

Vývoj a *in vitro* hodnocení dvouvrstvých hierarchických skafoldů pro tkáňové inženýrství kůže v rekonstrukční chirurgii

Prokopcová Eliška, Bc.

Sekce – MECHATRONIKA,
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 2. ročník
Magisterský studijní program – NANOTECHNOLOGIE

Abstrakt: Obnova rozsáhlých kožních a tvarově specifických defektů představuje v současné medicíně kritickou výzvu, neboť tradiční metody často vedou k tvorbě nefunkční jizevnaté tkáně nebo neumožňují dosažení požadovaného tvaru a vnitřní organizace tkáně. Tato práce se zabývá vývojem pokročilých biomimetických skafoldů vyrobených kombinací technologií Melt Electrowriting (MEW) a Melt Electrospinning (MES) z polykaprolaktonu (PCL). Cílem bylo vytvořit dvouvrstvou strukturu, kde makroporézní MEW vrstva poskytuje mechanickou oporu dermis a hustá MES vrstva simuluje dermo-epidermální spojení. Pro zlepšení bioaktivity byly skafoldy funkcionalizovány kolagenem typu I a silk fibroinem (SF). Biologické testování s lidskými dermálními fibroblasty (NHDF) po dobu 21 dnů prokázalo, že skafoldy se SF vykazují nejvyšší dlouhodobou metabolickou aktivitu a viabilitu, což potvrdilo SF jako vhodný funkcionalizační protein. Detekce α -SMA potvrdila schopnost struktur stimulovat diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty, což je zásadní pro neosyntézu extracelulární matrix.

Klíčová slova: tkáňové inženýrství kůže, skafold, melt electrowriting (MEW), melt electrospinning (MES), polykaprolakton (PCL), kolagen, silk fibroin (SF), normální lidské dermální fibroblasty (NHDF)

1 Úvod

Lidská kůže disponuje složitou hierarchickou architekturou, kterou je při rozsáhlém poškození (traumata, tumory, chronické vředy) velmi obtížné regenerovat. Současným klinickým standardem jsou autografty, jejichž použití je však limitováno nedostatkem dárcovských míst a rizikem odmítnutí či nekrózy tkáně. Tkáňové inženýrství (TI) proto směřuje k vývoji 3D skafoldů, které slouží jako dočasná mechanická opora a instruktivní prostředí pro buňky a umožňují tvorbu nové tkáně v požadovaném rozměru, tvaru a struktuře. Tyto parametry následně přímo ovlivňují vlastnosti nově formované tkáně a její funkční vlastnosti.

Polykaprolakton (PCL) je lineární alifatický polyester, který je díky své biokompatibilitě, kontrolované biodegradaci a schválení FDA pro vybrané aplikace "zlatým standardem" v TI [1, 2]. Jeho hlavní limitací je však inherentní hydrofobicita a absence buněčných vazebných motivů [3, 4].

Tato práce využívá synergii technologií MEW a MES k vytvoření hierarchických struktur. Ty jsou následně funkcionalizovány přírodními proteiny – kolagenem a silk fibroinem – s cílem napodobit nativní extracelulární matrix (ECM) a zlepšit biologickou integraci [4, 5].

2 Materiály a metody

2.1 Příprava a funkcionalizace skafoldů

Hierarchické dvouvrstvé skafoldy byly vyrobeny z PCL. Struktura se skládala ze 3 vrstev vytvořených technologií MEW (s rotací 60°) a 2 vrstev vytvořených technologií MES (s rotací 90°). Přehled použitých tiskových parametrů je uveden níže, viz. Tabulka 1. Vzorky byly následně rozděleny do tří skupin: 1. bez ošetření, 2. ošetřené argonovou plazmou a

potážené kolagenem typu I, 3. potážené silk fibroinem (20 mg/ml) bez předchozí úpravy plazmou. Všechny vzorky byly ošetřeny v ethanolu.

Neupravené skafoldy a jejich jednotlivé vrstvy byly dále hodnoceny z hlediska mechanických vlastností (trhačka – Z1010, ZwickRoell, Germany). Účinnost povrchové funkcionalizace byla ověřena prostřednictvím FTIR analýzy.

Tabulka 1: Přehled tiskových parametrů

	MEW	MES
Teplota tavení	75 °C	75 °C
Vzdálenost kolektoru	3 mm	12 mm
Napětí	8 kV	18 kV
Rychlost tisku	700 mm/min	60 mm/min
Tlak	35 kPa	5 kPa

2.2 In vitro biologické hodnocení

Pro *in vitro* hodnocení byly na skafoldy nasazeny NHDF buňky (10 000 buněk/vzorek) a kultivovány v kompletním médiu (DMEM/F-12, 5 % FBS, 5 % NBSCS, 1 % Pen/Strep) po dobu 21 dní s průběžným hodnocením v časových bodech ve dnech 1, 7, 14 a 21. Viabilita buněk byla hodnocena pomocí Live/Dead barvení (SYTO 9 a propidium jodid), celková metabolická aktivita esejí na bázi resazurinu (měření fluorescence 530/590 nm) a buněčná morfologie pomocí fluorescenční mikroskopie s barvením jader (DAPI), aktinových vláken (Phalloidin-FITC), vimentinu (anti-Vimentin Rabbit Monoclonal Antibody (clone 2I13)/anti-Rabbit Ig-6-TRITC), α -SMA (anti- α -Smooth Muscle Actin (ACTA2) Antibody/anti-Rabbit Ig-6-TRITC) a mitochondrií (MitoTracker™ Deep Red FM). Většina chemikálií byla zakoupena od Sigma-Aldrich, MitoTracker a Live/Dead esej pocházely z Thermo Fisher Scientific.

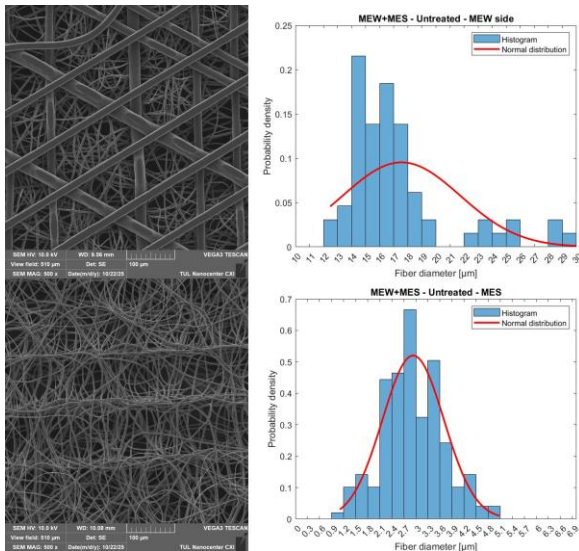
Vstupní morfologie skafoldů a průběh kolonizace buňkami byly vizualizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Vyhodnocení orientace buněčných jader bylo provedeno pomocí ImageJ (plugin pro distribuci orientace). Polární grafy ukazující orientaci buněčných jader na skafoldech byly konstruovány v MATLABu.

3 Výsledky

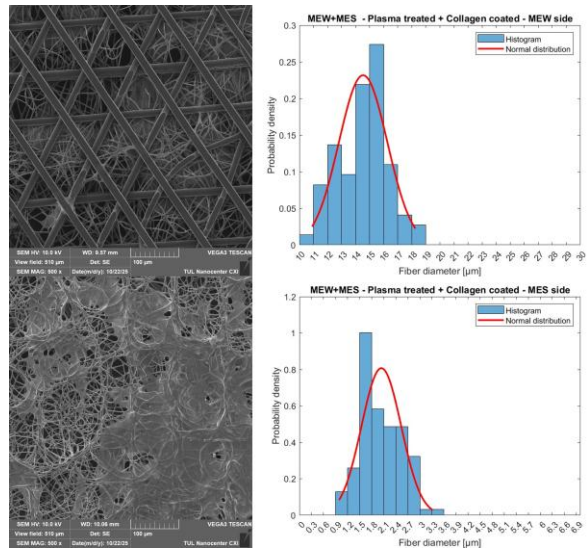
3.1 Morfologie a chemické složení skafoldů

SEM analýza potvrdila přesnou a vysoce orientovanou depozici MEW mikrovláken o průměru $17,5 \pm 4,1 \mu\text{m}$ a náhodnou orientaci MES mikrovláken o průměru $2,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (viz. Obrázek 1). Funkcionalizace proteiny mírně zvýšila průměr vláken, ale zachovala porézní architekturu nezbytnou pro difuzi živin. K lepšímu zachování porézní struktury došlo po úpravě SF – a to zejména v případě MES vrstvy (viz. Obrázek 3). U skafoldů ošetřených kolagenem došlo na MES straně k částečnému uzavření pórů (viz. Obrázek 2).

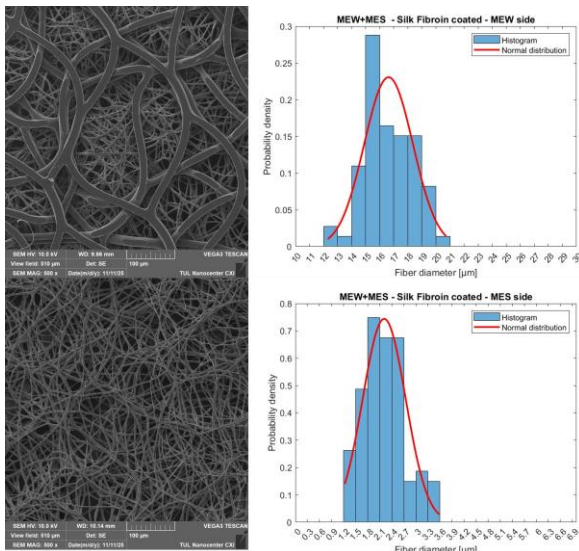
Hodnocení mechanických vlastností prokázalo, že kombinovaná MEW/MES struktura vykazuje vyšší pevnost v tahu (viz. Obrázek 5) [6].



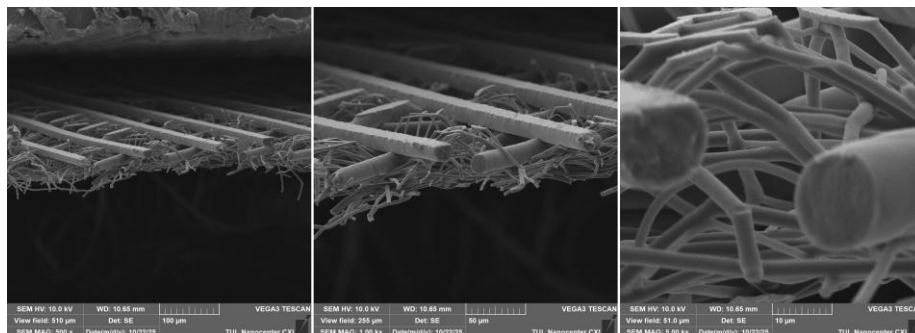
Obrázek 1 : SEM obrázek MEW+MES skafoldu – MEW strana a distribuce průměrů vláken. SEM obrázek MEW+MES skafoldu – MES strana a distribuce průměrů vláken.



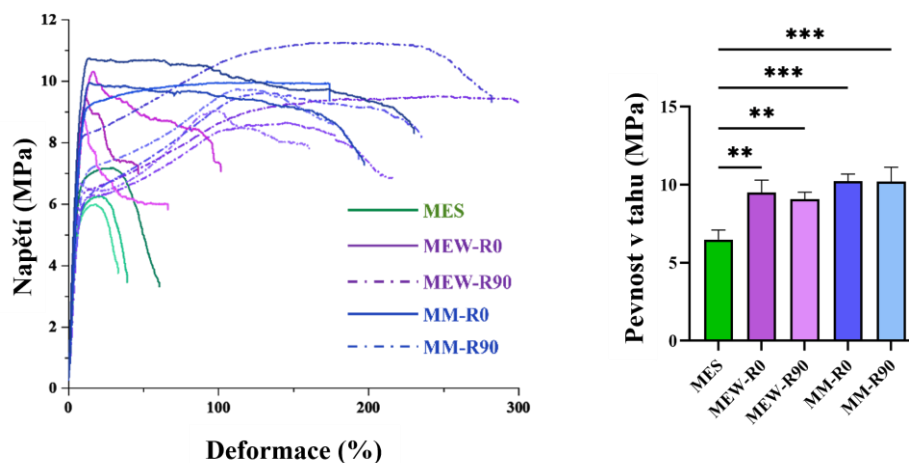
Obrázek 2 : SEM obrázek MEW+MES (plazma + kolagen) skafoldu – MEW strana a distribuce průměrů vláken. SEM obrázek MEW+MES (plazma + kolagen) skafoldu – MES strana a distribuce průměrů vláken.



Obrázek 3 : SEM obrázek MEW+MES (silk fibroin) skafoldu – MEW strana a distribuce průměrů vláken. SEM obrázek MEW+MES (silk fibroin) skafoldu – MES strana a distribuce průměrů vláken.

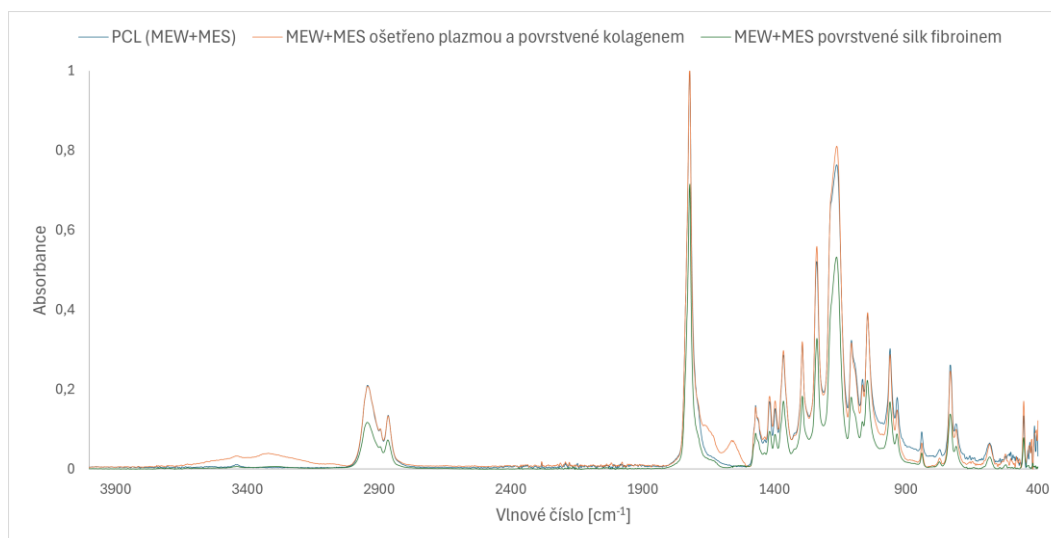


Obrázek 4 : SEM obrázek pohledu na řez MEW+MES neošetřeným skafoldem



Obrázek 5 : Výsledný graf a porovnání mezi skupinami pro test mechanické zkoušky v tahu (MM = MEW+MES, R0 = rotation of 0°, R90 = rotation of 90°, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

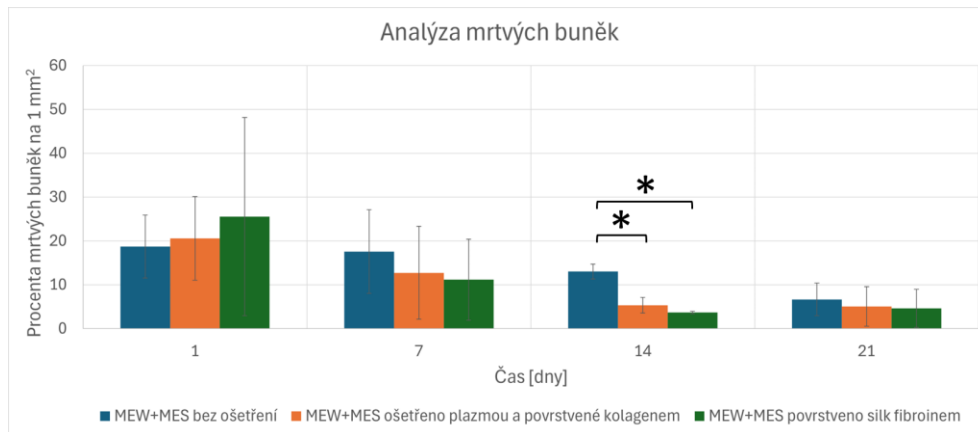
FTIR spektra všech analyzovaných skafoldů jsou charakteristická absorpčními pásy PCL, zejména výrazným píkem pro natahování karbonylové vazby (C=O) při přibližně 1720 cm^{-1} [7]. Obrázek 6 porovnává neošetřený PCL skafold MEW+MES s MEW+MES skafoldy funkcionalizovanými proteiny (kolagen typu I, SF). FTIR analýza prokázala přítomnost obou typů proteinů prostřednictvím pro ně typických vrcholů spektra. Kolagen I vykazuje zřetelné pásy pro Amid I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), Amid II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) a široký pás Amid A ($3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$), které odpovídají vibracím N-H vazby, často spojeným s vibracemi vazby O-H [4, 8]. Vyšší intenzita píku je způsobena tendencí kolagenu tvořit membrány, a tedy lokálně deponovat větší množství kolagenu. Podobně i povlak SF vykazuje výrazný pás Amid I u něhož lze sledovat posun k nižším vlnovým číslům (shift, $\sim 1623\text{ cm}^{-1}$), což indikuje transformaci do stabilní β -sheet struktury [9].



Obrázek 6 : FTIR spektrum skafoldů (MEW+MES neošetřený, MEW+MES ošetřený plazmou a potažený kolagenem a MEW+MES potažený SF)

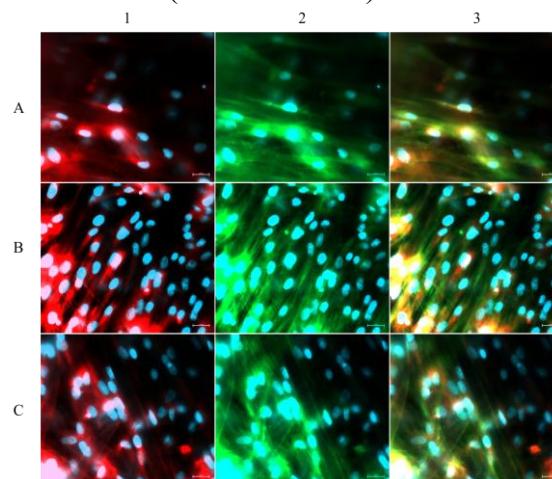
3.2 Viabilita a proliferace buněk

Ačkoliv byl v den 1 zaznamenán zvýšený podíl mrtvých buněk (19–25 %) v důsledku stresu při nasazení, do 21. dne viabilita u všech skupin přesáhla 90 %. Obrázek 7 ukazuje vývoj buněčné viability napříč skupinami a časovými body.

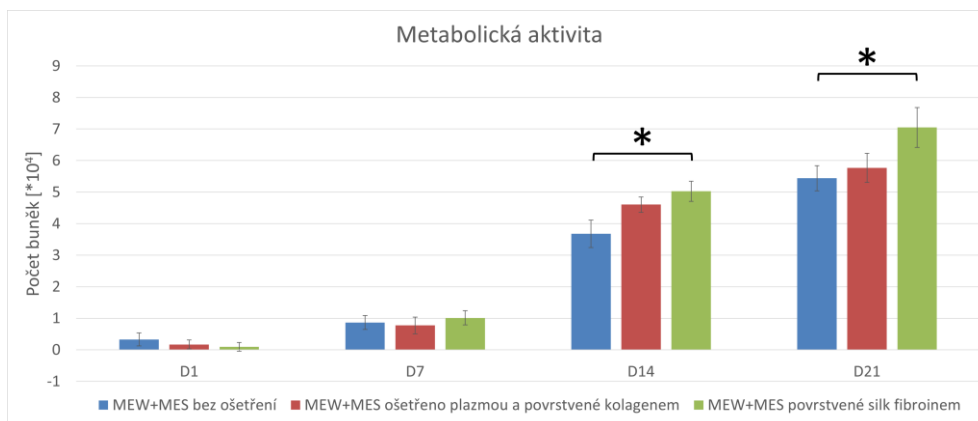


Obrázek 7 : Graf s výsledky viability buněk (*: $p < 0,05$)

Test metabolické aktivity buněk prokázal (Obrázek 9), že od 14. dne skafoldy se SF podporují metabolickou aktivitu signifikantně lépe než neupravený PCL. Robustní mitochondriální síť (barvení MitoTracker) koncentrovaná kolem jader potvrdila, že buňky jsou metabolicky aktivní i v hlubších vrstvách skafoldu (viz. Obrázek 8).



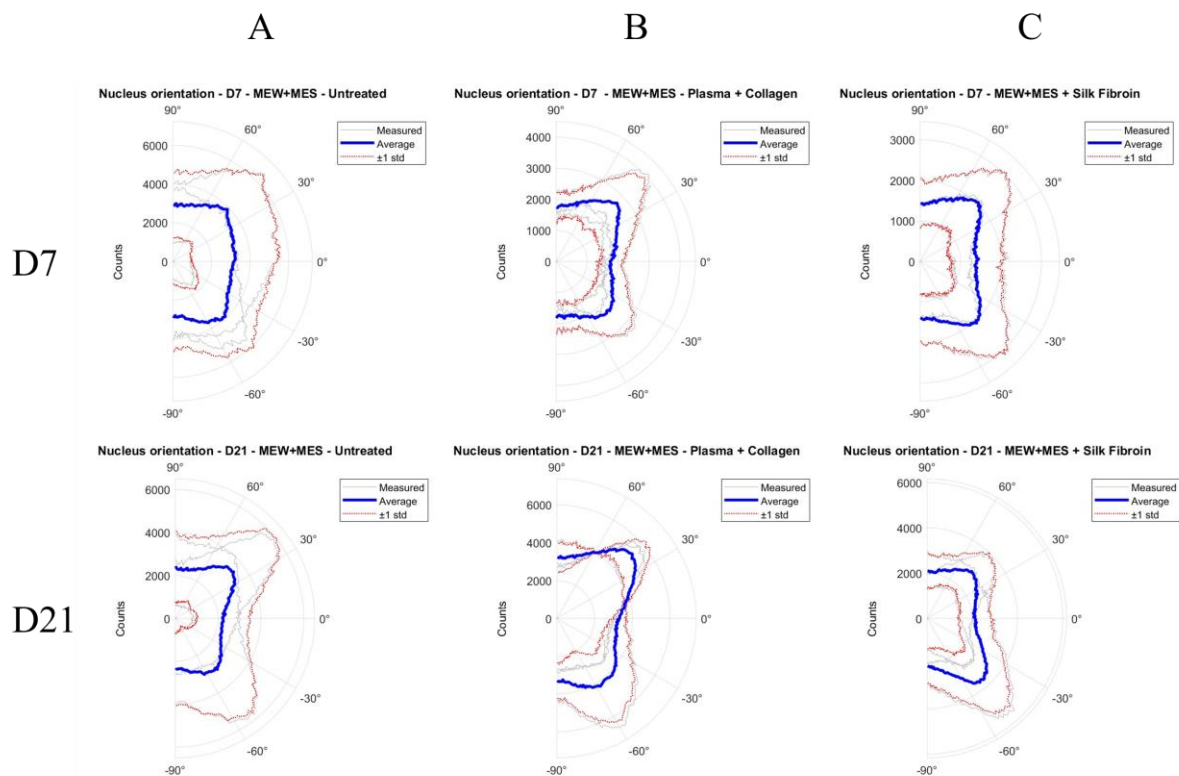
Obrázek 8: Den 21 – MitoTracker (červená) + DAPI (modrá) + Phalloidin (zelená).
1) DAPI + MitoTracker, 2) DAPI + Phalloidin, a 3) sloučeno (DAPI, Phalloidin, MitoTracker). A) MEW+MES bez ošetření, B) MEW+MES ošetřeno plazmou a potaženo kolagenem, a C) MEW+MES potaženo silik fibroinem (měřítko: 20 μm).



Obrázek 9 : Graf s výsledky metabolické aktivity (*: $p < 0,05$)

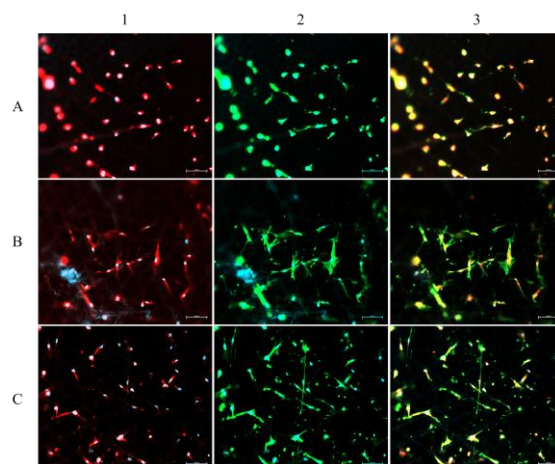
3.3 Buněčná morfologie a diferenciac

Fluorescenční barvení cytoskeletu (Phalloidin/Vimentin) ukázalo, že fibroblasty se silně orientovaly a prodlužovaly podél osy uspořádaných MEW vláken [10, 11] – Obrázek 10 slouží jako vizuální potvrzení a ukazuje výsledky hodnocení orientace jader NHDF kolonizujících skafoldy. Dosažené výsledky potvrdily význam orientace MEW struktury a její vliv na orientaci buněk. Zároveň bylo potvrzeno, že tento efekt zůstává zachován u obou typů povrchové funkcionalizace. V den 21 se buňky orientují pod úhlem $\pm 45^\circ$, zatímco v den 7 byla orientace více méně nahodilá.

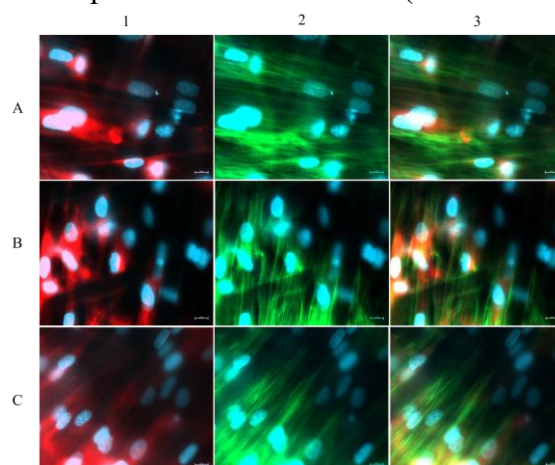


Obrázek 10: Polární grafy s orientací jader buněk, A) MEW+MES bez úprav, B) MEW+MES ošetřeno plazmou a potažené kolagenem, C) MEW+MES potažené silk fibroinem, D7 – den 7 a D21 – den 21

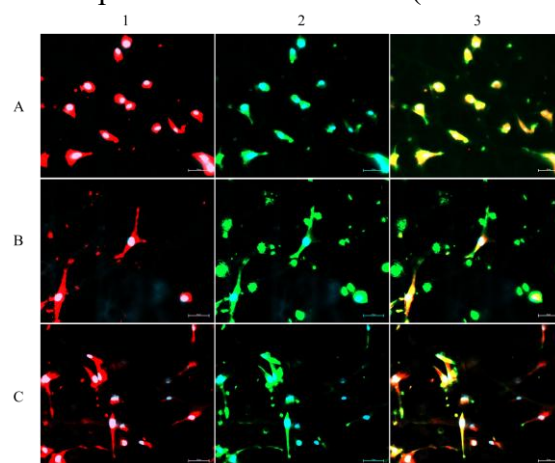
Obrázek 11 a Obrázek 12 zachycují den 1 a den 21 s barvením vimentinu, markeru typického pro normální lidské dermální fibroblasty. Od 14. do 21. dne kultivace byla u buněk napříč všemi vzorky detekována výrazná exprese α -SMA (Obrázek 13 a Obrázek 14 zachycují den 1 a den 21), a to zejména u buněk silně orientovaných podél MEW mikrovláken. To potvrzuje, že vyvinuté dvouvrstvé skafoldy generují dostatečné mechanické napětí potřebné k indukci diferenciac normálních fibroblastů na aktivované myofibroblasty. Indukce diferenciac na myofibroblasty bývá připisována stimulaci vnějším mechanickým napětím nebo napětím generovaným strukturou skafoldu [6, 11]. Tento jev je klíčový, neboť myofibroblasty jsou zodpovědné za produkci kolagenu a remodelaci ECM, což urychluje reorganizaci a maturaci nové tkáně.



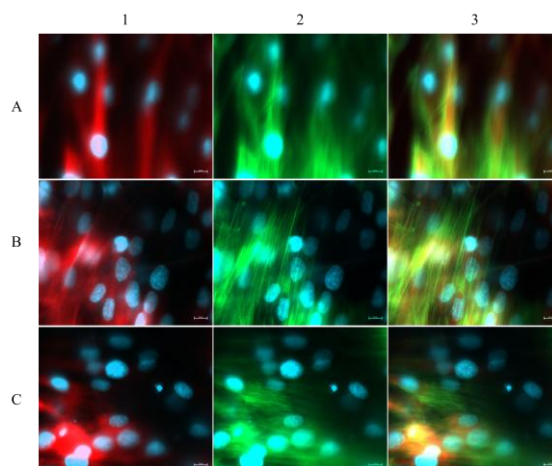
Obrázek 11 : Den 1 – Vimentin (červená) + DAPI (modrá) + Phalloidin (zelená).
 1) DAPI + Vimentin, 2) DAPI + Phalloidin, and 3) sloučeno (DAPI, Phalloidin, Vimentin).
 A) MEW+MES bez ošetření, B) MEW+MES ošetřeno plazmou a potaženo kolagenem, a C)
 MEW+MES potaženo silk fibroinem (měřítko: 100 µm).



Obrázek 12: Den 21 – Vimentin (červená) + DAPI (modrá) + Phalloidin (zelená).
 1) DAPI + Vimentin, 2) DAPI + Phalloidin, a 3) sloučeno (DAPI, Phalloidin, Vimentin). A)
 MEW+MES bez ošetření, B) MEW+MES ošetřeno plazmou a potaženo kolagenem, a C)
 MEW+MES potaženo silk fibroinem (měřítko: 10 µm).



Obrázek 13: Den 1 – α -SMA (červená) + DAPI (modrá) + Phalloidin (zelená).
 1) DAPI + α -SMA, 2) DAPI + Phalloidin, a 3) sloučeno (DAPI, Phalloidin, α -SMA). A)
 MEW+MES bez ošetření, B) MEW+MES ošetřeno plazmou a potaženo kolagenem, a C)
 MEW+MES potaženo silk fibroinem (měřítko: 50 µm).



Obrázek 14: Den 21 – α -SMA (červená) + DAPI (modrá) + Phalloidin (zelená).
 1) DAPI + α -SMA, 2) DAPI + Phalloidin, a 3) sloučeno (DAPI, Phalloidin, α -SMA). A) MEW+MES bez ošetření, B) MEW+MES ošetřeno plazmou a potaženo kolagenem, a C) MEW+MES potaženo silk fibroinem (měřítko: 10 μ m).

Z výsledků imunofluorescenční analýzy vyplývá, že po dni 21 povrchová úprava SF vedla k lepší proliferaci buněk, což je patrné z testu metabolické aktivity buněk (Obrázek 9) i z vyšší viability buněk (Obrázek 7). Zatímco kolagen je přirozenou složkou ECM, silk fibroin (SF) se v této studii ukázal jako stabilnější a procesně výhodnější alternativa, která umožňuje povrchovou úpravu bez předúpravy povrchu, zachovává vysoce porézní charakter MES vrstvy a efektivněji podporuje proliferaci a diferenciaci NHDF na povrchu skafoldu.

4 Diskuze

Získané výsledky potvrzují, že spojení technologií MEW a MES úspěšně napodobuje složitou stratifikovanou architekturu lidské kůže, jak jako první prokázali Girard a kol. [6]. Makroporézní MEW mikrovláknenné struktury fungují jako vynikající šablona schopná vést orientaci cytoskeletu prostřednictvím kontaktního vedení (contact guidance) a zároveň stimulovat buněčnou polarizaci a diferenciaci. Je zásadní, že tyto vlastnosti zůstávají zachovány i po povrchové funkcionalizaci. Zároveň je inkorporace MEW struktury významná pro zlepšení mechanických vlastností skafoldu.

Při srovnání zvolených povrchových úprav se silk fibroin (SF) ukázal jako vynikající alternativa k nativnímu kolagenu. SF se velmi účinně vázal na povrch bioinertního PCL a podporoval dlouhodobou proliferaci, metabolickou aktivitu i viabilitu NHDF buněk lépe než standardní kolagenová úprava. Vhodnost SF jako materiálu pro regeneraci kůže ve svých pracích také popsali také Li a kol. A Zhang a kol. Zhang a kolektiv potvrdili regenerativní kapacitu SF skafoldů dokonce *in vivo* na zvířecím modelu [9, 12]. Pro budoucí klinickou translaci je další významnou výhodou SF jeho snadnější aplikace, jelikož nevyžaduje plazmovou aktivaci povrchu polymeru a zároveň nenarušuje vysoce porézní strukturu MEW a MES skafoldů.

Z hlediska regenerace tkáně je nejvýznamnějším poznatkem silná exprese α -SMA. Přítomnost tohoto proteinu jednoznačně značí, že fibroblasty diferencovaly na myofibroblasty, které jsou hlavními hybateli syntézy nové extracelulární matrix (ECM) a napomáhají tvorbě a reorganizaci nové tkáně.

5 Závěr

Biologické hodnocení potvrdilo, že vyvinuté hierarchické skafoldy jsou vysoce biokompatibilní a funkční. Silk fibroin se ukázal jako vhodnější biopolymer pro funkcionalizaci PCL, neboť poskytuje stabilnější bioaktivní rozhraní pro dlouhodobou kultivaci dermálních fibroblastů v porovnání s kolagenem typu I a nevyžaduje náročnou plazmovou úpravu. Tato práce demonstruje, že správná kombinace orientované 3D architektury skafoldu a proteinové úpravy dokáže stimulovat proliferaci lidských primárních dermálních fibroblastů *in vitro* a vést ke vzniku organizovaného dermálního ekvivalentu připraveného s potenciálem pro využití v tkáňovém inženýrství pro rekonstrukční chirurgii kůže. Samozřejmě tento skafold vyžaduje další preklinické a klinické testování.

Poděkování

Tato práce byla vypracována ve spolupráci s týmem prof. Gelinského v Drážďanech, který poskytl základní neupravené skafoldy. Tímto bych ráda poděkovala za předané zkušenosti a nové znalosti v oblasti pokročilé metody přípravy materiálů pro tkáňové inženýrství využité pro tuto práci. Práce byla vypracována pod vedením Ing. Miroslavy Rysové, Ph.D. na OABI CXI TUL.

Literatura

- [1] *Principles of Tissue Engineering* [online]. 2020 [vid. 2025-09-30]. ISBN 978-0-12-818422-6. Dostupné z: <https://shop.elsevier.com/books/principles-of-tissue-engineering/lanza/978-0-12-818422-6>
- [2] O'NEILL, Kelly L. a Paul D. DALTON. A Decade of Melt Electrowriting. *Small Methods* [online]. 2023, 7(7), e2201589. ISSN 2366-9608. Dostupné z: [doi:10.1002/smt.202201589](https://doi.org/10.1002/smt.202201589)
- [3] NIKFARJAM, Sadegh, Yaqeen ALDUBAISI, Vivek SWAMI, Vinay SWAMI, Gang XU, Melville B. VAUGHAN, Roman F. WOLF a Morshed KHANDAKER. Polycaprolactone Electrospun Nanofiber Membrane with Skin Graft Containing Collagen and Bandage Containing MgO Nanoparticles for Wound Healing Applications. *Polymers* [online]. 2023, 15(9) [vid. 2026-01-26]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: [doi:10.3390/polym15092014](https://doi.org/10.3390/polym15092014)
- [4] SORUSHANOVA, Anna, Luis M. DELGADO, Zhuning WU, Naledi SHOLOGU, Aniket KSHIRSAGAR, Rufus RAGHUNATH, Anne M. MULLEN, Yves BAYON, Abhay PANDIT, Michael RAGHUNATH a Dimitrios I. ZEUGOLIS. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials* [online]. 2019, 31(1), 1801651. ISSN 1521-4095. Dostupné z: [doi:10.1002/adma.201801651](https://doi.org/10.1002/adma.201801651)
- [5] SALVATORE, Luca, Nunzia GALLO, Maria Lucia NATALI, Alberta TERZI, Alessandro SANNINO a Marta MADAGHIELE. Mimicking the Hierarchical Organization of Natural Collagen: Toward the Development of Ideal Scaffolding Material for Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, 9 [vid. 2026-01-24]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: [doi:10.3389/fbioe.2021.644595](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.644595)

- [6] GIRARD, Fabien, Caroline LAJOYE, Marie CAMMAN, Nicolas TISSOT, Florence BERTHELOT PEDURAND, Biranche TANDON, Denise MOEDDER, Ievgenii LIASHENKO, Sacha SALAMEH, Paul D. DALTON a Maïté RIELLAND. First Advanced Bilayer Scaffolds for Tailored Skin Tissue Engineering Produced via Electrospinning and Melt Electrowriting. *Advanced Functional Materials* [online]. 2024, **34**(27), 2314757. ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.202314757
- [7] İLASLAN, Kerem, Fatih TORNUK a M. Zeki DURAK. Development of polycaprolactone biodegradable films reinforced with silver-doped organoclay and effect on the microbiological quality of ground beef meat. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2022, **46**(10), e16862. ISSN 1745-4549. Dostupné z: doi:10.1111/jfpp.16862
- [8] JAFARI, Hafez, Alberto LISTA, Manuela Mafosso SIEKAPEN, Pejman GHAFFARI-BOHLOULI, Lei NIE, Houman ALIMORADI a Amin SHAVANDI. Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. *Polymers* [online]. 2020, **12**(10) [vid. 2026-01-24]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12102230
- [9] ZHANG, Wei, Longkun CHEN, Jialin CHEN, Lingshuang WANG, Xuexian GUI, Jisheng RAN, Guowei XU, Hongshi ZHAO, Mengfeng ZENG, Junfeng JI, Li QIAN, Jianda ZHOU, Hongwei OUYANG a Xiaohui ZOU. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2017, **6**(10), 1700121. ISSN 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201700121
- [10] LOEWNER, Sebastian, Sebastian HEENE, Timo BAROTH, Henrik HEYMANN, Fabian CHOLEWA, Holger BLUME a Cornelia BLUME. Recent advances in melt electro writing for tissue engineering for 3D printing of microporous scaffolds for tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, **10** [vid. 2025-09-30]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.896719
- [11] BOLLE, Eleonore C. L., Nicole BARTNIKOWSKI, Parvathi HARIDAS, Tony J. PARKER, John F. FRASER, Shaun D. GREGORY a Tim R. DARGAVILLE. Improving skin integration around long-term percutaneous devices using fibrous scaffolds in a reconstructed human skin equivalent model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* [online]. 2020, **108**(3), 738–749. ISSN 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.34428
- [12] LI, Dipeng, Renjie LIANG, Yirong WANG, Yanting ZHOU a Weibang CAI. Preparation of silk fibroin-derived hydrogels and applications in skin regeneration. *Health Science Reports* [online]. 2024, **7**(8), e2295. ISSN 2398-8835. Dostupné z: doi:10.1002/hsr2.2295