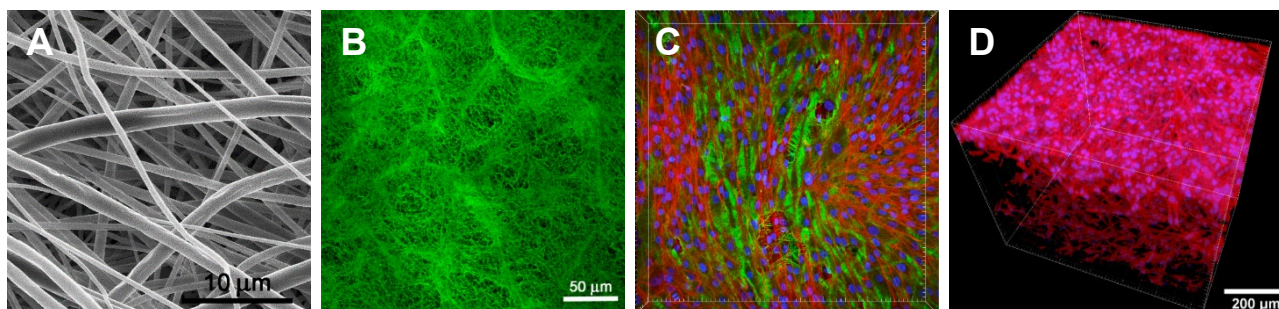


Konstrukce zcela nových tkáňových náhrad na bázi syntetických i přírodních biomateriálů a buněk

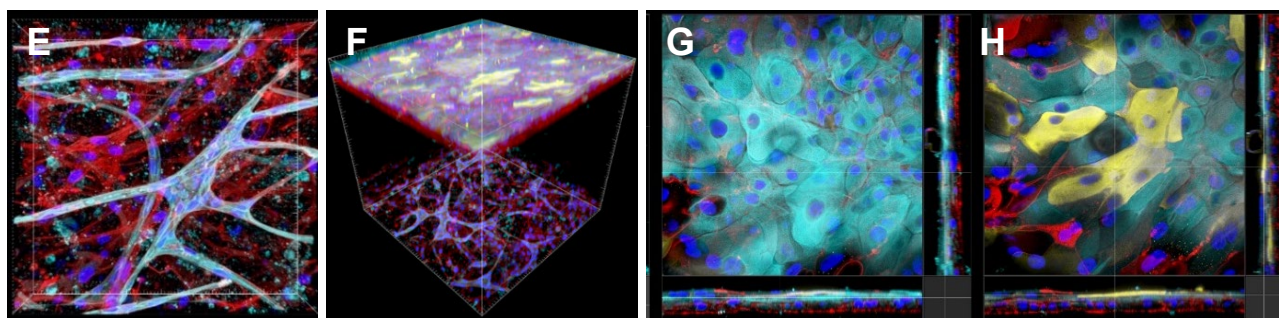
1. Pre-vaskularizovaný konstrukt tkáně *in vitro*

Základem zcela nových tkáňových náhrad vytvářených metodami moderního tkáňového inženýrství je pre-vaskularizovaný konstrukt tkáně *in vitro*, který pak může být dále vyvíjen směrem ke **kůži**, **cévní stěně** či **osteochondrálnímu rozhraní**.

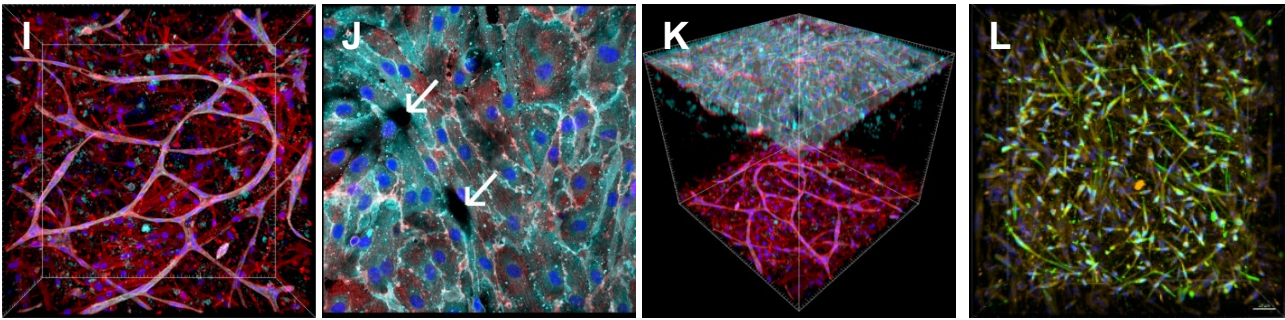
Do jisté míry univerzální prevaskularizovaný tkáňový konstrukt je vytvořen následovně:



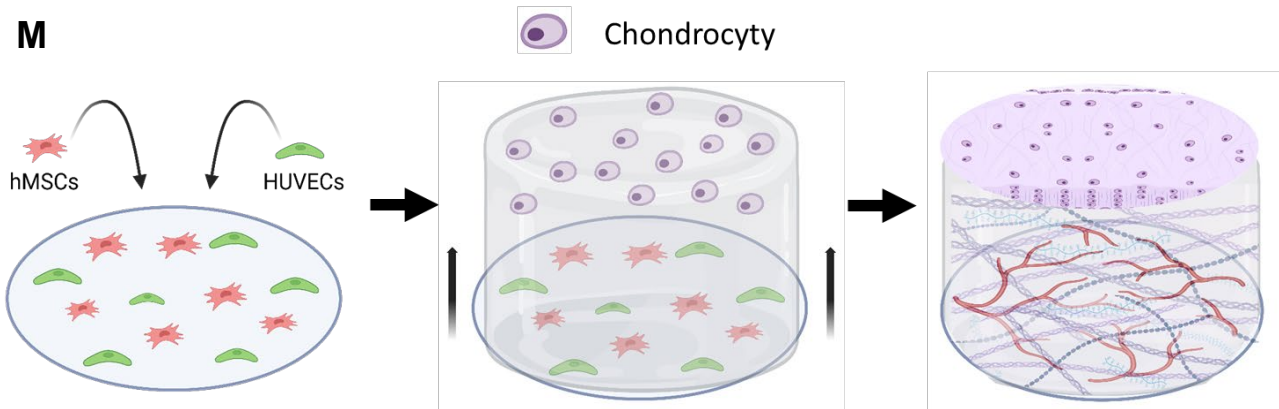
Nanovláknenná membrána, připravená metodou elektrostatického zvlákňování (elektrospinningu) ze syntetického degradovatelného polymeru, např. PLA, PLGA či PCL, získaná **ve spolupráci s TUL Liberec či ÚMCH AV ČR (A)**, je dále modifikována vrstvou fibrinu či fibronektinu (**B**), aby se zvýšila její atraktivita pro adhezi buněk. Je osazena mezenchymálními kmenovými buňkami tukové tkáně (ASC), relativně snadno dostupnými liposukcí (**C**). Po dosažení subkonfluency je vrstva ASC překryta hydrogelem na bázi kolagenu, do něhož následně ASC migrují a osídlují ho v celém jeho objemu (**D**).



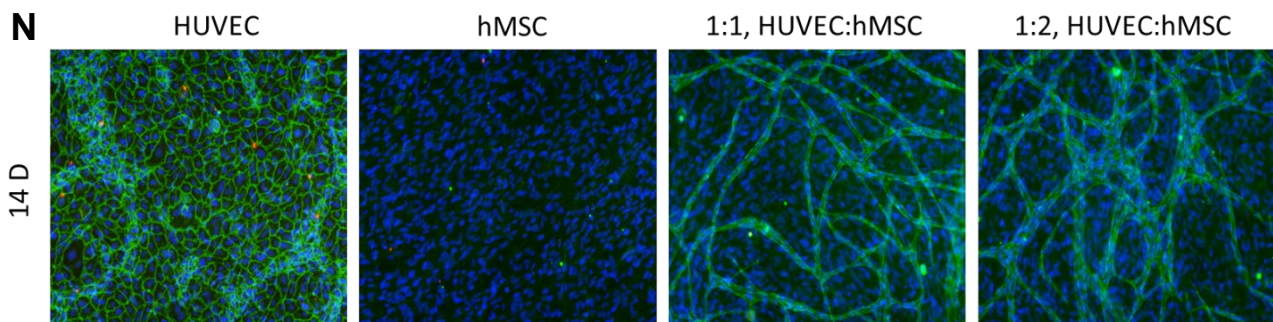
Pokud jsou do kolagenního hydrogelu přimísены endotelové buňky, například lidské endotelové buňky pupečnickové žíly (HUVEC), vytvářejí spontánně rozvětvené tubulární útvary podobné kapilárám, ke kterým se některé ASC zvnějšku přikládají na způsob pericytů (**E**). Osadíme-li povrch kolagenního hydrogelu keratinocyty (**F**), získáme konstrukt simulující epidermis a pre-vaskularizovanou dermis, neboť ASC jsou buňky fenotypicky blízké fibroblastům, a mohou v ně být i dále diferencovány. Keratinocyty pak mohou být přenesením na rozhraní médium-vzduch diferencovány ve stratifikovanou vrstvu podobnou fyziologické epidermis, kde se fenotypická maturace keratinocytů posouvá od relativně nezralých bazálních keratinocytů, charakterizovaných imunofluorescencí cytokeratinu 14 (**G**, tyrkysová), až k diferencovaným keratinocytům s cytokeratinem 10 (**H**, žlutá).



Pokud však neosadíme včas povrch konstruktu keratinocyty, vyústí nám pre-kapiláry (I) na jeho povrch (J, šípky) a endotelové buňky se po něm rozrostou v konfluentní vrstvu (K). Získáme tak konstrukt připomínající cévní stěnu, tj. komplex tunica intima a media, neboť ASC mohou být vhodným složením kultivačního média poměrně snadno diferencovány směrem k hladkým svalovým buňkám, charakterizovaným imunofluorescencí kalponinu-1 a SM1a SM2 myosinu (L). Tyto konstrukty by bylo možno využít jako cévní záplaty, nebo po jejich srolování do trubiček či vytvoření přímo v nanovláknenných trubičkách jako cévní náhrady malého průměru, které v klinické praxi dosud chybí.



Konstrukt lze přizpůsobit i pro simulaci osteochondrálního rozhraní, tj. oblasti, kde přechází kost v kloubní chrupavku. Na nanovláknennou membránu jsou nasazeny lidské mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně (hMSC) a endotelové buňky HUVEC. Po dosažení subkonfluencie jsou buňky překryty hydrogelem obsahujícím kolagen a kyselinu hyaluronovou, do něhož jsou přimíseny lidské chondrocyty (M). HUVEC společně s hMSC vytvářejí pre-kapilární síť (N). Pokud jsou buňky exponovány osteogennímu médiu, diferencují hMSC směrem k osteoblastům. Přítomnost chondrocytů podporuje osteogenní diferenciaci hMSC (expresi kolagenu I a alkalické fosfatázy), a zároveň přítomnost hMSC podporuje fenotypickou maturaci chondrocytů (produkce chondrogenního proteinu SOX9).

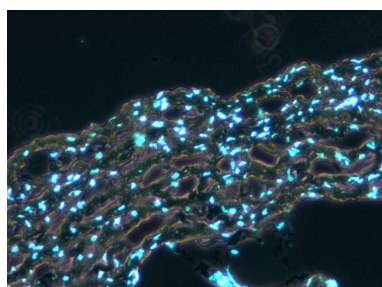


Vybrané související publikace:

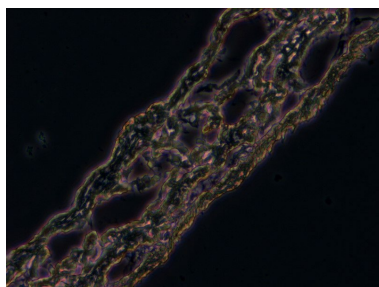
- **Bacakova M, Pajorova J, Broz A**, Hadraba D, Lopot F, Zavadakova A, Vistejnova L, Beno M, Kostic I, Jencova V, **Bacakova L**. A two-layer skin construct consisting of a collagen hydrogel reinforced by a fibrin-coated polylactide nanofibrous membrane. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5033-5050. doi: 10.2147/IJN.S200782.
- **Travnickova M, Pajorova J, Zarubova J, Krocilova N**, Molitor M, **Bacakova L**. The Influence of Negative Pressure and of the Harvesting Site on the Characteristics of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells from Lipoaspirates. *Stem Cells Int*. 2020;2020:1016231. doi: 10.1155/2020/1016231.
- **Molitor M, Trávníčková M**, Měšťák O, Christodoulou P, **Sedlár A, Bačáková L**, Lucchina S. The Influence of Low- and High-Negative-Pressure Liposuction and Different Harvesting Sites on the Viability and Yield of Adipocytes and Other Nucleated Cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2021 45(6):2952-2970. doi: 10.1007/s00266-021-02396-z. IF= 2.708, Q2 (2021)
- **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.
- **Filova E**, Supova M, Eckhardt A, Vrbacky M, Blanquer A, **Travnickova M, Knitlova J**, Suchy T, Ryglova S, Braun M, Burdikova Z, Schätz M, Jencova V, Lisnenko M, Behalek L, Prochazkova R, Sedlacek R, Kubasova K, **Bacakova L**. Adipose-Derived Stem Cells in Reinforced Collagen Gel: A Comparison between Two Approaches to Differentiation towards Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5692. doi: 10.3390/ijms24065692.
- **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.
- Klimek K, Benko A, **Vandrovcova M, Travnickova M**, Douglas TEL, Tarczynska M, **Broz A**, Gaweda K, Ginalska G, **Bacakova L**. Biomimetic biphasic curdlan-based scaffold for osteochondral tissue engineering applications - Characterization and preliminary evaluation of mesenchymal stem cell response in vitro. *Biomater Adv. (formerly Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.)* 2022; 135:212724. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.212724

2. Tkáňové náhrady založené na decelularizovaných maticích

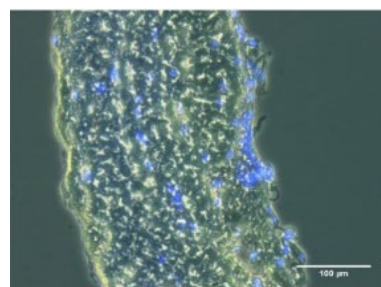
K vaskulárnímu tkáňovému inženýrství využíváme i decelularizované matrice, například z perikardu, podkožních či pupečnickových žil (**spolupráce s IKEM**, dr. Jaroslav Chlupáč):



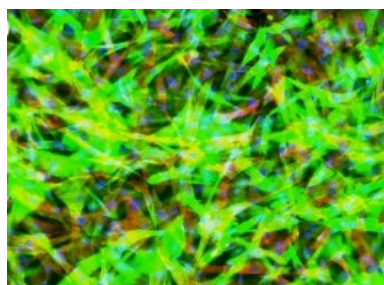
Nativní perikard



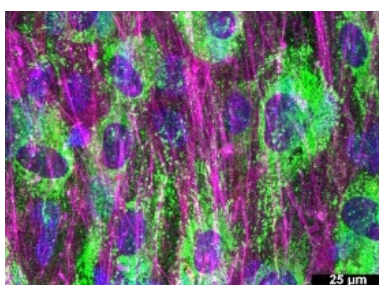
Perikard decelularizovaný pomocí SDS, DNázy a dynamického systému



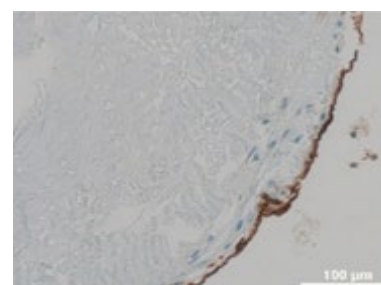
Perikard recelularizovaný kmenovými buňkami tukové tkáně (ASC)



ASC diferencovány směrem k hladkým svalovým buňkám cévní stěny (červeně alfa-aktin, zeleně kalponin-1, modře jádra)



Povrch perikardu následně osazen endotelovými buňkami (zeleně von Willebrandův faktor, fialově F-aktin, modře jádra)



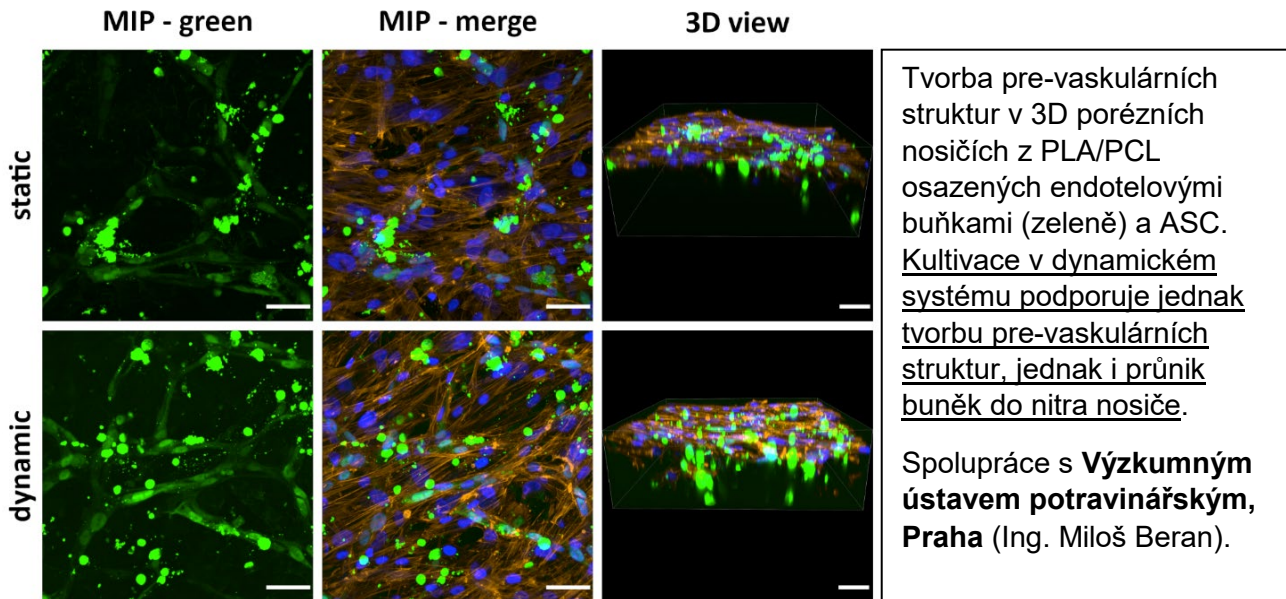
Boční pohled na konstrukt s vrstvou endotelu barvící se pozitivně na CD31. Konstrukt lze využít pro cévní záplaty.

Vybrané související publikace:

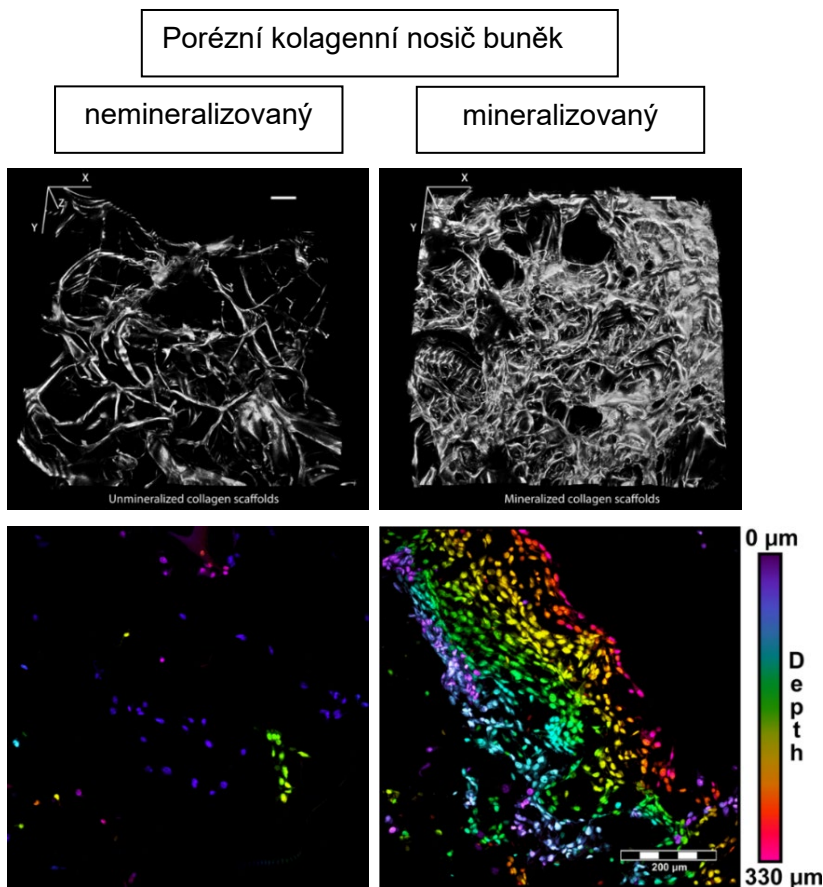
- **Chlupac J**, Matejka R, Konarik M, Novotny R, Simunkova Z, Mrazova I, Fabian O, Zapletal M, Pulda Z, Lipensky JF, Stepanovska J, Hanzalek K, **Broz A**, Novak T, Lodererova A, Voska L, Adla T, Fronek J, Rozkot M, Forostyak S, Kneppo P, **Bacakova L**, Pirk J. Vascular Remodeling of Clinically Used 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/abdbdb.
- **Matějka, R.**, Koňářík, M., **Štěpanovská, J.**, Lipenský, J., **Chlupáč, J.**, Turek, D., **Pražák, Š.**, **Brož, A.**, Šimůnková, Z., Mrázová, I., Forostyak, S., Kneppo, P., Rosina, J., **Bačáková, L.**, Pirk, J. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Applied Sciences-Basel*. 2020, 10(16), 5473. ISSN 2076-3417. DOI: 10.3390/app10165473.

3. Tkáňové náhrady založené na 3D porézních polymerních nosičích

K inženýrství měkkých i tvrdých tkání využíváme i porézní polymerní nosiče buněk, v nichž lze navodit i vaskularizaci:



Mineralizace porézních nosičů buněk zlepšuje průnik buněk do jejich nitra:



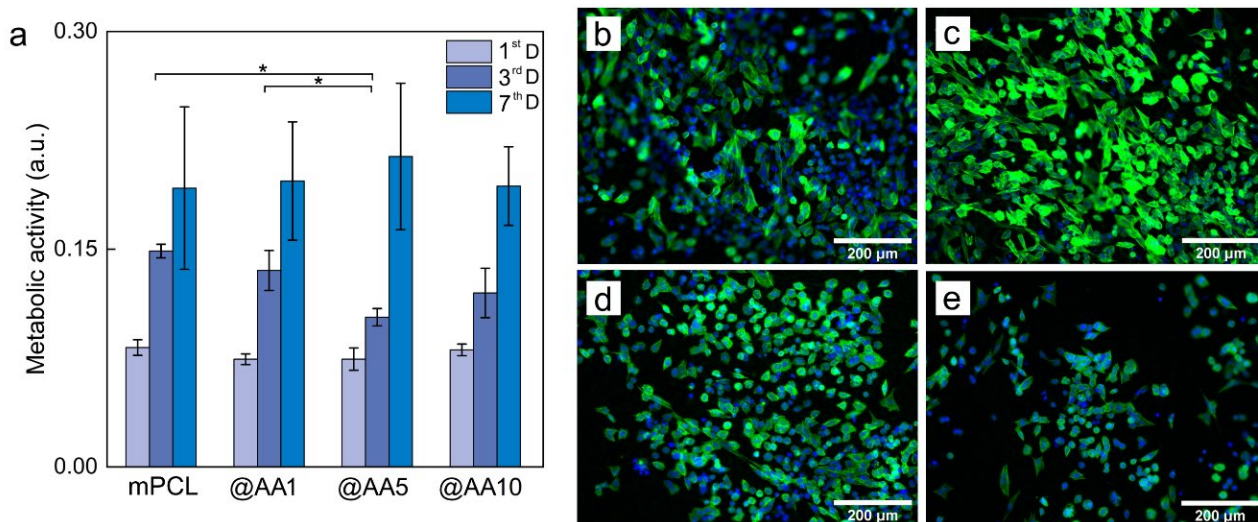
Spolupráce s **Výzkumným ústavem potravinářským, Praha** (Ing. Miloš Beran)

Publikace:

Bacakova L, Novotna K, Hadraba D, Musilkova J, Slepicka P, Beran M. Influence of Biomimetically Mineralized Collagen Scaffolds on Bone Cell Proliferation and Immune Activation. **Polymers** (Basel). 2022; 14(3):602. doi: 10.3390/polym14030602.

4. Kompozity polymerů s magnetickými nanočásticemi

Zajímavými materiály jsou i kompozity syntetického degradabilního polymeru (PCL) s uhlíkovými a magnetickými nanočásticemi, které by bylo možno využít jak k odstranění kostních nádorů (pomocí fototermální terapie), tak i k následné regeneraci kostní tkáně na stejném materiálu, již neozařovaném infračervenými paprsky (spolupráce s **ÚMCH AV ČR**, Dr. Daniel Horák, dr. Malgorzata Swietek):



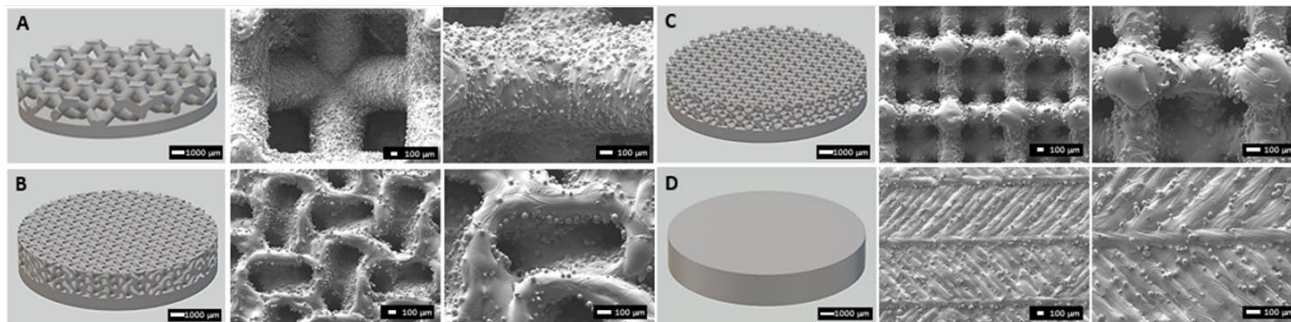
Metabolická aktivita (a) a morfologie lidských osteoblastů linie Saos-2 (b-e) na nosičích z PCL s magnetickými nanočásticemi a různými koncentracemi kyseliny askorbové (AA), která má protinádorové a osteogenní účinky.

Publikace: Hlukhaniuk A, Świątek M, Patsula V, Hodan J, Janoušková O, Bystrianský L, **Brož A, Malič M, Zasoňka B, Tokarz W, Bačáková L, Horák D.** Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Composites Modified With Polymer-Grafted Magnetic Nanoparticles and L-Ascorbic Acid for Bone Tissue Engineering. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2024;112(9):e35480. doi: 10.1002/jbm.b.35480.

5. 3D tištěné kovové implantáty

Pracujeme i s 3D tištěnými kovovými kostními implantáty (Ti-6Al-4V), získanými ve spolupráci s firmou **Prospan s.r.o., Kladno** (dr. Zdeněk Čejka), a **Fakultou strojní ČVUT, Praha** (doc. Ladislav Cvrček), s různou strukturou povrchové části implantátu:

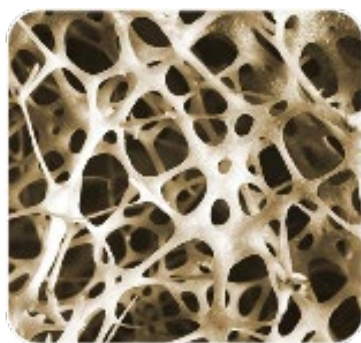
hrubý ← kosočtverečný trabekulární dvanáctistěn → jemný



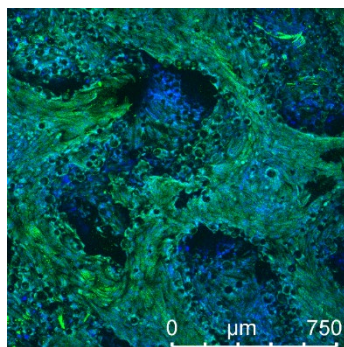
Gyroidní struktura

2D tištěný - sytký materiál

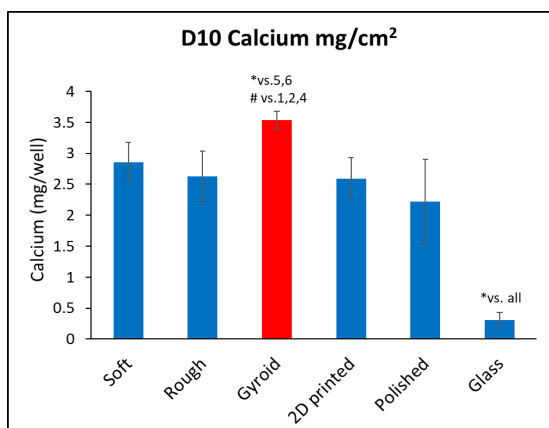
Jako nejvýhodnější se jeví gyroidní struktura, neboť se podobá trabekulární (tj. houbovitě, spongiózní) kostní tkáni:



Trabekulární struktura kostní tkáně



Materiál s gyroidní strukturou, osídlený lidskými osteoblasty linie Saos-2, produkujícími osteocalcin



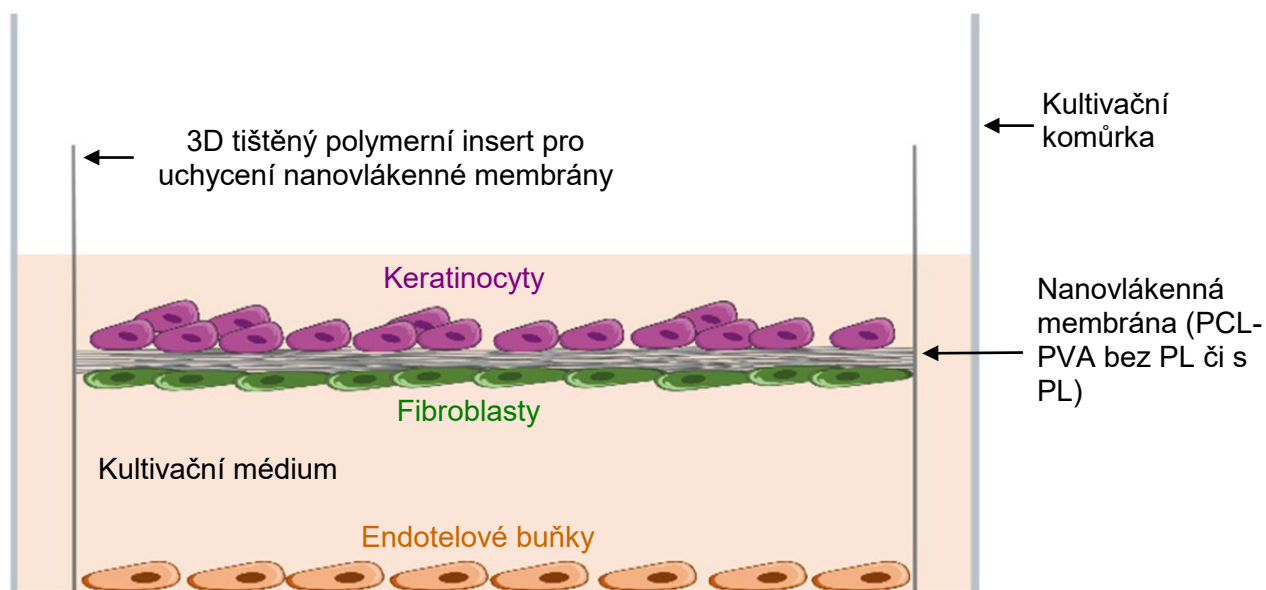
Mineralizace kultur buněk Saos-2 je nejvyšší na materiálu s gyroidní strukturou

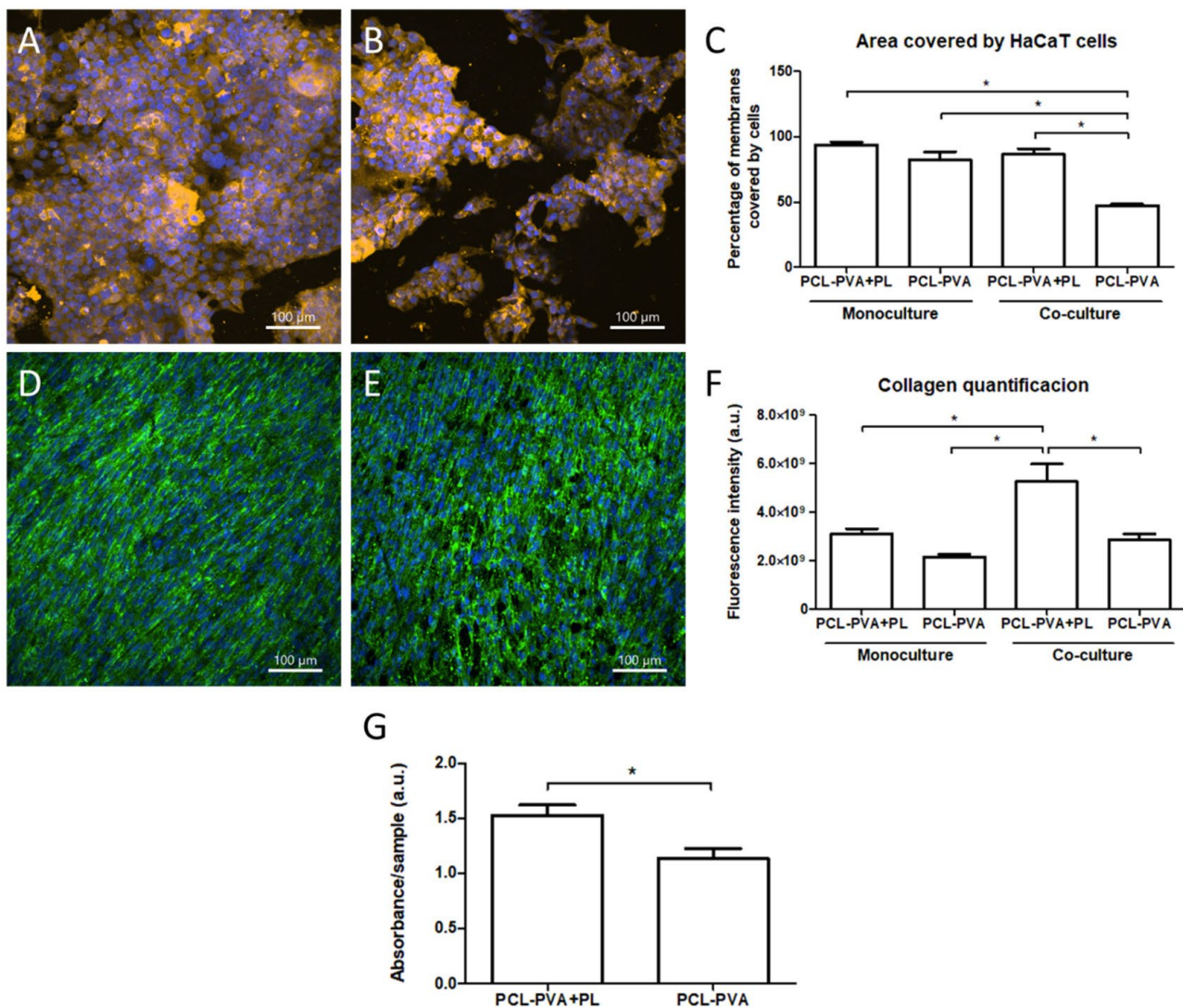
Související publikace:

- Cvrček L, Krčil J, **Musílková J, Musílková V, Bačáková L**, Nehasil V, Denk F, Čejka Z. Nanostructured TiNb coating improves the bioactivity of 3D printed PEEK. **Materials and Design**. 2022, **224**(Dec), 111312. ISSN 0264-1275. E-ISSN 1873-4197. doi: [10.1016/j.matdes.2022.111312](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111312).
- Gabor R, Cvrček L, **Doubková M**, Nehasil V, Hlinka J, Unucka P, Buřil M, Podepřelová A, Seidlerová J, **Bačáková L**. Hybrid coatings for orthopaedic implants formed by physical vapour deposition and microarc oxidation. **Materials & Design** 219 (2022) 110811, doi: [10.1016/j.matdes.2022.110811](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110811).

6. „Inteligentní nanovláknenné kryty ran

Velká pozornost je věnována i **novým „inteligentním“ nanovláknenným krytům ran** dodávajícím buňky a léčiva pro aktivní hojení chronických ran, zejména diabetických. Vyvinuli jsme následující kokultivační systém pro základní 3 typy buněk obsažených v kůži, a sice keratinocyty, fibroblasty a endotelové buňky (spolupráce s **TUL Liberec, ÚMCH AV ČR**):





Lidské epidermální keratinocyty (A, B) a dermální fibroblasty (D, E) v kokultúrách na nanovlákných membránách ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a polyvinylalkoholu (PVA) buď obsahujících destičkový lysát (PL) (A, D) nebo bez PL (B, E). Buňky byly dále kokultivovány s lidskými endotelovými buňkami, nasazenými na dně kultivační komůrky. Je zřejmé, že jak přítomnost destičkového lysátu, tak kokultivace s endotelovými buňkami podporuje vytváření souvislé vrstvy keratinocytů (C), produkci kolagenu fibroblasty (F) i metabolickou aktivitu obou typů buněk (G).

Související publikace:

- **Blanquer A**, Kostakova EK, **Filova E**, Lisnenko M, **Broz A**, Mullerova J, Novotny V, Havlickova K, Jakubkova S, Hauzerova S, Heczko B, Prochazkova R, **Bacakova L**, Jencova V. A novel bifunctional multilayered nanofibrous membrane combining polycaprolactone and poly (vinyl alcohol) enriched with platelet lysate for skin wound healing. **Nanoscale**. 2024;16(4):1924-1941. doi: 10.1039/d3nr04705a.
- Táborská J, **Blanquer A**, Brynda E, **Filová E**, Stiborová L, Jenčová V, Havlíčková K, Riedelová Z, Riedel T. PLCL/PCL Dressings with Platelet Lysate and Growth Factors Embedded in Fibrin for Chronic Wound Regeneration. **Int J Nanomedicine**. 2023;18:595-610. doi: 10.2147/IJN.S393890.
- Filova E, **Blanquer A**, **Knitlova J**, **Plencner M**, Jencova V, Koprivova B, Lisnenko M, Kostakova EK, Prochazkova R, **Bacakova L**. The Effect of the Controlled Release of Platelet Lysate from PVA Nanomats on Keratinocytes, Endothelial Cells and Fibroblasts. **Nanomaterials** (Basel). 2021;11(4):995. doi: 10.3390/nano11040995.

- **Blanquer A, Musilkova J, Filova E, Taborska J, Brynda E, Riedel T, Klapstova A, Jencova V, Mullerova J, Kostakova EK, Prochazkova R, Bacakova L.** The Effect of a Polyester Nanofibrous Membrane with a Fibrin-Platelet Lysate Coating on Keratinocytes and Endothelial Cells in a Co-Culture System. **Nanomaterials** (Basel). 2021;11(2):457. doi: 10.3390/nano11020457.