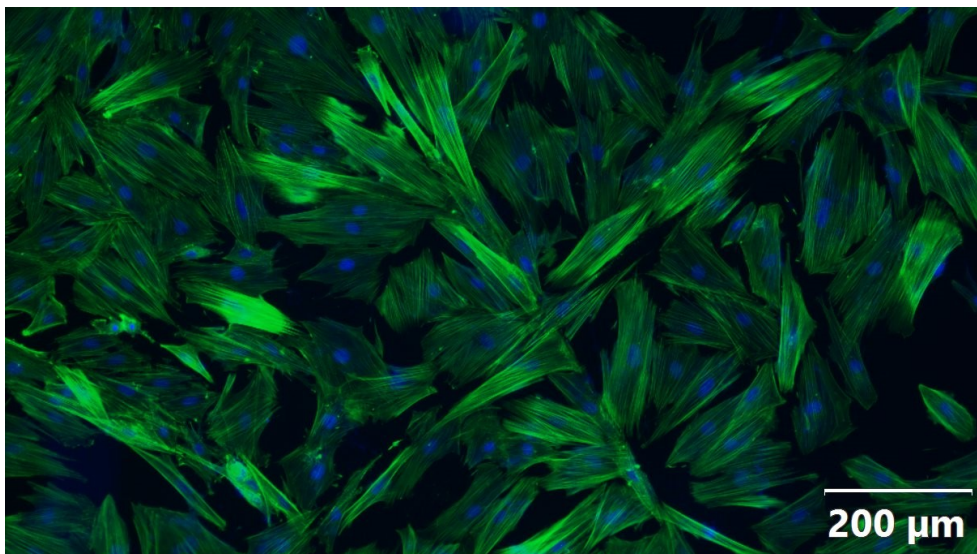
Oproti tomu na buněčné monovrstvě myších myoblastů na zbylých systémech povrchových úprav (**Obrázek 13–15**) mají buňky podlouhlý, větvenovitý tvar často s jedním jádrem.



Obrázek 13: Proliferace – kolagen



Obrázek 14: Proliferace – želatina



Obrázek 15: Proliferace – CAM sheet

Obecně by se tedy dalo konstatovat, že rozdíl v morfologii můžeme pozorovat pouze u buněk na vzorku s referencí. U vzorku povrchové úpravy kolagenu, želatiny a CAM sheetu nebyly pozorovány výrazné rozdíly v morfologii, ale kultivace H9C2 buněk na vzorku CAM sheetu vykazovaly vzájemnou provázanost. Provázaností buněk a tvarem jader buněk (modrá barva), které jsou obklopeny výrazně vymezeným cytoskeletem (fluorescenčně zvýrazněn zeleně), se prokázalo, že buňky linie H9C2 kultivované na CAM sheetu vykazují příznivé prostředí pro vzájemnou interakci buněk.

6 DISKUZE

Cílem této práce bylo za použití buněčné linie HDF vytvořit CAM sheet (neboli samosestavenou ECM) a dokázat, že je tento biomateriál vhodným scaffoldem pro růst jiné buněčné linie.

ECM se dá považovat za složitou podpurnou síť, která hraje v buňkách velmi důležitou roli – má totiž vliv na jejich nejdůležitější chování a vlastnosti, jako je buněčná migrace, diferenciace, proliferace, adheze nebo apoptóza. Podílí se na mechanických vlastnostech tkání, na hojení ran a ovlivňuje buněčnou aktivitu a reakce probíhající v buňce. Právě díky biochemické aktivitě ECM dokážou buňky komunikovat s jejich extracelulárním prostředím pomocí přenášení chemických signálů. Naopak na zprostředkování fyzikálních signálů se podílí fyzikální vlastnosti ECM, mezi které patří její tuhost, hustota či pórovitost. (Yue, 2014; Kular *et al.*, 2014) Složení ECM je různorodé, největší roli zde však hrají makromolekuly, jako jsou například proteiny či sacharidy. Hlavní molekulou obsaženou v ECM je kolagen, jehož zastoupení se v ECM pohybuje okolo 50 – 90 %. Kolagen je produkován primárně fibroblasty a hraje roli při adhezi či migraci buněk. Díky svému strukturnímu uspořádání ve formě fibril je zodpovědný za mechanickou pevnost a odolnost v tahu u pojivových tkání. (Kular *et al.*, 2014; Diller and Tabor, 2022; Soroushanova *et al.*, 2019)

K vytvoření CAM sheetu byla použita již zmíněná buněčná linie HDF, která byla pro tuto práci vybrána na základě jejich schopnosti produkovat proteiny ECM. HDF buňky jsou důležité při obnově a regeneraci tkání a jejich použití je navíc poměrně snadná záležitost. (Mesdom *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2019; Kiesel and Klar, 2019)

Samotné přípravě CAM sheetu předcházelo sestavení růstové křivky, jejíž teoretický průběh a fáze jsou již popsány v kapitole 4.4.1. Lze konstatovat, že HDF buňky setrvaly v klidové fázi cca 72 hodin, přičemž průměrná doba trvání této fáze bývá 48 hodin. Od třetího dne buňky vstoupily do fáze exponenciálního růstu. Ke zdvojení počtu buněk došlo za 50,81 hodin. Dle Grafu 1 lze vidět, že stacionární fáze ani apoptóza neproběhly, což mohlo být způsobeno krátkou dobou kultivace. Celkový průběh růstové křivky však dle literatury použité v kapitole 4.4.1 koreluje s teorií buněčného růstu, z čehož plyne, že buněčná suspenze byla správně připravena pro dlouhodobou kultivaci CAM sheetu.

Celkový průběh produkce CAM sheetu trval 8 týdnů. K médiu s HDF buňkami byl přidán askorbát sodný, který zapříčiňuje stimulaci tvorby kolagenu. Nejčastěji se k médiu přidává v koncentraci 0,5 mM, což byla koncentrace použitá i v této práci. (Torres *et al.*, 2021)

Za tuto dobu se na spodní části kultivačních lahví vytvořila tenka poloprůhledná fólie/blána, jejíž vzhled se shodoval s popisem jiných studií zabývajících se tímto tématem (příkladem je studie, kterou publikovali Torres *et al.* v roce 2021).

V současné době se CAM sheet využívá primárně jako biomateriál potřebný pro výrobu implantabilních cévních štěpů. Funguje také dobře jako scaffold, který podporuje vývoj buněk a obnovu tkání – je však nutné, aby byl decelularizovaný. (Potart *et al.*, 2023; Chaudhari *et al.*, 2016) Takové scaffoldy, tzn. scaffoldy vytvořené na bázi nativní ECM, jsou obvykle svou strukturou i složením mnohem přívětivější než jiné umělé scaffoldové materiály, jako jsou hydrogely nebo 3D podklady vytvořené biotiskem. Právě přítomností nativních strukturních proteinů a dalších makromolekul může CAM sheet jako scaffold lépe obnovit vzájemné působení buněk a ECM, čímž poskytne buňkám vysoce biomimetické mikroprostředí. Navíc dlouhodobou kultivaci lidských dermálních fibroblastů lze kontrolovat v *in vitro* podmínkách a udržovat je téměř v bezpatogenním stavu. V závěru takové dlouhodobé kultivace je tedy výsledný CAM sheet uspořádán do podoby podpůrného systému v podobě nanovlákněného listu, který obsahuje hlavní strukturální proteiny ECM a další makromolekuly včetně kolagenů, fibronektinu, lamininu a elastinu. (Xing *et al.*, 2015) Výsledky se téměř shodují s informacemi v publikacích, kdy se dlouhodobou kultivací lidských dermálních fibroblastů za řízených podmínek podařilo získat neporušenou ECM se zachovaným složením a architekturou původní buněčné linie. ECM kultivována *in vitro* tedy potenciálně vede k vytvoření struktur podobných tkáni se zvýšenými buněčně-instrukčními vlastnostmi.

ZÁVĚR

Kolagen je významný heterogenní protein, který je v současné době ve velké míře využíván jako biomateriál, a to především díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a mechanickým vlastnostem. Je nejhojnější složkou extracelulární matrix savců a najdeme jej ve většině tkání. S kolagenem a extracelulární matrix úzce souvisí ECM odvozená z buněk, tzv. CAM. Některé buňky, například lidské dermální fibroblasty, jsou schopny CAM produkovat a vytvářet tak CAM sheet.

V této práci byla zmíněná buněčná linie HDF použita k úspěšnému vytvoření CAM sheetu, jehož výsledný vzhled se shodoval s popisem jiných odborných studií zabývajících se tímto tématem. CAM sheet byl následně devitalizován, decelularizován a otestován, zda by byl vhodným scaffoldem pro růst jiné buněčné linie. Proliferační test byl proveden nasazením buněčné linie H9C2 na povrch CAM sheetu, přičemž schopnost proliferace těchto buněk byla vyhodnocena fluorescenčním barvením a pozorována fluorescenčním mikroskopem. Ve výsledku lze říci, že kultivace buněčné linie H9C2 byla úspěšná. Experiment tedy ukázal, že mechanické vlastnosti a biokompatibilita CAM sheetu jakožto vhodného prostředí pro adhezi a proliferaci buněk podtrhují jeho potenciál jako scaffold v oblasti tkáňového inženýrství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMIAK, Katarzyna a SIONKOWSKA, Alina. Current methods of collagen cross-linking: Review. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, roč. 161, s. 550-560. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075>. [cit. 2024-02-26].

ASSANGA, Iloki. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. Online. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 2013, roč. 4, č. 4, s. 60-70. ISSN 2141-2154. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/IJBMBR2013.0154>. [cit. 2023-11-21].

ASSUNÇÃO, Marisa; DEGHAN-BANIANI, Dorsa; YIU, Chi Him Kendrick; SPÄTER, Thomas; BEYER, Sebastian et al. Cell-Derived Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, roč. 8. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602009>. [cit. 2024-04-29].

BANDZEREWICZ, Aleksandra a GADOMSKA-GAJADHUR, Agnieszka. Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. Online. *Cells*. 2022, roč. 11, č. 5. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells11050914>. [cit. 2024-05-07].

BECKER, W. Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. Online. *Journal of Microscopy*. 2012, roč. 247, č. 2, s. 119-136. ISSN 0022-2720. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x>. [cit. 2024-03-09].

BOSMAN, Fred T a STAMENKOVIC, Ivan. Functional structure and composition of the extracellular matrix. Online. *The Journal of Pathology*. 2003, roč. 200, č. 4, s. 423-428. ISSN 0022-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/path.1437>. [cit. 2024-04-29].

BOYCE, Steven T.; CHRISTIANSON, Deborah J. a HANSBROUGH, John F. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. Online. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1988, roč. 22, č. 10, s. 939-957. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.820221008>. [cit. 2024-03-25].

BRASS, Lawrence F. a BENSUSAN, Howard B. The Role of Collagen Quaternary Structure in the Platelet: Collagen Interaction. Online. *Journal of Clinical Investigation*. 1974, roč. 54, č. 6, s. 1480-1487. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI107896> [cit. 2023-10-31].

BRODSKY, Barbara a PERSIKOV, Anton V. Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. Online. In: *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers. Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, 2005, s. 301-339. ISBN 9780120342709. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7). [cit. 2024-03-18].

BURJANADZE, Thengiz V. a VEIS, Arthur. A Thermodynamic Analysis of the Contribution of Hydroxyproline to the Structural Stability of the Collagen Triple Helix.

Online. *Connective Tissue Research*. 2009, roč. 36, č. 4, s. 347-365. ISSN 0300-8207. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/03008209709160233>. [cit. 2024-03-18].

CEN, Lian; LIU, Wei; CUI, Lei; ZHANG, Wenjie a CAO, Yilin. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. Online. *Pediatric Research*. 2008, roč. 63, č. 5, s. 492-496. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3>. [cit. 2024-05-14].

Collagen Uses, © 2019. Online. News-Medical. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/Collagen-Uses.aspx>. [cit. 2024-04-26].

DILLER, Robert B. a TABOR, Aaron J. The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. Online. *Biomimetics*. 2022, roč. 7, č. 3. ISSN 2313-7673. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087>. [cit. 2024-03-30].

DZOBO, Kevin; THOMFORD, Nicholas Ekow; SENTHEBANE, Dimakatso Alice; SHIPANGA, Hendrina; ROWE, Arielle et al. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. Online. *Stem Cells International*. 2018, roč. 2018, s. 1-24. ISSN 1687-966X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>. [cit. 2024-04-27].

EL MASRY, Mohamed S.; CHAFFEE, Scott; DAS GHATAK, Piya; MATHEW-STEINER, Shomita S.; DAS, Amitava et al. Stabilized collagen matrix dressing improves wound macrophage function and epithelialization. Online. *The FASEB Journal*. 2018, roč. 33, č. 2, s. 2144-2155. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1096/fj.201800352R>. [cit. 2024-04-25].

ELTOM, Abdalla; ZHONG, Gaoyan a MUHAMMAD, Ameen. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. Online. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2019, roč. 2019, s. 1-13. ISSN 1687-8434. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>. [cit. 2024-05-14].

ENGEL, Jürgen a BÄCHINGER, Hans Peter. Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. Online. In: BRINCKMANN, Jürgen; NOTBOHM, Holger a MÜLLER, P. K. (ed.). *Collagen. Topics in Current Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005, s. 7-33. ISBN 978-3-540-23272-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/b103818>. [cit. 2024-05-14].

ETHERINGTON, D. J. Collagen degradation. Online. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1977, roč. 36, č. Supplement 2, s. 14-17. ISSN 0003-4967. Dostupné z: https://doi.org/10.1136/ard.36.Suppl_2.14. [cit. 2024-02-21].

FERREIRA, Ana Marina; GENTILE, Piergiorgio; CHIONO, Valeria a CIARDELLI, Gianluca. Collagen for bone tissue regeneration. Online. *Acta Biomaterialia*. 2012, roč. 8, č. 9, s. 3191-3200. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>. [cit. 2024-03-26].

FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M. a WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix at a glance. Online. *Journal of Cell Science*. 2010, roč. 123, č. 24, s. 4195-4200. ISSN 1477-9137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>. [cit. 2024-04-27].

FRIESS, Wolfgang. Collagen – biomaterial for drug Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998, roč. 45, č. 2, s. 113-136. ISSN 09396411. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00017-4). [cit. 2024-05-15].

GELSE, K.; PÖSCHL, E. a AIGNER, T. Collagens – structure, function, and biosynthesis. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, roč. 55, č. 12, s. 1531-1546. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>. [cit. 2024-03-17].

Growth curve, © 2019. Online. Encyclopedia Britannica. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/growth-curve>. [cit. 2024-03-17].

HANAI, Koji; KOJIMA, Takashi; OTA, Mika; ONODERA, Jun a SAWADA, Norimasa. Effects of Atelocollagen Formulation Containing Oligonucleotide on Endothelial Permeability. Online. *Journal of Drug Delivery*. 2012, roč. 2012, s. 1-9. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/245835>. [cit. 2023-10-31].

HULMES, David J. S. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. Online. *Journal of Structural Biology*. 2002, roč. 137, č. 1-2, s. 2-10. ISSN 10478477. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4450>. [cit. 2024-03-18].

CHANG CHIEN, George C. a STOGICZA, Agnes. Regenerative Medicine. Online. In: *Pain Care Essentials and Innovations*. Elsevier, 2021, s. 245-253. ISBN 9780323722162. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-72216-2.00017-X>. [cit. 2024-04-27].

CHAUDHARI, Atul; VIG, Komal; BAGANIZI, Dieudonné; SAHU, Rajnish; DIXIT, Saurabh et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, roč. 17, č. 12. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>. [cit. 2024-03-31].

KAVITHA, O. a THAMPAN, Raghava Varman. Factors influencing collagen biosynthesis. Online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008, roč. 104, č. 4, s. 1150-1160. ISSN 0730-2312. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcb.21728>. [cit. 2023-10-31].

KESSLER, Efrat; TAKAHARA, Kazuhiko; BINIAMINOV, Luba; BRUSEL, Marina a GREENSPAN, Daniel S. Bone Morphogenetic Protein-1: The Type I Procollagen C-Proteinase. Online. *Science*. 1996, roč. 271, č. 5247, s. 360-362. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.360>. [cit. 2024-03-18].

KHAN, Ruby a KHAN, MohdHaroon. Use of collagen as a biomaterial: An update. Online. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013, roč. 17, č. 4. ISSN 0972-124X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0972-124X.118333>. [cit. 2024-04-25].

KISIEL, Marta A. a KLAR, Agnes S. Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts. Online. In: BÖTTCHER-HABERZETH, Sophie a BIEDERMANN, Thomas (ed.). *Skin Tissue Engineering*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019, s. 71-78. ISBN 978-1-4939-9472-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_6. [cit. 2024-03-30].

KOČÁREK, Eduard; PÁNEK, Martin a NOVOTNÁ, Drahuše. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2. upravené vyd. *Učební texty Univerzity Karlovy v Praze*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.

KOIDE, Takaki a NAGATA, Kazuhiro. Collagen Biosynthesis. Online. In: BRINCKMANN, Jürgen; NOTBOHM, Holger a MÜLLER, P. K. (ed.). *Collagen*. Topics in Current Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005, s. 85-114. ISBN 978-3-540-23272-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/b103820>. [cit. 2024-03-18].

Kolagen a jeho účinky, © 2022. Online. BrainMarket.cz. Dostupné z: <https://www.brainmarket.cz/nase-novinky/kolagen-a-jeho-ucinky/> [cit. 2024-03-17].

KULAR, Jaspreet K; BASU, Shouvik a SHARMA, Ram I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. Online. *Journal of Tissue Engineering*. 2014, roč. 5. ISSN 2041-7314. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>. [cit. 2024-03-30].

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson; ROBBINS, Stanley L.; COTRAN, Ramzi S. et al. *Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease (7th ed.)*. Filadelfie: Elsevier. 2005. ISBN 978-0-7216-0187-8. [cit. 2024-04-26].

LAURENT, G. J. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. Online. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1987, roč. 252, č. 1, s. C1-C9. ISSN 0363-6143. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.252.1.C1>. [cit. 2024-02-21].

LEE, Chi H.; SINGLA, Anuj a LEE, Yugyung. Biomedical applications of collagen. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, roč. 221, č. 1-2, s. 1-22. ISSN 03785173. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3). [cit. 2024-03-25].

LLOYD, D. Jordan; MARRIOTT, R. H. a PLEASS, W. B. The swelling of protein fibres. Part I. The swelling of collagen. Online. *Transactions of the Faraday Society*. 1933, roč. 29, č. 140. ISSN 0014-7672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/tf9332900554>. [cit. 2024-03-18].

MAEDA, Miho; TANI, Shunsuke; SANO, Akihiko a FUJIOKA, Keiji. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. Online. *Journal of Controlled Release*. 1999, roč. 62, č. 3, s. 313-324. ISSN 01683659. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00156-X). [cit. 2024-03-25].

MAGNAN, Laure; LABRUNIE, Gaëlle; FÉNELON, Mathilde; DUSSERRE, Nathalie; FOULC, Marie-Pierre et al. Human textiles: A cell-synthesized yarn as a truly “bio” material for tissue engineering applications. Online. *Acta Biomaterialia*. 2020, roč. 105, s. 111-120. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.037>. [cit. 2024-05-15].

MAO, Hui; CHEN, Chen; LIAO, Xuepin a SHI, Bi. Catalytic hydrogenation of quinoline over recyclable palladium nanoparticles supported on tannin grafted collagen fibers. Online. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2011, roč. 341, č. 1-2, s. 51-56. ISSN 13811169. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.03.023>. [cit. 2024-03-20].

MESDOM, Pierre; COLLE, Romain; LEBIGOT, Elise; TRABADO, Séverine; DEFLESSELLE, Eric et al. Human Dermal Fibroblast: A Promising Cellular Model to Study Biological Mechanisms of Major Depression and Antidepressant Drug Response. Online. *Current Neuropharmacology*. 2020, roč. 18, č. 4, s. 301-318. ISSN 1570159X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1570159X17666191021141057>. [cit. 2024-03-30].

MEYER, Michael. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. Online. *BioMedical Engineering OnLine*. 2019, roč. 18, č. 1. ISSN 1475-925X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>. [cit. 2024-03-18].

MINABE, Masato; UEMATSU, Atsuo; NISHIJIMA, Kayo; TOMOMATSU, Eiko; TAMURA, Toshiyuki et al. Application of a Local Drug Delivery System to Periodontal Therapy. Online. *Journal of Periodontology*. 1989, roč. 60, č. 2, s. 113-117. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.2.113>. [cit. 2024-04-26].

MLÁDEK, Milan. *Zpracování odpadu kožedělného průmyslu*. Praha: SNTL, 1971.

MOHD HILMI, A. B.; HASSAN, Asma a HALIM, Ahmad Sukari. A Bilayer Engineered Skin Substitute for Wound Repair in an Irradiation-Impeded Healing Model on Rat. Online. *Advances in Wound Care*. 2015, roč. 4, č. 5, s. 312-320. ISSN 2162-1918. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0551>. [cit. 2024-03-25].

MUTHUKUMAR, T.; SREEKUMAR, G.; SASTRY, T. P. a CHAMUNDEESWARI, M. Collagen as a Potential Biomaterial in Biomedical Applications. Online. *REVIEWS ON ADVANCED MATERIALS SCIENCE*. 2018, roč. 53, č. 1, s. 29-39. ISSN 1605-8127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/rams-2018-0002>. [cit. 2024-04-04].

NEISHABOURI, Afarin; SOLTANI KHABOUSHAN, Alireza; DAGHIGH, Faezeh; KAJBAFZADEH, Abdol-Mohammad a MAJIDI ZOLBIN, Masoumeh. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, roč. 10. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>. [cit. 2024-03-06].

NIMNI, M. E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M. a SHEIKH, K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. Online. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1987, roč. 21, č. 6, s. 741-771. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.820210606>. [cit. 2024-02-26].

OLIVEIRA, H; MÉDINA, C; LABRUNIE, G; DUSSERRE, N; CATROS, S et al. Cell-assembled extracellular matrix (CAM): a human biopaper for the biofabrication of pre-vascularized tissues able to connect to the host circulation in vivo. Online. *Biofabrication*. 2021, roč. 14, č. 1. ISSN 1758-5082. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac2f81>. [cit. 2024-05-09]

OLSEN, Bjorn Reino. Collagen Biosynthesis. Online. In: HAY, Elizabeth D. (ed.). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Boston, MA: Springer US, 1981, s. 139-177. ISBN 978-1-4612-8226-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0881-2_7. [cit. 2024-02-26].

OTTANI, V; RASPANTI, M a RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. Online. *Micron*. 2001, roč. 32, č. 3, s. 251-260. ISSN 09684328. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00042-1). [cit. 2023-12-10].

OWCZARZY, Aleksandra; KURASIŃSKI, Robert; KULIG, Karolina; ROGÓŻ, Wojciech; SZKUDLAREK, Agnieszka a MACIĄŻEK-JURCZYK, Małgorzata. Collagen - structure, properties and application. Online. *Engineering of Biomaterials*. 2020, č. 156, s. 17-23. ISSN 1429-7248. Dostupné z: <https://doi.org/10.34821/eng.biomat.156.2020.17-23> [cit. 2023-10-31].

PARENTEAU-BAREIL, Rémi; GAUVIN, Robert a BERTHOD, François. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. Online. *Materials*. 2010, roč. 3, č. 3, s. 1863-1887. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma3031863>. [cit. 2024-04-25].

PATINO, M. G.; NEIDERS, M. E.; ANDREANA S.; NOBLE, B. et al. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. Online. *The Journal of oral implantology*, vol. 28, issue 5, 2002, s. 220-225. Dostupné z: [https://doi.org/10.1563/1548-1336\(2002\)028<0220:CAAIMI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1563/1548-1336(2002)028<0220:CAAIMI>2.3.CO;2) [cit. 2024-03-25].

XU, Peiyao; KANKALA, Ranjith Kumar; WANG, Shibin a CHEN, Aizheng. Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Online. *Regenerative Biomaterials*. 2024, roč. 11. ISSN 2056-3426. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/rb/rbad107>. [cit. 2024-05-09]

PETERKOVÁ, Petra a LAPČÍK (Jr.), Lubomír, 2000. Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace. Online. In: *Chemické listy*. roč. 94, č. 6, s. 371-379. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2501> [cit. 2023-10-31].

PODOS, Steven M.; BECKER, Bernard; ASSEFF, Carl a HARTSTEIN, Jack. Pilocarpine Therapy with Soft Contact Lenses. Online. *American Journal of Ophthalmology*. 1972, roč. 73, č. 3, s. 336-341. ISSN 00029394. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(72\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0002-9394(72)90062-1). [cit. 2024-04-26].

POTART, Diane; GLUAIS, Maude; GAUBERT, Alexandra; DA SILVA, Nicolas; HOURQUES, Marie et al. The cell-assembled extracellular matrix: A focus on the storage stability and terminal sterilization of this human “bio” material. Online. *Acta Biomaterialia*. 2023, roč. 166, s. 133-146. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.05.002>. [cit. 2024-02-08].

PRIVALOV, P.L. Stability of Proteins. Online. In: *Advances in Protein Chemistry Volume 35*. Advances in Protein Chemistry. Elsevier, 1982, s. 1-104. ISBN 9780120342358. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60468-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60468-4). [cit. 2024-03-18].

RAGHUNATH, Michael; BRUCKNER, Peter a STEINMANN, Beat. Delayed Triple Helix Formation of Mutant Collagen from Patient with Osteogenesis Imperfecta. Online. *Journal of Molecular Biology*. 1994, roč. 236, č. 3, s. 940-949. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1199>. [cit. 2024-03-18].

RAMACHANDRAN, G. N. *Treatise of Collagen*, sv. I *Chemistry of Collagen*. New York: Academic Press, 1967.

RAMSHAW, John A. M. Biomedical applications of collagens. Online. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2016, roč. 104, č. 4, s. 665-675. ISSN 1552-4973. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33541>. [cit. 2024-03-26].

RUOZI, Barbara; TOSI, Giovanni; LEO, Eliana; PARMA, Bruna; VISMARA, Susanna et al. Intact collagen and atelocollagen sponges: Characterization and ESEM observation. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2007, roč. 27, č. 4, s. 802-810. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.08.018>. [cit. 2023-11-13].

RÝGLOVÁ, Šárka; BRAUN, Martin a SUCHÝ, Tomáš. Collagen and Its Modifications-Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. Online. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2017, roč. 302, č. 6. ISSN 14387492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mame.201600460>. [cit. 2024-02-26].

SATO, Yasushi; MERA, Hisashi; TAKAHASHI, Daisuke; MAJIMA, Tokifumi; IWASAKI, Norimasa et al. Synergistic effect of ascorbic acid and collagen addition on the increase in type 2 collagen accumulation in cartilage-like MSC sheet. Online. *Cytotechnology*. 2017, roč. 69, č. 3, s. 405-416. ISSN 0920-9069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9924-3>. [cit. 2024-03-06].

SELA, J.; KAUFMAN, D.; SHOSHAN, S. a SHANI, J. Retinoic acid enhances the effect of collagen on bone union, following induced non-union defect in guinea pig ulna. Online. *Inflammation Research*. 2000, roč. 49, č. 12, s. 679-683. ISSN 1023-3830. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s000110050646>. [cit. 2024-03-26].

SHIM, G.; KIM, M-G.; PARK, J. Y. a OH, Y-K. Small interfering RNAs (siRNAs) as cancer therapeutics. Online. In: *Biomaterials for Cancer Therapeutics*. Elsevier, 2013, s. 237-269. ISBN 9780857096647. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857096760.3.237> [cit. 2023-10-31].

SHOULDERS, Matthew D. a RAINES, Ronald T. Collagen Structure and Stability. Online. *Annual Review of Biochemistry*. 2009, roč. 78, č. 1, s. 929-958. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>. [cit. 2023-10-31].

SCHMITT, A.; CSIKI, R.; TRON, A.; SALDAMLI, B.; TÜBEL, J. et al. Optimized protocol for whole organ decellularization. Online. *European Journal of Medical Research*. 2017, roč. 22, č. 1. ISSN 2047-783X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0272-y>. [cit. 2024-03-06].

SILVER, Frederick H.; FREEMAN, Joseph W. a SEEHRA, Gurinder P. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. Online. *Journal of*

Biomechanics. 2003, roč. 36, č. 10, s. 1529-1553. ISSN 00219290. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00135-0). [cit. 2023-10-31].

SIONKOWSKA, Alina; ADAMIAK, Katarzyna; MUSIAŁ, Katarzyna a GADOMSKA, Magdalena. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. Online. *Materials*. 2020, roč. 13, č. 19. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma13194217>. [cit. 2024-04-25].

SORUSHANOVA, Anna; DELGADO, Luis M.; WU, Zhuning; SHOLOGU, Naledi; KSHIRSAGAR, Aniket et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. Online. *Advanced Materials*. 2019, roč. 31, č. 1. ISSN 0935-9648. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>. [cit. 2023-12-08].

TELIS, V.; WOLF, K. a SOBRAL, P. Characterizations of Collagen Fibers for Biodegradable Films Production. Online. In: *13th World Congress of Food Science & Technology*. Les Ulis, France: EDP Sciences, 2006, -. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/IUFoST:20060929>. [cit. 2023-10-31].

THEOCHARIS, Achilleas D.; SKANDALIS, Spyros S.; GIALELI, Chrysostomi a KARAMANOS, Nikos K. Extracellular matrix structure. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, roč. 97, s. 4-27. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>. [cit. 2024-04-29].

Tissue engineering and regenerative medicine, © 2013. Online. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Dostupné z: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>. [cit. 2024-04-27].

VATE, Naveen Kumar; STRACHOWSKI, Przemyslaw; UNDELAND, Ingrid a ABDOLLAHI, Mehdi. Structural and functional properties of collagen isolated from lumpfish and starfish using isoelectric precipitation vs salting out. Online. *Food Chemistry: X*. 2023, roč. 18. ISSN 25901575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100646>. [cit. 2023-11-13].

VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana a FRESHNEY, R. Ian (ed.). *Culture of Cells for Tissue Engineering*. Online. Hoboken: Wiley, 2005. ISBN 9780471629351. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471741817>. [cit. 2023-11-20].

WOODHEAD-GALLOWAY, J. *Collagen, the Anatomy of a Protein*. Institute of Biology's studies in biology – vydání 117. London: E. Arnold, 1980. ISBN: 071312783X. [cit. 2023-10-31].

WRIGHT, N. T. a HUMPHREY, J. D. Denaturation of Collagen Via Heating: An Irreversible Rate Process. Online. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2002, roč. 4, č. 1, s. 109-128. ISSN 1523-9829. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.101001.131546>. [cit. 2023-10-31].

XING, Qi; YATES, Keegan; TAHTINEN, Mitchell; SHEARIER, Emily; QIAN, Zichen et al. Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation. Online. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2015, roč. 21, č. 1, s. 77-87. ISSN 1937-3384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0666>. [cit. 2024-04-09].

YANNAS, Ioannis V. Biologically Active Analogues of the Extracellular Matrix: Artificial Skin and Nerves. Online. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1990, roč. 29, č. 1, s. 20-35. ISSN 0570-0833. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.199000201>. [cit. 2024-04-25].

YI, Sheng; DING, Fei; GONG, Leiei a GU, Xiaosong. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Online. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2017, roč. 12, č. 3, s. 233-246. ISSN 1574888X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1574888X11666160905092513>. [cit. 2024-05-02].

YU, Xiaoyue; TANG, Cuie; XIONG, Shanbai; YUAN, Qijuan; GU, Zhipeng et al. Modification of Collagen for Biomedical Applications: A Review of Physical and Chemical Methods. Online. *Current Organic Chemistry*. 2016, roč. 20, č. 17, s. 1797-1812. ISSN 13852728. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1385272820666151102213025>. [cit. 2024-02-26].

YUE, Beatrice. Biology of the Extracellular Matrix. Online. *Journal of Glaucoma*. 2014, roč. 23, s. S20-S23. ISSN 1057-0829. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108>. [cit. 2024-03-30].

ŽBIKOWSKA, H. M., and CZUBAK, K. A. Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*. 2014, roč. 68, č. 4.

ZHANG, Xiaoxia; XU, Songcheng; SHEN, Lirui a LI, Guoying. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. Online. *Journal of Leather Science and Engineering*. 2020, roč. 2, č. 1. ISSN 2524-7859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s42825-020-00033-0>. [cit. 2023-12-10].

ZHANG, Zhong-jie; LI, Guoying a SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. Online. *Journal of The Society of Leather Technologists and Chemists*. 2006, roč. 90, č. 1, s. 23-28. ISSN: 0144-0322. [cit. 2023-11-13].

ZHAO, Chenxi; XIAO, Yuelong; LING, Shengjie; PEI, Ying a REN, Jing. Structure of Collagen. Online. In: LING, Shengjie (ed.). *Fibrous Proteins. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2021, s. 17-25. ISBN 978-1-0716-1573-7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1574-4_2. [cit. 2023-10-31].

ZUO, Yanhai; WEI, Jianjun a CHEN, Hui. Utilizing Human Dermal Fibroblast Heterogeneity in Autologous Dermal Fibroblast Therapy: An Overcomplicated Strategy or a Promising Approach? Online. *The Anatomical Record*. 2019, roč. 302, č. 12, s. 2126-2131. ISSN 1932-8486. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ar.24232>. [cit. 2024-03-30].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
CAM	Cell-assembled extracellular matrix
DT	Doubling time
ECM	Extracelulární matrix
ER	Endoplazmatické retikulum
FBS	Fetální bovinní sérum
GA	Glutaraldehyd
Gly	Glycin
GP	Genipin
GTR	Řízená tkáňová regenerace
HDF	Lidské dermální fibroblasty
Hsp	Homology proteinu tepelného šoku
Hyl	Hydroxylysin
Hyp	Hydroxyprolin
Lys	Lysin
P4-H	Prolyl-4-hydroxyláza
PDI	Protein disulfidové izomerázy
Pro	Prolin
SDS	Dodecylsírán sodný
T _d	Teplota denaturace
T _s	Teplota smrštění
UPW	Ultračistá voda
TEWL	Transepidermální ztráta vody
DDS	Systém cíleného podávání léků
TERM	Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína

GF Růstový faktor

MMP Matrixové metaloproteinázy

BM Bazální membrána

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Struktura kolagenu (převzato z Kolagen a jeho účinky, © 2022)</i>	12
<i>Obrázek 2: Biosyntéza kolagenu (upraveno podle Gelse et al., 2003)</i>	15
<i>Obrázek 3: Mechanismus polymerizace genipinu (upraveno podle Yu et al., 2016)</i>	24
<i>Obrázek 4: Struktura ECM (upraveno podle Bandzerewicz and Gadomska-Gajadur, 2022)</i>	32
<i>Obrázek 5: Buněčná linie HDF (zvětšení Z: 100×)</i>	37
<i>Obrázek 6: Postup produkce CAM in vitro</i>	43
<i>Obrázek 7: CAM sheet na Petriho misce</i>	48
<i>Obrázek 8: Produkce CAM in vitro (Z: 100×)</i>	49
<i>Obrázek 9: Devitalizovaný CAM sheet (Z: 100×)</i>	50
<i>Obrázek 10: Decelularizovaný CAM sheet (Z: 100×)</i>	50
<i>Obrázek 11: Buněčná linie H9C2 (Z: 100×)</i>	51
<i>Obrázek 12: Proliferace – reference</i>	52
<i>Obrázek 13: Proliferace – kolagen</i>	52
<i>Obrázek 14: Proliferace – želatina</i>	53
<i>Obrázek 15: Proliferace – CAM sheet</i>	53

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Typy a výskyt fibrilárních kolagenů (převzato od Owczarzy et al., 2020)</i>	16
<i>Tabulka 2: Typy a výskyt nefibrilárních kolagenů (převzato od Owczarzy et al., 2020)</i>	17
<i>Tabulka 3: Složení ECM (upraveno podle Kular et al., 2014 a Diller and Tabor, 2022)...</i>	31
<i>Tabulka 4: Aplikace ECM (upraveno podle Yi et al., 2017).....</i>	35
<i>Tabulka 5: Typy povrchových úprav</i>	46
<i>Tabulka 6: Koncentrace buněk v jednotlivých dnech experimentu</i>	47