

Využití elektricky vodivých materiálů v tkáňovém inženýrství

Mária Jurášová

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Mária Jurášová**
Osobní číslo: **T22093**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Využití elektricky vodivých materiálů v tkáňovém inženýrství**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Zpracujte literární přehled zaměřený na elektricky vodivé materiály a jejich vlastnosti v kontextu biomedicínských aplikací.

Zaměřte se na různé typy elektricky vodivých materiálů, nejen na vodivé polymery (např. kovy, uhlíkové nanostruktury).
Porovnejte elektricky vodivé materiály s nevodivými materiály v kontextu tkáňového inženýrství.

Praktická část:

Seznamte se s prací v biologických laboratořích.

Testujte biologické vlastnosti vodivého scaffoldu obsahujícího grafit.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] BALINT R. et al. Cartmell, "Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering", Acta Biomaterialia, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.015.
- [2] BIRLA R. "Biomaterials for Tissue Engineering. In Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges", John Wiley & Sons, 2014, doi: 10.1002/9781118886410.
- [3] DAN S. a SAH M. K. "Terminalia arjuna fruit-derived graphite: a versatile biomaterial precursor for bone tissue engineering applications", Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05170-0>.
- [4] GAJENDIRA M. et. al. "Conductive biomaterials for tissue engineering applications", Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.02.031>.
- [5] JALILINEJAD N. et. al. "Electrically conductive carbon-based (bio)-nanomaterials for cardiac tissue engineering", 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/btm2.10347>.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Eliška Daďová**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- 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 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 řádně citovala; v případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....

podpis autora

ABSTRAKT

Tkáňové inženýrství využívá nové generace biomateriálů s cílem podpořit regeneraci poškozených tkání a obnovit jejich funkci. Mezi nejperspektivnější materiály v této oblasti patří elektricky vodivé biomateriály, které umožňují modulovat chování buněk pomocí elektrických stimulů. Cílem bakalářské práce bylo vyhodnotit cytokompatibilitu a podporu buněčné proliferace kompozitních scaffoldů na bázi elastomeru VistaMaxx a expandovatelného grafitu. Testované scaffoldy se lišily hmotnostním poměrem elastomer/grafit (70/30 a 60/40) a přítomností povrchové úpravy želatinou. Cytotoxicita byla stanovena pomocí MTT testu, zatímco proliferace buněk NIH/3T3 byla analyzována pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie. Výsledky ukázaly velmi dobrou cytokompatibilitu všech scaffoldů. Zjištěné poznatky podporují potenciál těchto materiálů pro regeneraci elektroaktivních tkání, jako jsou svalová, nervová a srdeční tkáň, a potvrzují jejich využitelnost v tkáňovém inženýrství.

Klíčové slova: cytokompatibilita, elektricky vodivé biomateriály, elektroaktivní tkáň, scaffoldy, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

Tissue engineering aims to restore the structure and function of damaged tissues using advanced biomaterials. Among the most promising are electrically conductive biomaterials, which can modulate cellular behavior by applying electrical stimulation. This bachelor's thesis evaluated the cytocompatibility and cell proliferation potential of composite scaffolds based on elastomer VistaMaxx and expandable graphite. The tested scaffolds differed in weight ratio (70/30 and 60/40) and surface modification with gelatin. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay, while the proliferation of NIH/3T3 fibroblasts was analyzed by confocal fluorescence microscopy. The results demonstrated excellent cytocompatibility of all scaffolds. The scaffold with a higher content of conductive filler (EG) supported proliferation even without a gelatin coating. These findings highlight the potential of such materials in the regeneration of electroactive tissues, such as muscle, nerve, and cardiac tissues, and confirm their suitability for applications in tissue engineering.

Keywords: cytocompatibility, electrically conductive biomaterials, electroactive tissues, cell proliferation, scaffolds, tissue engineering

Touto cestou by som sa rada poďakovala Ing. Kateřine Skopalovej, PhD. za jej ochotu, cenné rady a pomoc pri praktickej časti mojej bakalárskej práce. Zvláštne poďakovanie patrí Ing. Eliške Daďovej za odborné vedenie, ktoré mi poskytla počas vypracovania tejto práce. Veľmi si vážim jej čas a ochotu prevziať vedenie v náročnej fáze.

Podakovanie patrí aj mojej rodine a priateľom za neustálu podporu, trpezlivosť a povzbudenie počas štúdia.

Vyhlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej práce a elektronická verzia nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TKANIVOVÉ INŽINIERSTVO.....	13
1.2 BUNKOVÉ KULTÚRY	15
1.2.1 2D vs. 3D bunkové kultúry	15
1.2.2 Typy buniek v tkanivovom inžinierstve.....	17
2 BIOMATERIÁLY.....	20
2.1 VLASTNOSTI BIOMATERIÁLOV.....	21
2.2 SCAFFOLDY - NOSNÉ ŠTRUKTÚRY PRE REGENERÁCIU TKANÍV	22
3 BIOELEKTRICKÁ AKTIVITA V ĽUDSKOM TELE	24
3.1 ELEKTRICKÁ AKTIVITA NERVOVEJ A POHYBOVEJ SÚSTAVY.....	24
3.2 ELEKTRICKÁ AKTIVITA SRDCA	25
3.3 ELEKTRICKÁ AKTIVITA PRI PORANENÍ	27
4 ELEKTRICKY VODIVÉ BIOMATERIÁLY	28
4.1 MECHANIZMY ELEKTRICKEJ VODIVOSTI V BIOMATERIÁLOCH	28
4.1.1 Iónová vodivosť v biomateriáloch	29
4.1.2 Elektrónová vodivosť v biomateriáloch.....	30
4.2 VYBRANÉ VODIVÉ BIOMATERIÁLY	32
4.2.1 PEDOT:PSS	32
4.2.2 Extrinzicky vodivé kompozity obsahujúce grafén a CNT	33
5 APLIKÁCIE VYBRANÝCH ECBS	36
5.1 ELEKTRICKY VODIVÉ HYDROGÉLY	36
5.1.1 Regenerácia nervového tkaniva	36
5.1.2 Regenerácia srdcového tkaniva.....	36
5.1.3 Hojenie rán	37
5.2 INTRINZICKY VODIVÉ POLYMÉRY	37
5.2.1 Regenerácia periférnych nervov.....	37
5.2.2 Regenerácia srdcového tkaniva.....	38
5.3 EXTRINZICKY VODIVÉ KOMPOZITY	38
5.3.1 Regenerácia nervového tkaniva	38
5.3.2 Regenerácia kostného tkaniva.....	39
6 BUDÚCE SMEROVANIE VÝSKUMU A APLIKÁCIÍ ECBS	40
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	42
7 CIEĽ PRÁCE	43
8.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	44
8.2 POUŽITÉ PRÍSTROJE	44

8.3	KOMPOZITNÝ VODIVÝ MATERIÁL	45
8.4	PRÍPRAVA KOMPOZITNÉHO VODIVÉHO MATERIÁLU	45
8.5	CHARAKTERIZÁCIA KOMPOZITNÉHO VODIVÉHO MATERIÁLU	46
8.5.1	Skenovacia elektrónová mikroskopia.....	46
8.5.2	Dvojbodová metóda merania vodivosti.....	47
8.6	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	47
8.6.1	Bunkové línie.....	47
8.6.2	Kultivačné médium	48
8.6.3	Pestovanie bunkových kultúr	48
8.7	EXPERIMENTÁLNE METÓDY A HODNOTIACE POSTUPY	49
8.7.1	Biokompatibilita.....	49
8.7.2	Cytokompatibilita.....	50
8.7.3	Cytotoxicita – MTT test	50
8.7.4	Proliferácia buniek na vzorkách	52
9	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	54
9.1	SEM ANALÝZA.....	54
9.2	ELEKTRICKÁ VODIVOSŤ MATERIÁLU	55
9.3	CYTOTOXICITA SCAFFOLDOV – MTT TEST	56
9.4	PROLIFERACE NIH/3T3 NA SCAFFOLDECH	57
	ZÁVER.....	61
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	62
	ZOZNAM OBRÁZKOV	74
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	75

ÚVOD

Tkanivové inžinierstvo zohráva čoraz významnejšiu úlohu ako dynamická a interdisciplinárna oblasť, ktorá sa snaží preklenúť medzeru medzi klasickými biomateriálmi a aktívnou regeneráciou poškodených tkanív. Zatiaľ čo tradičné biomateriály slúžili primárne ako pasívna výplň či mechanická opora, súčasný vývoj sa orientuje na tzv. bioaktívne a elektroaktívne materiály, ktoré sú schopné ovplyvňovať bunkové procesy na molekulárnej úrovni. Tento posun je obzvlášť významný pri regenerácii tkanív, ktoré prirodzene reagujú na elektrické signály ako sú nervové, svalové a srdcové tkanivo [1].

Na rozdiel od konvenčných biomateriálov, elektricky vodivé biomateriály dokážu sprostredkovať prenos elektrických impulzov buď pohybom iónov (iónová vodivosť), alebo elektrónov (elektrónová vodivosť), čo výrazne rozširuje ich možnosti na využitie [2]. Výskum sa čoraz viac sústreďuje na vývoj inteligentných vodivých scaffoldov, ktoré dokážu stimulovať prirodzené regeneračné procesy napríklad prostredníctvom galvanotaxie, aktivácie signálnych dráh alebo podporou synchronnej kontrakcie buniek [3].

Predkladaná bakalárska práca sa zameriava na testovanie cytokompatibility a bunkovej odpovede na kompozitné scaffoldy na báze elastoméru a expandovateľného grafitu – extrinzičky vodivého materiálu. Cytokompatibilita materiálu je dôležitým ukazovateľom pri určovaní celkovej biokompatibility a hodnotila sa sledovaním cytotoxicity a proliferácie buniek na povrchu vzoriek. Cytotoxicita bola hodnotená pomocou MTT testu a bunková proliferácia bola analyzovaná fluorescenčnou konfokálnou mikroskopiou na myšej fibroblastovej bunkovej línii NIH/3T3. Cieľom práce bolo nielen potvrdiť vhodnosť testovaných materiálov z hľadiska bunkovej viability, ale aj porovnať rôzne varianty scaffoldov z hľadiska ich vplyvu na proliferáciu buniek, vrátane efektu želatínovej povrchovej úpravy.

Získané poznatky môžu prispieť k ďalšiemu vývoju vodivých biomateriálov, ktoré by v budúcnosti mohli slúžiť ako aktívne nosiče pre tkanivové inžinierstvo, najmä v oblastiach, kde elektrická stimulácia zohráva významnú úlohu v bunkovej regenerácii.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TKANIVOVÉ INŽINIERSTVO

Tkanivové inžinierstvo je multidisciplinárna oblasť, ktorá spája poznatky z biológie, chémie, materiálového inžinierstva a medicíny. Vznik tejto disciplíny siaha až do 16. storočia, kedy Gasparo Tagliacozzi, profesor chirurgie na Univerzite v Bologni, opísal metódu, ktorou sa snažil rekonštruovať nos z laloku predlaktia. Tento prístup, hoci primitívny, ukazuje na dávnu snahu ľudstva regenerovať poškodené tkanivá [4].

V modernej ére sa tkanivové inžinierstvo vyvinulo do komplexnej disciplíny, ktorú dnes oficiálne definujeme ako aplikáciu inžinierskych a biologických princípov na vývoj biologických substitútov, ktoré môžu opraviť alebo zlepšiť funkciu poškodeného tkaniva či orgánu [5]. Tkanivové inžinierstvo, ako ho poznáme dnes, sa formovalo predovšetkým v 80. a 90. rokoch, kedy Dr. Joseph Vacanti a Dr. Robert Langer z Massachusettského technologického inštitútu položili základy tohto odvetvia navrhnutím vhodných scaffoldov. Ich inovatívny prístup, ktorý zahŕňal použitie syntetických biokompatibilných polymérov, otvoril dvere k novej ére regeneratívnej medicíny [6].

Hlavným cieľom tkanivového inžinierstva je vyvinúť systémy, ktoré môžu efektívne regenerovať alebo nahradiť poškodené tkanivá. Tieto ciele sa dajú dosiahnuť buď priamo *in vivo*, alebo *ex vivo*. Jednou z hlavných stratégií tkanivového inžinierstva je bunková implantácia, pri ktorej sa využívajú rôzne metódy dodania buniek do organizmu. Tieto bunky môžu byť injektované priamo do poškodeného tkaniva alebo kultivované v laboratórnych podmienkach na biodegradovateľných scaffoldoch pred implantáciou do pacienta [7]. Jedným z najväčších problémov v tejto oblasti je obmedzená dostupnosť vhodných darcovských tkanív a orgánov. Aj keď mechanické zariadenia a umelé protézy môžu dočasne nahradiť stratené funkcie, ich schopnosť plne sa integrovať s tkanivom hostiteľa je často limitovaná. V budúcnosti by umelo vytvorené tkanivá mohli znížiť potrebu transplantácie orgánov a zároveň urýchliť vývoj nových liekov, ktoré by pacientov vyliečili a odstránili potrebu transplantácií úplne [8].

Vo výskume sa už dlhší čas kladie výrazný dôraz na vývoj biologických štruktúr, ktoré využívajú bunky, a biomateriály slúžiace ako scaffoldy – štruktúry podporujúce rast nového tkaniva. Tieto scaffoldy sú kľúčové pri regenerácii rôznych tkanív, vrátane kože, chrupavky, kostného, nervového a srdcového svalového tkaniva. Napríklad pri regenerácii srdcového tkaniva sa používajú scaffoldy z kyseliny polyglykolovej (PGA) v kombinácii s kardiomyocytmi, čo významne zlepšuje funkciu srdca po infarkte [9].

V posledných rokoch sú intenzívne skúmané aj elektricky vodivé polyméry ako inovatívne materiály v tkanivovom inžinierstve. Tieto materiály umožňujú stimuláciu buniek elektrickými signálmi, čo je obzvlášť dôležité pri regenerácii svalového a nervového tkaniva. Elektricky vodivé scaffoldy ponúkajú väčšiu kontrolu nad rastom a funkčnosťou buniek, vďaka čomu prispievajú k významnému pokroku v liečebných postupoch [10].

1.1 Klinické aplikácie

Klinické aplikácie tkanivového inžinierstva zahŕňajú široké spektrum terapeutických prístupov, od liečby popálenín a regenerácie nervového tkaniva až po opravu srdcového svalu. Táto disciplína zaznamenala významný pokrok nielen na teoretickej úrovni, ale aj v klinickej praxi, kde sa jej metódy úspešne aplikujú v rôznych oblastiach medicíny [9].

Jedným z prvých úspešných klinických využití tkanivového inžinierstva je **regenerácia kože**, pri ktorej sa na scaffoldy efektívne aplikujú kultivované keratinocyty a fibroblasty. Tento prístup podporuje rast nového epitelu a urýchľuje hojenie rán. Kompozitné materiály s hornou vrstvou zo silikónu, ktorá minimalizuje stratu tekutín, a spodnou vrstvou obsahujúcou chondroitínsulfát a kolagén pre podporu vaskularizácie a tvorby spojivového tkaniva sa ukázali ako účinné v klinických štúdiách [11].

Ľudská koža tvorí približne jednu desatinu telesnej hmotnosti a jej poškodenie môže viesť k vážnym komplikáciám. Normálny proces hojenia rán je výsledkom interakcie medzi epitelovými a mezenchýmovými bunkami, pričom dôležitú úlohu zohráva reepitelizácia a kontrakcia rany podporená proliferáciou a migráciou keratinocytov po extracelulárnej matrix (ECM) [12]. Biomateriály ako kyselina hyalurónová, fibrín a kolagén zlepšujú migráciu a diferenciáciu buniek, podporujú angiogézu a urýchľujú regeneráciu tkaniva. Preukázali sa ako účinné pri liečbe diabetických vredov, popálenín a iných chronických kožných defektov [13].

Okrem regenerácie kože sa významné pokroky dosiahli aj v oblasti nervového tkaniva, kde sú výzvy ešte komplexnejšie. **Regenerácia nervového tkaniva** je náročná kvôli obmedzenej schopnosti neurónov regenerovať sa. Scaffoldy s nanovláknami napodobňujúce ECM podporujú rast axónov a ich usmernenie. Uhlíkové nanorúrky a vodivé polyméry zlepšujú prenos elektrických signálov a podporujú diferenciáciu neurónov, pričom rastové faktory ako neurotrofin alebo mozgový neurotrofický faktor (BDNF) stimulujú regeneráciu tým, že podporujú prežitie neurónov, ich rast a tvorbu synaptických spojení [9].

Pokroky v liečbe ochorení, ako je Parkinsonova choroba, zahŕňajú transplantáciu fetálnych buniek produkujúcich dopamín. Syntetické nervové vodiče s pridaním Schwannových buniek a rastových faktorov podporujú regeneráciu periférnych nervov [14].

Regenerácia kostného tkaniva zahŕňa využitie biomateriálov, ako sú demineralizovaná kostná matrix, hydrogély a keramické materiály, doplnené o rastové faktory, najmä morfogenetické proteíny kostí (BMP) a transformujúci rastový faktor beta (TGF- β) [15]. Scaffoldy na báze kalciumfosfátu podporujú osteointegráciu a vaskularizáciu, čím urýchľujú hojenie zlomenín [16].

Zatiaľ čo regenerácia kostí a chrupavky sa zameriava na štrukturálnu integritu, **regenerácia srdcového tkaniva** kladie dôraz najmä na obnovu kontraktilnej funkcie myokardu po infarkte. Scaffoldy z kolagénu, alginátu a fibrínu sa kombinujú s kardiomyocytmi alebo kmeňovými bunkami, čo zlepšuje schopnosť srdcového svalu sťahovať sa a zároveň podporuje novotvorbu ciev [9]. Technológie *in vitro* umožňujú vytvorenie srdcových "patchov", ktoré sa následne implantujú priamo do poškodeného svalu, zatiaľ čo *in situ* prístupy využívajú injekčné biomateriály s rastovými faktormi na stimuláciu angiogenézy [17].

Tkanivové inžinierstvo výrazne ovplyvnilo prístup k liečbe mnohých ochorení. Stále však čelí výzvam, ako je zlepšenie integrácie implantátov, zabezpečenie efektívnej vaskularizácie a zvládanie imunitných reakcií [18].

1.2 Bunkové kultúry

Bunkové kultúry hrajú kľúčovú úlohu v tkanivovom inžinierstve, pretože umožňujú detailne študovať správanie buniek v kontrolovaných podmienkach. Tieto laboratórne metódy poskytujú základ pre pochopenie biologických mechanizmov, ktoré sú zásadné pre regeneráciu tkanív a vývoj nových terapeutických prístupov [19]. Pri kultivácii buniek existujú dva hlavné prístupy: **monovrstvové (2D)** a **trojrozmerné (3D) bunkové kultúry** [20].

1.2.1 2D vs. 3D bunkové kultúry

2D bunkové kultúry predstavujú tradičný prístup, kde sa bunky pestujú na plochých povrchoch, ako sú plastové alebo sklenené Petriho misky, často ošetrené adhéznymi proteínmi, ktoré podporujú priľnavosť buniek. Tento prístup je technicky nenáročný, nákladovo efektívny a umožňuje jednoduchú manipuláciu s bunkami, čo z neho robí

štandardný model pre mnohé biologické experimenty [21]. Avšak tento typ kultivácie zásadne obmedzuje bunkové interakcie na jednu rovinu, čím dochádza k strate komplexnosti, ktorá je prítomná v prirodzenom tkanivovom prostredí *in vivo*. Bunky pestované v 2D prostredí často vykazujú zmenenú morfológiu, stratu polaritu, zmeny v metabolizme [18]. Absencia priestorových interakcií medzi bunkami a ECM vedie k nereprezentatívnym výsledkom, najmä pri štúdiu procesov, ktoré sú citlivé na mikroprostredie, ako je diferenciácia alebo odpoveď na farmakologické látky [22].

Na rozdiel od 2D modelov umožňujú **3D bunkové kultúry** bunkám rásť v prostredí, ktoré lepšie simuluje fyziologické podmienky organizmu. Bunky v týchto kultúrach vytvárajú zhľuky (spheroidy), organoidy alebo sú kultivované v scaffoldoch, ktoré napodobňujú štruktúru ECM [23]. Tento priestorový rozmer umožňuje bunkám udržiavať prirodzenú polarizáciu, vytvárať bunkovo-bunkové a bunkovo-matrixové interakcie a vytvárať tkanivovo-špecifické štruktúry. V 3D kultúrach sa prirodzene vyskytujú gradienty živín, kyslíka a metabolických odpadov, čo vedie k heterogenite mikroprostredia podobnej fyziologickým tkanivám. Tieto gradienty ovplyvňujú proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu buniek, pričom bunky vo vnútorných oblastiach spheroidov môžu vykazovať hypoxické alebo nekrotické zóny, čo je dôležité najmä pri modelovaní nádorového mikroprostredia alebo štúdiu tkanivovej homeostázy [24].

3D kultúry umožňujú vernejšie modelovanie komplexných biologických systémov, vrátane štúdia invazívnych vlastností buniek, angiogenézy, vývoja liekov a tkanivovej regenerácie [21]. Výskumy ukazujú, že bunky pestované v 3D prostredí vykazujú odlišné vzorce génovej expresie v porovnaní s 2D kultúrami, čo naznačuje, že bunkové správanie je vysoko citlivé na fyzikálne a chemické vlastnosti ich mikroprostredia. Tento fakt je obzvlášť dôležitý v oblasti tkanivového inžinierstva, kde je cieľom vyvinúť modely, ktoré čo najpresnejšie napodobňujú nielen štruktúru, ale aj funkciu tkanív a orgánov [22].

Aj keď 2D kultúry zostávajú cenným nástrojom pre základný biologický výskum vďaka svojej jednoduchosti a reprodukovateľnosti, ich limitácie sú zrejmé, najmä pokiaľ ide o modelovanie zložitých bunkových interakcií a odpovedí na externé podnety. Naopak, 3D kultúry ponúkajú možnosť presnejšej simulácie *in vivo* podmienok, čím poskytujú robustnejšie modely pre štúdium ochorení, testovanie liekov a vývoj nových terapeutických stratégií v oblasti tkanivového inžinierstva [23].

1.2.2 Typy buniek v tkanivovom inžinierstve

V rámci tkanivového inžinierstva sa využívajú rôzne typy buniek, pričom ich výber závisí od konkrétnej aplikácie a požiadaviek na regeneráciu daného tkaniva. Rozhodujúcimi faktormi sú zdroj buniek, ich schopnosť proliferácie a diferenciácie, ako aj ich imunogénne vlastnosti. Každý typ buniek má špecifické výhody a obmedzenia, ktoré je potrebné zvážiť pri návrhu terapeutických stratégií [19].

Rozdelenie buniek podľa pôvodu

- **Autológne bunky:** odobraté z tela pacienta, ktorý je aj príjemcom. Ich najväčšou výhodou je vysoká biokompatibilita, pretože imunitný systém pacienta tieto bunky rozpoznáva ako vlastné, čo minimalizuje riziko imunitnej odpovede alebo odmietnutia implantátu. Tento typ buniek je preferovaný v tkanivovom inžinierstve, najmä pre personalizované terapie, pretože znižuje potrebu imunosupresívnej liečby. Avšak nevýhodou môže byť obmedzené množstvo dostupných buniek a čas potrebný na ich izoláciu a expanziu pred samotnou aplikáciou [25].
- **Alogénne bunky:** pochádzajú od darcu rovnakého druhu, ale geneticky odlišného od príjemcu. Výhodou ich použitia je dostupnosť, pretože môžu byť pripravené vopred a uchovávané pre okamžité použitie. Avšak, ich hlavnou nevýhodou je riziko imunitnej odpovede, pretože imunitný systém príjemcu môže tieto bunky identifikovať ako cudzie. Na zníženie rizika imunitnej reakcie sa často používajú imunomodulačné stratégie alebo imunosupresívna liečba [7].
- **Xenogénne bunky:** získané z iného druhu, často sa používajú v experimentálnych modeloch. Použitie xenogénnych buniek na regeneráciu tkanív je stále kontroverzné kvôli riziku prenosu patogénov. Avšak, tieto bunky môžu dočasne podporovať poškodené tkanivo, kým sa nenájde vhodný ľudský darcovský orgán alebo kým sa tkanivo samo neobnoví [25]. Napríklad pečeňové bunky (hepatocyty) ošísaných pestované v extracorporálnych bioreaktoroch sa klinicky testujú na podporu pacientov so zlyhaním pečene [26].

Rozdelenie podľa stupňa diferenciácie

- **Kmeňové bunky:** nediferencované bunky s regeneračným potenciálom schopné obnovovať poškodené tkanivá. Tieto bunky sa vyznačujú schopnosťou samoobnovy, čo znamená, že sa môžu deliť a udržiavať svoj nediferencovaný stav po dlhé

obdobie [27]. Okrem toho majú schopnosť diferenciacie na rôzne špecializované bunkové typy, ktoré sú nevyhnutné pre opravu a regeneráciu poškodených tkanív. Ich význam spočíva aj v regulácii homeostázy tkanív, pričom reagujú na poškodenie alebo stresové podmienky a aktivujú sa na podporu obnovy tkaniva [28]. Jedným z typov kmeňových buniek sú somatické bunky, ktoré majú obmedzenú diferenciatnú kapacitu, no zohrávajú zásadnú úlohu v udržiavaní a opravách tkanív počas celého života [29].

- **Progenitorové bunky:** čiastočne diferencované bunky s obmedzenou schopnosťou delenia. Termín "čiastočne diferencované" znamená, že tieto bunky už prešli počiatočným štádiom diferenciacie z kmeňových buniek, no stále si zachovávajú určitú schopnosť vytvárať špecifické bunkové línie. Na rozdiel od kmeňových buniek majú progenitorové bunky nižšiu schopnosť samoobnovy, ale vyššiu schopnosť rýchlej diferenciacie, čo ich robí efektívnymi v procesoch rýchlej regenerácie [30].
- **Diferencované bunky:** špecializované bunky s definovanou funkciou, ktoré tvoria rôzne tkanivá a orgány v tele [31]. Tieto bunky majú obmedzenú alebo žiadnu schopnosť delenia, ich hlavnou úlohou je vykonávať špecifické funkcie v organizme, ako napríklad prenos kyslíka, tvorba hormónov alebo zabezpečenie kontrakility svalov [32].

Rozdelenie kmeňových buniek podľa schopnosti delenia a diferenciacie

- **Totipotentné bunky:** najmenej diferencované bunky, ktoré sa vyskytujú v raných štádiách vývoja [33]. Oploďnené vajíčko (zygota) a bunky z prvých dvoch cyklov delenia sú totipotentné, pretože sa môžu diferencovať na embryonálne aj extraembryonálne tkanivá, čím sa podieľajú na tvorbe embrya aj placenty [34].
- **Pluripotentné bunky:** dokážu sa diferencovať na bunky pochádzajúce zo všetkých troch zárodočných listov – ektodermu, endodermu a mezodermu – z ktorých sa vyvíjajú všetky tkanivá a orgány. Pluripotentné kmeňové bunky, nazývané embryonálne kmeňové bunky (ESCs), boli prvýkrát izolované z vnútornej bunkovej masy blastocysty [33]. Okrem ESCs sem patria aj indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSCs), ktoré sa získavajú genetickým preprogramovaním dospelých somatických buniek do pluripotentného stavu. Tento proces bol prvýkrát opísaný Takahashim a Yamanakom v roku 2006. iPSCs vykazujú

vlastnosti podobné ESCs, vrátane exprese génov spojených s pluripotenciou a aktivity telomerázy. Napriek ich potenciálu existujú obavy týkajúce sa ich bezpečnosti, najmä rizika vzniku rakovinových buniek [35].

- **Multipotentné bunky:** nachádzajú sa vo väčšine tkanív a môžu sa diferencovať na bunky pochádzajúce z jedného zárodočného listu. Najznámejšie sú mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs), ktoré možno získať z rôznych tkanív, vrátane kostnej drene, tukového tkaniva, kosti, pupočníkovej krvi a periférnej krvi [36]. Štúdie preukázali, že MSCs sa dokážu diferencovať aj na neurálne tkanivo, ktoré pochádza z ektodermu, čo predstavuje transdiferenciáciu [37].
- **Unipotentné bunky:** majú schopnosť samoobnovy, ale dokážu sa diferencovať iba na jeden špecifický typ bunky, čím tvoria jedinú bunkovú líniu. Príkladom sú svalové kmeňové bunky, ktoré sa diferencujú na zrelé svalové bunky, ale nemajú schopnosť vytvárať iné typy buniek [33].

2 BIOMATERIÁLY

Biomateriály sú materiály, ktoré interagujú s biologickými systémami a sú navrhnuté na nahradenie, opravu alebo podporu tkanív a orgánov v ľudskom tele. Tieto materiály zohrávajú kľúčovú úlohu v tkanivovom inžinierstve, pretože slúžia ako scaffoldy, nosiče liečiv alebo implantovateľné zariadenia, ktoré podporujú regeneráciu tkanív. Biomateriály musia byť biokompatibilné, aby nedochádzalo k toxickým reakciám alebo odmietnutiu hostiteľským organizmom [38].

Možno ich rozdeliť do dvoch hlavných kategórií: **prirodné** a **syntetické**. **Prirodné biomateriály** zahŕňajú materiály získané z biologických zdrojov, ako sú kolagén, chitozán (CHI), kyselina hyaluronová alebo alginát. Tieto materiály sú často výhodné vďaka svojej vynikajúcej biokompatibilite a biologickým vlastnostiam, ktoré napodobňujú tkanivo. Napríklad kolagén, prirodzene prítomný v spojivových tkanivách (základná zložka ECM), je široko používaný v scaffoldoch pre regeneráciu kože a kostí, a CHI je známy svojimi antibakteriálnymi vlastnosťami a zároveň podporuje hojenie rán [39]. **Syntetické biomateriály** sú vytvorené pomocou chemických procesov a umožňujú väčšiu kontrolu nad ich fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami. K bežným syntetickým biomateriálom patria polyméry ako poly(laktid-ko-glykolid) (PLGA) a polymetylmetakrylát (PMMA). Tieto materiály sa často používajú v implantátoch alebo ako nosiče pre liečivá vďaka ich mechanickej pevnosti a kontrolovateľnej biodegradovateľnosti [40].

Prirodné biomateriály ponúkajú biologickú aktivitu a prirodzené vlastnosti, ktoré podporujú bunkovú regeneráciu. Avšak ich nevýhodou môže byť nedostatok mechanickej pevnosti a možnosť imunitných reakcií. Na druhej strane syntetické biomateriály sú dizajnované tak, aby mali presne požadované vlastnosti, ale môžu mať problémy s biokompatibilitou, čo znamená, že potrebujú ďalšie modifikácie, aby sa zlepšila ich interakcia s biologickým prostredím [39].

V posledných rokoch sa vývoj biomateriálov posunul smerom k vytváraniu inteligentných biomateriálov, ktoré reagujú na biologické podmienky v tele, ako sú pH alebo teplota. Tieto materiály môžu uvoľňovať liečivá alebo rastové faktory v reakcii na podmienky prostredia, čo zvyšuje efektivitu hojenia a regenerácie [41]. Zároveň sa zvyšuje dôraz na výskum personalizovanej medicíny, kde sa biomateriály prispôbujú individuálnym potrebám pacienta. Tento prístup otvára nové možnosti v oblasti

regeneratívnej medicíny a umožňuje vyvinúť nové liečebné metódy pre konkrétne diagnózy [42].

2.1 Vlastnosti biomateriálov

Biomateriály používané v tkanivovom inžinierstve musia spĺňať rôzne špecifické kritériá, aby účinne podporovali regeneráciu tkanív a buniek. Ich kľúčové vlastnosti zahŕňajú mechanické, povrchové, chemické a elektrické parametre, biokompatibilitu, degradabilitu a interakciu s biologickým prostredím [40].

Mechanické vlastnosti, ako sú pevnosť, elasticita a odolnosť voči tlaku alebo ťahu, sú zásadné pre úspešné využitie biomateriálov. Materiály určené pre kostné implantáty musia byť mimoriadne pevné, aby vydržali mechanický stres, zatiaľ čo materiály určené pre mäkké tkanivá, ako sú svaly a chrupavky, musia byť flexibilnejšie a pružnejšie [43]. Napríklad titánové zliatiny sú ideálne pre kostné implantáty kvôli ich vysokému pomeru pevnosti k hmotnosti, zatiaľ čo kolagénové scaffoldy sú vhodné pre mäkké tkanivá, pretože napodobňujú prirodzenú elasticitu týchto tkanív [44].

Povrchové vlastnosti biomateriálov, ako sú drsnosť a hydrofóbnosť alebo hydrofilnosť, majú výrazný vplyv na bunkovú adhéziu a migráciu. Optimálna drsnosť povrchu podporuje lepšiu priľnavosť buniek, čo je nevyhnutné pre regeneráciu tkanív [44]. Povrchová hydrofóbnosť môže inhibovať bunkovú migráciu, zatiaľ čo hydrofilné povrchy podporujú interakcie medzi bunkami a proteínmi, ktoré sa na povrchu biomateriálu adsorbujú a ovplyvňujú bunkovú adhéziu a diferenciáciu. Modifikácia povrchových vlastností, napríklad prostredníctvom pridania funkcionálnych skupín, môže zlepšiť biokompatibilitu a podporiť adhéziu buniek [45].

Biokompatibilita je nevyhnutnou vlastnosťou biomateriálov, pretože zaručuje, že materiály nevyvolávajú imunitnú odpoveď organizmu. Interakcia biomateriálov s bunkami a ECM musí byť prirodzená, aby nedochádzalo k odmietnutiu implantátov alebo zápalovým reakciám [43].

Degradabilita a biodegradabilita biomateriálov sú dôležité pre scaffoldy, ktoré sa v tele postupne rozkladajú a umožňujú rast nového tkaniva. Tento proces sa často riadi chemickými mechanizmami, ako je hydrolýza alebo enzymatická degradácia [43]. Rýchlosť degradácie je dôležitá pre úspešnú regeneráciu – príliš rýchla degradácia by mohla viesť k nedostatočnej podpore tkaniva, zatiaľ čo pomalá degradácia by mohla brániť rastu nového

tkaniva. Biodegradovateľné polyméry, ako polyaktid (PLA) a PGA, sa bežne používajú práve pre ich kontrolovateľnú rýchlosť degradácie [46].

Elektrické vlastnosti biomateriálov, najmä ich vodivosť, sú kľúčové pre regeneráciu nervového a svalového tkaniva. Elektricky vodivé materiály, ako sú uhlíkové nanorúrky a polypyrol (PPy), dokážu stimulovať bunky prostredníctvom elektrických signálov a tým prispievajú k regenerácii tkanív. Na rozdiel od iných fyzikálno-chemických parametrov, ako je napríklad pevnosť alebo degradabilita, majú elektrické vlastnosti biomateriálov schopnosť aktívne zasahovať do signalizácie buniek, čo ich radí medzi tzv. elektroaktívne materiály. Tieto materiály navyše umožňujú prepojenie biologických štruktúr s elektronickými zariadeniami, ako sú biosenzory alebo stimulatory. V závislosti od mechanizmu vodivosti sa rozlišujú elektrónovo vodivé a iónovo vodivé biomateriály, ktoré majú odlišný spôsob vedenia náboja [44]. Keďže elektrická vodivosť predstavuje ústredný aspekt tejto práce a tvorí základ aj pre praktickú časť, kapitola 4 sa jej venuje detailnejšie.

Chemické vlastnosti biomateriálov, ako je ich stabilita v rôznych biologických prostrediach, majú veľký vplyv na ich správanie v tele. Stabilita v prostredí s odlišným pH alebo ionickým zložením je dôležitá pre dlhodobú funkčnosť biomateriálov [43]. Chemické väzby v biomateriáloch ovplyvňujú ich schopnosť odolávať degradácii a poskytovať potrebnú stabilitu pre úspešnú integráciu do biologického prostredia [44].

2.2 Scaffoldy - Nosné štruktúry pre regeneráciu tkanív

Regenerácia poškodených tkanív je komplexný proces, ktorý si vyžaduje vhodné podmienky pre rast a diferenciáciu buniek. Aby sa tento proces mohol úspešne uskutočniť, je potrebné vytvoriť optimálne prostredie, ktoré napodobňuje prirodzené mikroprostredie buniek. V tomto kontexte zohrávajú scaffoldy úlohu 3D nosných štruktúr, v rámci ktorej poskytujú priestor na adhéziu buniek, podporujú ich migráciu a uľahčujú výmenu živín a metabolitov [47]. Vývoj scaffoldov je zameraný na optimalizáciu ich fyzikálnych, chemických a biologických vlastností tak, aby čo najvernejšie imitovali ECM a umožnili úspešnú regeneráciu tkanív [48].

Dôležitým aspektom scaffoldov je ich **pórovitosť** a **veľkosť pórov**, ktoré zásadne ovplyvňujú priľnavosť buniek, difúziu živín a odstraňovanie metabolitov. Pórovitosť scaffoldov by mala byť dostatočne vysoká na umožnenie bunkovej migrácie a cievnej vaskularizácie, pričom interkonektivita pórov je nevyhnutná na efektívny prenos živín

a kyslíka [47]. Póry s veľkosťou 100–300 μm sú ideálne pre kostné tkanivo, pretože podporujú osteointegráciu a vaskularizáciu [49]. Naopak, menšie póry v rozsahu 5–15 μm sú vhodné pre aplikácie zahŕňajúce regeneráciu mäkkých tkanív, kde je potrebná väčšia hustota buniek a interakcia s ECM [48].

Scaffoldy môžu byť degradovateľné alebo trvalé v závislosti od aplikácie. **Biodegradovateľné scaffoldy** sa často využívajú v regeneratívnej medicíne pri opravách mäkkých tkanív, nervového tkaniva a chrupavky, kde je žiaduce, aby scaffold postupne zmizol a bol nahradený novým tkanivom [49]. Na druhej strane, **trvalé scaffoldy** sú určené na dlhodobú podporu tkaniva, pričom sú často vyrobené z keramických alebo kovových materiálov, ako je titán alebo bioaktívne sklo, ktoré poskytujú vysokú mechanickú stabilitu. Tieto scaffoldy sa využívajú najmä v ortopédii, kde sa aplikujú na opravu veľkých kostných defektov, v maxilofaciálnej chirurgii na rekonštrukciu čeľustí a lebky, ako aj v implantológii na dlhodobé fixácie a podporu pri hojení kostného tkaniva [50].

Bunková adhézia a proliferácia závisia od chemického zloženia a povrchových vlastností scaffoldov. Scaffoldy s modifikovanými povrchmi, ktoré obsahujú bioaktívne ligandy alebo rastové faktory, môžu zlepšiť príľnavosť buniek a urýchliť proces diferenciácie [51]. Povrchové úpravy, ako sú chemické modifikácie alebo nanosenie bioaktívnych vrstiev, sú efektívnym spôsobom, ako optimalizovať bunkové interakcie a podporiť regeneráciu tkaniva [50].

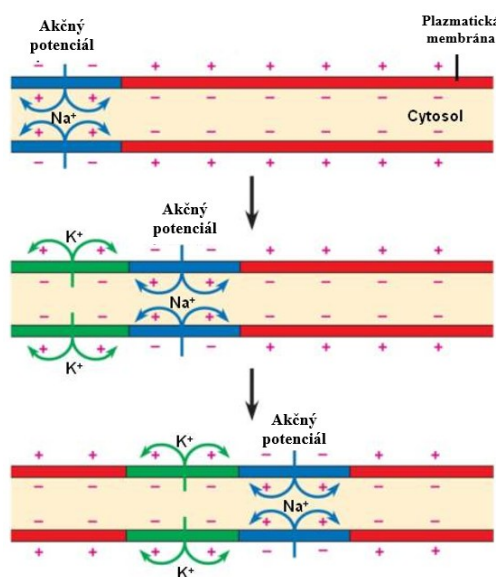
Vďaka pokročilým výrobným technikám, ako je 3D tlač, je dnes možné vytvárať scaffoldy s presne definovanými vlastnosťami, ktoré napodobňujú prirodzené tkanivá a urýchľujú proces regenerácie [47]. Vývoj nových materiálov a výrobných technológií neustále rozširuje možnosti tkanivového inžinierstva a umožňuje navrhovanie scaffoldov s čoraz vyššou funkcionalitou [50].

3 BIOELEKTRICKÁ AKTIVITA V LUDSKOM TELE

Bioelektrická aktivita predstavuje kľúčový mechanizmus riadiaci široké spektrum fyziologických procesov, od prenosu nervových signálov a svalových kontrakcií až po reguláciu bunkovej proliferácie, diferenciácie a regenerácie tkanív. Táto aktivita je výsledkom nerovnomerného rozloženia elektricky nabitých iónov medzi intracelulárnym a extracelulárnym prostredím, pričom ich pohyb cez selektívne iónové kanály vedie k vzniku elektrochemických gradientov a elektrických impulzov, ktoré sú základom bunkovej signalizácie [52]. Pochopenie bioelektrických procesov v ľudskom tele je kľúčové pre vývoj a aplikáciu elektricky vodivých biomateriálov v tkanivovom inžinierstve.

3.1 Elektrická aktivita nervovej a pohybovej sústavy

Všetky elektricky excitabilné bunky, predovšetkým neuróny a svalové bunky, využívajú membránový potenciál, ktorý vzniká nerovnomerným rozložením elektricky nabitých iónov medzi intracelulárnym a extracelulárnym prostredím. Tento potenciál je v pokojovom stave negatívny, čo znamená, že vnútrobunkové prostredie je menej elektricky nabité ako extracelulárny priestor. Udržiavanie tejto rovnováhy je zabezpečené **sodíkovo-draslíkovou pumpou**, ktorá aktívne transportuje sodíkové ióny (Na^+) von z bunky a draselné ióny (K^+) dovnútra, čím vytvára elektrochemický gradient potrebný na elektrickú signalizáciu [52].



Obrázok 1 Znázornenie postupného šírenia akčného potenciálu pomocou aktivácie napäťovo riadených iónových kanálov

(zdroj:[53])

V nervovej sústave sa elektrická aktivita prejavuje vo forme akčných potenciálov, ktoré predstavujú rýchle zmeny membránového potenciálu nevyhnutné na prenos signálov medzi neurónmi. Keď neurón dostane dostatočne silný podnet, membránový potenciál sa začne depolarizovať – napäťovo riadené sodíkové kanály (Na^+) sa otvoria, čo umožní prudký prísun sodíkových iónov do bunky. Tento masívny influx kladne nabitých iónov spôsobí, že vnútro bunky sa náhle stane pozitívne nabité. Tento jav sa nazýva **akčný potenciál** (Obrázok 1). Vzniknutý elektrický impulz sa šíri pozdĺž axónu neurónu ako vlna depolarizácie, až kým nedosiahne synapsiu, kde spôsobí uvoľnenie neurotransmiterov. Tieto chemické látky následne aktivujú receptory na postsynaptickej bunke, v dôsledku čoho môže pokračovať prenos signálu [54]. Po dosiahnutí vrcholu depolarizácie sa sodíkové kanály zatvoria a otvoria sa draslíkové kanály (K^+), ktoré umožnia výstup draslíkových iónov z bunky, čím sa membránový potenciál začne vracat' do pôvodného (negatívneho) stavu, tento proces sa nazýva repolarizácia. Po repolarizácii sa membrána často dostáva do krátkej fázy hyperpolarizácie, kedy je jej náboj ešte negatívnejší ako v pokojovom stave. Táto fáza zabezpečuje, že signál sa nebude okamžite opakovať [55].

Podobný mechanizmus sa uplatňuje aj v svalových bunkách, kde elektrická aktivita riadi svalové kontrakcie. Napäťovo riadené **vápnikové kanály** (Ca^{2+}) v membráne svalových buniek a v sarkoplazmatickom retikule sa aktivujú po príchode elektrického signálu. Keď elektrický impulz dosiahne svalové vlákno, kanály v sarkoplazmatickom retikule sa otvoria, čím sa uvoľnia ióny vápnika do cytoplazmy svalovej bunky. Prítomnosť vápnika umožňuje interakciu medzi aktínom a myozínom, dvoma hlavnými proteínmi zodpovednými za svalový pohyb. Myozínové hlavy sa naviažu na aktín a posúvajú svalové vlákna proti sebe, čo vedie k stiahnutiu svalu. Akonáhle sa sval prestane elektricky stimulovať, vápnikové kanály sa uzavrujú a vápnik sa aktívne transportuje späť do sarkoplazmatického retikula, čo spôsobí jeho uvoľnenie [56].

Tieto mechanizmy sú základom pre všetky motorické, senzorické a kognitívne procesy. Ak dôjde k ich narušeniu, ako napríklad pri neurodegeneratívnych ochoreniach, môže to mať za následok stratu senzorických funkcií, zhoršenie pohyblivosti alebo kognitívne poruchy [52].

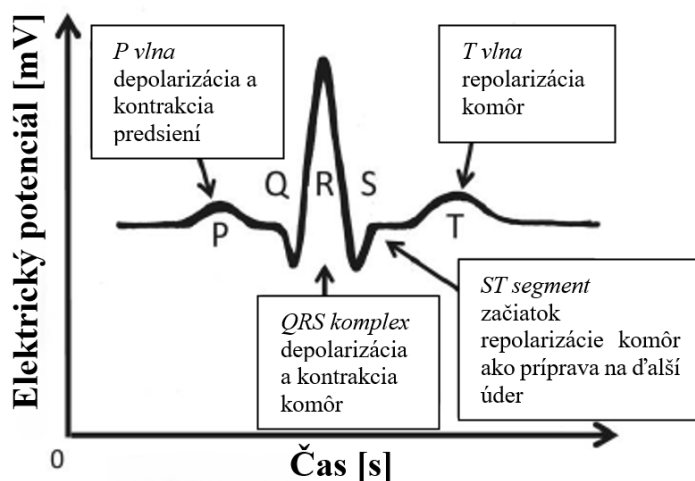
3.2 Elektrická aktivita srdca

Srdcová činnosť je riadená presne koordinovanou elektrickou aktivitou, vďaka ktorej dochádza k rytmickým kontrakciám a efektívnemu pumpovaniu krvi do tela. Tento proces

zabezpečujú špecializované bunky známe ako „pacemakery“, ktoré generujú elektrické impulzy a udržiavajú pravidelný srdcový rytmus [57].

Elektrický signál sa začína v **sinoatriálnom (SA) uzle** uloženom v pravej predsieni, ktorý funguje ako prirodzený kardioštimulátor srdca. Spontánna depolarizácia v SA uzle vedie k vytvoreniu elektrického impulzu, ktorý sa šíri stenami predsiení, spôsobuje ich depolarizáciu a následnú kontrakciu – tento proces sa na elektrokardiograme (EKG) prejavuje ako **P vlna**. Po prechode predsieniami sa elektrický signál dostáva do **atrioventrikulárneho (AV) uzla**, kde dochádza k jeho krátkemu spomaleniu. Toto oneskorenie umožňuje úplné stiahnutie predsiení a efektívne naplnenie komôr krvou predtým, než sa začnú sťahovať samotné komory [57].

Z AV uzla sa signál šíri cez Hisov zväzok, ktorý sa následne rozvetvuje na pravé a ľavé Tawarove ramienko. Tieto zväzky vedú impulz smerom k Purkyňovým vláknam, ktoré sú rozložené v stenách komôr a zabezpečujú ich rýchlu a synchronnú depolarizáciu. Výsledkom je kontrakcia komôr a výtlak krvi do veľkého a malého krvného obehu, pričom sa tento proces na EKG zaznamenáva ako **QRS komplex**. Po kontrakcii komôr sa musí srdcový sval vrátiť do svojho pôvodného elektrického stavu. Po depolarizácii nasleduje repolarizácia, počas ktorej sa iónové kanály uzatvárajú, membránový potenciál sa obnovuje a svalové bunky sa uvoľňujú – tento jav sa na EKG prejavuje ako **T vlna** [58].



Obrázok 2 Základné vlny EKG znázorňujúce elektrickú aktivitu srdca

(zdroj: [57])

Celý tento cyklus elektrickej aktivity srdca je riadený pohybom iónov cez membrány buniek srdcového svalstva. Sodíkové ióny (Na^+) vstupujú do bunky pri začiatku depolarizácie. Vápnikové ióny (Ca^{2+}) umožňujú samotnú kontrakciu srdcového svalu. Naopak, draselné ióny (K^+) obnovujú pokojový membránový potenciál a pripravujú bunku na ďalší cyklus [52].

3.3 Elektrická aktivita pri poranení

Poškodenie tkaniva narúša bunkové membrány a tým aj prirodzenú rovnováhu iónov medzi vnútorným prostredím buniek a extracelulárnym okolím. Táto nerovnováha spôsobí vznik lokálneho elektrického potenciálu, ktorý sa prejavuje ako elektrické pole v okolí rany. Takéto elektrické pole pôsobí ako smerujúci signál, ktorý priťahuje okolité bunky potrebné na regeneráciu smerom k miestu poranenia. Bunky sú schopné vnímať tento elektrický gradient prostredníctvom špecifických membránových receptorov a iónových kanálov citlivých na elektrické stimuly. Tieto receptory a kanály následne iniciujú intracelulárnu signalizačnú kaskádu, ktorá vedie k prestavbe cytoskeletu. Bunka polarizuje, čo znamená, že predná časť bunky sa aktívne posúva v smere elektrického poľa, zatiaľ čo zadná časť sa kontrahuje, čím dochádza k cieľnému pohybu – **galvanotaxii** [59].

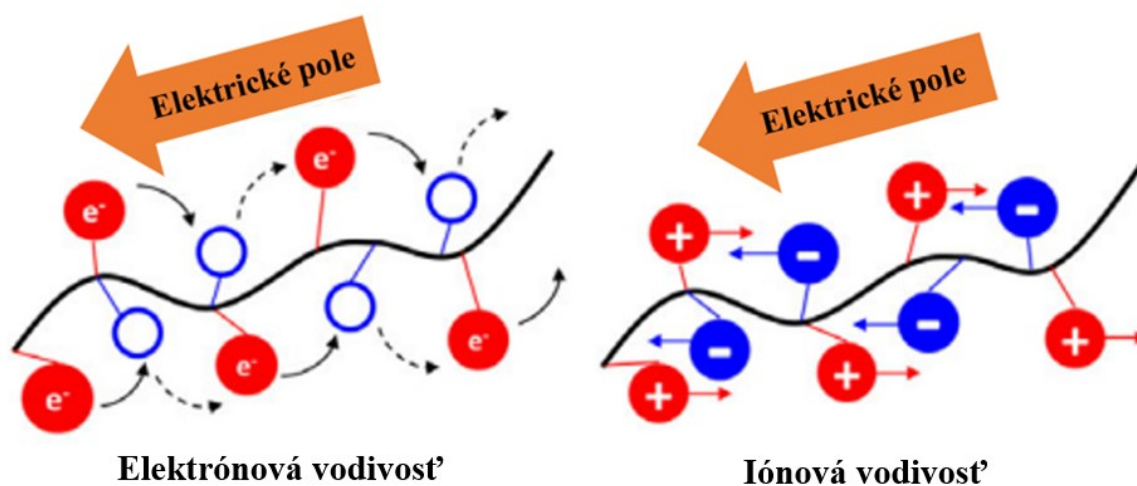
Elektrické pole okrem migrácie ovplyvňuje aj ďalšie biologické procesy, ako proliferáciu a diferenciáciu buniek. To sa deje prostredníctvom aktivácie špecifických intracelulárnych signálnych dráh, napríklad **mitogénom aktivované proteínkinázy** (MAPK) alebo **PI3K/Akt dráhy**, ktoré sú známe svojou úlohou v regulácii bunkového cyklu, rastu a diferenciácie. Aplikáciou exogénneho elektrického poľa spôsobuje otvorenie napäťovo riadených iónových kanálov v membráne buniek, čo vedie k influxu iónov (predovšetkým Ca^{2+}) do bunky. Zvýšenie intracelulárneho vápnika následne aktivuje signálne kaskády, napríklad MAPK dráhu, ktorá prostredníctvom série fosforylačných reakcií spúšťa expresiu génov zodpovedných za proliferáciu, diferenciáciu a riadenú migráciu buniek potrebných pre efektívnu regeneráciu poškodeného tkaniva [3].

4 ELEKTRICKY VODIVÉ BIOMATERIÁLY

Elektricky vodivé biomateriály (ECBs) predstavujú špecifickú triedu biomateriálov schopných interagovať s bioelektrickými procesmi v organizme. Na rozdiel od tradičných biomateriálov, ktoré primárne poskytujú fyzikálno-chemické prostredie pre adhéziu, proliferáciu a diferenciáciu buniek, ECBs umožňujú cielený prenos elektrických signálov v tkanivách. Tento aspekt je nevyhnutný najmä pri regenerácii nervového, svalového a srdcového tkaniva, kde elektrická aktivita riadi bunkovú signalizáciu, koordináciu kontrakcií a neuroprenosy [1].

Poruchy elektrických procesov v ľudskom tele môžu viesť k závažným ochoreniam, ako sú srdcové arytmie, svalová atrofia či neurodegeneratívne poruchy, preto ECBs predstavujú sľubnú stratégiu na obnovu elektrickej aktivity v poškodených tkanivách [2]. Ich účinok je sprostredkovaný mechanizmami, ako je galvanotaxia, kde bunky migrujú v smere elektrického poľa, čím sa optimalizuje proces regenerácie [3]. Súčasný výskum sa preto sústreďuje na kombináciu bioelektroniky, nanotechnológií a biomateriálového inžinierstva, s cieľom vyvinúť inteligentné implantáty, ktoré dokážu presne reagovať na elektrické podnety organizmu [2].

4.1 Mechanizmy elektrickej vodivosti v biomateriáloch



Obrázok 3 Rozdiel medzi elektrónovou a iónovou vodivosťou v biomateriáloch

(zdroj: [60])

Vodivé biomateriály navrhnuté na podporu biologických procesov musia byť schopné prenášať elektrický náboj podobným spôsobom ako živé tkanivá. Mechanizmus elektrickej vodivosti závisí od typu materiálu – niektoré vedú prúd pohybom iónov (kladne a záporne nabitých častíc), iné využívajú pohyb elektrónov a tzv. diery (Obrázok 3), ktoré vznikajú po uvoľnení elektrónov. Vzniknuté kladne nabité diery priťahujú elektróny z okolia, čo umožňuje prenos elektrického náboja [2].

4.1.1 Iónová vodivosť v biomateriáloch

Iónová vodivosť je mechanizmus, pri ktorom dochádza k prenosu elektrického náboja pohybom voľných iónov v materiáli. Tento typ vodivosti zohráva zásadnú úlohu v biologických systémoch, kde sa elektrické signály prenášajú cez bunkové membrány pomocou sodíkových (Na^+), draslíkových (K^+), vápnikových (Ca^{2+}) a chloridových (Cl^-) iónov [55].

V biomateriáloch sa iónová vodivosť často dosahuje použitím hydrogélů, ktoré majú vysoký obsah vody a umožňujú voľný pohyb iónov. V takýchto materiáloch nevzniká prúd tokmi elektrónov, ale migráciou iónov. Tento princíp imituje prirodzené prostredie v tele, preto iónovo vodivé hydrogély dokážu verne napodobniť transport náboja v biologických tkanivách, čo je z hľadiska biomimetiky významná vlastnosť [61].

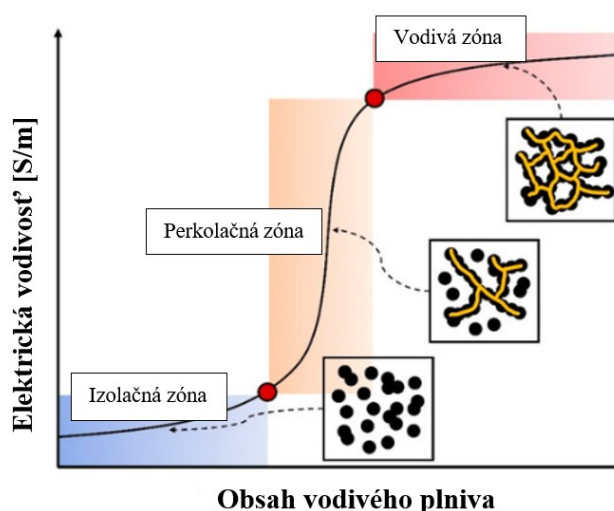
Aby si hydrogél zachoval stabilnú iónovú vodivosť, je potrebné udržať dostatočný obsah voľných iónov a vody v jeho štruktúre. Jednou stratégiou je **fixácia iónov v polymérnej sieti** zavedením polyelektrolytov (nabité polyméry ako polyakrylová kyselina, polystyénsulfonát a iónomerné prepojenia) do matrice hydrogélů. Tieto fixované nabitie skupiny viažu voľne pohyblivé protiióny, čím zabezpečujú vodivosť a zároveň bránia úplnému vyplaveniu iónov [62]. Ďalšou možnosťou je **iónová zosieťovacia interakcia**, napríklad dvojmocné kationy (Ca^{2+}) koordinujúce sa s karboxylovými skupinami alginátu vytvoria sieť, ktorá jednak stabilizuje hydrogél a zároveň poskytuje pohyblivé ióny pre vodivosť [63]. Inovatívne prístupy zahŕňajú aj používanie **zwitteriónových polymérov** (obsahujúcich kladne aj záporne nabitie skupiny), ktoré majú výbornú hydratovateľnosť a biokompatibilitu – tieto materiály udržiavajú vysoký obsah vody a tým aj trvalejšie iónovo vodivé kanály [64]. Na zvýšenie samotnej vodivosti sa do hydrogélů často pridávajú voľné soli alebo iónové kvapaliny. Napríklad pridaním chloridu sodného do chitozánového hydrogélů sa umožní voľný pohyb Na^+ a Cl^- iónov, čo výrazne zlepšilo jeho elektrickú vodivosť. Podobne zabudovanie organických iónových kvapalín (napr. na báze cholínu)

do polyméru poskytuje zdroj mobilných iónov, ktorý sa nevymyje tak ľahko a zvyšuje vodivosť aj v suchších podmienkach. Ak ióny v materiáli nie sú dostatočne viazané a začnú voľne difundovať preč, vodivosť a funkčnosť hydrogélu sa časom stráca [65].

4.1.2 Elektrónová vodivosť v biomateriáloch

Elektrónová vodivosť sa dosahuje dvoma hlavnými prístupmi: tzv. **intrinzičky vodivými polymérmi** (ICPs), ktoré vedú prúd vďaka svojej chemickej (konjugovanej) štruktúre, a **extrinzičky vodivými kompozitmi** (ECC), v ktorých sa do inak nevodivého polyméru pridávajú vodivé zložky, ktoré umožňujú prenos elektrónov [66].

ICPs patria medzi konjugované polyméry, v ktorých sa striedajú jednoduché a dvojité väzby. Vďaka tomu vzniká delokalizovaný π -elektrónový systém, ktorý umožňuje vedenie elektrického prúdu. V takejto konjugovanej štruktúre sa elektróny v p-orbitáloch môžu voľnejšie pohybovať, na rozdiel od bežných nasýtených polymérov, ktoré takýto π -systém nemajú [67]. Aj keď majú konjugovaný reťazec, nedopované polyméry sú v základnom stave málo vodivé, a preto samotná štruktúra na zabezpečenie vodivosti často nestačí. Aby nadobudli vysokú vodivosť, zavádzajú sa do polyméru dopanty (oxidačné alebo redukčné činidlá), ktoré pridávajú či odoberú elektróny z π -systému [66]. Takýmto dopovaním vznikajú vo vnútri polyméru pohyblivé nosiče náboja (napríklad poláróny), čo dramaticky zvyšuje elektrónovú vodivosť. Ako príklad možno uviesť polyacetylén dopovaný jódom, ktorý dosahuje kovovo vodivé správanie [68]. Medzi najčastejšie študované ICPs patria PPy, polyanilin (PANI) a polytiofény (napr. poly(3,4 -etyléndioxytiofén)), ktoré možno vďaka dopovaniu naladiť na vodivosť porovnateľnú s vodivosťou biologických tkanív [66].



Obrázok 4 Schéma vzniku vodivej siete v kompozite pri zvyšujúcom sa obsahu vodivého plniva

(zdroj: [69])

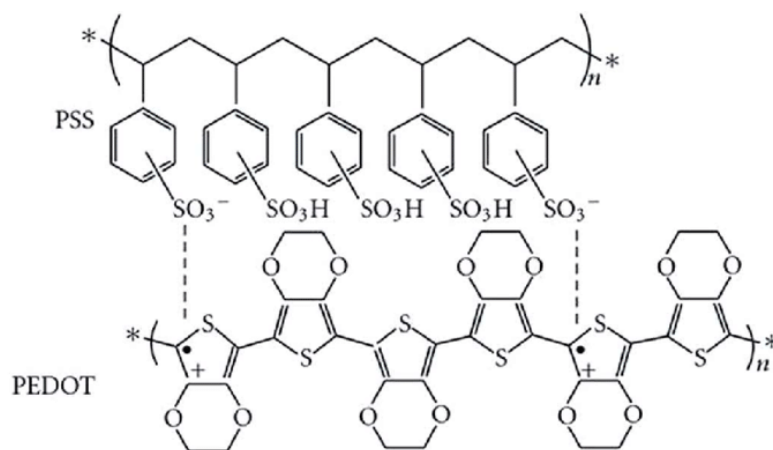
ECC získavajú elektrónovú vodivosť vďaka vodivým zložkám (napr. uhlíkové nanomateriály) zakomponovanými v nevodivom polyméri. Polymér slúži ako podložka, zatiaľ čo vodivé plnivo vytvára cez celý kompozit prepojenú vodivú sieť [66]. Dôležitým fenoménom je **perkolácia**, ktorá predstavuje určitú prahovú koncentráciu vodivej plnky, pri ktorej sa jednotlivé vodivé častice začnú navzájom dotýkať a tvoriť súvislú cestu pre elektróny. Pod touto koncentráciou je kompozit izolant, no po dosiahnutí prahu perkolácie nastáva prudký nárast vodivosti (Obrázok 4). Elektróny sa potom môžu prenášať tunelovaním či priamym dotykom cez susediace vodivé častice rozptýlené v polyméri [70]. Uhlíkové nanomateriály ako sú grafén, uhlíkové nanorúrky (CNT), fullerény či expandovaný grafit patria k často využívaným vodivým plnivám pre takéto kompozity. Majú vynikajúcu schopnosť viesť náboj vďaka konjugovaným sp^2 väzbám v ich štruktúre, pričom grafén napríklad dosahuje teoretickú elektrickú vodivosť až okolo $10^3 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Navyše disponujú veľkým povrchom, takže pri dostatočnom množstve v polyméri vedia vytvoriť rozsiahlu kontaktnú sieť [71].

Hoci vývoj ECBs priniesol významné pokroky, ich prechod do medicínskej praxe čelí mnohým výzvam. Najväčšie prekážky spočívajú v optimalizácii elektrických vlastností materiálov, biokompatibilite a stabilite v biologickom prostredí [1]. Mechanická krehkosť elektricky vodivých polymérov môže obmedziť ich dlhodobé využitie v implantátoch a niektoré vodivé nanočastice môžu vykazovať cytotoxicitu, čo si vyžaduje presnú optimalizáciu ich chemického zloženia a povrchových úpravy. Z týchto dôvodov sa čoraz

viac výskumov zameriava na vytváranie hybridných kompozitov, kde sa vodivé polyméry kombinujú s biodegradovateľnými alebo prírodnými polymérmi, ako je CHI, želatína alebo PCL. Takéto kombinácie môžu výrazne zlepšiť mechanickú stabilitu, spracovateľnosť a najmä biokompatibilitu výsledného materiálu, pričom sa zároveň zachová potrebná elektrická vodivosť [72].

4.2 Vybrané vodivé biomateriály

4.2.1 PEDOT:PSS



Obrázok 5 Štruktúra vodivého polyméru PEDOT:PSS

(zdroj: [73])

Poly(3,4-etyldioxytiofén) (PEDOT) patrí medzi intrinzičky vodivé polyméry zo skupiny polythiofénov. Vyniká vysokou chemickou a environmentálnou stabilitou, čo znamená, že si dokáže dlhodobo zachovať svoje elektricky vodivé vlastnosti aj v náročných podmienkach, napríklad pri vystavení kyslíku, zvýšenej vlhkosti alebo teplote. To ho odlišuje od starších typov vodivých polymérov, ako sú PPy alebo PANI, ktoré v takýchto podmienkach rýchlo degradujú, strácajú vodivosť alebo sa stávajú menej spoľahlivými [66]. Stabilita PEDOT je preto veľkou výhodou najmä v aplikáciách, kde je materiál dlhodobo vystavený biologickému prostrediu, ako napríklad pri implantátoch alebo senzoch. Samotný PEDOT je nerozpustný, avšak bežne sa syntetizuje a používa vo forme komplexu PEDOT:PSS (s polystyrénsulfonátom ako dopantom), ktorý zabezpečuje jeho dispergovateľnosť vo vode. Táto kombinácia dodáva materiálu zároveň kombinovanú iónovo-elektrónovú vodivosť a uľahčuje spracovanie do podoby tenkých filmov či povlakov [74].

Vďaka svojej stabilnej konjugovanej štruktúre a vysokej vodivosti je PEDOT intenzívne skúmaný v rôznych oblastiach (senzory, elektródy, aktívne bio-scaffolds) a považuje sa za perspektívnejší než PPy. Vo všeobecnosti PEDOT patrí k najvodivejším a najstabilnejším vodivým polymérom. Na rozdiel od PPy si PEDOT dokáže zachovať 89 % svojej vodivosti za rovnakých podmienok aj po dlhšom vystavení degradujúcim podmienkam [75].

Z hľadiska mechanických vlastností je PEDOT krehký a nedá sa ľahko použiť samostatne ako objemový konštrukčný materiál, preto sa často aplikuje ako tenká povrchová vrstva na pružné nosné scaffolds alebo sa vmiešava do poréznych nosičov. Ukázalo sa, že ultratenké povlaky PEDOT na mikrovláknitých polymérnych sieťach sú dostatočne vodivé a zároveň mechanicky odolné vo vlhkom prostredí – nedochádza k ich delaminácii či praskaniu, takže dlhodobo udržia elektrickú stimuláciu buniek [76].

Interakcia PEDOT:PSS s bunkami je predmetom viacerých štúdií, ktoré prevažne potvrdzujú dobrú biokompatibilitu. *In vitro* testy nezistili cytotoxické účinky samotného PEDOT na viaceré typy buniek. Naopak, na povrchoch upravených PEDOTom bolo pozorované zlepšené prichytenie buniek a ich rast – dermálne fibroblasty na PLA/PEDOT scaffoldoch vykazovali výbornú adhéziu, migráciu aj proliferáciu [77]. Taktiež sa zaznamenala nízka hodnota impedancie na rozhraní materiál-bunka, čo uľahčuje elektrický prenos signálov k bunkám [78]. Treba však dbať na zloženie materiálu, pretože nadbytok dopantu a následné zvýšenie aniónovej prítomnosti v prostredí môže negatívne ovplyvniť biokompatibilitu. Pri vyšších koncentráciách PEDOT:PSS v hydrogéle (0,3 % hmotn.) sa preukázala mierna cytotoxicita pri použití buniek myoblastových buniek C2C12. Odstránenie prebytočného PSS (napr. premývaním) alebo použitie alternatívnych biologicky odbúrateľných dopantov preto môže byť nevyhnutné pre bezpečné využitie PEDOT v živom tkanive [79].

4.2.2 Extrinzicky vodivé kompozity obsahujúce grafén a CNT

ECC sú kompozity, v ktorých vodivosť zabezpečuje vodivá časť rozptýlená v inak nevodivej polymérnej matrici. Typickým príkladom sú polymérne scaffolds obsahujúce grafénové nanoplatničky alebo CNT. Grafén predstavuje jednovrstvovú hexagonálnu mriežku s výnimočnými fyzikálnymi vlastnosťami – je mimoriadne pevný a disponuje vynikajúcou elektrickou vodivosťou vďaka delokalizovaným elektrónom v svojej štruktúre [76]. CNT možno považovať za zvinuté listy grafénu, pričom existujú vo forme

jednovrstvových (SWCNT) alebo viacvrstvových (MWCNT) štruktúr. Tieto rúrky sa vyznačujú vysokým aspektným pomerom a výbornou elektrickou vodivosťou [80].

Na to, aby kompozit vykazoval makroskopickú elektrickú vodivosť, musí vodivá časť vytvoriť skrz polymérnu sieť vzájomne prepojené cestičky – t. j. dosiahnuť **perkoláciu**. Aby však táto vodivá sieť vôbec vznikla, je veľmi dôležité, ako rovnomerne sú vodivé častice rozptýlené v polyméri. Ak sa častice zhľukujú len na niektorých miestach, medzi týmito zhľukmi vznikajú „hluché miesta“ – oblasti s nevodivým polymérom, cez ktoré elektrina neprejde. Takýto materiál má potom nízku alebo žiadnu vodivosť. Naopak, rovnomerné rozptýlenie častíc na úrovni nanoštruktúry zabezpečí, že sa medzi nimi vytvoria neprerušené vodivé „cestičky“, ktorými môže elektrický náboj pohodlne pretekať. Výsledkom je celkovo vodivý scaffold vhodný napríklad na elektrickú stimuláciu buniek [70].

Elektrická vodivosť týchto kompozitov závisí predovšetkým od koncentrácie a typu vodivého nanomateriálu [81]. Napríklad polyuretánová nanovláknitá membrána s 10 hmotn.% grafénu dosiahla povrchovú vodivosť $9 \times 10^{-6} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$, čo je približne sedemnásobok vodivosti samotného polyuretánu ($1,3 \times 10^{-6} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Iné štúdie uvádzajú, že pri vyšších koncentráciách grafénu okolo 15 % sa dá v polymérnom kompozite dosiahnuť vodivosť až okolo $10^{-2} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Tieto hodnoty spadajú do oblasti polovodičov, avšak pre potreby tkanivového inžinierstva sú postačujúce – už vodivosť rádovo $10^{-6} - 10^{-4} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dokáže umožniť elektrickú stimuláciu buniek v scaffolde. Uhlíkové nanomateriály samé o sebe majú dokonca kovovo-vodivé vlastnosti (napr. grafén má teoretickú vodivosť približne $10^{-4} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), avšak reálna vodivosť kompozitu je limitovaná ich objemovým podielom a kvalitou spojenia v sieti [82]. V porovnaní s ICPs (ako PEDOT) dosahujú ECC spravidla nižšiu vodivosť, no ich výhodou je, že aj relatívne malý prídavok nano-plniva môže zmeniť izolant na funkčný polovodič [66].

Mechanické vlastnosti uhlíkových kompozitov závisia od použitého polymérneho základu a od množstva vodivej zložky. Biopolyméry, ako sú polyuretán, PLA alebo želatína, zabezpečujú pružnosť a tvarovú stabilitu scaffoldu, zatiaľ čo nanoskopické uhlíkové plniva prispievajú k zvýšeniu pevnosti a tuhosti. Udržiavanie vhodného pomeru medzi jednotlivými zložkami je rozhodujúce, pretože nadmerný obsah nanoplňiva môže narušiť spojitú štruktúru polymérnej matrice, čo vedie k väčšej krehkosti a nižšej mechanickej odolnosti výsledného materiálu [83].

Biologická odozva buniek na uhlíkovo-vodivé kompozity je vo všeobecnosti priaznivá za predpokladu, že nanomateriály sú správne začlenené do polymérnej matrice alebo povrchovo upravené. Vo svojej voľnej forme totiž môžu grafén či uhlíkové nanorúrky vykazovať cytotoxické účinky, najmä pri priamom kontakte s bunkovou membránou. Z tohto dôvodu sa pri použití *in vivo* často vyžaduje ich funkcionalizácia (chemická modifikácia povrchu), ktorá podporuje rovnomernú disperziu v materiáli a umožňuje naviazanie bioaktívnych molekúl [84]. V kompozitnej forme sú však uhlíkové nanomateriály dobre tolerované a mnohé štúdie nepreukázali cytotoxicitu takýchto zmesových scaffoldov. Naopak, často sa pozoruje zlepšená interakcia s bunkami vďaka kombinácii biokompatibilného polyméru a vodivého nanomateriálu. Polyuretánové nanokompozity s grafénom napríklad podporili adhéziu aj proliferáciu viacerých typov buniek. Konkrétne sa na nich dobre uchytili a proliferovali fibroblasty aj endotelové bunky, a to najmä na nanovláknitom povrchu so zdrsnenou topografiou [82].

5 APLIKÁCIE VYBRANÝCH ECBS

5.1 Elektricky vodivé hydrogély

5.1.1 Regenerácia nervového tkaniva

Výskumy preukázali, že elektricky vodivé hydrogély môžu urýchliť obnovu nervov, výrazne urýchliť **regeneráciu poškodených nervov** a zlepšiť ich funkčné výsledky [85]. Jedným z najnádejnejších materiálov v tejto oblasti je polypyrol s kyselinou tanínovou (PPy-TA). V *in vivo* experimentoch na diabetických potkanoch tento biomateriál vytvoril okolo poškodeného nervu ochranný obal, ktorý aktívne podporoval jeho hojenie. U týchto zvierat, ktoré majú narušenú schopnosť regenerácie nervového tkaniva kvôli hyperglykémii, implantácia PPy-TA významne stimulovala obnovu axónov, podporovala remyelinizáciu a zlepšovala vedenie nervových impulzov. Tento účinok je mimoriadne dôležitý, pretože diabetes často vedie k periférnej neuropatii, pri ktorej dochádza k strate ochranného myelínového obalu a zhoršenému vedeniu signálov. Navyše sa preukázalo, že tento biomateriál zabraňuje **denervačnej atrofii svalov**, čo je častý problém pri dlhodobom poškodení periférnych nervov [86].

5.1.2 Regenerácia srdcového tkaniva

Srdcový sval je vysoko závislý od elektrických signálov, pričom po infarkte myokardu dochádza k tvorbe nevodivého jazvového tkaniva, ktoré narúša synchronizáciu kontrakcií srdca. Elektricky vodivé hydrogély sa preto skúmajú ako biomateriály, ktoré môžu obnoviť vodivosť a podporiť **regeneráciu myokardu** [87]. V preklinických štúdiách bol vyvinutý polypyrol-chitozánový hydrogél (PPy-CHI), ktorý po injekcii do post-infarktového jazvového tkaniva významne zvýšil jeho vodivosť a urýchlil vedenie elektrických signálov medzi nepoškodenými oblasťami myokardu a jazvou. Tento efekt sa priamo prejavil v obnove synchronných kontrakcií srdcového svalu, čím sa zvýšila efektívnosť čerpania krvi srdca [88]. Navyše, kombinácia biopolyméru chitózanu s elektricky vodivým PPy zabezpečila nielen výbornú elektrickú vodivosť, ale aj mechanickú stabilitu a biokompatibilitu hydrogél. Chitozán, známy svojimi bioaktívnymi vlastnosťami, podporuje adhéziu a proliferáciu buniek, čím umožňuje efektívnejšiu regeneráciu srdcového tkaniva. Vďaka týmto vlastnostiam môžu elektricky vodivé hydrogély slúžiť nielen ako injikovateľné scaffoldy na obnovu myokardu, ale aj ako implantovateľné náplaste, ktoré

by mohli nahradit' nevodivé jazvové tkanivo a obnovit' elektrickú konektivitu poškodených oblastí srdca [89].

5.1.3 Hojenie rán

Pri hojení rán sa preukázalo, že nízkoúrovňová elektrická stimulácia urýchľuje regeneráciu kože vďaka galvanotaxii, pričom vodivé hydrogély umožňujú aplikáciu týchto mikroprúdov priamo na ranu a tým podporujú migráciu kožných buniek a fibroblastov do miesta poškodenia [90]. Výskum v tejto oblasti sa momentálne zameriava na vývoj *inteligentných „smart“ obväzov*, ktoré kombinujú hojivé vlastnosti hydrogelov so zabudovanými senzormi a elektronikou na monitorovanie hojenia rán v reálnom čase [91]. Napríklad bol vyvinutý flexibilný hydrogél na báze alginátu a PANI, ktorý obsahuje pH senzory a mikroohrievače. Tento systém dokáže detegovať zmeny pH v rane (indikátor infekcie alebo zhoršeného hojenia) a v prípade potreby automaticky aktivovať uvoľňovanie antibiotík prostredníctvom tepelných nanosenzorov [92]. Ďalším inovatívnym riešením je využitie grafénových senzorov integrovaných do hydrogélového obväzu na neinvazívne meranie glukózy v tekutinách rany, čo je obzvlášť užitočné pri liečbe diabetických pacientov. Okrem toho sa ukázalo, že vodivé hydrogély môžu zlepšiť expresiu proteínu konexín-43 (Cx43), ktorý zohráva kľúčovú úlohu v komunikácii medzi bunkami, čím sa urýchľuje proces hojenia a regenerácie kože [91].

5.2 Intrinzicky vodivé polyméry

5.2.1 Regenerácia periférnych nervov

Jednou z najskôr skúmaných oblastí využitia ICPs bola **regenerácia periférnych nervov**, ktoré prirodzene fungujú na princípe elektrických signálov. Cieľom týchto biomateriálov je vytvoriť prostredie, ktoré nielen mechanicky podopiera rastúce axóny, ale zároveň im poskytuje elektrickú stimuláciu potrebnú na obnovu funkcie. Intrinzicky vodivé polyméry, ako napríklad PANI, boli implementované do makroporéznych hydrogelov na báze polyetylén glykol diakrylátu (PEGDA). Už 3 hmot. % PANI významne zvýšili elektrickú vodivosť výsledného hybridného hydrogél. Tento scaffold bol testovaný na dvoch typoch buniek – neurónovej línii PC12 a mezenchýmových kmeňových bunkách (hMSCs). Po ich osiatí na hydrogél sa preukázala vysoká miera bunkovej príľnavosti, prežitia a najmä predĺžený rast neuritov. Zároveň sa pozorovala diferenciácia MSC smerom k neurónovému fenotypu pri dodaní nervového rastového faktora, čo poukazuje na aktívnu

podporu neurogenézy zo strany elektricky vodivého materiálu. Dôležité bolo, že scaffold zachoval mechanickú stabilitu aj po osiatí, čo je kľúčové pre aplikácie *in vivo* [93].

5.2.2 Regenerácia srdcového tkaniva

Medzi intrinziicky vodivé polyméry s potenciálom pre **srdcové aplikácie** patrí najmä PEDOT. Jeho klasická verzia, PEDOT:PSS, síce vykazuje vysokú vodivosť, avšak má isté obmedzenia z hľadiska biokompatibility a stability v prostredí organizmu. V novej formulácii vodivého hydrogélu bol použitý PEDOT v kombinácii s dodecylsulfátom sodným (DSS), karboxymetylchitozánom (CMCS) a oxidovaným dextransom. Tento komplexný systém sa v literatúre označuje skratkou PDCOH (PEDOT:(DSS/CMCS) + oxidovaný dextrans). Výsledná formulácia významne zlepšila elektrickú vodivosť, cytocompatibilitu aj histocompatibilitu, pričom si zachovala priaznivé mechanické vlastnosti podobné natívnemu srdcovému tkanivu. Hydrogél bol injektovateľný, čo umožňuje jeho minimálne invazívne aplikovanie priamo do post-infarktovej oblasti. *In vivo* testy na myších modeloch preukázali, že PDCOH s pridruženými kmeňovými bunkami výrazne znížil rozsah jazvového tkaniva, podporil neovaskularizáciu (tvorbu nových ciev) a obnovil elektrickú vodivosť medzi zdravým a poškodeným myokardom. Okrem toho sa pozorovalo zvýšenie kontraktilnej aktivity srdca a obnova synchronizácie impulzov, čo naznačuje, že vodivé polyméry môžu zohrávať aktívnu úlohu pri obnove srdcovej funkcie po infarkte [94].

5.3 Extrinziicky vodivé kompozity

5.3.1 Regenerácia nervového tkaniva

Uhlíkové nanomateriály ako grafén alebo CNT sa vkladajú do polymérneho základu, napríklad polykaprolaktón fumarátu (PCLF) a poskytujú ďalšiu možnosť regenerácie nervového tkaniva. Takto vytvorený kompozitný scaffold (PCLF-GO-CNT-MTAC), tvorený poly(ϵ - kaprolaktón fumarátom) s oxidovaným grafénom (GO), CNT a metakryloyl-tioetyl chitózanom (MTAC), dosiahol výbornú elektroaktivitu aj biokompatibilitu. V kultúrach PC12 buniek bol zaznamenaný nárast počtu neuritov o 50 %, ich predĺženie a schopnosť buniek migrovať. Navyše scaffold zlepšil bunkové prepojenie, čo je kľúčové pre efektívnu obnovu dlhších defektov, kde klasické autotransplantáty často zlyhávajú [95].

5.3.2 Regenerácia kostného tkaniva

Aj keď osteoblasty neprodukujú elektrické impulzy tak ako neuróny či kardiomyocyty, ukazuje sa, že ich rast, diferenciáciu a funkčnú aktivitu možno ovplyvniť pomocou elektrických podnetov. Výraznejšie účinky boli pozorované pri použití ECC. V štúdiu bol vytvorený 3D scaffold z poly(ϵ -kaprolaktónu) (PCL) s prídavkom dusíkom dopovaného grafénu (N-G) [96]. Tento typ grafénu má vyššiu elektrickú vodivosť než klasický grafén a zároveň lepšiu povrchovú hydratáciu, čo podporuje adhéziu a rast osteoblastov. Dôležitým zistením bolo, že scaffold dokázal aktivovať intracelulárne signálne dráhy súvisiace s osteogenezou aj bez externej elektrickej stimulácie. Konkrétne bola aktivovaná kalmodulínová signálna kaskáda, čo viedlo k zvýšeniu hladiny intracelulárneho vápnika, ktorý pôsobí ako sekundárny posol pri aktivácii génov zodpovedných za diferenciáciu buniek smerom k osteoblastom. V dôsledku tejto aktivácie sa pozorovala zvýšená produkcia mineralizovanej ECM, čo naznačuje, že elektricky vodivé kompozity môžu urýchliť proces **kostnej regenerácie** [97]. Vzhľadom na ich mechanickú stabilitu, biologickú kompatibilitu a schopnosť ovplyvniť bunkové správanie aj bez aplikácie externého poľa, sa tieto materiály javia ako sľubná možnosť pre použitie pri liečbe zle sa hojajúcich zlomenín, výplni kostných defektov alebo ako podpora okolo implantátov, kde je potrebné rýchle a kvalitné začlenenie do hostiteľského tkaniva [96].

6 BUDÚCE SMEROVANIE VÝSKUMU A APLIKÁCIÍ ECBS

Budúci vývoj sa zameriava na nové materiály schopné lepšie napodobniť elektrofyziologické prostredie živých tkanív. Okrem tradičných elektrónovo vodivých polymérov (napr. PPy, PANI) rastie záujem o iónovo vodivé hydrogély, ktoré vernejšie imitujú prenos iónových signálov v biologických systémoch [98]. Kombináciou elektrónovej a iónovej vodivosti v jednom hybride možno dosiahnuť efektívnejšie prepojenie medzi elektronickými zariadeniami a bunkami, čo je kľúčové napríklad pre *in vivo* biosenzory a stimulatory. Významný posun nastáva aj v oblasti výrobných technológií, kde sa využíva 3D tlač vodivých bioatramentov a elektrospinning na tvorbu poréznych scaffoldov s precízne riadenou vodivosťou a štruktúrou [99].

Nervové a srdcové tkanivá patria k hlavným cieľom pre elektrovodivé biomateriály. Vodivé polyméry a nanoštruktúry zabudované do nervových vodičov (tzv. nerve conduits) môžu podporiť rast axónov a obnovu nervových spojení, najmä ak sa skombinujú s riadenou elektrickou stimuláciou poškodeného miesta. Ešte povzbudivejšie sú *in vivo* výsledky na zvieracích modeloch, napríklad injikovateľný vodivý hydrogél s kmeňovými bunkami výrazne zlepšil funkciu srdca a znížil fibrózu v oblasti infarktu myokardu u potkanov [100]. Do budúca sa uvažuje aj o „inteligentných“ kostných implantátoch, ktoré by neplnili iba pasívnu opornú úlohu, ale dokázali by aktívne reagovať na fyziologické podnety, najmä na mechanickú záťaž, ktorej je kostné tkanivo prirodzene vystavené. Tieto implantáty by mohli priebežne generovať alebo usmerňovať slabé mikroprúdy v reakcii na tlak, napätie či ohyb, čím by imitovali prirodzené bioelektrické signály vznikajúce v zdravej kosti. V biologických podmienkach sa totiž preukázalo, že kostné bunky reagujú na mechanické podnety tvorbou tzv. streaming potenciálov, čo sú slabé elektrické polia generované prúdením iónov v ECM pri deformácii tkaniva. Tieto signály zohrávajú dôležitú úlohu pri aktivácii osteoblastov a spúšťaní kostnej regenerácie. Zavedením elektroaktívnych materiálov do implantátov by bolo možné napodobniť tento mechanizmus a lokálne stimulovať bunky bez potreby vonkajšej elektrickej stimulácie. Takýto prístup by mohol výrazne urýchliť regeneráciu a podporiť proces mineralizácie najmä v prípadoch zložitejších zlomenín, osteoporózy alebo veľkých kostných defektov [101].

Napriek sľubným pokrokom v oblasti vývoja elektricky vodivých biomateriálov zostáva ich prechod do klinickej praxe spojený s viacerými výzvami. Jednou z kľúčových podmienok je dlhodobá biokompatibilita a stabilita, keďže materiály musia spoľahlivo zachovávať svoje elektrické aj mechanické vlastnosti v komplexnom prostredí ľudského

tela [100]. Okrem toho je nevyhnutné vyriešiť otázku škálovateľnosti výroby, teda ako prejsť od laboratórnej syntézy malých vzoriek k spoľahlivej a efektívnej hromadnej produkcii. To si vyžaduje optimalizáciu procesov z hľadiska reprodukovateľnosti, sterilizácie a dlhodobého skladovania, pričom každá z týchto oblastí predstavuje samostatnú technickú aj regulačnú výzvu [76].

V neposlednom rade bude proces regulačného schvaľovania týchto nových biomateriálov mimoriadne prísny. Pred ich zavedením do klinickej praxe je nevyhnutné preukázať bezpečnosť a účinnosť v rozsiahlych *in vivo* experimentoch a následných klinických skúškach, čo predstavuje časovo náročný a finančne nákladný proces [101]. V nasledujúcich rokoch sa očakáva ďalší vývoj smerujúci k zlepšeniu funkčných vlastností a biologickej znášanlivosti týchto materiálov. Tieto inovácie by mohli viesť k vzniku novej generácie takzvaných inteligentných terapeutických implantátov, ktoré by neplnili iba pasívnu úlohu náhrady poškodeného tkaniva, ale zároveň by boli schopné aktívne ovplyvňovať elektrické mikroprostredie lézie a tým výrazne urýchliť regeneračné procesy [76].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 CIEĽ PRÁCE

- Hodnotenie cytokompatibility 3D scaffoldu na bázi elastoméru VistaMaxx s expandovateľným grafitom.
- Testovanie cytotoxicity týchto materiálov pomocou MTT testu na myších embryonálnych fibroblastoch NIH/3T3.
- Vyhodnotenie proliferácie myších embryonálnych fibroblastov NIH/3T3 na testovaných vzorkách.

8 MATERIÁL A METODIKA

8.1 Použité chemikálie

Pri experimentoch boli použité nasledovné chemické látky a reagenty:

- **ActinRed™ 555** (kat. č.: R37112, Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- **Calf Serum** (kat. č.: CA-115/500, Biosera, Francúzsko)
- **Dimetylsulfoxid (DMSO)** (kat. č.: 276855–100ML, Sigma Aldrich, USA)
- **Formaldehyd 36–38 %** (kat. č.: 14150-11000, Penta s. r. o., Česká republika)
- **Fosfátový pufor (PBS)** (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, kat. č.: LM-S2041/500, BioSera, Francúzsko)
- **Hoechst 33258** (kat. č.: H3569, Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA)
- **Médium DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories GmbH, Rakúsko; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)
- **MTT** (Invitrogen Corporation, USA)
- **Penicillin/streptomycin** (GE Healthcare HyClone, Veľká Británia)
- **Triton™ X–100** (kat. č.: X100-100ML, Sigma Aldrich, USA)
- **Trypsín** (kat. č.: XC-T1717/100, Biosera, Francúzsko)

8.2 Použité prístroje

V rámci experimentálnej časti boli využité nasledujúce laboratórne zariadenia:

- **Centrifúga 5702 R** (Eppendorf, Česká republika)
- **Fluorescenčný mikroskop Olympus IX81 s fázovým kontrastom** (Olympus, Japonsko)
- **Hnetač Plastograph; Brabender W50 EHT PL** (Brabender, Nemecko)
- **Inkubátor Heracell™ 150i** (ThermoFisher Scientific, USA)
- **Inverzný mikroskop IX51** (Olympus, Japonsko)
- **Konfokálny mikroskop** (Olympus, Japonsko)

- **Laminárny box Bio130 A2 s príslušenstvom** (Alpina, Poľsko)
- **Skenovací elektrónový mikroskop Tescan** (Tescan, Česká republika)
- **Spektrofotometer INFINITE M200 PRO NanoQuant** (Tecan, Švajčiarsko)
- **Trepacia jednotka Vortex GENIE 2** (Scientific Industries, USA)

8.3 Kompozitný vodivý materiál

Testované scaffoldy pozostávali z kompozitného vodivého materiálu na báze elastoméru **VistaMaxx Performance Polymer 6202** (ExxonMobil) s prídavkom **expandovateľného grafitu** (EG 500 F5 pH, Graphit Kropfmühl GmbH). VistaMaxx je elastomér na báze izotaktického polypropylénu s náhodne rozptýlenými etylénovými jednotkami, ktorý sa vyznačuje elastickými vlastnosťami, chemickou stabilitou, a kompatibilitou s rôznymi typmi plnív, čo umožňuje vytváranie homogénnych kompozitných štruktúr. V tomto prípade bol zvolený najmä pre svoju pružnosť a stabilitu v biologickom prostredí, zatiaľ čo expandovateľný grafit zabezpečoval v kompozite elektrickú vodivosť a tvorbu pórovitej štruktúry. V experimente boli použité dve varianty scaffoldov: **70/30** (70 % VistaMaxx, 30 % expandovateľný grafit) a **60/40** (60 % VistaMaxx, 40 % expandovateľný grafit).

V rámci praktickej časti bakalárskej práce bola testovaná cytokompatibilita tohto materiálu prostredníctvom stanovenia cytotoxicity a sledovania bunkovej proliferácie bunkovej línie NIH/3T3.

8.4 Príprava kompozitného vodivého materiálu

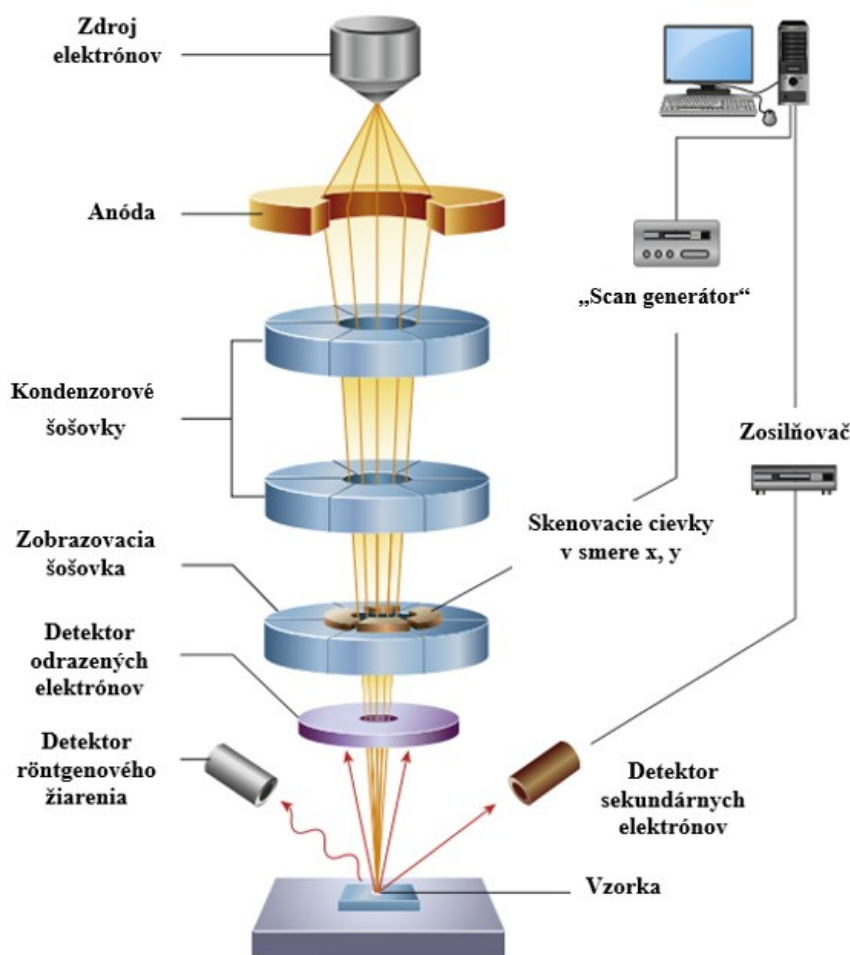
Zmes elastoméru VistaMaxx/EG bola homogenizovaná za použitia hnetača pri teplote 190 °C a 50 rpm po dobu 5 minút.

Z homogénnej zmesi boli následne vylisované doštičky s hrúbkou 1 mm pri teplote 190 °C. Z týchto doštičiek boli vyrezané časti s rozmermi 35 × 35 mm, ktoré sa následne podrobili expandácii vo forme s rozmermi 35 × 35 × 5 mm pri teplote 260 °C po dobu 15 minút. Obe varianty scaffoldov (70/30 a 60/40) boli pripravené rovnakým postupom.

8.5 Charakterizácia kompozitného vodivého materiálu

Pripravený materiál bol analyzovaný pomocou dvoch metód, a to skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM) a dvojbodovej metódy určovania elektrickej vodivosti.

8.5.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia



Obrázok 6 Schéma princípu fungovania SEM

(zdroj: [102])

SEM je technika využívajúca zväzok elektrónov namiesto svetla na detailné pozorovanie povrchovej morfológie materiálov. Vysoké rozlíšenie SEM umožňuje analyzovať aj veľmi jemné mikroštruktúry, ako sú pórovitosť scaffoldov alebo rozloženie častíc. Na obrázku 6 je znázornená schéma konštrukcie a princíp fungovania SEM. Elektróny sú generované v zdroji elektrónov a urýchľované pomocou anódy. Ich zväzok je následne usmerňovaný cez systém kondenzorových šošoviek a zobrazovacej šošovky, ktoré

zabezpečujú jeho zaostrenie do tenkého lúča. Elektrónový lúč je pomocou skenovacích cievok v smere x a y postupne vychýľovaný tak, aby systematicky prechádzal povrchom vzorky po jednotlivých riadkoch. Tento pohyb umožňuje zmapovanie celého povrchu a vytvorenie detailného obrazu na základe signálov generovaných pri dopade elektrónov na vzorku. Pri dopade elektrónov na vzorku dochádza k interakciám, ktoré vedú k uvoľňovaniu rôznych druhov signálov. Vznikajú sekundárne elektróny (detegované detektorom sekundárnych elektrónov), odrazené (späť rozptýlené) elektróny (zachytávané detektorom odrazených elektrónov) a charakteristické röntgenové žiarenie, ktoré je zaznamenávané detektorom röntgenového žiarenia. Získané dáta sú zosilňované pomocou zosilňovača, synchronizované cez „scan generátor“ a následne spracované počítačom, ktorý vytvára výsledný obraz povrchu skúmanej vzorky [102].

8.5.2 Dvojbodová metóda merania vodivosti

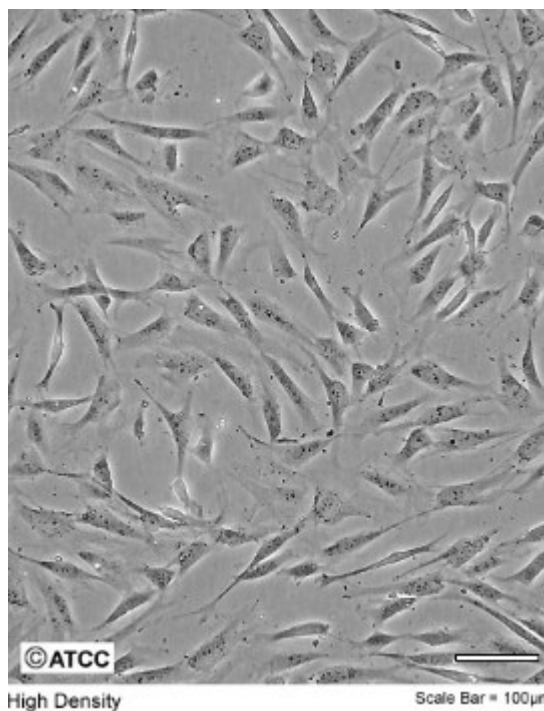
Dvojbodová metóda bola použitá na stanovenie elektrickej vodivosti scaffoldov. Vzorka bola umiestnená medzi dve zlaté elektródy, ktoré boli pripojené k elektrometru Keithley. Elektrometrom bol meraný prúd prechádzajúci vzorkou pri aplikácii napätia. Zo získaných hodnôt napätia a prúdu bol pomocou Ohmovho zákona vypočítaný elektrický odpor materiálu a následne vodivosť, ktorá je recipročnou hodnotou odporu. Ide o bežnú metódu merania elektrickej vodivosti najmä pevných materiálov. Výhodou metódy je jej jednoduchosť a rýchle prevedenie, ktoré nevyžaduje špeciálne vybavenie. Nevýhodou je nižšia presnosť pri vzorkách s nízkou vodivosťou [103].

Keďže skúmaný scaffold má poréznu štruktúru a obsahuje vodivé častice (expandovateľný grafit), bola táto metóda vhodná na jeho charakterizáciu. Umožnila získať spoľahlivé údaje o vodivosti bez nutnosti špeciálneho upravovania kontaktov alebo komplikovaných výpočtov odporu.

8.6 Biologický materiál

8.6.1 Bunkové línie

Použitá bola bunková línia myších embryonálnych fibroblastov NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, American Type Culture Collection, ATCC), ktorá patrí medzi stabilné a široko využívané modely v oblasti biomedicínskeho výskumu. Morfológia buniek je zobrazená na obrázku 7. Fibroblasty sú bunky mezenchymálneho pôvodu, ktoré sa podieľajú na tvorbe ECM a zohrávajú významnú úlohu pri regenerácii tkanív a hojení rán.



Obrázok 7 Bunková línia NIH/3T3 pozorovaná pod svetelným mikroskopom

(zdroj: [104])

V laboratórnych podmienkach sa tieto bunky vyznačujú schopnosťou dlhodobej kultivácie a rýchlej proliferácie, čo umožňuje ich opakované využitie pri testovaní biomateriálov. Často sú používané na hodnotenie biokompatibility, cytotoxicity a bunkových interakcií, pričom sa sleduje ich príľnavosť, morfológia a schopnosť proliferácie v kontakte s rôznymi povrchmi [105].

8.6.2 Kultivačné médium

Bunky boli kultivované v živnom médiu, ktorého zloženie bolo nasledovné: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10 % Calf Serum a $100 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicilín/streptomycín.

8.6.3 Pestovanie bunkových kultúr

Manipulácia s bunkovou líniou myších fibroblastov prebiehala v sterilnom prostredí laminárneho boxu a udržiavali sa v inkubátore pri 37°C so zvlhčeným vzduchom a obsahom 5 % CO_2 . Pasážovanie sa vykonávalo po dosiahnutí približne 80 % konfluencie, pričom celý proces zahŕňal sériu krokov zameraných na uvoľnenie buniek z povrchu kultivačnej nádoby a ich následný presun do nového média.

Najskôr bolo opatrne odstránené pôvodné kultivačné médium, aby sa predišlo poškodeniu adherovaných buniek. Následne bol do kultivačnej nádoby pridaný fosfátový pufo (PBS) v objeme $0,2 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$, ktorý umožnil odstrániť zvyšky média a stabilizovať bunkové prostredie. Po jeho odsátí bol aplikovaný trypsín-EDTA v objeme $0,1 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$, ktorý bol ponechaný pri inkubačnej teplote, aby postupne narušil väzby medzi bunkami navzájom, ako aj ich prichytenie k povrchu nádoby. Proces enzymatického uvoľňovania prebiehal približne 15 minút, pričom po jeho dokončení bol trypsín deaktivovaný pridaním 7 ml čerstvého kultivačného média.

Takto získaná bunková suspenzia bola presunutá do centrifugačnej skúmavky a podrobená centrifugácii pri 37°C počas 3 minút pri 1100 rpm, čím sa bunky separovali od zvyškového média. Supernatant obsahujúci trypsín bol následne odstránený a bunky usadené na dne skúmavky boli resuspendované v 2 ml čerstvého kultivačného média, pričom výsledná koncentrácia dosahovala približne 10^7 buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Pre ďalšiu kultiváciu bola časť bunkovej suspenzie prenesená do novej kultivačnej nádoby T75 s 25 ml média, čím sa zabezpečila kontinuita bunkového rastu. Zároveň bola pripravená samostatná suspenzia s koncentráciou 10^5 buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ pre vyhodnotenie cytotoxicity, 2×10^5 buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ pre vyhodnotenie proliferácie.

8.7 Experimentálne metódy a hodnotiace postupy

8.7.1 Biokompatibilita

Biokompatibilita predstavuje základný predpoklad pre úspešné využitie biomateriálov v medicíne, keďže zabezpečuje ich toleranciu v organizme bez vyvolania negatívnych imunitných reakcií. Materiál musí byť schopný harmonicky interagovať s okolitými bunkami a tkanivami, pričom jeho prítomnosť nesmie spôsobovať zápal, cytotoxicitu ani iné nežiaduce biologické odozvy. Okrem samotnej chemickej stability a biologickej inertnosti sa pri hodnotení biokompatibility posudzuje aj schopnosť materiálu podporovať príľnavosť buniek, ich rast a diferenciáciu.

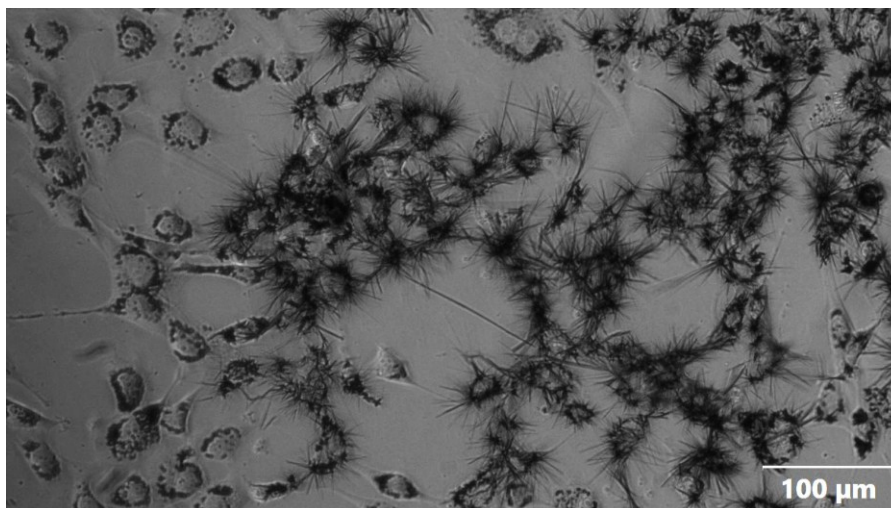
V prípade implantovateľných materiálov je nevyhnutné, aby neviedli k vzniku fibrózy alebo chronických zápalových procesov, ktoré by mohli ohroziť ich funkčnosť. Všetky tieto faktory sú starostlivo analyzované prostredníctvom štandardizovaných *in vitro* a *in vivo* testov, ktoré umožňujú predpovedať reakciu organizmu na daný biomateriál [43].

8.7.2 Cytokompatibilita

Cytokompatibilita je špecifický pojem opisujúci správanie sa buniek v priamom kontakte s testovaným materiálom v *in vitro* prostredí. Zatiaľ čo biokompatibilita hodnotí komplexnú reakciu organizmu vrátane imunitnej tolerancie, cytokompatibilita sa zameriava výlučne na bunkovú životaschopnosť, schopnosť adhézie a proliferácie. Jej testovanie prebieha v kontrolovaných laboratórnych podmienkach a predstavuje jeden z prvých krokov pri predklinickom hodnotení nových biomateriálov [43].

8.7.3 Cytotoxicita – MTT test

MTT test je často používaná kolorimetrická metóda na hodnotenie bunkovej životaschopnosti a metabolickej aktivity. Tento test je založený na redukcii žltého tetrazóliového farbiva MTT [3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyyl-tetrazóliumbromid] na nerozpustné fialové kryštály formazanu, ktoré sa tvoria výlučne v metabolicky aktívnych bunkách.



Obrázok 8 Formazanové kryštály vzniknuté po inkubácii buniek s MTT roztokom

(zdroj: vlastný)

Premena prebieha prostredníctvom mitochondriálnych enzýmov, primárne závislých od koenzýmu NAD(P)H a sukcinátdehydrogenázy. Keďže redukcia MTT je priamo spojená s aktivitou mitochondrií, množstvo vytvoreného formazanu slúži ako indikátor metabolizmu buniek. Mikroskopické zobrazenie formazanových kryštálov bolo získané pomocou inverzného svetelného mikroskopu (Obrázok 8).

Po inkubácii buniek s MTT je vytvorený formazan rozpustený v organickom rozpúšťadle, akým je dimetylsulfoxid (DMSO), čím vzniká farebný roztok. Optická hustota tohto roztoku sa následne meria spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 570 nm, pričom intenzita farby je úmerná množstvu životaschopných buniek v analyzovanom vzorku. Výhodou MTT testu je jeho vysoká citlivosť, jednoduchosť a schopnosť poskytovať kvantitatívne výsledky. Napriek tomu môže byť test ovplyvnený viacerými faktormi, ako je heterogenita bunkovej populácie alebo zloženie kultivačného média, čo je potrebné zohľadniť pri interpretácii výsledkov [106].

Prevedenie:

Na testovanie cytotoxicity bola pripravená bunková suspenzia s koncentráciou 10^5 buniek·ml⁻¹, ktorá bola následne napipetovaná do 96-jamkovej mikrotitračnej platne. Po 24-hodinovej inkubácii pri štandardných podmienkach bolo kultivačné médium nahradené roztokmi extraktov pripravenými zo scaffoldov, ktoré boli zriedené v médiu na objemové koncentrácie 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % a 1 %. Príprava extraktov bola vykonaná v súlade s normou ISO 10993-12, ktorá špecifikuje požiadavky na prípravu vzoriek pre biologické testovanie zdravotníckych materiálov. Konkrétne bol použitý hmotnostný pomer 0,2 g vzorky na 1 ml extrakčného média. Vzorky boli následne inkubované pri 37 °C počas 24 hodín na trepačke, aby došlo k uvoľneniu prípadných cytotoxických látok do média. Po inkubácii boli extrakty sterilne separované pomocou filtrov a použité na testovanie cytotoxicity. Ako referenčná vzorka slúžili bunky kultivované v čistom médiu bez prídavku testovaného materiálu.

V každej jamke bol celkový objem upravený na 100 µl, pričom napríklad pri koncentrácii 75 % bolo pipetovaných 75 µl testovaného roztoku a 25 µl kultivačného média. Pripravené platne boli následne umiestnené do inkubátora, kde bunky zotrvali ďalších 24 hodín. Pred samotným vykonaním MTT testu bola vykonaná vizuálna kontrola buniek pod inverzným mikroskopom, aby sa zhodnotil ich stav a morfológia.

Po tejto kontrole bol z každej jamky odsatý zvyšný roztok a následne bolo pridaných 90 µl čerstvého kultivačného média spolu s 10 µl roztoku MTT v konečnej koncentrácii 0,5 mg·ml⁻¹. Po aplikácii MTT boli mikrotitračné platne inkubované po dobu 4 hodín, čím došlo k tvorbe nerozpustného formazanu v metabolicky aktívnych bunkách. Po odstránení obsahu jamiek odsávaním bolo pridaných 80 µl DMSO, ktoré rozpustilo vzniknuté kryštály formazanu. Po 15 minútovej inkubácii bola absorbancia meraná

pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou spektrofotometra, pričom získané dáta boli spracované a vizualizované vo forme grafov.

8.7.4 Proliferácia buniek na vzorkách

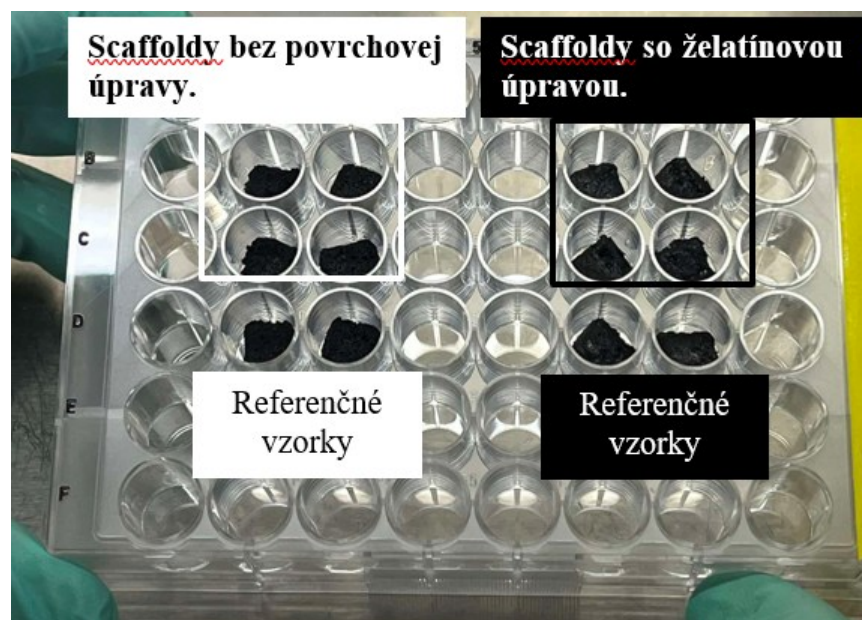
Proliferácia je ovplyvnená mnohými faktormi, ako sú chemické a fyzikálne vlastnosti biomateriálu, interakcia buniek s ECM a prítomnosť rastových faktorov v prostredí. Ak je adhézia buniek na materiál úspešná, ďalším rozhodujúcim faktorom je ich schopnosť proliferovať, čím sa zabezpečuje dostatočné osídlenie biomateriálu bunkami a jeho potenciálna integrácia do tkaniva. [107]

Na hodnotenie proliferácie sa využívajú rôzne mikroskopické metódy, pričom dôležitú úlohu zohráva fluorescenčné značenie bunkových štruktúr. Aktínové vlákna cytoskeletu sa vizualizujú pomocou farbiva ActinRed™ 555, ktoré umožňuje sledovanie štruktúry bunky a jej interakcie s materiálom. Jadrá buniek sú kontrastne farbené Hoechst 33258, čo poskytuje prehľad o ich distribúcii a hustote na scaffoldde.

Prevedenie:

V rámci experimentu bola skúmaná adhézia a proliferácia myších embryonálnych fibroblastov (NIH/3T3) na scaffoldoch s odlišnými povrchovými úpravami. Na tento účel boli substráty rozdelené na menšie segmenty a sterilizované ponorením do 70 % etanolu po dobu 20 minút. Následne boli jednotlivé vzorky umiestnené do 48-jamkovej mikrotitračnej doštičky a uložené do flowboxu, kde sa nechali odpariť zvyšky etanolu. Pre zvýšenie priľnavosti buniek bola jedna séria vzoriek ošetrená 1 ml 0,1 % želatínového roztoku, druhá séria bola testovaná bez ošetrenia želatínou a ako referencia bol použitý tkanivový plastik. Každá séria bola testovaná v troch opakovaníach. Schéma experimentu je zobrazená na obrázku 9. Na pripravené substráty bola pridaná bunková suspenzia s hustotou 2×10^5 buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Po nasadení buniek nasledovala 48-hodinová inkubácia, počas ktorej boli vytvorené podmienky na adhéziu a rast buniek na scaffoldoch. Po uplynutí inkubačnej doby bolo médium odstránené a bunky boli fixované 4 % formaldehydovým roztokom s expozičným časom 15 minút pri izbovej teplote. Aby sa eliminovali zvyšky fixačného činidla, vzorky boli premyté fosfátovým pufrom (PBS). Následne sa pristúpilo k permeabilizácii bunkových membrán pomocou 0,5 % roztoku Triton X-100, ktorý pôsobil 5 minút pri izbovej teplote. Po ukončení permeabilizácie boli vzorky opakovane premyté PBS pufrom s cieľom odstrániť zvyškové množstvá činidla.



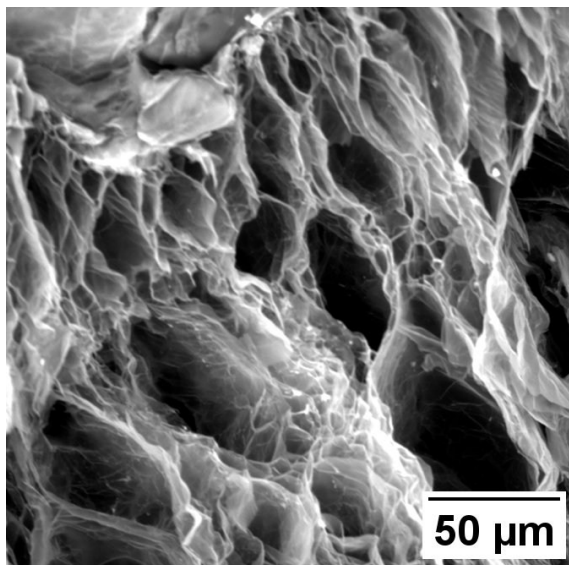
Obrázok 9 Scaffolds s rôznou povrchovou úpravou pripravené na test proliferácie buniek

(zdroj: vlastný)

Bunkové štruktúry boli následne vizualizované pomocou fluorescenčných farbív. Na zvýraznenie aktínového cytoskeletu bola použitá 1 - 2 kvapky ActinRed™ 555, zatiaľ čo farbenie jadrového materiálu bolo realizované pridaním 20 μ l Hoechst 33258. Inkubácia farbív prebiehala 30 minút v tme, aby sa minimalizovala fotodegradácia. Po tejto dobe boli vzorky opakovane premyté PBS pufrom na odstránenie prebytočného farbiva. Takto pripravené bunkové kultúry boli následne analyzované konfokálnou mikroskopiou s cieľom posúdiť proliferáciu fibroblastov na jednotlivých scaffoldoch. Výsledky sú prezentované vo forme mikrofotografií.

9 VÝSLEDKY A DISKUSIA

9.1 SEM analýza

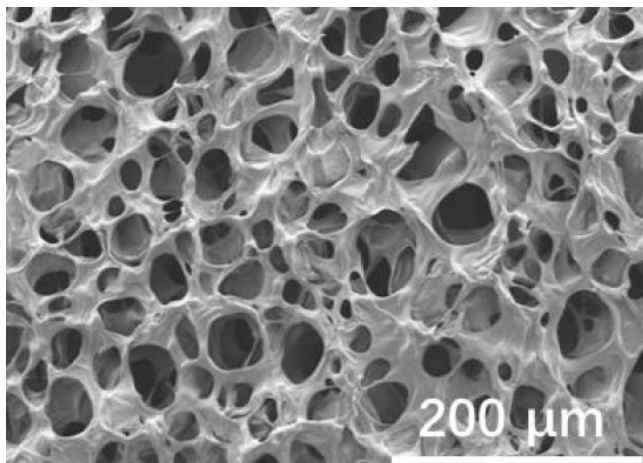


Obrázok 10 SEM snímka VistaMaxx/EG scaffoldu 60/40

(zdroj: vlastný)

SEM analýza vzorkov potvrdila pórovitú štruktúru, ktorá vznikla expanziou grafitu v elastomére. Na obrázku 10 možno vidieť, že póry majú rôznu veľkosť pohybujúcu sa okolo 50 µm. Ďalej bola pozorovaná prepojenosť (interkonektivita) pórov – teda miera prepojenia medzi jednotlivými pórmí, ktorá umožňuje bunkám pohybovať sa naprieč scaffoldom a rovnomerne osídliť celý objem materiálu. Táto prepojenosť štruktúry je obzvlášť významná pri aplikáciách v tkanivovom inžinierstve, kde je cieľom nielen vytvoriť mechanickú oporu, ale aj zabezpečiť priaznivé mikroprostredie podporujúce regeneráciu. Okrem toho môže takto rozvetvená pórovitá sieť ovplyvniť aj kinetiku degradácie materiálu a uvoľňovanie prípadných bioaktívnych látok, čo robí z týchto scaffoldov nielen pasívny nosič, ale aj potenciálne aktívnu súčasť liečebnej stratégie [108].

Pórovitá architektúra scaffoldov VistaMaxx/EG zohráva zásadnú úlohu v súvislosti s ich biologickým správaním. Takáto architektúra vytvára priaznivé podmienky pre adhéziu, migráciu a proliferáciu buniek, ako aj pre výmenu živín a odvod metabolitov počas bunkovej kultivácie.



Obrázok 11 SEM snímka CHI/grafénoxidového scaffoldu

(zdroj: [109])

Pre ilustráciu rozdielov vo vnútornej morfológii scaffoldov pripravených rôznymi technikami možno porovnať SEM snímku scaffoldu VistaMaxx/EG vytvoreného expandáciou (Obrázok 10) so snímku CHI/grafénoxidového (GO) pripraveného lyofilizáciou, ako ju prezentovali Yang et al. (2021) (Obrázok 11). Zatiaľ čo v prípade VistaMaxx/EG scaffoldu možno pozorovať nepravidelnú, rozvetvenú a menej organizovanú poréznu štruktúru, scaffold z chitozánu a grafénového oxidu vykazuje výrazne homogénnejšiu a usporiadanejšiu morfológiu pórov. Táto pravidelnosť pórov vznikla v dôsledku lyofilizačného procesu a môže pozitívne ovplyvňovať distribúciu buniek aj transport živín v tkanivovom inžinierstve. Tento rozdiel je dôsledkom odlišného mechanizmu tvorby pórov – pri lyofilizácii vznikajú póry sublimáciou rozpúšťadla, čo zvyčajne vedie k väčšej symetrii, kým expandácia grafítu vytvára nepravidelnejšiu štruktúru [110].

9.2 Elektrická vodivosť materiálu

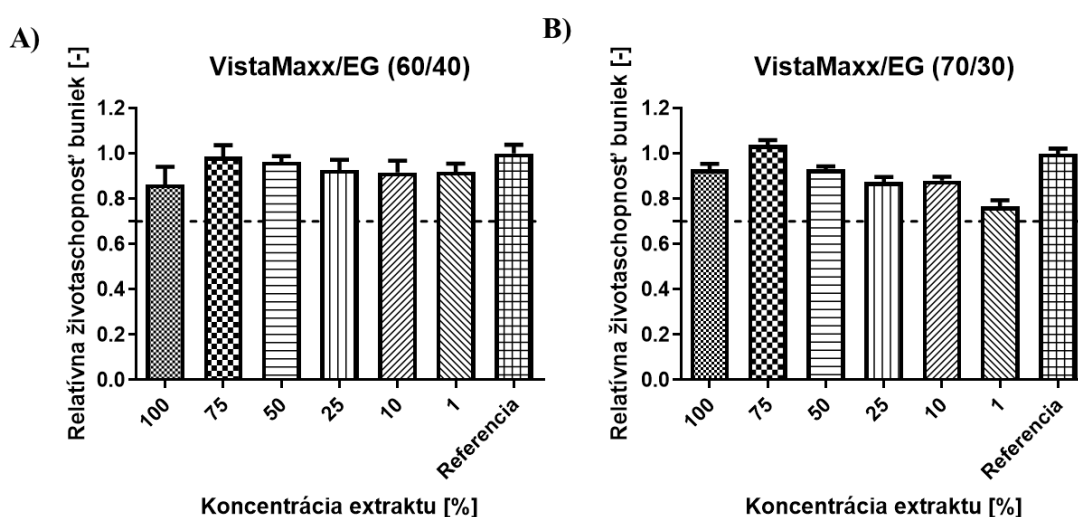
Elektrická vodivosť bola stanovená pomocou dvojbodovej metódy. Scaffold VistaMaxx/EG 70/30 vykazoval vodivosť $2,5 \times 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, zatiaľ čo varianta s vyšším podielom vodivého grafítu (60/40) dosiahla hodnotu $3,5 \times 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tento nárast korešponduje s vyšším objemovým podielom vodivej fázy, ktorá po prekročení perkolančného prahu vytvára spojitú sieť pre efektívny prenos elektrického náboja.

Z literatúry je známe, že už 5–10 % uhlíkového nanoplňiva dokáže zvýšiť vodivosť nevodivého polyméru ($10^{-13} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$) na úroveň polovodiča ($10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$), čo naše výsledky potvrdzujú. Pre porovnanie, CHI/GO scaffold zo spomínanej štúdie dosahoval vodivosť

až $2,83 \times 10^{-3}$ S/cm, čo je rádovo vyššia hodnota. Tento rozdiel možno pripísať rozdielnemu typu matrice, ako aj efektívnejšiemu rozptýleniu grafénoxidových vločiek, ktoré vytvárajú hustú a rovnomernú vodivú sieť [109].

Ako uvádza Nezakati et al., rovnomerná dispergácia vodivej zložky je rozhodujúca – agregácia častíc vedie k vzniku nevodivých oblastí a zníženiu celkovej vodivosti. Naše výsledky naznačujú, že grafit bol v matrici rozptýlený dostatočne homogénne na zabezpečenie spojitého vodivého prepojenia vnútri scaffoldov [87].

9.3 Cytotoxicita scaffoldov – MTT test



Obrázok 12 Relatívna životaschopnosť buniek po kultivácii s extraktmi scaffoldu VistaMaxx/EG (60/40) (A) a VistaMaxx/EG (70/30) (B)

(zdroj: vlastný)

Grafy na obrázku 12 zobrazujú relatívnu životaschopnosť buniek po inkubácii s extraktmi pripravenými zo scaffoldov VistaMaxx/EG s hmotnostným pomerom 60/40 (A) a 70/30 (B). Pri oboch testovaných variantoch scaffoldov bola životaschopnosť buniek vo všetkých koncentráciách extraktu vyššia než 0,7, čo podľa normy ISO 10993-5 zodpovedá necytotoxickému materiálu. V prípade vzorky VistaMaxx/EG (60/40) boli všetky hodnoty relatívnej životaschopnosti blízke referenčnej vzorke a pohybovali sa v rozmedzí 0,85 až 0,95, pričom najvyššiu životaschopnosť dosiahla koncentrácia 75 %. U variantu VistaMaxx/EG (70/30) boli hodnoty mierne nižšie, no stále nad bezpečnostným prahom cytotoxicity.

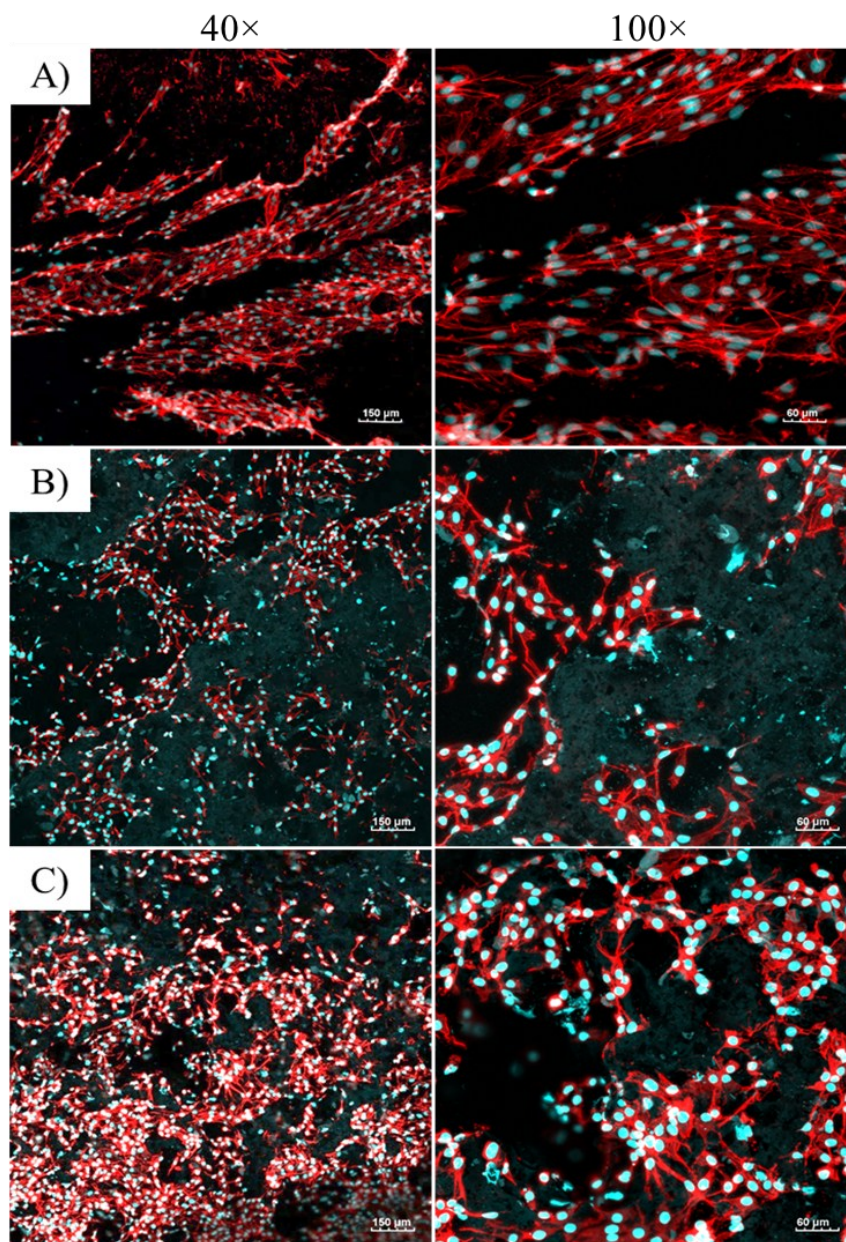
Zaujímavým pozorovaním je, že hodnoty životaschopnosti buniek pri variante VistaMaxx/EG (60/40) zostávajú veľmi konzistentné naprieč všetkými koncentraciami extraktu. Táto stabilita môže svedčiť o nízkej miere uvoľňovania potenciálne cytotoxických látok a zároveň o homogénnejšom zakomponovaní vodivého plniva do polymérnej matrice. Scaffold s vyšším obsahom grafitu tak preukázal nielen vysokú úroveň cytokompatibility, ale aj priaznivú materiálovú stabilitu v podmienkach extrakcie. Naopak, mierne kolísanie hodnôt pri variante 70/30 môže súvisieť s jemnými rozdielmi v interakcii materiálu s extrakčným médiom alebo variabilitou v distribúcii grafitovej zložky.

V niektorých prípadoch sa pri nižších koncentráciách extraktu zaznamenala mierne zvýšená životaschopnosť buniek, avšak bez konzistentného trendu naprieč všetkými vzorkami. Tento jav môže súvisieť s nižšou chemickou záťažou prostredia, prípadne s prirodzenou variabilitou medzi opakovaniami. V odbornej literatúre sa podobné pozorovania niekedy spájajú s tzv. hormetickým efektom – javom, pri ktorom veľmi nízke dávky stresových alebo stimulačných faktorov paradoxne vedú k aktivácii bunkových obranných mechanizmov, čím dochádza k zlepšeniu ich vitality a metabolickej aktivity. V prípade testovaných scaffoldov by takýto efekt mohol teoreticky súvisieť s miernym uvoľňovaním látok, ktoré v nízkych koncentráciách bunky nepoškodzujú, ale skôr podporujú ich funkcie [111]. Hoci túto hypotézu nemožno na základe dostupných údajov jednoznačne potvrdiť, je zaujímavým podnetom pre ďalší výskum v oblasti interakcie biomateriálov s bunkami.

Celkovo možno konštatovať, že scaffoldy VistaMaxx/EG nevykazovali cytotoxický účinok ani pri 100 % extraktoch, čo potvrdzuje ich dobrú cytokompatibilitu. Tento výsledok je obzvlášť dôležitý vzhľadom na prítomnosť uhlíkovo-vodivého komponentu, EG, ktorého cytotoxicita môže byť za určitých podmienok problémom [84].

9.4 Proliferace NIH/3T3 na scaffoldech

Obrázok 13 a Obrázok 14 zobrazujú porovnanie bunkovej distribúcie a morfológie pri oboch zloženiach scaffoldov v dvoch zväčšeniach (40× a 100×). Referenciou je tkanivový plastik, na ktorom sú bunky dobre rozprestreté, so zachovanou typickou fibroblastickou morfológiou a vysokou hustotou.

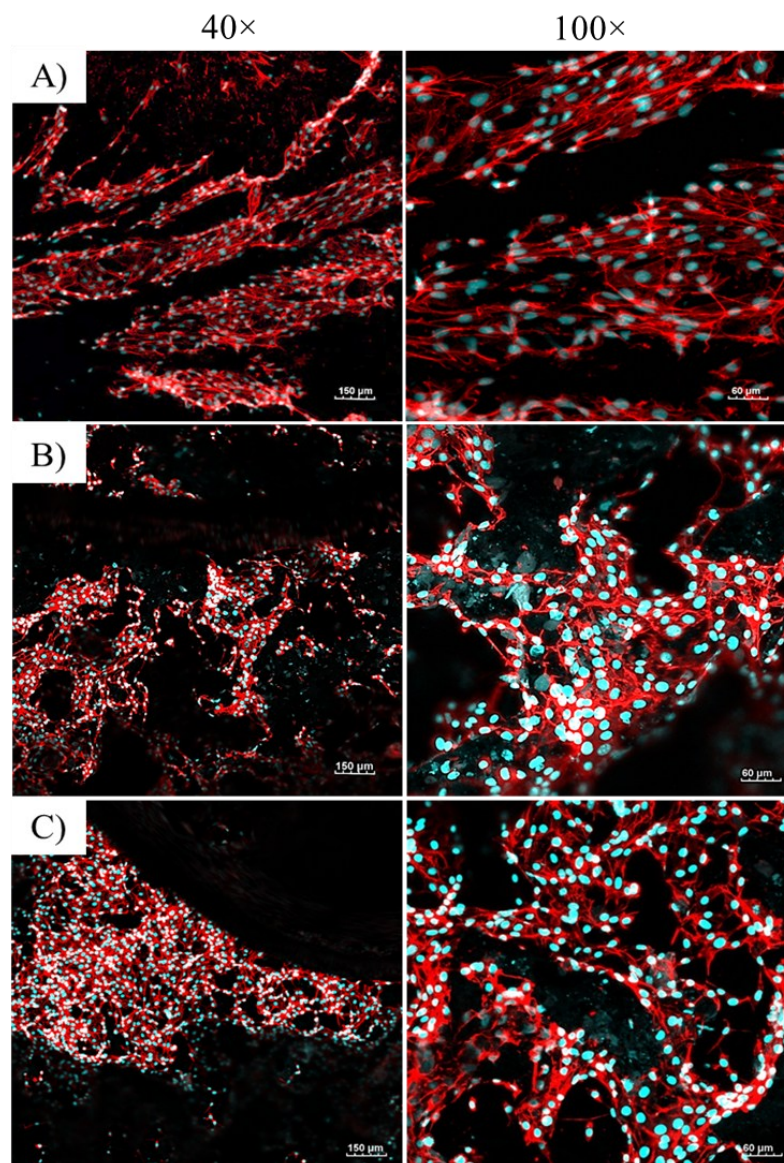


Obrázok 13 Fluorescenčné mikrofotografie bunkovej línie NIH/3T3 na scaffoldoch VistaMaxx/EG (60/40): **A)** Referencia, **B)** scaffold s povrchovou úpravou želatínou (Gel+), **C)** scaffold bez želatíny (Gel–), zväčšenie 40× a 100×

(zdroj: vlastný)

Obrázok 13 prezentuje porovnanie distribúcie buniek a ich morfológie na referenčnej vzorke (A), scaffolde VistaMaxx/EG (60/40) s povrchovou úpravou želatínou (B) a scaffold bez povrchovej úpravy (C), pri dvoch úrovniach zväčšenia (40× a 100×). Z výsledkov vyplýva, že bunková línia NIH/3T3 bola schopná adherovať, proliferovať a zachovávať si životaschopnosť na scaffoldoch v rozsahu porovnateľnom s referenciou. Pri hodnotení vplyvu povrchovej úpravy sa scaffold bez želatínovej vrstvy (Gel–) javil

ako vhodnejší variant, keďže podporoval vyššie osídlenie povrchu pri zachovaní elipsoidnej morfológie buniek aj pri zvýšenej hustote. Pozorované morfologické zmeny, charakterizované redukciou aktínových filamentov, možno pripísať pórovitej architektúre scaffoldov.



Obrázok 14 Fluorescenčné mikrofotografie bunkovej línie NIH/3T3 na scaffoldoch VistaMaxx/EG (70/30): **A)** Referencia, **B)** scaffold s úpravou želatínou (Gel+), **C)** scaffold bez úpravy (Gel-), zväčšenie 40× a 100×

(zdroj: vlastný)

Obrázok 14 prezentuje porovnanie bunkovej distribúcie a morfológie referenčnej vzorky (A), scaffoldu VistaMaxx/EG (70/30) s povrchovou úpravou pomocou želatíny (B) a scaffoldu bez povrchovej úpravy (C) pri dvoch úrovniach zväčšenia (40× a 100×). Pri vzorke s nižším obsahom grafitu bolo možné pozorovať tvorbu bunkových zhlukov v porovnaní s referenciou. Medzi scaffoldmi s a bez povrchovej úpravy sa nepreukázali výrazné rozdiely. Prítomnosť zhlukov a menej rovnomerná distribúcia buniek v prípade oboch scaffoldov v porovnaní s referenciou pravdepodobne súvisí s ich pórovitou štruktúrou. Morfológia buniek sa však od referencie výraznejšie nelíšila.

Napriek tomu, že povrchová úprava scaffoldov želatínou môže zlepšovať bunkovú adhéziu, výsledky proliferácie naznačujú, že scaffoldy VistaMaxx/EG poskytovali priaznivé prostredie pre rast buniek aj bez povrchovej modifikácie. Tento jav môže byť spojený so zvýšenou povrchovou energiou alebo topografickými vlastnosťami materiálu, ktoré prirodzene podporujú adhéziu buniek.

Celkovo možno konštatovať, že pripravené scaffoldy VistaMaxx/EG podporujú proliferáciu fibroblastov NIH/3T3. Povrchová úprava scaffoldov želatínou bola realizovaná s cieľom vytvoriť bioaktívne prostredie, ktoré môže ovplyvniť správanie buniek v kontakte s materiálom. Želatína, ako denaturovaný kolagén, obsahuje sekvencie (napr. RGD – Arginín-Glycín-Aspartát), ktoré sú rozpoznávané integrínovými receptormi na povrchu buniek a môžu podporiť ich interakciu s podkladom [112].

ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo preskúmať potenciál elektricky vodivých materiálov v oblasti tkanivového inžinierstva, a to prostredníctvom prípravy a charakterizácie kompozitných scaffoldov na báze elastoméru VistaMaxx a expandovateľného grafítu.

V teoretickej časti bola spracovaná odborná literatúra zameraná na princípy tkanivového inžinierstva, úlohu elektrickej vodivosti v regenerácii tkanív a vlastnosti vodivých biomateriálov. Praktická časť sa zamerala na syntézu scaffoldov VistaMaxx/EG v dvoch hmotnostných pomeroch (60/40 a 70/30), ktoré boli následne podrobené analýze mikroštruktúry (SEM), stanovenia elektrickej vodivosti (dvojbodová metóda), cytotoxicity (MTT test) a proliferácie buniek (fluorescenčná mikroskopia).

Získané výsledky preukázali, že pripravené scaffoldy majú vhodnú poréznu štruktúru, ktorej charakter je ovplyvnený metódou prípravy (expandácia grafítu), a súhlasia so záznamami v odbornej literatúre. Hodnoty elektrickej vodivosti sa pohybovali v rozsahu $10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, čo potvrdzuje tvorbu spojitkej vodivej siete v kompozite. Cytotoxicita bola pri oboch vzorkách minimálna a relatívna životaschopnosť buniek presiahla 0,7 v každej testovanej koncentrácii extraktu. Okrem toho scaffoldy podporovali proliferáciu fibroblastov, umožňovali ich adhéziu a rast bez výraznej zmeny morfológie.

Práca ukázala, že vhodné kombinovanie polymérov a vodivých plnív môže viesť k vzniku cytokompatibilných materiálov s potenciálom pre aplikácie v tkanivovom inžinierstve. Napriek tomu, že ide len o úlomok rozsiahlej problematiky, práca otvára priestor pre ďalší výskum zameraný na mechanické vlastnosti, dlhodobú stabilitu a reakcie v multibunkových systémoch.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] ZHAO, Guoxu, Hongwei ZHOU, Guorui JIN, Birui JIN, Songmei GENG, Zhengtang LUO, Zigang GE a Feng XU. Rational design of electrically conductive biomaterials toward excitable tissues regeneration. *Progress in Polymer Science* [online]. 2022, **131**, 101573. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2022.101573
- [2] GUO, Baolin a Peter X. MA. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* [online]. 2018, **19**(6), 1764–1782. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b00276
- [3] BALINT, Richard, Nigel J. CASSIDY a Sarah H. CARTMELL. Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2013, **19**(1), 48–57. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2012.0183
- [4] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88–95. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [5] IKADA, Yoshito. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2006, **3**(10), 589–601. ISSN 1742-5689, 1742-5662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2006.0124
- [6] LANGER, Robert a Joseph P. VACANTI. Tissue Engineering. *Science* [online]. 1993, **260**(5110), 920–926. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.8493529
- [7] GRIFFITH, Linda G. a Gail NAUGHTON. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* [online]. 2002, **295**(5557), 1009–1014. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1069210
- [8] MCCLELLAND, Randall, Robert DENNIS, Lola M. REID, Bernard PALSSON a Jeffery M. MACDONALD. TISSUE ENGINEERING. In: *Introduction to Biomedical Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2005 [vid. 2024-10-14], s. 313–402. ISBN 978-0-12-238662-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-238662-6.50009-4
- [9] BHATIA, Sujata K. Tissue engineering for clinical applications. *Biotechnology Journal* [online]. 2010, **5**(12), 1309–1323. ISSN 1860-6768, 1860-7314. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201000230
- [10] HU, Hui, Yingchun NI, Swadhin K. MANDAL, Vedrana MONTANA, Bin ZHAO, Robert C. HADDON a Vladimir PARPURA. Polyethyleneimine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as a Substrate for Neuronal Growth. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2005, **109**(10), 4285–4289. ISSN 1520-6106, 1520-5207. Dostupné z: doi:10.1021/jp0441137
- [11] DAVIS, Michael E., J.P. Michael MOTION, Daria A. NARMONEVA, Tomosaburo TAKAHASHI, Daihiko HAKUNO, Roger D. KAMM, Shuguang ZHANG a

- Richard T. LEE. Injectable Self-Assembling Peptide Nanofibers Create Intramyocardial Microenvironments for Endothelial Cells. *Circulation* [online]. 2005, **111**(4), 442–450. ISSN 0009-7322, 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.0000153847.47301.80
- [12] LI, Xiaoming, Chaofeng CHEN, Shangchen ZHOU, Xianhui LIN, Wangmeng ZUO a Lei ZHANG. *Blind Face Restoration via Deep Multi-scale Component Dictionaries* [online]. B.m.: arXiv. 2. srpen 2020 [vid. 2025-02-10]. Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.2008.00418. arXiv:2008.00418 [cs]
- [13] CARAVAGGI, Carlo, Roberto DE GIGLIO, Chiara PRITELLI, Manuela SOMMARIA, Sergio DALLA NOCE, Ezio FAGLIA, Manuela MANTERO, Giacomo CLERICI, Pietro FRATINO, Luca DALLA PAOLA, Giulio MARIANI, Roberto MINGARDI a Alberto MORABITO. HYAFF 11-Based Autologous Dermal and Epidermal Grafts in the Treatment of Noninfected Diabetic Plantar and Dorsal Foot Ulcers. *Diabetes Care* [online]. 2003, **26**(10), 2853–2859. ISSN 0149-5992, 1935-5548. Dostupné z: doi:10.2337/diacare.26.10.2853
- [14] LINDVALL, Olle, Patrik BRUNDIN, Håkan WIDNER, Stig REHNCRONA, Björn GUSTAVII, Richard FRACKOWIAK, Klaus L. LEENDERS, Guy SAWLE, John C. ROTHWELL, C. David MARSDEN a Marsden BJÖRKLUND. Grafts of Fetal Dopamine Neurons Survive and Improve Motor Function in Parkinson's Disease. *Science* [online]. 1990, **247**(4942), 574–577. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.2105529
- [15] MARUKAWA, E., I. ASAHINA, M. ODA, I. SETO, Md I. ALAM a S. ENOMOTO. Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [online]. 2001, **39**(6), 452–459. ISSN 02664356. Dostupné z: doi:10.1054/bjom.2001.0673
- [16] HAYNESWORTH, S.E., J. GOSHIMA, V.M. GOLDBERG a A.I. CAPLAN. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* [online]. 1992, **13**(1), 81–88. ISSN 87563282. Dostupné z: doi:10.1016/8756-3282(92)90364-3
- [17] KELLAR, Robert S., Benjamin R. SHEPHERD, Doug F. LARSON, Gail K. NAUGHTON a Stuart K. WILLIAMS. Cardiac Patch Constructed from Human Fibroblasts Attenuates Reduction in Cardiac Function after Acute Infarct. *Tissue Engineering* [online]. 2005, **11**(11–12), 1678–1687. ISSN 1076-3279, 1557-8690. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2005.11.1678
- [18] DUVAL, Kayla, Hannah GROVER, Li-Hsin HAN, Yongchao MOU, Adrian F. PEGORARO, Jeffery FREDBERG a Zi CHEN. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* [online]. 2017, **32**(4), 266–277. ISSN 1548-9213, 1548-9221. Dostupné z: doi:10.1152/physiol.00036.2016
- [19] VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana a R. Ian FRESHNEY, ed. *Culture of Cells for Tissue Engineering* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2005 [vid. 2024-10-18]. ISBN 978-0-471-62935-1. Dostupné z: doi:10.1002/0471741817

- [20] EDMONDSON, Rasheena, Jessica Jenkins BROGLIE, Audrey F. ADCOCK a Liju YANG. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies* [online]. 2014, **12**(4), 207–218. ISSN 1540-658X, 1557-8127. Dostupné z: doi:10.1089/adt.2014.573
- [21] JENSEN, Caleb a Yong TENG. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2020, **7**, 33. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2020.00033
- [22] SUN, Miao, An LIU, Xiaofu YANG, Jiaxing GONG, Mengfei YU, Xinhua YAO, Huiming WANG a Yong HE. 3D Cell Culture—Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? *Advanced NanoBiomed Research* [online]. 2021, **1**(5), 2000066. ISSN 2699-9307, 2699-9307. Dostupné z: doi:10.1002/anbr.202000066
- [23] HAYCOCK, John W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. In: John W. HAYCOCK, ed. *3D Cell Culture* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011 [vid. 2025-02-14], Methods in Molecular Biology, s. 1–15. ISBN 978-1-60761-983-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-984-0_1
- [24] KAPAŁCZYŃSKA, Marta, Tomasz KOLENDA, Weronika PRZYBYŁA, Maria ZAJĄCZKOWSKA, Anna TERESIAK, Violetta FILAS, Matthew IBBS, Renata BLIŹNIAK, Łukasz ŁUCZEWSKI a Katarzyna LAMPERSKA. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* [online]. 2016 [vid. 2025-02-14]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.63743
- [25] HEATH, Carole A. Cells for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. 2000, **18**(1), 17–19. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(99)01396-7
- [26] ALLEN, Jared W., Tarek HASSANEIN a Sangeeta N. BHATIA. Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* [online]. 2001, **34**(3), 447–455. ISSN 0270-9139. Dostupné z: doi:10.1053/jhep.2001.26753
- [27] CHAGASTELLES, Pedro C. a Nance B. NARDI. Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements* [online]. 2011, **1**(3), 63–67. ISSN 21571716. Dostupné z: doi:10.1038/kisup.2011.15
- [28] DENHAM, Mark, Brock CONLEY, Fredrik OLSSON, Timothy J. COLE a Richard MOLLARD. Stem Cells: An Overview. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. 2005, **28**(1) [vid. 2025-02-11]. ISSN 1934-2500, 1934-2616. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb2301s28
- [29] WAGERS, Amy J. The Stem Cell Niche in Regenerative Medicine. *Cell Stem Cell* [online]. 2012, **10**(4), 362–369. ISSN 19345909. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2012.02.018
- [30] WEISSMAN, Irving L., David J. ANDERSON a Fred GAGE. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2001, **17**(1), 387–403. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.387

- [31] HOLMBERG, Johan a Thomas PERLMANN. Maintaining differentiated cellular identity. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2012, **13**(6), 429–439. ISSN 1471-0056, 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3209
- [32] CHO, Charles J, Jeffrey W BROWN a Jason C MILLS. Origins of cancer: ain't it just mature cells misbehaving? *The EMBO Journal* [online]. 2024, **43**(13), 2530–2551. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/s44318-024-00099-0
- [33] KOLIOS, George a Yuben MOODLEY. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration* [online]. 2013, **85**(1), 3–10. ISSN 0025-7931, 1423-0356. Dostupné z: doi:10.1159/000345615
- [34] ROSSANT, Janet. Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *STEM CELLS* [online]. 2001, **19**(6), 477–482. ISSN 1066-5099, 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.19-6-477
- [35] TAKAHASHI, Kazutoshi a Shinya YAMANAKA. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [online]. 2006, **126**(4), 663–676. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- [36] INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCES, FORESTERHILL, ABERDEEN AB25 2ZD, UK, A AUGELLO, Tb KURTH a C DE BARI. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells and Materials* [online]. 2010, **20**, 121–133. Dostupné z: doi:10.22203/eCM.v020a11
- [37] BARZILAY, Ran, Eldad MELAMED a Daniel OFFEN. Introducing Transcription Factors to Multipotent Mesenchymal Stem Cells: Making Transdifferentiation Possible. *Stem Cells* [online]. 2009, **27**(10), 2509–2515. ISSN 1066-5099, 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.172
- [38] RATNER, Buddy D. Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2019, **21**(1), 171–191. ISSN 1523-9829, 1545-4274. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-120940
- [39] RATNER, Buddy D. a Stephanie J. BRYANT. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2004, **6**(1), 41–75. ISSN 1523-9829, 1545-4274. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027
- [40] RAFFAINI, Giuseppina a Fabio GANAZZOLI. Understanding the Performance of Biomaterials through Molecular Modeling: Crossing the Bridge between their Intrinsic Properties and the Surface Adsorption of Proteins. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2007, **7**(5), 552–566. ISSN 1616-5187, 1616-5195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200600278
- [41] WILLIAMS, David F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(30), 5897–5909. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027

- [42] NARAYAN, Roger J. The next generation of biomaterial development. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2010, **368**(1917), 1831–1837. ISSN 1364-503X, 1471-2962. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2010.0001
- [43] MARIN, Elia, Francesco BOSCHETTO a Giuseppe PEZZOTTI. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2020, **108**(8), 1617–1633. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36930
- [44] RATNER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN, Jack E. LEMONS, William R. WAGNER, Shelly E. SAKIYAMA-ELBERT, Guigen ZHANG a Michael J. YASZEMSKI. Introduction to Biomaterials Science. In: *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2024-10-21], s. 3–19. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00001-5
- [45] KIM, Byung-Soo, Carlos E. BAEZ a Anthony ATALA. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology* [online]. 2000, **18**(1), 2–9. ISSN 0724-4983, 1433-8726. Dostupné z: doi:10.1007/s003450050002
- [46] DOS SANTOS, Venina, Rosmary Nichele BRANDALISE a Michele SAVARIS. Biomaterials: Characteristics and Properties. In: Venina DOS SANTOS, Rosmary Nichele BRANDALISE a Michele SAVARIS *Engineering of Biomaterials* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [vid. 2024-10-21], Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering, s. 5–15. ISBN 978-3-319-58606-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-58607-6_2
- [47] HUTMACHER, Dietmar W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* [online]. 2000, **21**(24), 2529–2543. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6
- [48] LIU, C., Z. XIA a J.T. CZERNUSZKA. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. 2007, **85**(7), 1051–1064. ISSN 02638762. Dostupné z: doi:10.1205/cherd06196
- [49] HOLLISTER, Scott J. Scaffold Design and Manufacturing: From Concept to Clinic. *Advanced Materials* [online]. 2009, **21**(32–33), 3330–3342. ISSN 0935-9648, 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200802977
- [50] WANG, Chong, Wei HUANG, Yu ZHOU, Libing HE, Zhi HE, Ziling CHEN, Xiao HE, Shuo TIAN, Jiaming LIAO, Bingheng LU, Yen WEI a Min WANG. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials* [online]. 2020, **5**(1), 82–91. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2020.01.004
- [51] DO, Anh-Vu, Behnoush KHORSAND, Sean M. GEARY a Aliasger K. SALEM. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2015, **4**(12), 1742–1762. ISSN 2192-2640, 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201500168

- [52] MCCORMICK, David A. Membrane Potential and Action Potential. In: *Fundamental Neuroscience* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [vid. 2025-03-18], s. 93–116. ISBN 978-0-12-385870-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385870-2.00005-6
- [53] DUNDEEMEDSTUDENTNOTES, Author. Conduction of the Action Potential. *Notes on Medicine/Surgery* [online]. 7. duben 2012 [vid. 2025-04-26]. Dostupné z: <https://dundeedmedstudentnotes.wordpress.com/2012/04/07/conduction-of-the-action-potential/>
- [54] SHU, Yousheng, Andrea HASENSTAUB, Alvaro DUQUE, Yuguo YU a David A. MCCORMICK. Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature* [online]. 2006, **441**(7094), 761–765. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature04720
- [55] BEZANILLA, F. Voltage-Gated Ion Channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience* [online]. 2005, **4**(1), 34–48. ISSN 1536-1241. Dostupné z: doi:10.1109/TNB.2004.842463
- [56] CATTERALL, William A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2000, **16**(1), 521–555. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- [57] HELMREICH, Stefan. Potential Energy and the Body Electric: Cardiac Waves, Brain Waves, and the Making of Quantities into Qualities. *Current Anthropology* [online]. 2013, **54**(S7), S139–S148. ISSN 0011-3204, 1537-5382. Dostupné z: doi:10.1086/670968
- [58] DEVKOTA, Ashok, Ahmed BAKHIT, Alix DUFRESNE, AungNaing OO, Premraj PARAJULI a Saveena MANHAS. Arrhythmias and electrocardiographic changes in systolic heart failure. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2016, **8**(4), 171. ISSN 1947-2714. Dostupné z: doi:10.4103/1947-2714.179931
- [59] ZHAO, Min. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2009, **20**(6), 674–682. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2008.12.009
- [60] MANOUKIAN, Ohan S., Scott STRATTON, Michael R. ARUL, Joshua MOSKOW, Naseem SARDASHTI, Xiaojun YU, Swetha RUDRAIAH a Sangamesh G. KUMBAR. Polymeric ionically conductive composite matrices and electrical stimulation strategies for nerve regeneration: *In vitro* characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2019, **107**(6), 1792–1805. ISSN 1552-4973, 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.34272

- [61] MANOUKIAN, Ohan S., Rita MATTA, Justin LETENDRE, Paige COLLINS, Augustus D. MAZZOCCA a Sangamesh G. KUMBAR. Electrospun Nanofiber Scaffolds and Their Hydrogel Composites for the Engineering and Regeneration of Soft Tissues. In: Sarah Hurst PETROSKO a Emily S. DAY, ed. *Biomedical Nanotechnology* [online]. New York, NY: Springer New York, 2017 [vid. 2025-03-21], Methods in Molecular Biology, s. 261–278. ISBN 978-1-4939-6838-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6840-4_18
- [62] WANG, Feifei, Zhen LI, Jianqiang GUO, Lin LIU, Hao FU, Juming YAO, Izabella KRUCIŃSKA a Zbigniew DRACZYŃSKI. Highly Strong, Tough, and Stretchable Conductive Hydrogels Based on Silk Sericin-Mediated Multiple Physical Interactions for Flexible Sensors. *ACS Applied Polymer Materials* [online]. 2022, 4(1), 618–626. ISSN 2637-6105, 2637-6105. Dostupné z: doi:10.1021/acsapm.1c01553
- [63] SAMOREZOV, Julia E., Colin M. MORLOCK a Eben ALSBERG. Dual Ionic and Photo-Crosslinked Alginate Hydrogels for Micropatterned Spatial Control of Material Properties and Cell Behavior. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2015, 26(7), 1339–1347. ISSN 1043-1802, 1520-4812. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00117
- [64] YANG, Bowen a Weizhong YUAN. Highly Stretchable, Adhesive, and Mechanical Zwitterionic Nanocomposite Hydrogel Biomimetic Skin. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2019, 11(43), 40620–40628. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.9b14040
- [65] ZHANG, Fengshi, Meng ZHANG, Songyang LIU, Ci LI, Zhentao DING, Teng WAN a Peixun ZHANG. Application of Hybrid Electrically Conductive Hydrogels Promotes Peripheral Nerve Regeneration. *Gels* [online]. 2022, 8(1), 41. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels8010041
- [66] SOLAZZO, Matteo, Fergal J. O'BRIEN, Valeria NICOLOSI a Michael G. MONAGHAN. The rationale and emergence of electroconductive biomaterial scaffolds in cardiac tissue engineering. *APL Bioengineering* [online]. 2019, 3(4), 041501. ISSN 2473-2877. Dostupné z: doi:10.1063/1.5116579
- [67] HEEGER, Alan J. Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2001, 40(14), 2591–2611. ISSN 1433-7851, 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3773(20010716)40:14<2591::AID-ANIE2591>3.0.CO;2-0
- [68] CHIANG, C. K., C. R. FINCHER, Y. W. PARK, A. J. HEEGER, H. SHIRAKAWA, E. J. LOUIS, S. C. GAU a Alan G. MACDIARMID. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. *Physical Review Letters* [online]. 1978, 40(22), 1472–1472. ISSN 0031-9007. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.40.1472
- [69] MAZUMDER, Md Rahinul Hasan, Premika GOVINDARAJ, Nisa SALIM, Dennis ANTIOHOS, Franz Konstantin FUSS a Nishar HAMEED. Digitalization of composite manufacturing using nanomaterials based piezoresistive sensors. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* [online]. 2025, 188, 108578. ISSN 1359835X. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesa.2024.108578

- [70] RAHAMAN, Mostafizur, Ali ALDALBAHI, Periyasami GOVINDASAMI, Noorunnisa KHANAM, Subhendu BHANDARI, Peter FENG a Tariq ALTALHI. A New Insight in Determining the Percolation Threshold of Electrical Conductivity for Extrinsicly Conducting Polymer Composites through Different Sigmoidal Models. *Polymers* [online]. 2017, **9**(10), 527. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym9100527
- [71] SHIN, Su Ryon, Yi-Chen LI, Hae Lin JANG, Parastoo KHOSHAKHLAGH, Mohsen AKBARI, Amir NASAJPOUR, Yu Shrike ZHANG, Ali TAMAYOL a Ali KHADEMHOSEINI. Graphene-based materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **105**, 255–274. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.03.007
- [72] ABARRATEGI, Ander, María C. GUTIÉRREZ, Carolina MORENO-VICENTE, María J. HORTIGÜELA, Viviana RAMOS, José L. LÓPEZ-LACOMBA, María L. FERRER a Francisco DEL MONTE. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(1), 94–102. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.021
- [73] FAN, Zeng a Jianyong OUYANG. Thermoelectric Properties of PEDOT:PSS. *Advanced Electronic Materials* [online]. 2019, **5**(11), 1800769. ISSN 2199-160X, 2199-160X. Dostupné z: doi:10.1002/aelm.201800769
- [74] GROENENDAAL, L., F. JONAS, D. FREITAG, H. PIELARTZIK a J. R. REYNOLDS. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and Its Derivatives: Past, Present, and Future. *Advanced Materials* [online]. 2000, **12**(7), 481–494. ISSN 0935-9648, 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1521-4095(200004)12:7<481::AID-ADMA481>3.0.CO;2-C
- [75] ZHOU, Lu, Mengjie YU, Xiaolian CHEN, Shuhong NIE, Wen-Yong LAI, Wenming SU, Zheng CUI a Wei HUANG. Screen-Printed Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene):Poly(Styrenesulfonate) Grids as ITO-Free Anodes for Flexible Organic Light-Emitting Diodes. *Advanced Functional Materials* [online]. 2018, **28**(11), 1705955. ISSN 1616-301X, 1616-3028. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201705955
- [76] SABERI, Azadeh, Farzaneh JABBARI, Payam ZARRINTAJ, Mohammad Reza SAEB a Masoud MOZAFARI. Electrically Conductive Materials: Opportunities and Challenges in Tissue Engineering. *Biomolecules* [online]. 2019, **9**(9), 448. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9090448
- [77] NIU, Xufeng, Mahmoud ROUABHIA, Nicolas CHIFFOT, Martin W. KING a Ze ZHANG. An electrically conductive 3D scaffold based on a nonwoven web of poly(L-lactic acid) and conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2015, **103**(8), 2635–2644. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35408
- [78] POVILICH, L.K., K.E. FELDMAN, B.S. SHIM a D.C. MARTIN. Electroactive Polymeric Biomaterials. In: *Comprehensive Biomaterials* [online]. B.m.: Elsevier, 2011 [vid. 2025-03-23], s. 547–561. ISBN 978-0-08-055294-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00042-8

- [79] SPENCER, Andrew R., Asel PRIMBETOVA, Abigail N. KOPPEs, Ryan A. KOPPEs, Hicham FENNIRI a Nasim ANNABI. Electroconductive Gelatin Methacryloyl-PEDOT:PSS Composite Hydrogels: Design, Synthesis, and Properties. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2018, acsbiomaterials.8b00135. ISSN 2373-9878, 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00135
- [80] TRAN, Phong A., Lijie ZHANG a Thomas J. WEBSTER. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2009, **61**(12), 1097–1114. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.010
- [81] HITSCHERICH, Pamela, Ashish APHALE, Richard GORDAN, Ricardo WHITAKER, Prabhakar SINGH, Lai-hua XIE, Prabir PATRA a Eun Jung LEE. Electroactive graphene composite scaffolds for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2018, **106**(11), 2923–2933. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36481
- [82] BAHRAMI, Saeid, Atefeh SOLOUK, Hamid MIRZADEH a Alexander M. SEIFALIAN. Electroconductive polyurethane/graphene nanocomposite for biomedical applications. *Composites Part B: Engineering* [online]. 2019, **168**, 421–431. ISSN 13598368. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesb.2019.03.044
- [83] ATIF, Rasheed, Islam SHYHA a Fawad INAM. Mechanical, Thermal, and Electrical Properties of Graphene-Epoxy Nanocomposites—A Review. *Polymers* [online]. 2016, **8**(8), 281. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym8080281
- [84] SYAMA, S. a P.V. MOHANAN. Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **86**, 546–555. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.116
- [85] NOCERA, Gianluigi a Claire JACOB. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2020, **77**(20), 3977–3989. ISSN 1420-682X, 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-020-03516-9
- [86] LIU, Can, Lei FAN, Zhenming TIAN, Huiquan WEN, Lei ZHOU, Pengfei GUAN, Yian LUO, Chuncheung CHAN, Guoxin TAN, Chengyun NING, Limin RONG a Bin LIU. Self-curling electroconductive nerve dressing for enhancing peripheral nerve regeneration in diabetic rats. *Bioactive Materials* [online]. 2021, **6**(11), 3892–3903. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2021.03.034
- [87] NEZAKATI, Toktam, Amelia SEIFALIAN, Aaron TAN a Alexander M. SEIFALIAN. Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2018, **118**(14), 6766–6843. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.6b00275

- [88] CUI, Zhi, Nathan C. NI, Jun WU, Guo-Qing DU, Sheng HE, Terrence M. YAU, Richard D. WEISEL, Hsing-Wen SUNG a Ren-Ke LI. Polypyrrole-chitosan conductive biomaterial synchronizes cardiomyocyte contraction and improves myocardial electrical impulse propagation. *Theranostics* [online]. 2018, **8**(10), 2752–2764. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.22599
- [89] WANG, Haibin, Xuelian ZHANG, Yanmin LI, Yitong MA, Ye ZHANG, Zhiqiang LIU, Jin ZHOU, Qiuxia LIN, Yanmeng WANG, Cuimi DUAN a Changyong WANG. Improved myocardial performance in infarcted rat heart by co-injection of basic fibroblast growth factor with temperature-responsive Chitosan hydrogel. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* [online]. 2010, **29**(8), 881–887. ISSN 10532498. Dostupné z: doi:10.1016/j.healun.2010.03.016
- [90] TALIKOWSKA, Milena, Xiaoxu FU a Grzegorz LISAK. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2019, **135**, 50–63. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2019.04.001
- [91] YU, Rui, Hualei ZHANG a Baolin GUO. Conductive Biomaterials as Bioactive Wound Dressing for Wound Healing and Skin Tissue Engineering. *Nano-Micro Letters* [online]. 2022, **14**(1), 1. ISSN 2311-6706, 2150-5551. Dostupné z: doi:10.1007/s40820-021-00751-y
- [92] MOSTAFALU, Pooria, Ali TAMAYOL, Rahim RAHIMI, Manuel OCHOA, Akbar KHALILPOUR, Gita KIAEE, Iman K. YAZDI, Sara BAGHERIFARD, Mehmet R. DOKMECI, Babak ZIAIE, Sameer R. SONKUSALE a Ali KHADEMHOSEINI. Smart Bandage for Monitoring and Treatment of Chronic Wounds. *Small* [online]. 2018, **14**(33), 1703509. ISSN 1613-6810, 1613-6829. Dostupné z: doi:10.1002/smll.201703509
- [93] GUARINO, Vincenzo, Marco Antonio ALVAREZ-PEREZ, Anna BORRIELLO, Teresa NAPOLITANO a Luigi AMBROSIO. Conductive PANi/PEGDA Macroporous Hydrogels For Nerve Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2013, **2**(1), 218–227. ISSN 2192-2640, 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201200152
- [94] YU, Chaojie, Zhiwei YUE, Hong ZHANG, Mingyue SHI, Mengmeng YAO, Qingyu YU, Min LIU, Bingyan GUO, Haitao ZHANG, Leqi TIAN, Hong SUN, Fanglian YAO a Junjie LI. Ultra-Histocompatible and Electrophysiological-Adapted PEDOT-Based Hydrogels Designed for Cardiac Repair. *Advanced Functional Materials* [online]. 2023, **33**(15), 2211023. ISSN 1616-301X, 1616-3028. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.202211023
- [95] SUN, Yuan, Xifeng LIU, Matthew N. GEORGE, Sungjo PARK, Bipin GAIHRE, Andre TERZIC a Lichun LU. Enhanced nerve cell proliferation and differentiation on electrically conductive scaffolds embedded with graphene and carbon nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2021, **109**(2), 193–206. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.37016

- [96] WANG, Weiguang, Jun-Xiang CHEN, Yanhao HOU, Paulo BARTOLO a Wei-Hung CHIANG. Investigations of Graphene and Nitrogen-Doped Graphene Enhanced Polycaprolactone 3D Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Nanomaterials* [online]. 2021, **11**(4), 929. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11040929
- [97] ZAYZAFOON, Majd. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2006, **97**(1), 56–70. ISSN 0730-2312, 1097-4644. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.20675
- [98] WANG, Jingyu, Bao YANG, Zhenyu JIANG, Yiping LIU, Licheng ZHOU, Zejia LIU a Liqun TANG. Recent Advances of Conductive Hydrogels for Flexible Electronics. *Electronic Materials* [online]. 2024, **5**(3), 101–131. ISSN 2673-3978. Dostupné z: doi:10.3390/electronicmat5030008
- [99] DIXON, Damion T. a Cheryl T. GOMILLION. 3D-PRINTED conductive polymeric scaffolds with direct current electrical stimulation for enhanced bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2023, **111**(7), 1351–1364. ISSN 1552-4973, 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.35239
- [100] ROGERS, Zachary J., Michael P. ZEEVI, Ryan KOPPES a Sidi A. BENCHERIF. Electroconductive Hydrogels for Tissue Engineering: Current Status and Future Perspectives. *Bioelectricity* [online]. 2020, **2**(3), 279–292. ISSN 2576-3105, 2576-3113. Dostupné z: doi:10.1089/bioe.2020.0025
- [101] DIXON, Damion T. a Cheryl T. GOMILLION. Conductive Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Current State and Future Outlook. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2021, **13**(1), 1. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb13010001
- [102] INKSON, B.J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2025-04-05], s. 17–43. ISBN 978-0-08-100040-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X
- [103] KOVALOV, A, S RUCEVSKIS, V KULAKOV a A ANISKEVICH. Delamination Detection in Carbon Fibre Reinforced Composites Using Electrical Resistance Measurement. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 2016, **111**, 012010. ISSN 1757-8981, 1757-899X. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/111/1/012010
- [104] *NIH/3T3 - CRL-1658 | ATCC* [online]. [vid. 2025-04-25]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/crl-1658>
- [105] QIU, Lian, Wi LAI, Deborah STUMPO a Perry BLACKSHEAR. Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2016, **6**(13) [vid. 2025-02-16]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.1859

- [106] TOLOSA, Laia, María Teresa DONATO a María José GÓMEZ-LECHÓN. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. In: Mathieu VINKEN a Vera ROGIERS, ed. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015 [vid. 2025-02-16], *Methods in Molecular Biology*, s. 333–348. ISBN 978-1-4939-2073-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_26
- [107] BADING, James R. a Anthony F. SHIELDS. Imaging of Cell Proliferation: Status and Prospects. *Journal of Nuclear Medicine* [online]. 2008, **49**(Suppl 2), 64S-80S. ISSN 0161-5505, 2159-662X. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.107.046391
- [108] CHENG, Alice, Zvi SCHWARTZ, Adrian KAHN, Xiyu LI, Zhenxing SHAO, Muyang SUN, Yingfang AO, Barbara D. BOYAN a Haifeng CHEN. Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2019, **25**(1), 14–29. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2018.0119
- [109] YANG, Bing, Pang-Bo WANG, Ning MU, Kang MA, Shi WANG, Chuan-Yan YANG, Zhong-Bing HUANG, Ying LAI, Hua FENG, Guang-Fu YIN, Tu-Nan CHEN a Chen-Shi HU. Graphene oxide-composited chitosan scaffold contributes to functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regeneration Research* [online]. 2021, **16**(9), 1829. ISSN 1673-5374. Dostupné z: doi:10.4103/1673-5374.306095
- [110] FREYTES, Donald O., Robert S. TULLIUS, Jolene E. VALENTIN, Ann M. STEWART-AKERS a Stephen F. BADYLAK. Hydrated versus lyophilized forms of porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2008, **87A**(4), 862–872. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31821
- [111] ZHANG, Chao, Shenghui CHEN, Jiaolin BAO, Yulin ZHANG, Borong HUANG, Xuejing JIA, Meiwan CHEN, Jian-Bo WAN, Huanxing SU, Yitao WANG a Chengwei HE. Low Doses of Camptothecin Induced Hormetic and Neuroprotective Effects in PC12 Cells. *Dose-Response* [online]. 2015, **13**(2), 1559325815592606. ISSN 1559-3258, 1559-3258. Dostupné z: doi:10.1177/1559325815592606
- [112] VAN DER VALK, J., D. BRUNNER, K. DE SMET, Å. FEX SVENNINGSSEN, P. HONEGGER, L.E. KNUDSEN, T. LINDL, J. NORABERG, A. PRICE, M.L. SCARINO a G. GSTRAUNTHALER. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, **24**(4), 1053–1063. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2010.03.016

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Znázornenie postupného šírenia akčného potenciálu pomocou aktivácie napät'ovo riadených iónových kanálov	24
Obrázok 2 Základné vlny EKG znázorňujúce elektrickú aktivitu srdca.....	26
Obrázok 3 Rozdiel medzi elektrónovou a iónovou vodivosťou v biomateriáloch	28
Obrázok 4 Schéma vzniku vodivej siete v kompozite pri zvyšujúcom sa obsahu vodivého plniva.....	31
Obrázok 5 Štruktúra vodivého polyméru PEDOT:PSS	32
Obrázok 6 Schéma princípu fungovania SEM.....	46
Obrázok 7 Bunková línia NIH/3T3 pozorovaná pod svetelným mikroskopom	48
Obrázok 8 Formazanové kryštály vzniknuté po inkubácii buniek s MTT roztokom	50
Obrázok 9 Scaffoldy s rôznou povrchovou úpravou pripravené na test proliferácie buniek	53
Obrázok 10 SEM snímka VistaMaxx/EG scaffoldu 60/40	54
Obrázok 11 SEM snímka CHI/grafénoxidového scaffoldu	55
Obrázok 12 Relatívna životaschopnosť buniek po kultivácii s extraktmi scaffoldu VistaMaxx/EG (60/40) (A) a VistaMaxx/EG (70/30) (B)	56
Obrázok 13 Fluorescenčné mikrofotografie bunkovej línie NIH/3T3 na scaffoldoch VistaMaxx/EG (60/40): A) Referencia, B) scaffold s povrchovou úpravou želatínou (Gel+), C) scaffold bez želatíny (Gel–), zväčšenie 40× a 100×	58
Obrázok 14 Fluorescenčné mikrofotografie bunkovej línie NIH/3T3 na scaffoldoch VistaMaxx/EG (70/30): A) Referencia, B) scaffold s úpravou želatínou (Gel+), C) scaffold bez úpravy (Gel–), zväčšenie 40× a 100×	59

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

2D	Monovrstvové
3D	Trojrozmerné
AV	Atrioventrikulárny
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (Neurotrofický faktor)
BMP	Bone Morphogenetic Proteins (Morfogenetické proteíny kostí)
CHI	Chitozán
CMCS	Carboxymethyl Chitosan (Karboxymetylchitozán)
CNT	Carbon Nanotubes (Uhlíkové nanorúrky)
DSS	Dodecylsulfát sodný
ECBs	Electrically Conductive Biomaterials (Elektricky vodivé biomateriály)
ECM	Extracelulárna matrix
ECC	Extrinsically Conductive Composites (Extrinzicky vodivé kompozity)
EG	Expandovateľný grafit
EKG	Elektrokardiogram
ESCs	Embryonic Stem Cells (Embryonálne kmeňové bunky)
ICPs	Intrinsically Conductive Polymers (Intrinzicky vodivé polyméry)
iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells (Indukované pluripotentné kmeňové bunky)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases (Mitogénom aktivované proteínkinázy)
MTAC	Methacryloyl-Thioethyl Chitosan (Metakryloyl-tioetyl chitózán)
MSCs	Mesenchymal Stem Cells (Mezenchymálne kmeňové bunky)
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotubes (Viacvrstvové uhlíkové nanorúrky)
PCL	Poly(ϵ -kaprolaktón)
PCLF	Polykaprolaktón fumarát
PGA	Kyselina polyglykolová
PEGDA	Polyetylénglykol diakrylát

PEDOT	Poly(3,4-etyléndioxytiofén)
PLA	Polylaktid
PLGA	Poly(laktid-ko-glykolid)
PMMA	Poly(metylmetakrylát)
PPy	Polypyrol
PSS	Polystyrénsulfonát
SA	Sinoatriálny
SEM	Scanning Electron Microscopy (Skenovacia elektrónová mikroskopia)
TA	Single-Walled Carbon Nanotubes (Jednovrstvové uhlíkové nanorúrky)
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta (Transformujúci rastový faktor beta)