PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
308 138
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-256**
(22) Přihlášeno: **04.05.2017**
(40) Zveřejněno: **14.11.2018**
(Věstník č. 46/2018)
(47) Uděleno: **11.12.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.01.2020**
(Věstník č. 4/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
CHENG, Ke; LAI, Yinzhi; KISAALITA, William S. Three-dimensional polymer scaffolds for high throughput cell-based assay systems. Biomaterials, 2008, 29.18: 2802-2812. ISSN: 0142-9612; SERAS-FRANZOSO, Joaquin, et al. Functionalization of 3D scaffolds with protein-releasing biomaterials for intracellular delivery. Journal of controlled release, 2013, 171.1: 63-72; ISSN: 0168-3659.
US 2012052565 A1; WO 2009127647 A2; CZ CZ30686 U1; WO 2014202199 A1.

(73) Majitel patentu:
SCITEG a.s., Brno - Královo Pole, CZ
(72) Původce:
prof. RNDr. Josef Jančář, CSc., Brno - Kohoutovice, CZ
doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D., Měnín, CZ
(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Nosič pro kultivaci buněk a způsob jeho přípravy

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje nosič pro kultivaci buněk, který obsahuje vícejamkovou destičku, přičemž v jamkách jsou umístěny porézní substráty, s výhodou s porozitou ≥ 90 %, upravené pro kultivaci buněk, adherující k povrchu jamek. Tento nosič lze reprodukovatelně připravit způsobem, který zahrnuje následující kroky:
- nanesení vrstvy rozpouštědla do alespoň jedné jamky vícejamkové destičky a její zmražení;
- nanesení do uvedené alespoň jedné jamky alespoň jedné vrstvy materiálu porézního substrátu, po nanesení každé vrstvy je materiál zmražen;
- nanesení krycí vrstvy rozpouštědla do uvedené alespoň jedné jamky, její zmražení; a
- lyofilizaci po nanesení každé vrstvy nebo po nanesení všech vrstev.

CZ 308138 B6

Nosič pro kultivaci buněk a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

Vynález se týká pevného nosiče obsahujícího porézní 3D substrát vhodný k růstu a testování vlastností jakýchkoliv buněk, a způsobu jeho přípravy.

Dosavadní stav techniky

Většina studií buněčných kultur se provádí na površích plošných substrátů, jako jsou např. kultivační mikrodesky, destičky pro tkáňové kultury, lahve pro kultivaci, Petriho misky atd. Zejména kultivační mikrodestičky, které obsahují velké množství malých identických jamek, jsou široce využívány, protože jsou ideální pro studium nízkého počtu buněk na velkém množství buněčných testů. Tyto desky jsou standardní jak pro analytický výzkum, tak i pro klinické diagnostické testy. Jejich nevýhoda však spočívá v omezení na 2–D kultury, kdy jsou buňky nuceny se přizpůsobit rovnému a tvrdému podkladu, který je zcela odlišný od jejich přirozeného prostředí vtkaních či orgánech *in–vivo*. Výhody použití troj–dimenzionálního (3D) substrátu, který by simuloval extracelulární matrix (ECM) tkání či orgánů, byly již mnohokrát popsány v odborné literatuře. 3D substrát především umožní lepší adhezi buněk, jejich migraci, proliferaci a diferenciaci, a to především proto, že imituje přirozené mezibuněčné mikroprostředí včetně signálních cest fungujících na základě různých imunochemických interakcí.

Doposud bylo v odborné literatuře popsáno velké množství 3D nosičů buněk, které se liší jak chemickým složením, tak i jejich přípravou. Byly připraveny nosiče z polymerů a biopolymerů, z biokeramiky, bioaktivního skla, kovů kolonizovatelných buňkami i z kompozitu připravených kombinací anorganického a organického materiálu. Pro dosažení požadovaných biologických funkcí byly nosiče dále modifikovány přídavkem různých přírodních i syntetických bioaktivních látek, růstových faktorů, krevních derivátů, funkčních proteinů a dalších tak, aby co nejlépe podpořily růst nebo diferenciaci použitých buněk specifické tkáně nebo orgánu.

Biologické experimenty, diagnostika či lékařský výzkum na buněčných kulturách jsou charakterizovány velkým rozptylem získaných výsledků, což je dáno jednak adaptabilitou zkoumaných buněk na prostředí, ve kterém rostou a jednak velmi malou reprodukovatelností postupů přípravy 3D substrátů. Především velmi nízká reprodukovatelnost 3D struktury substrátů připravených z biopolymerů (kolagen, celulóza, fibroin atd.) omezuje významně spolehlivost buněčných esejí jak v tkáňovém inženýrství, tak ve výzkumu mechanismů nádorových onemocnění a způsobuje neefektivní využívání moderních analytických přístrojů schopných automaticky zpracovávat velká množství vzorků. Tato omezení je možno významným způsobem minimalizovat nalezením metody přípravy porézních substrátů s vysoce reprodukovatelnou 3D strukturou na makro–, mikro– i nano škále přímo v jamce standardizované buněčné kultivační destičky.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je 3D nosič pro kultivaci buněk, který obsahuje vícejamkovou destičku, přičemž v jamkách jsou umístěny porézní substráty upravené pro kultivaci buněk, adherující k povrchu jamek. Porézní substráty jsou trojrozměrné (3D), nikoliv plošné, tj. mají tloušťku/výšku alespoň 10 mikrometrů, a umožňují kultivaci buněk v prostoru, nikoliv jen v ploše. Porézní substráty jsou upravené pro kultivaci buněk díky konektivitě pórů. Velikost a konektivita pórů pro jednotlivé typy kultivovaných buněk odpovídá parametrům extracelulární matrix příslušných tvrdých či měkkých tkání a orgánů, a tedy simuluje prostředí extracelulární matrix, jejíž buňky

budou kultivovány. Velikost a konektivita pórů cílové tkáně i porézních substrátu jsou měřeny a vzájemně porovnávány známými metodami.

Více–jamková destička obsahuje alespoň 2 jamky, s výhodou alespoň 4 jamky, výhodněji alespoň 12 jamek. Horní hranice počtu jamek je dána technickými možnostmi, s výhodou je 10 000 jamek, výhodněji 2000 jamek. Jamky mohou mít kruhový nebo nekruhový průřez.

Porézní substrát může být umístěn v alespoň jedné jamce vícejamkové destičky, s výhodou alespoň ve čtvrtině jamek vícejamkové destičky, výhodněji alespoň v polovině jamek vícejamkové destičky, nebo ve všech jamkách vícejamkové destičky.

Vícejamková destička je s výhodou z materiálu vybraného ze skupiny zahrnující plasty, sklo, kovy, keramiku, a kombinace těchto materiálů.

Je výhodné, jestliže je distribuce velikostí pórů v porézních substrátech ve všech jamkách nosiče stejná. Je také výhodné, když jsou póry v substrátu vzájemně propojené (konektivní). S výhodou mají substráty porozitu ≥ 90 %. Výhodněji mají substráty porozitu 95 až 99,5 %, ještě výhodněji 97 až 99,5 %.

Porézní substráty mohou sestávat z jedné nebo více vrstev. S výhodou jsou porézní substráty složeny alespoň ze dvou vrstev, lišících se porozitou, velikostí pórů a jejich konektivitou, materiálovým složením, přítomností a/nebo složením aditiv.

Velikost pórů porézního substrátu je v rozmezí 0,1 až 1000 μm, s výhodou v rozmezí 5 až 1000 μm nebo v rozmezí 100 až 2000 nm nebo v rozmezí 50 až 600 μm.

Materiál porézního substrátu je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující proteiny extracelulární matrix (ECM); strukturní proteiny jako je kolagen, fibrin, silk fibroin, elastin či želatina; polysacharidy jako kyselina hyaluronová a její deriváty, chitosan a jeho deriváty, škrob, pryskyřičné gumy, celulóza a deriváty celulózy; pryskyřice; syntetické biokompatibilní polymery, jako je kyselina polymléčná, polyglykolová, polyethylenglykol a jejich blokové kopolymery, polykaprolakton, polyhydroxybutyrát, polyurethany; keramické přírodní nanotrubky (např. Halloyzit); a směsi těchto materiálů. Polymery (vč. proteinů, polysacharidů a syntetických polymerů) mohou být s výhodou zesítěné. Materiál porézního substrátu může být například ve formě porézní xerogelové pěny, porézního hydrogelu, částic, vláken či nanovláken. Materiál porézního substrátu může dále obsahovat jako aditiva proteiny (zejména bioaktivní proteiny), jejich fragmenty či směsi, fosfáty či organické nebo anorganické nanočástice, např. hydroxyapatit, alfa– nebo beta–trikalcium fosfát, oxidové keramiky, např. SiO_2, kovy, např. Ag, Au, Mg, zejména ve formě nanočástic, či nanočástice kovů s kovalentně či fyzikálně vázanými organickými ligandy. Za nanočástice jsou obecně považovány částice s velikostí v rozmezí 1 až 1000 nm. Aditiv může být až 50 % hmotn., vztaženo na sušinu materiálu porézního substrátu, s výhodou až 30 % hmotn., nebo až 20 % hmotn., nebo až 10 % hmotn., nebo 0,1 až 5 % hmotn..

Materiály porézního substrátu jsou s výhodou vybrány ze skupiny zahrnující zejména kolagen, kolagen zesítěný EDC/NHS, polymery a kopolymery polymléčné kyseliny, polyglykolové kyseliny a/nebo polyethylenglykolu, polykaprolakton, polysacharidy (zejména chitosan a/nebo želatinu), gumy–karayi, silkilbroinu. Zvláknitelné materiály mohou být ve formě nanovláken. S výhodou obsahuje materiál porézního substrátu jako aditivum hydroxyapatit, oxidovanou celulózu, bovinní krevní destičky, bioaktivní proteiny kolagenní tkáně, kyselinu hyaluronovou, polykaprolaktuon, želatinu, růstové faktory, haloisit.

Porézní substrát má s výhodou tloušťku (výšku) alespoň 10 mikrometrů, s výhodou alespoň 100 mikrometrů, výhodněji alespoň 0,5 mm, nejvýhodněji 1 až 10 mm.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále způsob přípravy nosiče pro kultivaci buněk, zahrnující následující po sobě jdoucí kroky:

- nanesení vrstvy rozpouštědla do alespoň jedné jamky vícejamkové destičky a její zmražení,
- nanesení do uvedené alespoň jedné jamky alespoň jedné vrstvy materiálu porézního substrátu, po nanesení každé vrstvy je materiál zmražen,
- nanesení krycí vrstvy rozpouštědla do uvedené alespoň jedné jamky, její zmražení, a
- lyofilizaci po nanesení každé vrstvy nebo po nanesení všech vrstev.

Materiál porézního substrátu se s výhodou nanese ve formě roztoku, suspenze, aerogelu, emulze, hydrogelu, mikročástic nebo nanovláken.

Přítomnost rozpouštědla ve spodní a horní vrstvě dovoluje řídit homogenitu povrchu substrátu v procesu lyofilizace. V konečném produktu tyto vrstvy rozpouštědla nejsou přítomny, jelikož jsou odstraněny v procesu lyofilizace.

Rozpouštědlem je s výhodou voda, výhodněji ultračistá voda. Rovnoměrné a řízené velikosti a distribuce velikostí pórů se výhodně dosahuje umístěním materiálu porézního substrátu na vrstvu zmrzlé vody umístěnou na dně jamky, následným zmražením nanesené vrstvy roztoku či gelu materiálu zamýšleného porézního substrátu. Proces je ukončen umístěním svrchní vrstvy vody na povrch takto připraveného a zmraženého vrstevnatého systému a jeho následným konečným zmražením. Zmražení může probíhat různými rychlostmi, přičemž volba této rychlosti ovlivňuje velikost, distribuci velikostí a konektivitu pórů.

Zejména v případě použití ultračisté vody jako rozpouštědla se mražení s výhodou provádí ve dvou krocích, nejprve zmražením na teplotu mezi –5 až –40 °C, a potom zmražením na teplotu mezi –20 až –60 °C.

Lyofilizace se s výhodou provádí při teplotě nižší než –70 °C, s výhodou za tlaku nižšího, než je atmosférický, výhodněji za tlaku 1000 Pa a méně. Při použití vody jako rozpouštědla probíhá proces lyofilizace, kdy led uvnitř kapilár a pórů materiálu sublimuje do plynné fáze, při teplotě a tlaku nižším, než jsou podmínky odpovídající trojnému bodu vody (kritický bod: kritická teplota T_K = 373,95 °C a kritický tlak p_K = 22,06 MPa).

Materiál porézního substrátu může být v průběhu přípravy zesítěn pomocí síťovacích činidel vhodných pro daný materiál. Odborník v oboru bude mít dostatečné znalosti o vhodných síťovacích činidlech pro daný polymerní materiál. Například pro kolagen je jedním z vhodných síťovacích činidel EDC/NHS.

Tento způsob přípravy zajišťuje, že substrát je porézní s rovnoměrnou velikostí, distribucí velikostí pórů a jejich konektivitou reprodukovanou ve všech jamkách nosiče s tloušťkou od 10 μm po rozměr odpovídající výšce jamky. Zároveň tento způsob umožňuje reprodukovatelně řídit porozitu, velikost a distribuci velikostí pórů a konektivitu pórů. Nosiče podle vynálezu s reprodukovatelnou a ve všech jamkách, kde je substrát, stejnou průměrnou velikostí, distribucí velikostí a konektivitou pórů substrátu umožňují okamžité osazení substrátu buněčným materiálem, a tím poskytují podmínky pro získání vysoce opakovatelných a spolehlivých výsledků v biologickém a medicínském výzkumu, v tkáňovém inženýrství a v procedurách regenerativní medicíny či v diagnostice.

Způsob přípravy porézního substrátu zahrnuje vysoce kontrolovaný a reprodukovatelný proces vrstvení pro buňky netoxických polymer–kompozitních materiálů, poskytujících substráty s vysokou porozitou (≥ 90 %) a navzájem propojenými póry o kontrolované velikosti umožňujícími transport kyslíku a živin nezbytných pro růst buněk v celém objemu. Takový substrát se dosud nepodařilo stávajícími metodami připravit. Nosič jeví dlouhodobou skladovatelnost při uchovávání při pokojové teplotě bez významného poklesu užitných vlastností

substrátu. Kombinace substrátu s nosičem umožňuje snadnou ruční či automatizovanou laboratorní i klinickou manipulaci.

Předkládaný vynález dále zahrnuje použití nosiče podle vynálezu pro osazení buněčným materiálem, jeho kultivaci a popřípadě následnou analýzu.

Objasnění výkresů

Obr. 1 SEM snímky povrchu porézní 3D struktury kolagenního substrátu. Vlevo dle příkladu 1 (0,5 % kolagenu) a vpravo dle příkladu 2 (kombinace 0,5 a 2% kolagenové vrstvy).

Obr. 2 Závislost střední velikosti pórů na složení materiál 3D kolagenního substrátu (vlevo) Vliv koncentrace kolagenu při konstantní koncentraci kolagenu, (vpravo) Vliv koncentrace nHAP při konstantní koncentraci kolagenu.

Obr. 3 NanoCT sken porézní struktury substrátu dle Příkladu 3 (šedivá plocha) a jeho 3D kolonizace buňkami rakoviny plic (tmavošedé kruhové objekty).

Obr. 4 Fluorescenční konfokální mikroskopie diferencovaných mesenchymálních kmenových buněk na 3D substrátu v příkladu 1. Životaschopnost buněk je dokumentována obarvením pomocí BCECF–AM/propidiumjodidu 28 dní po osazení substrátu obsahujícího 0,5 % kolagenu a (a) 50% nHAP, (b) 70% nHAP a (c) obsahující 2 % kolagenu a 50% nHAP. Immunofluorescenční detekce osteokalcinu 28 dní po osazení stejných substrátů.

Obr. 5 SEM snímky 3D substrátu dle Příkladu 6 (vlevo) obsahující kyselinu hyaluronovou a dle příkladu 7 (vpravo) obsahující jako modifikační složku chitosan.

Obr. 6 Fluorescenční konfoální mikroskopie diferencovaných buněk na 3D substrátu v příkladu 8 (vlevo) a 9 (vpravo). Životaschopnost buněk je dokumentována obarvením cytoplazmy pomocí BCECF–AM/propidiumjodidu a červeně jader buněk propidium jodidem.

Obr. 7 Fluorescenční konfoální mikroskopie diferencovaných buněk na 3D substrátu v příkladu 10 (vlevo) a 11 (vpravo). Životaschopnost buněk je dokumentována obarvením cytoplazmy zeleně pomocí BCECF–AM/propidiumiodidem) a červeně jader buněk propidium jodidem.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Jamky kultivační destičky obsahující 48 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,3 až 3 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na –18 °C (1h), poté na –35 °C (1h), á nakonec byla vysušena při teplotě kondenzátoru –95 °C a tlaku nižším než 1000 Pa do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným

způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující homogenní porézní kolagenní skafold s řízenou velikostí pórů v rozsahu 250 až 450 mikronů (dáno teplotou mražení a koncentrací kolagenní hmoty) a výškou 5 mm adherující ke stěnám destičky, který po navlhčení zůstává u dna destičky a neplave (viz. Obr. 1). Porozita byla úměrná koncentraci kolagenu a ležela v intervalu od 99,5 % pro 0,3 % hmotn. koncentraci po 97 % pro koncentraci 3 % hmotn. kolagenu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Materiál byl již podroben in–vitro i in–vivo testům

Příklad 2

Jamky kultivační destičky obsahující 48 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 2 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na –18 °C (1h), poté na –35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru –95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o celkové výšce 6 mm s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (póry o průměrné, velikosti 100 mikronů) tloušťky 3 mm, tak i v horní části materiálu (póry o velikosti 250 až 450 mikronů) tloušťky 3 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Materiál byl již podroben in–vitro i in–vivo testům z hlediska optimalizace porozity a velikosti pórů pro jednotlivé typy buněk (Obr. 2). Porozita byla 98,5 % pro 2 % hmotn. koncentraci po 99 % pro koncentraci 0,5 % hmotn. kolagenu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty.

Příklad 3

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II) – zmražení

2. Nanovlákna z polykaprolaktonu a želatiny připravené elektrospinováním na přístroji Nanospider (Elmarco) – průměr vláken 120 až 280 nm

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h) a v posledním kroku na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o celkové tloušťce 3 mm s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (50 μm) o tloušťce 0,5 mm, tak i v horní části materiálu (póry o průměrné velikosti 400 mikronu) tloušťky 2,5 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Kolonizace připraveného 3D substrátu dle příkladu 3 buňkami v celém jeho objemu je doložena Obr. 3. Porozita v nanovlákenné části byla 45 % a 99,3 % pro vrstvu o koncentraci 0,5 % hmotn. kolagenu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty.

Příklad 4

Jamky kultivační destičky obsahující 48 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 50 nebo 70 % nano hydroxyapatitu (nHAP) na kolagenovou sušinu v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o tloušťce 5 mm s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní části materiálu (průměrná velikost 350 mikronů) tloušťky 3 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Materiál byl podroben in−vitro i in−vivo testům (Obr. 4 až a,b,d,e). Porozita byla úměrná složení vrstev a byla 99,5 % pro 0,5 % hmotn. koncentraci kolagenu v první vrstvě a podle obsahu hydroxyapatitu byla 97 až 98 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty.

Příklad 5

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 2 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 50 % hmotn. nano hydroxyapatitu (nHAP) na kolagenovou sušinu v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o tloušťce 4 mm s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (100 mikronů) tloušťky 1 mm, tak i v horní části materiálu (350 mikronů) tloušťky 3 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Materiál byl již podroben in–vitro i in–vivo testům (Obr. 4 až c,f). Porozita byla 98,5 % pro první vrstvu a podle obsahu hydroxyapatitu byla 97 až 98 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty.

Příklad 6

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 10 % hmotn. kyseliny hyaluronové na kolagenovou sušinu v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h) a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold s celkovou výškou 4 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů) o tloušťce 3 mm, tak i v horní části materiálu (520 mikronů) o tloušťce 1 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. (Obr. 5a). Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 98,5 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané

pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 7

Jamky kultivační destičky obsahující 48 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 2 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 20 % hmotn. chitosanu na kolagenovou sušinu v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h) a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold s celkovou tloušťkou 8 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (100 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní části materiálu (600 mikronů) tloušťky 6 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. (Obr. 5b). Porozita byla 98,5 % pro první vrstvu a 98 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 8

Jamky kultivační destičky obsahující 24 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 30 % hmotn. oxidované celulózy na kolagenovou sušinu v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o celkové tloušťce 10 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů) tloušťky 4 mm, tak i v horní části materiálu (350 mikronů) tloušťky 6 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich

sledování. (Obr. 6a). Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 98,3 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografii (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 9

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 15 % hmotn. lyzátu bovinních krevních destiček na kolagenovou sušinu v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold tloušťky 6 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů), tak i v horní části materiálu (420 mikronů). Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. (Obr. 6b). Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 99 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 10

Jamky kultivační destičky obsahující 24 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. a 20 % hmotn. chitosanu a 10 % hmotn. lyzátu bovinních krevních destiček na kolagenovou sušinu ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold tloušťky 10 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů) tloušťky 3 mm, tak i v horní

části materiálu (380 mikronů) tloušťky 7 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. (Obr. 7a). Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 98,5 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 11

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn., s přídavkem 20 % hmotn. oxidované celulózy a 10 % hmotn. lyzátu bovinních krevních destiček, vztaženo na kolagenovou sušinu, v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na –18 °C (1h), poté na –35 °C (1h) a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru –95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je vzorek kolagenu kovalentně zesíťován pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušen stejným způsobem, jak je popsáno výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o tloušťce 6 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní části materiálu (250 mikronů) tloušťky 4 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. (Obr. 7b). Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 98 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 12

Jamky kultivační destičky obsahující 24 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (heterogenní suspenze, decelularizované kolagenní tkáně obsahující původní bioaktivní proteiny, koncentrace 0,7 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (heterogenní suspenze decelularizované kolagenní tkáně obsahující původní bioaktivní proteiny, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na –18 °C (1h), poté na –35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru –95 °C do konstantní hmotnosti. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o celkové tloušťce 10 mm s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části

materiálu (300 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní části materiálu (400 mikronů) tloušťky 8 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita byla 88,5 % pro první vrstvu a 91 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 13

Jamky kultivační destičky obsahující 24 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (heterogenní suspenze decelularizované kolagenní tkáně obsahující původní bioaktivní proteiny, koncentrace 0,7 % hmotn. ultračisté vodě)

3. Kolagenní hmota (heterogenní suspenze decelularizované kolagenní tkáně obsahující původní bioaktivní proteiny, koncentrace 0,5 % hmotn. a obohacená 2 mikro μg růstového faktoru TGF–β v ultračisté vodě)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na –18 °C (1h), poté na –35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru –95 °C do konstantní hmotnosti. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold o tloušťce 10 mm a s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (300 mikronů) tloušťky 5 mm, tak i v horní části materiálu (400 mikronů) tloušťky 5 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita byla 88,5 % pro první vrstvu a 91 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 14

Jamky kultivační destičky obsahující 24 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Želatinová nanovlákna modifikovaná haloisitem (vrstva náhodně orientovaných nanovláken průměru 180 nm, plošná koncentrace 20 % hmotn.)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na –18 °C (1h), poté na –35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru –95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je první vrstva kolagenu kovalentně zesíťována pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušena stejným způsobem, jak je popsáno

výše a poté je nanesena vrstva želatinových nanovláken obsahujících 1 % hmotn. haloisitu. Výsledkem je destička obsahující laminovaný porézní kolagenní skafold s řízenou velikostí pórů jak ve spodní vrstvě materiálu (400 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní vrstvě materiálu (50 mikronů) tloušťky 2 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita v nanovlákenné části byla 75 % a 99,3 % pro vrstvu o koncentraci 0,5 % hmotn. kolagenu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty.

Příklad 15

Jamky kultivační destičky obsahující 48 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Blokový kopolymer PLA–PGA–PEG (micelární gel, koncentrace 1 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Chitosan (homogenní roztok chitosanu, koncentrace 2 % hmotn.)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení první vrstvy blokového kopolymeru je nanesena vrstva chitosanová. Výsledkem je destička obsahující laminovaný porézní kolagenní skafold s řízenou velikostí pórů jak ve spodní vrstvě materiálu (400 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní vrstvě materiálu (380 mikronů) tloušťky 2 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita byla 98,2 % pro první vrstvu a 98,8 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 16

Jamky kultivační destičky obsahující 48 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (heterogenní suspenze decelularizované kolagenní tkáně obsahující původní bioaktivní proteiny, koncentrace 0,7 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Želatinová nanovlákna modifikovaná haloisitem (vrstva náhodně orientovaných nanovláken průměru 180 nm, plošná koncentrace 20 % hmotn.)

4. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

5. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h) a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení první vrstvy decelularizované tkáně tloušťky 2 mm je nanesena vrstva nanovláken tloušťky 0,5 mm a následně vrstva homogenního roztoku kolagenu tloušťky 2 mm. Po vysušení je horní vrstva kolagenu kovalentně zesíťována pomocí EDC/NHS přímo v destičce a opět vysušena stejným způsobem, jak je popsáno výše Výsledkem je destička obsahující laminovaný porézní kolagenní skafold s řízenou velikostí pórů jak ve spodní vrstvě materiálu (380 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní vrstvě materiálu (400 mikronů) tloušťky 2 mm. Obě vrstvy jsou odděleny nanovlákennou membránou spory o velikosti cca 80 μm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita v nanovlákenné části byla 75 %, vrstva decelularizované kolagenní hmoty měla porozitu 90 % a 99,3 % pro vrstvu o koncentraci 0,5 % hmotn. kolagenu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky. Standardní odchylka průměrných hodnot porozity byla menší než 10 % této hodnoty.

Příklad 17

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Chitosanová hmota (homogenní roztok chitosanu, koncentrace 2 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Modifikovaná gum–karaya (vrstva hydrogelu gum karayi obsahující oxidovanou celulózu, koncentrace 20 % hmotn. celulózy na sušinu gum–karayi, koncentrace gum karayi 2 % hmotn.)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení první vrstvy je nanesena vrstva hydrogelu na bázi modifikované gum karayi. Výsledkem je destička obsahující laminovaný porézní skafold s řízenou velikostí pórů jak ve spodní vrstvě materiálu (380 mikronů) tloušťky 2 mm, tak i v horní vrstvě materiálu (150 mikronů) tloušťky 2 mm. Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita byla 98,5 % pro první vrstvu a 98 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 18

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Chitosan (homogenní roztok chitosanu, koncentrace 2 % hmotn.)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je první vrstva kolagenu kovalentně zesíťována pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušena stejným způsobem, jak je popsáno výše a poté je nanesena vrstva chitosanová, která je opět vysušena způsobem popsaným výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold tloušťky 5 mm s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů), tak i v horní části materiálu (380 mikronů). Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 98 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografii (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

Příklad 19

Jamky kultivační destičky obsahující 96 jamek byly sendvičově (vrstva po vrstvě) vyplněny netoxickým materiálem v pořadí:

1. Ultračistá voda (Milipore, čistota II)

2. Kolagenní hmota (homogenní roztok bovinního kolagenu typu I, koncentrace 0,5 % hmotn. v ultračisté vodě)

3. Silk fibroin (vodní suspenze, koncentrace 2 % hmotn.)

4. Ultračistá voda (Milipore, čistota II).

Destička s netoxickým materiálem byla kontrolovaným způsobem po každém kroku vrstvení zmražena nejprve na −18 °C (1h), poté na −35 °C (1h), a nakonec vysušena při teplotě kondenzátoru −95 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení je první vrstva kolagenu tloušťky 2,5 mm kovalentně zesíťována pomocí EDC/NHS přímo v destičce, opět vysušena stejným způsobem, jak je popsáno výše a poté je nanesena vrstva suspenze silk fibroinu tloušťky 1,5 mm, která je opět vysušena způsobem popsaným výše. Výsledkem je destička obsahující heterogenní porézní kolagenní skafold s řízenou velikostí pórů jak ve spodní části materiálu (400 mikronů), tak i v horní části materiálu (380 mikronů). Po navlhčení zůstává substrát u dna destičky a neplave. Je proto velmi vhodným materiálem pro osazení různými buňkami a jejich sledování. Porozita byla 99,5 % pro první vrstvu a 97,6 % pro horní vrstvu. Porozita byla určována na základě analýzy zobrazení 3D struktury lyofilizovaného materiálu získané pomocí mikroCT počítačového tomografu (například Nano3DX Rigaku, Japan). Uváděné hodnoty jsou průměrem měření na materiálech z 5 náhodně vybraných jamek destičky.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nosič pro kultivaci buněk, **vyznačený tím**, že obsahuje vícejamkovou destičku, přičemž v jamkách jsou umístěny porézní substráty, s výhodou s porozitou ≥ 90 %, upravené pro kultivaci buněk, adherující k povrchu jamek.

2. Nosič podle nároku 1, **vyznačený tím**, že porézní substrát je umístěn v alespoň jedné jamce vícejamkové destičky, s výhodou jsou porézní substráty umístěny alespoň ve čtvrtině jamek

vícejamkové destičky, výhodněji alespoň v polovině jamek vícejamkové destičky, nebo ve všech jamkách vícejamkové destičky.

3. Nosič podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že vícejamková destička je z materiálu vybraného ze skupiny zahrnující plasty, sklo, kovy, keramiku, a kombinace těchto materiálů.

4. Nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že je porézní substrát složen alespoň ze dvou vrstev, lišících se materiálovým složením, přítomností a/nebo složením aditiv, a/nebo porozitou.

5. Nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že velikost pórů porézního substrátu je v rozmezí 0,1 až 1000 μm, s výhodou v rozmezí 5 až 1000 μm nebo v rozmezí 100 až 2000 nm nebo v rozmezí 50 až 600 μm.

6. Nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že materiál porézního substrátu je vybrán ze skupiny zahrnující proteiny extracelulární matrix; strukturní proteiny jako je kolagen, fibrin, silk fibroin, elastin či želatina; decelularizovanou kolagenní tkáň; polysacharidy jako kyselina hyaluronová a její deriváty, chitosan a jeho deriváty, škrob, pryskyřičné gumy, celulóza a deriváty celulózy; pryskyřice; syntetické biokompatibilní polymery, jako je kyselina polymléčná, polyglykolová, polyethylenglykol a jejich blokové kopolymery, polykaprolakton, polyhydroxybutyrát, polyurethany; keramické přírodní nanotrubky; a směsi těchto materiálů; přičemž materiál porézního substrátu může být volitelně zesíťovaný, a/nebo materiál porézního substrátu může volitelně obsahovat jako aditiva bioaktivní proteiny, jejich fragmenty či směsi, fosfáty či organické nebo anorganické nanočástice, např. hydroxyapatit, alfa– nebo beta–trikalcium fosfát, oxidové keramiky, např. SiO_2 kovy, např. Ag, Au, Mg, či nanočástice kovů s kovalentně či fyzikálně vázanými organickými ligandy.

7. Nosič podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že porézní substrát má nejmenší rozměr alespoň 10 mikrometrů, s výhodou alespoň 100 mikrometrů, výhodněji alespoň 0,5 mm, nejvýhodněji 1 až 10 mm.

8. Způsob přípravy nosiče pro kultivaci buněk, **vyznačený tím**, že zahrnuje následující kroky:
- nanesení vrstvy rozpouštědla do alespoň jedné jamky vícejamkové destičky a její zmražení,
- nanesení do uvedené alespoň jedné jamky alespoň jedné vrstvy materiálu porézního substrátu, po nanesení každé vrstvy je materiál zmražen,
- nanesení krycí vrstvy rozpouštědla do uvedené alespoň jedné jamky, její zmražení, a
- lyofilizaci po nanesení každé vrstvy nebo po nanesení všech vrstev.

9. Způsob podle nároku 8, **vyznačený tím**, že zmražení se provádí dvoukrokově, nejprve zmražením na teplotu mezi –5 až –40 °C, a potom zmražením na teplotu mezi –20 až –60 °C.

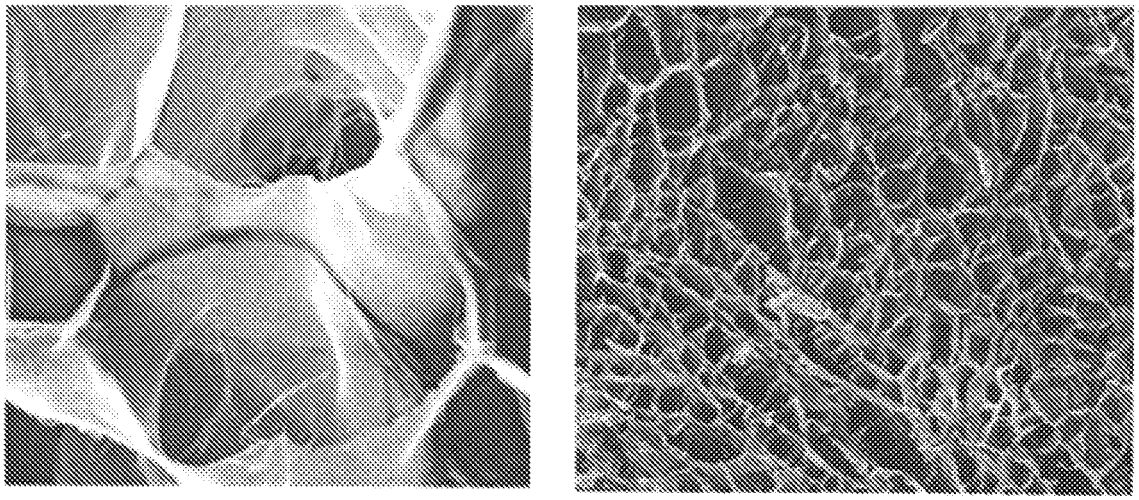
10. Způsob podle nároku 8 nebo 9, **vyznačený tím**, že lyofilizace se provádí při teplotě nižší než –70 °C, s výhodou nižšího než atmosférického tlaku, výhodněji za tlaku 1000 Pa a méně.

11. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10, **vyznačený tím**, že materiál porézního substrátu se nanáší ve formě roztoku v rozpouštědle, suspenze, aerogelu, emulze, hydrogelu, mikročástic nebo nanovláken.

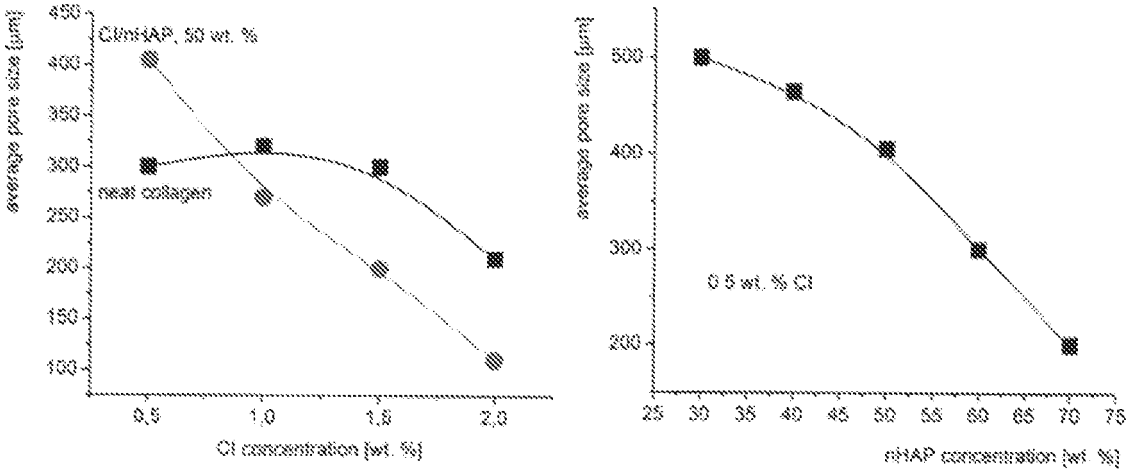
12. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 8 až 11, **vyznačený tím**, že materiál porézního substrátu se zesíťuje síťovacím činidlem.

13. Použití nosiče podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 pro osazení buněčným materiálem, jeho kultivaci a popřípadě následnou analýzu.

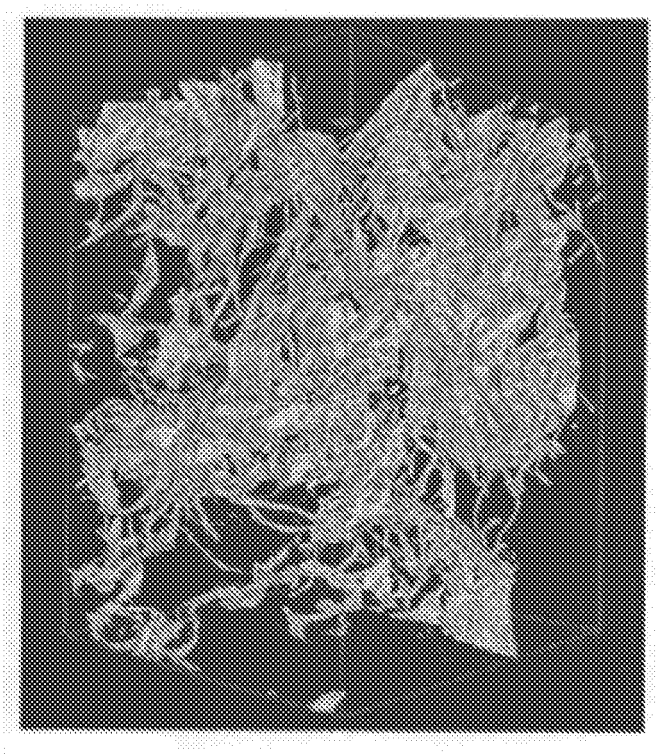
3 výkresy



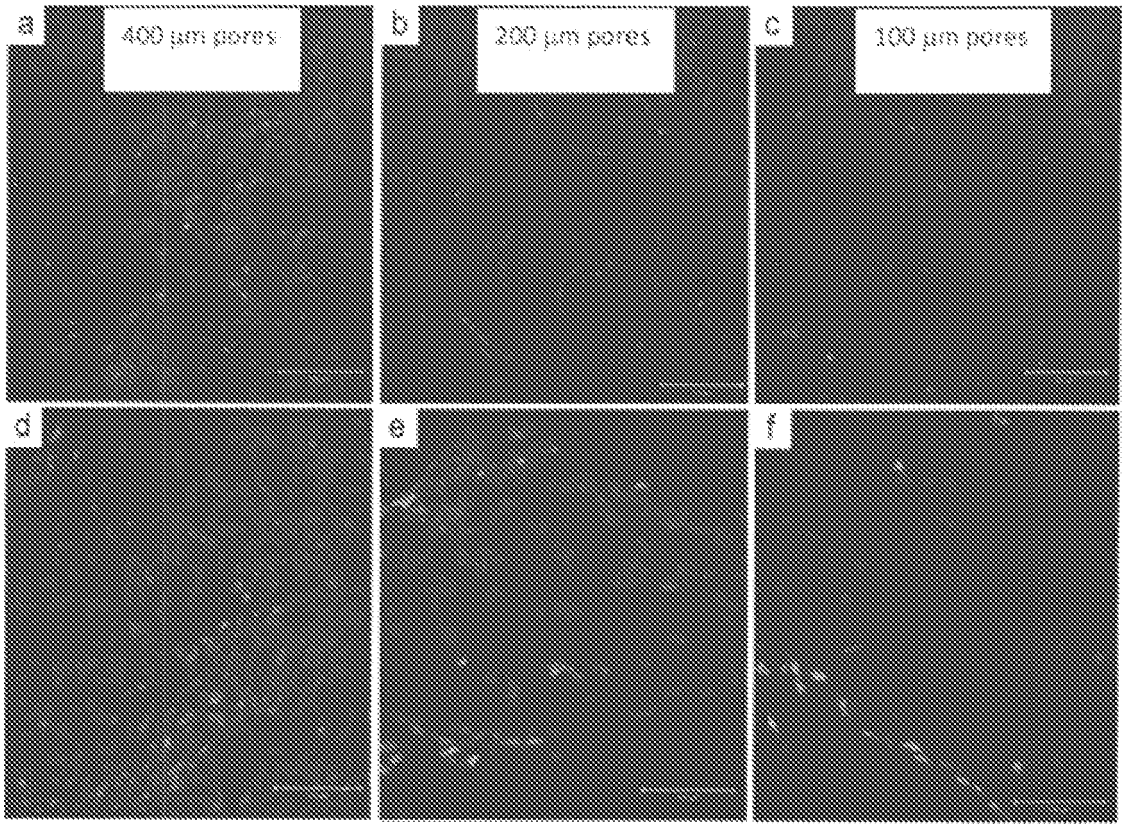
Obr. 1


Cl/nHAP, 50 wt. %
neat collagen
average pore size [µm]
Cl concentration [wt. %]
0.5 wt. % Cl
nHAP concentration [wt. %]

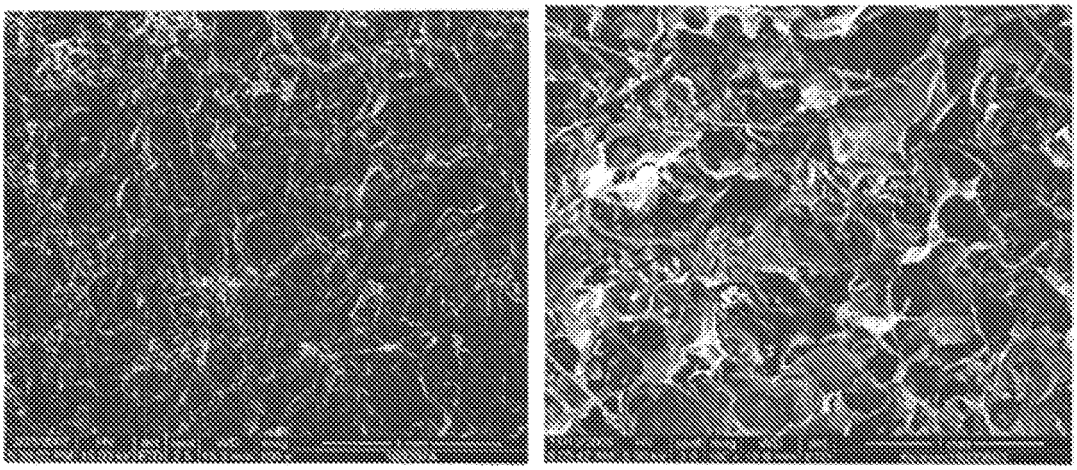
Obr. 2



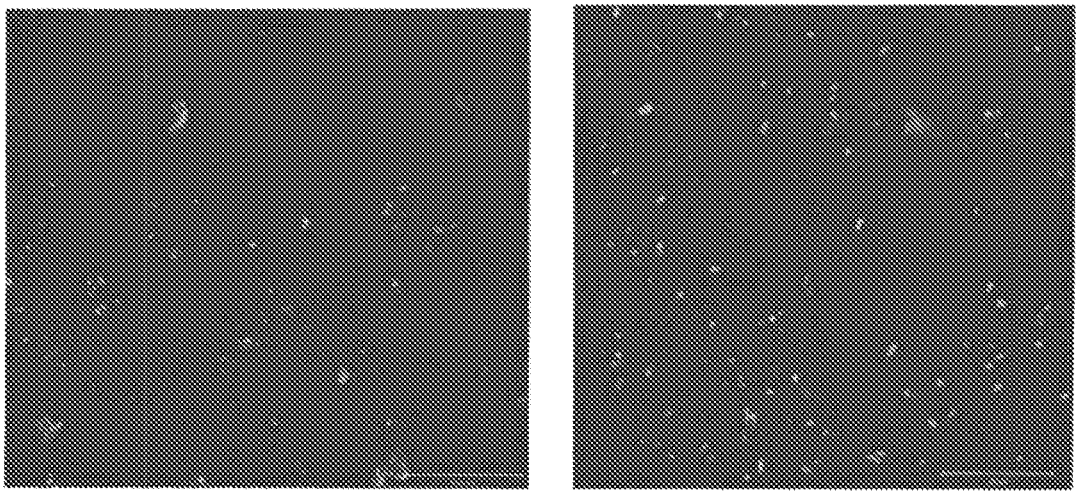
Obr. 3



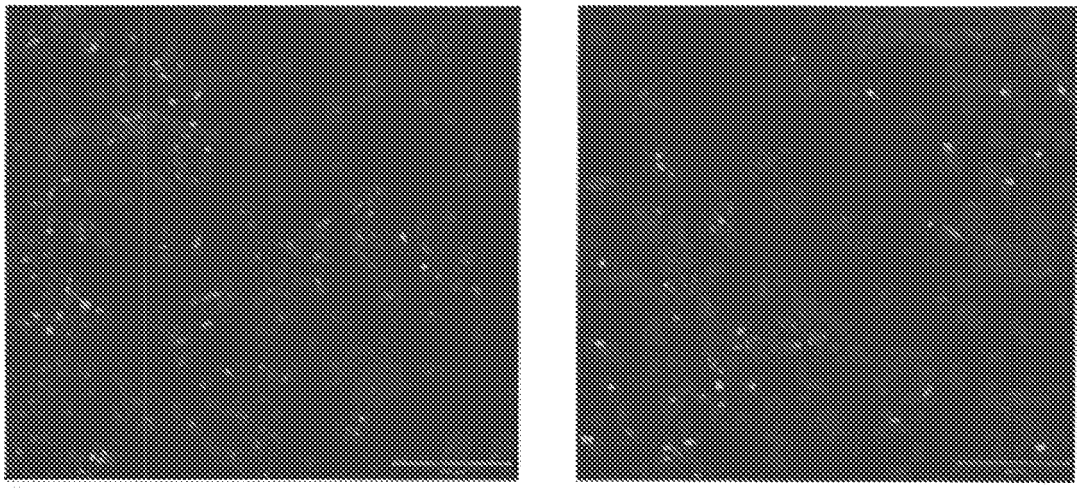
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7