

Zdokonalení současně používaných tkáňových náhrad

V mezioborové spolupráci s tuzemskými i zahraničními institucemi, zabývajícími se materiálovým inženýrstvím, se soustředíme zejména na povrchové modifikace implantátů za účelem modulovat jejich atraktivitu pro osídlení buňkami.

U polymerních implantátů se jedná například o **modifikaci plasmatem**, kterou obvykle užíváme pro zvýšení atraktivity syntetických i přírodních polymerů pro adhezi, růst a následnou fenotypickou maturaci buněk.

Poměrně intenzívně se zabýváme kovovými kostními implantáty, a to jak dlouhodobými či trvalými (náhrady velkých kloubů, jako je kyčel a koleno), tak i krátkodobými a vyjímatelnými, jako jsou fixace kostí při jejich zlomeninách.

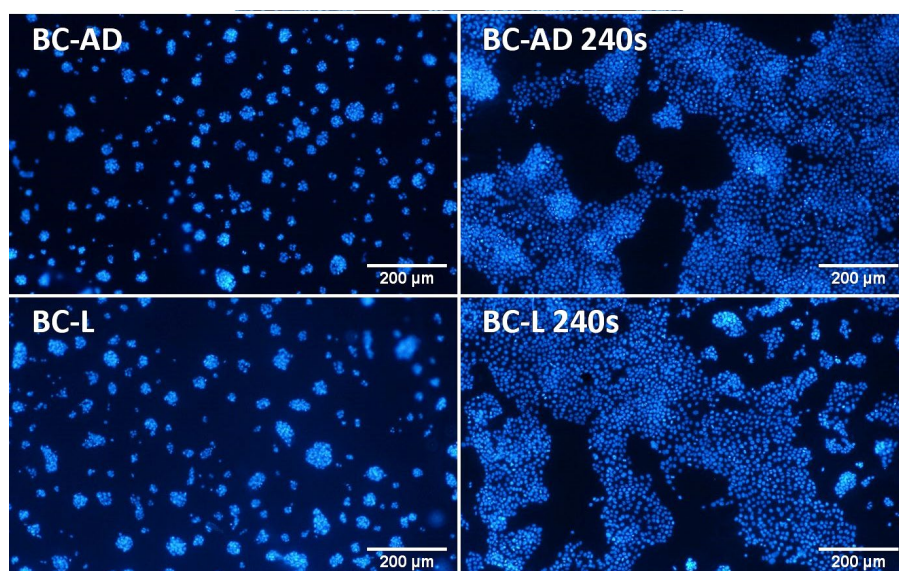
Pro dlouhodobé implantáty je žádoucí pevná osteointegrace, kterou jsme se snažili dosáhnout jejich pokrytím např. vrstvami **nanokrystalického diamantu**, vrstvami **uhlíku podobného diamantu (DLC)**, ale i například vrstvami **zeolitické a feroelektrické keramiky**.

Pro krátkodobé vyjímatelné implantáty se podílíme na vývoji **oxidických vrstev** nanosených technologií **mikroobloukové anodické oxidace (MAO)**, které svou vysokou hydrofilií omezují adhezi a růst buněk.

Všechny uvedené typy vrstev jsou však biokompatibilní, pro buňky netoxické, antikorozi, omezující i nežádoucí uvolňování částic, molekul a iontů z materiálu.

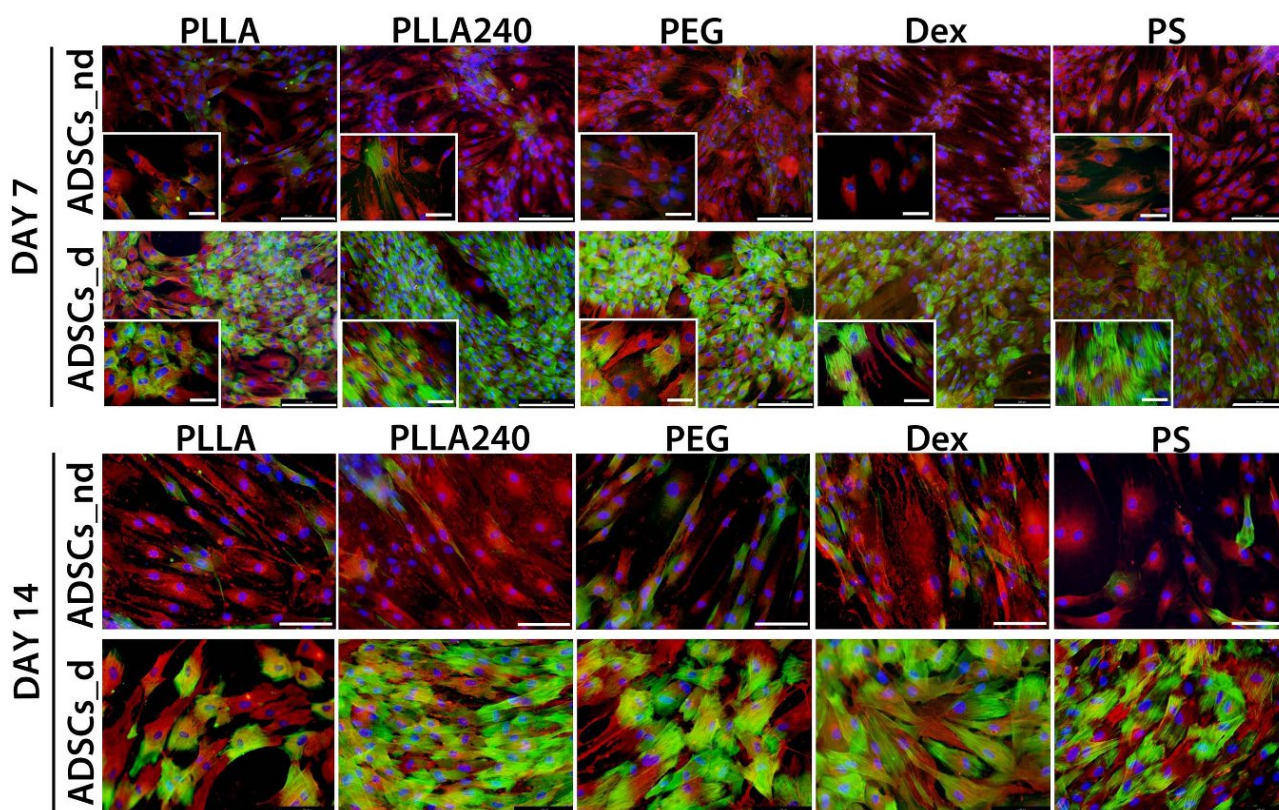
Uvádíme některé příklady interakce buněk s materiály po jmenovaných modifikacích:

1. Modifikace plasmatem:



Obr. 1. Lidské keratinocyty linie HaCaT za 4 dny po nasazení na bakteriální nanocelulózu, perspektivní jako materiál pro „inteligentní“ kryty ran, tj. kryty dodávající léčiva a buňky pro aktivní hojení ran. **Vlevo:** Malé ostrůvky keratinocytů na bakteriální nanocelulóze vysušené vzduchem (BC-AD) či lyofilizací (BC-L). **Vpravo:** tvorba souvislých ploch pokrytých keratinocyty na BC-AD a BC-L modifikovaných argonovým plasmatem po dobu 240 s (**spolupráce s VŠCHT, prof. V. Švorčík, dr. Anna Kutová**).

Modifikaci polymerů plasmatem lze využít nejen ke zvýšení adheze a růstu buněk, ale i k následnému roubování dalších biologicky aktivních molekul:



Obr. 2. Lidské kmenové buňky tukové tkáně (ASC) za 7 dnů a za 14 dnů po nasazení na vzorky nemodifikovaného poly(L-laktidu) (PLLA) a PLLA modifikovaného ozářením argonovým plasmatem po dobu 240 s (PLLA240) a následně roubovaného polyetylen glykolem (PEG) či dextranem (Dex), a na kontrolní polystyrénové kultivační misky (PS). Buňky byly kultivovány jednak ve standardním růstovém (nediferenčním) médiu (nd) nebo v médiu navozujícím diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám cévní stěny. Tato diferenciace se projevuje přítomností časného markeru alfa-aktinu (červená imunofluorescence) a střednědobého markeru kalponinu-1 (zelená imunofluorescence); jádra dobarvena modře (Hoechst 33258). (**Spolupráce s VŠCHT, prof. V. Švorčík, dr. Nikola Slepíková Kasálková**)

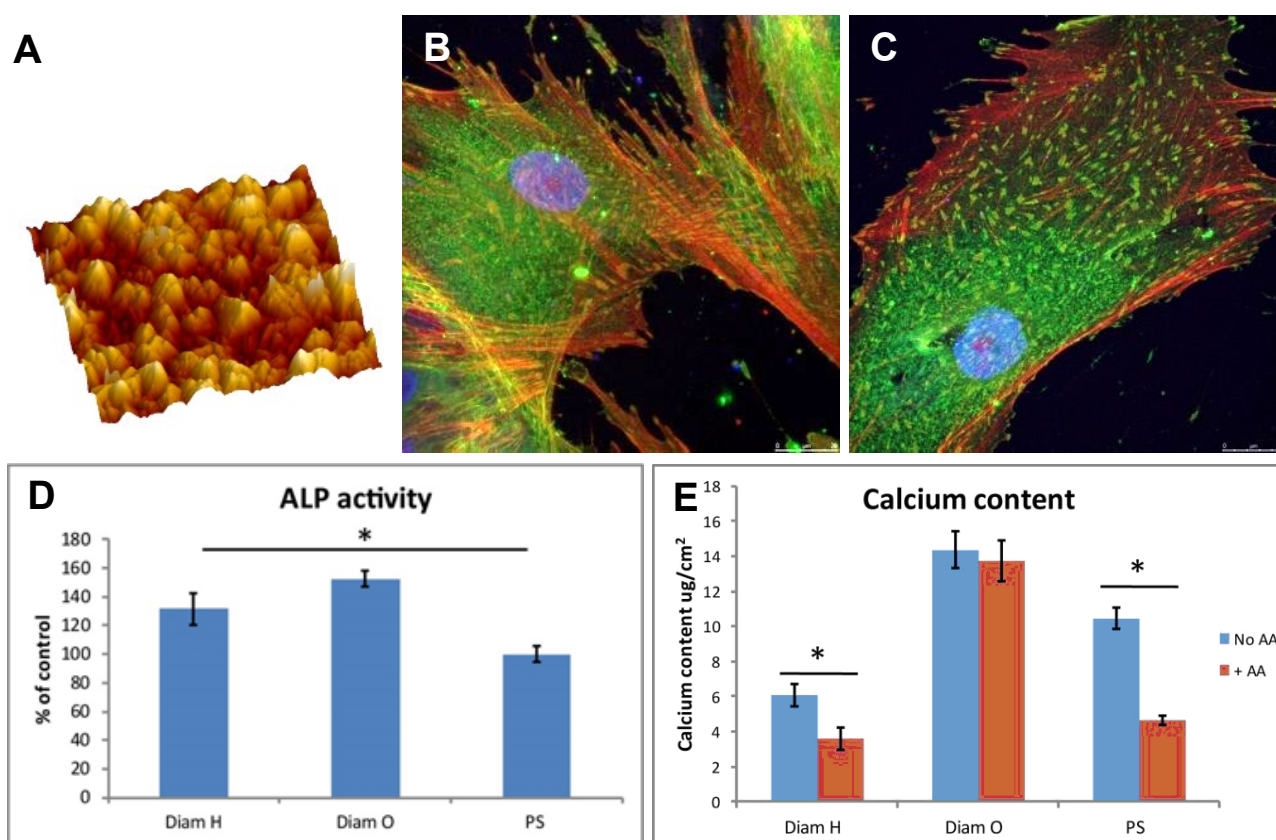
Vybrané publikace se vztahem k tématu:

- Staňková L, Kutová A, Doubková M, Kvítek O, Vokatá B, Sedlář A, Idriss H, Slepíčka P, Švorčík V, **Bačáková L**. Argon plasma-modified bacterial nanocellulose: Cell-specific differences in the interaction with fibroblasts and endothelial cells. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications** 2024;7:100470, doi:10.1016/j.carpta.2024.100470.
- Kacvinská K, **Trávníčková M**, Vojtová L, Poláček P, Dorazilová J, Kohoutek M, Hlináková K, **Pajorová J**, Tírpáková M, **Bačáková L**. Porous cellulose-collagen scaffolds for soft tissue regeneration: influence of cellulose derivatives on mechanical properties and compatibility with adipose-derived stem cells. **Cellulose** 2022; 29:8329–8351. doi: 10.1007/s10570-022-04759-4.
- Kutová A, **Staňková L**, Vejvodová K, Kvítek O, Vokatá B, Fajstavr D, Kolská Z, **Brož A**, **Bačáková L**, Švorčík V. Influence of Drying Method and Argon Plasma Modification of Bacterial Nanocellulose on Keratinocyte Adhesion and Growth. **Nanomaterials** (Basel). 2021;11(8):1916. doi: 10.3390/nano11081916.
- **Travnickova M**, Slepickova Kasalkova N, **Sedlar A**, Molitor M, **Musilkova J**, Slepicka P, Svorcik V, **Bacakova L**. Differentiation of adipose tissue-derived stem cells towards vascular smooth muscle

cells on modified poly(L-lactide) foils. **Biomed. Mater.** 16 (2021) 025016, doi: 10.1088/1748-605X/abaf97.

- Bilek MMM, **Vandrovcova M**, Shelemin A, Kuzminova A, Kylian O, Biederman H, **Bacakova L**, Weiss AS. Plasma treatment in air at atmospheric pressure that enables reagent-free covalent immobilization of biomolecules on polytetrafluoroethylene (PTFE). **Applied Surface Science** 2020; 518:146128. doi: 10.1016/j.apsusc.2020.146128.
- **Bacakova L**, **Pajorova J**, Tomkova M, **Matejka R**, **Broz A**, **Stepanovska J**, **Prazak S**, Skogberg A, Siljander S, Kallio P. Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. **Nanomaterials** (Basel). 2020;10(2):196. doi: 10.3390/nano10020196.
- **Zikmundova M**, Vereshaka M, Kolarova K, **Pajorova J**, Svorcik V, **Bacakova L**. Effects of Bacterial Nanocellulose Loaded with Curcumin and Its Degradation Products on Human Dermal Fibroblasts. **Materials** (Basel). 2020;13(21):4759. doi: 10.3390/ma13214759.

2. Vrstvy nanokrystalického diamantu:



Obr. 3. Lidské osteoblasty v kulturách na vrstvách nanokrystalického diamantu (NCD). **A:** Morfologie vrstvy NCD, vyvíjené ve spolupráci s Fyzikálním ústavem AV ČR (prof. Alexander Kromka, dr. Štěpán Potocký), v mikroskopu atomárních sil (AFM). **B, C:** imunofluorescence talinu, proteinu fokálních adhezních plaků, v buňkách na NCD terminovaných vodíkem (**B**) a kyslíkem (**C**). **D, E:** markery fenotypické maturace, a sice aktivita alkalické fosfatázy, tj. enzymu zúčastněného v mineralizaci kostní matrix (**D**) a obsah vápníku (**E**) v kulturách osteoblastů na NCD terminovaných vodíkem (Diam H), terminovaných kyslíkem (Diam O) a na kontrolním kultivačním polystyrénu (PS).

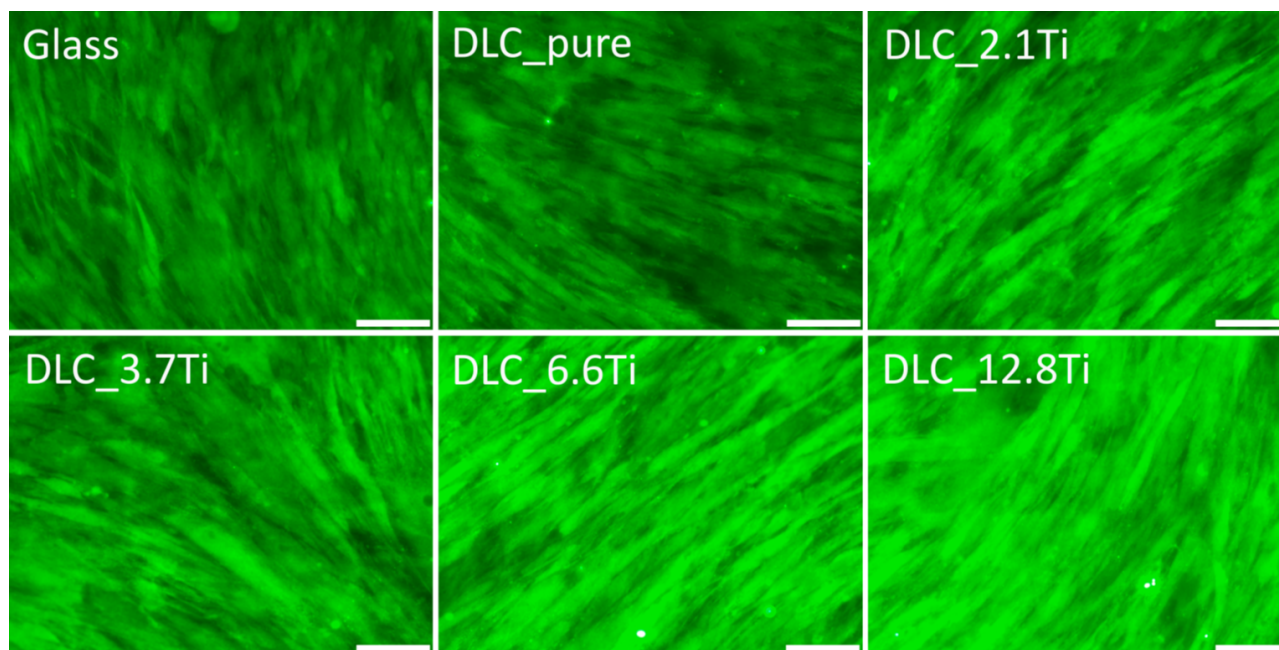
Vybrané publikace se vztahem k tématu:

- **Nemcakova I**, Litvinec A, Mandys V, Potocky S, Plencner M, **Doubkova M**, Nanka O, Olejnickova V, Sankova B, Bartos M, Ukraintsev E, Babčenko O, **Bacakova L**, Kromka A, Rezek B, Sedmera D. Coating Ti6Al4V implants with nanocrystalline diamond functionalized with BMP-7 promotes

extracellular matrix mineralization in vitro and faster osseointegration in vivo. **Scientific Reports**. 2022;12(1):5264. doi: 10.1038/s41598-022-09183-z.

- Steinerova M, Matejka R, Stepanovska J, Filova E, Stankova L, Rysova M, Martinova L, Dragounova H, Domonkos M, Artemenko A, Babchenko O, Otahal M, **Bacakova L**, Kromka A. Human osteoblast-like SAOS-2 cells on submicron-scale fibers coated with nanocrystalline diamond films. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2021;121:111792. doi: 10.1016/j.msec.2020.111792.

3. Vrstvy uhlíku podobného diamantu (DLC):



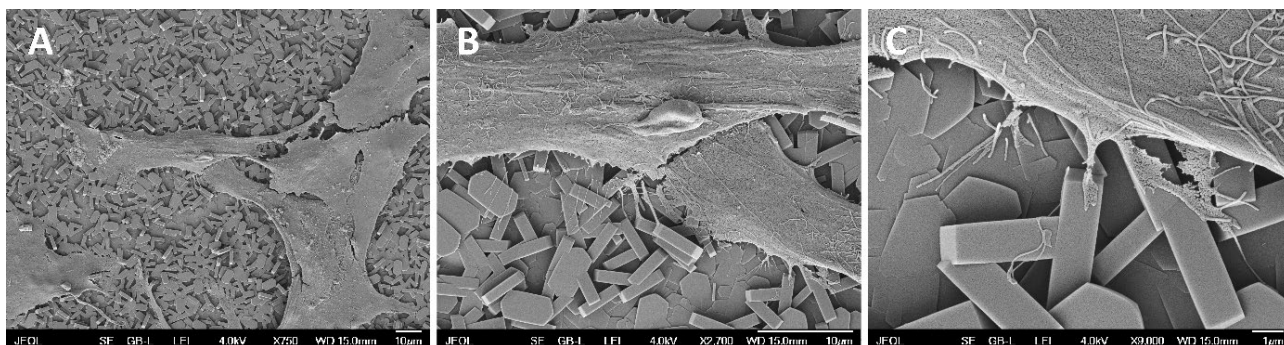
Obr. 4. *Imunofluorescence osteokalcinu, pozdního markeru osteogenní diferenciace v lidských kmenových buňkách kostní dřeně za 14 dnů po nasazení na vrstvy DLC dopované různými koncentracemi Ti (2,1-12,8 at.%) pro zvýšení jejich přilnavosti ke kovovému materiálu. Je zřejmé, že dopace DLC titanem podporuje i osteogenní diferenciaci buněk. Měřítka představuje 100 μ m.*

Vybrané publikace se vztahem k tématu:

- Travnickova M, Filova E**, Slepicka P, Slepickova Kasalkova N, Kocourek T, Zaloudkova M, Suchy T, **Bacakova L**. Titanium-Doped Diamond-like Carbon Layers as a Promising Coating for Joint Replacements Supporting Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Int J Mol Sci**. 2024 Feb 29;25(5):2837. doi: 10.3390/ijms25052837.
- Travnickova M, Vandrovcova M, Filova E, Steinerova M, Rackova J**, Kocourek T, Bartova J, Suchy T, Zaloudkova M, Jelinek M, **Bacakova L**. Effect of diamond-like carbon doped with chromium on cell differentiation, immune activation and apoptosis. **Eur Cell Mater**. 2020;40:276-302. doi: 10.22203/eCM.v040a17.

Výzkum je prováděn ve spolupráci s **Fyzikálním ústavem AV ČR** (dr. Tomáš Kocourek)

4. Vrstvy zeolitické keramiky:

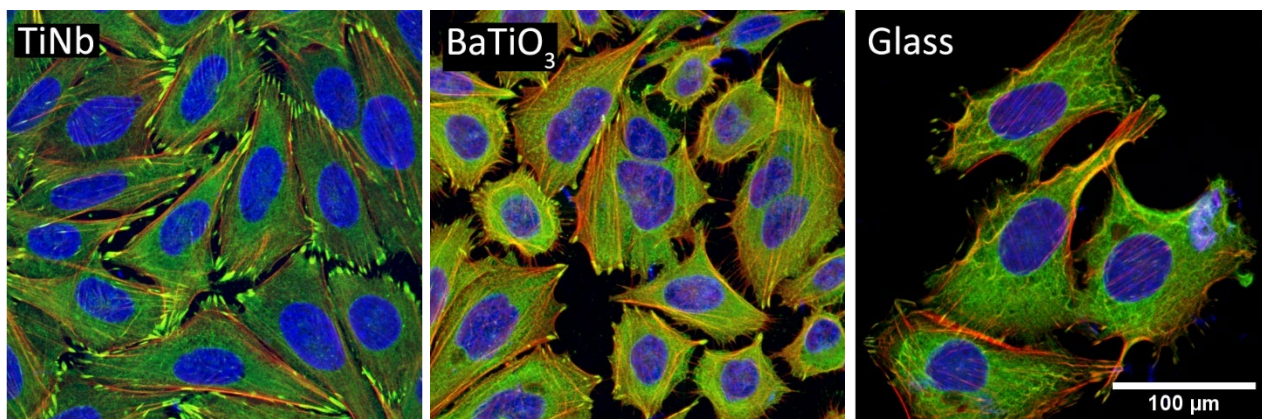


Obr. 5. Lidské osteoblasty linie MG-63 za 1 den po nasazení na vrstvu silikalitu-1, vyvíjenou ve spolupráci s **Heyrovského ústavem fyzikální chemie AV ČR (dr. Ivan Jirka)** pro pokryv kovových kostních implantátů. Obrázek ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) při původním zvětšení 750x (A), 2700x (B) and 9000x (C).

Vybrané publikace se vztahem k tématu:

- **Brož A**, Jirka I, Matějka R, Štěpanovská J, **Doubková M**, Sajdl P, Drahokoupil, J, Volochanskyi O, **Futóová T**, **Bačáková L**. Surface modifications of a silicalite film designed for coating orthopaedic implants. **Materials and Design** 2022, 224, 111373. doi: 10.1016/j.matdes.2022.111373.
- **Nemcakova I**, Jirka I, **Doubkova M**, **Bacakova L**. Heat treatment dependent cytotoxicity of silicalite-1 films deposited on Ti-6Al-4V alloy evaluated by bone-derived cells. **Scientific Reports** 2020;10(1):9456. doi: 10.1038/s41598-020-66228-x.
- **Doubkova M**, **Nemcakova I**, Jirka I, Brezina V, **Bacakova L**. Silicalite-1 Layers as a Biocompatible Nano- and Micro-Structured Coating: An In Vitro Study on MG-63 Cells. **Materials** (Basel). 2019;12(21):3583. doi: 10.3390/ma12213583.

6. Vrstvy feroelektrické keramiky

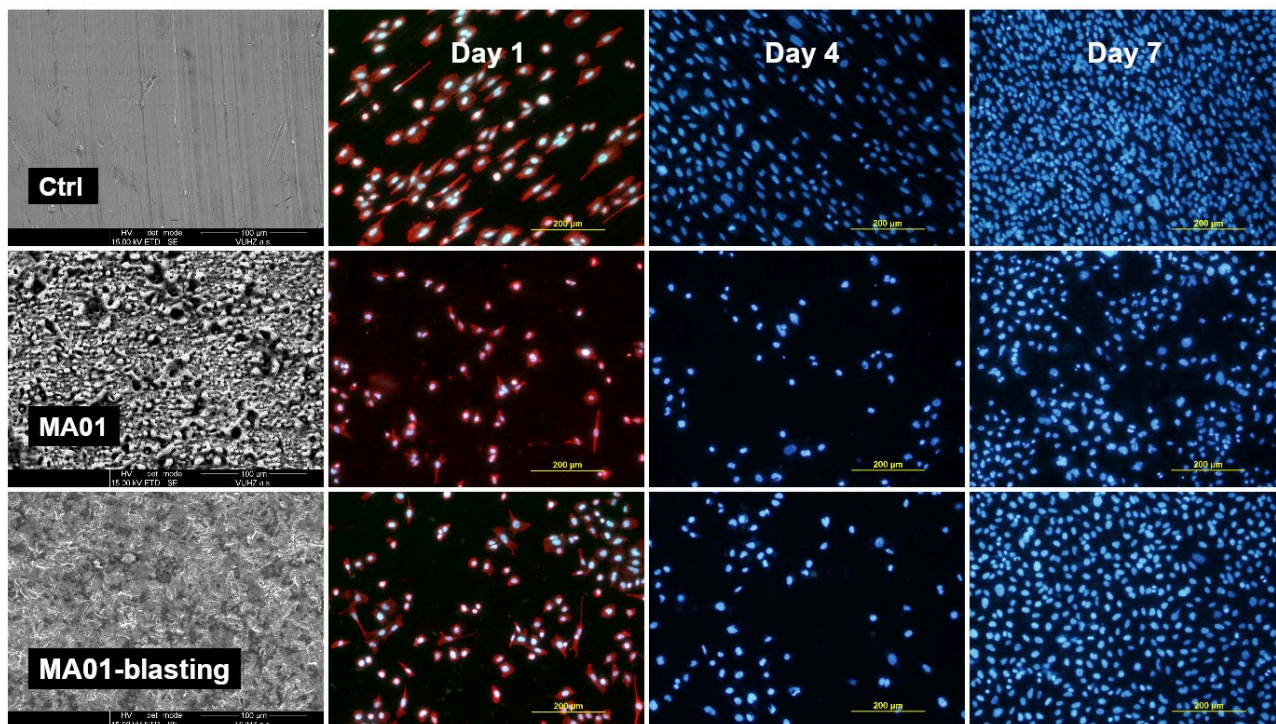


Obr. 6. Lidské osteoblasty linie Saos-2 v kulturách na beta-slitině titanu Ti39Nb pro konstrukci kostních implantátů, pokryté feroelektrickou keramikou BaTiO₃ pro další zlepšení osteointegrace implantátu, a na referenčním mikroskopickém krycím sklíčku (Glass). Imunofluorescence fokálního adhezního proteinu vinkulinu (zeleně), aktinový cytoskelet dobarven červeně a jádra buněk modře. Spolupráce s **Fyzikálním ústavem AVČR (dr. Přemysl Vaněk)** a **Fakultou strojní ČVUT (dr. Zdeněk Tolde, doc. Ladislav Cvrček)**.

Vybrané publikace se vztahem k tématu:

Vandrovcova, M.; Tolde, Z.; Vanek, P.; Nehasil, V.; Doubkova, M.; Travnickova, M.; Drahokoupil, J.; Buixaderas, E.; Borodavka, F.; Novakova, J.; Bacakova L. Beta-Titanium Alloy Covered by Ferroelectric Coating–Physicochemical Properties and Human Osteoblast-Like Cell Response. **Coatings** 2021, 11, 210. doi: [10.3390/coatings11020210](https://doi.org/10.3390/coatings11020210).

6. Oxidické vrstvy po regulaci stupně adheze a růstu buněk



Obr. 7. Lidské osteoblasty linie Saos-2 za 1, 4 a 7 dnů po nasazení na kontrolní nemedifikovanou slitinu Ti-6Al-4V (Ctrl), užívanou v klinické praxi pro implantaci do kostí, a na tutéž slitinu modifikovanou mikroobloukovou oxidací (MAO1). Vlivem vysoké smáčivosti a mikrodrsnosti vniklé oxidické vrstvy je snížena adheze a růstu buněk, což je vhodné pro dočasné implantáty, u nichž není požadována pevná osteointegrace. Odstraněním svrchní části oxidické vrstvy (MAO1-blasting) se adheze a růst buněk vrací prakticky k normálu. Spolupráce s **Centrem nanotechnologií, Vysoká škola báňská-Technická univerzita Ostrava (VŠB-TUO; dr. Roman Gabor, prof. Jana Seidlerová).**

Publikace:

Gabor R, **Doubkova M**, Gorosova S, Malanik K, **Vandrovcova M**, Cvrcek L, Drobikova K, Mamulova Kutlakova K, **Bacakova L.** Preparation of highly wettable coatings on Ti-6Al-4V ELI alloy for traumatological implants using micro-arc oxidation in an alkaline electrolyte. **Scientific Reports** 2020;10(1):19780. doi: 10.1038/s41598-020-76448-w.

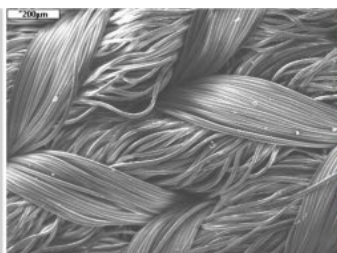
7. Fibrinové vrstvy po modifikaci biomateriálů

Zajímavým přístupem k modifikaci biomateriálů, který používáme zejména u materiálů polymerních, je nanosení vrstev fibrinu, a to částečnou simulací procesu hemokoagulace *in vitro* – tuto technologii jsme si osvojili ve **spolupráci s ÚMCH AV ČR (dr. Eduard Brynda, dr. Tomáš Riedel)**. Předpokládáme, že fibrinogen, prekursor fibrinu, by mohl být izolován

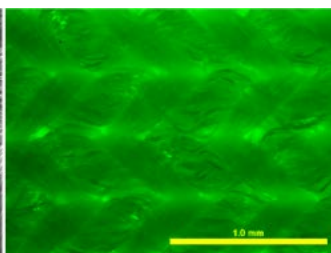
v rozumném množství z krve pacienta - příjemce tkáňové náhrady, a použit v autologní podobě, například pro endotelizaci polymerních cévních náhrad:



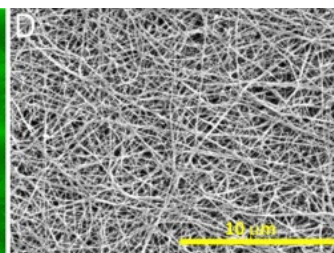
Pletená cévní protéza vyrobená z PET v podniku VUP Medical a.s., Brno



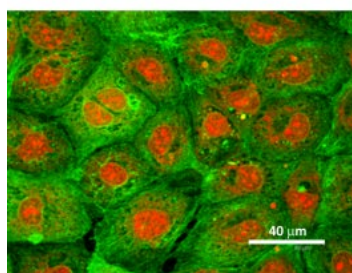
Její vnitřní povrch je drsný a vysoce hydrofobní nevhodný k adhezi buněk



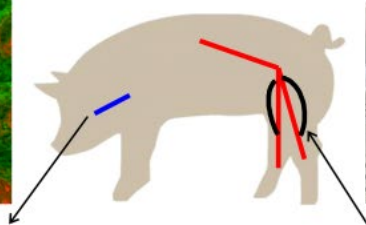
Modifikace vnitřního povrchu protézy nanesením vrstvy fibrinu



Detail vrstvy nanovláken fibrinu ve skenovacím elektron. mikroskopu



Vrstva autologního endotelu z jugulární žíly miniprasete



Protéza endotelizována v dynamickém kultivačním systému, implantována minipraseti (IKEM, dr. Jaroslav Chlupáč)



Za dnů po implantaci: nemodifikovaná protéza ucpána krevní sraženinou, endotelizovaná protéza je průchodná

Vybrané publikace se vztahem k tématu:

- **Bačáková L, Chlupáč J, Filová E, Musílková J, Tomšů J, Wu YC, Svobodová L, Pražák Š, Brož A.** Vascular Damage and Repair - Are Small-Diameter Vascular Grafts Still the "Holy Grail" of Tissue Engineering? *Physiol Res.* 2024;73(Suppl 1):S335-S363. doi: 10.33549/physiolres.935294.
- **Chlupac J, Matejka R, Konarik M, Novotny R, Simunkova Z, Mrazova I, Fabian O, Zapletal M, Pulda Z, Lipensky JF, Stepanovska J, Hanzalek K, Broz A, Novak T, Lodererova A, Voska L, Adla T, Froncek J, Rozkot M, Forostyak S, Kneppo P, Bacakova L, Pirk J.** Vascular Remodeling of Clinically Used Patches and Decellularized Pericardial Matrices Recellularized with Autologous or Allogeneic Cells in a Porcine Carotid Artery Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3310. doi: 10.3390/ijms23063310.
- **Filova E, Steinerova M, Travnickova M, Knitlova J, Musilkova J, Eckhardt A, Hadraba D, Matejka R, Prazak S, Stepanovska J, Kucerova J, Riedel T, Brynda E, Lodererova A, Honsova E, Pirk J, Konarik M, Bacakova L.** Accelerated in vitro recellularization of decellularized porcine pericardium for cardiovascular grafts. *Biomed Mater.* 2021;16(2):025024. doi: 10.1088/1748-605X/abbdbd.