



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VÝVOJ MATERIÁLU NA BÁZI HYDROGELŮ
Kyseliny hyaluronové pro regeneraci
myokardu**

DEVELOPMENT OF MATERIAL BASED ON HYALURONIC ACID'S HYDROGELS FOR MYOCARDIAL
REGENERATION

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Lenka Kovářová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2020

OBSAH

1	ÚVOD	3
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
2.1	Hydrogely jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství.....	4
2.2	Regenerace tkáně po infarktu myokardu	6
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	9
4	METODY	10
4.1	Hydroxyfenyl derivát HA a příprava hydrogelů.....	10
4.2	Stanovení reologických parametrů	10
4.3	Stanovení mechanických vlastností hydrogelů a výtlačné síly v kompresi.....	12
4.4	Botnání – gravimetrie	12
4.5	Biologická část	12
5	DISKUZE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	13
5.1	Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA	13
5.2	Inkorporace kardiopoietických buněk do HA-PH-RGD hydrogelu	17
5.3	Kompatibilita vybraného materiálu s aplikačními zařízeními	19
5.4	Preklinická studie	25
6	ZÁVĚR	27
7	LITERATURA	29
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	34
9	PŘÍLOHY	35
9.1	Příloha 1: Životopis	35
9.2	Příloha 2: Publikační činnost.....	36

1 ÚVOD

Mezi nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělých zemích patří kardiovaskulární onemocnění, které jsou spojeny především s obezitou, kouřením či stresem. Revaskularizační terapie je sice účinnou léčbou při obnovení toku krve v srdci, ale jizva vzniklá po infarktu myokardu je permanentní. Současná regenerace myokardu zahrnuje chirurgickou či farmakologickou léčbu. Bohužel pomocí dostupných metod léčby lze ovlivnit pouze funkční tkáň srdce. V pokročilém stádiu srdečního selhání je jedinou možností transplantace srdce, která je omezená počtem dárců.

V posledních několika dekádách byl zaznamenán obrovský vzestup zájmu o tkáňové inženýrství a kombinaci jeho metod s terapeutickými postupy využívajícími buněčné terapie např. implantaci mesenchymálních kmenových buněk. I přes velký potenciál buněčné terapie při léčbě různých typů onemocnění, nedosahují dosavadní klinické studie očekávaných výsledků. Jako možné příčiny těchto neúspěchů byly identifikovány nedostatečná doba setrvání buněk v místě implantace spolu s jejich nízkou viabilitou *in vivo*. Tyto problémy vyvolaly zájem mnoha vědeckých pracovišť o nosič, do kterého by mohly být buňky inkorporovány, a jenž by prodloužil dobu jejich setrvání v místě aplikace a podpořil jejich viabilitu případně i diferenciaci v požadovaný typ buněk. Pro tento účel jsou za nadějně materiály považovány hydrogely, které se v minulosti ukázaly jako vhodné prostředí pro růst a diferenciaci buněk *in vitro*. Díky svým mechanickým vlastnostem navíc mohou bránit nežádoucímu úniku buněk z místa aplikace a do značné míry mohou poskytnout i oporu okolní tkáni, např. ischemické srdeční stěně. Výhodou hydrogelů je možnost jejich snadné aplikace, kdy ke vzniku finální struktury gelu dochází až v místě aplikace (*in situ*) a to za fyziologických podmínek. To je velmi důležitý parametr kvůli možným způsobům aplikace materiálu do srdeční tkáně, zahrnující obvykle podání prostřednictvím katetru.

Vývoj hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové, které lze připravit za fyziologických podmínek, patří mezi moderní trend ve výzkumu biomateriálů. Takové hydrogely umožňují aplikaci materiálu přímo do místa poškození, a to i v přítomnosti buněk a tkáně. Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid nacházející se v pojivové, epiteliální či nervové tkáni obratlovců. V oblasti tkáňového inženýrství je tento polymer široce využíván především pro svou biokompatibilitu a biodegradabilitu. Jako farmaceutická ingredience je daná makromolekula již využívána v mnoha aplikacích, jako je viskosuplementace či oční chirurgie.

Tato práce je zaměřena na přípravu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové, do kterých lze enkapsulovat buňky především pro potenciální regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu. Charakter hydrogelů musí být přizpůsoben jak buněčnému typu, tak i možnostem aplikace materiálu do místa určení. Musí splňovat řadu kritérií, jako je snadná inkorporace buněk či možnost zesílení *in situ*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hydrogely jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství

Hydrogely jsou nejčastěji tvořeny trojrozměrnou sítí hydrofilních řetězců polymeru, které mohou absorbovat mnohonásobně více vody, než je jejich hmotnost sušiny. Díky jejich strukturní podobnosti s extracelulární matrix jsou extenzivně zkoumány pro možné využití v medicínských aplikacích, jako je regenerace chrupavky [3], kostí, zubů, meziobratlových plotének, svalů, kůže, srdce, hlasivek či regenerace míchy [1, 2, 4, 5].

Výhodou hydrogelů je možnost inkorporace léčiv, biologicky aktivních látek či růstových faktorů do jejich struktury a možnost postupného uvolňování těchto látek (kontrolovatelná difúze) po implantaci do okolní tkáně. Uvolňování látek z hydrogelu je většinou založeno na velikosti ok hydrogelové sítě (*mesh size*), botnání v místě aplikace či kontrolované degradaci (obvykle hydrolýza či enzymatické štěpení). Tento proces je mimo jiné ovlivněn nábojem polymeru, z něž je hydrogel připraven [5].

Hydrogely mohou být také vhodné pro enkapsulaci buněk. Klíčovým parametrem je opět velikost ok sítě gelu, která umožňuje snadnou difúzi malých molekul, především kyslíku, živin či metabolitů produkovaných buňkami [4].

Snad nejdůležitějším parametrem při výběru vhodného materiálu v dané aplikaci je bezpečnost. Obecně jsou hydrogely díky podobnosti s extracelulární matrix a hydrofilní povaze dobře snášeny organismem – jsou „biokompatibilní“. Legislativní hodnocení biokompatibility materiálu ale není tak snadné. Na základě místa aplikace (povrch kůže/implantáty/styk s krví) a délky setrvání v něm, jsou materiály rozděleny do kategorií pro hodnocení biokompatibility. Dle ISO norem tyto kategorie musí splňovat zadané parametry, aby byly hodnoceny jako biokompatibilní. Kromě cytotoxicity to dle určené kategorie také může být senzibilizace, dráždivost, akutní systémová toxicita, pyrogenita materiálu, subakutní/subchronická toxicita, genotoxicita, hemokompatibilita, chronická toxicita a karcinogenita [6].

Velmi důležitým aspektem při výběru materiálu jsou možnosti jeho podání. Hydrogely mohou být předem připraveny před vlastní aplikací (*pre-formed* hydrogel) či ve formě scaffoldů – bez buněk či již s předkultivovanými buňkami. Tyto materiály je potřeba chirurgicky implantovat do požadovaného místa (invazivní metoda). V některých případech, např. pro viskosuplementaci či dermální filery, je možné i *pre-formed* hydrogely aplikovat injekčně. Mezi minimálně invazivní techniky patří endoskopy, katetry či jehly. Injektovatelné hydrogely, vyznačující se *in situ* gelací, mohou být aplikovány do místa určení a vyplnit celý defekt nezávisle na jeho tvaru. Výhoda využití tohoto typu materiálu tkví také v jeho snadném použití [4].

2.1.1 Materiály pro přípravu hydrogelů využitelné v tkáňovém inženýrství

Velkou výhodou hydrogelů je jejich strukturní rozmanitost. Pro přípravu hydrogelů jako scaffoldů v tkáňovém inženýrství je využíváno mnoho typů syntetických či přírodních materiálů [1]. Obecně mezi výhody hydrogelů připravených z biopolymerů patří jejich biodegradabilita a biokompatibilita, jelikož mnoho z nich se vyskytuje v lidském těle [3, 1]. Na druhou stranu u syntetických polymerů je možno lépe kontrolovat a reprodukovat materiálové vlastnosti [3]. Lze velmi dobře řídit molekulovou hmotnost, strukturu blokových polymerů, síťování či degradaci. Doba setrvání materiálu v tkáni je důležitá kvůli zajištění účinku, ale ve většině aplikací je důležitá také degradace po určité době. V ideálním případě dochází k postupné degradaci a materiál je nahrazován plynule novou funkční tkání [1]. Čas degradace *in vivo* je také klíčový pro klasifikaci materiálů do kategorií v rámci hodnocení biokompatibility [6]. Dalším důležitým parametrem je adheze materiálu k tkáni (bioadhezivní vlastnosti) ovlivňující setrvání materiálu v místě aplikace. Pouze některé polymery mají bioadhezivní vlastnosti bez chemické modifikace – například chitosan či polyakrylová kyselina [5]. Také schopnost

buněk adherovat na povrch scaffoldu je kritériem ovlivňující výběr vhodného materiálu využitelného ve tkáňovém inženýrství. V tkáni buňky adherují přímo k extracelulární matici, proto je výhodné připravit scaffold napodobující danou tkáň, do které je aplikován. Mezi procesy regulované buněčnou adhezí patří vlastní komunikace mezi buňkami, migrace buněk či vývoj tkáně. Narušení buněčné adheze může vést ke změně buněčných procesů. Adheze buněk na materiálu ovlivňuje také proliferaci či diferenciaci buněk [7].

Mezi využívané syntetické materiály pro přípravu hydrogelů patří polyethylenglykol, polyvinyl alkohol, polyakrylová kyselina, kopolymer polypropylen fumarátu a ethylen glykolu [1], polyestery a různé typy polypeptidů [4]. Mezi využívané přírodní polymery a jejich deriváty patří agaróza, alginát, methylcelulóza [1], Matrigel [8], chitin, dextran, pektin, heparin, chitosan, kolagen, fibrin, želatina a **kyselina hyaluronová (HA)** [1, 8, 4].

2.1.1.1 Hydrogely na bázi HA

Kyselina hyaluronová je po desetiletí využívána v medicíně, ale navzdory mnoha výhodným vlastnostem, se tento polysacharid nevyznačuje dobrými mechanickými vlastnostmi [9] či dlouhým setrváním v místě aplikace díky rychlé degradaci zapříčiněné především přítomností hyaluronidáz v těle [10]. Možností je chemická modifikace samotného polymeru, která je zaměřena na 3 funkční skupiny řetězce HA: N-acetylovou skupinu, ale především na reaktivnější karboxylovou skupinu glukuronové kyseliny a primární a sekundární hydroxylové skupiny [11].

Hydrogely na bázi derivátů kyseliny hyaluronové [12] jsou použitelné jako perspektivní materiál pro přípravu scaffoldů v oblasti tkáňového inženýrství. HA hydrogely mohou také sloužit jako scaffoldy pro inkorporaci buněk či růstových faktorů. Hydrogely na bázi HA lze rozdělit na základě povahy vznikající vazby na fyzikální či kovalentní [13] a supramolekulární komplexy.

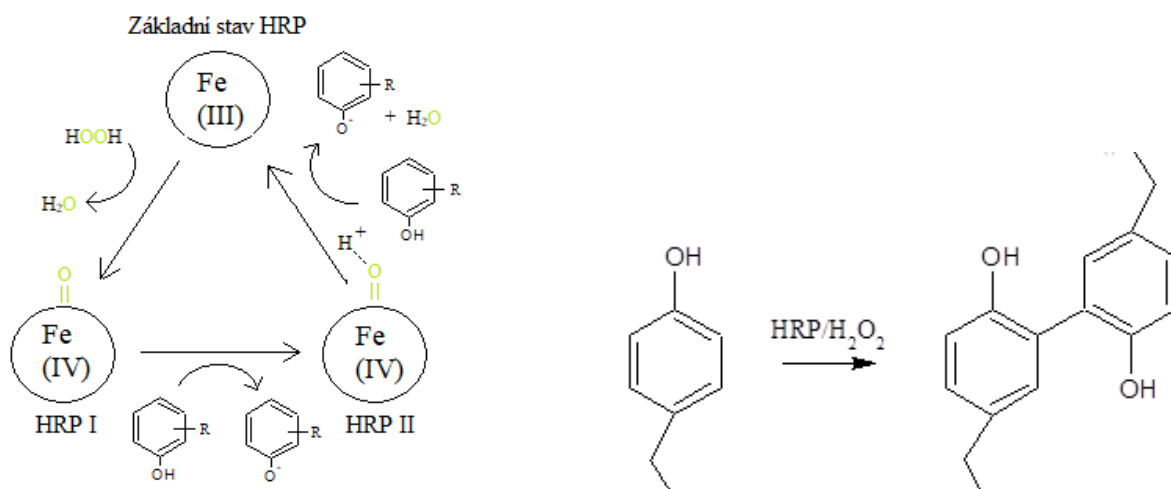
2.1.1.1.1 Kovalentně zesílené hydrogely na bázi HA síťující *in situ*

Pro přípravu kovalentně zesílených hydrogelů HA za fyziologických podmínek či přímo v organismu příjemce je nutné využít reakce vycházející z chemicky modifikovaného hyaluronanu. Akrylované deriváty hyaluronanu podstupují radikálové síťovací reakce, které mohou být iniciovány elektromagnetickým zařízením (UV/VIS) nebo přidávkem redoxních činidel. V případě využití vhodně modifikované HA lze zvolit i metody z oblasti *click* chemie (Huisgenova adice, Diels-Alderovy reakce, thiol-en reakce), nebo např. enzymaticky katalyzované reakce [2] [4].

Enzymatické síťování

Z pohledu chemického je enzym bílkovinou, která vykazuje katalytickou aktivitu s vysokou substrátovou specifitou. V reakcích určuje její rychlost i povahu. Tento typ síťovacích reakcí je čím dál více využíván v tkáňovém inženýrství, jelikož mohou probíhat za fyziologických podmínek a vykazují dobrou kompatibilitu s buňkami a tkání [14, 15, 16].

Kurisawa připravil derivát na bázi kyseliny hyaluronové konjugovaný s tyraminem. Cílem bylo připravit jednoduchý enzymaticky katalyzovaný systém, schopný tvořit biokompatibilní hydrogely *in situ* [17]. Daná enzymatická reakce je založena na katalytické dekompozici peroxidu vodíku pomocí křenuvé peroxidázy (HRP – *horseradish peroxidase*). Jedná se o jednořetězcový hemoprotein, jehož základem je porfyrinová struktura obsahující železo. Katalyzuje množství fenolových a anilinových derivátů za využití peroxidu vodíku jako oxidantu (Obr. 1). Během enzymatické reakce dochází díky vazbě peroxidu vodíku na atom železa k vytvoření oktaedrální konfigurace okolo atomu železa. Vzniká tak reaktivní enzym, který interaguje se substrátem. Katalyzovanou reakcí dochází ke vzniku fenolových radikálů, které izomerizují a dimerizují, a vytváří se tak C-C (Obr. 1), případně C-O-C vazby [18, 19] vedoucí k tvorbě gelu.



Obr. 1 Křenová peroxidáza HRP katalyzující fenolový substrát za využití peroxidu vodíku jako oxidantu (vlevo). Schéma síťovací reakce iniciované přítomností peroxidu vodíku a katalyzované křenovou peroxidázou (vpravo) [15].

Reakcí lze připravit scaffoldy bez buněk či hydrogely se zabudovanými buňkami. Kurisawa i mnoho dalších výzkumných týmů se zabývá systémem HRP/peroxid vodíku/substrát obsahující fenolovou skupinu, které mohou být využity v cílené distribuci léčiv či v tkáňovém inženýrství [17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. Například skupina Calabra využila hydrogely na bázi HA připravené danou reakcí pro regeneraci chrupavky [10]. Výzkumem spojeným s tyraminovaným derivátem kyseliny hyaluronové se zabýval také tým Claudie Loebel. Opakovaným přidávkem 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloridu a tyraminu k HA docílila skupina zvýšení funkcionalizace tyraminu až k 20 % a tím i zvýšení Youngova modulu připravených hydrogelů. Do hydrogelů s různou koncentrací peroxidu vodíku (0,68 mM a 1,1 mM) byly inkorporovány lidské mesenchymální buňky s viabilitou 85–98 % po 6 dnech. Adheze buněk byla detekována pouze u hydrogelů s nižším stupněm zesílení (0,68 mM peroxid vodíku), kdežto u hydrogelů s vyšším stupněm zesílení měly buňky morfologii zakulacenou [29]. Mechanické vlastnosti hydrogelů na bázi HA-TA mohou být také zvýšeny přidávkou HRP [30]. Je potřeba si uvědomit, že vliv aktivity HRP či koncentrace peroxidu vodíku na rychlost reakce jsou na sobě závislé. Pokud zvolíme nízkou aktivitu HRP a zvyšujeme pouze přidávek peroxidu vodíku, dochází k urychlení reakce a zvýšení mechanických či viskoelastických vlastností hydrogelů jen do jisté koncentrace peroxidu vodíku, poté již přidávek nemá na dané vlastnosti vliv. Stejný princip platí i v případě zvolení příliš nízké koncentrace peroxidu vodíku, kdy zvýšení aktivity HRP má vliv pouze do jisté hodnoty a pak se již nemění [29, 30].

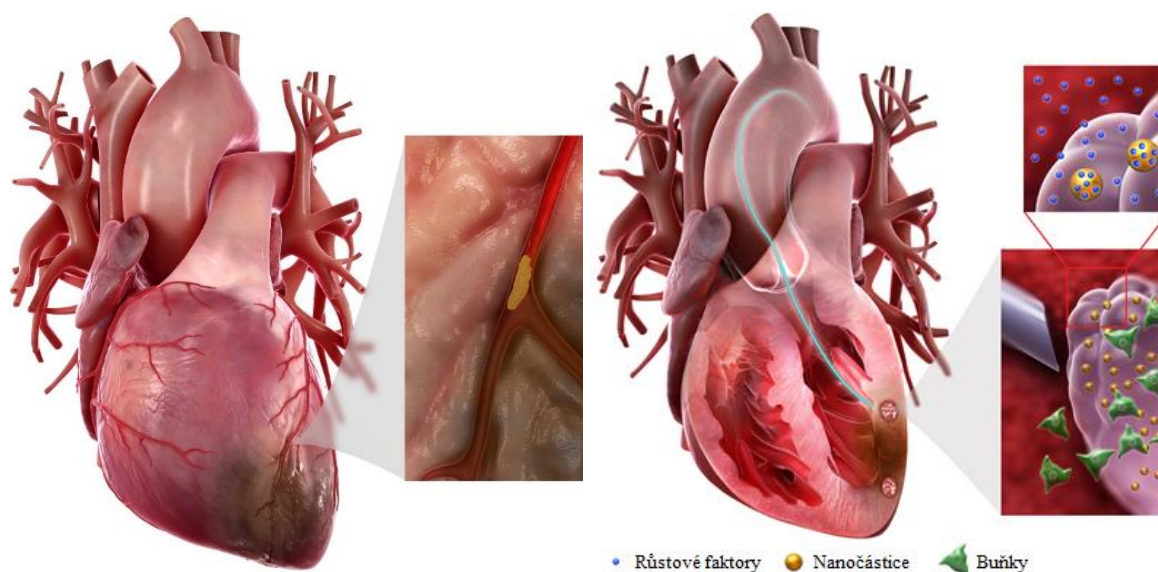
Obecně je adheze buněk k hydrogelům na bázi HA termodynamicky nevýhodná díky hydrofilní a polyaniontové povaze polymeru [35]. Ke zvýšení buněčné adheze je možné využít adhesivních molekul jako je fibronectin [34], laminin, fibrinogen, kolagen [36, 37], či peptidové sekvence – IKVAV, YIGSR [38], RGDS [39] či RGD, které mohou být navázány na polymerní řetězec HA [35, 40, 41, 42, 43]. Pravda a jeho tým popsali syntézu derivátu na bázi HA nesoucí hydroxyfenylovou skupinu a RGD. Hydrogely mohou být připraveny enzymatickou reakcí s HRP a peroxidu vodíku na stejném principu popsaném výše [41].

2.2 Regenerace tkáně po infarktu myokardu

Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích [8, 44, 45, 46]. Kromě vysoké mortality tvořící až 1/3 všech úmrtí v USA [44, 45], jsou tyto nemoci také spojené s enormními náklady na zdravotní péči [8, 44, 45, 46].

Při tomto onemocnění dochází k náhlému přerušení krevního zásobení části srdce. Příčinou je uzavření srdeční artérie, což vede k úmrtí kardiomyocytů. Do postižené oblasti poté migrují buňky zodpovědné za imunitní odpověď, jako jsou makrofágy, monocyty a neutrofily. Secernované metaloproteinázy degradují extracelulární matrix, což způsobuje odplavení myocytů, celkové oslabení struktury kolagenového scaffoldu vedoucí ke ztenčení srdeční stěny a tvorbě jizvy. Tento proces je nazýván remodelace levé komory [8, 47] (Obr. 2).

Pomocí dostupných metod léčby lze ovlivnit pouze funkční tkáň srdce. Obvykle je využívána farmakologická terapie či stenty k rozšíření ucpaných cév. Revaskularizační terapie je účinná při obnovení krevního toku do srdce, nicméně zbytkové zjizvení myokardu zůstává natrvalo. Zlepšení zjizvení po infarktu a obnovení srdeční funkce může eliminovat kaskádu událostí, která vede k srdečnímu selhání. V pokročilém stádiu srdečního selhání je jedinou možností transplantace srdce. Nevýhodou je samozřejmě omezené množství dárců [48].



Obr. 2 Vlevo: blokáce koronární artérie způsobující infarkt myokardu. Vpravo: Aplikace injektovatelného materiálu s obsahem nanočástic s inkorporovanými růstovými faktory či jinými biologicky aktivními látkami a buněk (kmenové buňky, kardiomyocyty či jiný buněčný typ) do srdeční stěny [49] (použito s dovolením koordinátora projektu AMCARE).

Při infarktu myokardu dochází k smrti kardiomyocytů. Jednou z možností regenerace nekrotické tkáně po infarktu myokardu je využití buněčné terapie [50, 51, 52]. Buňky samotné mohou být aplikovány pomocí katetru jako minimálně invazivního nástroje [53]. Na druhou stranu s rozvojem tkáňového inženýrství se výzkum stále více zaměřuje na přípravu scaffoldu, který lze využít samotný (acelulární) či jako nosič růstových faktorů a jiných látek podporující např. angiogenezi [5, 53] nebo sloužící pro inkorporaci buněk (Obr. 2). Při terapii kardiovaskulárních onemocnění mají velký potenciál kmenové buňky pro své unikátní vlastnosti sebeobnovy a diferenciace [50, 56].

I přes velký potenciál nemá terapie pomocí samotných kmenových buněk v klinických studiích uspokojivé výsledky kvůli lokalizaci do místa aplikace, životaschopnosti a nízké účinnosti inkorporovaného graftu. Mezi faktory ovlivňující životaschopnost buněk patří netěsnost v místě vpichu, únik materiálu z místa aplikace, generace neadekvátní extracelulární matrix či následná apoptóza [58]. Buněčná viabilita po aplikaci je časově omezená – v závislosti na buněčném typu se pohybuje od 24 do 48 hod. Pro dosažení lepších výsledků je nezbytné zvýšit životaschopnost buněk. Jednou z možností je právě využití hydrogelu jako matrice pro inkorporaci buněk, ať už bez nebo s dalšími podpůrnými látkami. Hydrogel tvoří mechanickou oporu i vytváří vhodné prostředí pro růst či diferenciaci buněk. Ke zlepšení komunikace (*crosstalk*) mezi buňkami by mohly být využity speciální materiály s různou

povrchovou úpravou či využity peptidové sekvence, jako je RGD [57]. Mezi materiály, využitelné pro přípravu hydrogelů pro regeneraci myokardu, patří přírodní či syntetické deriváty či přímo přírodní materiály [47, 54], jako je alginát, agaróza, chitosan, decelularizovaná extracelulární matrix, fibrin, kyselina hyaluronová či její modifikace, keratin, Matrigel [8], kolagen, želatina či laminin [55]. Jejich přítomnost či podobnost s molekulami nacházejícími se v lidském těle snižuje možnost nežádoucí imunologické odpovědi po implantaci [55]. Ze syntetických materiálů by mohly být využity deriváty polyethylenglykolu, termoresponsivní poly(N-isopropyl)akrylamid [8], polylaktát, kopolymer kyseliny mléčné a polyglykolové, polykaprolakton či polyuretan. Obecně u syntetických polymerů existuje větší riziko cytotoxicity. Jen některé ze syntetických materiálů (polyethylenglykol, polylaktát, kopolymer kyseliny mléčné a polyglykolové) byly uznány FDA pro klinické použití. Další možností je využití hybridních hydrogelů složených ze syntetického a přírodního polymeru [55].

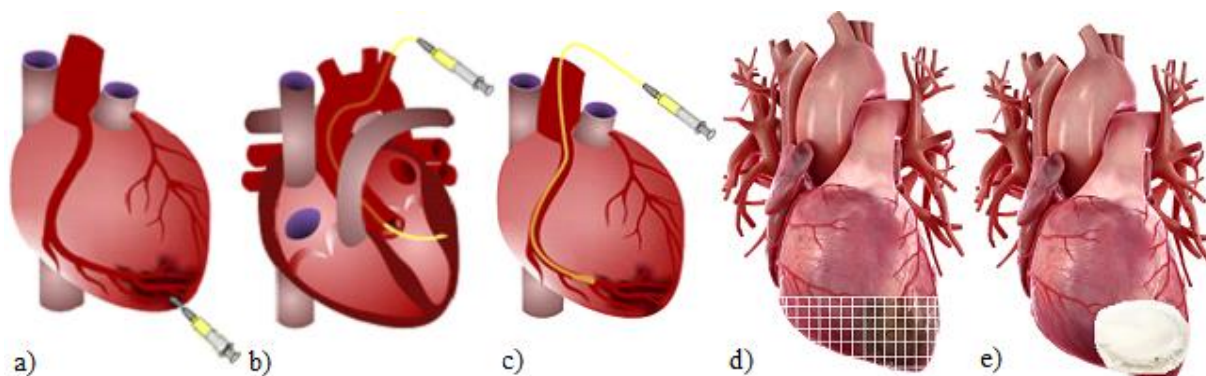
2.2.1 Metody aplikace

Velmi důležitým aspektem, ovlivňujícím výběr materiálu a jeho formy, je způsob aplikace. Obecně existují 3 metody pro injektaci materiálů do srdeční stěny [52] či lze aplikovat tenkou vrstvu biomateriálu (*patch*) na povrch epikardu [47, 54].

Jednou z možností aplikace je přímá injekce do epikardu (Obr. 3 a), ale tato metoda je invazivní a vyžaduje otevření hrudníku. Proto je cílem nalézt techniku, která by byla minimálně invazivní. K tomuto lze využít katetr představující „hadičku“, která je zavedena do artérie (arteriální katetr) a to buď transendokardiálně (Obr. 3 b) do oblasti postižené po infarktu myokardu či intrakoronárně (Obr. 3 c) za pomoci koronárního balónku [8, 47, 52, 54, 59, 60].

Polymerní struktura *patch* materiálu může vytvářet podpůrnou strukturu pro ischemické srdce (Obr. 3 d) nebo může být materiál připevněn pomocí adhezivního materiálu na postižené místo srdce (Obr. 3 e). Mezi komerčně dostupná a využívaná tkáňová lepidla patří BioGlu založené na kombinaci bovinního sérového albuminu (BSA) a glutaraldehydu [61]. Vazba je založena na interakci amino a aldehydické skupiny. Dále je možné využít komerčně dostupný produkt CoSeal [62]. Nevýhodou využití *patch* materiálu je nutnost otevření hrudníku během jeho aplikace.

Na základě možných metod aplikace hydrogelů je vhodné využití *in situ* gelujících materiálů (injektovatelných hydrogelů) [8, 63, 64]. Cílem je připravit materiál, který by zgeloval ihned při aplikaci do požadovaného místa. Na druhou stranu ke gelaci nesmí docházet v aplikátoru (katetru/jehle), abychom se vyhnuli jeho blokaci [5, 8, 64]. Důležité je si uvědomit běžně používanou velikost jehly (26–28 G) a vnitřního poloměru katetru, který je velmi malý, což značně ovlivňuje vlastnosti vybraného materiálu [64].



Obr. 3 Metody aplikace hydrogelů do srdce síťujících *in situ*: a) přímá epikardiální injekce b) intrakoronární aplikace c) transendokardiální injekce [63] d-e) epikardiální aplikace *patch* materiálu [60] (použito s dovolením koordinátora projektu AMCARE).

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této disertační práce je charakterizace hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové pro využití v tkáňovém inženýrství, především pro regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu.

U vyvíjených materiálů bylo sledováno jejich chemické složení, mechanické a viskoelastické vlastnosti, podmínky síťovacích reakcí a kinetika gelace. Za tímto účelem bylo nutné navrhnout množství dostupných experimentů, které budou vhodné ke stanovení fyzikálně-chemických parametrů.

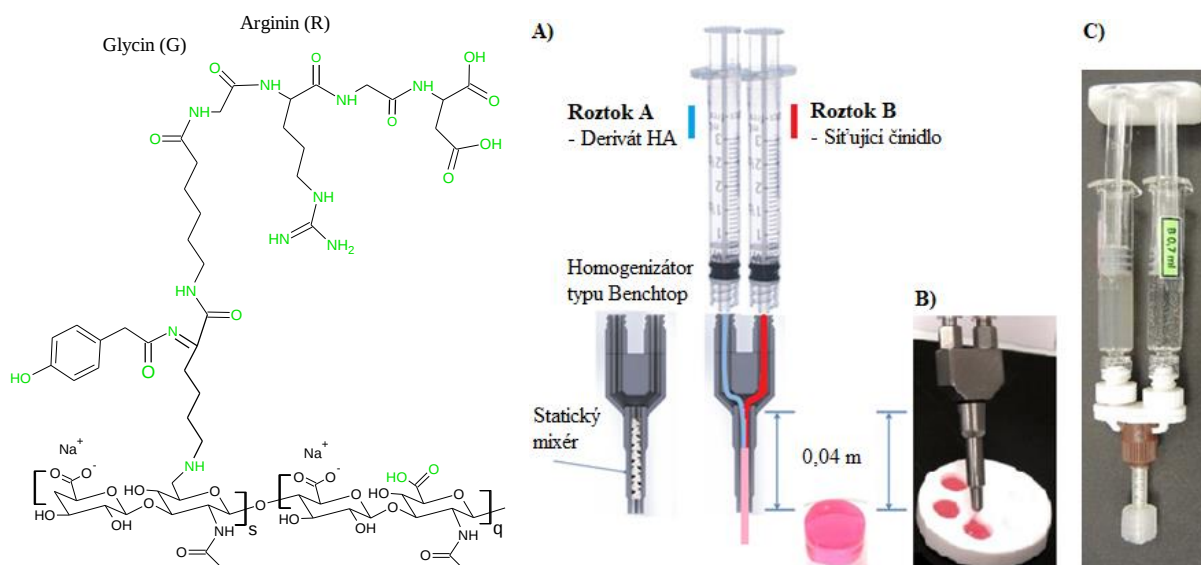
Připravené hydrogely by měly sloužit jako scaffoldy pro vybraný typ buněk, a proto byly sledovány také biologické vlastnosti těchto materiálů z hlediska buněčné viability a adheze. U finálně zvoleného materiálu byla testována kompatibilita s vhodným aplikačním zařízením *in vitro* a *in vivo*.

4 METODY

4.1 Hydroxyfenyl derivát HA a příprava hydrogelů

Síťovací reakce materiálů na bázi hydroxyfenyl derivátů HA (HA-TA, HA-PH-RGD) je iniciována přidávkou peroxidu vodíku a katalyzována křenovou peroxidázou (HRP) (2.1.1.1). Ke zvýšení buněčné adheze lze použít hydroxyfenyl derivát HA s navázanou peptidovou sekvencí RGD (HA-PH-RGD), který lze zesíťovat stejným způsobem [41].

Hydrogely byly připraveny pomocí homogenizátoru ve dvoucestném provedení (Obr. 4 A), kde pomocí šneku dochází k homogenizaci 2 složek. Vzniklá směs je aplikována do teflonových forem (Obr. 4 B), kde dochází ke vzniku transparentních gelů. Byl využit kovový homogenizátor připravený ve společnosti Contipro a.s. (Obr. 4 B) a komerčně dostupný homogenizátor společnosti MEDMIX (<https://www.medmix.ch/>) (Obr. 4 C).



Obr. 4 Vlevo: Struktura HA-PH-RGD derivátu. Vpravo: Schéma dvousložkového homogenizátoru pro přípravu hydrogelů (A). Homogenizátor připravený společností Contipro a.s. s teflonovou formou pro přípravu hydrogelu (B). Homogenizátor od společnosti MEDMIX (C).

4.2 Stanovení reologických parametrů

Ke stanovení zdánlivé viskozity a dalších reologických vlastností jsou používány rotační reometry, které se skládají ze dvou částí – statoru a rotoru otáčejícího se konstantní úhlovou rychlostí.

4.2.1.1 Stanovení zdánlivé viskozity

Viskozita patří mezi základní reologické parametry. Vyjadřuje míru odporu proti vnějšímu zatížení, resp. míru odporu proti toku [65, 66]. U newtonských kapalin stanovujeme dynamickou viskozitu, která není závislá na smykové rychlosti. U nenewtonských látek není viskozita konstantní při změně smykové rychlosti a u většiny materiálů dochází k poklesu této zdánlivé viskozity se smykovou rychlostí, tedy ke zřednutí při toku (*shear-thinning*). Tímto chováním se vyznačují například emulze či polymerní roztoky [65, 66], jako je i roztok nativní kyseliny hyaluronové.

Zdánlivá viskozita prekurzorových roztoků derivátů pro přípravu hydrogelů byla měřena na reometru TA Instruments AR-G2 s vrchní pohyblivou geometrií, kuželem (průměr 60 mm, úhel 1°). Dávkovací objem měřeného vzorku byl 1000 μl . Měření bylo provedeno při 25 °C. Byla stanovena závislost zdánlivé viskozity na smykové rychlosti v rozmezí 0,01–3000 s^{-1} (viskozitní křivka).

4.2.1.2 Stanovení viskoelastických vlastností

Využitím oscilační reologie je možné kvantifikovat viskózní i elastické vlastnosti materiálů. Během experimentu je vzorek vložen mezi dvě desky. Jedna z desek je stacionární a druhá se pohybuje a působí časově závislou deformací na vzorek. Současně časově závislé napětí je kvantifikováno měřením krouticího momentu, který se přenáší přes vzorek na nehybnou (statickou) desku. Tato odezva materiálu nám dává vypovídající hodnotu o rozdílu mezi jednotlivými materiály. Odezva (napětí) ideálně elastické látky je vždy ve fázi s aplikovaným namáháním (deformací), kdežto u ideálně viskózní kapaliny je tomu naopak. Odezva materiálů, jako jsou např. i gely, leží v oblasti mezi těmito dvěma extrémy (tedy mezi ideálně elastickou pevnou látkou a viskózní kapalinou). Takovéto materiály se tedy vyznačují viskoelastickými vlastnostmi [67, 68, 69, 70].

Komplexní modul pružnosti ve smyku G^* je složen ze dvou částí: viskózního (ztrátového) G'' a elastického (paměťového) modulu G' . Viskózní modul není ve fázi s deformací a udává fluidní příspěvek viskózní kapaliny, naproti tomu ve fázi s deformací je paměťový modul, jenž je charakteristikou ideálně elastické pevné látky [70]. Vztah mezi moduly lze vyjádřit pomocí ztrátového úhlu následujícím vztahem:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (1)$$

kde δ je ztrátový úhel, G'' je viskózní a G' je elastický modul [70]. Pokud je hodnota modulu stejná, tak $\tan \delta$ je roven 1 a úhel pak nabývá 45° . Nízká hodnota ztrátového úhlu připadá pro tuhé materiály a naopak.

Pro určení viskoelastických vlastností jsou voleny dva typy nastavení. V prvním režimu je zvolena konstantní rychlost smykové deformace a stanovujeme smykové napětí, u druhého typu nastavení je tomu naopak. Z úhlové rychlosti lze vypočítat rychlost smykové deformace a krouticí moment udává smykové napětí [65]. Viskoelastické vlastnosti byly stanoveny pomocí přístroje AR-G2 (TA Instruments) za použití geometrie se zdrsňelým povrchem (*crosshatch*), aby bylo zamezeno vyklouznutí hydrogelu během oscilace horní pohyblivé geometrie (deska, průměr 20 mm). Pro porovnání viskoelastických vlastností byl použit test v módu *strain sweep* s nastavenou konstantní frekvencí 1 Hz a posunem (*displacement*) v rozmezí od 10^{-3} do 2 rad.

4.2.1.3 Kinetika gelace

Byla stanovena časová závislost elastického (paměťového) G' a viskózního (ztrátového) G'' modulu na čase. Na začátku reakce jsou hodnoty obou modulů velmi nízké a následně dochází k jejich nárůstu. Hodnota elastického modulu je nižší v porovnání s viskózním modulem G'' až do bodu gelace známého jako *cross-over point*, kdy dochází k vyrovnání hodnot obou modulů. V tomto bodě byl také odečten čas gelace T_g . Dále již převyšuje modul elastický, jehož hodnota nadále roste [70]. Ke konci reakce elastický modul dosahuje rovnovážných hodnot tzv. plata. Pro porovnání jednotlivých materiálů mezi sebou byla odečtena hodnota elastického G' a viskózního G'' modulu a ztrátového úhlu δ v čase 3 minut.

Kinetika gelace byla stanovena za použití paralelních desek s horní pohyblivou deskou (40 mm) s nastavenou fixní mezerou 400 μm . Pro homogenní smísení nadávkovaných prekurzorových roztoků derivátu a síťovacího činidla bylo nastaveno promíchání (*pre-shear*) o rychlosti 2000 1/s po dobu 1 sekundy. Byla využita oscilační metoda v závislosti na čase (*oscillation time sweep*) při frekvenci 1 Hz a posunu 0,001 rad. Teplota byla zvolena 37 $^\circ\text{C}$ odpovídající teplotě lidského těla.

4.3 Stanovení mechanických vlastností hydrogelů a výtlačné síly v kompresi

Mechanické vlastnosti hydrogelů a výtlačná síla prekurzorových roztoků derivátů byly měřeny pomocí přístroje *Single Column Materials Testing System* INSTRON 3342 a 3343 (*Bluehill software*) v kompresním módu. Kapacita zařízení je 500 N a kapacita kompresní desky 100 N. Testovací rychlosti je možné nastavit v rozmezí 0,05–1000 mm/min. Testovací rychlost použita pro stanovení mechanických vlastností hydrogelů v této práci byla 2 mm/min. Testovací rychlost použita pro stanovení výtlačné síly prekurzorových roztoků v této práci byla 50 mm/min. Pro uchycení stříkaček o objemu 3 ml s vnitřním průměrem 8,9 mm obsahující měřený roztok byl využit speciální nástavec. Vnitřní průměr zvolených jehel (25 a 27 G) odpovídal průměru kónické jehly u katetru využitého v dané práci (0,24 mm). Dráha jednoho testu byla 10 mm.

4.4 Botnání – gravimetrie

Během procesu botnání je botná síla kompenzována retrakční silou. Hydrogel se dostane do rovnovážného stavu při vyrovnání těchto dvou sil, a poté je již hodnota koeficientu nabotnění konstantní. Stupeň nabotnění Q lze stanovit gravimetricky. Hydrogely byly po přípravě zváženy, vloženy do lékovek a zality roztokem PBS pH 7,4 (desetinásobkem hmotnosti hydrogelu). Lékovky se vzorky byly uchovávány při 37 °C v inkubátoru a v daných intervalech byly hydrogely po osušení zváženy. Pro zjednodušení lze Q vyjádřit v procentech jen jako podíl hmotnosti gelu po a před nabotněním:

$$Q = \frac{m(\text{po nabotnění})}{m_0(\text{před nabotněním})} \cdot 100 (\%) \quad (2)$$

V tomto případě stupeň nabotnění hydrogelu před nabotněním je rovno 100 % a hodnota nad 100 % představuje nabotnělý podíl.

4.5 Biologická část

Pro uvedené testy cytotoxicity a inkorporaci buněk do hydrogelové matrice byly použity kardiopoietické buňky z tukové tkáně dárců (ADSC). Poskytovatelem byla společnost Celyad (<https://www.celyad.com/>), jeden z partnerů EU projektu AM CARE. Buňky jsou kultivovány dle protokolů za standardních podmínek v inkubátoru – kultivace buněk není předmětem této disertační práce.

Byla stanovena cytotoxicita prekurzorových roztoků. Buňky byly nasazeny na 24jamkové kultivační panely a následující den k nim byly přidány testované vzorky. Cytotoxicita byla stanovována po 24-72 hod. metodou ATP.

Byla testována viabilita a adheze buněk inkorporovaných do hydrogelové matrice. Suspenze buněk je přidána v případě enzymatického systému do roztoku hydroxyfenyl derivátu HA s obsahem enzymu HRP. Následně jsou z prekurzorových roztoků připraveny hydrogely do teflonových formiček dle postupu v kapitole 4.1. Po gelaci (maximálně 15 minut) jsou hydrogely přeneseny do jamky kultivačního panelu a zality vhodným médiem.

Testovací metody

Barvení *Live/Dead* se provádí za účelem zaznamenání růstu, distribuce a morfologie buněk na jamkách nebo v hydrogelech. Metoda je založena na základě rozdílné propustnosti membrány pro různá barviva a na základě aktivity vnitrobuněčných enzymů esteráz. Snímky jsou pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu *Nikon Eclipse Ti*, kde neviabilní buňky jsou červené a viabilní zelené.

Metoda ATP je založena na detekci luminiscenčního signálu na přístroji *TECAN Infinite*, který je emitován v přítomnosti ATP uvolněného z živých, metabolicky aktivních buněk.

5 DISKUZE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

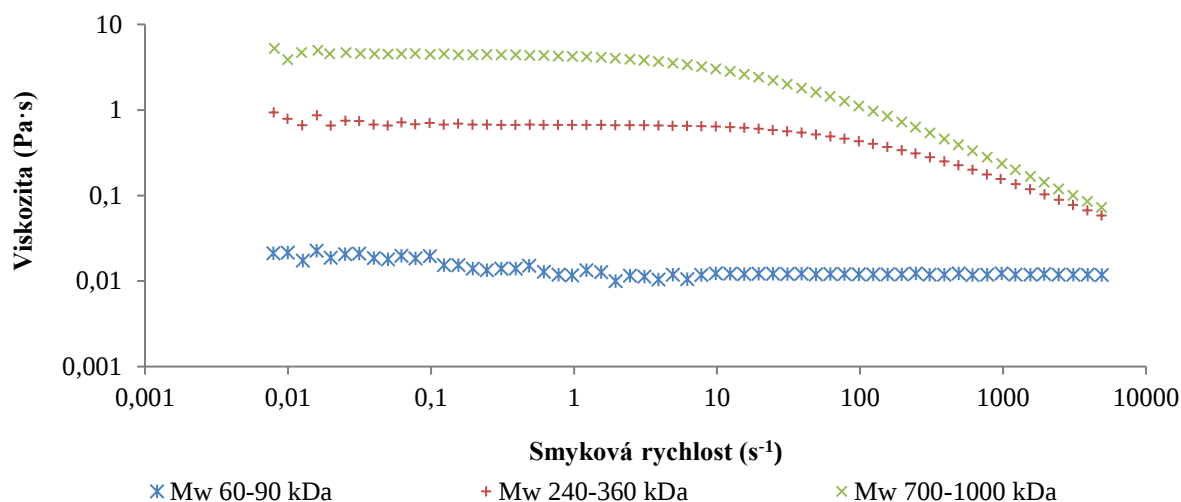
5.1 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA

Byl připraven a charakterizován hydrogel na bázi hydroxyfenyl (tyraminovaného) derivátu HA-TA vhodný jako vehikulum pro inkorporované buňky. Daný systém vykazuje rychlou gelaci umožňující zesítnění materiálu *in situ* při zachování vhodných vlastností hydrogelu. Pro podporu buněčné viability a adheze byl využit hydroxyfenyl derivát HA, který obsahuje RGD sekvenci i hydroxyfenylovou skupinu (HA-PH-RGD^{PURE}) možnou zesítnit pomocí peroxidu vodíku a HRP stejně jako u HA-TA derivátu. Reakce je pomalejší ve srovnání s tyraminovaným derivátem HA-TA, a proto je žádoucí kombinace těchto dvou derivátů (HA-PH-RGD^{MIX}) pro dosažení vhodné rychlosti gelace a viskoelastických či mechanických vlastností.

5.1.1 HA-PH-RGD a jeho směsi s HA-TA derivátem

5.1.1.1 Zdánlivá viskozita

Zdánlivá viskozita byla stanovena pomocí rotačního reometru AR-G2 dle metodiky popsané v kapitole 4.2.1.1. Roztoky HA-PH-RGD^{MIX} o koncentraci 20 mg/ml (hmotnostní poměr HA-PH-RGD^{PURE}:HA-TA byl 1:1, 10 mg/ml HA-PH-RGD^{PURE} a 10 mg/ml HA-TA) v PBS pH 7,4 byly zvoleny pro porovnání zdánlivé viskozity roztoků lišících se molekulovou hmotností výchozího derivátu. Dle předpokladu dochází u těchto roztoků k poklesu zdánlivé viskozity se smykovou rychlostí (Obr. 5). Jedná se o projev nelineárního chování, kdy dochází k zřednutí při toku (*shear-thinning*). Pokles je o to více signifikantní, čím je vyšší molekulová hmotnost. Pokud je molekulová hmotnost velmi nízká (M_w 60–90 kDa, koncentrace derivátu 20 mg/ml), roztoky se chovají téměř jako newtonské. Dle předpokladu s rostoucí molekulovou hmotností při zvolené smykové rychlosti narůstá i zdánlivá viskozita roztoku.

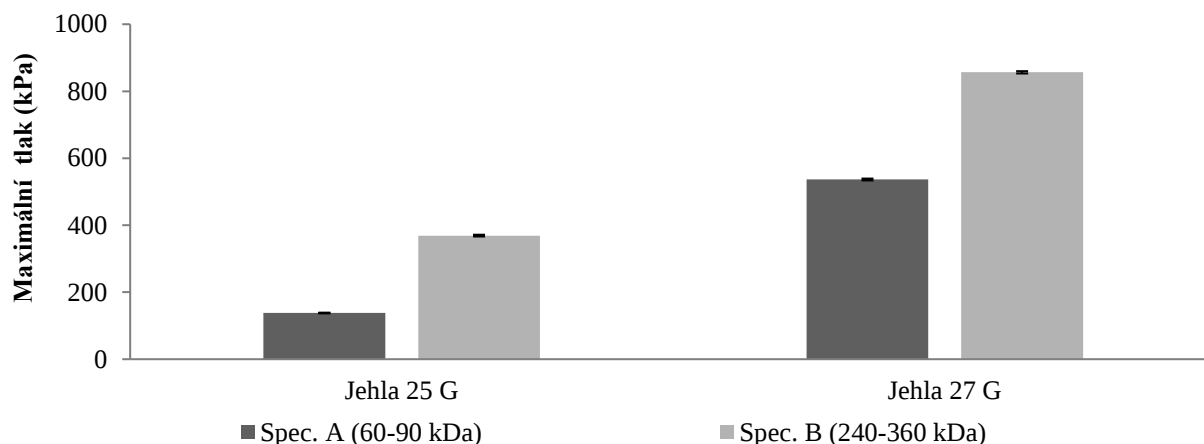


Obr. 5 Závislost zdánlivé viskozity na smykové rychlosti u HA-PH-RGD^{MIX} derivátu s různou molekulovou hmotností.

5.1.1.2 Výtlačná síla

S viskozitou také souvisí výtlačná síla, u které byl hodnocen maximální tlak vytvořený extruzí roztoku ze stříkačky přes jehlu. Výtlačná síla byla stanovena dle metodiky popsané v kapitole 4.3. Pro aplikaci materiálu byly použity 2 typy velmi tenkých jehel 25 G a 27 G s délkou 40 mm a vnitřním průměrem 0,26 mm (25 G) a 0,21 mm (27 G). Jehly byly zvoleny na základě parametrů aplikačního zařízení AMCath katetr. Vnitřní průměr 1,2 m dlouhého dvoucestného katetru (0,5 mm) i jehly zakončující katetr ($0,24 \pm 0,01$ mm) jsou velmi malé.

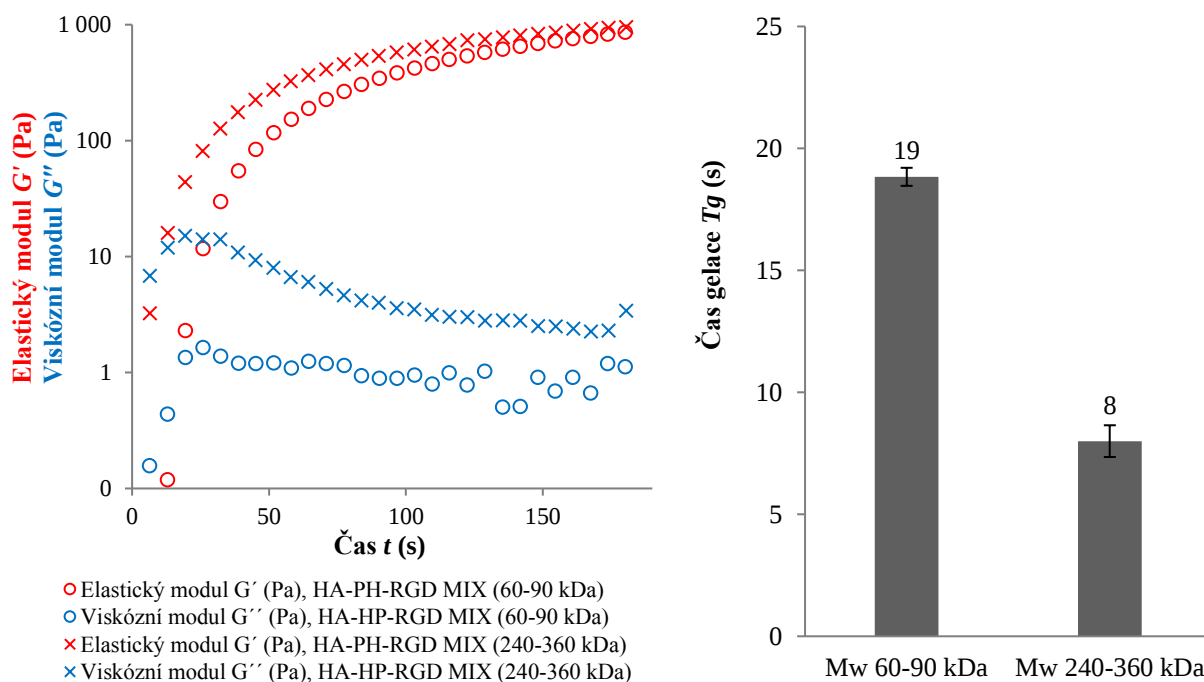
V případě tohoto systému je výtlačná síla dána především parametry hydroxyfenyl derivátu HA. Byly testovány deriváty lišící se v molekulové hmotnosti (spec. A M_w 60–90 kDa, spec. B M_w 240–360 kDa) při zachování stejné koncentrace roztoku derivátu 20 mg/ml v PBS (pH 7,4). V následujícím Obr. 6 jsou uvedeny hodnoty maximálního tlaku pro oba typy derivátu při extruzi přes jehlu 25 G v porovnání s jehlou s menším průměrem 27 G. Maximální tlak je vyšší u roztoků derivátu s vyšší molekulovou hmotností (M_w 240–360 kDa) v porovnání s nízkomolekulárním derivátem (M_w 60–90 kDa). Dle předpokladu je také hodnota maximálního tlaku vyšší u jehly (27 G) s menším vnitřním průměrem.



Obr. 6 Výtlačná síla – maximální tlak vytlačovaných roztoků HA-PH-RGD^{MIX} (spec. A a B) přes jehlu o velikost 25 a 27 G.

5.1.1.3 Kinetika gelace

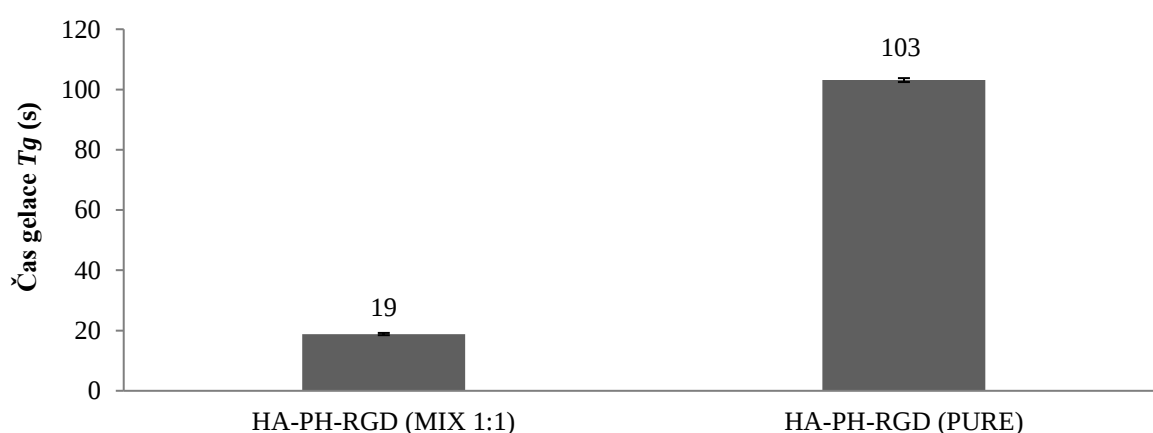
Byla testována kinetika gelace u materiálů na bázi HA-PH-RGD^{MIX} (1:1) v koncentraci 20 mg/ml v roztoku PBS (pH 7,4) se síťovacími činidly 1 (koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml) s nízkou (M_w 60–90 kDa) a střední molekulovou hmotností (M_w 240–360 kDa).



Obr. 7 Závislost elastického a viskózního modulu na čase (vlevo) čas gelace T_g (vpravo) materiálů na bázi derivátu HA-PH-RGD^{MIX} o koncentraci 20 mg/ml s různou molekulovou hmotností. Aktivita HRP je 0,24 U/ml a koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %.

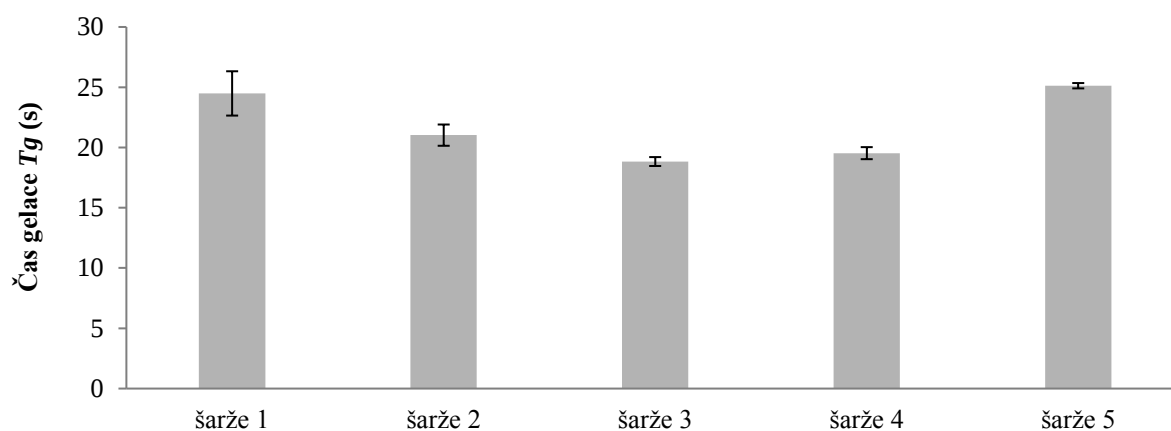
Na základě výsledků stanovení zdánlivé viskozity a výtlačné síly roztoků HA-PH-RGD^{MIX} je výhodné využití derivátu s nejnižší molekulovou hmotností spec. A (M_w 60–90 kDa), jelikož bude materiál aplikován do srdeční tkáně katetrem s malým vnitřním průměrem o délce 1,2 m. Kromě nízké viskozity je dalším důležitým parametrem charakterizující prekursorový roztok i hodnota elastického a viskózního modulu na počátku reakce. Jak je vidět z Obr. 7 z průběhu kinetiky gelace, prekursorový roztok derivátu HA-PH-RGD^{MIX} s M_w 240–360 kDa dosahuje na počátku měření před gelací vyššího elastického a viskózního modulu ve srovnání s M_w 60–90 kDa. Také je rychlost gelace derivátu s vyšší M_w (240–360 kDa) příliš rychlá pro danou aplikaci ve srovnání s nižší M_w (60–90 kDa, spec. A).

Hydroxyfenyl derivát nesoucí RGD skupinu (HA-PH-RGD^{pure}) s nízkou molekulovou hmotností (M_w 60–90 kDa) dosahuje velmi pomalých časů gelace a materiál by vytékal po aplikaci z místa defektu. Z tohoto důvodu byl kombinován s hydroxyfenyl derivátem HA bez RGD skupiny (HA-TA) v hmotnostním poměru 1:1 za vzniku směsi HA-PH-RGD^{MIX}. Byla porovnána rychlost gelace této směsi v koncentraci 20 mg/ml v roztoku PBS 7,4 se síťovacími činidly 1 (koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml). Jak je vidět v Obr. 8, čas gelace se tímto způsobem zkrátil na 19 s.



Obr. 8 Čas gelace Tg materiálů na bázi derivátů HA-PH-RGD^{PURE} a HA-PH-RGD^{MIX} spec. A (20 mg/ml, PBS 7,4) se síťovacími činidly 1 (koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml).

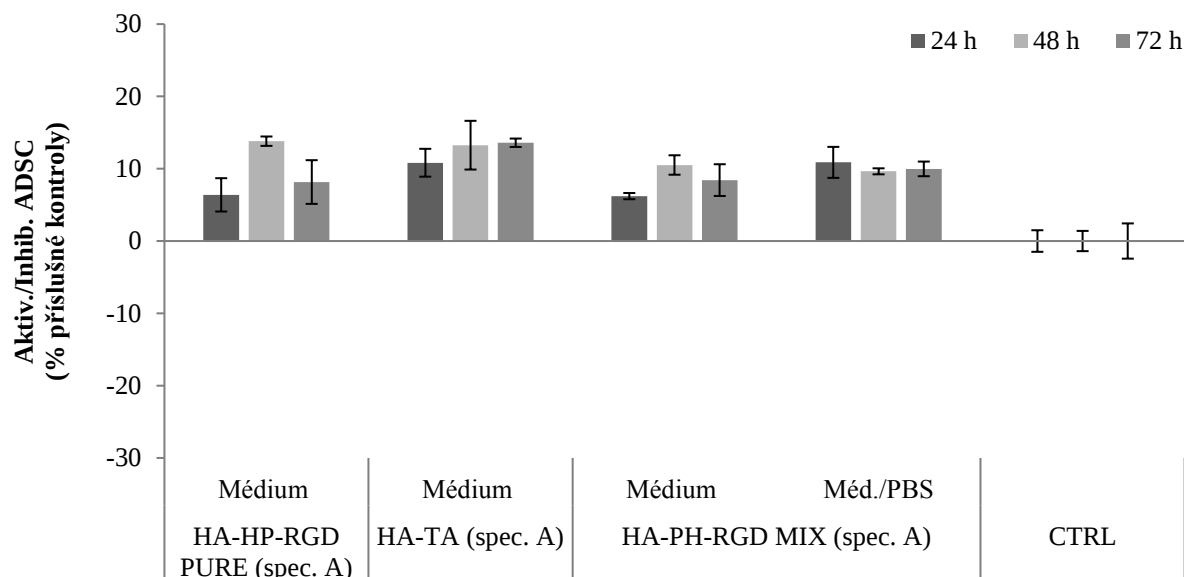
U derivátu HA-PH-RGD^{MIX} spec. A (M_w 60–90 kDa) bylo proměřeno množství připravených vzorků lišících se připravenou šarží vstupního derivátu HA-PH-RGD^{MIX}, šarží HRP a peroxidu vodíku. Jak je vidět v Obr. 9, z pohledu aplikačního je rychlost gelace porovnatelná u všech připravených šarží.



Obr. 9 Čas gelace vzorků lišících se šarží derivátu HA-PH-RGD^{MIX} spec. A či šarží HRP a peroxidu vodíku.

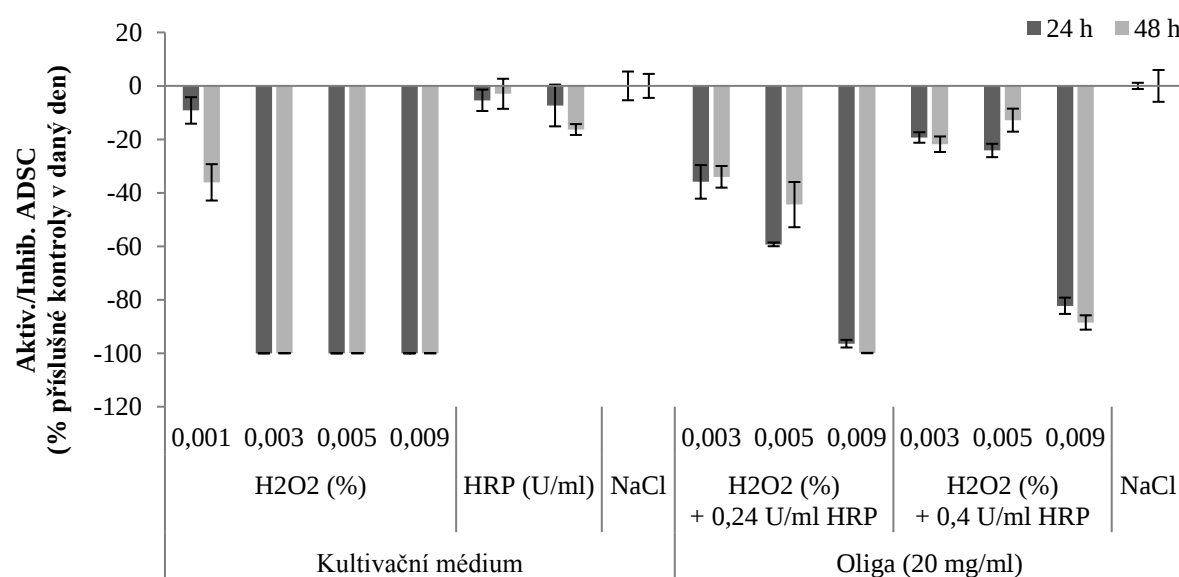
5.1.1.4 Cytotoxicita

Materiál není cytotoxický, pokud buněčná viabilita neklesne o 30 % vůči kontrole dle ISO 10993-5. V Obr. 10 je znázorněna cytotoxicita hydroxyfenyl derivátů HA – HA-PH-RGD^{PURE}, HA-TA a HA-PH-RGD^{MIX}. Testované materiály nejsou cytotoxické. Buňky vykazují vyšší proliferační schopnost v přítomnosti daných derivátů v porovnání s kontrolou (kultivačním médiem).



Obr. 10 Aktivace a inhibice ADSC u hydroxyfenyl derivátů HA specifikace A s nízkou M_w vyjádřena v procentech vůči příslušné kontrole CTRL.

Síťovací reakce hydroxyfenyl derivátu HA za přítomnosti enzymu HRP je iniciována přidavkem peroxidu vodíku. Proto také byla testována cytotoxicita těchto síťovacích činidel samotných a jejich kombinace s oligosacharidy připravených degradací hydroxyfenyl derivátu HA (Obr. 11). Roztoky HRP nejsou cytotoxické, kdežto samotný roztok peroxidu vodíku je cytotoxický v koncentraci 0,003 % a vyšší. Při zvolené finální koncentraci peroxidu vodíku (0,005 %) a HRP (0,4 U/ml) s obsahem oligosacharidu derivátu HA-TA (oligo-HA) nepoklesla viabilita o více než 30 % vůči kontrole (hranice cytotoxicity -30 %). Navíc je roztok peroxidu vodíku během síťovací reakce spotřebováván a buňky jsou jím exponovány po velmi krátkou dobu v rámci sekund či desítek sekund.



Obr. 11 Cytotoxicita síťovacích činidel – aktivace/inhibice ADSC.

5.1.1.5 Botnání hydrogelů – in vitro stabilita HA-PH-RGD hydrogelů

Hydrogely na bázi HA-PH-RGD^{MIX} o koncentraci 20 mg/ml byly připraveny v roztoku PBS pH 7,4. Dle postupu uvedeném v kapitole 4.1 byly připraveny gely o průměru 11,1 mm a hmotnosti 300–500 mg. Hydrogely byly po zvážení vloženy do vialky a zality 3 ml roztoku PBS a uchovány v inkubátoru po dobu 8 týdnů. Koeficient nabotnění byl spočten jako podíl hmotnosti gelu po a před botnáním (Tab. 1) a byl sledován spolu s Youngovým modulem po dobu 8 týdnů.

Tab. 1 Botnání hydrogelů HA-PH-RGD^{MIX} v PBS (pH 7,4) po dobu 8 týdnů

	Koncentrace peroxidu vodíku (%)	Aktivita HRP (U/ml)	Čas t	Koeficient nabotnění Q ± SD (%)	Youngův modul ± SD (kPa)
HA-PH-RGD ^{MIX}	0,003	0,24	0 dní	100,0	9,7 ± 1,2
			1 dní	143,3 ± 2,0	8,4 ± 1,1
			7 dní	145,4 ± 2,4	8,1 ± 1,1
			14 dní	152,0 ± 0,6	6,8 ± 0,2
			21 dní	161,8 ± 12,8	5,6 ± 0,7
			28 dní	169,1 ± 4,0	6,7 ± 0,9
			6 týdnů	183,1 ± 5,5	6,1 ± 1,9
			8 týdnů	178,9 ± 0,5	6,4 ± 1,2

5.2 Inkorporace kardiopoitických buněk do HA-PH-RGD hydrogelu

Pro dosažení požadovaného efektu regenerace tkáně po infarktu myokardu je nutné do hydrogelu zakomponovat co nejvíce buněk při zachování jejich viability, možnosti proliferace a současně zachování vhodných vlastností materiálu. Pro danou aplikaci byly použity kardiopoitické buňky ADSC. Buňky byly poskytnuty společností Celyad, jedním z partnerů EU projektu AMCARE. Zvolené finální množství buněk (ADSC) inkorporovaných do hydrogelu bylo 20 mil. na 1 ml hydrogelu.

Buněčná adheze k povrchu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové je termodynamicky nevýhodná. Je to dáno značnou hydrofilitou polymeru a jeho záporným nábojem [35]. Dále pak samotná struktura a povaha polysacharidů hraje důležitou roli v interakci s buňkami, tzv. *crosstalk* je příhodný pro bílkoviny/peptidy obsahující mnoho amino skupin. Adheze buněk je důležitá kvůli proliferaci a diferenciaci buněk. Pro buněčnou adhezi je tedy nutné zakomponovat do struktury hydrogelu adhezivní molekuly, jako je kolagen, fibronectin, laminin, vitronectin, fibrin, fibrinogen [34, 36, 37] či různé peptidové sekvence [35, 38, 39, 40, 41, 42, 43].

Ke zvýšení buněčné adheze a viability byl použit derivát s pevně vázanou peptidovou RGD sekvencí HA-PH-RGD^{PURE} [41] v kombinaci s tyraminovaným derivátem HA-TA v hmotnostním poměru 1:1 pro dosažení optimálních vlastností gelu (HA-PH-RGD^{MIX}).

5.2.1.1 Vliv inkorporovaných buněk na charakter hydrogelu na bázi HA-PH-RGD^{MIX}

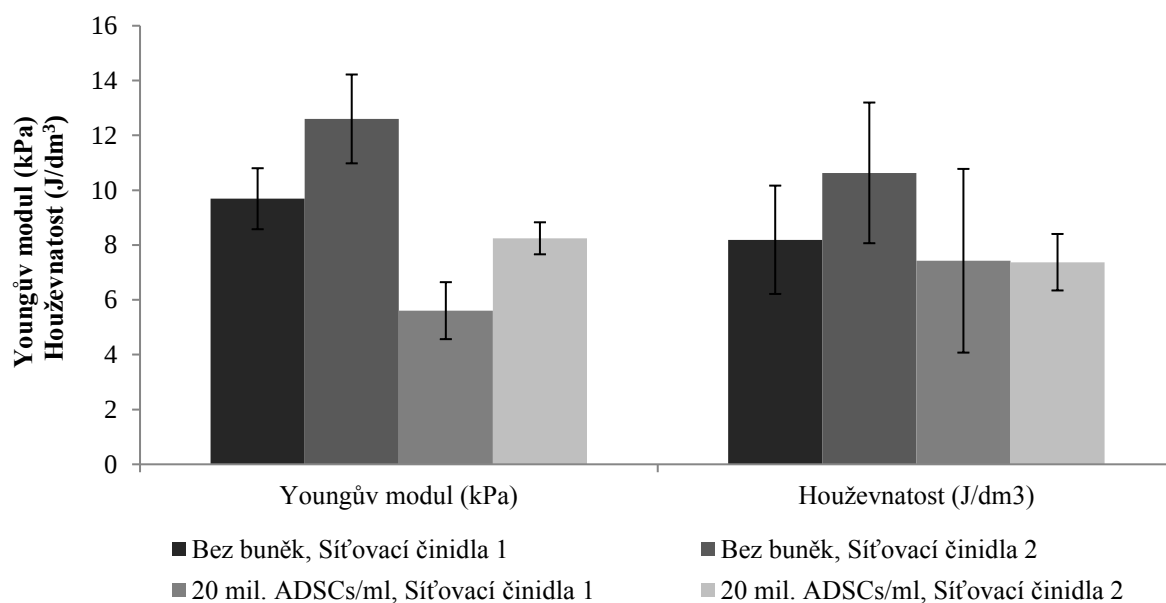
Hydrogely byly připraveny dle postupu v kapitole 4.1. Zvolený finální materiál HA-PH-RGD^{MIX} byl rozpuštěn v roztoku PBS pH 7,4 v koncentraci 20 mg/ml. V případě buněčných hydrogelů byla při gelaci přidána buněčná suspenze s finální koncentrací 20 mil. ADSC/ml.

Hydrogel

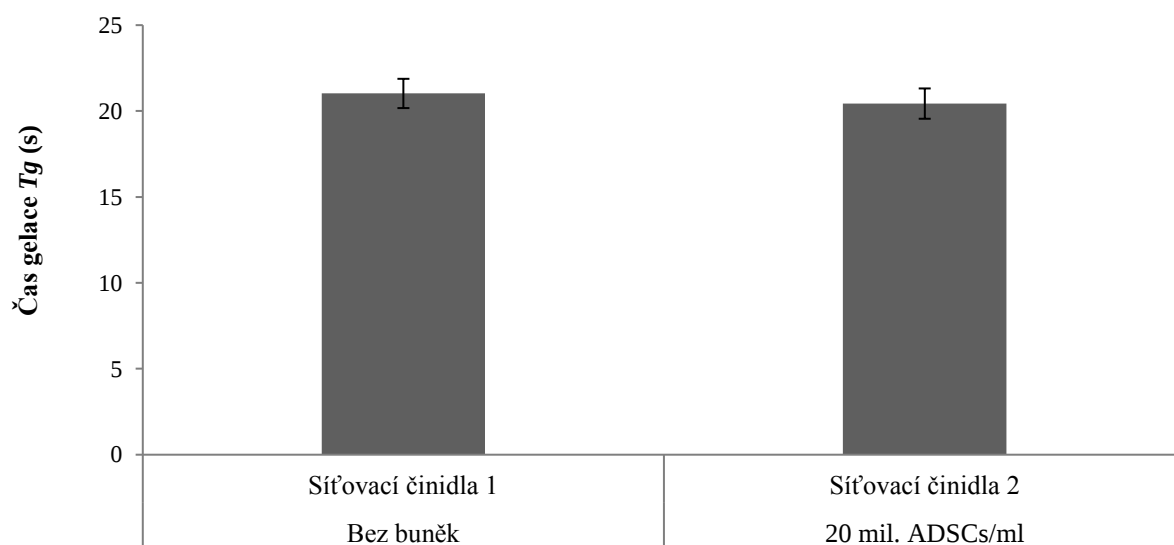
Bez buněk	Síťovací činidla 1	Konc. peroxidu vodíku 0,003 %	Aktivita HRP 0,24 U/ml
Bez buněk	Síťovací činidla 2	Konc. peroxidu vodíku 0,005 %	Aktivita HRP 0,4 U/ml
20 mil. ADSC/ml	Síťovací činidla 1	Konc. peroxidu vodíku 0,003 %	Aktivita HRP 0,24 U/ml
20 mil. ADSC/ml	Síťovací činidla 2	Konc. peroxidu vodíku 0,005 %	Aktivita HRP 0,4 U/ml

U HA-PH-RGD^{MIX} materiálu bez buněk se síťovacími činidly 1 bylo docíleno optimálních vlastností hydrogelu z pohledu rychlosti gelace, mechanických a viskoelastických vlastností (kapitola 5.1.1). Pokud jsou ale do hydrogelu inkorporovány buňky, dochází ke znatelnému botnání hydrogelové matrice

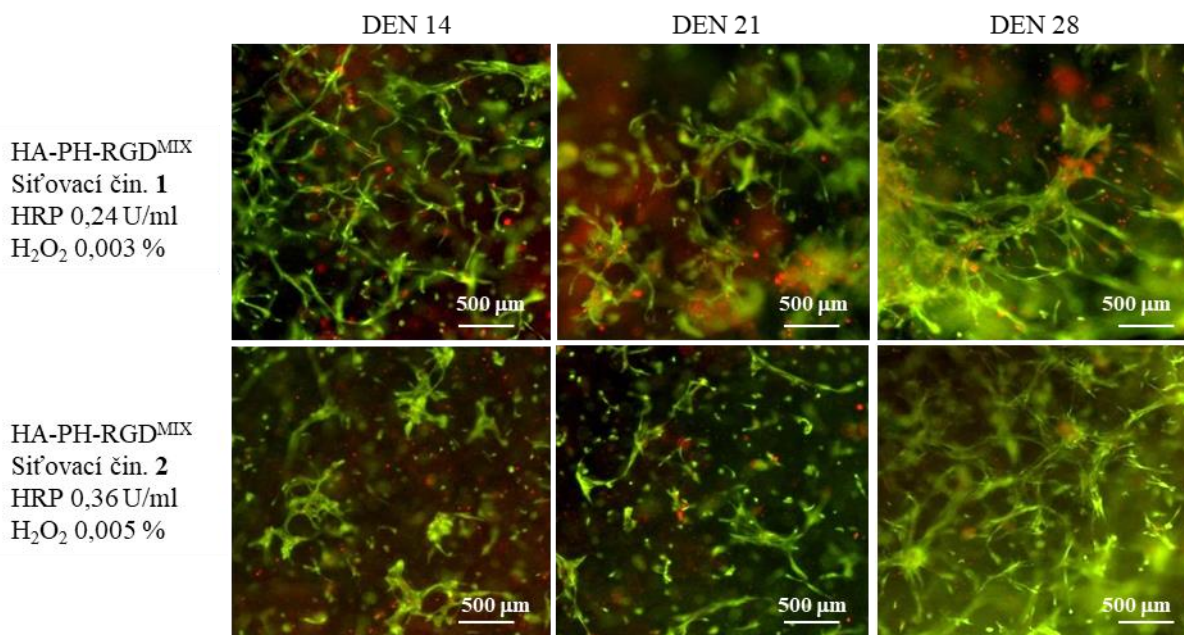
a degradaci během kultivace (Obr. 14). Tento negativní aspekt je způsoben dekompozicí peroxidu vodíku vlivem přidavku suspenze vedoucí k prodloužení gelačního času a poklesu tuhosti hydrogelové sítě, resp. Youngova modulu (Obr. 12 hydrogel obsahující síťovací činidla 1 – bez buněk vs. inkorporace 20 mil. ADSC/ml). Navýšením koncentrace činidel lze tyto nevyhovující vlastnosti eliminovat a dosáhnout srovnatelných vlastností gelu s obsahem ADSC jako v případě hydrogelu bez buněk (Obr. 12 – hydrogel obsahující síťovací činidla 2 s inkorporovanými 20 mil. ADSC/ml). Jak je vidět z Obr. 13, volbou vhodné koncentrace síťovacích činidel bylo docíleno také srovnatelné rychlosti gelace u hydrogelu bez buněk (s nižším obsahem síťovacích činidel 1) a buněčného hydrogelu (s vyšším obsahem síťovacích činidel 2). V tomto případě hydrogely během kultivace signifikantně méně botnají a degradace je zpomalena. Adheze ADSC je patrná u obou hydrogelů lišících se tuhostí a charakterem (Obr. 14).



Obr. 12 Youngův modul a houževnatost hydrogelů bez buněk a s obsahem 20 mil. ADSC na 1 ml s různým stupněm zesílení určeným síťovacími činidly: 1 (koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml) a 2 (koncentrace peroxidu vodíku 0,005 %, aktivita HRP 0,4 U/ml).



Obr. 13 Čas gelace hydrogelu bez buněk s obsahem síťovacích činidel 1 a hydrogelu s inkorporovanými buňkami (20 mil. ADSC/ml) s obsahem síťovacích činidel 2.



Obr. 14 Vliv tuhosti gelů na adhezi a růst ADSC. Materiály s nižším přidavkem síťovacích činidel (HRP 0,24 U/ml, peroxid vodíku 0,003 %) s nižší tuhostí (Síťovací činidla 1) a vyšším přidavkem síťovacích činidel (HRP 0,4 U/ml, peroxid vodíku 0,005 %) s vyšší tuhostí (Síťovací činidla 2).

5.3 Kompatibilita vybraného materiálu s aplikačními zařízeními

Na základě dosažených výsledků (5.1.1, 5.2.1.1) byl pro testování kompatibility vybraného materiálu s aplikačními zařízeními použit derivát na bázi HA-PH-RGD^{MIX}, který lze zesílit enzymatickou reakcí pomocí enzymu HRP při přidavku peroxidu vodíku. Tento materiál podporuje viabilitu a adhezi buněk ADSC ve finální zvolené koncentraci 20 mil./ml hydrogelu.

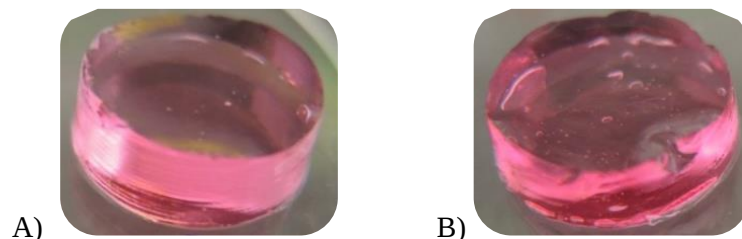
Pro snadnou aplikovatelnost materiálu pomocí aplikačních zařízení byl zvolen derivát s nízkou molekulovou hmotností 60–90 kDa vykazující v koncentraci 20 mg/ml nízkou zdánlivou viskozitu prekurzorových roztoků (5.1.1.1) i při nízké smykové rychlosti. Dalším důležitým parametrem je gelační čas, který nesmí být příliš rychlý, aby nedošlo k zatuhnutí v aplikační části SPREADS zařízení či v jehle katetru, ale také příliš dlouhý, aby nedocházelo k vytékání materiálu z místa aplikace při použití katetru. Proto byla zvolena u scaffoldu bez buněk aktivita HRP 0,24 U/ml a koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %. Při inkorporaci buněk ADSC v hustotě 20 mil. b./ml byl navýšen obsah síťovacích činidel (HRP 0,4 U/ml a peroxid vodíku 0,003 %) pro zachování vhodné rychlosti gelace a charakteru gelu (5.2.1.1). Výsledky popisu charakteru finálního materiálu a jeho kompatibility s aplikačními zařízeními jsou uvedeny také v publikacích [71, 72].

5.3.1 Aplikace materiálu pomocí katetru

Pro možnou aplikaci daného materiálu do srdeční tkáně byl v rámci EU projektu AMCARE (FP7-NMP-2013-SME-7) partnery navržen speciální katetr AMCath s uzpůsobeným dávkováním vzorku popsáný v publikaci [71]. Katetr délky 1,2 m je složen ze dvou přírodních hadiček s vnitřním průměrem 0,5 mm zakončených nástavcem mající *luer lock* pro možné napojení stříkaček, které obsahují prekurzorové roztoky HA-PH-RGD^{MIX} se síťovacími činidly a ADSC buňkami. Přírodní dvoucestná hadička vede do reservoáru o objemu 5 ml v koncové části katetru, kde dochází ke smísení dvou prekurzorových roztoků. Katetr je zakončen konickou jehlou s velmi malým vnitřním průměrem ($0,24 \pm 0,01$ mm). Katetr, vyjma úchytne části, je zaveden přes abdominální aortu do srdeční stěny, kde jsou aplikovány malé dávky materiálu (200 μl).

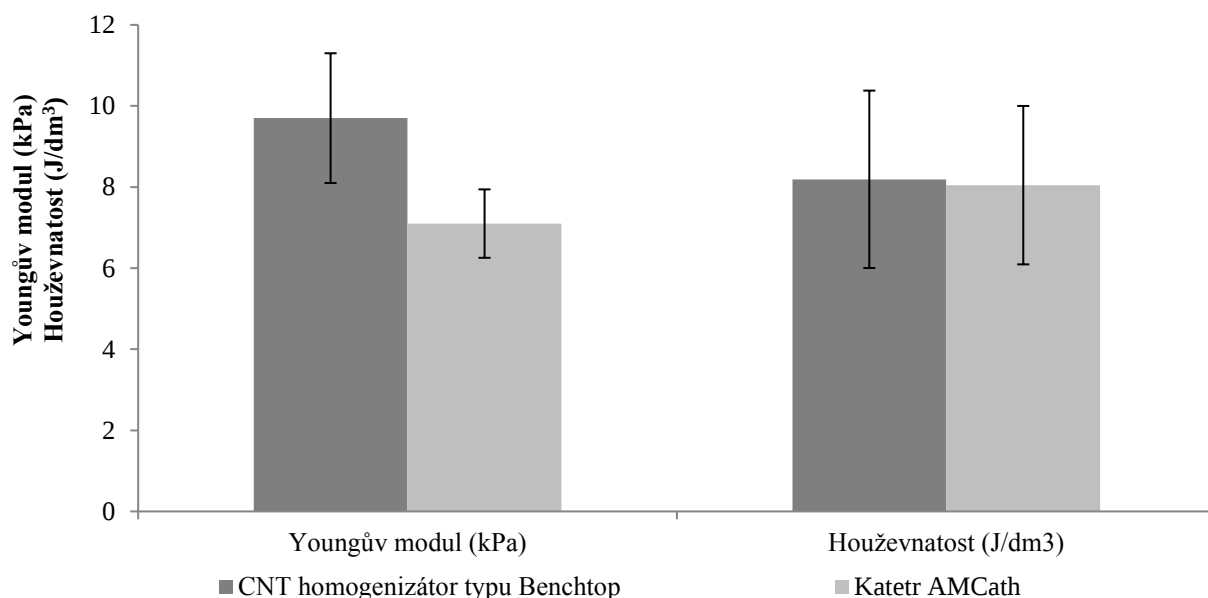
5.3.1.1 Charakterizace hydrogelů připravených pomocí katetru

Byly porovnány vlastnosti hydrogelů připravených pomocí Contipro směšovače (4.1) a katetru AMCath. Koncentrace finálního materiálu HA-PH-RGD^{MIX} (1:1) byla 20 mg/ml v PBS (pH 7,4), koncentrace peroxidu vodíku 0,003 % a aktivita HRP 0,24 U/ml. Byly stanoveny viskoelastické a mechanické vlastnosti hydrogelů a stupeň nabotnění.

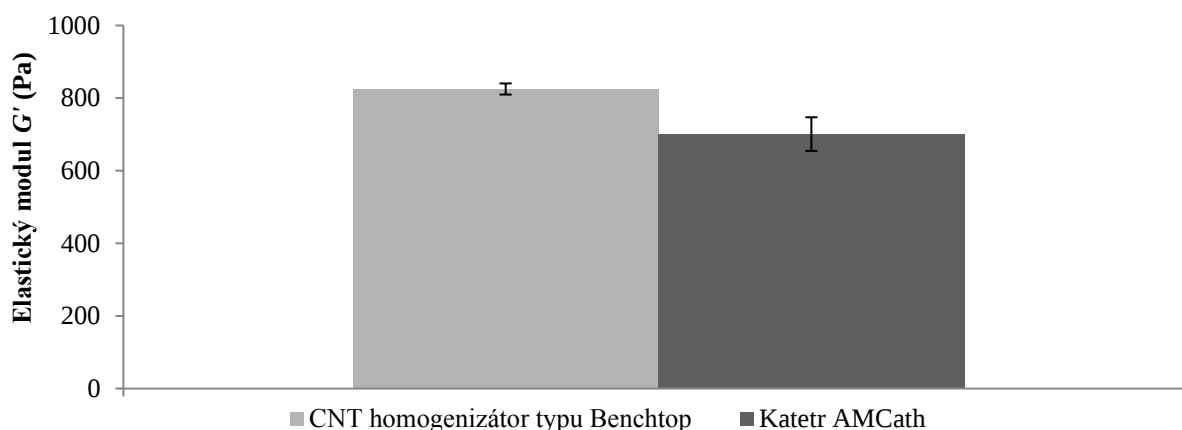


Obr. 15 Homogenita hydrogelů připravených pomocí Contipro homogenizátoru (A) a katetru AMCath (B) vizuálně znázorněna pomocí přidavku barviva Sirius Red.

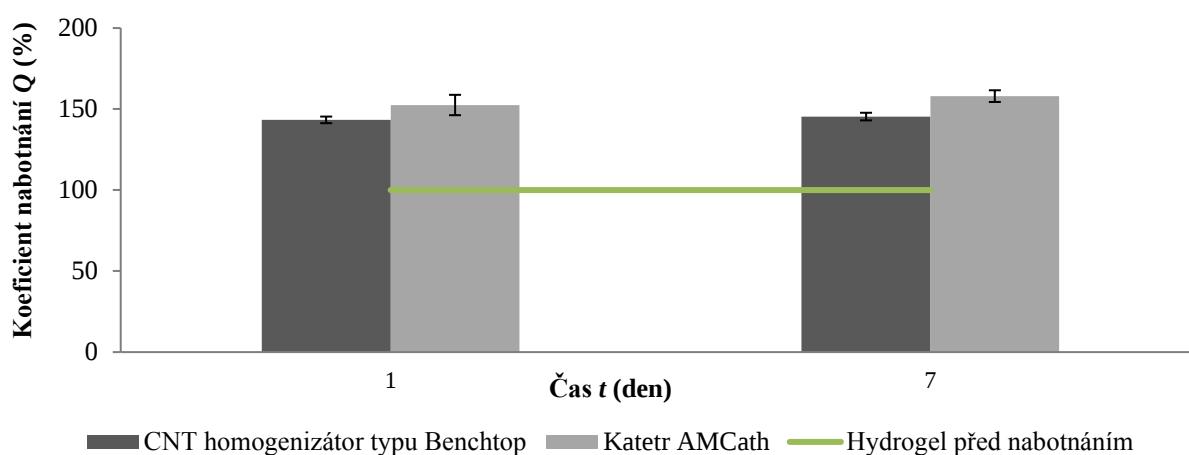
Homogenita připravených hydrogelů byla testována vizuálně pomocí barviva Sirius Red, která byla zamíchána do prekursorového roztoku před jeho přípravou. Vizuálně nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi hydrogely připravenými pomocí homogenizátoru a katetru (Obr. 15). Na druhou stranu tuhost hydrogelů připravených pomocí standardního směšovače byla vyšší v porovnání s hydrogely připravenými pomocí katetru (Obr. 16, Obr. 17). Tuhost sítě byla určena stanovením elastického G' (viskózního modulu G'' , ztrátového úhlu δ) a Youngova modulu Y . Pro hydrogel připravený směšovačem jsou parametry následovné: $G' = 825$ Pa, $G'' = 3,2$ Pa, $\delta = 0,22^\circ$, $Y = 9,7$ kPa a pomocí katetru nabývají hodnot $G' = 701$ Pa, $G'' = 4,3$ Pa, $\delta = 0,36^\circ$, $Y = 7,7$ kPa se statistickým rozdílem pro G' $p = 0,0002$ a pro Y $p = 0,0077$. Stupeň nabotnění (Obr. 18) byl také vyšší u hydrogelů připravených pomocí katetru (52,5 % vs. 43,3 %, $p = 0,0077$), což koreluje s výsledky dosaženými při testování viskoelastických a mechanických vlastností. Rozdíl nebyl zaznamenán u houževnatosti stanovené podílem energie, potřebné k narušení hydrogelu, a objemu hydrogelu (0,35–0,45 ml). Pravděpodobně je rozdíl ve vlastnostech dán mírnou nehomogenitou způsobenou nedostatečným zesítním, která ale není vizuálně patrná. Na druhou stranu hydrogel je kompaktní, drží tvar a lze do něj inkorporovat buňky bez ztráty integrity vzorků.



Obr. 16 Youngův modul a houževnatost hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a katetru AMCath.



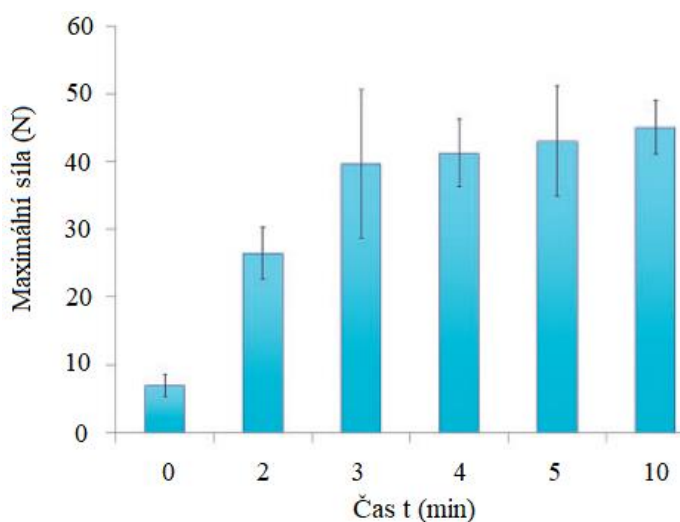
Obr. 17 Elastický modul hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a katetru AMCath.



Obr. 18 Stupeň nabotnění Q hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a katetru AMCath.

Roztok HA-PH-RGD^{MIX} s M_w 60–90 kDa vykazuje velmi nízkou zdánlivou viskozitu a maximální sílu při extruzi přes jehly (25 G a 27 G) se srovnatelným vnitřním průměrem s jehlou zakončující katetr.

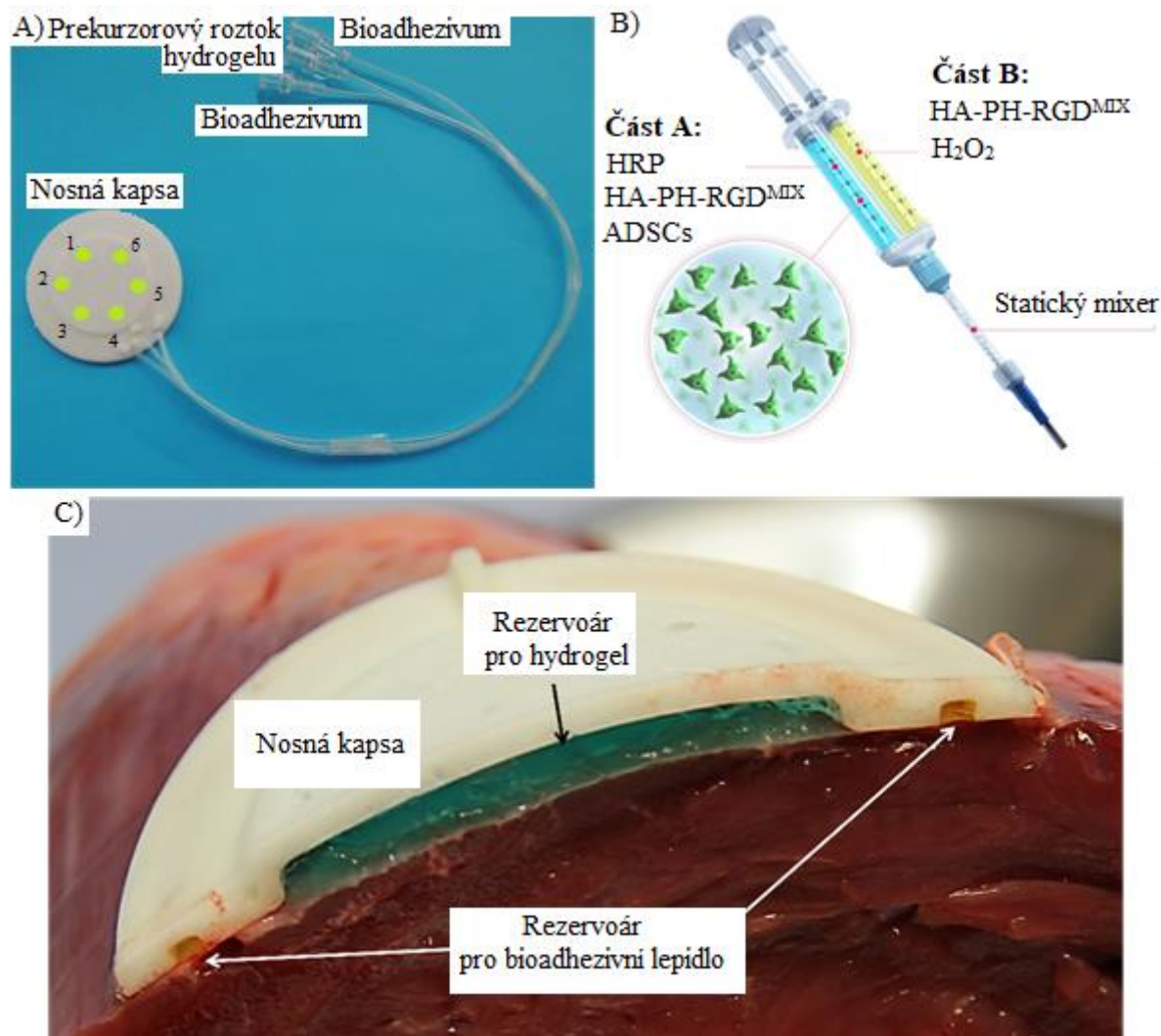
Pro snadnou aplikovatelnost *in vivo* je důležité stanovení maximální síly potřebné pro extruzi materiálu při stlačení stříkaček spojených s katetrem. Obecně je maximální vhodná síla pro stlačení mužem 70 N a ženou 50 N. Během extruze finálního materiálu dochází ke gelaci a v průběhu 3 minut maximální síla dosahuje maxima, které ale nepřesahuje hodnotu 50 N a dále se již tato hodnota nemění a je možné materiál aplikovat (Obr. 19) [71]. Tento fakt je dán vlastní speciální konstrukcí katetru obsahující rezervoár v konečné části, kde dochází k mísení prekurzorových roztoků, a také charakterem samotného materiálu po gelaci – hydrogely nevykazují příliš vysokou tuhost.



Obr. 19 Závislost maximální síly na čase při extruzi finálního materiálu pomocí katetru.

5.3.2 Aplikace pomocí SPREADS zařízení

SPREADS je speciální aplikační zařízení, které bylo vyvinuto společností AdjuCor GmbH (<https://www.adjuco.com/>). Je složeno z nosné kapsy (*substance carrier*) a 3 přírodních hadiček (*supply line*) – jedna pro aplikaci hydrogelového prekurzorového roztoku do rezervoáru ve středu kapsy a dvou hadiček pro dopravení bioadheziva do rezervoáru nacházející se po obvodu kapsy. Spodní část nosné kapsy je tvořena biodegradabilní polopropustnou membránou (Obr. 20) [72].

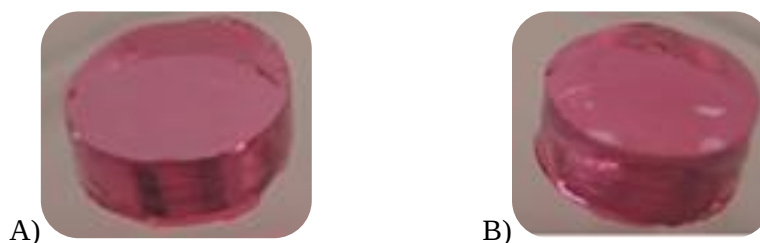


Obr. 20 Zařízení SPREADS je složené z nosné kapsy a aplikačních hadiček (A), směšovače pro přípravu homogenního roztoku (B). Ukázka řezu nosné kapsy aplikované na prasečím kadáveru obsahující hydrogel obarvený methylenovou modří (C) [72].

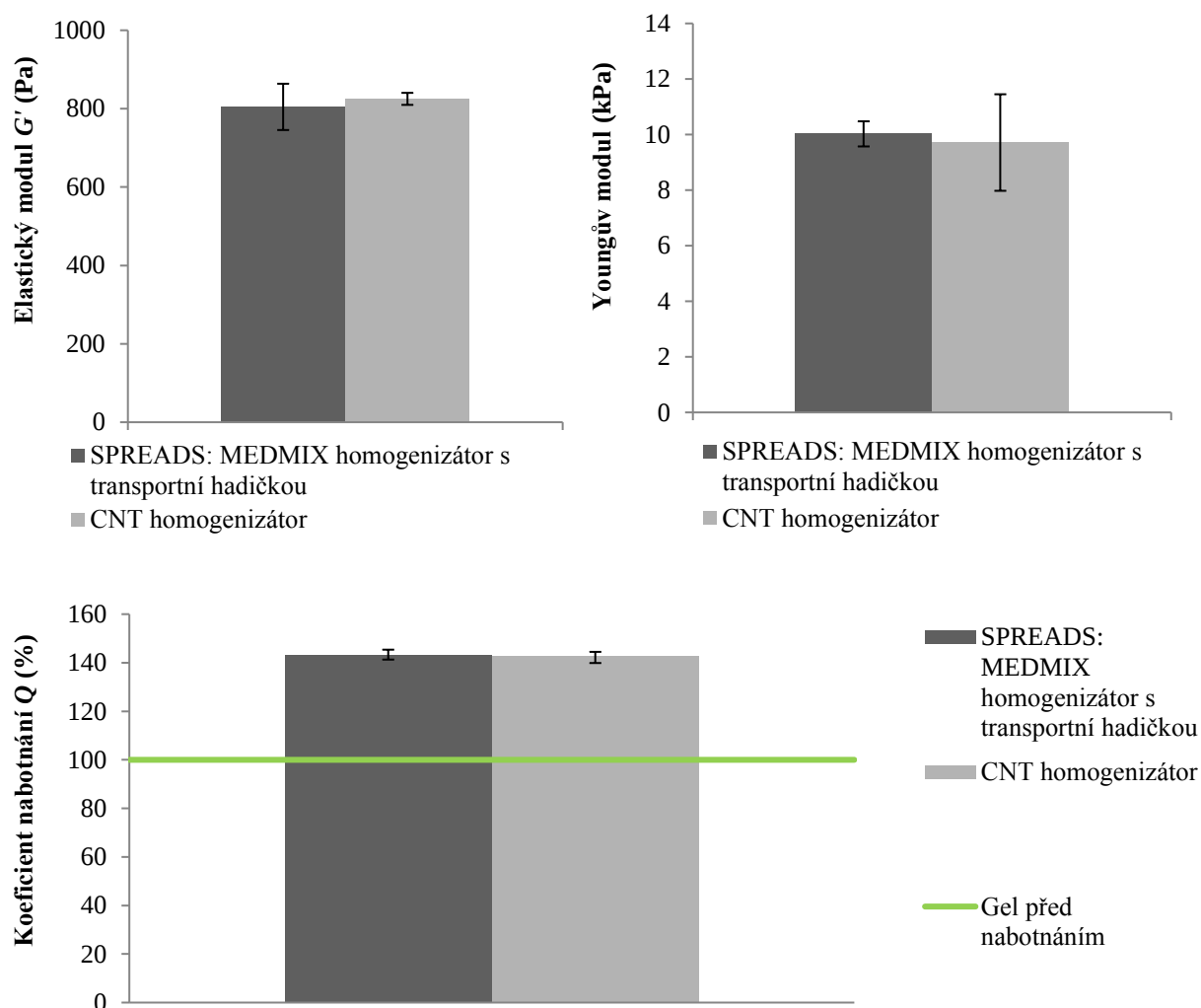
5.3.2.1 Charakterizace hydrogelů připravených pomocí aplikační části zařízení SPREADS

Pro smísení prekurzorových roztoků byl použit směšovač zakoupený od společnosti MEDMIX (<https://www.medmix.ch/>). Byly porovnány vlastnosti hydrogelů připravené tímto směšovačem s transportní hadičkou vedoucí do nosné kapsy SPREADS zařízení (Obr. 20) a Contipro (CNT) homogenizátorem typu Benchtop (4.1), který byl použit při předchozím testování hydrogelových vlastností. Finální prekurzorový roztok byl zvolen na bázi HA-PH-RGD^{MIX} s nízkou molekulovou hmotností (M_w 60–90 kDa) a koncentrací roztoku (20 mg/ml) zachovávající velmi nízkou zdánlivou viskozitu kvůli snadné aplikovatelnosti. Koncentrace síťovacích činidel byla volena, aby nedošlo k zatuhnutí směsi v přírodních hadičkách a došlo k dostatečnému rozprostření materiálu v nosné kapse (peroxid vodíku 0,003 %, HRP 0,24 U/ml) zaručující homogenní distribuci buněk.

Homogenita připravených hydrogelů byla testována vizuálně pomocí barviva Sirius Red, které bylo zamícháno do prekurzorového roztoku před jeho přípravou. Vizuálně nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi připravenými hydrogely (Obr. 21), což bylo potvrzeno srovnatelnými hodnotami elastického a Youngova modulu a koeficientu nabotnění (Obr. 22). Pro hydrogel připravený Contipro směšovačem byly stanoveny hodnoty $G' = 825$ Pa, $G'' = 3,2$ Pa, $\delta = 0,20^\circ$, $Y = 9,7$ kPa a pomocí MEDMIX směšovače s přívodnou hadičkou $G' = 805$ Pa, $G'' = 2,8$ Pa, $\delta = 0,22^\circ$, $Y = 7,7$ kPa se statistickým rozdílem pro G' $p = 0,0002$ a pro Y $p = 0,0077$.



Obr. 21 Homogenita připravených hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop (A) a MEDMIX homogenizátoru s transportní hadičkou (B) vizuálně znázorněna pomocí přídavku barviva Sirius Red.



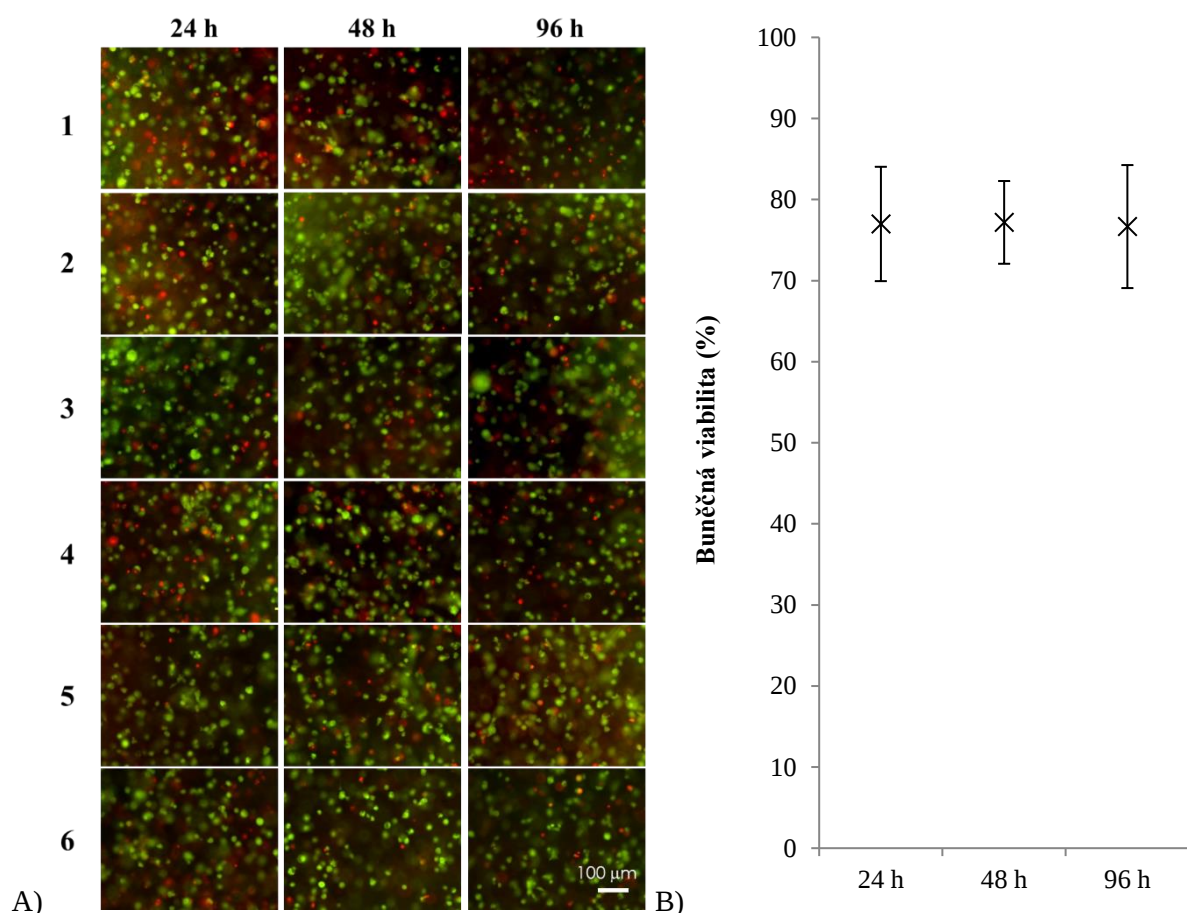
Obr. 22 Hydrogely připravené pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru a MEDMIX homogenizátoru s transportní hadičkou. Elastický, Youngův modul a koeficient nabotnění hydrogelů na bázi HA-PH-RGD^{MIX} (20 mg/ml, PBS pH 7,4, peroxid vodíku 0,003 %, HRP 0,24 U/ml).

5.3.2.2 Homogenní distribuce buněk v SPREADS zařízení

Byla zjišťována homogenní distribuce a viabilita buněk v hydrogelu injektovaném do nosné kapsy aplikačního zařízení SPREADS. Buňky ADSC byly enkapsulovány do HA-PH-RGD^{MIX} hydrogelu v koncentraci 20 mil. buněk/ml. Obsah síťovacích činidel byl kvůli přítomnosti buněk navýšen na koncentraci peroxidu vodíku 0,005 % a aktivitu HRP 0,4 U/ml.

Stříkačky s hydrogelovými prekurzorovými roztoky byly připevněny pomocí *luer lock* zakončení k SPREADS zařízení a plynule stlačovány, čímž vznikl pomocí směšovače hydrogelový prekurzorový roztok. Díky vytvořenému aplikačnímu oknu danému rychlostí gelace (více než 15 sekund), dochází k jeho zatuhnutí po průchodu přívodní hadičkou a rozprostření v nosné kapse (Obr. 20 C). Pro smísení prekurzorových roztoků byl použit směšovač zakoupený od společnosti MEDMIX.

Po 15 minutách od přípravy hydrogelu byly vzorky vyřezány z nosné kapsy v 6 různých místech dle Obr. 20-A pomocí nástavce na biopsii (*biopsy punch*, 5 mm). Každý vzorek (výřez hydrogelu) byl vložen odděleně do 6jamkového kultivačního panelu a vzorky byly kultivovány při 37 °C s 5 % oxidu uhličitého. Distribuce a viabilita buněk ve vzorcích byla detekována po 24, 48 a 96 hodinách (Obr. 23). Mezi testovanými vzorky nebyl pozorován žádný významný rozdíl v distribuci buněk a životaschopnosti. Průměrná viabilita buněk v hydrogelu byla 77 %.



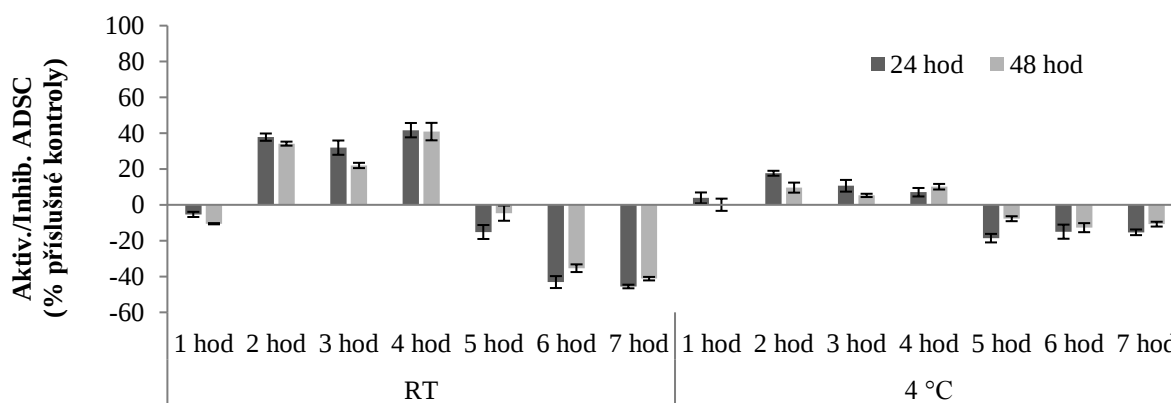
Obr. 23 Distribuce buněk v hydrogelu odebraného z různých částí nosné kapsy SPREADS (1–6). Barvení Live/Dead – živé buňky (zelené) a mrtvé buněčné jádro (červené). (A) Viabilita buněk vyjádřena v procentech, detekována po 24, 48 a 96 hodinách ($n = 6$) (B).

5.4 Preklinická studie

V rámci preklinické studie byl vyvinut model pro simulaci infarktu myokardu společností Explora Biotech (projekt AM CARE, <https://www.explora-biotech.com/>). Testování aplikačních zařízení *in vivo* (AMCath/SPREADS zařízení) s finálně zvoleným materiálem bylo úspěšné. Dále proběhlo testování terapeutického efektu na modelu velkého zvířete – miniprasete. Preklinické studie jsou popsány v uvedených publikacích [71, 72].

5.4.1 Viabilita buněk v prekurzorovém roztoku HA-PH-RGD^{MIX}

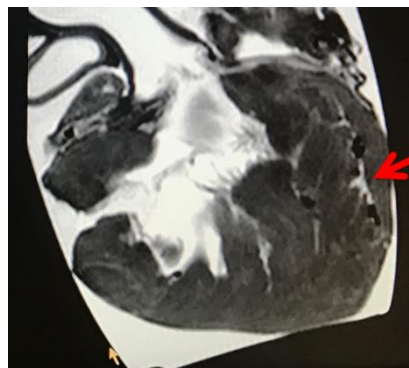
Operace myokardu, ať už za použití katetru či SPREADS zařízení, je několikahodinový proces, během kterého může dojít k tomu, že předem připravená suspenze buněk zůstane před vlastní aplikací ve směsi s roztokem A (HA-PH-RGD^{MIX} v PBS pH 7,4 obsahující mimo jiné HRP). Proto je nutné stanovit dobu, po jakou může být taková směs uchována, aniž by byla narušena buněčná viabilita. 40 milionů ADSC buněk bylo obsaženo v 1 ml prekurzorového roztoku A. Směs byla uchovávána po dobu až 7 hodin při laboratorní teplotě (RT) a při snížené teplotě v lednici a v hodinových intervalech byly ze směsi odebírány vzorky. Tyto vzorky byly po zředění kultivačním médiem nasazeny na kultivační panel. Viabilita buněk byla stanovena po 24 a 48 h. Viabilita ADSC není ovlivněna po dobu 4 hodin při inkubaci v roztoku HA-PH-RGD^{MIX} + HRP, ať už při RT či při snížené teplotě (2–10 °C). Poté signifikantně klesá viabilita buněk ($p < 0,05$), ale v případě uchování v lednici nedochází k poklesu pod hranici cytotoxicity 30 % po dobu 7 hodin (Obr. 24).



Obr. 24 Viabilita buněk ADSC po inkubaci 1–7 hod v prekurzorovém roztoku HA-PH-RGD^{MIX} + HRP vyjádřena v % růstu kontrolních buněk.

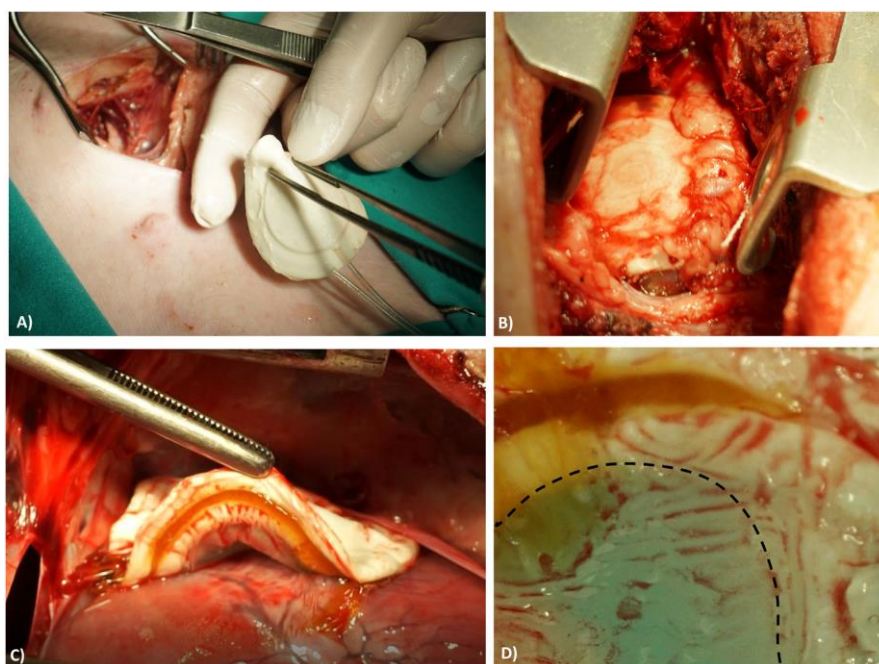
5.4.2 Aplikovatelnost materiálu *in vivo*

Proveditelnost aplikace pomocí katetru byla testována na modelu velkého zvířete – prasete (~90 kg, Landrace, samice), (Ethics approval No.904/2015-PR). Katetr byl zaveden přes abdominální aortu, aortální arch a následně zaveden do levé srdeční komory (LV). Stříkačky obsahující prekurzorové roztoky byly připevněny k homogenizátoru a postupným stlačováním obou stříkaček byl roztok aplikován do daného místa v rámci několikanásobné dávky malého objemu (200 ul/12 s). Po 30 sekundách byla konická jehla přesunuta do dalšího místa aplikace. Celkem byly provedeny 3 vpichy. Po 20 minutách od posledního aplikovaného vzorku byly subjekty usmrceny. Přítomnost hydrogelu uvnitř stěny LV byla potvrzena vizuálně a MRI analýzou (Obr. 25) [71].



Obr. 25 MRI analýza injektovaného hydrogelu v srdeční tkáni [71].

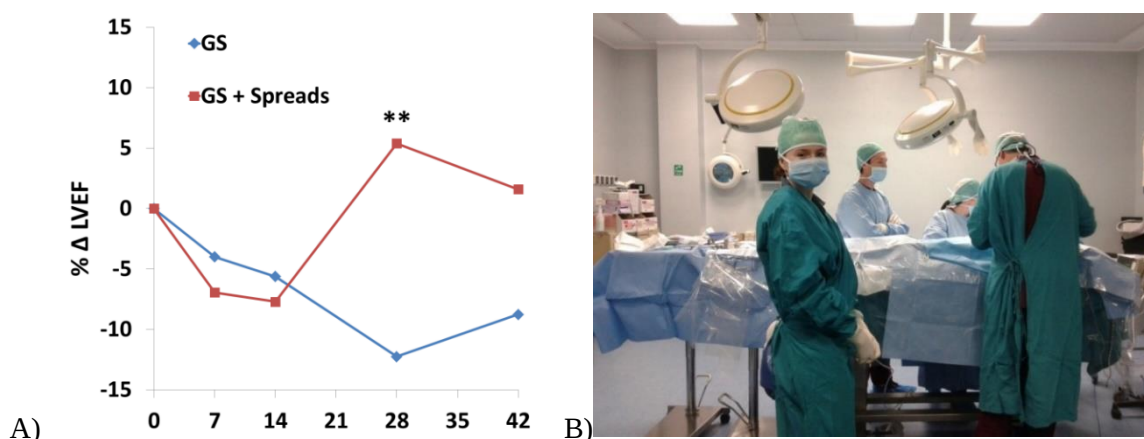
Implantace SPREADS zařízení i s aplikací materiálu a gelací proběhla úspěšně. SPREADS zařízení bylo implantováno na srdeční stěnu pomocí adhesiva injektovaného do okrajových částí aplikačního zařízení. Uchycení proběhlo úspěšně. Nadávkování prekursorového roztoku a gelace materiálu v nosné kapse byla bezproblémová a viditelná, jelikož hydrogel byl obarven methylenovou modří (Obr. 26) [72].



Obr. 26 Implantace minimálně invazivního SPREADS zařízení s inkorporovaným hydrogelem a ADSC buňkami (A). Umístění nosné kapsy (B). Kontrola uchycení po 1 hodině po implantaci (C). Kontrola přítomnosti a umístění hydrogelu v nosné kapse (n = 4 zvířata) [72].

5.4.3 Terapeutický efekt

Postup a vyhodnocení preklinické studie včetně histologického vyšetření je blíže popsáno v uvedené publikaci [72]. Testování proběhlo na 36 miniprasatech (~40 kg, *Landrace*, samice) rozčleněných do 6 skupin. *In vivo* studie byla započata stimulací infarktu myokardu zavedením katetru s implantovaným balónkem. Po 14 dnech byla provedena implantace SPREADS zařízení a aplikace materiálu pomocí katetru. U žádného testovaného subjektu nedošlo k nežádoucí reakci. Následně po 7 dnech od provedení zákroku (21. den) bylo zjištěno signifikantní zlepšení LVEF (%) u subjektů, kterým byl aplikován SPREADS (Obr. 27) s hydrogelem bez i s ADSC buňkami oproti kontrole (*gold standard*) [72, 73].



Obr. 27 Porovnání LVEF (%) u materiálu SPREADS bez a s buňkami oproti kontrole (A) [72, 73]. Ukázka aplikace SPREADS zařízení s obsahem hydrogelu a ADSC buněk (B).

6 ZÁVĚR

Omezená regenerační kapacita srdce po infarktu myokardu má za následek remodelační procesy, které mohou vést až k srdečnímu selhání. Bylo vyvinuto několik strategií zahrnujících mechanickou oporu srdeční tkáně či regenerativní přístupy za využití např. kmenových buněk. Prozatímní účinnost léčby je ale stále nedostatečná, mimo jiné díky nízké životaschopnosti buněk a jejich nedostatečné retenci v místě aplikace.

Nosným prvkem, který by podpořil životaschopnost buněk a jejich retenci v místě aplikace, může být hydrogel. Jeho značná hydrofilita, podobnost s extracelulární matrix a možnost gelace *in situ* jej předurčují jako vhodného kandidáta pro využití v této aplikaci. Kyselina hyaluronová je tělu vlastní látka s přirozenou biokompatibilitou a biodegradabilitou. Díky přítomnosti hyaluronidáz či reaktivních forem kyslíku v lidském těle dochází k rychlé degradaci, kterou lze výrazně zpomalit její modifikací za vzniku derivátů HA vedoucí za vhodných podmínek k tvorbě hydrogelů. Díky těmto vlastnostem jsou hydrogely na bázi HA považovány za vhodné materiály pro vývoj prostředků umožňujících aplikaci a růst buněk sloužících pro buněčnou terapii po infarktu myokardu.

V současnosti jsou hojně používány katetry i v rámci regenerace tkáně po infarktu myokardu. V této práci byl využit speciálně navržený katetr s rezervoárem popsáný v kapitole 5.3.1 a publikaci [71]. Druhé použité aplikační zařízení v daném práci byl SPREADS složené z aplikační části sloužící k dopravení materiálu do nosné kapsy, která je tak vyplněna hydrogelem obsahující buňky a na okrajích bioadhezivem pro uchycení zařízení na srdeční stěně (5.3.2) [72].

Možnost *in situ* aplikovatelnosti je velmi důležitá, pokud chceme využít jako aplikačního zařízení katetr či nově vyvinuté nosné kapsy SPREADS. Je nutné zachovat nízkou zdánlivou viskozitu (i při nízké smykové rychlosti), jelikož průměr jehly zakončující katetr je velmi malý. *In situ* gelace umožňuje docílit nízké viskozity materiálu při jeho průchodu katetrem danou pouze viskozitou prekurzorových roztoků. K prudkému nárůstu zdánlivé viskozity dochází v místě aplikace či částečně v přizpůsobeném rezervoáru umístěném na konci katetru. Dále je velmi důležitá rychlost gelace, která musí být dostatečně rychlá, aby došlo ke zgelování pouze v místě aplikace. Na druhou stranu příliš rychlá gelace nemusí přinést vhodnou integraci materiálu do tkáně, jelikož se materiál vhodně nerozprostře a může docházet ke gelaci v aplikátoru.

Pro dosažení požadovaného efektu regenerace tkáně po infarktu myokardu je nutné do hydrogelu zakomponovat co nejvíce buněk při zachování jejich viability, možnosti proliferace a současně zachování vhodných vlastností materiálu. Pro danou aplikaci byly použity kardiopoietické buňky ADSC. Zvolené finální množství buněk (ADSC) inkorporovaných do hydrogelu bylo 20 mil na 1 ml hydrogelu.

Enzymaticky katalyzovanou reakcí hydroxyfenyl derivátu HA v přítomnosti peroxidu vodíku vznikají hydrogely s vhodnými vlastnostmi i v přítomnosti požadovaného vysokého množství buněčného materiálu. Buněčná adheze k povrchu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové je termodynamicky nevýhodná. Pro podporu buněčné viability a adheze byl připraven derivát, který obsahuje syntetickou sekvenci aminokyselin RGD interagující s buněčnými receptory ze skupiny integrinů. RGD sekvence je kovalentně vázaná na strukturu derivátu, čímž je eliminováno riziko embolizace, které může být problémem při využití například fibrinogenu. Na druhou stranu objemnost skupiny RGD snižuje efektivitu zesílení, tedy snižuje tuhost hydrogelové sítě a zpomaluje gelaci, což by mohlo vést k vytékání materiálu z místa defektu. Proto byl hydroxyfenyl derivát s RGD (HA-PH-RGD^{PURE}) kombinován s derivátem bez RGD sekvence (HA-TA) v hmotnostním poměru 1:1. Čas gelace se tímto způsobem zkrátil ze ≈ 100 s na 18–26 s v závislosti na šarži derivátu, šarži HRP či peroxidu vodíku.

Dále byla u jednotlivých komponent testována cytotoxicita. U derivátů HA-TA, HA-PH-RGD^{PURE} a HA-PH-RGD^{MIX} buňky vykazují vyšší proliferační schopnost v porovnání s kontrolou (kultivační

médium) (Obr. 10). Roztoky HRP nejsou cytotoxické, kdežto samotný roztok peroxidu vodíku je cytotoxický v koncentraci 0,003 % a vyšší (Obr. 11). Při kombinaci peroxidu vodíku (0,005 %) s HRP (0,4 U/ml) a s obsahem oligosacharidu derivátu HA-TA (oligo-HA) nebyla překročena hranice cytotoxicity -30 %. Navíc je roztok peroxidu vodíku během síťovací reakce spotřebováván a buňky jsou jím exponovány po velmi krátkou dobu v rámci sekund či desítek sekund.

Pro možnou aplikaci daného derivátu pomocí katetru či SPREADS zařízení je nutné zachování nízké zdánlivé viskozity a výtlačné síly prekurzorového roztoku, čehož bylo docíleno volbou nízké molekulové hmotnosti výchozího derivátu (M_w 60–90 kDa) při koncentraci 20 mg/ml.

U hydrogelu bez buněk byl obsah síťovacích činidel 1 (HRP 0,24 U/ml, peroxid vodíku 0,003 %) optimalizován na základě rychlosti gelace, charakteru hydrogelové sítě, botnání a kompatibility s dvěma zvolenými aplikačními zařízeními (katetr, SPREADS). Inkorporace vysokého množství buněk (20 mil. ADSC na 1 ml) má signifikantní vliv na charakter gelu. Tuhost hydrogelové sítě klesá, což je patrné nahodnotě Youngova modulu a také dochází ke zdatelnému botnání hydrogelové sítě a její degradaci během kultivace. Tyto nevyhovující vlastnosti lze redukovat mírným navýšením obsahu síťovacích činidel – HRP 0,4 U/ml, peroxid vodíku 0,005 %. Tím dosáhneme srovnatelných vlastností gelu bez buněk s nižší koncentrací síťovacích činidel 1 a s buňkami s vyšší koncentrací síťovacích činidel 2. Hydrogely během buněčné kultivace signifikantně méně botnají a degradace je zpomalena, také se projevuje buněčná adheze ADSC.

V rámci Evropského projektu AM CARE byl vyvinut speciálně upravený katetr pro aplikaci materiálu do srdeční tkáně. Byla prokázána aplikovatelnost finálního materiálu s obsahem 20 mil ADSC/ml pomocí katetru *in vitro* bez signifikantního vlivu na buněčnou viabilitu. Připravené hydrogely pomocí katetru vykazují vhodné vlastnosti pro danou aplikaci. Výhodou katetru je jeho minimálně invazivní aplikace do srdeční stěny. Vzniklý hydrogel byl při *in vivo* testech detekován v místě aplikace bez negativního vlivu na okolní tkáň či testovaný subjekt (miniprase).

Materiál byl rovněž *in vitro* aplikován do nosné kapsy zařízení SPREADS, kde došlo k jeho rozprostrění a vzniku hydrogelu s inkorporovanými viabilními buňkami s homogenní distribucí. Předpokladem je mechanická opora poškozené srdeční stěny po infarktu myokardu pomocí tohoto elastického a biologicky rozložitelného *patch* v kombinaci s regenerací srdeční tkáně kmenovými buňkami, jež prochází přes polopropustnou membránu a také při SPREADS degradaci. *In vivo* aplikace hydrogelu do nosné kapsy, její implantace a uchycení pomocí bioadheziva bylo úspěšné. Došlo také k významnému zvýšení LVEF (%) po 14 dnech od implantace v porovnání se standardem GS (*gold standard*), u kterého nebylo použito aplikační zařízení ani vyvinutý materiál či buňky.

Operace myokardu, ať už za použití katetru či SPREADS zařízení, je časově náročná a během operačního procesu může zůstat suspenze buněk smísená s roztokem A – HA-PH-RGD^{MIX} v PBS pH 7,4 obsahující HRP. Viabilita ADSC není ovlivněna po dobu 4 hodin při inkubaci v roztoku derivátu HA-PH-RGD^{MIX} + HRP, ať už při RT či při snížené teplotě (2–10 °C). Poté signifikantně klesá viabilita buněk, ale v případě uchování v lednici nedochází k poklesu pod hranici cytotoxicity -30 % po dobu 7 hodin.

Cílem disertační práce byl vývoj materiálu sloužící jako scaffold pro enkapsulaci buněk pro regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu. V rámci disertační práce byl připraven hydrogel, do jehož struktury lze inkorporovat kmenové buňky izolované z tukové tkáně dárců. Pro podporu viability a adheze buněk ve scaffoldu byl zvolen hydroxyfenyl derivát HA nesoucí pevně vázanou RGD sekvencí. Obsah síťovacích činidel byl optimalizován pro možnou enkapsulaci vysokého množství buněk. Finálně vybraný materiál byl úspěšně aplikován pomocí speciálně vyvinutých aplikačních zařízení (katetru a SPREADS) *in vitro* i *in vivo*.

7 LITERATURA

1. Barbucci, R. *Hydrogels biological properties and applications*. Online-Ausg. Milan: Springer, 2009. ISBN 88-470-1104-3
2. Burdick, J. A., Prestwich, G. D. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* [online]. 2011, **23**(12), H41–H56 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/adma.201003963. ISBN 10.1002/adma.201003963. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201003963>
3. Spiller, K. L., Maher, S. A., Lowman, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2011, **17**(4), 281–299 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0077. ISSN 1937-3368. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2011.0077>
4. Sivashanmugam, A., Kumar, R. A., Priya, M. V., Nair, S. V., Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **72**, 543–565 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305715002785>
5. Li, J., Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials* [online]. 2016, **1**(12) [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71. ISSN 2058–8437. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/natrevmats201671>
6. ISO 10993-1: Biological Evaluation of Medical Devices Part 1, Attachment A, 2013
7. Zaviskova, K. et al. Injectable hydroxyphenyl derivative of hyaluronic acid hydrogel modified with RGD as scaffold for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res A*. [online]. 2018, **106**(4), 1129–1140. DOI: 10.1002/jbm.a.36311. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29266693>
8. Johnson, T. D., Christman, K. L. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2012, **10**(1), 59–72 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1517/17425247.2013.739156. ISBN 10.1517/17425247.2013.739156. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2013.739156>
9. Prestwich, G. D.: Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan. *Glycoforum* [online]. 2001, [cit. 2016–16–4]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
10. Liu, M., Zeng, X., Mao, Ch. et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research* [online]. 2017; **5** [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1038/boneres.2017.14. ISBN 10.1038/boneres.2017.14. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/boneres201714>
11. Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)* [online]. 2018, **10**(7) [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.3390/polym10070701. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30960626>
12. Khunmanee, S., Jeong, Y., Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng.* [online]. 2017 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1177/2041731417726464. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731417726464>
13. Highley, C. B., et al. Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2016, **40**, 35–40 [cit. 2019-12-29]. ISSN 0958-1669, DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.008. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166916300313>
14. Darr, A., Calabro, A. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2009, **20**(1), 33–44 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1007/s10856-008-3540-0. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3540-0>

15. Kobayashi, S., Uyama, H., Kimura, S. Enzymatic polymerization. *Chem Rev* [online]. 2001, **101**(12), 3793–818 [cit. 2017-09-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr990121l>
16. Kobayashi, S., Morii, H., Itoh, R., Kimura, S., Ohmae, M. Enzymatic polymerization to artificial hyaluronan: a novel method to synthesize a glycosaminoglycan using a transition state analogue monomer. *J Am Chem Soc* [online]. 2001, **123**(47), 11825–6 [cit. 2017-09-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja017104+>
17. Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y., Gao, S. J., Uyama H. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chemical Communications* [online]. 2005, (34), 4312–4314 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1039/b506989k. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b506989k>
18. Gross, A. J., Sizer, I. W. The Oxidation of Tyramine, Tyrosine, and Related Compounds by Peroxidase *J. Biol. Chem.* 1959, **234**(6), 1611–1614.
19. Teixeira, L. S., Feijen J., van Blitterswijk C. A. et al. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2012, **33**(5), 1281–1290 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.067. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296121101283X>
20. Lee, F., Chung, J. E., Kurisawa, M. An injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogel system for protein delivery. *J Control Release* 2009, **134**(3), 186–193.
21. Wang, L.-S., Boulaire, J., Chan, P. P. Y., Chung, J. E., Kurisawa, M. The role of stiffness of gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme-mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 2010, **31**(33), 8608–8616.
22. Lim, T. C., Toh, W. S., Wang, L.-S., Kurisawa, M., Spector, M. The effect of injectable gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogel matrices on the proliferation, migration, differentiation and oxidative stress resistance of adult neural stem cells. *Biomaterials* 2012, **33**(12), 3446–3455.
23. Toh, W. S., Lim, T. C., Kurisawa, M., Spector, M. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials* 2012, **33**(15), 3835–3845
24. Wang, L.-S., Du, C., Chung, J. E., Kurisawa, M. Enzymatically cross-linked gelatin-phenol hydrogels with a broader stiffness range for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* 2012, **8**(5), 1826–1837
25. Wang, L.-S., Du, C., Toh, W. S., Wan, A. C., Gao, S. J., Kurisawa, M. Modulation of chondrocyte functions and stiffness-dependent cartilage repair using an injectable enzymatically crosslinked hydrogel with tunable mechanical properties. *Biomaterials* 2014, **35**(7), 2207–2217
26. Tavakol, M., Vasheghani-Farahani, E., Soleimani, M., Mohammadifar, M. A., Hashemi-Najafabadi, S., Hafizi, M. Synthesis and characterization of an enzyme mediated *in situ* forming hydrogel based on gum tragacanth for biomedical applications. *Iranian Journal of Biotechnology* 2014, **12**, 42–49
27. Hu, M., Kurisawa, M., Deng, R., Teo, C.-M., Schumacher, A., Thong, Y.-X., Wang, L., Schumacher, K. M., and Ying, J. Y. Cell immobilization in gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogel fibers. *Biomaterials* 2009, **30**(21), 3523–3531
28. Chin, L., Calabro, A., Walker, E., Derwin, K. A. Mechanical properties of tyramine substituted-hyaluronan enriched fascia extracellular matrix. *J Biomed Mater Res Part A* 2012, **100**(3), 786–793
29. Loebel, C., Stauber, T., D'Este, M., Alini, M., Zenobi-Wong, M., Eglin, D. Fabrication of cell-compatible hyaluronan hydrogels with a wide range of biophysical properties through high tyramine functionalization. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2017, **5**(12), 2355–2363 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1039/C6TB03161G. ISBN 10.1039/C6TB03161G. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6TB03161G>

30. Abu-Hakmeh, A., Kung, A., Mintz, B. R., Kamal, S., Cooper, J. A., Lu, X. L., Wan, L. Q. Sequential gelation of tyramine-substituted hyaluronic acid hydrogels enhances mechanical integrity and cell viability. *Medical* [online]. 2016, **54**(12), 1893–1902 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1007/s11517-016-1474-0. ISSN 0140-0118. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11517-016-1474-0>
31. Wolfova, L., Pravda, M. et al. *Derivates based on hyaluronic acid, capable of forming hydrogels, method of preparation thereof, hydrogels based on said derivatives, method of preparation thereof and use* (2013) WO2013127374 A1
32. Kučera, L., Weinfurterová, R., Dvořáková, J., Kučera, J., Pravda, M., Foglarová, M. et al Chondrocyte Cultivation in Hyaluronan-Tyramine Cross-Linked Hydrogel, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2015, **64**(13), 661–674 DOI: 10.1080/00914037.2014.996715
33. Dvořáková, J., Kučera, L., Kučera, J., Švík, K., Foglarová, M., Muthný, T. et al. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Hydrogel System Based on an Enzymatically Crosslinked Tyramine Derivative of Hyaluronan. *J Biomed Mater Res* 2014, **102**, 3523–3530. DOI: 10.1002/jbm.a.35033
34. Nuttelman, C. R., Mortisen, D. J., Henry, S. M., Anseth, K. S. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *J Biomed Mater Res.* 2001, **57**(2), 217–223
35. Shu, X. Z., Ghosh, K., Liu, Y., Palumbo, F. S. Luo, Y., Clark, R. A., Prestwich G. D. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide–modified injectable hyaluronan hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2004, **68A**(2), 365–375 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1002/jbm.a.20002. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.20002>
36. Flanagan, L. A., Rebaza, L. M., Derzic, S., Schwartz, P. H., Monuki E. S. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 2006, **83**(5), 845–856 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/jnr.20778. ISSN 0360-4012. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.20778>
37. Meiners, S., Mercado, M. L. T. (2003) Functional peptide sequences derived from extracellular matrix glycoproteins and their receptors. *Molecular Neurobiology* [online]. 2003, **27**(2), 177–196 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1385/MN:27:2:177. ISSN 0893-7648. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/MN:27:2:177>
38. Schense, J. C., Bloch, J., Aebischer, P., Hubbel, J. A. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension. *Nat. Biotech.* 2000, **18**(4), 415–419
39. Kurimoto, R., Kanie, K., Idota, N., et al. Combinational Effect of Cell Adhesion Biomolecules and Their Immobilized Polymer Property to Enhance Cell-Selective Adhesion. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2016, 1–9 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1155/2016/2090985. ISSN 1687-9422. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2016/2090985/>
40. Huerta-Angeles, G., et al. Reductive alkylation of hyaluronic acid for the synthesis of biocompatible hydrogels by click chemistry. *Carbohydr. Polym.*, 2012, **90**(4), 1704–1711
41. Pravda, M., et al. RGD modified conjugate of hyaluronic acid and 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, **8**, 359–359
42. Wang, X., Yan, C., Ye, K., He, Y., Li, Z., Ding, J. Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(12), 2865–2874 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.021. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213000379>
43. Soler-Botija, C., Bagó, J. R., Lluçia-Valldeperas, A. et al. Engineered 3D bioimplants using elastomeric scaffold, self-assembling peptide hydrogel, and adipose tissue-derived progenitor cells for cardiac regeneration. *American Journal of Translational Research*. 2014, **6**(3), 291–301

44. Mozaffarian, D., et al., Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *A Report From the American Heart Association*, 2015.
45. Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., et al. Heart disease and stroke statistics—2012 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2012.
46. Wong, N. D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol* [online]. 2014, **11**(5), 276–289 [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.26. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663092>
47. Christman, K. L., Lee, R. J. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* [online]. 2006, **48**, 907–13 [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.06.005 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949479>
48. Blom, A. S., Acker, M. A. The Surgical Treatment of End-Stage Heart Failure. *Current Problems in Cardiology* [online]. 2007, **32**(10), 553–599 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2007.08.001. ISSN 01462806. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146280607000965>
49. O'Neill, H. S., Gallagher, L. B., O'Sullivan, J. et al. Biomaterial-Enhanced Cell and Drug Delivery: Lessons Learned in the Cardiac Field and Future Perspectives. *Advanced Materials* [online]. 2016, **28**(27), 5648–5661 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/adma.201505349. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201505349>
50. Schulman, I. H., Hare, J. M. Key developments in stem cell therapy in cardiology. *Regenerative Medicine* [online]. 2012, **7**(6s), 17–24 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.2217/rme.12.80. ISSN 1746-0751. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/rme.12.80>
51. Roche, E. T., et al., Comparison of biomaterial delivery vehicles for improving acute retention of stem cells in the infarcted heart. *Biomaterials*, 2014, **35**(25), 6850–6858.
52. Stamm, C., Nasser, B., Choi, Y. H., Hetzer, R. Cell Therapy for Heart Disease: Great Expectations, As Yet Unmet. *Heart, Lung and Circulation* [online]. 2009, **18**(4), 245–256 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.hlc.2008.10.014. ISSN 14439506. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1443950608009256>
53. Sherman, W., Martens, T. P., Viles-Gonzalez, J. F., Siminiak, T. Catheter-based delivery of cells to the heart. *Nature Clin. Pract. Cardiovas. Med.*, 3(Suppl. 1), 2006, 57–64
54. Rane, A. A., Christman, K. L. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: a 5-year update. *J Am Coll Cardiol* 2011, **58**, 2615–29
55. Li, Z.; Guan, J. Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Polymers* [online]. 2011, **3**(4), 740–761 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.3390/polym3020740. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/3/2/740/>
56. Klabusay, M., Skopalík, J., Meluzín, J. Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, **11**(10), 452–457 [cit. 2017-09-29]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/>
57. Yu, J., Gu, Y., Du, K. T., Mihadja, S., Sievers, R. E., Lee, R. J. The effect of injected RGD modified alginate on angiogenesis and left ventricular function in a chronic rat infarct model. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(5), 751–756 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.059. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208007448>
58. Karoubi, G., Ormiston, M. L., Stewart, D. J., Courtman, D. W. Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(29), 5445–5455 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.035. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209006516>
59. Leor, J., Tuvia, S., Guetta, V., et al. Intracoronary injection of in situ forming alginate hydrogel reverses left ventricular remodeling after myocardial infarction in swine. *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**, 1014–23

60. Chachques, J. C., Azarine, A., Mousseaux, E., et al. MRI evaluation of local myocardial treatments: epicardial versus endocardial (Cell-Fix catheter) injections. *J Interv Cardiol* 2007, **20**, 188–96
61. Furst, W., Bnerjee, A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *The annals of Thoracic Surgery* 2005, **79**(5), 1522–1528
62. Wallace, D. G., Cruise, G. M., Rhee, W. M., Schroeder, J. A., Prior, J. J., Ju, J., et al. A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001, **58**(5), 545–556
63. Wolfová L., Vojtová L., Jurečková L., Kohutová L. Úvod do tkáňového inženýrství ESF OPVK Škola molekulárních biotechnologií – Lékařské nanobiotechnologie
64. Curley, C. J., Dolan, E. B., Cavanagh, B., O'Sullivan, J., Duffy, G. P., Bruce, P. M. An in vitro investigation to assess procedure parameters for injecting therapeutic hydrogels into the myocardium. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2016. DOI: 10.1002/jbm.b.33802. ISSN 15524973
65. Wein, O. Úvod do reologie. FCH VUT v Brně, Brno 1996.
66. Holubová, R. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. [cit. 2017-09-16]. ISBN 978-80-244-4178-8. Dostupné z: <https://docplayer.cz/11920619-Zaklady-reologie-a-reometrie-kapalin.html>
67. Grillet, A. M., Wyatt, N. B., Gloe, L. M.: Polymer Gel Rheology and Adhesion, Rheology, Dr. Juan De Vicente (Ed.), ISBN: 978-953-51-0187-1, InTech, 2012. [online]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rheology/rheology-andadhesion-of-polymer-gels>
68. Deshpande, A. P. *Techniques in oscillatory shear rheology* [online]. 1–23 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://physics.iitm.ac.in/~compflu/Lect-notes/abhijit.pdf>
69. Oscillatory rheology: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. G.I.T. Laboratory Journal [online]. 2007. roč. 3–4, 68–70 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: http://www.mate.tue.nl/~wyss/files/Wyss_GIT_Lab_J_2007.pdf
70. Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B.: Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. *The Scientific World Journal* [online]. 2003, 3, 105–121 [cit. 2016-04-16]. ISSN 1537-744x. DOI: 10.1100/tsw.2003.15.
71. Dolan, E. B., Kovarova, L. et al. Advanced Material Catheter (AMCath), a minimally invasive endocardial catheter for the delivery of fast-gelling covalently cross-linked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomaterials Applications* [online] 2018, **33**(5), 681–692 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30354912>
72. Dolan, E. B., Hofmann, B., de Vaal, H., Bellavia, G., Straino, S., Kovarova, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. *Materials Science and Engineering: C* [online] 2019, [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118327838>
73. Dolan, E. B., Hofmann, B., de Vaal, H., Bellavia, G., Straino, S., Kovarova, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. In: 8th World Congress of Biomechanics, 8.–12. 6. 2018, Dublin, Irsko.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

HA-TA	Derivát na bázi HA – tyraminovaný/hydroxyfenyl derivát HA
HA	Kyselina hyaluronová/hyaluronan
RGD	Peptidová sekvence Arg-Gly-Asp (argynin-glycin-kyselina asparagová)
AMCARE	<i>Advanced Materials for Cardiac Regeneration</i> (EU projekt)
M_w	Molekulová hmotnost
Da	Dalton (Jednotka M_w polymerů, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
HRP	Křenová peroxidáza (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IKVAV	Peptidová sekvence Ile-Lys-Val-Ala-Val (izoleucin-lysin-valin-alanin-valin)
YIGSR	Peptidová sekvence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (tyramin-izoleucin-glycin-serotonin-arginin)
RGDS	Peptidová sekvence Arg-Gly-Asp-Ser (argynin-glycin-kyselina asparagová-serotonin)
ADSC	Kmenové buňky získané z tukové tkáně (<i>Adipose-derived stem cells</i>)
FDA	Federální agentura pro kontrolu potravin a léčiv <i>Food and Drug Administration</i>
LVEF	Ejekční frakce levé komory (<i>Left ventricular ejection fraction</i>)
BSA	Bovinní sérový albumin
GGRMSMPV	Peptidová sekvence (Gly-Gly-Arg-Met-Ser-Met-Pro-Val) (glycin-glycin-argynin-methionin-serotonin-methionin-prolin-valin)
DS	Stupeň substituce
HA-PH-RGD	Hydroxyfenyl derivát HA s navázanou RGD sekvencí
DEMI	Demineralizovaná voda
G^*	Komplexní modul pružnosti ve smyku
G'	Elastický (paměťový) modul
G''	Viskózní (ztrátový) modul
δ	Fázový posun/ztrátový úhel
T_g	Čas gelace
Q	Botnací koeficient/ Stupeň nabotnění
m	Hmotnost hydrogelu po nabotnění
m_0	Hmotnost hydrogelu před nabotněním
SD	Směrodatná odchylka
Y	Youngův modul pružnosti
LV	Levá srdeční komora

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1: Životopis

Ing. Lenka Kovářová (rozená Kohutová)

KONTAKTNÍ A OSOBNÍ INFORMACE

Rodné příjmení: Kohutová
Národnost: česká
Adresa: Na Podlesí 1130, Frýdek-Místek 739 11, Česká republika
Telefon: + 420 774 489 840
E-mail: KovarovaLenka5@seznam.cz
Lenka.Kovarova@contipro.com
Datum narození: 5. 7. 1989

VZDĚLÁNÍ

2014–současnost **Doktorský studijní program, obor fyzikální chemie**
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Česká republika
Disertační práce: *Vývoj materiálu na bázi hydrogelů kyseliny hyaluronové pro regeneraci myokardu*

2011–2013 **Magisterský studijní program, obor Spotřební chemie**
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Česká republika
Diplomová práce: *Studium fyzikálních gelů s hydrofobními doménami*

2008–2011 **Bakalářský studijní program, obor Spotřební chemie**
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Česká republika
Bakalářská práce: *Příprava a aplikace fyzikálních hyaluronových gelů*

2004–2008 **Všeobecné gymnázium**
Frýdlant nad Ostravicí, nám. T. G. Masaryka, Česká republika
Zakončeno maturitní zkouškou: Český jazyk, Anglický jazyk, Fyzika, Chemie

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

1. 9. 2016–současnost **Contipro a.s.**
Výzkumný pracovník R&D

1. 6. 2015–1.9.2016 **Contipro Pharma**
Výzkumný pracovník R&D (1. 9. 2015–1.9.2016)
Odborný asistent R&D (1. 6.–31.8.2015)

2. 9. 2013–31.5.2015 **Contipro Biotech s.r.o.**
Asistent R&D

ŠKOLENÍ/ CERTIFIKACE

15.–16. 10. 2019	3. ročník dvoudenního semináře Československé reologické akademie
13. 5. 2019	Řízení aplikovaného výzkumu a experimentálního vývoje, zabezpečování kvality při návrhu a vývoji zdravotnických prostředků (R&D)
24. 9. 2018	Vynálezy a užité vzory
30. 04. 2014	ESPACENET (R&D)
2013	Interní auditor ISO 9001:2008, KONFIRM, Brno
2013	Interní auditor HACCP, KONFIRM, Brno
2013	Senzorická analýza
2012	FCE zkouška

ZNALOST CIZÍCH JAZYKŮ

Český jazyk	mateřský jazyk
Anglický jazyk	B2 (certifikát FCE zkouška)
Německý jazyk	mírně pokročilý

DALŠÍ INFORMACE

Řidičský průkaz sk. B

Počítačové znalosti: MS Office, Origin Lab, QC Expert, ChemSketch,

9.2 Příloha 2: Publikační činnost

Tučným písmem jsou vyznačeny publikace, ve kterých jsou uvedeny výsledky disertační práce.

POSTERY

BOBULA, T.; KUTOVÁ, A.; BUFFA, R.; BASARABOVÁ, I.; KOVÁŘOVÁ, L.; VELEBNÝ, V. Dual crosslinking of methacrylated hyaluronic acid [poster]. In: Biofabrication, 20.–22. 10. 2019, Columbus, USA.

KAREL, S.; KOVÁŘOVÁ, L.; VELEBNÝ, V. Peptide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels [poster]. In: 26th American and 11th International Peptide Symposium (APS), 22.–27. 6. 2019, Monterey, USA

KOVAROVA, L.; TOROPITSYN, E.; SCIGALKOVA, I.; PRAVDA, M.; BOBULA, T.; VELEBNY, V. *In situ* gelation by UV curing in nasal cavity for multiple sclerosis treatment [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

PRAVDA, M.; KOVAROVA, L.; SCIGALKOVA, I.; VELEBNY, V. *In situ* gellable hyaluronan based hydrogels with antimicrobial activity [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

BOBULA, T.; BOHÁČOVÁ, P.; KOVÁŘOVÁ, L.; VÁGNEROVÁ, V.; HROBAŘ, V.; KAREL, S.; PRAVDA, M.; VELEBNY, V. Visible light crosslinking of RGD modified hyaluronan [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

KOVAROVA, L.; SCIGALKOVA, I.; WILDHIRT, S.; PRAVDA, M.; DARO, D.; DUFFY G.; VELEBNY, V. Hydrogels based on hyaluronan derivatives combined with implantable device for heart regeneration after myocardial infarction [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress, 4.–7. 9. 2018, Kyoto, Japonsko.

KOVAROVA, L.; SCIGALKOVA, I.; PRAVDA, M.; SULAKOVA, R.; DARO, D.; DUFFY G.; VELEBNÝ, V. Hydrogels based on hyaluronan-tyramine conjugates for use in myocardial infarction regeneration [poster]. In: 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), 4.–8. 9. 2017, Atény, Řecko.

KOHUTOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BUFFA, R.; WOLFOVÁ, L.; VELEBNÝ, V. New designed hydrogels based on aldehyde-derivative of hyaluronic acid for application in tissue engineering and regenerative medicine [poster]. In: European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 28. 6.–1. 7. 2016, Uppsala, Švédsko.

KOHUTOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; WOLFOVÁ, L.; BYSTROŇOVÁ, J.; PRAVDA, M. et al. The capacity of new designed hydrogels based on hyaluronan-tyramine derivative for cell incorporation [poster]. In: World Conference on Regenerative Medicine (WCRM), 21.–23. 10. 2015, Lipsko, Německo.

KOHUTOVÁ, L.; WOLFOVÁ, L.; PRAVDA, M.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V. Different crosslinking systems enable of hydrogels preparation based on hyaluronan-tyramine conjugates [poster]. In: 27th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), 30. 8.– 3. 9. 2015, Krakow, Polsko.

KOHUTOVÁ, L.; PRAVDA, M.; WOLFOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V. Glucose sensitive gelation of hydrogel based on hyaluronan-tyramine conjugate. [poster]. In: 26th European Conference on Biomaterials, 31. 8.–3. 9. 2014, Liverpool, Anglie.

PŘEDNÁŠKY

ŠEDOVÁ, P.; KOVÁŘOVÁ L.; BUFFA, R.; BEDNAŘÍK, J. Vliv struktury oxyaminového linkeru na zesítní hyaluronanu. In: 71. sjezd chemiků. 9.–13. 9. 2019, Horný Smokovec, Slovensko.

DOLAN, E. B.; HOFMANN, B.; DE VAAL, H.; BELLAVIA, G.; STRAINO, S.; KOVAROVA, L.; MONAHAN, D.; KELLY, H.; WILDHIRT, S.; DUFFY, G. P. A bioresorbable carrier and passive stabilization device to improve heart function postmyocardial infarction. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

ŠČIGALKOVÁ I.; KOVÁŘOVÁ L.; PRAVDA M.; BYSTROŇOVÁ J.; VELEBNÝ V.; RIABOV V.; KZHYSHKOWSKA J.; VRANA N.E. Interakce imunitních buněk s hydrogely na bázi hyaluronanu a želatiny In: Bioimplantologie, 11.–12. 4. 2019, Brno, ČR.

ŠEDOVÁ, P.; ŠILHÁR, P.; BUFFA, R.; KOVÁŘOVÁ, L.; VÁGNEROVÁ, H.; BEDNAŘÍK, J. Zesítní hyaluronanu – vliv hydrazidových linkerů na vlastnosti hydrogelu. In: Sjezd chemiků, 9.–12. 9. 2018, Zlín, ČR.

DOLAN, E. B.; HOFMANN, B.; DE VAAL, H.; BELLAVIA, G.; STRAINO, S.; KOVAROVA, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. In: 8th World Congress of Biomechanics, 8.–12. 6. 2018, Dublin, Irsko.

KOHUTOVÁ, L.; PRAVDA, M.; PEKAŘ, M.; DUFFY G.; VELEBNÝ, V. Development of materials based on hyaluronic acid's hydrogels for myocardial regeneration. In: Studentská konference Chemie je život, FCH, 23. 3. 2017, FCH VUT, Brno, ČR.

BOBULA, T.; BUFFA, R.; HERMANNOVÁ, M.; KOHUTOVÁ, L.; PROCHÁZKOVÁ, P.; VÁGNEROVÁ, H.; ČEPA, M.; ŽIDEK, O.; VELEBNÝ, V. The photocrosslinking of hyaluronan derivatives for designed hydrogel formation. In: Biofabrication, 29.–31. 10. 2016, Winston-Salem, USA.

BUFFA, R.; PRAVDA, M.; KOHUTOVÁ, L.; BASARABOVÁ, I.; KULHÁNEK, J.; BROULÍKOVÁ, M.; HROBAŘ, V.; VELEBNÝ, V. Conjugates of hyaluronic acid with tyramine – synthesis and application. In: Eurochemistry, 16.–18. 6. 2016, Řím, Itálie.

ČLÁNKY V IMPAKTOVANÝCH ČASOPISECH

GALLAGHER, L. B.; DOLAN, E. B.; O'SULLIVAN, J.; LEVEY, R.; CAVANAGH, B. L.; KOVAROVA, L.; PRAVDA, M.; VELEBNÝ, V.; FARRELL, T.; O'BRIEN, F. J.; DUFFY, G. P. Pre-culture of Mesenchymal Stem Cells within RGD-modified Hyaluronic Acid Hydrogel Improves their Resilience to Ischaemic Conditions. *Acta Biomaterialia* [online]. 2020, 107, 78-90 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.043> ISSN 17427061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706120301318>

O'DWYER, J.; MURPHY, R.; DOLAN, E. B.; KOVAROVA L. et al. Development of a nanomedicine-loaded hydrogel for sustained delivery of an angiogenic growth factor to the ischaemic myocardium. *Drug Delivery and Translational Research* [online] 2019, 1–15 [cit 2020-01-26]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13346-019-00684-5>

SCIGALKOVA, I.; BYSTRONOVA, J.; KOVAROVA, L. et al The effect of healing phenotype-inducing cytokine formulations within soft hydrogels on encapsulated monocytes and incoming immune cells. *RSC Advances* [online]. 2019, 9(37), 21396–21404 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1039/C9RA02878A. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA02878A>

DOLAN, E. B., HOFMANN, B., DE VAAL, H., BELLAVIA, G., STRAINO, S., KOVAROVA, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. *Materials Science and Engineering: C* [online] 2019, [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118327838>

ŠEDO VÁ, P., BUFFA, R., ŠILHÁR, P., KOVÁŘOVÁ, L. et al. The effect of hydrazide linkers on hyaluronan hydrazone hydrogels. *Carbohydrate Polymers* [online] 2019, 261, 63–71 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719303959>

DOLAN, E. B., KOVAROVA, L. et al. Advanced Material Catheter (AMCath), a minimally invasive endocardial catheter for the delivery of fast-gelling covalently cross-linked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomaterials Applications* [online] 2018, 33(5), 681–692 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30354912>

BOBULA, T., BUFFA R., HERMANNOVÁ M., KOHUTOVÁ L. et al. A novel photopolymerizable derivative of hyaluronan for designed hydrogel formation. *Carbohydr Polym.* [online]. 2017, 161, 277-285 [cit. 2017-09-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.009. ISBN 10.1016/j.carbpol.2017.01.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717300097>

KNIHY/SKRIPTA

WOLFOVÁ L.; VOJTOVÁ, L.; JUREČKOVÁ, L.; KOHUTOVÁ, L. Úvod do tkáňového inženýrství ESF OPVK Škola molekulárních biotechnologií – Lékařské nanobiotechnologie, reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0144.

PŘIZNANÉ PATENTY/UŽITNÉ VZORY

PRAVDA, M.; KOVÁŘOVÁ, L.; ŠCIGALKOVÁ, I.; BYSTROŇOVÁ, J.; TOROPITSYN, E.; VELEBNÝ, V. *Prostředek pro použití v přípravě hydrogelu na bázi hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu*. CZ 33901 U1. 7. 4. 2020

TOROPITSYN, E.; PRAVDA, M.; KOVAROVA, L.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V. *Hydrogel na bázi zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronové*. CZ 33324 U1. 25. 10. 2019

BOBULA, T.; BUFFA, R.; VÁGNEROVÁ, H.; ŠULÁKOVÁ, R.; WOLFOVÁ, L.; KOHUTOVÁ, L.; MORAVCOVÁ, V.; ŽIDEK, O.; PROCHÁZKOVÁ, P.; VELEBNÝ, V. *Deriváty sulfatovaných polysacharidů, způsob jejich přípravy, způsob jejich modifikace a použití*. CZ 306662 B6. 26. 4. 2017