

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

# Dizertační práce

Praha, 2020

**Ing. Roman Matějka**

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



## Dizertační práce

**Autonomní systém pro udržení biofyzikálních podmínek potřebných pro kultivaci  
biologických kultur in vitro**

*V aplikaci pro kardiovaskulární náhrady*

**Autonomous system for maintaining the biophysical conditions required for culturing  
biological cultures in vitro**

*In application for cardiovascular replacements*

Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 10.8.2020

Ing. Roman Matějka

Identifikační záznam:

**Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.**

MATĚJKA, Roman. *Autonomní systém pro udržení biofyzikálních podmínek potřebných pro kultivaci biologických kultur in vitro. [Autonomous system for maintaining the biophysical conditions required for culturing biological cultures in vitro]*. Praha, 2020. 81 s, 11 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky a lékařské informatiky. Vedoucí práce Rosina, Jozef.

**Klíčová slova:** Bioreaktory, decelularizace, dynamické kultivační systémy, kardiovaskulární náhrady, kompresní namáhání, rekolonizace buňkami, smykové napětí

**Keywords:** Bioreactors, decellularization, dynamic culture systems, cardiovascular replacements, compressive stress, cell recolonization, shear stress

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Jozefu Rosinovi, Ph.D., MBA. za jeho vedení a pomoc při realizaci dizertační práce.

Dále bych rád poděkoval prof. Ing. Peteru Kneppovi, DrSc. za možnost realizace technických řešení v laboratořích Fakulty biomedicínského inženýrství, ČVUT v Praze, a doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za její cenné rady v oblasti tkáňového inženýrství a možnost realizace buněčných experimentů na odd. Biomateriálů a tkáňového inženýrství, Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i..

Velmi rád bych též poděkoval své přítelkyni Janě, za podporu a trpělivost v průběhu mého studia a realizace této práce.

Tato vznikla za podpory projektů Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-29153A, NV18-02-00422 a NV19-02-00068, dále projektu GAUK 637712 a projektu „BIOCEV“ CZ.1.05/1.1.00/02.0109.

## Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění patří celosvětově mezi hlavní příčiny úmrtí. Operační techniky, zahrnující přemostění, nahrazení nebo plastiku poškozené tkáně, potřebují vhodné štěpy pro tyto operace. Ideálním zdrojem jsou autologně získané štěpy, které však vyžadují další invazivní přístup a není jich dostatek nebo nevyhovují z hlediska anatomie. Alogenní štěpy ze zemřelých dárců nejsou ihned k dispozici pro akutní zásahy. Syntetické náhrady vykazují dobré výsledky u velkých tepen, ovšem v pro náhradu cév malého průměru dochází k jejich restenózám a mnohdy vyžadují další reoperaci. Využití metod tkáňového inženýrství pro modifikaci těchto náhrad osídlením pomocí buněk může poskytnout lepší výsledky. Dále decelularizované xenogenní tkáně jsou slibné matrice pro vývoj tkáňově upravených kardiovaskulárních štěpů. Díky decelularizaci je minimalizován jejich imunogenní komplex při zachování vhodné stavební struktury. V kombinaci s rekolonizací vhodnými buňkami za pomoci kultivačních bioreaktorů mohou vzniknout nové funkční kardiovaskulární náhrady. Klíčovými prvky při vytvoření kardiovaskulárních náhrad je endotelizace vnitřního lumenu. Vliv smykového napětí simulovaného v bioreaktoru má pozitivní vliv na modulaci růstu endotelu v kombinaci s vhodným substrátem. Buňky hladkého svalu zase vytvářejí mechanickou oporu a zajišťují vazokonstrikci a vazodilataci. Hydrodynamická stimulace tlakem a natažením podporuje proliferaci hladkého svalu, příp. diferenciaci kmenových a stromálních buněk do fenotypu hladkého svalu. V rámci práce byly vytvořeny systémy pro automatizovanou decelularizaci tkání a systémy pro dynamickou kultivaci buněk zajišťující stimulaci pomocí smykového napětí a cyklické tlakové stimulace. Tyto stimulace prokazatelně podporovaly fenotypickou maturaci buněk, jejich proliferaci a diferenciaci. Na základě výsledků byla vytvořena optimalizovaná procedura, jež využívala navržené technologie pro přípravu rekolonizovaných kardiovaskulárních záplat na bázi decelularizovaného prasečího a ovčího perikardu, jež byly osídleny autologními stromálními buňkami z tukové tkáně. Vlivem mechanické stimulace došlo k homogenní rekolonizaci decelularizované tkáně za 5 dní a byla nastartována diferenciací stromálních buněk směrem k hladkému svalu. Takto připravené záplaty byly implantovány na umělý defekt *a. carotis*. Po explantaci a histologické analýze bylo prokázáno, že u rekolonizovaných záplat vznikla nova endotelová vrstva již po 1 měsíci.

**Klíčová slova:** Bioreaktory, decelularizace, dynamické kultivační systémy, kardiovaskulární náhrady, kompresní namáhání, rekolonizace buňkami, smykové napětí

## **Abstract**

Cardiovascular disease is one of the leading causes of death worldwide. Surgical techniques, including bridging, replacing, or plasticizing damaged tissue, need suitable grafts for these operations. The ideal source is autologously obtained grafts, which, however, require another invasive approach, and there are not enough of them, or they do not meet the optimal anatomical form. Allogeneic grafts from cadaveric donors are not immediately available for acute interventions. Synthetic replacements show good results in large arteries, but restenosis occurs in small diameter vessels and often require further reoperation. The use of tissue engineering methods to modify these replacements by cell colonization may provide their better patency. Furthermore, decellularized xenogeneic tissues are promising matrices for the development of tissue-engineered cardiovascular grafts. Due decellularization the immunogenic complex is minimized while maintaining a suitable building structure. In combination with recolonization with suitable cells using culture bioreactors, new functional cardiovascular replacements can be created. Endothelialization of the inner lumen is a crucial element in the formation of cardiovascular replacements. The effect of shear stress simulated in the bioreactor has a positive effect on the modulation of endothelial growth in combination with a suitable substrate. Smooth muscle cells, create mechanical support and provide vasoconstriction and vasodilation. Hydrodynamic stimulation by pressure and stretching supports the proliferation of smooth muscles, or differentiation of stem and stromal cells into a smooth muscle cell phenotype. These simulations have been shown to promote phenotypic cell maturation, proliferation and differentiation. Based on the results, an optimized procedure was created, which used the proposed technologies for the preparation of recolonized cardiovascular patches based on decellularized porcine and ovine pericardium, that were recolonized by autologous stromal cells from adipose tissue. Due to mechanical stimulation, decellularized tissue was homogeneously recolonized in 5 days and also stromal cell differentiation towards smooth muscle was maintained. These prepared patches were implanted on an artificial defect of the carotid artery in animal model. After explantation and histological analysis, it was shown that a new endothelial layer formed in the recolonized patches after only 1 month.

**Keywords:** Bioreactors, decellularization, dynamic culture systems, cardiovascular replacements, compressive stress, cell recolonization, shear stress

## Seznam symbolů a zkratk

ANOVA	Analýza rozptylu
ASC	Mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně
BMP-4	Kostní morfogenetický protein 4
CA	Kalifornie
CD31	Diferenční marker endotelu
CNF	Fibrilární nanocelulóza
CNT	Uhlíkové nanotrubičky
Co	Kolagen
Co/FN	Kolagen s navázaným fibronektinem
Co/LM	Kolagen s navázaným lamininem
dH <sub>2</sub> O	Destilovaná voda
EC	Endotelové buňky
ECM	Extracelulární hmota
EPC	Endoteliální progenitorové buňky
FAK	Fokální adhezivní kináza
GA	Georgia
HSVEC	lidské endotelové buňky z <i>v. saphena</i>
LM	Laminin
MWCNT	Vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
NI	National Instruments
NJ	New Jersey
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Polykaprolakton
pCO <sub>2</sub>	Parciální tlak oxidu uhličitého
PGA	Kyselina polyglykolová
PGS	poly-(glycerol-sebakát)
PLA	Kyselina poly-mléčná
PLGA	Poly-(laktid-ko-glykolid)
PLLA	Kyselina poly-l-mléčná
pO <sub>2</sub>	Parciální tlak kyslíku
PPFC	Planparalelní desky s úzkou průtočnou šterbinou
PrASC	Mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně prasete
PTFE	Polytetrafluorethylen
PU	Polyurethan
RhoA	Ras homolog family member A
SDS	Dodecylsírán sodný
SM	Hladký sval
SM-1	Izoforma těžkého řetězce myosinu
SM-2	Izoforma těžkého řetězce myosinu
SM22- $\alpha$	Transgelin
SMC	Buňky hladké svaloviny
SW	Software
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
UPS	Nepřerušitelný zdroj energie
VSMC	Buňky hladkého svalstva cév



## Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Stavba cévní stěny.....	10
1.2	Endotel a jeho diferenciaci.....	11
1.2.1	Vliv smykového napětí na endotel a dynamické systémy.....	13
1.3	Buňky hladkého svalstva a jejich diferenciaci.....	14
1.3.1	Mechanické namáhání SMC a dynamické systémy.....	15
1.4	Cévní náhrady.....	18
2	Cíle práce.....	22
2.1	Decelularizace tkání a jejich příprava pro rekolonizaci buňkami.....	22
2.2	Stimulace smykovým napětím pro modulaci růstu endotelových buněk v <i>in vitro</i> podmínkách.....	22
2.3	Stimulace hydrodynamickým tlakem pro modulaci růstu a diferenciaci hladkých svalových buněk v <i>in vitro</i> podmínkách.....	22
2.4	Příprava implantabilních kardiovaskulárních náhrad v bioreaktoru <i>in vitro</i> ...	23
2.5	Implantace připravených náhrad a jejich pilotní testování <i>in vivo</i> .....	23
3	Materiály a metody.....	24
3.1	Systém pro automatizovanou decelularizaci zvířecích planárních a tubulárních tkání	25
3.2	Kultivační komora typu PPFC pro stimulaci pomocí smykového napětí.....	28
3.3	Kultivační systém pro osazení a kultivaci endotelových buněk na decelularizovaných prasečích karotidách a syntetických cévních náhradách.....	31
3.4	Kultivační komora pro tlakovou stimulaci planárních decelularizovaných vzorků.....	32
3.5	Modifikovaná kultivační komora pro tlakovou stimulaci na skle a silikonu ...	33
3.6	Modifikovaná kultivační komora pro tlakovou stimulaci ve standardních kultivačních deskách.....	35
3.7	Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací.....	35
3.8	Metodika buněčných experimentů a analýz.....	39

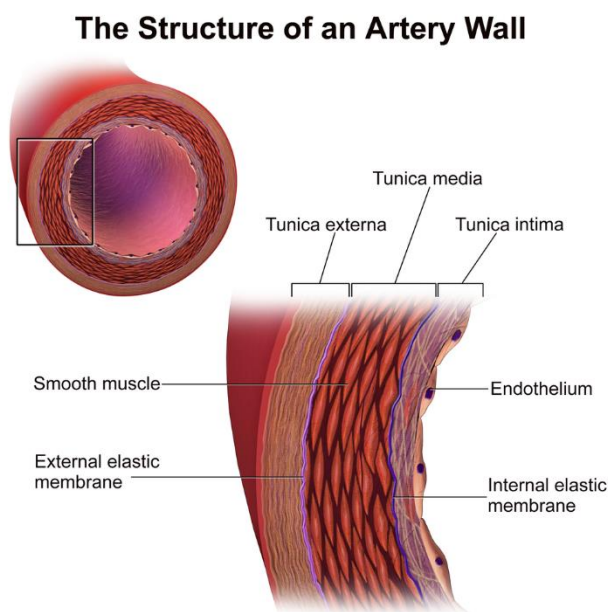
4	Výsledky a diskuze .....	40
4.1	Příprava decelularizovaných tkání .....	40
4.2	Podpora endotelizace povrchů a vliv smykového napětí .....	43
4.3	Vliv tlakové stimulace na proliferaci kmenových a stromálních buněk diferenciaci směrem k hladkému svalu.....	45
4.3.1	Dynamická kultivace na skle a fibrinové síti a nanovlákněném substrátu	45
4.3.2	Dynamická kultivace na decelularizované tkáni .....	50
4.4	Recelularizace decelularizovaných tkání pro přípravu implantabilních cévních náhrad v kultivačním bioreaktoru .....	53
4.4.1	Vliv dynamické kultivace na rekolonizaci decelularizované tkáně pomocí autologních buněk.....	53
4.4.2	Příprava autologně recelularizovaných tkáňových záplat pro kardiovaskulární aplikace .....	57
4.5	<i>In vivo</i> remodelace a endotelizace autologně recelularizovaných kardiovaskulárních záplat .....	59
5	Závěr .....	61
	Seznam obrázků.....	73
	Reference .....	63
	Publikace, užité vzory, kapitoly v knihách .....	77
	Publikace, užité vzory a kapitoly v knihách se vztahem k dizertační práci.....	77
5.1	Další publikace bez přímého vztahu k dizertační práci .....	79
	Přílohy.....	80

# 1 Úvod

Okluzivní arteriální choroby, včetně ischemické choroby srdeční a periferních arteriálních onemocnění, patří mezi nejčastější příčiny úmrtí, jak v České republice, tak i celosvětově. Současné metody obnovy cévního zásobení do postižené tkáně spočívají v angioplastice, umístění stentu nebo přemostěním, tzv. bypassem. Autologní cévy, zvláště *vena saphena magna*, *arteria thoracica interna* a *arteria radialis* představují standard pro náhradu cév malého průměru. V případě nemožnosti jejich použití (např. špatný stav cév pacienta) je možné také využít alogenní nebo xenogenní náhrady, popř. i náhrady z umělých materiálů. Takovéto štěpy vykazují uspokojivě dlouhodobé výsledky pro nahrazení tepen s velkým a středním průměrem, ale při aplikaci na cévy malého průměru, tj. menší než 6 mm, jako jsou koronární tepny, se zvyšuje riziko nežádoucích reakcí. Na poli tkáňového inženýrství se tak v současnosti vyvíjí buněčné náhrady založené na scaffoldech ze syntetického, příp. přírodního polymeru, v některých případech připravovaného z decelularizovaných tkání. Pro vytvoření kvalitní tkáně je nutné použití dynamických kultivačních systémů, jež zajišťují fyziologické podmínky pro proliferaci a diferenciaci buněk tvořících budoucí tkáň.

## 1.1 Stavba cévní stěny

Krevní cévy (tepny i žíly) se skládají ze tří hlavních soustředně uspořádaných vrstev, jež se označují *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia* (Obrázek 1).



Obrázek 1 - Stavba cévní stěny (Blausen 2014)

*Tunica intima* tvoří vnitřní vrstvu cév. Obsahuje monovrstvu endoteliálních buněk, podepřenou vnitřní elastickou vrstvou. U zdravých krevních cév je vrstva endoteliálních buněk kontinuální a semipermeabilní (Belanger 1990). Hlavní význam endotelu spočívá v zabraňování srážení krve, zánětům a infekcím a zajišťování další signalizace z vnitřního lumenu cévy směrem k buňkám hladkého svalstva v *tunica media* (Beck a D'Amore 1997). Endotelové buňky jsou podporovány tenkou vrstvou extracelulární hmoty zvanou endoteliální bazální membrána. Tato bazální membrána je bohatá na kolagen (Co) typu IV a laminin (LM) a obsahuje acelulární vrstvu nazývanou vnitřní elastická lamina (*lamina elastica interna*). Z hlediska samotné mechanické odolnosti tvoří tato část pouze minoritní podíl (Wagenseil a Mecham 2009).

*Tunica media* je nejsilnější vrstva a obsahuje kontraktilní buňky hladkého svalstva cév (VSMC – Vascular Smooth Muscle Cells), které jsou zodpovědné za cévní tonus. VSMC jsou uspořádané do kruhu, jsou inervované a přijímají signály z luminálního endotelu a z krve.

VSMC jsou nejhojnějším typem buněk ve stěně cév a tvoří svalovou vrstvu cév (hlavně tepen). Společně s extracelulární hmotou (ECM) jsou rozhodující pro udržení krevního tlaku a neustálého průtoku krve. Nejvíce zastoupené proteiny ECM kolagen typu I a III a elastin dodávají cévám vynikající pevnost v tahu a elasticitu. Zatímco kolagen udržuje strukturální integritu cévy, elastin brání nadměrné dilataci cévy a přispívá k poddajnosti cév (Tschoeke et al. 2008).

*Tunica adventita* je tvořena převážně z fibroelastické pojivové tkáně s longitudinálně orientovanými vlákny. Od *tunica media* je oddělena vnější elastickou membránou (Stegemann et al. 2007). Udržuje integritu cévy a tvoří hlavní složku její rezistence (Belanger 1990).

## **1.2 Endotel a jeho diferenciac**

Endotelové buňky uspořádané do jednovrstvé výstelky cév tvoří semipermeabilní membránu pro přestup látek mezi krví a hlubšími vrstvami cévy, dále však také mají významnou regulační funkci. Schopnost endotelia reagovat na průtok krve byla objevena před více než 150 lety patologem Virchowem, který upozornil na heterogenní morfologii endotelia podél arteriálního stromu, která korelovala s vývojem průtoku, kterým byly buňky ovlivněné (Galbraith et al. 1998). To vedlo k dalším studiím *in vivo* i *in vitro* s cílem charakterizovat vliv průtoku na endotel. Mnoho studií upozorňuje, že

biomechanické síly vzniklé z průtoku ovlivňuje endotelovou strukturu a funkci, včetně zvýšené permeability pro makromolekuly, akumulaci lipoproteinů a zánik a obnovu buněk okolo větvení a bifurkací (Davies et al. 1984; Gimbrone et al. 2000; Lee et al. 2008).

Arteriální strom, který se skládá z velkých elastických a svalových cév, je neustále vystaven hemodynamickým silám, které se mění v širokém rozsahu amplitudy, frekvence a směru. Hemodynamické síly se skládají z tlaku působícího kolmo na stěnu nádoby, cyklického napětí a smykového napětí působícího paralelně ke stěně, což vytváří třecí smykovou sílu na povrch endotelu (Davies 1995). U velkých tepen je rozsah smykového napětí v rozmezí 10 – 40 dyn/cm<sup>2</sup> a je umocněn pulzní charakteristikou průtoku, čímž vzniká gradient smykového napětí o daném rozsahu (Langille et al. 1986). V oblastech s jedinečnými morfologiemi, jako např. zakřivení a bifurkace, je trvalý laminární tok narušen a vytváří oblasti oddělených toků, kde dochází k recirkulaci, která se mění v průběhu kardiálního cyklu. Tyto sekundární toky modifikují profil původního laminárního toku, a proto ovlivňují výsledné smykové namáhání působící na endotel (Malek et al. 1999).

Modely *in vitro* i měření *in vivo* ukázaly, že hodnota smykového napětí v těchto oblastech se pohybuje od negativních hodnot až po nulu (v oblastech separace průtoku), až do kladných hodnot 40 dyn/cm<sup>2</sup>. Při patofyziologiích, např. zvýšeném krevním tlaku, tato hodnota může ještě narůst (Nerem et al. 1998).

Okamžité i dlouhodobé změny toku krve vyvolávají adaptaci velkých tepen. Tato adaptace je závislá na přítomnosti neporušené endoteliální vrstvy (Langille a Donnell 1986). Částečně je to způsobeno produkcí endotelových metabolitů, které řadíme mezi vazokonstriktory a vazodilatátory, které lokálně působí na vaskulární napětí buněk hladké svaloviny uložené hlouběji v cévě. Při patologických podmínkách se objevuje extrémní adaptace, kdy remodelace spočívá v buněčné proliferaci, apoptóze (programované buněčné smrti), degradaci a syntéze buněčné matrix (Rajendran et al. 2013; Russo et al. 2018).

Mechanické síly, jako smykové napětí, tahové napětí a hydrostatický tlak přispívají k vytváření vaskulárního systému endotelovými buňkami podobně jako chemické mediátory – hormony, cytokiny a neurotransmitery (Yamamoto et al. 2003). Smykové napětí je vytvořené prouděním krve a tkáňového moku a hraje významnou roli při

angiogenezi, kontrole vaskulárního napětí a remodelaci cév. Bylo dokázáno, že také ovlivňuje endoteliální progenitorové buňky (EPC) k diferenciaci do endotelových buněk (Obi et al. 2009).

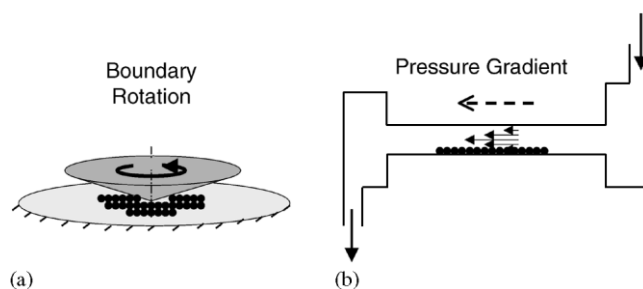
### 1.2.1 Vliv smykového napětí na endotel a dynamické systémy

Při *in vitro* studiích zase byly dokázány přímé účinky biomechanických sil na endoteliální strukturu a funkci. Dokázaly rychlou odpověď endotelu na definovanou velikost a charakter smykového napětí, aplikované namáhání má také vliv na následné transkripční změny (Nerem, et al. 1998). Endotelové buňky neustále podléhají smykovému napětí, přičemž velikost tohoto napětí se udává 1 – 5 dyn/cm<sup>2</sup> pro vény a 10 – 40 pro arterie (dela Paz a D'Amore 2009). Mnoho studií dokázalo, že smykové napětí aplikované na kmenové buňky ve fyziologických hodnotách (0 – 20 dyn/cm<sup>2</sup>) mělo pozitivní efekt na diferenciaci do endotelových buněk (Bai et al. 2009; Dong et al. 2009; Fischer et al. 2009; Kim et al. 2011). Např. (Kim, et al. 2011) uvádí, že smykové napětí o hodnotě 2,5 dyn/cm<sup>2</sup> zvýšilo hodnotu endotelového markeru CD-31. Ve studii (Bai, et al. 2009) uvedli, že při smykovém napětí o hodnotách 10 a 15 dyn/cm<sup>2</sup> zvýšilo produkci endotelových markerů, přičemž hodnoty smykového napětí 20 a 25 dyn/cm<sup>2</sup> naopak produkci snížily.

Proliferace širokého spektra buněk je závislá na působení smykového napětí, působícího na buněčné mechanoreceptory (membránové receptory, iontové kanály, integriny apod.) mající vliv na další procesy (hladiny intracelulárního kalcia, oxidu dusného, prostacyclin, remodelace cytoskeletu) (Davies 1995). Průtokové systémy využívají dvou konfigurací (Obrázek 2). Jednou je rotace kónického kužele kolmo uloženého nad povrchem desky (tzv. orbitální třepačka, Obrázek 2a). Protože jak lokální relativní rychlost, tak i vzdálenost mezi povrchy kužele a desky se mění lineárně s radiální polohou, dosáhne toto uspořádání prostorově homogenního smykového napětí na obou příslušných površích. V závislosti na kuželovém zúžení a uložené úhlové rychlosti lze dosáhnout širokého rozsahu smykového napětí, které sahá i do turbulentního režimu (Topper et al. 1997).

Druhou hlavní konfigurací je sestava rovnoběžných desek, mezi kterými protéká médium (Obrázek 2b). Vzhledem k malé velikosti štěrbině vzniká mezi deskami laminární proudění a buňky jsou rovnoměrně namáhány smykovým napětím. Pohon média mezi deskami může být proveden jak gravitačně, tak i pumpou. V závislosti na geometrických vlastnostech desek a rychlosti proudění média může být vytvořeno variabilní smykové napětí (Ruel et al. 1995). Vzhledem k obtížnému sledování buněčné kultury během

kultivace v první konfiguraci se častěji využívá paralelních desek (Schnittler et al. 1993), jak dokládají následující studie: (Frangos et al. 1988; Chun et al. 1997; Levesque a Nerem 1985)



Obrázek 2 - konfigurace systémů s průtokovým namáháním: a) rotující kužel, b) paralelní desky. Obrázek převzat z (Brown 2000).

Mezi nejčastější zařízení pro aplikaci smykového napětí na endotelové buňky patří kultivační komory s paralelními deskami (Bai, et al. 2009; Takizawa et al. 2010; Tefft et al. 2013; Wu et al. 2008; Yee et al. 2006; Zeng et al. 2006) a tubulární systémy (tj. varianta průtokové komory, kdy médium protéká kapilárou, ve které jsou nasazené buňky) (Dong, et al. 2009; Kim, et al. 2011), orbitální třepačky jsou využívány méně (Fischer, et al. 2009; Zhang et al. 2009). Výhodou prvních dvou typů zařízení je stabilní hodnota smykového napětí o dané velikosti, naopak nevýhodou je, že pro porovnání více hodnot smykového napětí je potřeba několik sériových experimentů, kdy podmínky kultivace nemusí být stejné. Orbitální třepačky vytvářejí gradientní pole smykového napětí, neboli lze je využít pro experimenty na srovnání účinků různých napětí, nevýhodou ovšem je, že hodnoty napětí nelze přesně nastavit.

### 1.3 Buňky hladkého svalstva a jejich diferenciaci

Cévní buňky hladkého svalstva (VSMC) hrají důležitou roli ve fyziologickém fungování krevních cév a v cévních patologických změnách. Ve zdravých krevních cévách dospělého organismu VSMC zajišťují kontrakci a relaxaci cév. Tento buněčný fenotyp je charakterizován bohatými kontraktilními vlákny obsahujícími VSMC-specifické kontraktilní proteiny, jako jsou  $\alpha$ -isoforma aktinu a izoformy těžkého řetězce myosinu SM-1 a SM-2 a další specifické proteiny (Bacakova 2018a). Dynamická kultivace mezenchymálních kmenových buněk je důležitým nástrojem pro indukci a stanovení kontraktilního diferencovaného fenotypu v těchto buňkách. Diferenciaci kmenových buněk vůči VSMC vyžaduje pulzující tlak a cyklické namáhání, podobně jako působí hemodynamické namáhání na cévy *in vivo*. Stupeň diferenciaci kmenových buněk vůči

VSMC je určen úrovní exprese specifických markerů, zejména:  $\alpha$ -aktinu hladkého svalu (SM), myocardinu a SM22- $\alpha$  (časné markery); h-caldesmonu a SM calponinu (intermediární markery); a desminu, meta-vinculinu, SM-1 a SM-2 izoforem myosinového těžkého řetězce a smoothelinu (pozdní markery) (Bacakova 2018a). Účinek mechanického napětí lze dále modulovat přítomností různých růstových faktorů (PDGF, TGF- $\beta$ ) (Bacakova 2018b). TGF- $\beta$  je hlavním růstovým faktorem podporujícím diferenciaci vůči buňkám hladkého svalstva (SMC) prostřednictvím signální dráhy TGF- $\beta$ 1. V přítomnosti TGF- $\beta$ 1 dochází ke zvýšení produkce diferenciacních markerů SMC v kmenových buňkách (Garat et al. 2000; Qiu et al. 2005). Podobné pozitivní účinky na diferenciaci buněk vůči fenotypu SMC (buňky hladké svaloviny) byly popsány v kostním morfogenetickém proteinu 4 (BMP-4) (Bacakova 2018a).

Biomechanické síly, jako je tlak a průtok, jsou nezbytné pro diferenciaci kmenových buněk do SMC a lze je přirovnat k napětí během fyzické aktivity. Buňky se přizpůsobují změnám v mechanickém prostředí změnou morfologie a změnou genové exprese a fenotypu. Kromě toho produkce kolagenu a tvorba elastických vláken jsou rozhodující pro vývoj *tunica media* (Yokoyama et al. 2017).

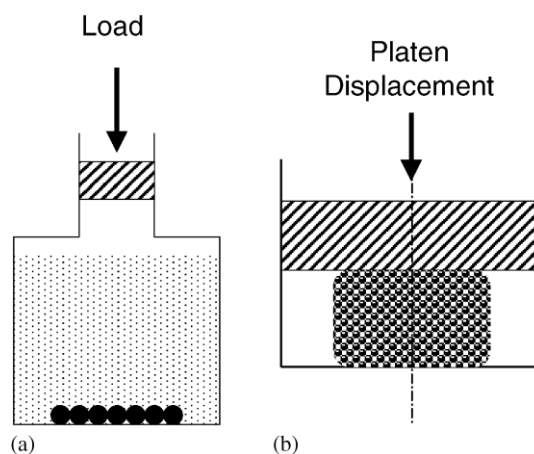
### 1.3.1 Mechanické namáhání SMC a dynamické systémy

Diferenciace SMC je výrazně ovlivněna mechanickým napětím. Většina typů buněk, na které se ASC (mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně) diferencují, např. SMC, jsou vysoce mechanosenzitivní (Ye et al. 2014). Buňky jsou schopné reagovat na mechanické síly prostřednictvím mechanosenzitivních receptorů. Tyto receptory jsou schopny přeměnit mechanické napětí na biochemické signály procesem mechanotransdukce. Účelem použití mechanického stresu během kultivace *in vitro* je vytvoření fyziologických podmínek, kterým jsou buňky v těle vystaveny. Mechanotransdukční mechanismy zahrnují integriny, mechanicky řízené iontové kanály, receptory spojené s G proteiny a senzory, např. řasinky (Ye, et al. 2014).

Pro mechanické namáhání SMC a diferenciaci kmenových buněk směrem k hladké svalovině se nejčastěji používají systémy na bázi kompresivního tlaku a podélné jednoosé tenzi. Hydrostatická komprese (Obrázek 3) má několik podstatných výhod: jednoduchost zařízení, prostorová homogenita stimulu, snadnost konfigurace více zátěžových replikátů (pomocí rozdělovače) a snadnost dodání a přenosu buď statických nebo přechodných zátěžových vstupů (Brown 2000). Vzhledem k nepřímému kontaktu se zatěžovacím



systemem desky, nevzniká žádné nebezpečí ohledně lokálního stlačení vzorků a dochází tak k plynulému přenosu metabolitů mezi kultivační vrstvou a živným médiem. Dodávané zatížení navíc není závislé na stavu adheze mezi kulturou a jejím substrátem (Brown 2000). Bohužel tlaky plynů v inkubátoru odpovídají kvazi-fyziologickému kultivačnímu stresu vedoucí k vysoké hladině  $pO_2$  a  $pCO_2$  (Ozawa et al. 1990). Další výkyvy mohou nastat při příliš nízké nebo vysoké frekvenci tlakových pulsů (Tanck et al. 1999). Jde o nejjednodušší princip mechanické zátěže, která využívá jak pozitivní, tak negativní výchylky tlaku. Tento typ zátěže se využívá již od 70. let 20. stol., jak dokládají následující práce: (Bourret a Rodan 1976), (Lippiello et al. 1985), (van Kampen et al. 1985). Typicky se využívá dvou konfigurací systémů, a to namáhání buněčné kultury prostřednictvím tlaku distribuovaným kultivačním médiem (Obrázek 3a) a namáhání scaffoldů pomocí poháněného pístu (Obrázek 3b). Druhý ze způsobů se využívá zejména pro namáhání nosičů na bázi chondrogeních tkání (Brown 2000).

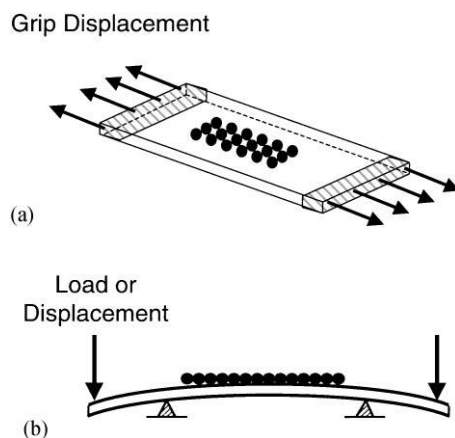


Obrázek 3 - Sestavy pro kompresivní namáhání. A) kompresivní namáhání 2D buněčné kultury prostřednictvím tlaku šířícího se kultivačním médiem. B) tlakové namáhání buněk inkorporovaných do buněčného nosiče, který je přímo tlakově komprimován pístem. Obrázek převzat z (Brown 2000).

Systémy pro podélné jednoosé namáhání (Obrázek 4) jsou často využívány zejména kvůli jednoduché implementaci a nízké ceně. Podstatou je působení síly v jednom směru na substrát osazený buňkami, přičemž substrát musí být do jisté míry elastický. Z toho důvodu se nejčastěji používají silikonové, polystyrenové či polymerové substráty, příp. nativní tkáně.

Pro experimenty se využívají jak komerční, tak vlastní systémy (Ghazanfari et al. 2009; Rabbani et al. 2016; Seriani et al. 2016; Shao et al. 2013; Yao a Wong 2015). Podstata namáhání je založená na podélné tenzi substrátu s nasazenými buňkami v jedné ose (Obrázek 4a), nebo flexi substrátu s buňkami umístěným na základnách (Obrázek 4b).

Vzhledem k Poissonově jevu působí na buňky v obou konfiguracích napětí kolmé ke směru namáhání. Zásadním parametrem pro tento typ namáhání je poměr natažení a stimulační frekvence, kterou však splňují pouze některé systémy (Rabbani, et al. 2016; Seriani, et al. 2016). Rozsah natahovacího poměru se mění v systémech mezi 1 a 25%, stejně jako rozsah frekvencí, které obvykle zahrnují interval 0,2 – 5 Hz. Některé další systémy také poskytují další nastavení, jako je doba trvání představovaná počtem cyklů (Rabbani, et al. 2016).



Obrázek 4 - Systémy s jednoosým namáháním a) podélnou tenzí, b) flexí substrátu. Obrázek převzat z (Brown 2000).

Mnoho studií zkoumalo korelaci mezi tlakovým namáháním, proliferací buněk a diferenciací SMC. Byly popsány dvě mechanosenzitivní signální dráhy spojené s diferenciací SMC: dráha spojená s RhoA a dráha spojená s FAK kinázou. Aktivace těchto signálních drah vede ke zvýšené produkci SMC diferenciačních markerů (Miralles et al. 2003). Dlouhodobá inkubace buněk a mechanická napětí vyvolaná tokem tekutin, zejména kompresivní namáhání, podporují expresi SMC-specifického cytoskeletálního proteinu ve stromálních buňkách kostní dřeně, kde tlakové napětí 120/60 mmHg (tj. 16/8 kPa) vyvolalo vyšší úroveň exprese SM-1 myosinu než namáhání smykovým napětím 0,6/1,2 l/min a kombinované namáhání (Kobayashi et al. 2004a). Cyklický fyziologický tlak 120/80 torr (16/11 kPa) změnil buněčnou morfologii a během 7 dnů zvýšil rychlost proliferace v kmenových buňkách (Maul et al. 2007). Delší preinkubační doba (7 – 21 dní), následovaná mechanickou stimulací, přispěla ke zvýšené expresi SMC proteinu (Maul et al. 2011). Vyšší hustoty buněčné populace a vyšší exprese markerů časné diferenciaci  $\alpha$ -aktinu a calponinu bylo dosaženo v kultuře stimulované tlakem než ve statických podmínkách (Bacakova 2018b).

Bylo stanoveno, že optimální hodnoty tlakového cyklického napětí pro zrání lidských umbilikálních arteriálních SMC jsou amplituda od 11 do 18 kPa s frekvencí 0,2 Hz. To bylo naznačeno vysokou životaschopností buněk, tvorbou stresových vláken, fibronektinovou fibrilogenezí a tvorbou 3D struktury SMC (Yokoyama, et al. 2017). Zvýšený hydrostatický tlak, kolísající mezi 8 a 16 kPa, zvyšoval celkový obsah kolagenu a nerozpustného elastinu a také zvyšoval průřezný tlak umělého arteriálního konstrukturu (Crapo a Wang 2011).

#### 1.4 Cévní náhrady

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí na celém světě. Mezi běžné projevy patří ischemická choroba srdeční a periferní arteriální onemocnění, které se vyvíjejí v důsledku kritického aterosklerotického zúžení zásobujících tepen.

Okamžitá obnova tkáňové perfuze je klíčová pro prevenci srdečního selhání u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a poškození ischemických končetin. Stále tak k nejčastěji prováděným kardiovaskulárním chirurgickým výkonům patří nahrazení poškozené tkáně vhodným štěpem pomocí přemostění (bypass), nahrazení poškozené tkáně (substituce) nebo angioplastika pomocí záplat (Chlupáč et al. 2009). Štěpy pro tyto uvedené výkony mohou být tzv. autografty tj. vlastní tkáň pacienta (žíla nebo tepna); alografty nejčastěji získané od zemřelých dárců (v případě cévních náhrad); xenografty, neboli tkáň z jiného živočišného druhu, a v neposlední řadě umělé syntetické náhrady. Každá z těchto metod má však svá omezení. Mezi něž patří nedostatek vlastní nebo dárcovské tkáně, přenos patogenu, antikoagulační terapie, riziko infekce a omezená životnost. Navíc mnohé z nich neumožňují úplnou regeneraci a plnou náhradu funkce, a zvyšují tak pravděpodobnosti komplikací a opakovaného chirurgického zákroku (Bouten et al. 2011).

Autologní náhrady jsou obecně brány za zlatý standard pro náhradu poškozených cév malého průměru (< 4 - 6 mm) a jsou brány jako první možné řešení. Nejčastějším zdrojem těchto náhrad je pacientova vlastní *v. saphena magna*, *a. thoracica interna* a *a. radialis*. Na druhou stranu je pro použití autologních náhrad vyžadován invazivní přístup pro jejich získání a stejně tak je jejich množství limitované. Navíc v řadě případů je jejich stav nevhodný pro další použití z hlediska nevhodné anatomické struktury jako je například gracilita, nevhodné větvení a cévní odbočení, formace trombů nebo aterosklerotických plátů (Pashneh-Tala et al. 2016). Uvádí se, že u pacientů, kteří potřebují primární

revaskularizaci dolních končetin, až 30 % postrádá vhodnou autogenní žílu (Collins et al. 2008). Tento počet se zvyšuje na 50 % u pacientů vyžadujících sekundární bypass. Kromě toho mohou žilní štěpy v peri-anastomotických oblastech vést k neointimální hyperplazii (Schwann et al. 2009). Míra průchodnosti po implantaci *v. saphena* zůstává omezená, přičemž rekonstrukce koronárních i femuro-podkolenních tepen vykazují míru selhání přibližně 50 % po 10 letech (Harskamp et al. 2013).

Implantace umělých náhrad vyrobených z biologicky nerozložitelných polymerů, tj. polytetrafluorethylenu (PTFE), Gore-Tex a Dacronu, se ukázala jako účinná při výměně velkých cév. Avšak při použití při aplikaci vaskulárních štěpů o malém průměru byly komplikovány trombogenezí (Takagi et al. 2010). Z toho důvodu začaly vznikat náhrady cév, jež kombinují více metod s cílem poskytnout alternativní a inovativní řešení pro cévní náhradu malého průměru, interdisciplinární přístup by mohl nabídnout šanci navrhnout štěp pro jakoukoli konkrétní cílovou tkáň a klinické potřeby.

Syntetické materiály pro cévní náhrady se používají již od 70. let minulého (Dacron (De Bakey et al. 1958), PTFE (Campbell et al. 1976; Soyer et al. 1972)). Jak je uvedeno výše, nízká míra průchodnosti a nebezpečí trombogeneze po implantaci byla běžným omezením těchto vaskulárních štěpů. Východiskem tak bylo použití náhrad založených na alo- nebo xenograftech. První komerčně dostupné náhrady tohoto typu byly Artegraft (North Brunswick, NJ) (Hutchin et al. 1975), Procol (Hancock Jaffe Laboratories Inc., Irvine, CA) (Hatzibaloglou et al. 2004) a Cryovein (CryoLife, Kennesaw, GA) (Madden et al. 2004), objevily se na trhu ke konci sedmdesátých let. Následovaly náhrady biologického původu se zabudovanými xenogenními buňkami, vzhledem k omezené dostupnosti autologních buněk (Weinberg a Bell 1986). Jako základ pro tyto cévy se používaly kolagenové gely, které však vykazovaly špatné mechanické vlastnosti a výsledná céva tak neudržela svoji integritu a pevnost. Dnes je tak nastaven soubor kritérií pro kontrolu kvality vyrobených cévních náhrad, který je založen na standardech zlatého standardu *v. saphaeny*, které spočívají v kontrole mechanických vlastností, tj. minimální doporučený průřezový tlak je 1 700 mmHg (226 kPa) (Konig et al. 2009) a odolnost vůči cyklickému zatížení *in vitro* je 30 dnů (L'Heureux et al. 2006).

Současně používané náhrady lze tedy dle použitého původu řešení rozdělit na náhrady s využitím syntetických, přírodních nebo hybridních materiálů. Přírodní polymery mohou

být dále roztrženy na materiál založený na extracelulární matrici (ECM) a decelularizované přírodní matrice.

Výroba buněčných cévních náhrad s využitím syntetických polymerů má výhodu v možnosti upravení vlastností štěpu tak, aby vyhovovaly klinickým potřebám. Na druhou stranu je však nevýhodou náročnost technologie a potřeba specifického materiálu. Dalšími významnými nevýhodami těchto materiálů, jsou nedostatek vazebných míst pro buňky a nutnost zajistit antitrombogenní vlastnost lumenu. Bylo testováno množství polymerů a kopolymerů. Mezi nejstudovanější patří degradovatelné polyestery, jako je kyselina polyglykolová (PGA)(E. Niklason a S. Langer 1997), kyselina poly-mléčná (PLA), kyselina poly-l-mléčná (PLLA)(Yokota et al. 2008), jejich kopolymer poly-(laktid-ko-glykolid) (PLGA)(In Jeong et al. 2007) a polykaprolakton (PCL). Mezi biologicky rozložitelné polymery patří polyurethany (PU) (Hashi et al. 2007) a poly-(glycerol-sebakát) (PGS)(Wu et al. 2012), které jsou bioresorbovatelnými elastomery. Navzdory řadě těchto studií však pouze minimum studií vyhodnotilo tyto nosiče jako využitelné. Většina těchto nosičů vykazovala sklony ke tvorbě trombů, čímž došlo k ucpání cévy po několika dnech až týdnech po implantaci, případně nevykazovaly dostatečnou mechanickou odolnost nebo nepropustnost.

Nedostatek biologické aktivity syntetických nosičů vedl k výrobě lešení z přírodních polymerů získaných z ECM. Proteiny odvozené z ECM mají výhodu v zachování přirozených vazebných míst pro buněčnou adhezi, zlepšení biomimetických a biokompatibilních vlastností materiálu a stimulaci kolonizace a proliferace rekrutovaných buněk. Aktuálně se nejvíce využívají kolagen, želatina, elastin, fibrin a hedvábný fibroin. Typické postupy pro výrobu nosičů z těchto polymerů jsou elektrostatické zvláknování (Soffer et al. 2008) a vymrazování (Zhang et al. 2006), většina studií je však zaměřena na výrobu náhrad pomocí lití do forem, kdy směs požadovaného gelu a buněčné suspenze je nalita do trubkové formy vyrobené z polypropylenové trubice (Boccafroschi et al. 2007; Schutte et al. 2010). Po prvním období inkubace a růstu buněk následuje období zrání v dynamických podmínkách, aby bylo dosaženo vlastností cévní tkáně (Weinberg a Bell 1986).

Přirozené polymery jsou uznávány jako platné alternativy při výrobě cévních náhrad s malým průměrem, kvůli jejich vyšší biokompatibilitě a schopnosti remodelovat *in vivo*. Nicméně přírodní polymery obecně nabízejí sníženou mechanickou pevnost ve srovnání

se svými syntetickými protějšky a mohou být náchylnější k degradaci, která, pokud není pečlivě kontrolována, může vést k prasknutí a tvorbě aneurysmatu (Carrabba a Madeddu 2018).

Nesoulad mechanických vlastností, pokud jde o pevnost, elasticitu, dlouhodobou odolnost a únavu, mezi scaffoldem vyrobeným z přírodních polymerů a nativní cévou vedl k vývoji štěpů se strukturou více podobnou biologickým tkáním. Další pokusy se tak zaměřily na využití decelularizovaných tkání odebraných z alogenních nebo xenogenních zdrojů. Eliminace buněk je nutná, aby se zabránilo imunologické reakci od příjemce, ale tento proces musí zachovat struktury a funkci ECM. Obvykle se používají detergenty, jako je dodecylsulfát sodný, oktylglukosid, deoxycholát sodný a enzymy, jako je dispáza II, nukleázy, fosfolipáza a termolysin, často v kombinaci s mechanickými a fyzikálními metodami k urychlení procesu (Crapo et al. 2011).

Pro výrobu náhrad z decelularizovaných tkání se využívají jak vaskulární, tak i nevaskulární tkáně. Oproti syntetickým náhradám mají vysokou míru průchodnosti a funkčnosti i po několika letech od implantace (Lindsey et al. 2018). Řada náhrad založených na decelularizovaných tkáních již byla pro své pozitivní účinky komercializována. Např. Procol (Hancock Jaffe Laboratories Inc., CA, USA), vaskulární štěp SG 100 SynerGraft®, (CryoLife, GA, USA) a již zmíněný Artegraft (North Brunswick, NJ, USA).

Nehledě na původ tkáně vykazují i tyto náhrady mnohé limity. Hlavní příčinou selhání je imunitní reakce vyvolaná zbytky cizího buněčného materiálu. Ačkoli biologický původ tkáně zmenšoval mezeru mezi vlastnostmi nativní cévy a vestavěného štěpu, přetrvávající omezení spočívá v odlišném chování při dlouhodobé zátěži (Shetty et al. 2009). Tento rozdíl vede k selhání štěpu a možnému vytvoření aneurysmatu (Gössl et al. 2012). Kromě toho jsou decelularizované štěpy pocházející z nevaskulární tkáně nevhodné pro aplikace, ve kterých je lešení nutné přizpůsobit se růstu spolu s pacientem. U těchto pacientů jsou aterosklerotické a fibrotické remodelace a kalcifikace nejčastějšími důsledky špatné integrace štěpu s okolní tkání, což má za následek stenózu a selhání štěpu a vyžaduje vícenásobné intervence pro substituci (Woo et al. 2016).

## 2 Cíle práce

Cílem práce bylo prokázat pozitivní vliv dynamické kultivace buněk v kultivačních systémech (bioreaktorech) na proliferaci, diferenciaci a genovou expresy buněk oproti běžné používané statické kultivaci. Hlavním záměrem bylo využití těchto kultivačních systémů pro výzkum a vývoj nových implantabilních tkáňových náhrad pro kardiovaskulární aplikace.

Jednotlivé dílčí hypotézy a cíle práce lze následovně shrnout:

### 2.1 Decelularizace tkání a jejich příprava pro rekolonizaci buňkami

Vývoj a optimalizace metody pro automatizovanou decelularizaci planárních prasečí a ovčích perikardů a karotid. Při decelularizaci vzniká tkán u níž je potlačen imunogenní komplex. Takto připravená tkán je vhodná pro použití jako xenogenní náhrada. Decelularizace vyžaduje optimalizaci procesu decelularizačních činidel a proplachu pro získání netoxické a sterilní tkáně. Zároveň při decelularizaci dochází ke zhoršení mechanických vlastností tkáně které musí být minimální. Pro automatizaci byl vyvinut unikátní systém. Publikováno v rámci prací (Matějka et al. 2020a; Vondrášek et al. 2018)

### 2.2 Stimulace smykovým napětím pro modulaci růstu endotelových buněk v *in vitro* podmínkách

Endotelové buňka jsou klíčovým prvkem pro zajištění antitrombogenního povrchu kardiovaskulárních náhrad. V těle je endotel stimulován protékající krví jež působí smykovým napětím pro jeho fenotypickou maturaci a vývoj. Endotelizace povrchu umělých cévních náhrad s předkultivování v kultivačním bioreaktoru napomůže fenotypické maturaci endotelu pro vytvoření souvislé odolné vrstvy. Publikováno v rámci práce (Chlupac et al. 2014; Matejka et al. 2013) a technické řešení v užitných vzorech (Matějka et al. 2017; Matějka et al. 2016a)

### 2.3 Stimulace hydrodynamickým tlakem pro modulaci růstu a diferenciaci hladkých svalových buněk v *in vitro* podmínkách

Hladké svalové buňky tvoří hlavní opornou funkci cév a zajišťují jejich vazokonstrikci a vazodilataci. Hlavním stimulem je mechanická zátěž v podobě hydrodynamické zátěže tvořené cyklickým hydrostatickým tlakem a elastickým tahem. Tyto stimuly zajišťují fenotypickou maturaci hladkého svalu a zároveň v kombinaci s vhodnými růstovými faktory (TGF-B, BMP-4) podporují diferenciaci kmenových a stromálních buněk do

fenotypu hladkého svalu. Zároveň tato stimulace podporuje proliferaci buněk a formaci stavebních extracelulárních proteinů. Publikováno (Bacakova et al. 2020; Bacakova et al. 2018a; Bacakova et al. 2019) a technické řešení v užitných vzorech (Matějka et al. 2020c)

#### **2.4 Příprava implantabilních kardiovaskulárních náhrad v bioreaktoru *in vitro***

Kombinace decelularizovaných nosičů rekolonizovaných autologními stromálními buňkami je možností přípravy kardiovaskulárních náhrad u kterých bude urychlena schopnost regenerace *in vivo* a bude podpořena následná endotelizace. Klíčovým prvkem je získání homogenně rekolonizovaného nosiče k čemuž je možné využít mechanické stimulace stromálních buněk což podpoří jejich proliferaci, penetraci do tkáně a nastartuje diferenciací proces. Publikováno v rámci práce (Matějka, et al. 2020a) a technické řešení v užitných vzorech (Matějka et al. 2020b; Matějka et al. 2016b)

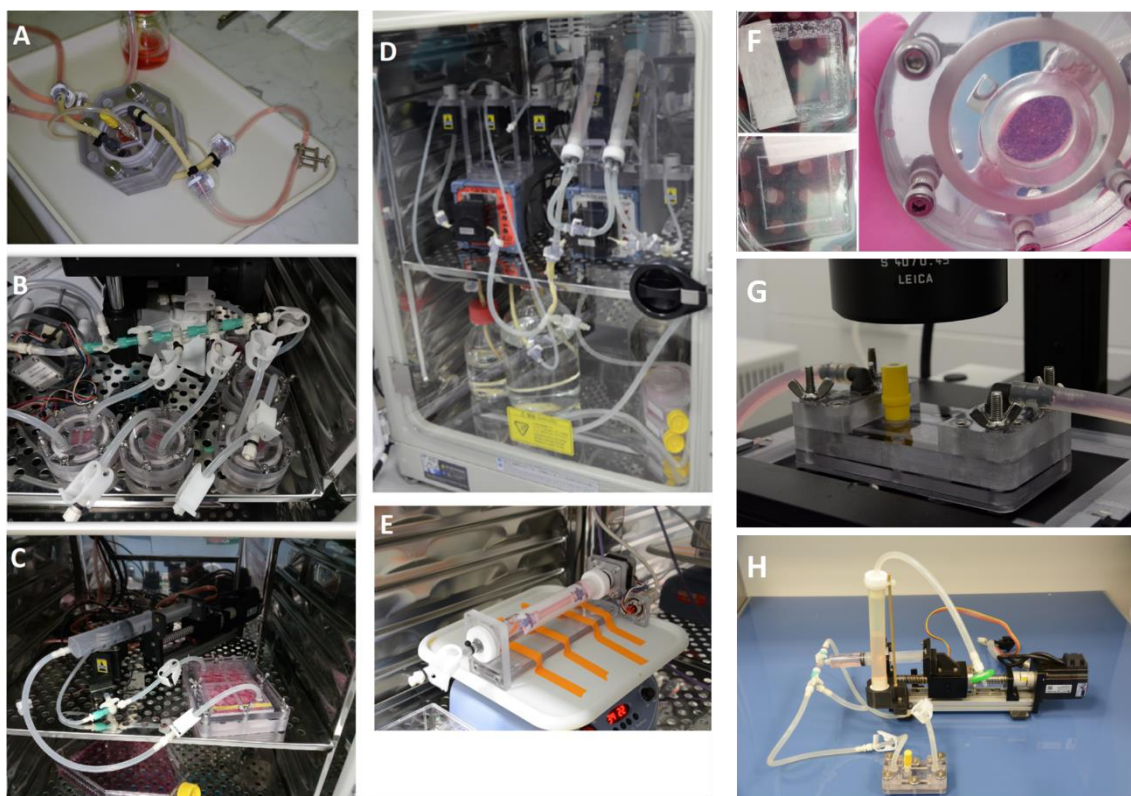
#### **2.5 Implantace připravených náhrad a jejich pilotní testování *in vivo***

Připravené kardiovaskulární náhrady v podobě cévních záplat budou otestovány v animálním modelu *in vivo* a bude po měsíční periodě sledována jejich celková remodelace v těle a tvorba endotelové vrstvy. Tyto záplaty budou připraveny ve vyvinutých a optimalizovaných systémech pro buněčnou kultivaci.



### 3 Materiály a metody

V rámci realizace práce vznikla řada kultivačních systému skládajících se ze speciálně navržených kultivačních komor a systému pro zajištění perfuze kultivačního média a generování mechanických stimulů. Jak kultivační komory, tak stimulační systémy byly postupně optimalizovány pro zajištění vhodných podmínek pro kultivaci buněk, jejich proliferaci nebo diferenciaci. Veškeré návrhy systémů byly optimalizovány pro instalaci uvnitř buněčného inkubátoru. Konstrukční řešení oproti řadě jiných experimentálních návrhů nebo i komerčním řešením bylo optimalizováno pro dlouhodobé experimenty a pro opakovatelné použití. V průběhu realizace byly průběžně testovány veškeré konstrukční materiály z hlediska cytotoxicity a byly průběžně vystavovány cyklům parní sterilizace v autoklávu. V následujících kapitolách jsou souhrnně popsány jednotlivé kultivační systémy a dále jsou prezentovány v rámci publikačních výsledků. Valná většina systému byla chráněna formou užitných vzorů, jež dokumentují detailněji technické řešení a jsou uvedeny v přílohách. Na Obrázek 5 jsou zachyceny vybrané systémy.



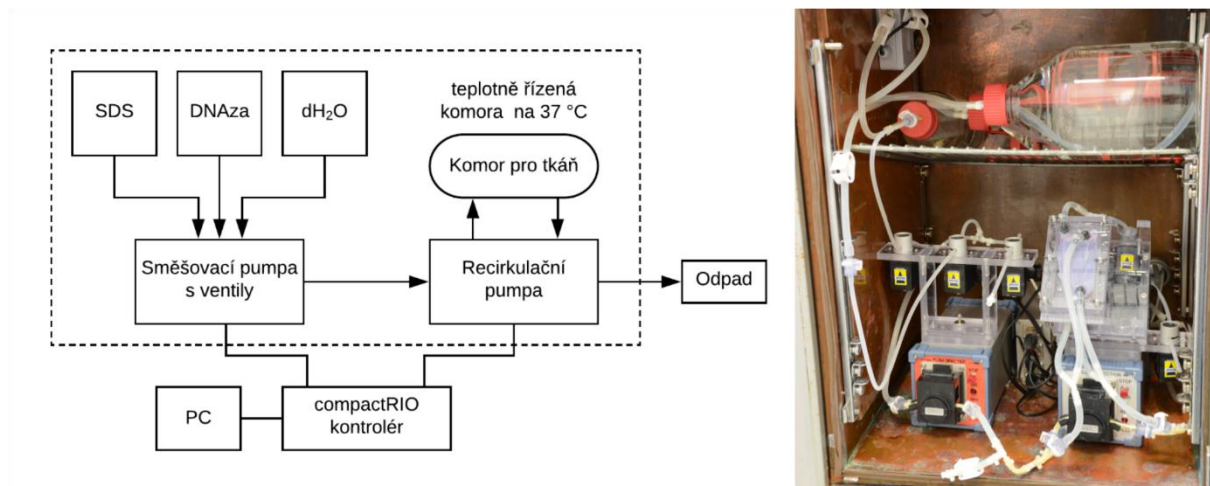
Obrázek 5 - Vybrané kultivační komory a systémy. A – komora pro decelularizované vzorky perikardu, B – komora pro tlakovou stimulaci na skle, C – komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách, D – automatizovaný decelularizační systém, E – rotační osazovací systém pro endotelizaci tubulárních náhrad, F – komora pro elasticko-tlakovou stimulaci na silikonovém substrátu, G – komora PPFC pro stimulaci pomocí smykového napětí, H – mikroperfúzní stimulační systém s připojenou komorou a rezervoárem.

### **3.1 Systém pro automatizovanou decelularizaci zvířecích planárních a tubulárních tkání**

Jak již bylo zmíněno v úvodu, decelularizace tkáně vyžaduje kombinaci více kroků zahrnujících rozklad buněčné membrány (detergent, hypo- či hypertonické prostředí), rozklad zbytků DNA/RNA pomocí enzymů a důkladný proplach. Tyto postupy lze realizovat i za použití běžných laboratorních metod, ovšem jedná se o časově náročný proces který je nutné realizovat několik dní, jak je publikováno v práci (Musilkova et al. 2019).

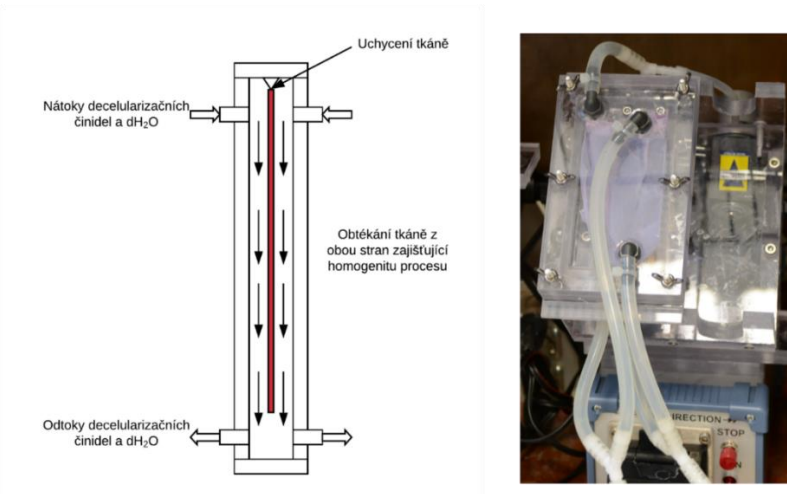
Pro potřeby automatizace těchto procesů byl vytvořen speciální systém. Tento systému se skládá ze dvou peristaltických čerpadel, sestavy ventilů a speciálních komor pro uchycení tkáně. První čerpadlo zajišťuje přípravu a plnění decelularizačních komor roztoky detergentů, enzymů a destilované vody. Druhé čerpadlo zajišťuje recirkulaci roztoků v decelularizačních komorách a homogenní oplach tkáně. Řízení systému je zajištěno pomocí kontroléru NI compactRIO (National Instruments, Austin, TX, USA) se speciálním ovládacím software v LabVIEW (National Instruments) pro nastavení jednotlivých parametrů.

Důležitým prvkem je pak samotné řízení procesu decelularizace. Jednotlivé etapy, tj. rozklad pomocí detergentů, enzymatické štěpení a proplach probíhá v cyklech. Při každém tomto cyklu je naplněna decelularizační komora s tkání dílčím množstvím požadovaného roztoku/vody. Následuje recirkulace a oplach tkáně o daném časovém intervalu. Po tomto intervalu je komora vypuštěna a je naplněn znovu koncentrovaný roztok/čistá demineralizovaná voda. Díky tomu vzniká při každém cyklu vysoký chemický gradient. Tyto cykly jsou použity pro všechny jednotlivé roztoky a byly optimalizovány pro potřeby jednotlivých tkání. Pro zvýšení aktivity použitých činidel, především enzymů, je také celý systém umístěn v teplotně řízené komoře s teplotou 37 °C. Kromě zvýšení aktivity bylo toto řešení také zvoleno pro zajištění reprodukovatelnosti celého procesu. Schématické zobrazení systému a jeho instalace je znázorněna na Obrázek 6.



Obrázek 6 - schematické znázornění systému na decelularizaci tkání a jeho instalace v temperované komoře.

Důležitou částí systému jsou speciálně navržené decelularizační komory. Do těchto komor je uchycena daná tkáň a je následně připojena do decelularizačního systému. Tyto komory byly optimalizovány z hlediska fixace tkáně, a to tak aby docházelo k rovnoměrnému oplachu tkáně při recirkulaci roztoku. Zároveň byl také kladen důraz na minimální mrtvý objem. Komory pro planární vzorky umožňuje uchycení tkáně o maximálním rozměru 12 x 6 cm. Primární návrh byl uzpůsoben pro použití s prasečími, ovčími perikardy a také lidskými perikardy. Uchycení tkáně je řešeno pomocí chirurgického našítí na silikonový nástavec. Tkáň je uchycena na jedné straně a je v průběhu recirkulace oplachována po obou plochách. Funkční znázornění komory je vyobrazeno na Obrázek 7.



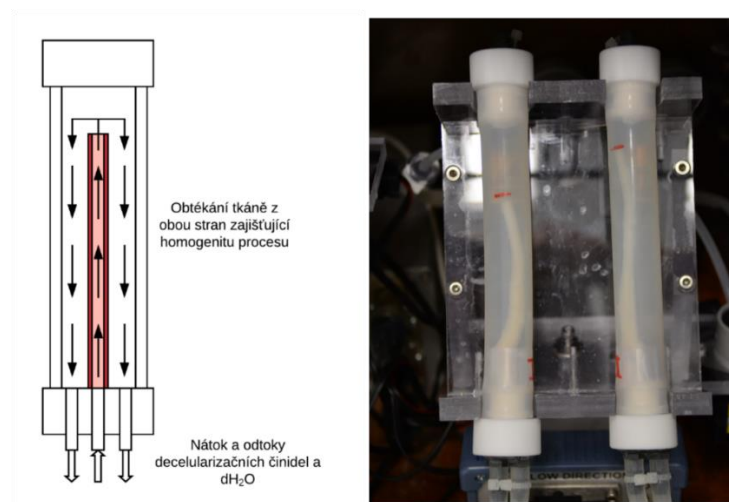
Obrázek 7 - funkční znázornění komory pro decelularizaci planárních tkání a její použití v decelularizačním systému. Komora pro tubulární tkáň, primárně tepny a žíly, je tvořena trubicovým tělem. Tkáň je nasazena na trn o odpovídajícím průměru tak, aby mohly roztoky protékat skrz cévu.

Uchycení je opět řešeno pomocí chirurgického hedvábí. Decelularizační roztoky protékají skrz cévu a poté dochází ještě k oplachu vnější stěny. Tyto komory je možné řetězit pro paralelní decelularizaci více tkání zároveň. Funkční znázornění komory je vyobrazeno na Obrázek 8.

Pro potřeby decelularizace prasečích a ovčích perikardů byl optimalizován následující protokol. Jako decelularizační činidlo byl použit 0,5% roztok dodecylsírany sodného (SDS). Tento roztok byl použit v 6 recirkulačních cyklech, každý trval 10 min. Poté byl SDS vymyt pomocí 5 recirkulačních cyklů dH<sub>2</sub>O, každý trvající 5 min. Poté byl proveden 60minutový cyklus DNAzy. Roztok DNAzy o koncentraci 40 µg/ml byla rozpuštěna v TRIS pufru. Poté byl celý proces ukončen důkladným promytím tkáně dH<sub>2</sub>O, sestávajícím ze 120 10minutových cyklů.

Pro prasečí cévy (karotidy) byl také použit protokol zahrnující SDS a DNAzu. V tomto případě díky tlustší stěně tkáně byla zvýšena koncentrace SDS na 2 % a zvýšen čas na 8 cyklů po 15 min. Následoval 60minutový proplach v DNAze. Poté byl znova zopakován postup s SDS, ale pouze o 0,5 % koncentraci; opět 8 cyklů po 15 min. Následoval proplach 120 cyklů po 20 min.

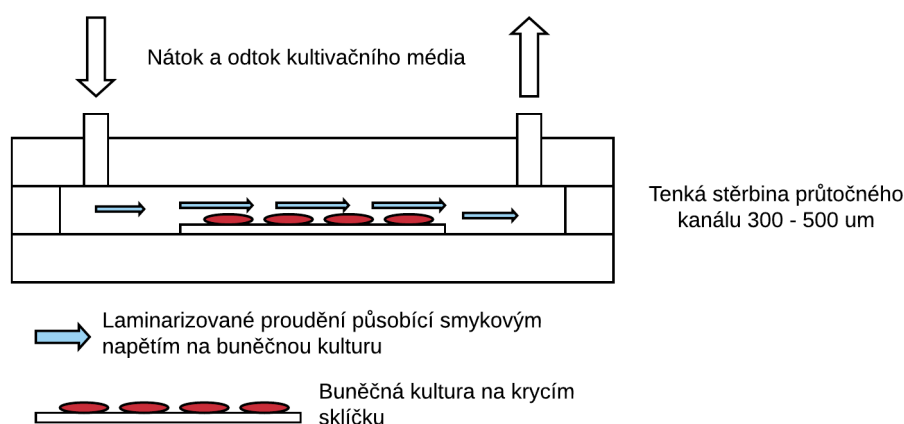
Následně byla tkáň sterilizována v 70% roztoku ethanolu po dobu 1 hod. a propláchnuta sterilním PBS, ve kterém byla i uložena při teplotě do 4 °C.



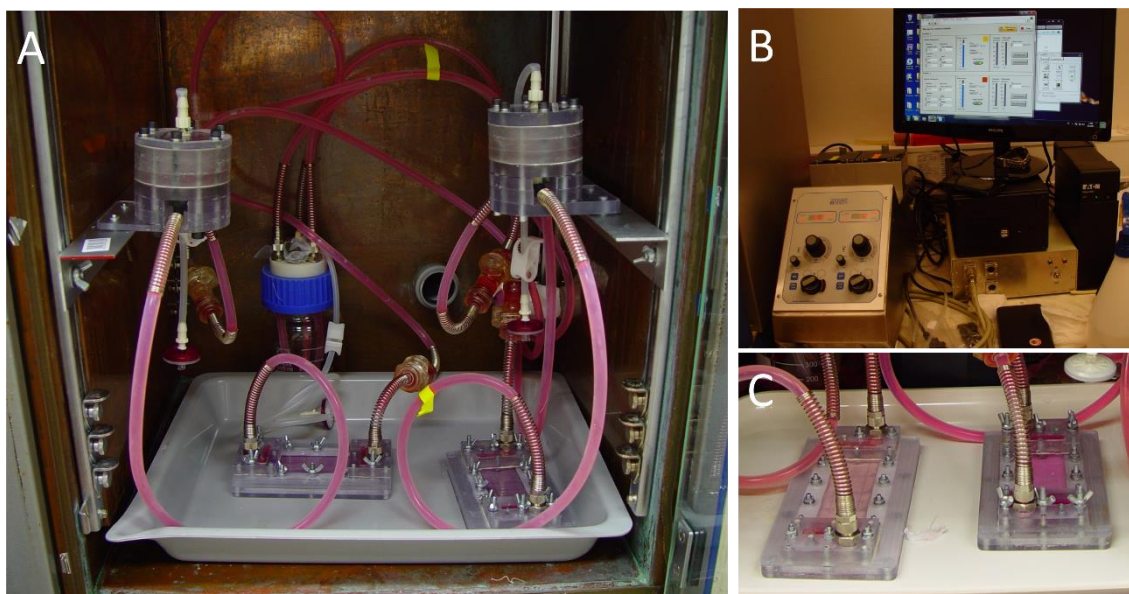
Obrázek 8 - funkční znázornění komory pro decelularizaci tubulárních tkání a jejich instalace v decelularizačním systému.

### 3.2 Kultivační komora typu PPFC pro stimulaci pomocí smykového napětí

Pro stimulaci endotelových buněk a testování endotelizace povrchu byla vytvořena speciální kultivační komora. Návrh na kultivační komory vycházel z osvědčených řešení typu PPFC, tj. planparalelní desky s úzkou průtočnou štěrbinou. Konstrukce byla realizovaná z třískově obráběného polykarbonátu. Substrát pro kultivaci bylo standardní krycí sklíčko rozměru 24x40 mm. Navržená kultivační komora umožňuje vložení až 4 skel o tomto rozměru pro možnost paralelní kultivace více vzorků. Schematické znázornění viz Obrázek 9 a instalace v buněčném inkubátoru viz Obrázek 10. Toto sklíčko bylo před použitím potaženo vrstvou kolagenu, lamininu nebo fibronektinu. Následně na takto připravené vrstvy byl nasazen endotelové buňky HSVEC (lidské endotelové buňky z *v. saphena*), které byly prekultivované ve statických podmínkách po dobu 24 hod. Následně byla komora sestavena a byly zafixovány sklíčka s buňkami. Takto připravená komora byla následně připojena k perfuznímu okruhu a nastaven průtok odpovídající smykovému napětí  $12 \text{ dyn/cm}^2$  (1,2 Pa). Perfuze byla zajištěna pomocí externí peristaltické pumpy Stockert CAPS pump (Stockert GMB, Freiburg, Německo) která byla elektronicky ovládána pomocí datové karty NI-PCI-7831 R (National Instruments, Austin, TX, USA) a vlastního SW v LabVIEW (taktéž National Instruments). Perfuzní okruh byl dále doplněn o pružník tlakových rázů (Chlupac, et al. 2014) a (Matejka, et al. 2013).



Obrázek 9 - schématické znázornění kultivační komory typu PPFC.

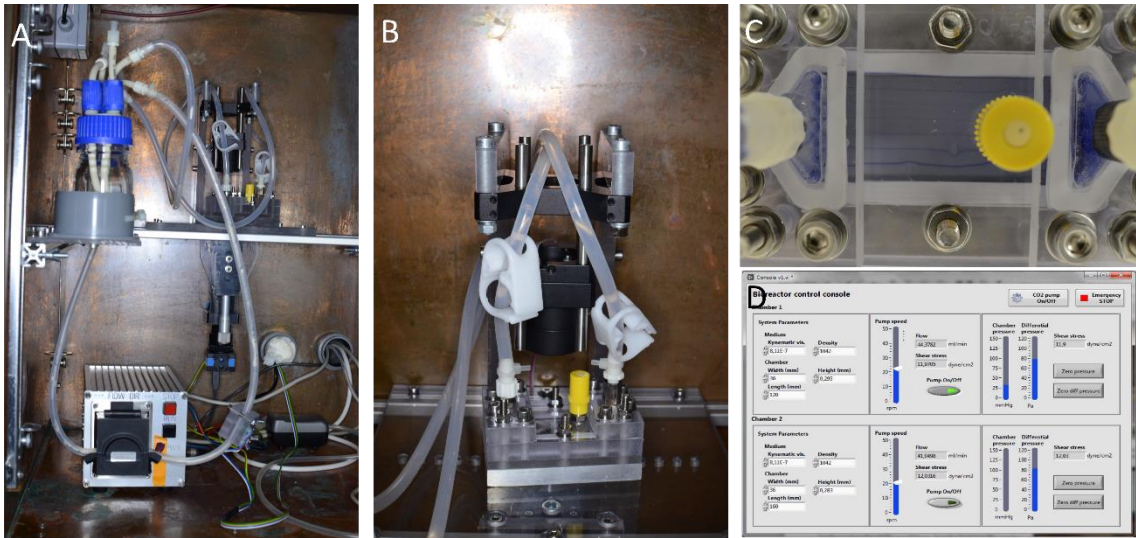


Obrázek 10 – A - sestava kultivačních komor a perfuzního okruhu, B - externí peristaltická pumpa s ovládacím SW a C - detail kultivačních komor.

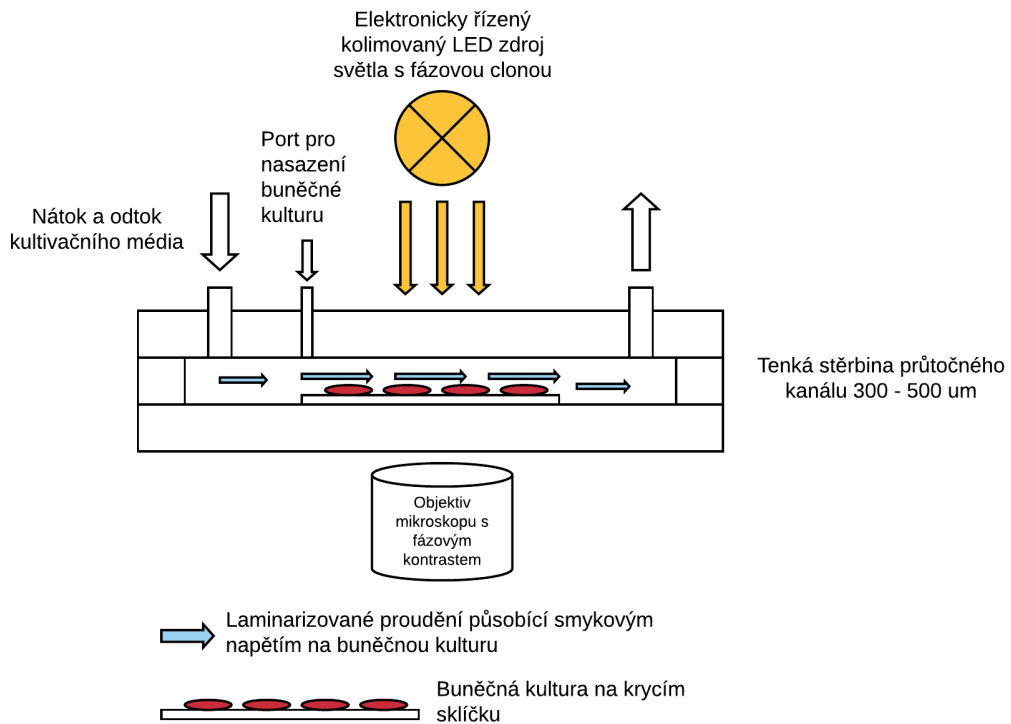
Systém manipulace se sklíčkem s osazenými buňkami při sestavení a následné připojení k perfuznímu okruhu, kdy bylo vytvořeno velké množství bublin v komoře, nebyl optimální z hlediska ergonomie realizace pokusu. Proto byla vytvořena optimalizovaná verze sestavy. Základ vycházel z dosavadní funkční verze kultivační komory, do které byly přidán port typu Luer-Lock pro připojení sterilního septa, takže buňky byly nasazeny přímo do komory až po sestavení celé soustavy. Dále byl optimalizován design komory pro použití v mikroskopu pro možnost živého sledování buněk při kultivaci. Pro snížení mrtvého objemu soustavy a zlepšení celkové ergonomie byla použita peristaltická pumpa vlastní konstrukce, která byla umístěna přímo v buněčném inkubátoru. Inovovaný systém, včetně detailu mikroskopu pro živé sledování, barvivové zkoušky proudění v komoře a ovládací aplikace je zobrazen na Obrázek 11

Nasazení a sestavení komory probíhalo obdobně jak v předešlém případě, ovšem sklíčko, jež bylo vloženo, neobsahovalo buňky, pouze potah. Tento potah také mohl být usušen. Poté, co byla komora sestavena, byla připojena k perfuznímu okruhu a byla zaplavena. V této proceduře byly jednak eliminovány veškeré bubliny v komoře a systému a zároveň bylo vyrovnáno pH a teplota. Následně bylo přes sterilní septum vstříknuta buněčná suspenze buněk, jež se rozlila přes sklíčka. Po 30minutové fázi adheze byla zapnuta perfuze, které byla postupně zvětšena na požadovanou stimulaci. Schéma nové verze komory je znázorněno na Obrázek 12. Dynamická kultivace při časoběrném snímání je

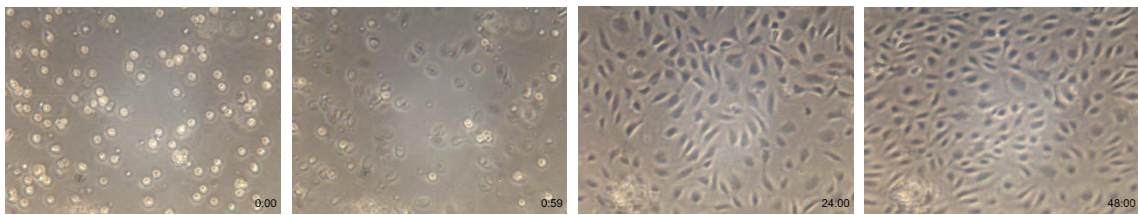
znázorněna Obrázek 13, kde je patrná proliferace buněk a jejich počínající orientace v proudění. Obrázek 14 pak znázorňuje výsledek kultivace po 72 hodinách kultivace.



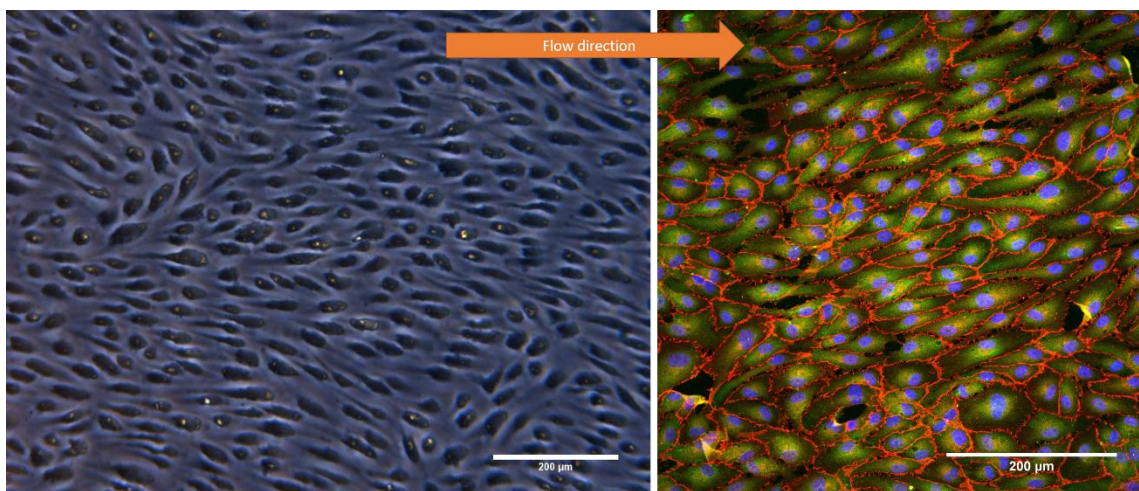
Obrázek 11 – A - nová verze kultivační komory a perfuzního systému v buněčném inkubátoru, B – detail kultivační komory v mikroskopu pro živé snímání buněk, C – barvivová zkouška tvorby laminárního proudění v komoře a D – ovládací SW systému.



Obrázek 12 - Schématické znázornění kultivační komory typu PPF s portem pro nasazení buněk a možností instalace do mikroskopu.



Obrázek 13 - časoběrné snímání při kultivaci v komoře, zleva - čas 0 po vstříknutí buněčné suspenze, 50 minut adheze buněk, 24 hodin průběžná stimulace, buňky bez zřejmé orientace, po 28 hodinách buňky se orientují ve směru proudění.



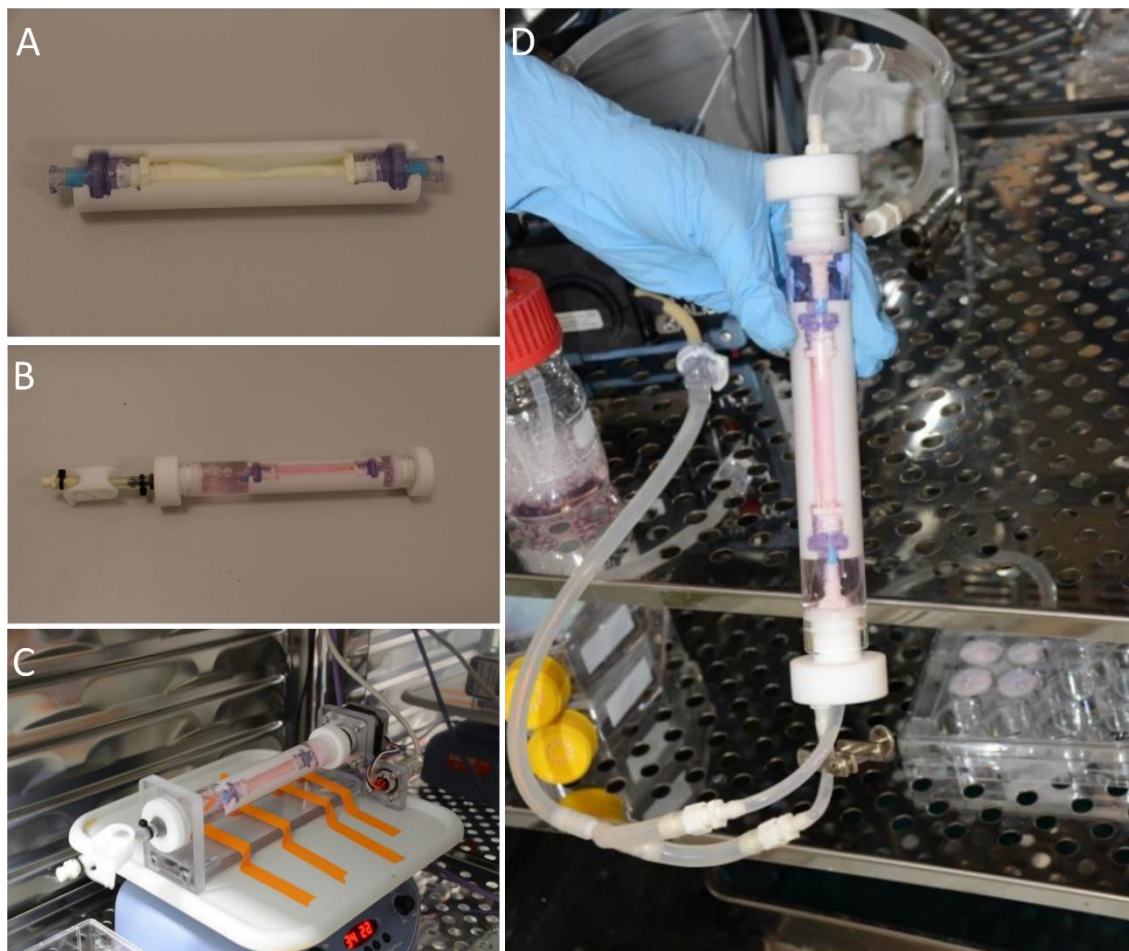
Obrázek 14 - Dynamická kultivace po 72 hodinách od nasazení, vlevo orientace buněk v proudění, vpravo imunofluorescenčně barvený VE-kadherin (červeně) a talin demonstrující vazbu mezibuněčných kontaktů a vazbu na povrch.

### 3.3 Kultivační systém pro osazení a kultivaci endotelových buněk na decelularizovaných prasečích karotidách a syntetických cévních náhradách

Pro osazení tubulárních struktur (syntetické protézy, decelularizované cévy) pomocí endotelových a později i stromálních buněk z tukové tkáně byly vytvořeny dva speciální systémy. Pro optimální nasazení vnitřního lumenu byl vytvořen speciální rotační osazovací systém. Tento systém umožňuje uchycení cévy nebo cévní náhrady ve speciálním držáku, který obsahuje jednocestné ventily pro nasazení buněčné suspenze. Následně je tento držák umístěn do rotační komory, kde je pomocí pomalé rotace docíleno osazení vnitřního lumenu. Poté je tento držák vyjmut a vložen do kultivační komory, která je připojena k perfuznímu systému a dochází ke stimulaci. Obě technické řešení jsou



popsány v příložených užitečných vzorech (Matějka, et al. 2017; Matějka, et al. 2016a). Jednotlivé díly systémů jsou zobrazeny na Obrázek 15.

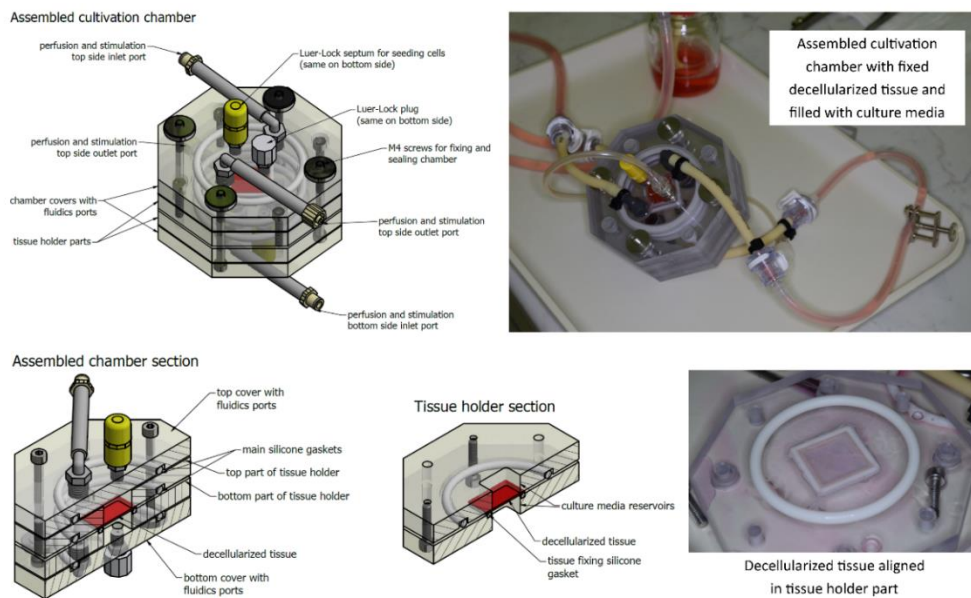


Obrázek 15 - A držák cévy s decelularizovanou cévou, B - rotační osazovací komory, C - rotační systém umístěný na kývné podložce, D - komora pro stimulaci.

### 3.4 Kultivační komora pro tlakovou stimulaci planárních decelularizovaných vzorků

Pro tlakovou stimulaci na decelularizovaných matricích byla vytvořena speciální kultivační komora. Tato komora se skládá ze čtyř hlavních částí. Střední dvě části vytvářejí tkáňový držák s rezervoáry. Decelularizovaná tkáň je předem nařezána na čtverce o rozměrech 35 x 35 mm, které jsou následně umístěny do středu rezervoárů. Rezervoár má čtvercový tvar a vymezuje kultivační plochu na 30 x 30 mm. Zbývající 2,5 mm tkáně z každé její strany jsou fixovány díly kultivační komory. Utěsnění je zajištěno pomocí silikonových O-kroužků. Komora je následně uzavřena kryty obsahujícími fluidní porty a opět těsněna O-kroužky. Celé sestavení a stažení komory je řešeno pomocí nerezových šroubů M4 a rýhovaných matic. Aby se minimalizovalo riziko jakékoli kontaminace nebo toxicity, tyto šrouby nejsou v kontaktu s tkání nebo kultivačním

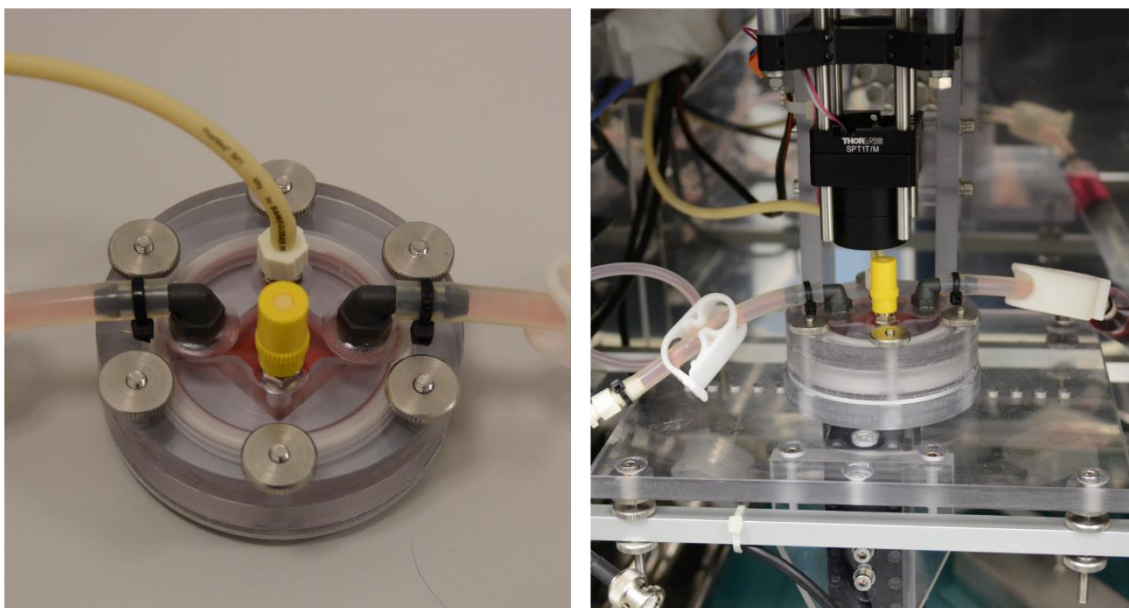
médiem. Všechny ostatní části komory jsou vyrobeny z netoxických materiálů tj. polykarbonátu, polyamidu nebo silikonu. Veškeré materiály byly testovány na potenciální cytotoxicitu. Kryty obsahují 2 fluidní porty typu Luer-Lock pro připojení sterilního septa, případně senzoru tlaku a dvě úhlové přípojky pro připojení perfuzního okruhu a stimulačního systému. Celkový pohled na kultivační komoru a její části je znázorněn na Obrázek 16. Technické řešení je popsáno podrobně v příloženém užitém vzoru (Matějka, et al. 2016b).



Obrázek 16 - Celkový pohled na sestavenou kultivační komoru (nahore). Vlevo dole řez komorou a jednotlivými částmi, uprostřed dole detail držáku tkáně s rezervoáry, vpravo dole detail decelularizované tkáně po kultivačním experimentu.

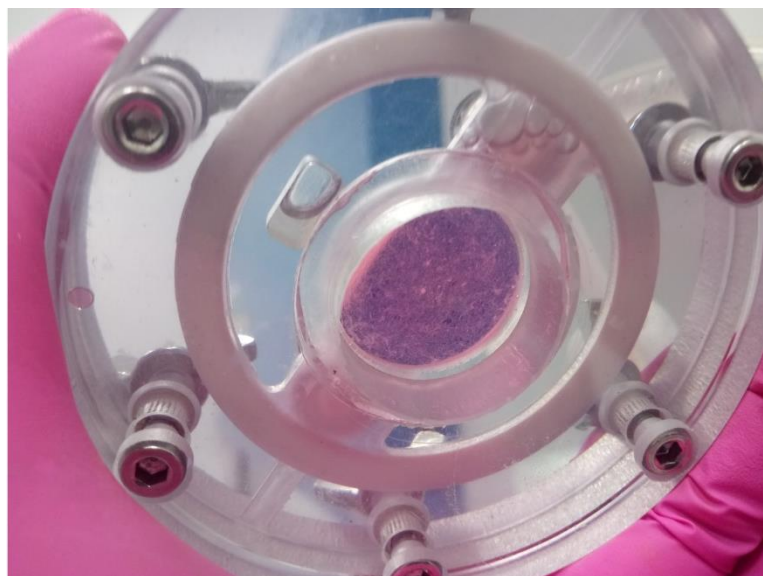
### 3.5 Modifikovaná kultivační komora pro tlakovou stimulaci na skle a silikonu

Na základě funkčního řešení komory pro tlakovou stimulaci na decelularizovaných vzorcích perikardu byla vytvořeny dvě modifikace kultivační komory. Modifikace zahrnovala úpravu pro použití standardního krycího sklíčka 24 x 24 mm. V tomto případě byla použita stejná koncepce s rozdílem, že komora měla pouze jednu osazovací stranu. Zároveň byla komora upravena pro možnost průběžného snímání mikroskopického snímání. Tato komora byla využita pro optimalizaci tlakové zátěže z hlediska diferenciací kmenových buněk směrem k hladkému svalu a studiu vlivu na proliferaci. Tento typ komory je zachycen na Obrázek 17.



Obrázek 17 - Kultivační komora pro tlakovou stimulaci na skle, vlevo sestavená komora, vpravo umístěna v mikroskopu pro živé snímání buněk.

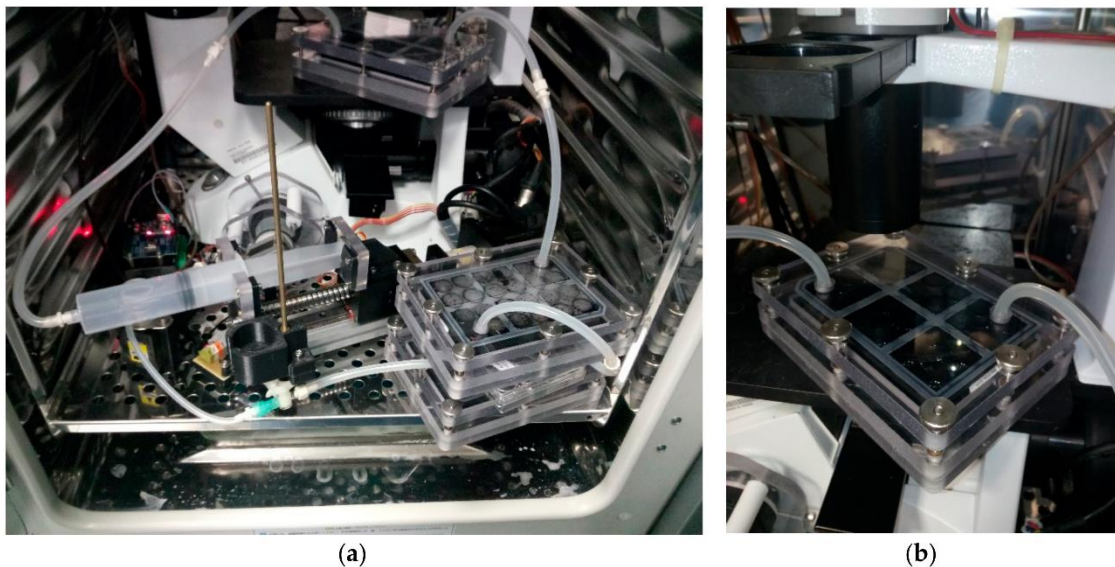
Další modifikací byla náhrad rigidního substrátu za elastický. Pro tento případ bylo upraveno dno stávající komory pro fixaci speciálních silikonových vaniček, jež byly odlity z čirého silikonu. V tomto případě kromě tlakové stimulace ještě přibyl další element stimulace v podobě víceosého natahování. Tento typ komory je znázorněn na Obrázek 18.



Obrázek 18 - Modifikace kultivační komory pro kultivaci na elastickém silikonovém substrátu. Patrná tvorba extracelulární hmoty.

### 3.6 Modifikovaná kultivační komora pro tlakovou stimulaci ve standardních kultivačních deskách

Pro testování velkého množství vzorků nebo realizace více paralelních experimentů je navržené řešení komory popsané v předchozí kapitole komplikované. Proto bylo vytvořeno obdobné řešení, jež využívá jako kultivační komoru standardizovanou více jamkovou desku (včetně i verze s 150  $\mu\text{m}$  tenkým sklem pro následnou mikroskopii). Tato deska je uzavřena a utěsněna pomocí krytů a připojena ke stimulátoru. Řešení umožňuje řazení více komor. Toto řešení bylo použito pro testování vlivu tlakové stimulace na různých materiálech, např. v rámci publikované studie o růstu buněk na fibrilární nanocelulóze (CNF) spolu s potahem uhlíkových nanotrubic (CNT) resp. víceštěnných uhlíkových nanotrubic (MWCNT). Detailní technické řešení je popsáno v příloženém užitém vzoru (Matějka, et al. 2020c). Kultivační systém s navrženou komorou je vyobrazen na Obrázek 19.



Obrázek 19 - Kultivační systém s připojenou komorou pro tlakovou stimulaci ve více jamkových deskách (a) a detail kultivační komory (b).

### 3.7 Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací

Za účelem zajištění perfuze buněčné kultury kultivačním médiem a zajištění stimulace buněk pulzními tlakovými vlnami byl také vyvinut unikátní systém. Tento systém je založen na elektronicky řízeném lineárním ovladači s připojením stříkačky a perfuzního okruhu. Platforma NI compactDAQ (National Instruments) byla použita s moduly sestávajícími z digitálních vstupních / výstupních vedení nezbytných pro řízení čerpadla

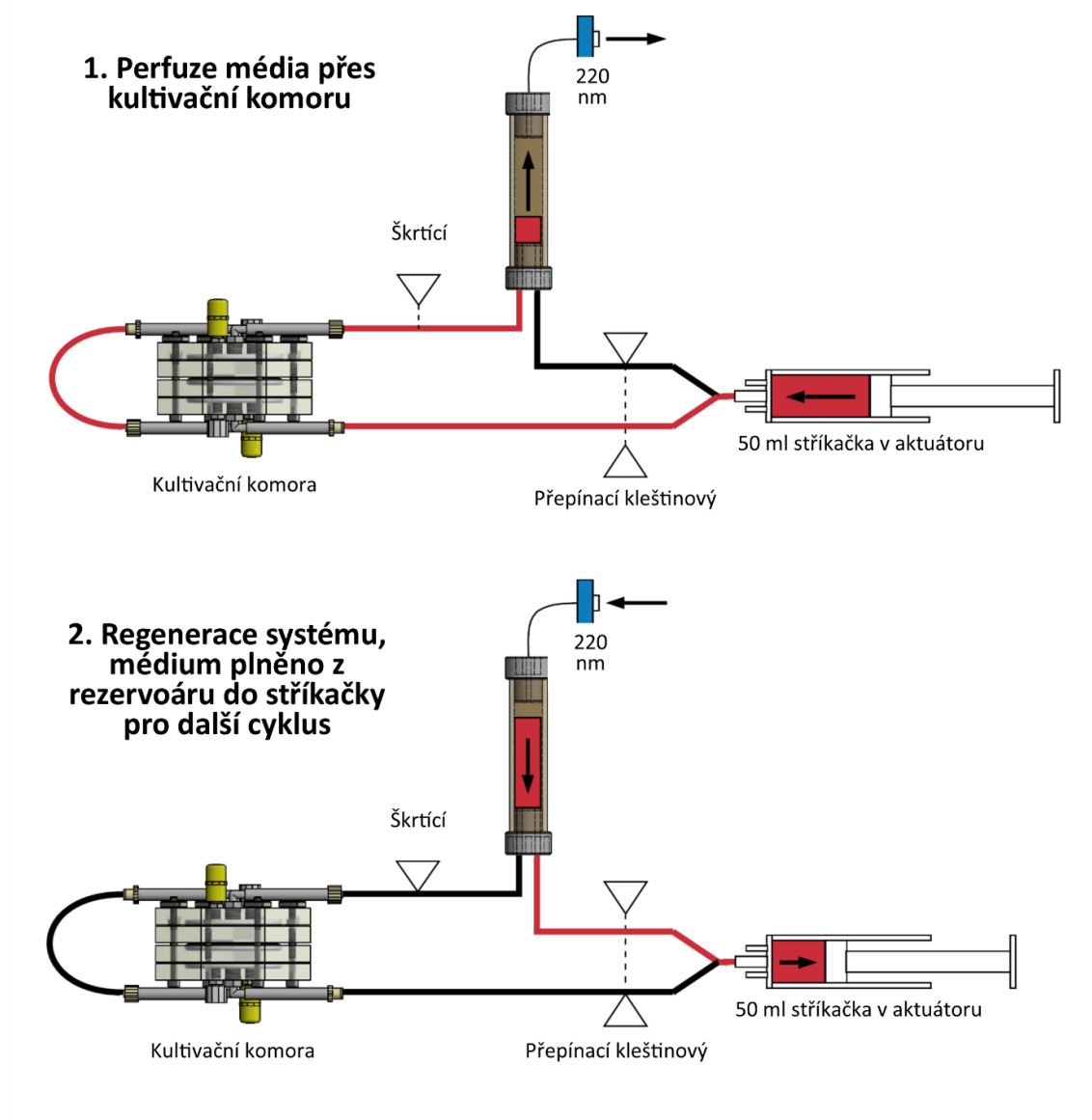
a ventilů (modul cDAQ 9401) a s analogovým modulem pro převodník tlaku (modul cDAQ 9218).

Běžným systémem pro zajištění perfuze u komerčních nebo experimentálních řešení je použití peristaltických čerpadel. Jejich nevýhodou však je, že při čerpání vytváří tlakové rázy, jež jsou způsobené postupným stlačováním okluzní hadice v čerpací hlavě. Tento negativní jev lze minimalizovat tlakovým pružníkem, což ovšem zvyšuje nároky na objem média a potenciálně vytváří místo kontaminace a vzniku bublin. Velkou výhodou řešení je, že kultivační okruh a samotné „čerpadlo“ je tvořeno sterilními díly. V případě výměny média je tak vyměněna pouze injekční stříkačka s novým kultivačním médiem. Technické řešení také umožňuje volbu různých velikostí stříkaček vzhledem k celkovému objemu média a také maximálními průtoky. Průtok je dán rychlostí posuvu pístu, jde o tzv. konstantní průtok bez pulzních vln, příp. je možné průtok modulovat pro vytvoření definované tlakové/průtokové vlny. Jistou nevýhodou na rozdíl od systému využívajícího peristaltického čerpadla je, že není možné v systému s lineárním pístovým čerpadlem zajistit kontinuální recirkulaci média. V rámci navrženého technického řešení je tento problém řešen pomocí dočasného rezervoáru, jež je při perfuzi plněn médiem protékajícím skrz kultivační komoru a poté slouží ke znovunaplnění injekční stříkačky. V tento okamžik dochází ke krátkému přerušení toku média/stimulace.

Perfuzní okruh je v tomto případě tvořen injekční stříkačkou, která v kombinaci s lineárním aktuátorem vytváří sterilní (v případě plastových stříkaček i jednorázové) pístové čerpadlo. Médium je čerpáno přes soustavu silikonových hadic a kultivační komoru do rezervoáru, kdy po jeho naplnění dojde k přečerpání zpět do injekční stříkačky.

Za injekční stříkačkou je pomocí Y spojky hadice rozdělena na dvě větve, které prochází přepínacím kleštinovým ventilem. Tento ventil zajišťuje, že vždy je průchozí pouze jedna větev. První větev pokračuje do kultivační komory a druhá je návratová z rezervoáru. Za kultivační komorou hadice prochází přes škrťací kleštinový ventil do rezervoáru (Obrázek 20). Tento ventil umožňuje kromě uzavření okruhu také modulovat průtočný odpor soustavy. V kombinaci s řízeným objemovým průtokem je také možné realizovat tlakovou stimulaci. Rezervoár obsahuje přípojku pro 220nm filtr zajišťující sterilní vyrovnání tlaku a výměnu atmosféry obohacené o CO<sub>2</sub>. Veškeré hadicové spojky

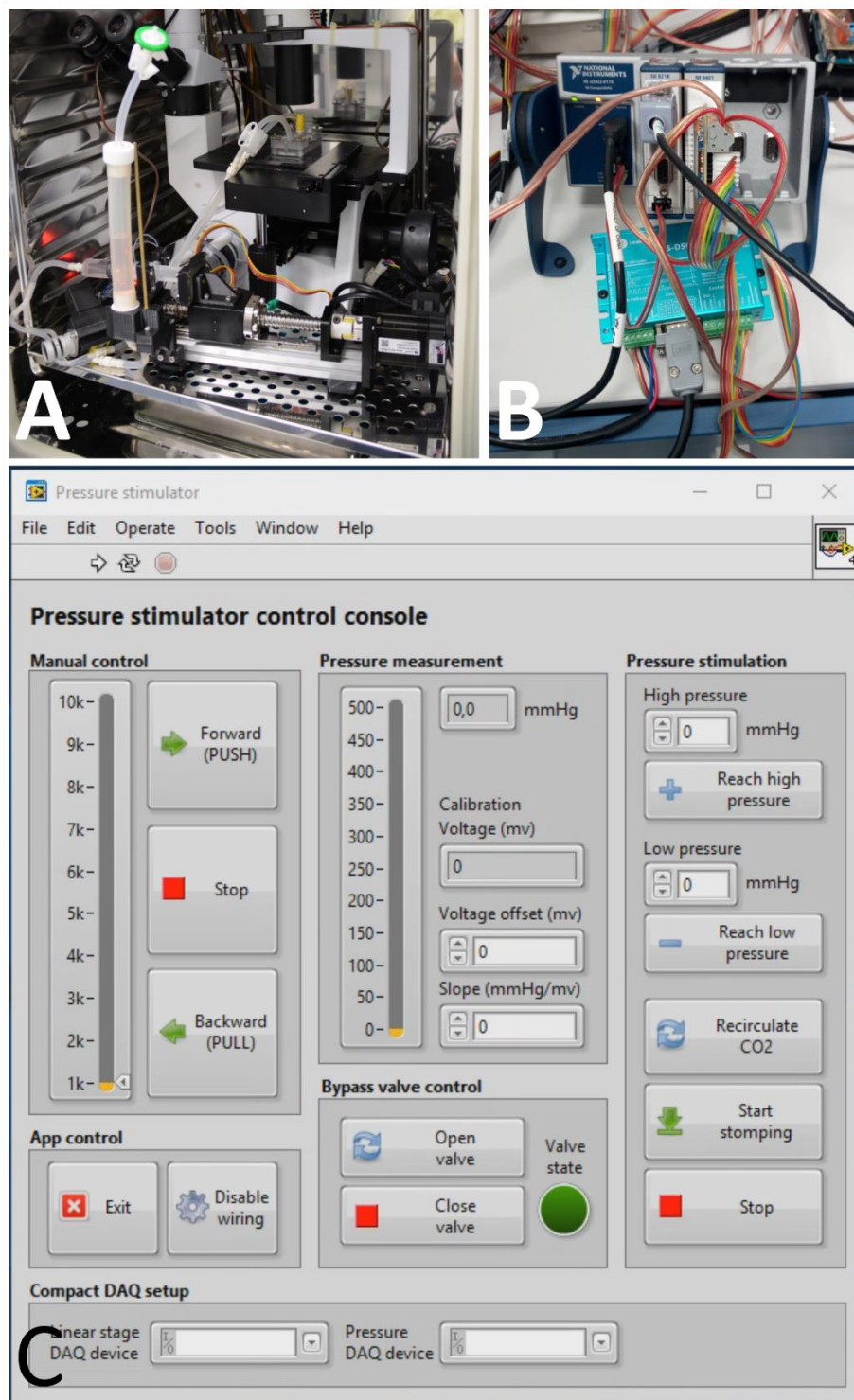
obsahují koncovky typu Luer-Lock pro standardizaci a možnost použití jednorázového lékařského materiálu.



Obrázek 20 – jednotlivé režimy mikroperfúzního systému.

K ovládání systému byl vytvořen vlastní software v LabVIEW (National Instruments). Tento software řídí pohyb lineárního ovladače a implementuje zpětnou vazbu pro stimulaci tlaku, kontroluje stav média ve stříkačce a řeší automaticky regeneraci systému a znovunaplnění injekční stříkačky. Systém a jeho řízení je upraveno pro nepřetržitý provoz s možností dálkového dohledu. Napájení systému a ovládací elektroniky je zálohované pomocí externí bateriové UPS, která je zároveň připojena k dalšímu jištěnému zdroji pro zajištění nepřetržitého provozu. Ovládací elektronika a uživatelské

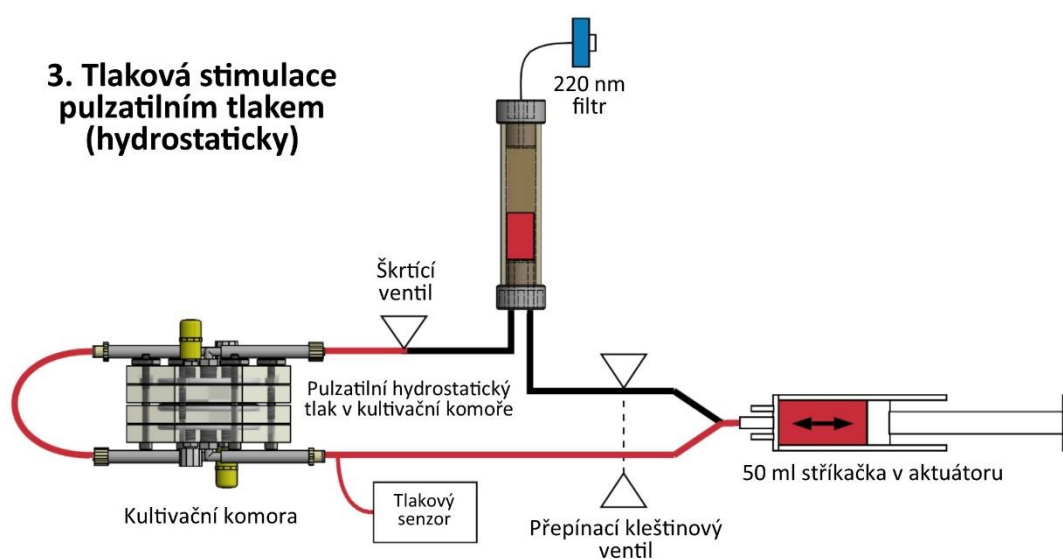
rozhraní systému je zachyceno na Obrázek 21. Technické řešení perfúzního systému je podrobně popsáno v užitém vzoru (Matějka, et al. 2020b).



Obrázek 21 - A - instalovaný perfúzní systém v buněčném inkubátoru, B - ovládací elektronika, C - uživatelské rozhraní pro nastavení parametrů.

Pro tlakovou stimulaci je v systému implementováno zpětnovazební řízení. V tomto režimu využívá systém tlakový kapalinový senzor používaný pro invazivní měření

krevního tlaku, typ TruWave (Baxter, Irvine, CA, USA). Tento senzor je připojen k pomocnému portu kultivační komory, kde snímá tlak. Řídící software umožňuje nastavení prahových tlaků a frekvence. V případě, že dochází k úniku tlaku a netěsnostem, systém vyhodnotí a upozorní obsluhu a je přepnut do nouzového režimu s minimální perfuzí. V případě tlakové stimulace, jež byla v řadě publikovaných prací použita, byl v systému využit druhý kleštinový ventil, jenž uzavřel průtok do rezervoáru. Generování hydrostatického tlaku bylo potom realizováno pohybem pístu stříkačky na základě monitorovaného tlaku v kultivační komoře. Tento režim je znázorněn na Obrázek 22.



Obrázek 22 - Perfuzní systém v režimu tlakové stimulace.

### 3.8 Metodika buněčných experimentů a analýz

Popis všech metod, které byly používány pro přípravu buněčných experimentů, tj. použité materiály, typ buněk, násady atd.; a dále analýzy, které byly použité pro stanovení výsledků jsou popsány ve člancích autora, které jsou součástí příloh.



## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Příprava decelularizovaných tkání

Detailní výsledky jsou uvedené v následujících publikacích:

**MATĚJKA, R.**, M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. LIPENSKÝ, J. CHLUPÁČ, D. TUREK, Š. PRAŽÁK, A. BROŽ, Z. ŠIMŮNKOVÁ, I. MRÁZOVÁ, S. FOROSTYAK, P. KNEPPO, J. ROSINA, L. BAČÁKOVÁ a J. PIRK Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Applied Sciences*, 2020a, 10(16).

MUSILKOVA, J., E. FILOVA, J. PALA, **R. MATEJKA**, D. HADRABA, D. VONDRASEK, O. KAPLAN, T. RIEDEL, E. BRYNDA, J. KUCEROVA, M. KONARIK, F. LOPOT, P. JAN a L. BACAKOVA Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies. *Biomed Mater*, Dec 9 2019, 15(1), 015008.

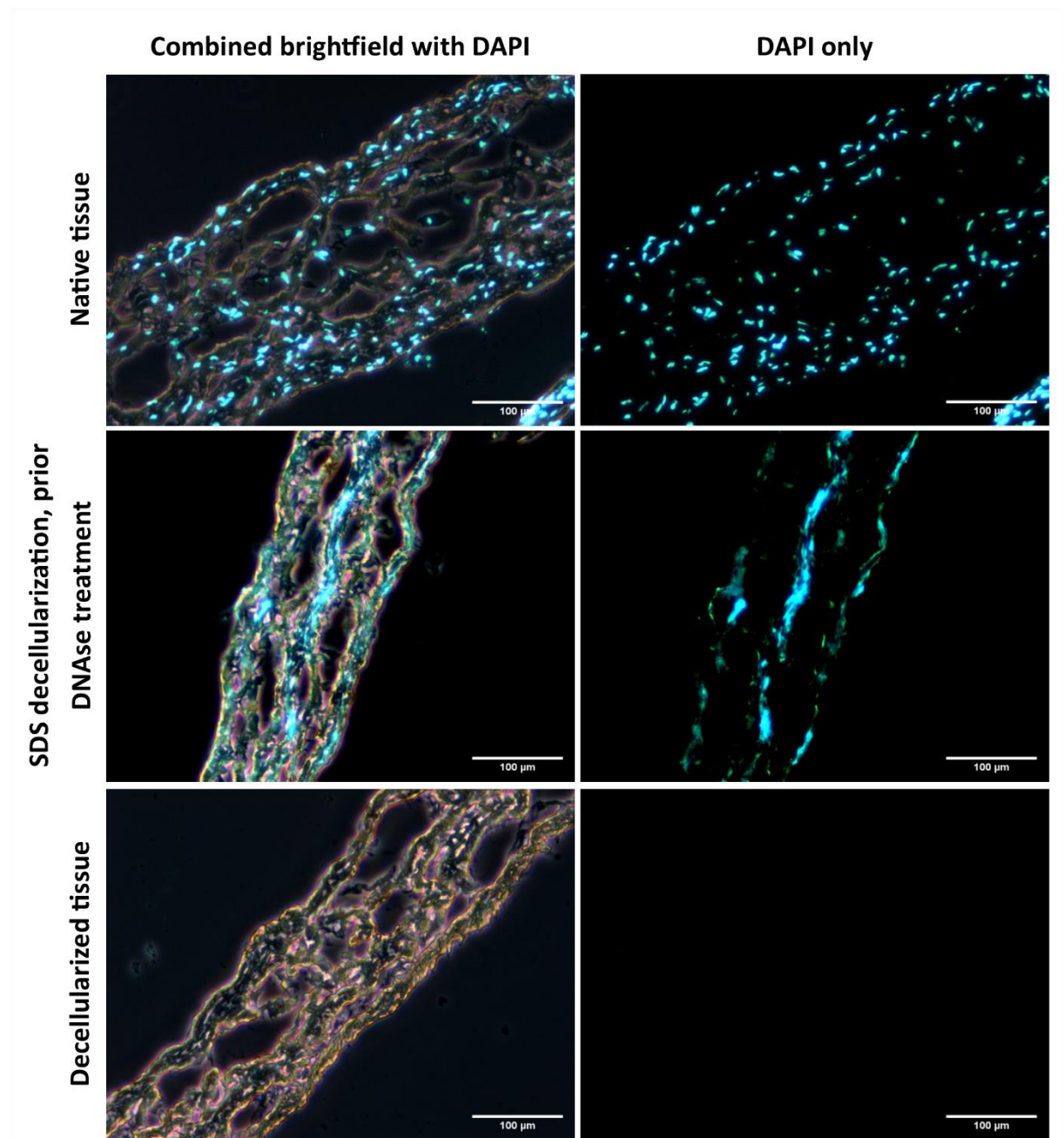
VONDRÁŠEK, D., D. HADRABA, **R. MATĚJKA**, F. LOPOT, M. SVOBODA a K. JELEN Uniaxial Tensile Testing Device for Measuring Mechanical Properties of Biological Tissue with Stress-Relaxation Test under a Confocal Microscope. *Manufacturing Technology*, 2018, 18(5), 866-872.

V rámci optimalizace procesu decelularizace tkáně bylo optimalizováno složení decelularizačních činidel, nastavení vhodných kroků a postupů pro decelularizaci. Samotná decelularizace byla hodnocena jednak histologicky na přítomnost jader nebo jejich reziduí, tak z hlediska mechanických vlastností. Původní postup ruční přípravy (Musilkova et al. 2019) za použití třepačky byl nahrazen využitím automatizovaného systému (Matějka, et al. 2020a).

Dále bylo optimalizováno složení decelularizačních činidel a jejich koncentrací. Používané byly 4% deoxycholát sodný a 0,5% dodecylsírán sodný. Na základě mechanických zkoušek bylo prokázáno že použití deoxycholátu výrazně snižuje mechanické vlastnosti tkáně oproti SDS. V případě použití SDS je elastický modul 58,91 MPa, měřeno při paralelně orientovaných vláknech, a 49,61 MPa při kolmé orientaci vláken (Vondrášek, et al. 2018). Při použití deoxycholátu je v případě paralelní orientace vláken elastický modul 11,30 MPa a 8,67 MPa v případě kolmé orientace vláken (Musilkova, et al. 2019).

Zhodnocení účinnosti procesu a optimálního nastavení jednotlivých kroků decelularizace bylo hodnoceno pomocí histologického barvení kryorezu o tloušťce 10  $\mu\text{m}$ , jež byly průběžně připravovány v průběhu decelularizace. Tyto řezy byly barveny pomocí DAPI

na přítomnost jader buněk a zbytkové DNA. Jak je patrné na Obrázek 23, tak v nativní tkáni jsou patrné jádra původních buněk (kontrolní vzorek). Po cyklech proplachu s detergentem v podobě 0,5% roztoku SDS dochází k porušení struktury původních buněk, nejsou patrná jádra. Dochází však zachycení zbytků DNA v tkáni. Proto byl použit krok zahrnující i štěpení pomocí DNAzy. Po následném proplachu již nejsou patrné jak jádra, tak zbytky DNA v tkáni. Z hlediska optimalizace procesu byla také hodnocena cytotoxicita z lyzátů a bakteriologické testy sterility.



Obrázek 23 – Průběh decelularizace prasečího perikardu. Histologické kryoseky o tloušťce 10  $\mu\text{m}$  a barvené pomocí DAPI. Nahoře nativní tkáň s patrnými jádry buněk. Uprostřed tkáň po cyklech SDS před použitím DNAzy s patrnými zbytky DNA. Dole plně decelularizovaná tkáň bez patrných zbytků jader a DNA.

Vytvořený protokol decelularizace zahrnující decelularizační činidla jako je SDS a DNAza spolu s oplachem demineralizovanou vodou byl implementován do nastavení systému na základě prací autorů (Crapo, et al. 2011) a (Gilbert et al. 2006). Mnoho popsaných metod vyžaduje opakované kroky zahrnující změnu decelularizačních činidel nebo vody po určité době, aby se udržel gradient chemické koncentrace. Ke zlepšení způsobu a zajištění homogenní decelularizace se používá třepání v třepačce. Tyto kroky mohou být časově náročné. Pro usnadnění těchto kroků a zajištění nepřetržité automatizace celého procesu byl vytvořen nový systém pro automatickou decelularizaci, popsaný v kapitole 3.1. Tento systém implementuje cyklický proces výměny činidel a promývací vody na základě požadovaného nastavení, čímž nahrazuje ruční výměnu a zajišťuje nepřetržitý provoz. Rovněž byla použita speciální kultivační komora fixující tkán a zajišťující proudění použitých tekutin optimálně okolo celé plochy tkáně, čímž se zlepšuje homogenita.

Jak je ukázáno na Obrázek 23, nativní tkáň má jasně viditelná buněčná jádra, zatímco u plně decelularizovaných tkání nejsou viditelná ani buněčná jádra, ani zbytky DNA. Buněčná kultivace jak v dynamickém systému, tak ve statických podmínkách také ukázala, že takto připravená decelularizovaná tkáň je vhodná pro následnou rekolonizaci pomocí buněk, což bylo využito v dalších experimentech (Obrázek 30).

Lze proto shrnout, že tento protokol implementovaný do vytvořeného systému pro automatizovanou decelularizaci tkání poskytuje decelularizovanou tkáň vhodnou pro další modifikaci nebo rekolonizaci buňkami. Celý proces je optimalizovaný tak, že takto připravenou tkáň je možné získat za 24 hod. bez nutnosti zásahu do procesu nebo manipulaci s tkání. Tento proces byl otestován jak pro prasečí, tak ovčí perikardy, jež dále slouží pro přípravu implantabilních cévních záplat na alogenní i xenogenní bázi (Abdolghafoorian et al. 2017; Boccafoschi et al. 2017; Lin et al. 2018).

Stejně tak i z hlediska mechanických vlastností bylo ověřeno, že metoda je vhodná a poskytuje tkáň s podobnými vlastnostmi, jaké jsou používané pro komerčně používané implantabilní tkáně na bázi decelularizovaných bovinních a porcinních perikardů, nebo jejich modifikaci pomocí kroslinkování glutaraldehydem (Gauvin et al. 2013; Hülsmann et al. 2012)

## 4.2 Podpora endotelizace povrchů a vliv smykového napětí

Detailní výsledky jsou uvedené v následujících publikacích:

CHLUPAC, J., E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, **R. MATEJKA**, T. RIEDEL, M. HOUSKA, E. BRYNDA, E. PAMULA, M. RÉMY, R. BAREILLE, P. FERNANDEZ, R. DACULSI, C. BOURGET, L. BACAKOVA a L. BORDENAVE The gene expression of human endothelial cells is modulated by subendothelial extracellular matrix proteins: Short-term response to laminar shear stress. *Tissue Engineering - Part A*, 2014 2014, 20(15-16), 2253-2264.

**MATEJKA, R.**, J. ROSINA, E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, J. CHLUPAC a J. STEPANOVSKA. Automated dynamic bioreactor for 2D endothelial structures. In 2013 E-Health and Bioengineering Conference, EHB 2013. 2013. – rozšířený recenzovaný konferenční abstrakt

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a E. FILOVÁ Česká republika Užitný vzor 30441. 7.3.2017.

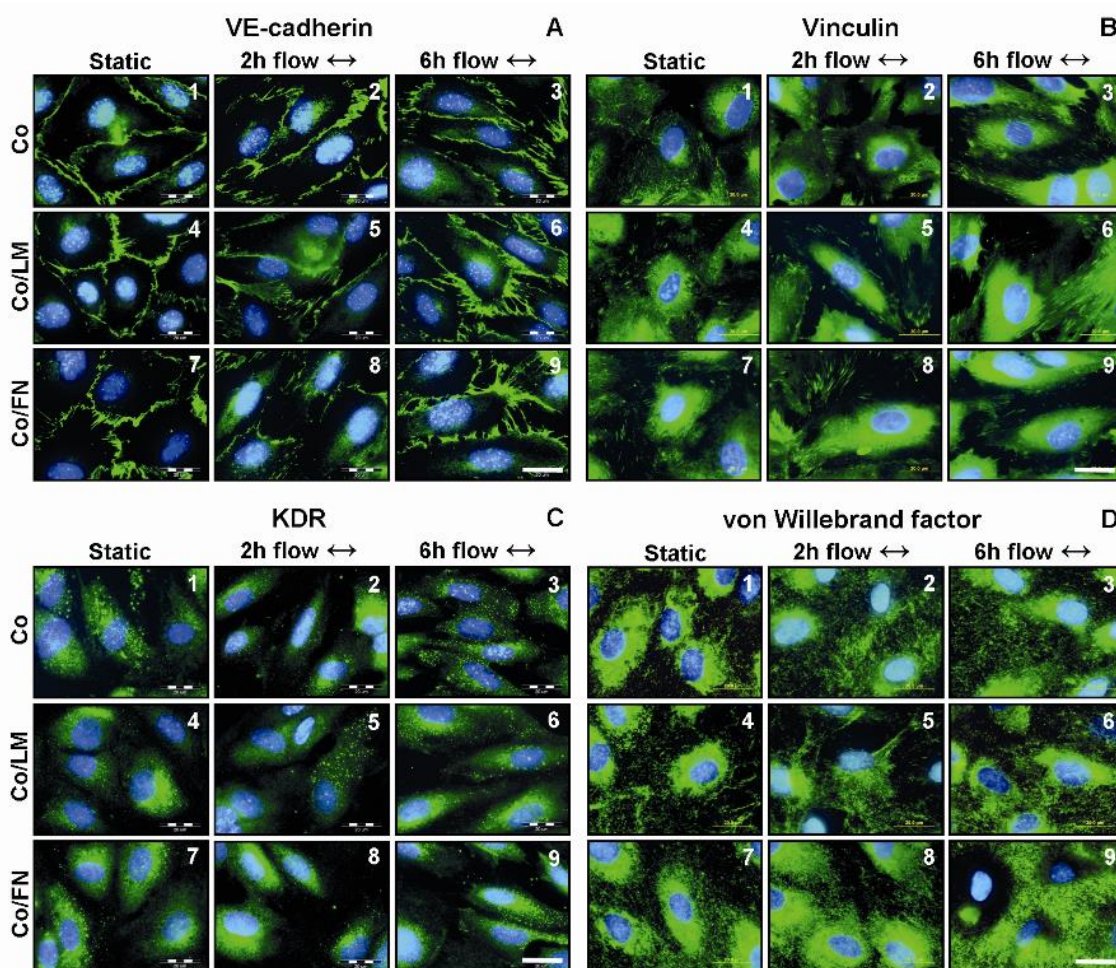
České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ a J. ZÁRUBOVÁ Česká republika Užitný vzor 31066. 3.10.2017.

Nedostatek funkčního endotelu na vnitřní straně vaskulárních štěpů malého průměru vede k intimální hyperplazii a trombotické okluzi. Jednou z možností pro potlačení těchto negativních jevů je endotelizace vaskulární protézy (Deutsch et al. 2009; Herring et al. 1984). Pouhé nasazení buněk je však z hlediska aplikace problematické z hlediska adheze buněk a retence buněk při vystavení proudění a smykovému napětí v *in vivo* podmínkách. Modifikací povrchu biokompatibilními proteiny běžnými v extracelulární hmotě je možné podpořit adhezi buněk a jejich růst (De Visscher et al. 2012; Stegemann, et al. 2007; Williams et al. 2011). Další možnost představují kultivační bioreaktory které simulují fyziologickou zátěž postupně pro prekondicionování buněčné kultury na povrchu této protézy (Chien 2007; Li et al. 2005; Vara et al. 2008).

Právě pro tyto potřeby byl využit navržený kultivační dynamický systém s definovaným smykovým napětím. Kultivace buněk HSVEC (lidský endotel z v. *saphena*) byla nasazen na skříčka modifikované kolagenem I (Co), kolagenem s navázaným lamininem (Co / LM) a kolagenem s navázaným fibronectinem pro zvýšení schopnosti adheze buněk. Takto připravené kultury byly vystaveny krátkodobému laminárnímu smykovému napětí

o velikosti  $12 \text{ dyn/cm}^2$  (1,2 Pa). Volba těchto povrchů byla uvažována pro případnou modifikaci cévních protéz pro zvýšení schopnosti adheze endotelových buněk na umělých protézách.

Již po krátkodobém vystavení buněk laminárnímu smykovému napětí je vidět jejich změna v morfologii, kdy dochází ke změně z dlaždicového tvaru (typického pro statickou kultivaci endotelových buněk) ve fyziologicky protáhlý tvar ve směru proudění, jak je znázorněno na Obrázek 24.



Obrázek 24 - Morfologie HSVEC na kolagenu (Co), Co / LM a Co / FN. Imunofluorescence VE-kadherinu (A1–9), Vinculin (B1–9), KDR (C1–9) a vWF (D1–9) (zelená), jádra buněk kontrastně barvená Hoechstem (modrá). Proudění je zleva doprava, jak je naznačeno obousměrnými šipkami. Epifluorescenční mikroskop Olympus IX50, Olympus Digitální fotoaparát DP70, zvětšení 100, stupnice měřítka = 20 mm. Obrázek publikován v (Chlupac, et al. 2014).

Navzdory rozdílům v drsnosti jednotlivých povrchů a smáčivosti nebyly pozorovány žádné rozdíly v adhezi a růstu endoteliálních buněk ve statických podmínkách. Na rozdíl tomu buňky kultivované v dynamických podmínkách kultivované na Co/LM a Co/FN vykazovaly větší adhezi a rezistenci na průtok oproti čistému kolagenu Co. Genová exprese spolu imunofluorescenčním barvením také poukázala na to, že kombinované

povrchy Co/LM a CO/FN jsou vhodnější pro možnou modifikaci umělých cévních náhrad, protože podporují interakci buňky a materiálu. V rámci dynamické kultivace je ještě zvýšená interakce mezibuněčných kontaktů.

Role subendoteliální extracelulární hmoty a její vliv na smykové napětí byla studována na řadě povrchů obsahujících kolagen I, laminin a fibronektin. Obecně kolagen I podporuje adhezi endotelových buněk k povrchu, ovšem v případě vystavení vyšším smykovým napětím ( $> 20 \text{ dyn/cm}^2$ ) dochází k odtržení buněčné kultury z povrchu (Feugier et al. 2005). Proto byly vytvořeny kompozity kolagenu I s lamininem (Co/LM) a kolagenu I s fibronektinem. Laminin je jedním z proteinů bazální membrány podporující buněčnou adhezi a angiogenezi (Malinda et al. 1999). Jeho kovalentní navázání na ePTFE protézy také podpořila endotelizaci vnitřního povrchu (Williams, et al. 2011). Fibronektin je zase protein přítomný v mnoha buněčných procesech zahrnujících buněčnou proliferaci a migraci, jež jsou důležité pro celkovou remodelaci poškozených cév (Schwartz a Assoian 2001).

### **4.3 Vliv tlakové stimulace na proliferaci kmenových a stromálních buněk diferenciací směrem k hladkému svalu**

#### **4.3.1 Dynamická kultivace na skle a fibrinové síti a nanovláčném substrátu**

Detailní výsledky jsou uvedené v následujících publikacích:

BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, **R. MATĚJKA**, J. STEPANOVSKA, J. MUSILKOVA, J. ZARUBOVA a M. MOLITOR. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. In K. SAKUMA ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. IntechOpen, 2018.

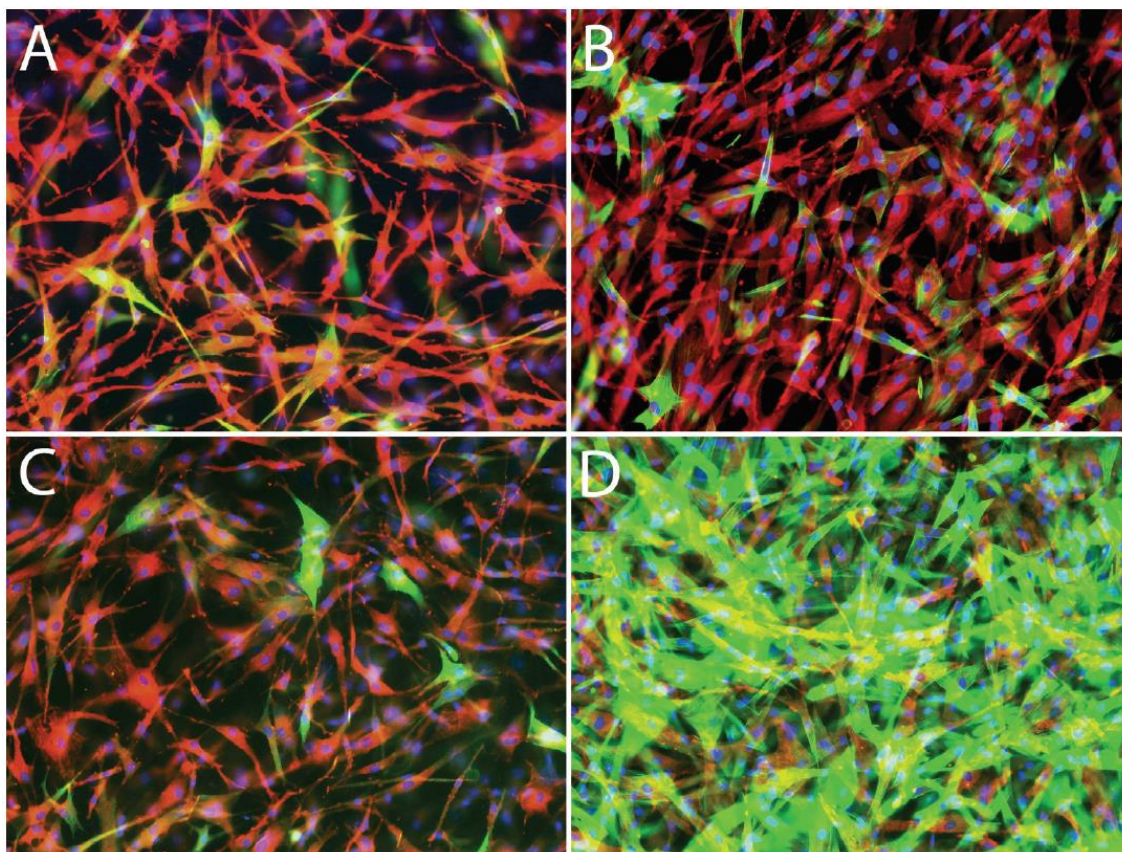
BACAKOVA, L., J. PAJOROVA, M. TOMKOVA, **R. MATEJKA**, A. BROZ, J. STEPANOVSKA, S. PRAZAK, A. SKOGBERG, S. SILJANDER a P. KALLIO Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. *Nanomaterials* (Basel), Jan 23 2020, 10(2).

České vysoké učení technické v Praze, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Institut klinické a experimentální medicíny. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, Š. PRAŽÁK, L. BAČÁKOVÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Česká republika Užitný vzor 33916.14.4.2020.

Dynamická kultivace kmenových (stromálních) ASC nebo i fenotypicky maturovaných SMC buněk je důležitým nástrojem pro obnovení a zachování kontraktilního diferencovaného fenotypu těchto buněk (Huang a Niklason 2014; Tschoeke et al. 2009). Opakovaně bylo prokázáno, že diferenciaci směrem k SMC nebo vaskulárním SMC (VSMC) vyžaduje pulsatilní cyklickou zátěž, tj. složky hemodynamického stresu, jež jsou vystaveny cévy a jejich stěna *in vivo* (Kurpinski *et al.* 2006).

Pozitivní účinky tlakové stimulace na diferenciaci lidských kmenových buněk ASC směrem k VSMC byly nalezeny i v případě našich experimentů realizovaných ve výše popsaném kultivačním systému. Pro zvýšení adheze buněk byla sklička potažena tenkým fibrinovým gelem popsaným v publikaci (Riedel et al. 2009). Kultura ASC buněk s počáteční hustotou cca. 70 000 buněk/cm<sup>2</sup> byla kultivována po dobu 3 a 7 dnů ve statické kultuře a dynamickém systému s tlakovou stimulací. Tato stimulace byla nastavena na fyziologickou hodnotu 120/80 mmHg (15,9/10,6 kPa) a rychlost pulzu simulující 60 úderů za minutu (1 Hz). V kultivačním médium bylo dále přidáno 2,5 ng/ml TGF-β1 a 2,5 ng/ml BMP-4.

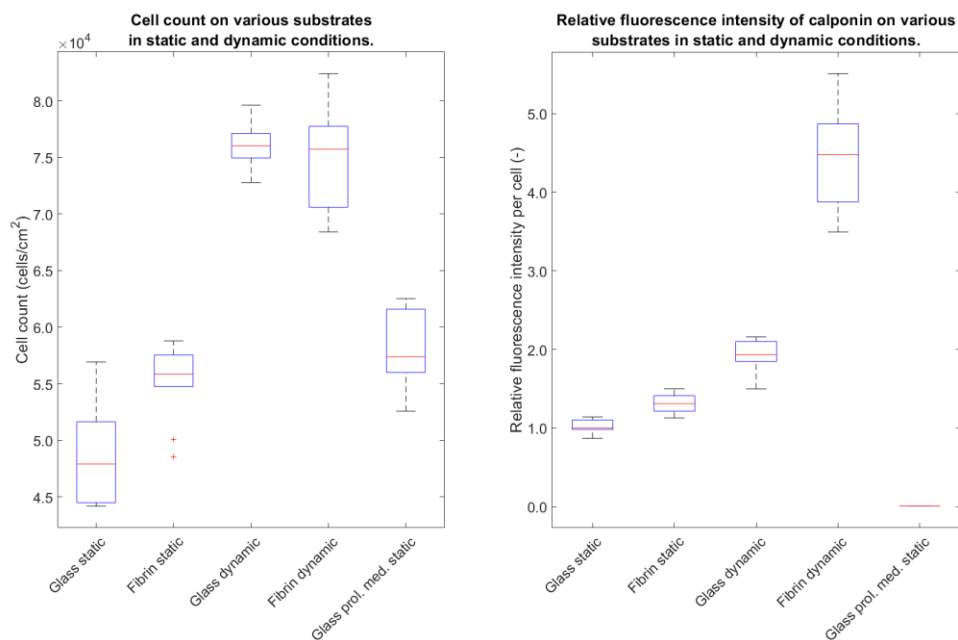
Tlakové zatížení výrazně podporovalo proliferaci ASC po 3 dnech (Obrázek 25B) a po 7 dnech (Obrázek 25D) oproti statické kontrole (Obrázek 25A a C). ASC byly pozitivně obarveny na α-aktin na všech vzorcích. V případě dynamické kultivace navíc byl navýšený počet buněk v případě dynamické kultivace 7. den kultivace (Obrázek 25D). To naznačuje, že diferenciaci ASC do VSMC v přítomnosti TGF-β1 a BMP-4 byla významně zvýšena dynamickým tlakovým zatížením.



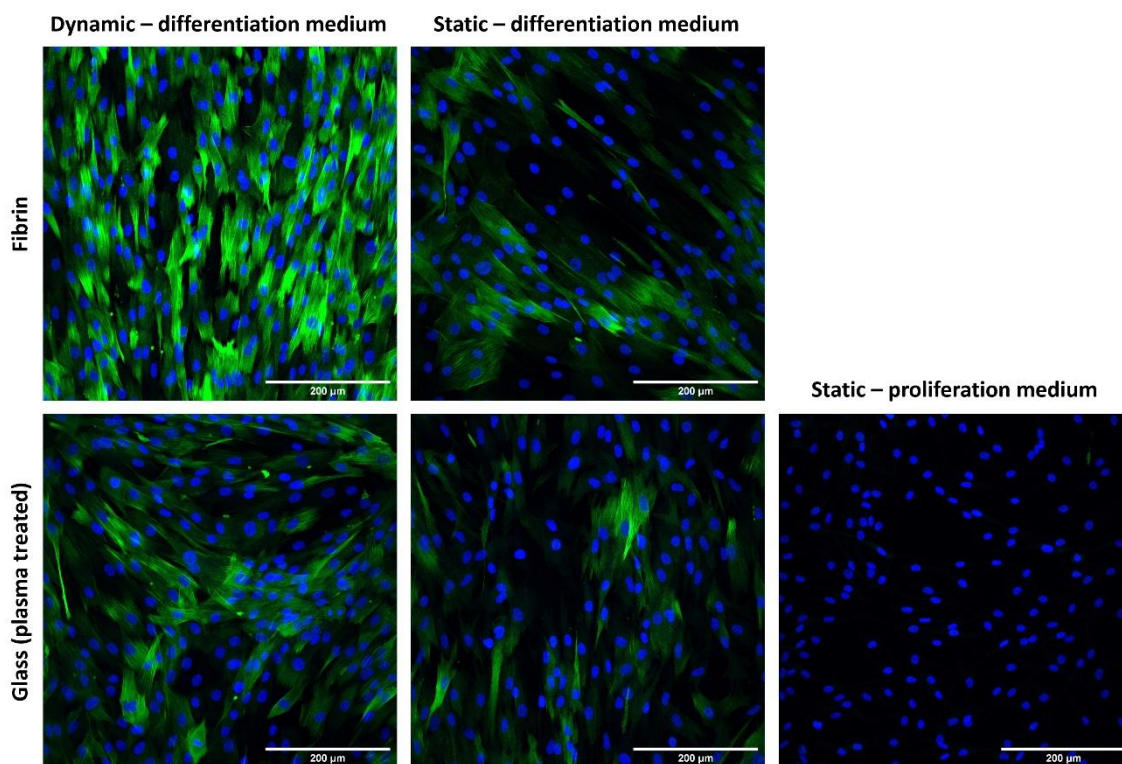
Obrázek 25 - Imunofluorescenční barvení  $\alpha$ -aktinu (červená) a kalponinu (zelená) u ASC kultivovaných na fibrinovém gelu na skle za statických podmínek (A, C) a za dynamických podmínek (B, D), A, B: 3 dny kultivace; C, D: 7 dní kultivace. Jádra buněk jsou kontrastně barvena Hoechstem # 33258. IX71 Olympus mikroskop, digitální fotoaparát DP71, obj.  $\times 10$ .

Toto bylo potvrzeno i v rámci dalších (zatím nepublikovaných výsledků). Kde byly ve stejném systému lidské ASC buňky vystaveny dynamické zátěži po dobu 3 dnů a byl srovnán vliv fibrinového gelu na jejich proliferaci a diferenciaci. Kultivace opět probíhala v médiu obsahujícím TGF-  $\beta$ 1 a BMP-4. Jako kontrola bylo také použito tzv. proliferační médium, určené pro růst buněk a zabraňující jejich diferenciaci, obsahující FGF-2.





Obrázek 26 - Počty buněk na daném substrátu při statické a dynamické kultivaci (vlevo), relativní intenzita fluorescence vtažená na počet buněk H1 kalponinu u statické a dynamické kultivace.

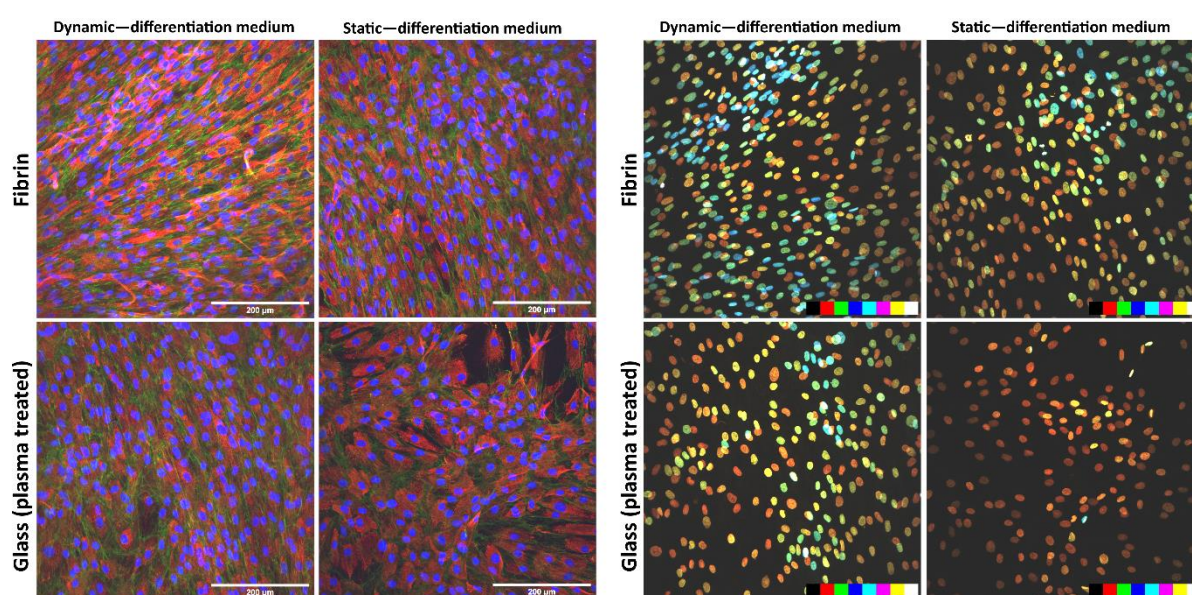


Obrázek 27 - imunofluorescenčně barvený H1-kalponin při různých typech kultivace na skle a fibrinovém potahu.

Proliferace ASC v různých kultivačních prostředích byla stanovena na základě počtu buněk a morfologie buněk. Ve statických podmínkách nebyl významný rozdíl v hustotě buněčné populace; byl však patrný trend, že počet buněk byl na fibrinovém gelu mírně vyšší, viz Obrázek 26. Fibrinová síť také podpořila paralelní buněčnou orientaci v kultuře

za statických i dynamických podmínek, jak je patrné na Obrázek 27 v horní části. Došlo k významnému nárůstu počtu buněk (cca 1,5krát) v dynamických podmínkách ve srovnání se statickým podmínkám kultivace. V dynamických podmínkách nedošlo k významnému rozdílu v počtu buněk mezi jednotlivými substráty; buňky však tvořily vícevrstvé shluky. Tyto shluky pak ovlivnily vyšší rozptyl naměřených dat. Toto je také dokumentováno barevně značenou projekcí na Obrázek 28.

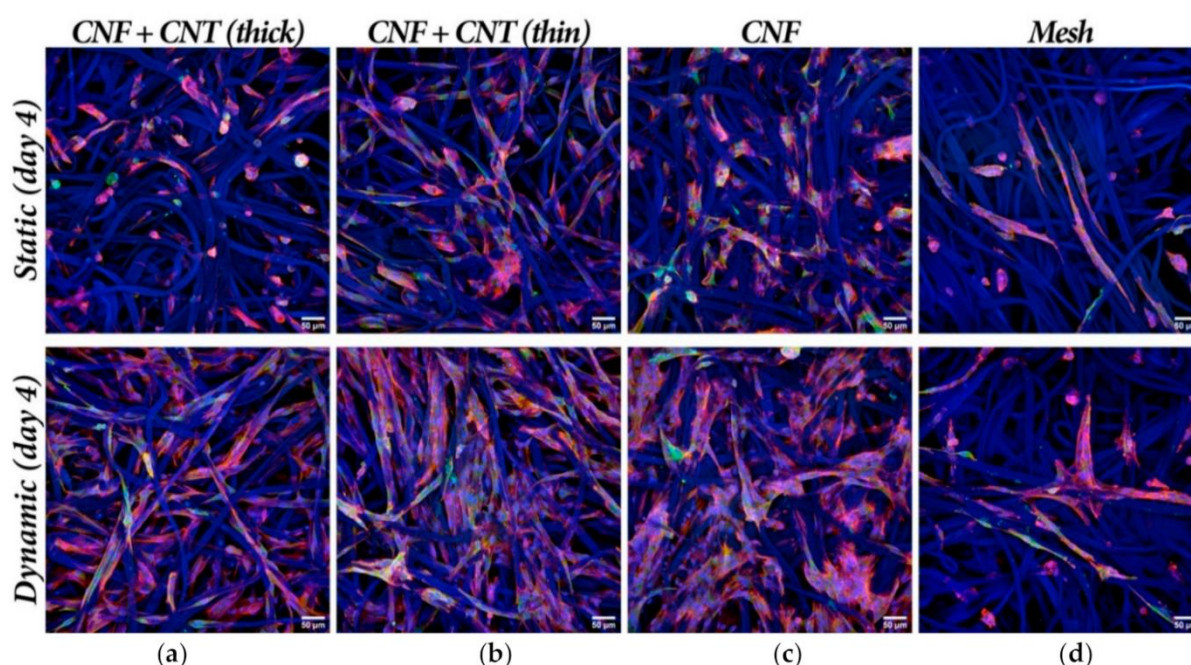
Analýza fluorescenčních obrázků také prokázala významný rozdíl mezi statickou a dynamickou kultivací jak u skla, tak fibrinu ve srovnání se všemi ostatními vzorky. Samotný rozdíl mezi typy substrátu v případě stejného typu kultivace není signifikantní.



Obrázek 28 - Vlevo imunofluorescenčně značený kolagen I (červeně) a fibronectin (zeleně) u statické a dynamické kultivace na skle a fibrinu. Vpravo barevně kódovaná (podle hloubky) jádra buněk.

Imunofluorescenční barvení fibronectinu a kolagenu I bylo použito pro analýzu tvorby extracelulárních proteinů a také pro celkové vyhodnocení morfologie buněčných kultur pěstovaných za různých podmínek, viz Obrázek 28. Fibrinem potažené sklo podporovalo paralelní orientaci buněk, což vedlo k homogenně orientovaným fibronectinovým vláknům. V dynamických podmínkách na skle byly také pozorovány oblasti s orientovanými buňkami. Na skle za statických podmínek byly buňky orientovány zcela náhodně. Zajímavostí je také, že dynamická kultivace pomohla k formaci vícevrstvých struktur, jak je patrné na barevně kódované projekci jader na Obrázek 28 vpravo. U dynamické kultivace jsou patrné až 3 nebo 4 vrstvy buněk. Vzhledem ke krátké době kultivace, pouze 3 dny, jsou tyto vícevrstvé formace ve formě shluků.

Dynamická kultivace buněk výrazně zlepšila adhezi a následný růst buněk PrASC (mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně prasete) i na nanocelulózových substrátech. Buňky byly lépe rozprostřeny a jejich počet po třech dnech dynamické kultivace byl výrazně vyšší než v odpovídajících vzorcích inkubovaných za statických podmínek po dobu čtyř dnů (Obrázek 29). Zlepšení kolonizace buněk dynamickou kultivací bylo pozorováno zejména u vzorků s tenkým povlakem CNF + MWCNT. Na silném i tenkém povlaku CNF + MWCNT byly buňky za dynamických podmínek distribuovány téměř homogenně, zatímco na čistém povlaku CNF měly buňky tendenci vytvářet shluky. Lze proto učinit závěr, že přidání MWCNT do kationtových CNF zlepšilo kolonizaci materiálu PrASC za dynamických podmínek buněčné kultury (Bacakova, et al. 2020).

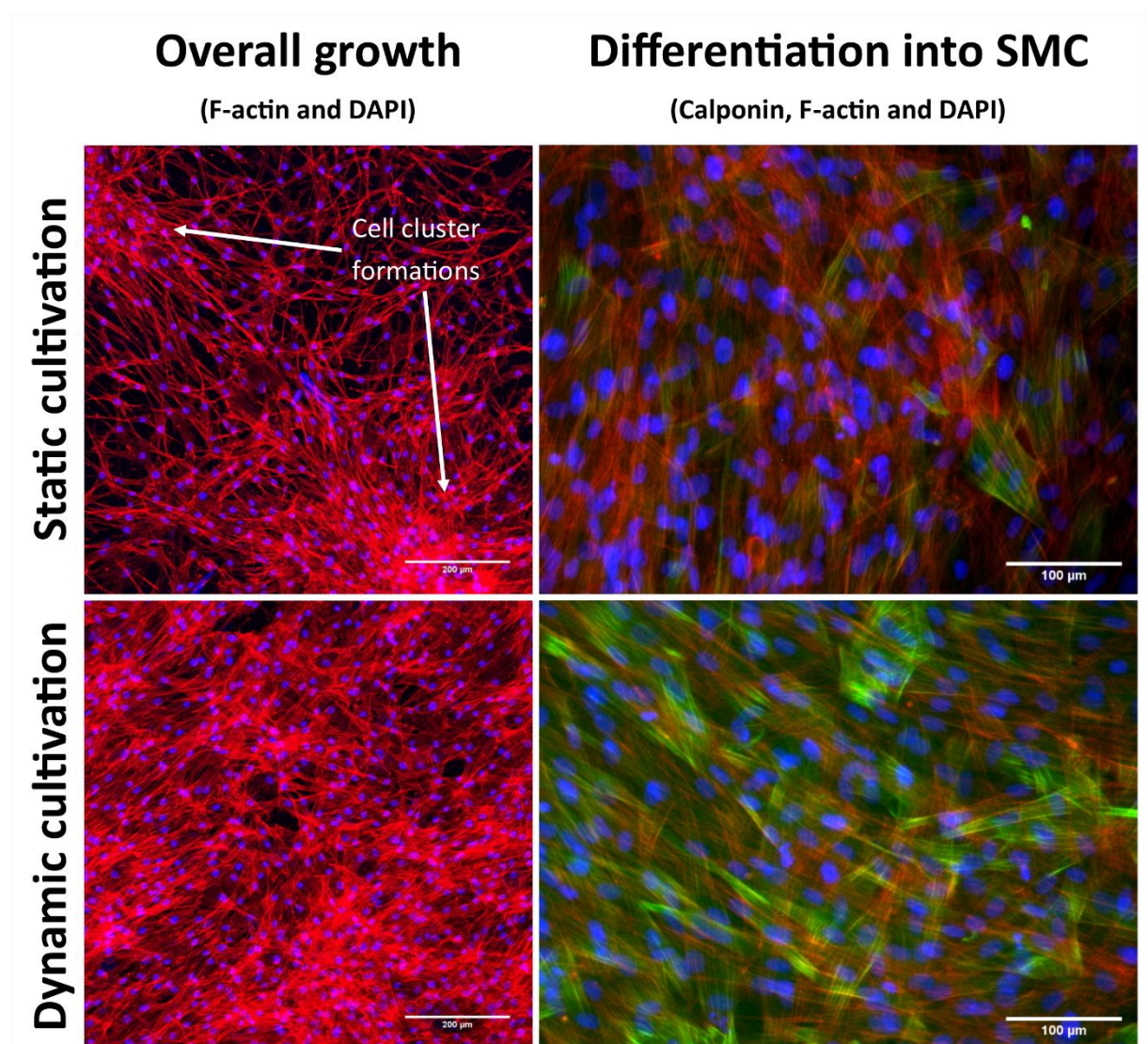


Obrázek 29 – Kmenové (stromální) buňky z prasečí tukové tkáně (PrASC) kultivované v statickém a dynamickém buněčném kultivačním systému vytvářejícím tlak po dobu tří dnů. Buňky byly pěstovány na celulóze sítí s tlustým nebo tenkým povlakem CNF + MWCNT (sloupec (a) a (b)), s povlakem CNF (sloupec (c)) a bez jakéhokoli povlaku (sloupec (d)). Buňky byly obarveny imunofluorescencí na vinculin (zelený), s TRITC-konjugovaným falloidinem pro zobrazení F-aktinu (červený) a DAPI pro jádra (modrý). Celulóze síť měla v modrém kanálu autofluorescenci. Konfokální mikroskop Dragonfly 503 s kamerou Zyla 4.2 PLUS sCMOS, objektiv HC PL APO 20x / 0,75 IMM CORR CS2. Měřítko: 50 μm.

#### 4.3.2 Dynamická kultivace na decelularizované tkáni

Analýza růstu a diferenciaci buněk na povrchu decelularizované matrice ukázala, že mezi statickou kultivací a dynamickou kultivací je hlavní rozdíl po 10 dnech kultivace. Jak je znázorněno na Obrázek 30, buňky vytvářejí za statických podmínek shluky místo toho,

aby se rovnoměrně šířily po celém povrchu. Signál h1-kalponinu je také slabší a je přítomen v menším počtu buněk. Za dynamických podmínek se však vytvoří homogenní buněčná vrstva a h1-kalponin je přítomen ve většině buněk, včetně buněk s dobře vyvinutými kalponinovými vlákny. V tomto případě lze za dynamických kultivačních podmínek pozorovat také zvýšený růst buněk a celkově lepší růst buněk na povrchu decelularizované tkáně.



Obrázek 30 - Růst a diferenciace PrASC na decelularizovaném porcinním perikardu.

Pozitivní účinek na diferenciaci kmenových buněk směrem k SMC byl prokázán ve studiích využívajících kombinaci růstových faktorů TGF- $\beta$ 1 a BMP-4. To vedlo ke zvýšení produkce specifických diferenciačních markerů cytoskeletálních proteinů, jako je  $\alpha$ -aktin a h1-calponin, které jsou přítomny pouze v diferencovaných SMC po 7 a více dnech statické kultivace (Lagna et al. 2007). Diferenciaci buněk vůči fenotypu SMC lze

dále zvýšit vhodnou mechanickou stimulací v dynamickém systému. Pozitivní účinek mechanické stimulace na diferenciaci vůči SMC byl popsán pro buňky kultivované i bez přítomnosti TGF- $\beta$ 1 a BMP-4 (Bacakova et al. 2018b; Dan et al. 2015). Kromě toho mechanická stimulace pomáhá udržovat buňky v diferencovaném stavu a zabraňuje dediferenciaci (Wang et al. 2010).

Buňky byly mechanicky zatěžovány cyklickým hydrostatickým tlakem o prahových hodnotách 120/80 mmHg (15.9/10.6 kPa). Tato stimulace indukovala diferenciaci PrASC buněk do fenotypu SMC, jak prokazuje exprese H1-kalponinu. V této souvislosti byly popsány dvě mechanosenzitivní signální dráhy spojené s diferenciací SMC: dráha spojená s RhoA a dráha spojená s FAK kinázou. Aktivace těchto signálních drah vede ke zvýšené syntéze markerů diferenciaci SMC v buňkách (Miralles, et al. 2003). V analogické studii (Kobayashi et al. 2004b) také našli zvýšenou expresi SMC markerů ve stromálních buňkách kostní dřene krys při tlakové zátěži. Stejně tak v rámci prací (Maul, et al. 2007; Maul, et al. 2011) došlo ke zvýšení produkci SMC markerů, kde byly krysí stromální buňky kultivovány na sklíčkách potažených kolagenem I při tlakové a kombinované tlakově-elastické zátěži.

#### 4.4 Recelularizace decelularizovaných tkání pro přípravu implantabilních cévních náhrad v kultivačním bioreaktoru

Detailní výsledky jsou uvedené v následujících publikacích:

**MATĚJKA, R.**, M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. LIPENSKÝ, J. CHLUPÁČ, D. TUREK, Š. PRAŽÁK, A. BROŽ, Z. ŠIMŮNKOVÁ, I. MRÁZOVÁ, S. FOROSTYAK, P. KNEPPO, J. ROSINA, L. BAČÁKOVÁ a J. PIRK Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. Applied Sciences, 2020a, 10(16).

České vysoké učení technické v Praze, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, P. KNEPPO, E. BRYNDA, T. RIEDEL, E. FILOVÁ, M. TRÁVNÍČKOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a Z. RIEDELOVA Česká republika Užitený vzor 30705. 30.5.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Česká republika Užitený vzor 33917.14.4.2020.

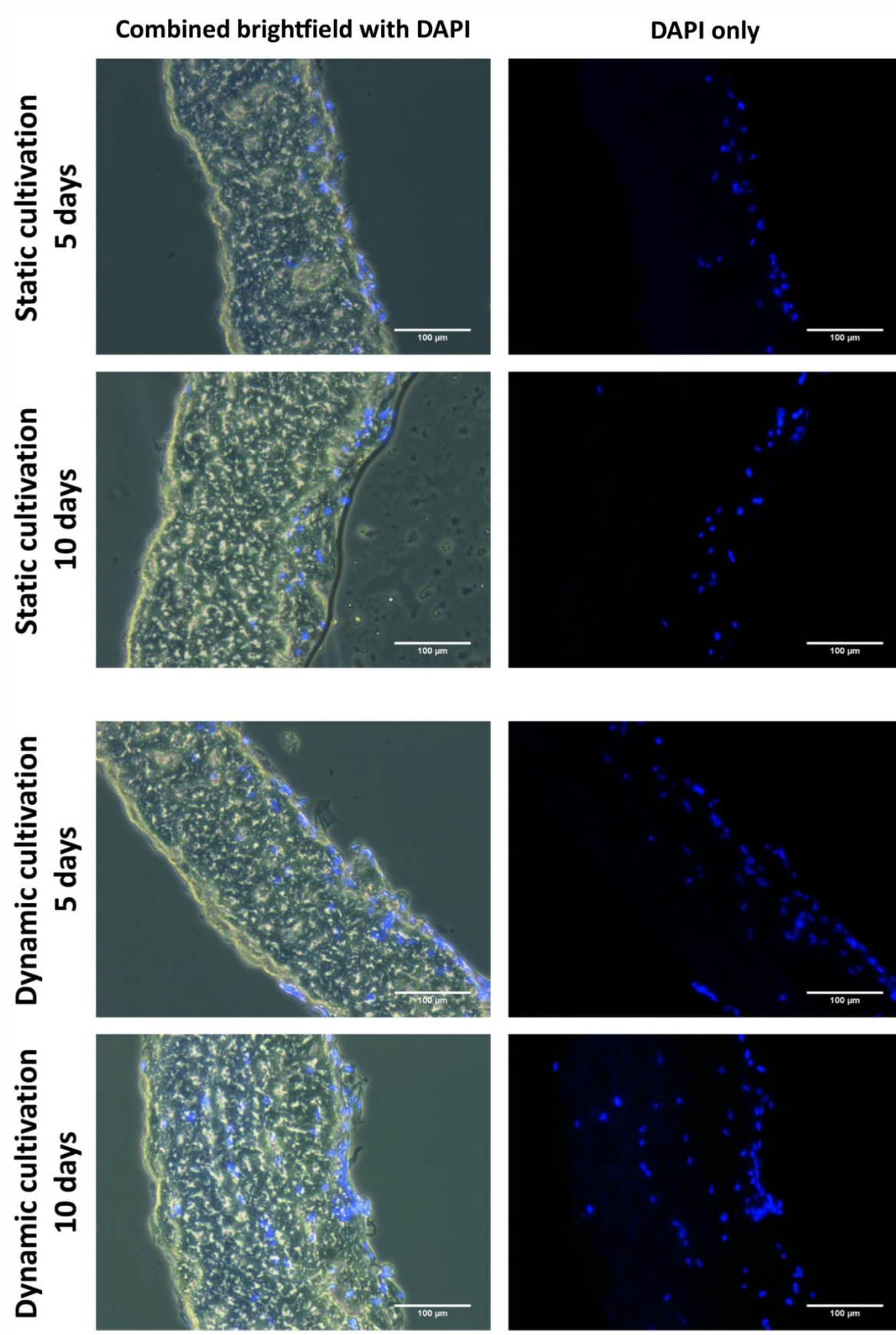
##### 4.4.1 Vliv dynamické kultivace na rekolonizaci decelularizované tkáně pomocí autologních buněk

Pro analýzu schopnosti vrůstání buněk do decelularizované tkáně byly histologické vzorky rozděleny na 50  $\mu\text{m}$  části. V těchto částech byly spočítány jednotlivé počty buněk a následně statisticky vyhodnoceny pomocí metody Kruskal-Wallisova testu (jednofaktorová neparametrická ANOVA) s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$  (Matějka, et al. 2020a).

Analýza histologických obrazů (Obrázek 31) a počtu buněk v daných hloubkách (Obrázek 32) ukazuje zásadní rozdíl mezi statickou a dynamickou kultivací. Ve statických podmínkách není žádný významný rozdíl mezi 5 a 10 dny kultivace. V obou případech buňky pronikly do hloubky 50  $\mu\text{m}$ , ale není prokázán růst buněk do hlubších oblastí tkáně.

Výsledky dynamické kultivace však ukazují výrazně zlepšené pronikání buněk do všech vrstev tkáně. Také je patrný určitý klesající charakter, kde počet buněk klesá s rostoucí hloubkou. Tento jev je způsoben tím, že pro případ demonstrace vlivu dynamické kultivace byla osazena pouze jedna strana decelularizované tkáně. Pro přípravu homogenně rekolonizovaných tkání byly osazeny obě strany před dynamickou kultivací, jak je popsáno v kapitole 4.4.2. V hloubkách  $>100 \mu\text{m}$  je významný rozdíl mezi statickou a

dynamickou kultivací. V obou časových intervalech jsou pozorovatelné buňky ve všech vrstvách dynamicky kultivovaných vzorků. Po 10 dnech dynamické kultivace je vidět, že téměř celá tkáň byla nově rekolonizována, byť s ubývajícím počtem oproti nižším hloubkám.

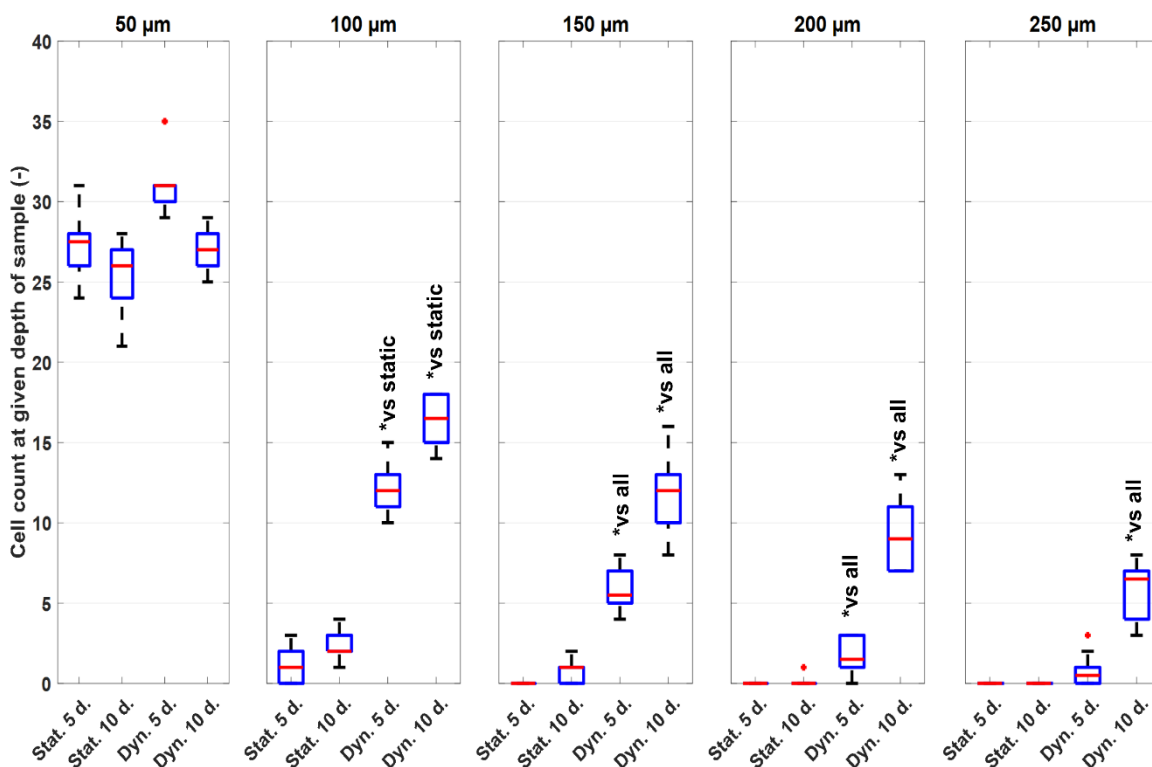


Obrázek 31 – Srovnání rekolonizace decelularizované tkáně pomocí PrASC při statických a dynamických podmínkách, doba kultivace 5 a 10 dní, 20 µm kryorezy barvené pomocí DAPI. Mikroskop Leica Dmi8, objektiv 10x



## Number of cells in given depths of tissue

(comparison of static and dynamic conditions and two time intervals)

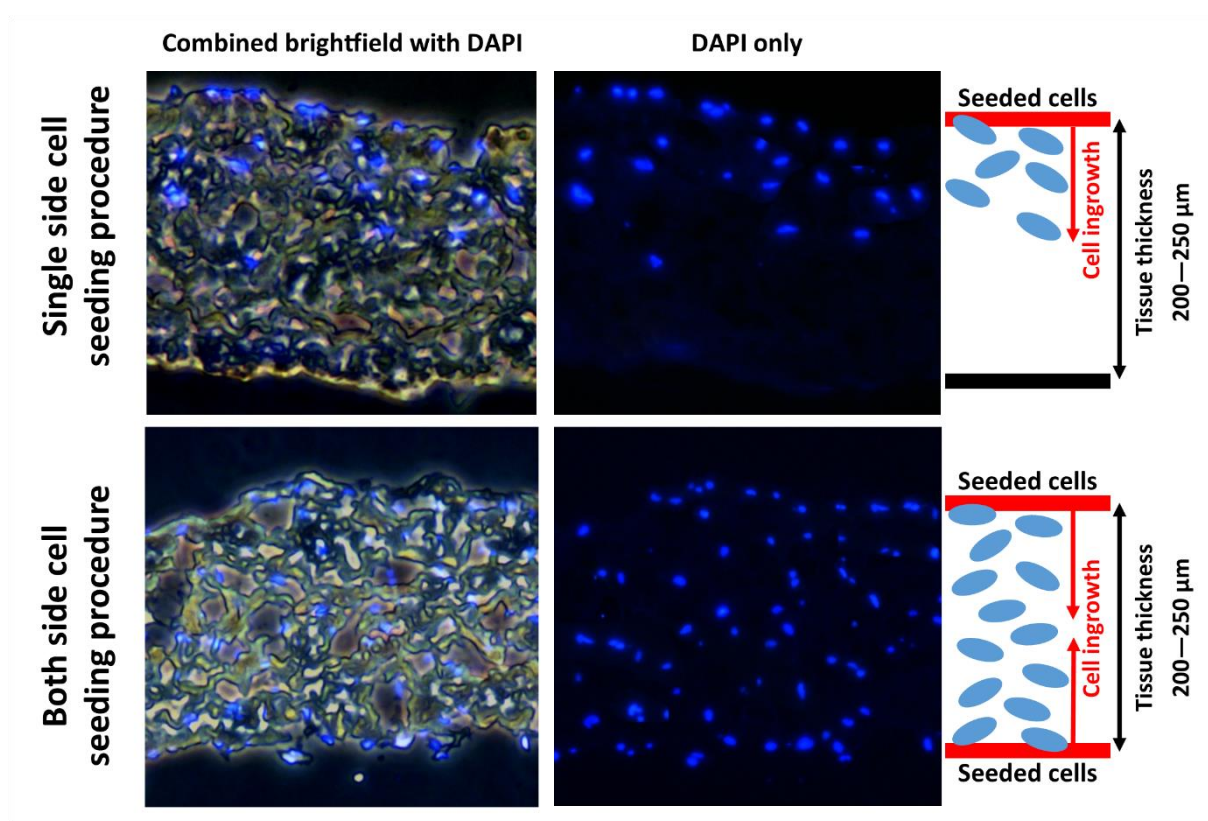


Obrázek 32 - Počty buněk v daných 50 μm segmentech tkáně. Statistická hladina významnosti  $p \leq 0,05$ . Pro každý typ kultivace a interval bylo hodnoceno z 10 náhodných vzorků. Červená čára představuje median; modrý rámeček ohraničuje 1. a 3. kvartil; hradba ohraničuje minimální a maximální hodnoty a červené body jsou odlehle hodnoty.

Jak bylo konstatováno výše, tak rekolonizace ve statických podmínkách nedává uspokojivé výsledky. Jak je znázorněno na Obrázek 31 a Obrázek 32, tak pouze 1/5 decelularizované tkáně byla rekolonizována buňkami po 10 dnech kultivace. Podobné výsledky byly získány v jiných studiích, ve kterých bylo zapotřebí několik týdnů kultivace, aby došlo k rekolonizaci připravených tkáňových matric buňkami a došlo k určitému zrání buněk (Villalona et al. 2010). Využití perfúzních a stimulačních reaktorů významně podporuje proces rekolonizace tkáně *in vitro*, jak uvádí studie autorů (Melchiorri et al. 2016). Několik studií také hledalo korelaci mezi tlakovým namáháním, buněčnou proliferací a diferenciací kmenových buněk směrem k SMC. Cyklický fyziologický tlak nastavený 120/80 mmHg změnil buněčnou morfologii a zvýšil rychlost proliferace v kmenových buňkách za 7 dní, jak popisuje studie (Maul, et al. 2007). Navíc inkubace buněk v bioreaktoru podporuje jejich maturaci a prekonidiování před použitím pro implantaci díky simulovaným více fyziologickým podmínkám, jak je popsáno ve studii autorů (Villalona, et al. 2010).

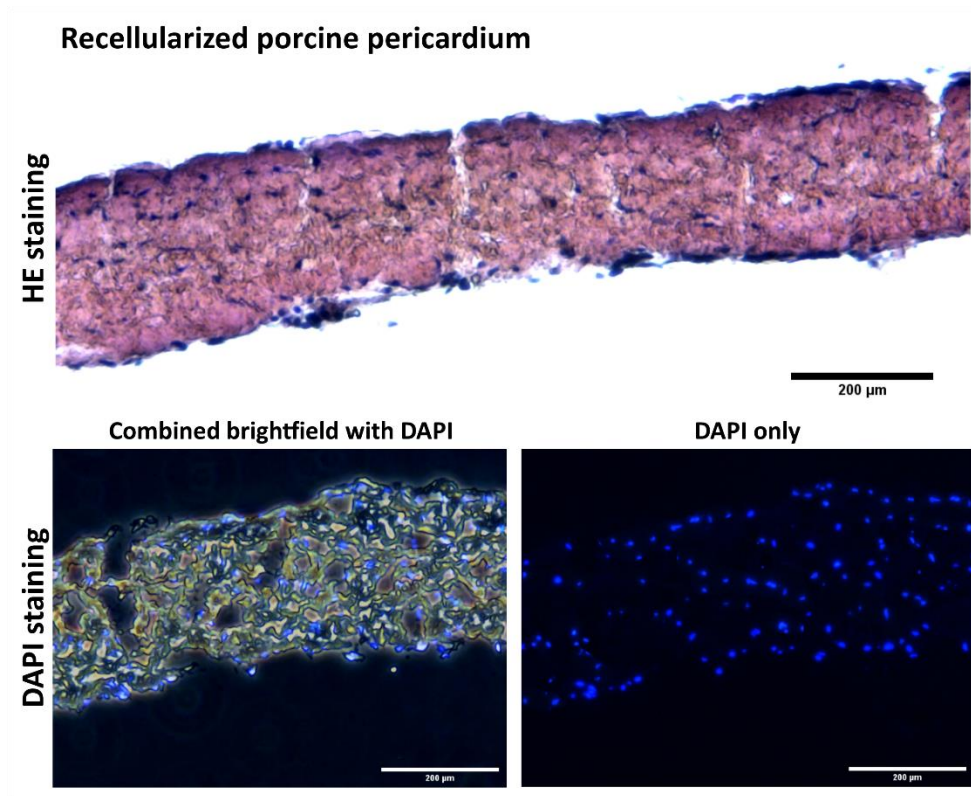
#### 4.4.2 Příprava autologně recelularizovaných tkáňových záplat pro kardiovaskulární aplikace

Jak bylo popsáno výše, buňky při dynamické kultivaci pronikly téměř po celé tkáni po 10 dnech kultivace. Počet buněk s hloubkou však postupně klesal. Po 5 dnech dynamické kultivace byly buňky schopné proniknout do cca poloviny hloubky decelularizované tkáně. Pro docílení homogenity rekolonizace decelularizovaných tkání byla optimalizována jak kultivační komora, tak samotný způsob nasazení. Návrh kultivační komory umožňuje osazení decelularizované tkáně z obou stran. Díky tomu bylo docíleno homogenní rekolonizace celé tkáně v průběhu již 5 dní dynamické kultivace. Rozdílný způsob nasazení buněk a vliv na rekolonizaci tkáně je znázorněn na Obrázek 33.

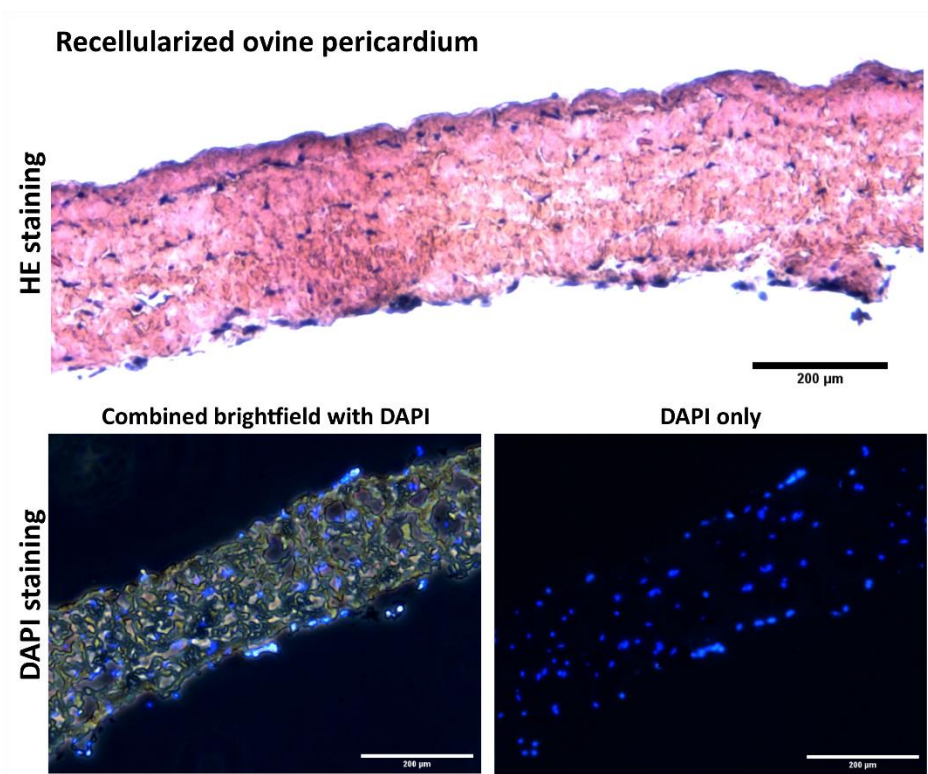


Obrázek 33 - Srovnání metod osazení decelularizovaných tkání před kultivací v reaktoru. Nahoře jednostranné dole oboustranné osazení decelularizované tkáně. Dynamická kultivace 5 dní, buňky prasečí stromální buňky PrASC. 20  $\mu\text{m}$  histologické řezy v parafínu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI.

Dále, jak je demonstrováno na 20  $\mu\text{m}$  histologických řezech na Obrázek 34 a Obrázek 35, je prasečí i ovčí perikard homogenně rekolonizovaný buňkami pro implantabilní použití. Takto připravené tkáně sloužily pro vytvoření autologně osídlených cévních záplat na bázi decelularizované alogenní (prasečí perikard) a xenogenní (ovčí perikard) tkáně.



Obrázek 34 - Decelularizovaný prasečí perikard a jeho následná recelularizace prasečími stromálními buňkami PrASC. Oboustranné osazení tkáně v kultivační komoře. Dynamická kultivace v reaktoru 5 dní. 20 µm histologické řezy v parafinu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI.

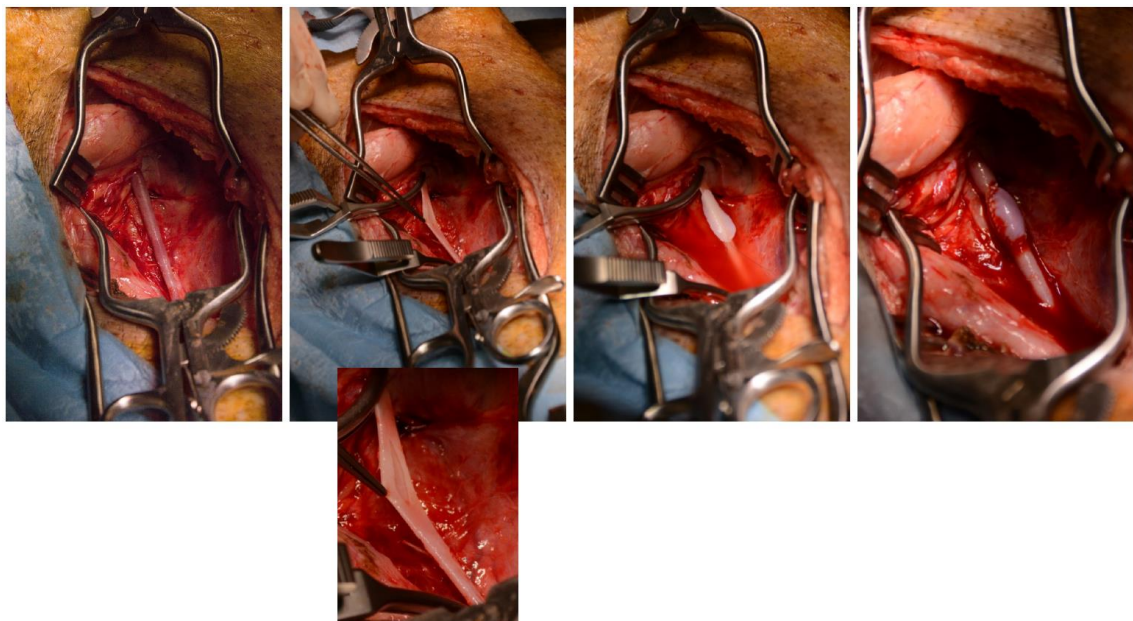


Obrázek 35 – Decelularizovaný ovčí perikard a jeho následná recelularizace prasečími stromálními buňkami PrASC. Oboustranné osazení tkáně v kultivační komoře. Dynamická kultivace v reaktoru 5 dní. 20 µm histologické řezy v parafinu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI.

#### 4.5 *In vivo* remodelace a endotelizace autologně recelularizovaných kardiovaskulárních záplat

Výše uvedené výsledky byly využity pro *in vivo* ověření připravených autologně osídlených kardiovaskulárních záplat v praseti. V rámci této dosud nepublikované části byly kardiovaskulární záplaty připravené na bázi prasečího a ovčího perikardu osídleného autologními buňkami daného prasete implantovány na uměle vytvořený defekt na karotickém povodí, jak je znázorněno na Obrázek 36. Logisticky tento protokol vyžadoval celkové dvě operace. Postup byl následující:

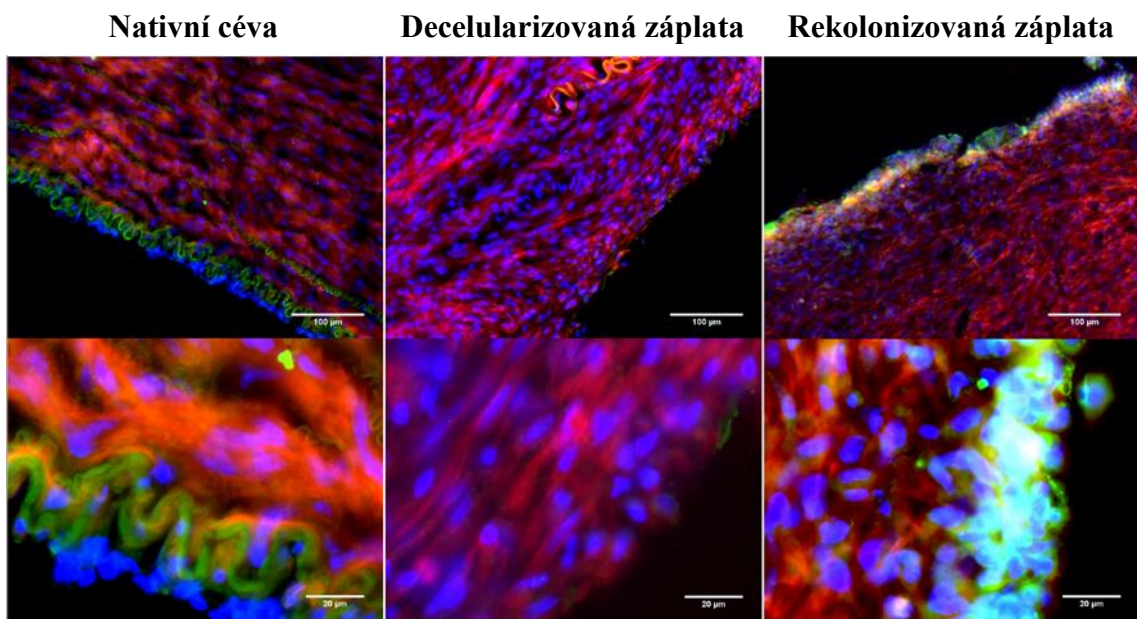
1. Odběr podkožního tuku z krční oblasti prasete – první operace
2. Izolace stromálních buněk a jejich pěstování ve statických podmínkách do 1. pasáže
3. Oboustranné nasazení na decelularizovanou tkáň
4. Dynamická kultivace v reaktoru pro rekolonizaci decelularizované tkáně
5. Implantace na umělé vytvořený defekt na a. carotis – druhá operace u stejného prasete
6. Měsíční observace a explantace



Obrázek 36 - Zleva, operační preparace a.caritis, příprava umělého defektu, našíťí cévní záplaty, obnovení průtoku.

Po měsíční observaci zvířete byly tyto části cévy se záplatou explantovány a byla provedena imunohistologická analýza. Jak je patrné na Obrázek 37, tak v případě nativní

cévy je jasně patrná endotelová vrstva tvořící *tunica intima*. U pouze decelularizované záplaty došlo k remodelaci v těle pomocí hladkosvalových buněk, ovšem vnitřní lumen cévy je bez zjevné formace CD31 pozitivních (endotelových) buněk. V případě rekolonizované cévy pomocí autologních stromálních buněk došlo po 1 měsíci k formaci nové CD31 pozitivní vrstvy buněk. Oproti nativní vrstvě EC buněk není tato vrstva tvořena monovrstvou. Tento výsledek významně podporuje celkový význam kultivačních systémů pro přípravu implantabilních štěpů.



Obrázek 37 - imunofluorescenčně barvené histologické řezy explantované nativní cévy, záplaty tvořené pouze decelularizovanou tkání a záplaty rekolonizované autologními stromálními buňkami. Imunofluorescenčně značné CD31 (zeleně), F-aktin (červeně) a jádra modře.

## 5 Závěr

V rámci práce bylo vyvinuto několik technologických řešení kultivačních systémů, u kterých byl prokazatelně potvrzen pozitivní vliv dynamické kultivace na buněčnou proliferaci, fenotypickou maturaci, diferenciaci a genovou expresi. Tyto výsledky jsou prezentovány v rámci 5 publikací a technické řešení navržených technologií je popsáno v 5 užitečných vzorech, jež jsou přiloženy.

Jednotlivé etapy lze shrnout:

### **Decelularizace tkání a jejich příprava pro rekolonizaci buňkami**

Byla vytvořena optimalizovaná metoda pro decelularizaci prasečích a ovčích perikardů, která poskytuje za 24 hodin decelularizovanou tkáň bez zbytků původních buněk. Tato tkáň je sterilní bez známek cytotoxicity. Takto připravená tkáň je vhodná pro další použití jako základní materiál pro přípravu kardiovaskulárních náhrad.

### **Stimulace smykovým napětím pro modulaci růstu endotelových buněk v *in vitro* podmínkách**

Vliv smykového napětí simulovaného v bioreaktoru a jeho pozitivní vliv na modulaci růstu endotelu byl prokázán u povrchů tvořených kolagenem a kolagenem s navázaným lamininem a fibrinem. Tato stimulace může pomoci pro snížení trombogenicity umělých cévních náhrad. Při nasazení ve statických podmínkách není schopen endotel vydržet následnou zátěž v průtoku. Prekondicionáním v bioreaktoru dochází k produkci integrinů zvyšujících vazbu mezi buňkami a mezi buňkou a povrchem.

### **Stimulace hydrodynamickým tlakem pro modulaci růstu a diferenciaci hladkých svalových buněk v *in vitro* podmínkách**

Navržené systémy pro tlakovou stimulaci pozitivně ovlivňují diferenciaci kmenových a stromálních buněk směrem k hladkému svaly a podporují jeho proliferaci. Byla prokázána tvorba proteinu specifických pro hladký sval. V kombinaci s růstovými faktory typu TGF- $\beta$  a BMP-4 byly signifikantní výsledky diferenciaci směrem k hladkému svaly již po 3 dnech dynamické kultivace. Tyto výsledky byly prokázány jednak na fibrinových potazích, dále na nanocelulóзовých vláknech s nanotubicovým potahem a také na decelularizovaných tkáních.

### **Příprava implantabilních kardiovaskulárních náhrad v bioreaktoru *in vitro***

Na základě výsledků byla vytvořena optimalizovaná procedura, jež využívala navržené technologie pro přípravu rekolonizovaných kardiovaskulárních záplat na bázi decelularizovaného prasečího a ovčího perikardu, jež byly osídleny autologními stromálními buňkami z tukové tkáně. Vlivem mechanické stimulace došlo k homogenní rekolonizaci decelularizované tkáně za 5 dní a byla nastartována diferenciací stromálních buněk směrem k hladkému svalu. Tato procedura zahrnoval izolaci stromálních buněk, jejich prekulivaci, nasazení na tkáň a kulivaci v reaktoru. Celkový čas pro přípravu takovýchto autologně osídlených záplat byl 8 – 10 dní pro izolaci a prekulivaci buněk z tukové tkáně, 5 dní kulivace reaktoru pro rekolonizaci.

### **Implantace připravených náhrad a jejich pilotní testování *in vivo***

V bioreaktoru připravené cévní záplaty na bázi decelularizovaného prasečího perikardu byly osídleny pomocí autologních stromálních buněk. Takto připravené záplaty byly implantovány na umělý defekt *a. carotis*. Po měsíční observaci byly explantovány. U záplat, které byly před implantací rekolonizovány buňkami, došlo k tvorbě nové endotelové vrstvy ve vnitřním lumenu.

## Reference

- ABDOLGHAFOORIAN, H., P. FARNIA, R. S. SAJADI NIA, A. BAHRAMI, et al. Effect of Heart Valve Decellularization on Xenograft Rejection. *Exp Clin Transplant*, Jun 2017, 15(3), 329-336.
- BACAKOVA, L. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. In. Rijeka: IntechOpen, 2018a, p. Ch. 12.
- BACAKOVA, L. Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. In. Rijeka: IntechOpen, 2018b, p. Ch. 14.
- BACAKOVA, L., J. PAJOROVA, M. TOMKOVA, R. MATEJKA, et al. Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. *Nanomaterials (Basel)*, Jan 23 2020, 10(2).
- BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, R. MATEJKA, et al. Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. In K. SAKUMA ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. IntechOpen, 2018a.
- BACAKOVA, L., J. ZARUBOVA, M. TRAVNICKOVA, J. MUSILKOVA, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*, Jul - Aug 2018b, 36(4), 1111-1126.
- BACAKOVA, L., M. ZIKMUNDOVA, J. PAJOROVA, A. BROZ, et al. Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Synthetic Polymers. In M.S.A.R. ZLATEV ed. *Applications of Nanobiotechnology*. IntechOpen, 2019.
- BAI, K., Y. HUANG, X. JIA, Y. FAN, et al. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *Journal of biomechanics*, 12/18 2009, 43, 1176-1181.
- BECK, L., JR. a P. A. D'AMORE Vascular development: cellular and molecular regulation. *Faseb j*, Apr 1997, 11(5), 365-373.
- BELANGER, A. C. *Vascular Anatomy and Physiology: An Introductory Text*. Edtion ed.: Appleton Davies, 1990. ISBN 9780941022118.
- BLAUSEN. Medical gallery of Blausen Medical 2014. Structure of an Artery Wall. *WikiJournal of Medicine*. 2014, 1(2). ISSN 20024436. Dostupné z: <[https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal\\_of\\_Medicine/Medical\\_gallery\\_of\\_Blausen\\_Medical\\_2014](https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blausen_Medical_2014)>.
- BOCCAFOSCHI, F., M. BOTTA, L. FUSARO, F. COPES, et al. Decellularized biological matrices: an interesting approach for cardiovascular tissue repair and regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, May 2017, 11(5), 1648-1657.
- BOCCAFOSCHI, F., N. RAJAN, J. HABERMEHL a D. MANTOVANI Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembling of collagen and cells in a cylindrical geometry. *Macromol Biosci*, May 10 2007, 7(5), 719-726.
- BOURRET, L. A. a G. A. RODAN The role of calcium in the inhibition of cAMP accumulation in epiphyseal cartilage cells exposed to physiological pressure. *J Cell Physiol*, Jul 1976, 88(3), 353-361.



- BOUTEN, C. V., P. Y. DANKERS, A. DRIESSEN-MOL, S. PEDRON, et al. Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, Apr 30 2011, 63(4-5), 221-241.
- BROWN, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics*, 2000/01/01/ 2000, 33(1), 3-14.
- CAMPBELL, C. D., D. H. BROOKS, M. W. WEBSTER a H. T. BAHNSON The use of expanded microporous polytetrafluoroethylene for limb salvage: a preliminary report. *Surgery*, May 1976, 79(5), 485-491.
- CARRABBA, M. a P. MADEDDU Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018-April-17 2018, 6(41).
- COLLINS, P., C. WEBB, W. CHONG a N. MOAT Radial artery versus saphenous vein patency randomized trial - Five-year angiographic follow-up. *Circulation*, 07/01 2008, 117, 2859-2864.
- CRAPO, P. M., T. W. GILBERT a S. F. BADYLAK An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, Apr 2011, 32(12), 3233-3243.
- CRAPO, P. M. a Y. WANG. Hydrostatic pressure independently increases elastin and collagen co-expression in small-diameter engineered arterial constructs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011, 96A(4), pp. 673-681. ISSN 15493296.
- DAN, P., É. VELOT, V. DECOT a P. MENU The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Sci*, Jul 15 2015, 128(14), 2415-2422.
- DAVIES, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, Jul 1995, 75(3), 519-560.
- DAVIES, P. F., C. F. DEWEY, JR., S. R. BUSSOLARI, E. J. GORDON, et al. Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells. *J Clin Invest*, Apr 1984, 73(4), 1121-1129.
- DE BAKEY, M. E., D. A. COOLEY, E. S. CRAWFORD a G. C. MORRIS, JR. Clinical application of a new flexible knitted dacron arterial substitute. *Am Surg*, Dec 1958, 24(12), 862-869.
- DE VISSCHER, G., L. MESURE, B. MEURIS, A. IVANOVA, et al. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1 $\alpha$ . *Acta Biomater*, Mar 2012, 8(3), 1330-1338.
- DELA PAZ, N. G. a P. A. D'AMORE Arterial versus venous endothelial cells. *Cell and tissue research*, 2009, 335(1), 5-16.
- DEUTSCH, M., J. MEINHART, P. ZILLA, N. HOWANIETZ, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg*, Feb 2009, 49(2), 352-362; discussion 362.
- DONG, J. D., Y. Q. GU, C. M. LI, C. R. WANG, et al. Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacol Sin*, May 2009, 30(5), 530-536.

- E. NIKLASON, L. a R. S. LANGER Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transplant Immunology*, 1997/12/01/ 1997, 5(4), 303-306.
- FEUGIER, P., R. A. BLACK, J. A. HUNT a T. V. HOW Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*, May 2005, 26(13), 1457-1466.
- FISCHER, L. J., S. MCILHENNY, T. TULENKO, N. GOLESORKHI, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res*, Mar 2009, 152(1), 157-166.
- FRANGOS, J. A., L. V. MCINTIRE a S. G. ESKIN Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechnol Bioeng*, Oct 5 1988, 32(8), 1053-1060.
- GALBRAITH, C. G., R. SKALAK a S. CHIEN Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998, 40(4), 317-330.
- GARAT, C., V. VAN PUTTEN, Z. A. REFAAT, C. DESSEV, et al. Induction of smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells by arginine vasopressin is mediated by c-Jun amino-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, Jul 21 2000, 275(29), 22537-22543.
- GAUVIN, R., G. MARINOV, Y. MEHRI, J. KLEIN, et al. A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. *J Biomater Appl*, Nov 2013, 28(4), 552-565.
- GHAZANFARI, S., M. TAFAZZOLI-SHADPOUR a M. A. SHOKRGOZAR Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009/10/23/ 2009, 388(3), 601-605.
- GILBERT, T. W., T. L. SELLARO a S. F. BADYLAK Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, Jul 2006, 27(19), 3675-3683.
- GIMBRONE, M. A., JR., J. N. TOPPER, T. NAGEL, K. R. ANDERSON, et al. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, May 2000, 902, 230-239; discussion 239-240.
- GÖSSL, M., S. KHOSLA, X. ZHANG, N. HIGANO, et al. Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*, Nov 6 2012, 60(19), 1945-1953.
- HARSKAMP, R. E., R. D. LOPES, C. E. BAISDEN, R. J. DE WINTER, et al. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Ann Surg*, May 2013, 257(5), 824-833.
- HASHI, C., Y. ZHU, G.-Y. YANG, W. YOUNG, et al. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 08/01 2007, 104, 11915-11920.
- HATZIBALOGLOU, A., I. VELISSARIS, D. KAITZIS, D. GREKAS, et al. ProCol vascular bioprosthesis for vascular access: midterm results. *J Vasc Access*, Jan-Mar 2004, 5(1), 16-18.

- HERRING, M., A. GARDNER a J. GLOVER Seeding human arterial prostheses with mechanically derived endothelium. The detrimental effect of smoking. *J Vasc Surg*, Mar 1984, 1(2), 279-289.
- HUANG, A. H. a L. E. NIKLASON Engineering of arteries in vitro. *Cell Mol Life Sci*, Jun 2014, 71(11), 2103-2118.
- HÜLSMANN, J., K. GRÜN, S. EL AMOURI, M. BARTH, et al. Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing. *Xenotransplantation*, Sep-Oct 2012, 19(5), 286-297.
- HUTCHIN, P., J. R. JACOBS, J. B. DEVIN, S. SHAUGHNESSY, et al. Bovine graft arteriovenous fistulas for maintenance hemodialysis. *Surg Gynecol Obstet*, Aug 1975, 141(2), 255-258.
- CHIEN, S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Mar 2007, 292(3), H1209-1224.
- CHLUPAC, J., E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, R. MATEJKA, et al. The gene expression of human endothelial cells is modulated by subendothelial extracellular matrix proteins: Short-term response to laminar shear stress. *Tissue Engineering - Part A*, 2014 2014, 20(15-16), 2253-2264.
- CHLUPÁČ, J., E. FILOVÁ a L. BACÁKOVÁ Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res*, 2009, 58 Suppl 2, S119-139.
- CHUN, T. H., H. ITOH, Y. OGAWA, N. TAMURA, et al. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension*, Jun 1997, 29(6), 1296-1302.
- IN JEONG, S., S. Y. KIM, S. K. CHO, M. S. CHONG, et al. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. *Biomaterials*, 2007/02/01/ 2007, 28(6), 1115-1122.
- KIM, D. H., S. J. HEO, S. H. KIM, J. W. SHIN, et al. Shear stress magnitude is critical in regulating the differentiation of mesenchymal stem cells even with endothelial growth medium. *Biotechnol Lett*, Dec 2011, 33(12), 2351-2359.
- KOBAYASHI, N., T. YASU, H. UEBA, M. SATA, et al. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Experimental Hematology*. 2004a, vol. 32(issue 12), pp. 1238-1245. ISSN 0301472X.
- KOBAYASHI, N., T. YASU, H. UEBA, M. SATA, et al. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp Hematol*, Dec 2004b, 32(12), 1238-1245.
- KONIG, G., T. N. MCALLISTER, N. DUSSEY, S. A. GARRIDO, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, Mar 2009, 30(8), 1542-1550.
- KURPINSKI, K., J. PARK, R. G. THAKAR a S. LI Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Mol Cell Biomech*, Mar 2006, 3(1), 21-34.

- L'HEUREUX, N., N. DUSSERRE, G. KONIG, B. VICTOR, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature medicine*, 2006, 12(3), 361-365.
- LAGNA, G., M. M. KU, P. H. NGUYEN, N. A. NEUMAN, et al. Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem*, Dec 21 2007, 282(51), 244-255.
- LANGILLE, B. L. a F. DONNELL Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science*, 1986, 231(4736), 405.
- LANGILLE, B. L., M. A. REIDY a R. L. KLINE Injury and repair of endothelium at sites of flow disturbances near abdominal aortic coarctations in rabbits. *Arteriosclerosis*, Mar-Apr 1986, 6(2), 146-154.
- LEE, Y.-U., D. DRURY-STEWART, R. P. VITO a H.-C. HAN Morphologic adaptation of arterial endothelial cells to longitudinal stretch in organ culture. *Journal of biomechanics*, 2008, 41(15), 3274-3277.
- LEVESQUE, M. J. a R. M. NEREM The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *Journal of biomechanical engineering*, Nov 1985, 107(4), 341-347.
- LI, Y. S., J. H. HAGA a S. CHIEN Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech*, Oct 2005, 38(10), 1949-1971.
- LIN, C. H., K. HSIA, H. MA, H. LEE, et al. In Vivo Performance of Decellularized Vascular Grafts: A Review Article. *Int J Mol Sci*, Jul 19 2018, 19(7).
- LINDSEY, P., A. ECHEVERRIA, M. CHEUNG, E. KFOURY, et al. Lower Extremity Bypass Using Bovine Carotid Artery Graft (Artegraft): An Analysis of 124 Cases with Long-Term Results. *World J Surg*, Jan 2018, 42(1), 295-301.
- LIPPIELLO, L., C. KAYE, T. NEUMATA a H. J. MANKIN In vitro metabolic response of articular cartilage segments to low levels of hydrostatic pressure. *Connect Tissue Res*, 1985, 13(2), 99-107.
- MADDEN, R. L., G. S. LIPKOWITZ, B. J. BROWNE a A. KURBANOV Experience with cryopreserved cadaveric femoral vein allografts used for hemodialysis access. *Ann Vasc Surg*, Jul 2004, 18(4), 453-458.
- MALEK, A. M., S. L. ALPER a S. IZUMO Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama*, Dec 1 1999, 282(21), 2035-2042.
- MALINDA, K. M., M. NOMIZU, M. CHUNG, M. DELGADO, et al. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *Faseb j*, Jan 1999, 13(1), 53-62.
- MATĚJKA, R., M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. LIPENSKÝ, et al. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Applied Sciences*, 2020a, 10(16).
- MATEJKA, R., J. ROSINA, E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, et al. Automated dynamic bioreactor for 2D endothelial structures. In *2013 E-Health and Bioengineering Conference, EHB 2013*. 2013.
- České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk.

Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, et al.  
Česká republika Užitný vzor CZ 33 917.14.4.2020.

České vysoké učení technické v Praze, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Institut klinické a experimentální medicíny. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, Š. PRAŽÁK, L. BAČÁKOVÁ, et al. Česká republika Užitný vzor 33916.14.4.2020.

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ, et al. Česká Republika Užitný vzor 31066.3.10.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ, et al. Česká Republika Užitný vzor 30441.7.3.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, P. KNEPPO, et al. Česká republika Užitný vzor CZ 30 705.30.5.2017.

MAUL, T. M., D. W. HAMILTON, A. NIEPONICE, L. SOLETTI, et al. A New Experimental System for the Extended Application of Cyclic Hydrostatic Pressure to Cell Culture. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2007, 129(1), pp. 110-116. ISSN 0148-0731.

MAUL, T. M., D. W. CHEW, A. NIEPONICE a D. A. VORP Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2011, 10(6), 939-953.

MELCHIORRI, A. J., L. G. BRACAGLIA, L. K. KIMERER, N. HIBINO, et al. In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods*, Jul 2016, 22(7), 663-670.

MIRALLES, F., G. POSERN, A. I. ZAROMYTIDOU a R. TREISMAN Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, May 2 2003, 113(3), 329-342.

MUSILKOVA, J., E. FILOVA, J. PALA, R. MATEJKA, et al. Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies. *Biomed Mater*, Dec 9 2019, 15(1), 015008.

NEREM, R. M., R. W. ALEXANDER, D. C. CHAPPELL, R. M. MEDFORD, et al. The study of the influence of flow on vascular endothelial biology. *Am J Med Sci*, Sep 1998, 316(3), 169-175.

OBI, S., K. YAMAMOTO, N. SHIMIZU, S. KUMAGAYA, et al. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol* (1985), Jan 2009, 106(1), 203-211.

OZAWA, H., K. IMAMURA, E. ABE, N. TAKAHASHI, et al. Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro. *J Cell Physiol*, Jan 1990, 142(1), 177-185.

- PASHNEH-TALA, S., S. MACNEIL a F. CLAEYSSSENS The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev*, Feb 2016, 22(1), 68-100.
- QIU, P., R. P. RITCHIE, Z. FU, D. CAO, et al. Myocardin enhances Smad3-mediated transforming growth factor-beta1 signaling in a CArG box-independent manner: Smad-binding element is an important cis element for SM22alpha transcription in vivo. *Circ Res*, Nov 11 2005, 97(10), 983-991.
- RABBANI, M., M. JANMALEKI, M. TAFAZZOLI-SHADPOUR, M. TEYMOORI, et al. Effects of uniaxial cyclic stretch loading on morphology of adipose derived stem cells. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 2016, 13(4), 396-402.
- RAJENDRAN, P., T. RENGARAJAN, J. THANGAVEL, Y. NISHIGAKI, et al. The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, 2013, 9(10), 1057-1069.
- RIEDEL, T., E. BRYNDA, J. E. DYR a M. HOUSKA Controlled preparation of thin fibrin films immobilized at solid surfaces. *J Biomed Mater Res A*, Feb 2009, 88(2), 437-447.
- RUEL, J., J. LEMAY, G. DUMAS, C. DOILLON, et al. Development of a parallel plate flow chamber for studying cell behavior under pulsatile flow. *Asaio j*, Oct-Dec 1995, 41(4), 876-883.
- RUSSO, T. A., D. STOLL, H. B. NADER a J. L. DREYFUSS Mechanical stretch implications for vascular endothelial cells: Altered extracellular matrix synthesis and remodeling in pathological conditions. *Life Sciences*, 2018/11/15/ 2018, 213, 214-225.
- SERIANI, S., G. FAVERO, J. MAHAFFEY, D. MARKO, et al. The Cell-Stretcher: a Novel Device for the Mechanical Stimulation of Cell Populations. *Review of Scientific Instruments*, 08/16 2016, 87.
- SHAO, Y., X. TAN, R. NOVITSKI, M. MUQADDAM, et al. Uniaxial cell stretching device for live-cell imaging of mechanosensitive cellular functions. *Rev Sci Instrum*, Nov 2013, 84(11), 114304.
- SHETTY, R., P. PIBAROT, A. AUDET, R. JANVIER, et al. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest*, Jun 2009, 39(6), 471-480.
- SCHNITTLER, H. J., R. P. FRANKE, U. AKBAY, C. MROWIETZ, et al. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol*, Jul 1993, 265(1 Pt 1), C289-298.
- SCHUTTE, S. C., Z. CHEN, K. G. BROCKBANK a R. M. NEREM Cyclic strain improves strength and function of a collagen-based tissue-engineered vascular media. *Tissue Eng Part A*, Oct 2010, 16(10), 3149-3157.
- SCHWANN, T. A., A. ZACHARIAS, C. J. RIORDAN, S. J. DURHAM, et al. Sequential radial artery grafts for multivessel coronary artery bypass graft surgery: 10-year survival and angiography results. *Ann Thorac Surg*, Jul 2009, 88(1), 31-39.
- SCHWARTZ, M. A. a R. K. ASSOIAN Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*, Jul 2001, 114(Pt 14), 2553-2560.

SOFFER, L., X. WANG, X. ZHANG, J. KLUGE, et al. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2008, 19(5), 653-664.

SOYER, T., M. LEMPINEN, P. COOPER, L. NORTON, et al. A new venous prosthesis. *Surgery*, Dec 1972, 72(6), 864-872.

STEGEMANN, J. P., S. N. KASZUBA a S. L. ROWE Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng*, Nov 2007, 13(11), 2601-2613.

TAKAGI, H., S.-N. GOTO, M. MATSUI, H. MANABE, et al. A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting. *Journal of Vascular Surgery*, 2010/07/01/ 2010, 52(1), 232-236.

TAKIZAWA, K., C. MOORMAN, S. WRIGHT, J. CHRISTOPHER, et al. Wall shear stress calculations in space-time finite element computation of arterial fluid-structure interactions. *Computational Mechanics*, 2010/06/01 2010, 46(1), 31-41.

TANCK, E., W. D. VAN DRIEL, J. W. HAGEN, E. H. BURGER, et al. Why does intermittent hydrostatic pressure enhance the mineralization process in fetal cartilage? *Journal of Biomechanics*, 1999/02/01/ 1999, 32(2), 153-161.

TEFFT, B. J., A. M. KOPACZ, W. K. LIU a S. Q. LIU Experimental and computational validation of Hele-Shaw stagnation flow with varying shear stress. *Computational Mechanics*, 2013/12/01 2013, 52(6), 1463-1473.

TOPPER, J. N., J. CAI, Y. QIU, K. R. ANDERSON, et al. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug 19 1997, 94(17), 9314-9319.

TSCHOEKE, B., T. C. FLANAGAN, A. CORNELISSEN, S. KOCH, et al. Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft. *Artif Organs*, Oct 2008, 32(10), 800-809.

TSCHOEKE, B., T. C. FLANAGAN, S. KOCH, M. S. HARWOKO, et al. Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold. *Tissue Eng Part A*, Aug 2009, 15(8), 1909-1918.

VAN KAMPEN, G. P., J. P. VELDHUIJZEN, R. KUIJER, R. J. VAN DE STADT, et al. Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum*, Apr 1985, 28(4), 419-424.

VARA, D. S., G. PUNSHON, K. M. SALES, S. SARKAR, et al. Endothelial cell retention on a viscoelastic nanocomposite vascular conduit is improved by exposure to shear stress preconditioning prior to physiological flow. *Artif Organs*, Dec 2008, 32(12), 977-981.

VILLALONA, G. A., B. UDELSMAN, D. R. DUNCAN, E. MCGILLICUDDY, et al. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, Jun 2010, 16(3), 341-350.

VONDRÁŠEK, D., D. HADRABA, R. MATĚJKA, F. LOPOT, et al. Uniaxial tensile testing device for measuring mechanical properties of biological tissue with stress-relaxation test under a confocal microscope. *Manufacturing Technology*, 2018, 18(5), 866-872.

- WAGENSEIL, J. E. a R. P. MECHAM Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*, Jul 2009, 89(3), 957-989.
- WANG, C., S. YIN, L. CEN, Q. LIU, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Eng Part A*, Apr 2010, 16(4), 1201-1213.
- WEINBERG, C. B. a E. BELL A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science (New York, N.Y.)*, 1986/01// 1986, 231(4736), 397-400.
- WILLIAMS, S. K., L. B. KLEINERT a V. PATULA-STEINBRENNER Accelerated neovascularization and endothelialization of vascular grafts promoted by covalently bound laminin type 1. *J Biomed Mater Res A*, Oct 2011, 99(1), 67-73.
- WOO, J. S., M. C. FISHBEIN a B. REEMTSEN Histologic examination of decellularized porcine intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix) in pediatric congenital heart surgery. *Cardiovasc Pathol*, Jan-Feb 2016, 25(1), 12-17.
- WU, C.-C., Y.-C. CHAO, C.-N. CHEN, S. CHIEN, et al. Synergism of biochemical and mechanical stimuli in the differentiation of human placenta-derived multipotent cells into endothelial cells. *Journal of biomechanics*, 2008/01/01/ 2008, 41(4), 813-821.
- WU, W., R. A. ALLEN a Y. WANG Fast degrading elastomer enables rapid remodeling of a cell-free synthetic graft into a neo-artery. *Nature medicine*, 2012, 18, 1148 - 1153.
- YAMAMOTO, K., T. TAKAHASHI, T. ASAHARA, N. OHURA, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* (1985), Nov 2003, 95(5), 2081-2088.
- YAO, R. a J. Y. WONG The effects of mechanical stimulation on controlling and maintaining marrow stromal cell differentiation into vascular smooth muscle cells. *Journal of biomechanical engineering*, 2015, 137(2), 020907-020907.
- YE, G. J., A. P. NESMITH a K. K. PARKER The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes' [corrected] cytoskeleton and contractile function. *Anat Rec (Hoboken)*, Sep 2014, 297(9), 1758-1769.
- YEE, A., Y. SAKURAI, S. G. ESKIN a L. V. MCINTIRE A Validated System for Simulating Common Carotid Arterial Flow In Vitro: Alteration of Endothelial Cell Response. *Annals of Biomedical Engineering*, 2006/03/25 2006, 34(4), 593.
- YOKOTA, T., H. ICHIKAWA, G. MATSUMIYA, T. KURATANI, et al. In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *J Thorac Cardiovasc Surg*, Oct 2008, 136(4), 900-907.
- YOKOYAMA, U., Y. TONOOKA, R. KORETAKE, T. AKIMOTO, et al. Arterial graft with elastic layer structure grown from cells. *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 140.
- ZENG, L., Q. XIAO, A. MARGARITI, Z. ZHANG, et al. HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *The Journal of cell biology*, 2006, 174(7), 1059-1069.
- ZHANG, L., Q. AO, A. WANG, G. LU, et al. A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, May 2006, 77(2), 277-284.



ZHANG, P., J. BAXTER, K. VINOD, T. N. TULENKO, et al. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Dev*, Nov 2009, 18(9), 1299-1308.

## Seznam obrázků

Obrázek 1 - Stavba cévní stěny (Blausen 2014) .....	10
Obrázek 2 - konfigurace systémů s průtokovým namáháním: a) rotující kužel, b) paralelní desky. Obrázek převzat z (Brown 2000). .....	14
Obrázek 3 - Sestavy pro kompresivní namáhání. A) kompresivní namáhání 2D buněčné kultury prostřednictvím tlaku šířícího se kultivačním médiem. B) tlakové namáhání buněk inkorporovaných do buněčného nosiče, který je přímo tlakově komprimován pístem. Obrázek převzat z (Brown 2000). .....	16
Obrázek 4 - Systémy s jednoosým namáháním a) podélnou tenzí, b) flexí substrátu. Obrázek převzat z (Brown 2000). .....	17
Obrázek 5 - Vybrané kultivační komory a systémy. A – komora pro decelularizované vzorky perikardu, B – komora pro tlakovou stimulaci na skle, C – komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách, D – automatizovaný decelularizační systém, E – rotační osazovací systém pro endotelizaci tubulárních náhrad, F – komora pro elasticko-tlakovou stimulaci na silikonovém substrátu, G – komora PPFC pro stimulaci pomocí smykového napětí, H – mikroperfuzní stimulační systém s připojenou komorou a rezervoárem. ....	24
Obrázek 6 - schematické znázornění systému na decelularizaci tkání a jeho instalace v temperované komoře.....	26
Obrázek 7 - funkční znázornění komory pro decelularizaci planárních tkání a její použití v decelularizačním systému. ....	26
Obrázek 8 - funkční znázornění komory pro decelularizaci tubulárních tkání a jejich instalace v decelularizačním systému. ....	27
Obrázek 9 - schématické znázornění kultivační komory typu PPFC. ....	28
Obrázek 10 – A - sestava kultivačních komor a perfuzního okruhu, B - externí peristaltická pumpa s ovládacím SW a C - detail kultivačních komor. ....	29
Obrázek 11 – A - nová verze kultivační komory a perfuzního systému v buněčném inkubátoru, B – detail kultivační komory v mikroskopu pro živé snímání buněk, C – barvivová zkouška tvorby laminárního proudění v komoře a D – ovládací SW systému. ....	30
Obrázek 12 - Schématické znázornění kultivační komory typu PPFF s portem pro nasazení buněk a možností instalace do mikroskopu. ....	30

Obrázek 13 - časoběrné snímání při kultivaci v komoře, zleva - čas 0 po vstříknutí buněčné suspenze, 50 minut adheze buněk, 24 hodin průběžná stimulace, buňky bez zřejmé orientace, po 28 hodinách buňky se orientují ve směru proudění.....	31
Obrázek 14 - Dynamická kultivace po 72 hodinách od nasazení, vlevo orientace buněk v proudění, vpravo imunofluorescenčně barvený VE-kadherin (červeně) a talin demonstrující vazbu mezibuněčných kontaktů a vazbu na povrch.....	31
Obrázek 15 - A držák cévy s decelularizovanou cévou, B - rotační osazovací komory, C - rotační systém umístěný na kývne podložce, D - komora pro stimulaci. ....	32
Obrázek 16 - Celkový pohled na sestavenou kultivační komoru (nahore). Vlevo dole řez komorou a jednotlivými částmi, uprostřed dole detail držáku tkáně s rezervoáry, vpravo dole detail decelularizované tkáně po kultivačním experimentu.....	33
Obrázek 17 - Kultivační komora pro tlakovou stimulaci na skle, vlevo sestavená komora, vpravo umístěna v mikroskopu pro živé snímání buněk. ....	34
Obrázek 18 - Modifikace kultivační komory pro kultivaci na elastickém silikonovém substrátu. Patrná tvorba extracelulární hmoty. ....	34
Obrázek 19 - Kultivační systém s připojenou komorou pro tlakovou stimulaci ve více jamkových deskách (a) a detail kultivační komory (b).....	35
Obrázek 20 – jednotlivé režimy mikroperfúzního systému.....	37
Obrázek 21 - A - instalovaný perfúzní systém v buněčném inkubátoru, B - ovládací elektronika, C - uživatelské rozhraní pro nastavení parametrů. ....	38
Obrázek 22 - Perfúzní systém v režimu tlakové stimulace.....	39
Obrázek 23 – Průběh decelularizace prasečího perikardu. Histologické kryorezy o tloušťce 10 $\mu$ m a barvené pomocí DAPI. Nahore nativní tkáň s patrnými jádry buněk. Uprostřed tkáň po cyklech SDS před použitím DNAzy s patrnými zbytky DNA. Dole plně decelularizovaná tkáň bez patrných zbytků jader a DNA.....	41
Obrázek 24 - Morfologie HSVEC na kolagenu (Co), Co / LM a Co / FN. Imunofluorescence VE-kadherinu (A1–9), Vinculin (B1–9), KDR (C1–9) a vWF (D1–9) (zelená), jádra buněk kontrastně barvená Hoechstem (modrá). Proudění je zleva doprava, jak je naznačeno obousměrnými šipkami. Epifluorescenční mikroskop Olympus IX50, Olympus Digitální fotoaparát DP70, zvětšení 100, stupnice měřítka = 20 mm. Obrázek publikován v (Chlupac, et al. 2014).....	44
Obrázek 25 - Imunofluorescenční barvení a-aktinu (červená) a kalponinu (zelená) u ASC kultivovaných na fibrinovém gelu na skle za statických podmínek (A, C) a za dynamických podmínek (B, D), A, B: 3 dny kultivace; C, D: 7 dní kultivace. Jádra buněk	

jsou kontrastně barvena Hoechstem # 33258. IX71 Olympus mikroskop, digitální fotoaparát DP71, obj. × 10.....	47
Obrázek 26 - Počty buněk na daném substrátu při statické a dynamické kultivaci (vlevo), relativní intenzita fluorescence vtažená na počet buněk H1 kalponinu u statické a dynamické kultivace. ....	48
Obrázek 27 - imunofluorescenčně barvený H1-kalponin při různých typech kultivace na skle a fibrinovém potahu.....	48
Obrázek 28 - Vlevo imunofluorescenčně značený kolagen I (červeně) a fibronectin (zeleně) u statické a dynamické kultivace na skle a fibrinu. Vpravo barevně kódovaná (podle hloubky) jádra buněk. ....	49
Obrázek 29 – Kmenové (stromální) buňky z prasečí tukové tkáně (PrASC) kultivované v statickém a dynamickém buněčném kultivačním systému vytvářejícím tlak po dobu tří dnů. Buňky byly pěstovány na celulósových sítích s tlustým nebo tenkým povlakem CNF + MWCNT (sloupec (a) a (b)), s povlakem CNF (sloupec (c)) a bez jakéhokoli povlaku (sloupec (d))). Buňky byly obarveny imunofluorescencí na vinculin (zelený), s TRITC-konjugovaným falloidinem pro zobrazení F-aktinu (červený) a DAPI pro jádra (modrý). Celulósová síť měla v modrém kanálu autofluorescenci. Konfokální mikroskop Dragonfly 503 s kamerou Zyla 4.2 PLUS sCMOS, objektiv HC PL APO 20x / 0,75 IMM CORR CS2. Měřítka: 50 μm.....	50
Obrázek 30 - Růst a diferenciaci PrASC na decelularizovaném porcinním perikardu..	51
Obrázek 31 – Srovnání rekolonizace decelularizované tkáně pomocí PrASC při statických a dynamických podmínkách, doba kultivace 5 a 10 dní, 20 μm kryorezy barvené pomocí DAPI. Mikroskop Leica Dmi8, objektiv 10x.....	55
Obrázek 32 - Počty buněk v daných 50 μm segmentech tkáně. Statistická hladina významnosti $p \leq 0,05$ . Pro každý typ kultivace a interval bylo hodnoceno z 10 náhodných vzorků. Červená čára představuje median; modrý rámeček ohraničuje 1. a 3. kvartil; hradba ohraničuje minimální a maximální hodnoty a červené body jsou odlehlé hodnoty. ....	56
Obrázek 33 - Srovnání metod osazení decelularizovaných tkání před kultivací v reaktoru. Nahoře jednostranné dole oboustranné osazení decelularizované tkáně. Dynamická kultivace 5 dní, buňky prasečí stromální buňky PrASC. 20 μm histologické řezy v parafínu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI. ....	57
Obrázek 34 - Decelularizovaný prasečí perikard a jeho následná recelularizace prasečími stromálními buňkami PrASC. Oboustranné osazení tkáně v kultivační komoře.	

Dynamická kultivace v reaktoru 5 dní. 20 µm histologické řezy v parafinu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI. ....	58
Obrázek 35 – Decelularizovaný ovčí perikard a jeho následná recelularizace prasečími stromálními buňkami PrASC. Oboustranné osazení tkáně v kultivační komoře. Dynamická kultivace v reaktoru 5 dní. 20 µm histologické řezy v parafinu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI. ....	58
Obrázek 36 - Zleva, operační preparace a.caritis, příprava umělého defektu, našití cévní záplaty, obnovení průtoku.....	59
Obrázek 37 - imunofluorescenčně barvené histologické řezy explantované nativní cévy, záplaty tvořené pouze decelularizovaná tkáně a záplaty rekolonizované autologními stromálními buňkami. Imunofluorescenčně značné CD31 (zeleně), F-aktin (červeně) a jádra modře. ....	60

## Publikace, užité vzory, kapitoly v knihách

### Publikace, užité vzory a kapitoly v knihách se vztahem k dizertační práci

#### Publikace

**MATĚJKA, R.**, M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. LIPENSKÝ, J. CHLUPÁČ, D. TUREK, Š. PRAŽÁK, A. BROŽ, Z. ŠIMŮNKOVÁ, I. MRÁZOVÁ, S. FOROSTYAK, P. KNEPPO, J. ROSINA, L. BAČÁKOVÁ a J. PIRK Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. Applied Sciences, 2020a, 10(16). **IF = 2,474**

CHLUPAC, J., E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, **R. MATEJKA**, T. RIEDEL, M. HOUSKA, E. BRYNDA, E. PAMULA, M. RÉMY, R. BAREILLE, P. FERNANDEZ, R. DACULSI, C. BOURGET, L. BACAKOVA a L. BORDENAVE The gene expression of human endothelial cells is modulated by subendothelial extracellular matrix proteins: Short-term response to laminar shear stress. Tissue Engineering - Part A, 2014 2014, 20(15-16), 2253-2264. **IF = 3,496**

BACAKOVA, L., J. PAJOROVA, M. TOMKOVA, **R. MATEJKA**, A. BROZ, J. STEPANOVSKA, S. PRAZAK, A. SKOGBERG, S. SILJANDER a P. KALLIO Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. Nanomaterials (Basel), Jan 23 2020, 10(2). **IF = 4,324**

MUSILKOVA, J., E. FILOVA, J. PALA, **R. MATEJKA**, D. HADRABA, D. VONDRASEK, O. KAPLAN, T. RIEDEL, E. BRYNDA, J. KUCEROVA, M. KONARIK, F. LOPOT, P. JAN a L. BACAKOVA Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies. Biomed Mater, Dec 9 2019, 15(1), 015008. **IF = 3,174**

VONDRÁŠEK, D., D. HADRABA, **R. MATĚJKA**, F. LOPOT, M. SVOBODA a K. JELEN Uniaxial Tensile Testing Device for Measuring Mechanical Properties of Biological Tissue with Stress-Relaxation Test under a Confocal Microscope. Manufacturing Technology, 2018, 18(5), 866-872.

PROCHAZKA, V., **R. MATEJKA**, T. IZAK, O. SZABO, J. STEPANOVSKA, E. FILOVA, L. BACAKOVA, V. JIRASEK a A. KROMKA Nanocrystalline diamond-based impedance sensors for real-time monitoring of adipose tissue-derived stem cells. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, May 2019, 177, 130-136. **IF = 4,389**

PROCHÁZKA, V., **R. MATĚJKA**, T. IŽÁK, O. SZABÓ, J. ŠTĚPANOVSKÁ, L. BAČÁKOVÁ a A. KROMKA Real-Time Monitoring of Stem Cells by Diamond-Based Impedance Sensors. Proceedings, 2017, 1(4).

#### Užité vzory

České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Česká republika Užité vzor 33917.14.4.2020.

České vysoké učení technické v Praze, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Institut klinické a experimentální medicíny. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, Š. PRAŽÁK, L. BAČÁKOVÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Česká republika Užitný vzor 33916.14.4.2020.

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ a J. ZÁRUBOVÁ Česká Republika Užitný vzor 31066. 3.10.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a E. FILOVÁ Česká Republika Užitný vzor 30441. 7.3.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, P. KNEPPO, E. BRYNDA, T. RIEDEL, E. FILOVÁ, M. TRÁVNÍČKOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a Z. RIEDELOVA Česká republika Užitný vzor 30705. 30.5.2017.

Fyzikální ústav AV ČR. v. v. i., Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i. Kultivační komora pro in-vitro opticko-elektrické monitorování biologických kultur s impedančními opticky-transparentními diamantovými elektrodami. Původci: **MATĚJKA, R.**, V. PROCHÁZKA, T. IŽÁK, J. ŠTĚPANOVSÁ, A. KROMKA, M. TRÁVNÍČKOVÁ a L. BAČÁKOVÁ Česká Republika Užitný vzor 30691. 15.5.2017.

### **Kapitoly v knihách**

BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, **R. MATEJKA**, J. STEPANOVSKA, J. MUSILKOVA, J. ZARUBOVA a M. MOLITOR. Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. In K. SAKUMA ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. IntechOpen, 2018.

BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, **R. MATĚJKA**, J. STEPANOVSKA, J. MUSILKOVA, J. ZARUBOVA a M. MOLITOR. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. In K. SAKUMA ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. IntechOpen, 2018.

BACAKOVA, L., M. ZIKMUNDOVA, J. PAJOROVA, A. BROZ, E. FILOVA, A. BLANQUER, **R. MATEJKA**, J. STEPANOVSKA, P. MIKES, V. JENCOVA, E. K. KOSTAKOVA a A. SINICA. Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Synthetic Polymers. In M. STOYECHEVA and R. ZLATEV ed. *Applications of Nanobiotechnology*. IntechOpen, 2019.

### **Konferenční příspěvky s oceněním**

**MATEJKA, R.**, J. ROSINA, E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, J. CHLUPAC a J. STEPANOVSKA. Automated dynamic bioreactor for 2D endothelial structures. In *2013 E-Health and Bioengineering Conference, EHB 2013*. 2013. – **Young Researcher Award**

### **5.1 Další publikace bez přímého vztahu k dizertační práci**

STEPANOVSKA, J.\*, **R. MATEJKA\***, M. OTAHAL, J. ROSINA a L. BACAKOVA The Effect of Various Surface Treatments of Ti6Al4V on the Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Coatings*, 2020a, 10(8). **IF = 2,436**

**\*These authors contributed equally to the study.**

STEPANOVSKA, J., **R. MATEJKA**, J. ROSINA, L. BACAKOVA a H. KOLAROVA Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, Mar 2020b, 164(1), 23-33. **IF = 1,198**

KUMOREK, M., O. JANOUSKOVA, A. HOCHERL, M. HOUSKA, E. MAZL-CHANOVA, N. KASOJU, L. CUCHALOVA, **R. MATEJKA** a D. KUBIES Effect of crosslinking chemistry of albumin/heparin multilayers on FGF-2 adsorption and endothelial cell behavior. *Applied Surface Science*, JUL 31 2017 2017, 411, 240-250. **IF = 6,182**

KUMOREK, M., D. KUBIES, E. FILOVÁ, M. HOUSKA, N. KASOJU, E. M. CHÁNOVÁ, **R. MATĚJKA**, M. KRÝSLOVÁ, L. BAČÁKOVÁ a F. RYPÁ?EK Cellular responses modulated by FGF-2 adsorbed on albumin/heparin layer-by-layer assemblies. *PLoS ONE*, 2015 2015, 10(5). **IF = 2,740**

MOLACEK, J., V. OPATRNY, **R. MATEJKA**, J. BAXA a V. TRESKA Retrograde oxygen persufflation of kidney - Experiment on an animal. In *Vivo*, 2016 2016, 30(6), 801-805. **IF = 1,609**

OPATRNY, V., J. MOLACEK, V. TRESKA, **R. MATEJKA** a O. HES Perfusion of a Kidney Graft From a Donor After Cardiac Death Based on Immediately Started Pulsatile Machine Perfusion?An Experimental Study on a Small Animal. *Transplantation Proceedings*, 2018 2018, 50(5), 1544-1548. **IF = 0,784**

VOLTROVA, B., V. HYBASEK, V. BLAHNOVA, J. SEPITKA, V. LUKASOVA, K. VOCETKOVA, V. SOVKOVA, **R. MATEJKA**, J. FOJT, L. JOSKA, M. DANIEL a E. FILOVA Different diameters of titanium dioxide nanotubes modulate Saos-2 osteoblast-like cell adhesion and osteogenic differentiation and nanomechanical properties of the surface. *Rsc Advances*, 2019, 9(20), 11341-11355. **IF = 3,119**

MOLACEK, J., V. OPATRNY, V. TRESKA, **R. MATEJKA** a O. HES Možnosti zlepšení vlastností ledvinných štěpů od dárců s rozšířenými kritérii - experimentální studie. *Rozhledy v chirurgii : mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti*, 2018, 97(5), 193-201.



## Přílohy

### Články:

1. **MATĚJKA, R.**, M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. LIPENSKÝ, J. CHLUPÁČ, D. TUREK, Š. PRAŽÁK, A. BROŽ, Z. ŠIMŮNKOVÁ, I. MRÁZOVÁ, S. FOROSTYAK, P. KNEPPO, J. ROSINA, L. BAČÁKOVÁ a J. PIRK Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Applied Sciences*, 2020a, 10(16).
2. CHLUPAC, J., E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, **R. MATEJKA**, T. RIEDEL, M. HOUSKA, E. BRYNDA, E. PAMULA, M. RÉMY, R. BAREILLE, P. FERNANDEZ, R. DACULSI, C. BOURGET, L. BACAKOVA a L. BORDENAVE The gene expression of human endothelial cells is modulated by subendothelial extracellular matrix proteins: Short-term response to laminar shear stress. *Tissue Engineering - Part A*, 2014 2014, 20(15-16), 2253-2264.
3. BACAKOVA, L., J. PAJOROVA, M. TOMKOVA, **R. MATEJKA**, A. BROZ, J. STEPANOVSKA, S. PRAZAK, A. SKOGBERG, S. SILJANDER a P. KALLIO Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. *Nanomaterials (Basel)*, Jan 23 2020, 10(2).
4. MUSILKOVA, J., E. FILOVA, J. PALA, **R. MATEJKA**, D. HADRABA, D. VONDRASEK, O. KAPLAN, T. RIEDEL, E. BRYNDA, J. KUCEROVA, M. KONARIK, F. LOPOT, P. JAN a L. BACAKOVA Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies. *Biomed Mater*, Dec 9 2019, 15(1), 015008.
5. VONDRÁŠEK, D., D. HADRABA, **R. MATĚJKA**, F. LOPOT, M. SVOBODA a K. JELEN Uniaxial Tensile Testing Device for Measuring Mechanical Properties of Biological Tissue with Stress-Relaxation Test under a Confocal Microscope. *Manufacturing Technology*, 2018, 18(5), 866-872.

### Kapitoly v knize:

6. BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, **R. MATEJKA**, J. STEPANOVSKA, J. MUSILKOVA, J. ZARUBOVA a M. MOLITOR. Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. In K. SAKUMA ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. IntechOpen, 2018.

### Užitné vzory:







7. České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ a J. ZÁRUBOVÁ Česká republika Užitný vzor 31066. 3.10.2017.
8. České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro dynamickou kultivaci

buněk na tubulárních nosičích. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a E. FILOVÁ Česká Republika Užiténý vzor 30441. 7.3.2017.

9. České vysoké učení technické v Praze, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Institut klinické a experimentální medicíny. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, Š. PRAŽÁK, L. BAČÁKOVÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Česká republika Užiténý vzor 33916.14.4.2020.
10. České vysoké učení technické v Praze, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, P. KNEPPO, E. BRYNDA, T. RIEDEL, E. FILOVÁ, M. TRÁVNÍČKOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a Z. RIEDELOVA Česká republika Užiténý vzor 30705. 30.5.2017.
11. České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: **MATĚJKA, R.**, J. ŠTĚPANOVSKÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Česká republika Užiténý vzor 33917.14.4.2020.

Article

# Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use

Roman Matějka <sup>1,2,3,\*</sup>, Miroslav Koňářík <sup>4,5</sup>, Jana Štěpanovská <sup>1,2</sup>, Jan Lipenský <sup>6</sup>, Jaroslav Chlupáč <sup>2,7,8</sup>, Daniel Turek <sup>4,5</sup>, Šimon Pražák <sup>1,2</sup>, Antonín Brož <sup>2</sup>, Zuzana Šimůnková <sup>9</sup>, Iveta Mrázová <sup>9</sup>, Serhiy Forostyak <sup>6,10</sup>, Peter Kneppo <sup>1</sup>, Jozef Rosina <sup>1,3</sup>, Lucie Bačáková <sup>2</sup> and Jan Pirk <sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biomedical Technology, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, 272 01 Kladno, Czech Republic; jana.stepanovska@fbmi.cvut.cz (J.Š.); simon.prazak@fgu.cas.cz (Š.P.); kneppo@fbmi.cvut.cz (P.K.); rosina@fbmi.cvut.cz (J.R.)
  - <sup>2</sup> Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic; jaroslav.chlupac@ikem.cz (J.C.); antonin.broz@fgu.cas.cz (A.B.); lucie.bacakova@fgu.cas.cz (L.B.)
  - <sup>3</sup> Department of Medical Biophysics and Informatics, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 100 00 Prague, Czech Republic
  - <sup>4</sup> Cardiovascular Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague, Czech Republic; miroslav.konarik@ikem.cz (M.K.); daniel.turek@ikem.cz (D.T.); jan.pirk@ikem.cz (J.P.)
  - <sup>5</sup> Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 121 08 Prague, Czech Republic
  - <sup>6</sup> PrimeCell Bioscience a.s., 110 00 Prague, Czech Republic; jan.lipensky@primecell.eu (J.L.); serhiy.forostyak@primecell.eu (S.F.)
  - <sup>7</sup> Transplant Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague, Czech Republic
  - <sup>8</sup> Department of Anatomy, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 150 06 Prague, Czech Republic
  - <sup>9</sup> Experimental Medicine Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague, Czech Republic; zuzana.simunkova@ikem.cz (Z.Š.); iveta.mrazova@ikem.cz (I.M.)
  - <sup>10</sup> Department of Burns and Plastic Surgery, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic
- \* Correspondence: roman.matejka@fbmi.cvut.cz; Tel.: +42-02-2435-9936

Received: 21 July 2020; Accepted: 5 August 2020; Published: 7 August 2020



**Featured Application:** In this study, we have prepared decellularized pericardium repopulated with adipose tissue-derived stromal cells for potential use as implantable cardiovascular patches. Novel optimized dynamic decellularization and recellularization systems have been used and demonstrated. In this bioreactor, the stromal cells deeply repopulated the full thickness of the matrix, and they pre-differentiated towards the smooth muscle cell phenotype by applying cyclic pressure stimulation. Thus, these dynamically recellularized patches resemble vascular tunica media. These grafts may be further applied in animal experiments to assess surface endothelialization and in vivo remodelling. Animal tissue is of large potential availability and decellularization renders the matrix non-immunogenic. Autologous adipose cells for recellularization can be harvested through small biopsy in human patients with cardiovascular disease. A potential application of this approach is manufacturing a tissue-engineered cardiovascular patch with improved biocompatibility for the surgical repair of the human heart or vessels, such as the carotid artery or femoral artery.

**Abstract:** (1) **Background:** Decellularized xenogeneic tissues are promising matrices for developing tissue-engineered cardiovascular grafts. In vitro recellularization of these tissues with stromal cells can provide a better in vivo remodelling and a lower thrombogenicity of the graft. The process of recellularization can be accelerated using a cultivation bioreactor simulating physiological conditions and stimuli. (2) **Methods:** Porcine pericardium was decellularized using a custom-built decellularization system with an optimized protocol. Autologous porcine adipose-derived stromal cells (PrASCs), isolated from the subcutaneous fat tissue, were used for recellularizing the decellularized pericardium. A custom cultivation bioreactor allowing the fixing of the decellularized tissue into a special cultivation chamber was created. The bioreactor maintained micro-perfusion and pulsatile pressure stimulation in order to promote the ingrowth of PrASCs inside the tissue and their differentiation. (3) **Results:** The dynamic cultivation promoted the ingrowth of cells into the decellularized tissue. Under static conditions, the cells penetrated only to the depth of 50  $\mu\text{m}$ , whereas under dynamic conditions, the tissue was colonized up to 250  $\mu\text{m}$ . The dynamic cultivation also supported the cell differentiation towards smooth muscle cells (SMCs). In order to ensure homogeneous cell colonization of the decellularized matrices, the bioreactor was designed to allow seeding of the cells from both sides of the tissue prior to the stimulation. In this case, the decellularized tissue was recolonized with cells within 5 days of dynamic cultivation. (4) **Conclusions:** Our newly designed dynamic bioreactor markedly accelerated the colonization of decellularized pericardium with ASCs and cell differentiation towards the SMC phenotype.

**Keywords:** bioreactor; cardiovascular patch; decellularization; recellularization; pericardium

---

## 1. Introduction

Cardiovascular diseases belong to the most frequent causes of death or life quality impairment. Currently, autologous vessel replacements such as the saphenous vein represent the gold standard grafts for small-diameter vessels (below 6 mm), and in many factors, they outperform synthetic alternatives. Autologous grafts, however, are of limited availability, and an invasive approach for their harvesting is required. In many cases, they are unsuitable for use due to unfavorable anatomy (gracility, branching, thrombosis) or previous harvest [1]. Allograft vessels from cadaveric donors provide an alternative source for bypass grafting. These grafts can be cold-stored or cryopreserved in tissue banks; nevertheless, they are not immediately available for emergent surgery, and also their long-term patency is limited [2]. Synthetic grafts act in many cases as suitable replacements; however, they show a reduced clinical efficacy, especially in small-calibre applications [3]. There is a great clinical demand for new biomaterials providing feasible solutions, including proper mechanical support, functional tissue regeneration, and a non-thrombogenic surface [4].

Not only tubular grafts but also planar patches are required with similar properties as cardiovascular prostheses [5]. These planar patches are indispensable in many vascular reconstruction procedures, i.e., endarterectomy [6].

Moreover, with pliable, non-thrombogenic, non-immunogenic patches seeded with autologous cells, we are just one step ahead of new heart valves' construction. Current heart valve bioprostheses, despite various types of advanced anti-calcification processing, are still subject to structural valve deterioration (SVD) in a long-term manner. The incidence of SVD is strongly dependent on age and the type of prosthesis, so it can vary widely between 3.3–20% at a 10-year follow up, even in the elderly population [7]. SVD strongly limits the clinical use of bioprosthetic valves in younger patients, especially in children.

One possible solution to this problem is using xenogeneic grafts. However, animal tissues cannot be directly applied due to immune incapability, risk of infectious disease transfer, and other safety and regulatory issues. Therefore, a need for tissue processing and engineering is a crucial step

toward practical application. One possible way is graft decellularization. This process removes the immunogenic cellular elements and produces a non-immunogenic substitute suitable as an implantable graft or scaffold for further modifications. Also, the mechanical strength is preserved similarly to the native blood vessel, which is suitable for recolonization with the recipient's native cells *in vivo* [8,9].

The decellularization is typically accomplished by treating the tissues with a combination of detergents, solvents, enzymes, osmotic gradients, and chelating agents [10,11]. The process of decellularization affects the structural and functional features of the tissue, such as its swelling and stretching properties, suture retention, and the conductivity for cells [12]. Decellularized matrices for cardiovascular use need further modification. The first major thing is to improve the antithrombogenicity. Second is the support of an overall cell recolonization and stimulate re-endothelization *in vivo*. These steps could involve chemical modifications employing growth factors such as VEGF (Vascular endothelial growth factor), bFGF (Basic fibroblast growth factor) [13] to promote cell overgrowth, or use of heparin as an anti-thrombogenic agent, which also promotes cell grow [14]. On the other hand, growth factor use can be problematic for fulfilling the regulatory requirements for tissue grafts intended for human use and also potentially can induce unpredictable cell growth of host cells.

The second approach to the modification of decellularized matrices is their recolonization with cells. Several studies have demonstrated the improved performance of these matrices in animal models. Cell-recolonized decellularized grafts are distinguished by better biocompatibility, growth potential, mechanical strength, and elasticity. They also reduce the risk of thrombus formation and calcification and induce the recruitment of progenitor cells and tissue regeneration *in vivo* in contrast to the artificial materials [12]. These studies often used smooth muscle cells (SMCs) or endothelial cells (ECs) or their combinations [15], or included the adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) [16]. One of the advantages of ASCs is their high yield and high differentiation potential in comparison with differentiated cells [17]. Another advantage is the easiness of isolation, either from the liposuction-derived or excision-derived adipose tissue when compared to SMC or EC. These allow isolation of autologous cells for combined use with decellularized grafts. Dynamic cultivation of stem or stromal cells is an essential tool for promoting their proliferation, but also for inducing and establishing a contractile differentiated SMC-like phenotype in these cells. The differentiation of stem cells towards SMCs requires pulsatile stress and cyclic strain, which are components of the hemodynamic stress to which the blood vessels are exposed *in vivo* [18].

Conventional preparation of recellularized grafts is time-consuming. Under the static conditions, it takes several weeks of cell cultivation to reach cell overgrowth and maturation toward differentiated cells/tissues [15]. Dynamic bioreactors mimicking physiological conditions could speed-up recellularization and promote cell differentiation.

In this study, we demonstrate a novel cultivation system allowing the recellularization of planar decellularized tissues intended as cardiovascular patches. This system incorporates a combination of micro-perfusion with mechanical strain to stimulate the proliferation of ASC cells and their differentiation towards smooth muscle cells. As for substrate, we have used two types of decellularized tissues—porcine and ovine decellularized pericardium. With possible use in *in vivo* conditions, the porcine pericardium will be acting as allogeneous decellularized tissue, and the ovine will be modelling xenogeneic decellularized tissue.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Porcine and Ovine Pericardium for Decellularization

The porcine pericardium was obtained from a local slaughterhouse (Steinhauser s.r.o, Skalice nad Svitavou, Czech Republic). The Large White breed of pigs with a weight of approximately 100 kg and age 5–6 months were used. The fresh tissues were extracted during the slaughter process. The tissue was then transported to our laboratory in phosphate-buffered saline (PBS) with 100 µg/mL Gentamicin and 10 µg/mL Fluconazole (both LEK PHARMACEUTICAL D.D., Ljubljana, Slovenia).

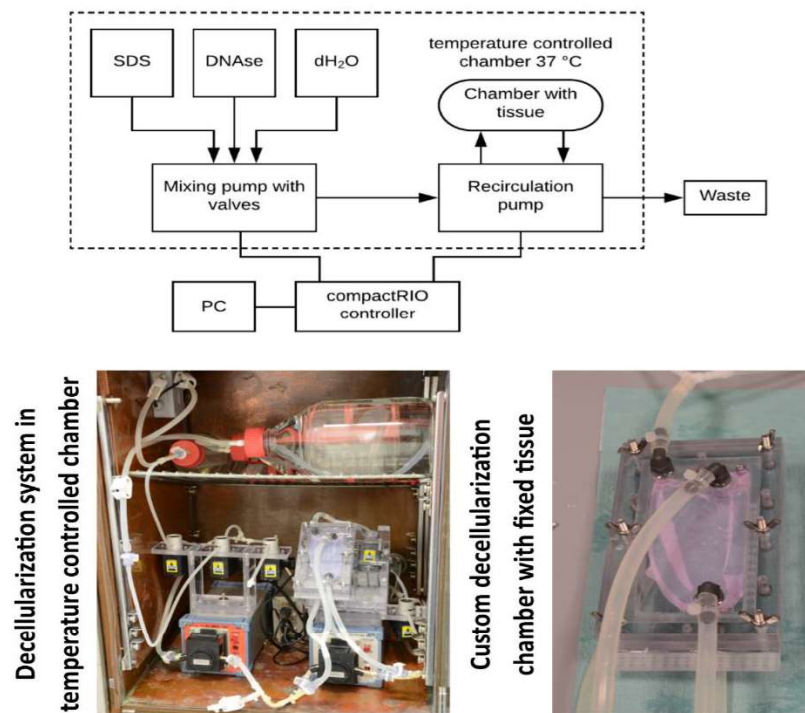
In the laboratory, the pericardial tissue was mechanically cleaned from fat and other residues. Then the tissue was cut into smaller pieces (approx.  $6 \times 10$  cm) to fit into the decellularization chamber described below, and frozen in a DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium with 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% ABAM (Antibiotic Antimycotic Solution, contains 100 units penicillin, 0.1 mg streptomycin, and 0.25  $\mu$ g amphotericin B per ml of culture media) and 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide). The freezing gradient was set to 1 °C/min up to  $-80$  °C. All chemicals unless otherwise specified were from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The ovine pericardium was obtained from experimental sheep (Suffolk breed, animals were used for another experimental work; these tissues were harvested fulfilling 3R). After animals were euthanized, a median sternotomy was performed and was followed by thoracotomy. The pericardium was extracted and mechanically cleaned from surrounding tissue, mainly fat. The same protocol for handling and cryopreservation, as described above, was used. Due to a limited number of experimental sheep, optimization procedures were mainly done on the porcine pericardium.

## 2.2. Decellularization System and Pericardium Decellularization

To automate the overall process of decellularization, a custom-made decellularization system was built. This solution consists of two peristaltic pumps with attached pinch valves. This system is controlled by an embedded controller compactRIO (National Instruments, Austin, TX, USA) with custom LabVIEW (also National Instruments) software to set appropriate parameters of the decellularization and to monitor the overall process. The first pump mixes and prepares decellularization agents, such as SDS (Sodium dodecyl sulfate) or DNase, with dH<sub>2</sub>O (deionized water) and fills the decellularization chamber. The second pump maintains the recirculation of the agents in the decellularization chamber. This approach promotes the overall decellularization of large tissues.

The process of decellularization works in cycles. First, the decellularization agent or water is filled into the chamber. Then, the agent/water is recirculated for a defined period. After that, the agent/water is flushed into waste. Finally, a new agent or water is filled again. These steps are repeated depending on the tissue properties or experimental setup. This multicycle approach maintains a high chemical gradient promoting the efficiency of agents and washing. The system is installed in a heated chamber that holds the temperature to 37 °C. Higher temperature promotes the activity of detergents. Also, a special chamber was designed for fixing the planar pericardial tissue. The flow in this chamber is optimized to be homogeneously spread over both sides of the tissue. This helps to decellularize the tissue homogeneously and to avoid the persistence of non-decellularized areas. The tissue in this chamber is fixed on a silicone holder using surgical silk. The overall view of the decellularization system and the fixing chamber is in Figure 1.



**Figure 1.** Schematic image of the decellularization system (top) and its installation in a temperature-controlled chamber (bottom left). Custom chamber for fixing pericardium and for maintaining the optimal process parameters (bottom right). The tissue is fixed in the chamber using a 4—0 suture on a silicone holder.

The frozen pericardium was thawed in a 37 °C water bath. Then, the tissue was installed in the decellularization chamber using a 4—0 suture. The 0.5% SDS solution was used as a decellularization agent. This solution was used in 6 recirculation cycles lasting 10 min each. Then the SDS was washed out using 5 recirculation cycles of dH<sub>2</sub>O lasting 5 min each. After that, a 60 min-lasting DNase cycle was performed. The DNase was dissolved in a DNase buffer to the concentration of 40 µg/mL. This treatment was crucial to remove the remaining residues of DNA spilt over the tissue as a result of the previous SDS treatment. Then, the overall process was finished with a thorough washing of the tissue, consisting of a hundred 10-min cycles of dH<sub>2</sub>O. The agent concentration, the cycle repetitions, and the exposure times were optimized to neutralize the potentially toxic effects of the agents and to minimize the mechanical degradation of the tissue described earlier [19]. The decellularized tissues were then sterilized in a 70% ethanol solution for 1 h, and then they were rinsed and stored in sterile PBS at 4 °C. To evaluate the effectiveness of the decellularization process, 10 µm-thin cryosections from randomly selected parts of the tissues were prepared. These sections were stained using DAPI to visualize the cell nuclei or the remaining DNA.

Cytotoxicity and sterility tests were also performed. The cultivation of cells in the leachate and directly on the decellularized tissue were done to verify the potential cytotoxic effects. The leachates were prepared in a laboratory. Decellularized and sterile tissue was incubated in DMEM culture media with 10% FBS for 72 h. Then, this culture media was added to cells, and proliferation was observed. The isolated porcine adipose tissue-derived stromal cells were used for these cytotoxic tests. The sterility tests were performed according to Ph. eur. 2.6.1 and ISO 11737-2 [20] in thioglycollate broth and tryptic soy broth.

### 2.3. Fat Extraction and Isolation of Porcine Adipose-Derived Stromal Cells

Porcine adipose tissue-derived stromal cells (PrASCs) were isolated from fat that was surgically extracted from the neck area of experimental pigs. Prestice black-pied pigs weighing approximately 35–40 kg were used.

During the surgery under general anaesthesia, a small amount of subcutaneous fat (approx. 2 cm<sup>3</sup>) was excised. Harvesting subcutaneous fat from the neck area was an easy and rapid surgical procedure well tolerated by the animals. There were no complications regarding wound healing. The fat obtained from this procedure was stored in warm DMEM containing 10% FBS and 3% ABAM solution and was transferred to the laboratory for further cell isolation.

The protocol for cell isolation was set according to Estes et al. [21] with some modifications developed in studies focused on adipose-derived stem or stromal cells [22,23]. These modifications included tissue homogenization and a red blood cell lysing step. First, the fat tissue was mechanically cleaned from other tissues and was rinsed several times in PBS with 3% ABAM solution. Then, the fat was mechanically minced and homogenized into small pieces, and put into a 0.1% collagenase I solution with 1% BSA in PBS. After 2 h of collagenase digestion, the cells were treated with a red blood cell lysis buffer, centrifuged, and seeded into cultivation flasks with DMEM with 15% FBS and 1% ABAM solution. In these primocultures, it took approximately 3–5 days to reach the cell confluence, which was taken as passage 0. After that, the cells were passaged into large 175 cm<sup>2</sup> culture flasks (1.2–1.5 million of cells per flask) and cultivated in a DMEM/F12 medium (ratio 1:1) supplemented with 10% FBS, 10 ng/mL FGF2 (FGF-basic (154aa), Genscript, Leiden, The Netherlands) and 1% ABAM solution. This medium was used to stimulate cell proliferation. After reaching confluence in passage 1, the cells were seeded on the decellularized pericardium. In addition, a flow cytometry analysis was performed to characterize the cells. The cells in the 2nd passage were also characterized by a flow cytometry analysis using NovoCyte Flow Cytometer (Acea Biosciences, Inc., CA, USA). Results of flow cytometry shown in Table 1.

**Table 1.** Flow cytometry analysis of isolated adipose-derived stromal cells.

CD Marker	PrASC Animal 1	PrASC Animal 2	Antibody Provider	Cat. No.
29	98.85%	99.34%	Invitrogen (CA, USA)	CD2920
31	34.58%	28.64%	Origene (MD, USA)	SM2146APC
34	0.47%	1.06%	Biorbyt (UK)	orb247244
45	1.09%	2.99%	Biorad (CA, USA)	MCA1222A647
73	0.31%	2.60%	Biolegend (CA, USA)	344004
90	99.08%	99.64%	BD Biosciences (NJ, USA)	555596
105	96.23%	99.56%	Abcam (UK)	ab53321
146	0.18%	0.71%	Origene (MD, USA)	SM1860F

#### 2.4. Cultivation Bioreactor

A custom-made dynamic culture system was used for recellularization of the decellularized tissue. This system consists of a specially designed cultivation chamber that allows fixing the pericardium, and of a pressure stimulation system generating pressure pulsation and culture media perfusion.

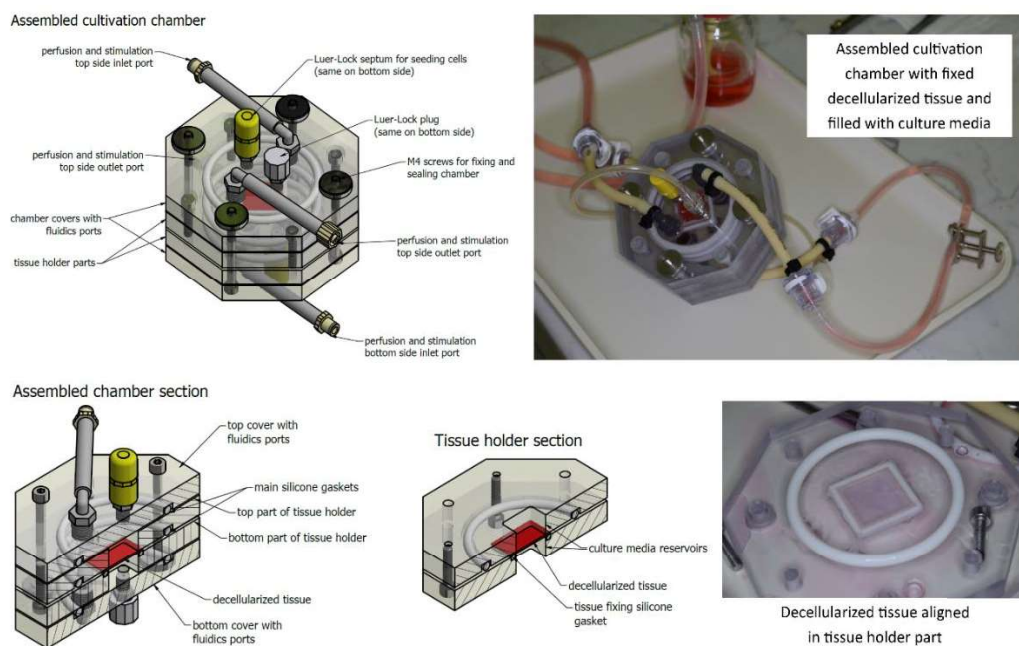
The cultivation chamber consists of four main parts. The middle two parts create a tissue holder. Both parts create reservoirs for culture media, and also, one part contains a small silicone gasket fixing the tissue. The decellularized tissue is cut to 35 × 35 mm<sup>2</sup> squares. Then these squares are placed over the hole of the reservoir. The reservoir has a square shape and is limiting the area to 30 × 30 mm<sup>2</sup> where cells are cultivated. The remaining 2.5 mm border of the prepared tissues is used for fixing them in place. A special inlet is put into this hole in order to prevent tissue bending. Then, the tissue is fixed with the second middle part of the chamber containing the silicone gasket that fixes the tissue in its position. A silicone O-ring gasket is also added to ensure the tightness of the chamber. Four stainless steel M4 screws tighten the holder. After this procedure, the helping inlet is removed.

Next, the chamber is closed by covers containing fluidics ports. Two more silicone O-ring gaskets are added to ensure the tightness. These covers are also tightened to the holder using stainless steel M4 screws with knurled nuts. To minimize the risk of any contamination or toxicity, these screws are not in contact with the tissue or the culture media. All other parts of the chamber are made of non-toxic materials including polycarbonate, polyamide, or silicone as mentioned above, and were



previously tested for potential cytotoxicity. Fluidics ports include two elbow pieces with silicone hoses with Luer-Locks (LLs) or quick couplings for connecting the perfusion/stimulation system. There are also two female LLs located in the middle of the lid for connecting a sterile septum for cell seeding, auxiliary hoses for pressure sensing, etc. The overall view of the cultivation chamber and its sections are illustrated in Figure 2. The technical solution is described in detail in our utility model [24].

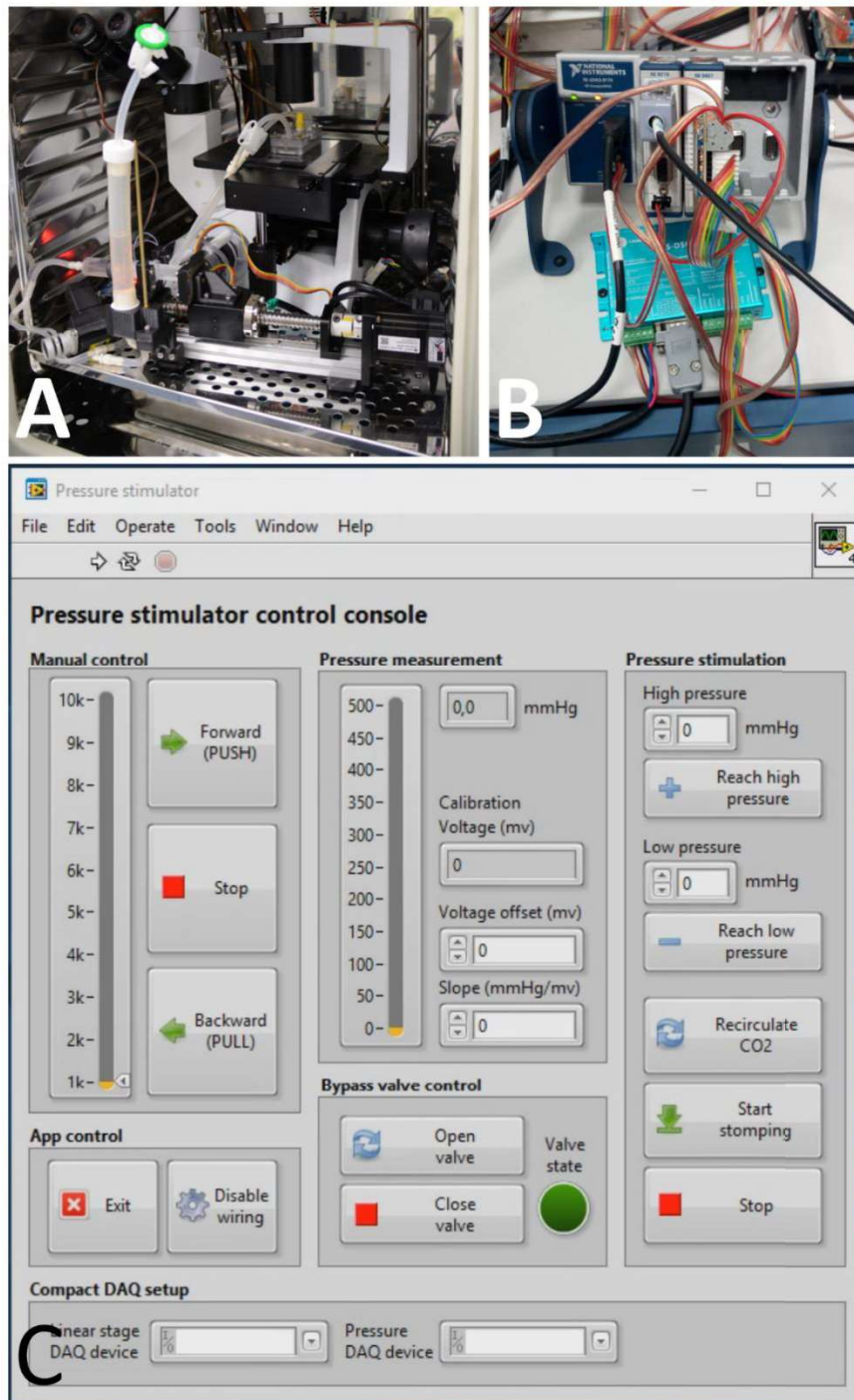
After assembling the chamber and ensuring its tightness, the chamber is connected to a perfusion circuit, a syringe with cultivation media and a working reservoir (described below). All the above-mentioned steps (i.e., tissue fixing, chamber assembling, connecting to perfusion circuit, etc.) are done in a biohazard box to ensure sterility. The cell seeding is then done using the sterile septum and a syringe with a needle. The chamber is vertically oriented during cultivation to minimize the risk of forming bubbles in the reservoirs. In order to provide multiple parallel sample cultivation, the chambers were daisy-chained.



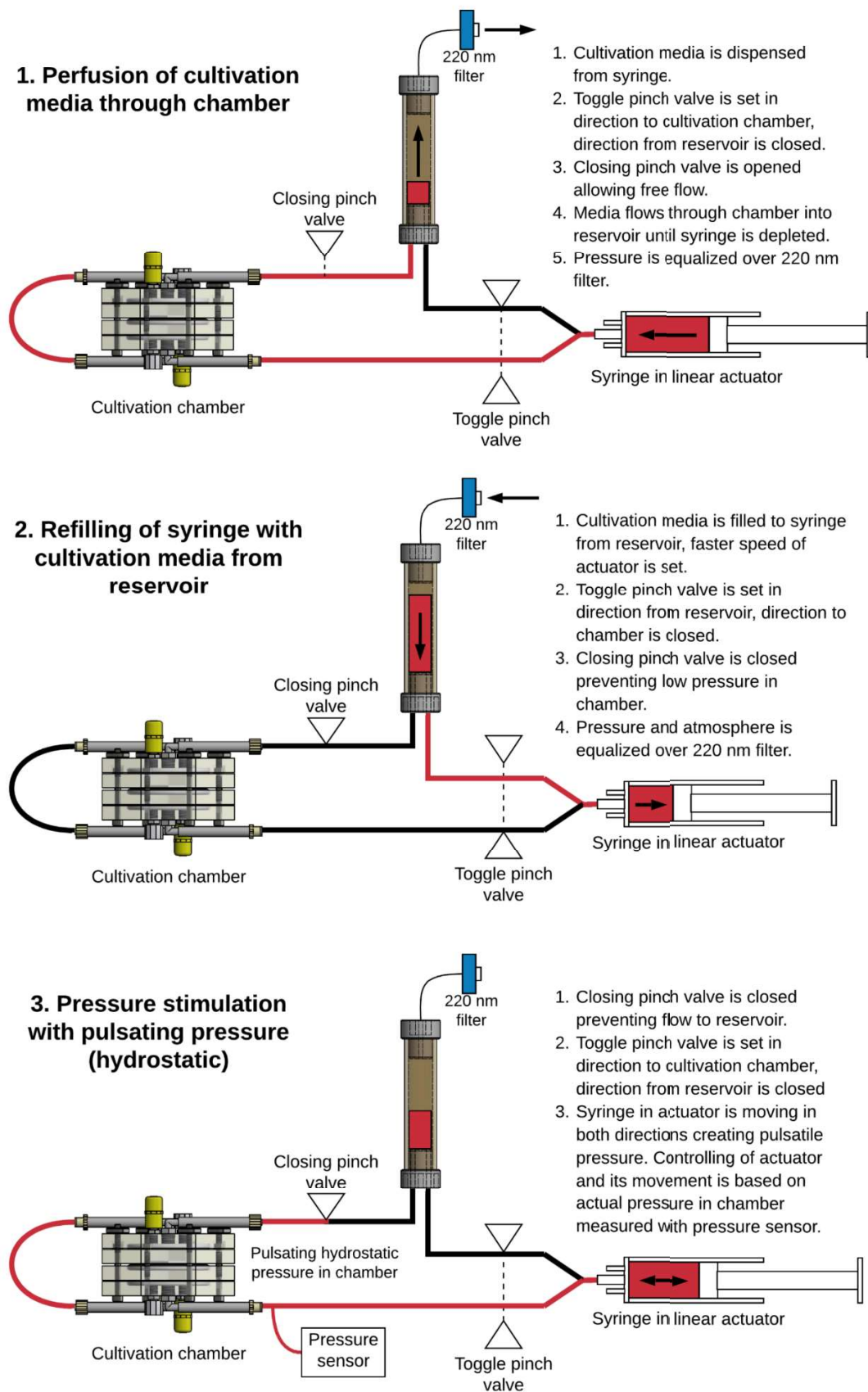
**Figure 2.** Overall schematic view of the cultivation chamber with sections of the main parts (left). Fully assembled cultivation chamber connected to the perfusion/stimulation system filled with cultivation media (right-top). Detail of a decellularized tissue in the tissue holder part (right bottom).

In order to maintain the perfusion of the tissue with cultivation media and to establish the stimulation of cells with pulsatile pressure waves, a unique system was also developed. This system is based on an electronically controlled linear actuator with the syringe and perfusion circuit connecting. The NI compactDAQ (National Instruments, Austin, TX, USA) platform was used with modules consisting of the digital input/output lines necessary for controlling the pump and valves (module cDAQ 9401), and with an analogue module for the pressure transducer (module cDAQ 9218). Custom LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA) software was created to control the system. This software controls the movement of the linear actuator and implements a feedback control for the pressure stimulation. This linear actuator with electronics and the control software is depicted in Figure 3. The design of the perfusion system is described in detail in our utility model [25]. The perfusion circuit consists of a silicone tubing, a 20 mL syringe installed in the linear actuator, and a working reservoir for culture media. The perfusion/stimulation system in this study was optimized to operate in three modes. The modes of operation and the overall setup are illustrated in Figure 4. In mode 1, perfusion of the cultivation media through the chamber, and in mode 2, refilling the syringe with cultivation media from the reservoir, the system moves at a constant speed until reaching the limit switch on the appropriate side of the movement. These modes were primarily used during the initial

phase of experiments to equilibrate the pH and temperature of the cultivation media and to remove all bubbles from the cultivation chamber. Mode 3, pressure stimulation, uses feedback control. In the software, the frequency and two pressure thresholds are specified. Based on these settings, the actuator moves in both directions repeatedly until reaching high/low-pressure thresholds. The speed is adjusted to reach a specified frequency of pulses. The pressure measurement is done with a disposable pressure transducer used for measuring invasive blood pressure TruWave(Baxter, Irvine, CA, USA), which is connected to an auxiliary Luer-Lock in the cultivation chamber.



**Figure 3.** (A) The linear actuator with an installed syringe and working reservoir in a CO<sub>2</sub> cell incubator; (B) the compactDAQ control system; (C) the pressure stimulator controlling software GUI.



**Figure 4.** Schematic setup of the perfusion/stimulation circuit with a connected chamber. Three modes of operation used in the cultivation process are shown.

### 2.5. Cell Seeding and Dynamic Cultivation

Before the cells were seeded, the pH and the temperature in the cultivation system and in the chamber were equilibrated. In this phase, the culture medium was perfused through the cultivation chamber. All bubbles were also removed. This phase took about 2 h.

Then the cell suspension was prepared. The cells were seeded at a density of 90,000 cells/cm<sup>2</sup>. This density was experimentally adjusted to form a homogeneous, confluent layer on the top of the decellularized tissue. As was mentioned above, 35 × 35 mm<sup>2</sup> squares of the tissue were fixed in the chamber. The total area for cell growth was 30 × 30 mm<sup>2</sup>; the borders were used for fixing the tissue in the holder. Thus, there were 810,000 cells on one side of the tissue, which were suspended in 500 µL of the culture medium. This cell suspension was then injected through a sterile septum into the appropriate side of the cultivation chamber. Then, the chamber was aligned horizontally, allowing the cells to adhere. During this phase, there was no perfusion and no dynamic stimulation. The cell adhesion phase took 60 min. After that, mild perfusion (flow 2 mL/min) with the culture medium was started. The perfusion lasted for 2 h. After that, the stimulation was set to 15.9/10.6 kPa (120/80 mmHg) high/low pressure with a frequency of 1 Hz (60 pulses per minute). Every 2 h, the stimulation was changed to the perfusion mode for 10 min in order to refill the reservoirs of the chamber with a fresh culture medium. This cultivation was performed for 5 days and for 10 days.

The first goal of this study was to test how well the bioreactor promotes the ingrowth of the cells through the decellularized tissue, so only one side of the tissue was seeded with cells and analyzed. The second goal was to prepare fully recellularized cardiovascular patches. When these patches were being prepared, the cells were seeded from both sides. This procedure involved the described seeding on one side. Then, the cells were left for 60 min, allowing their adhesion. After this phase, the chamber was turned and then the same seeding procedure, but from the second side, was performed, also followed by 60 min of cell adhesion.

The cultivation medium consists of DMEM/F12 with a 1:1 mixture, supplemented by 10% of fetal bovine serum, 50 µg/mL of ascorbic acid, 2.5 ng/mL of TGF-β (Transformation growth factor β), 2.5 ng/mL of BMP4 (Bone morphological protein 4), and 1% of ABAM antibiotics. This composition was set on the basis of our previous study [17], in order to promote both the growth and the differentiation of the ASCs towards smooth muscle cells. This culture medium was replaced every two days. During replacement, the cultivation chamber and the perfusion circuit were still fully flooded, and only the remaining medium was refilled into a syringe from the working reservoir. Then, the syringe was replaced by a new syringe containing fresh culture medium. These syringe replacements were carried out in a biohazard box to ensure sterility.

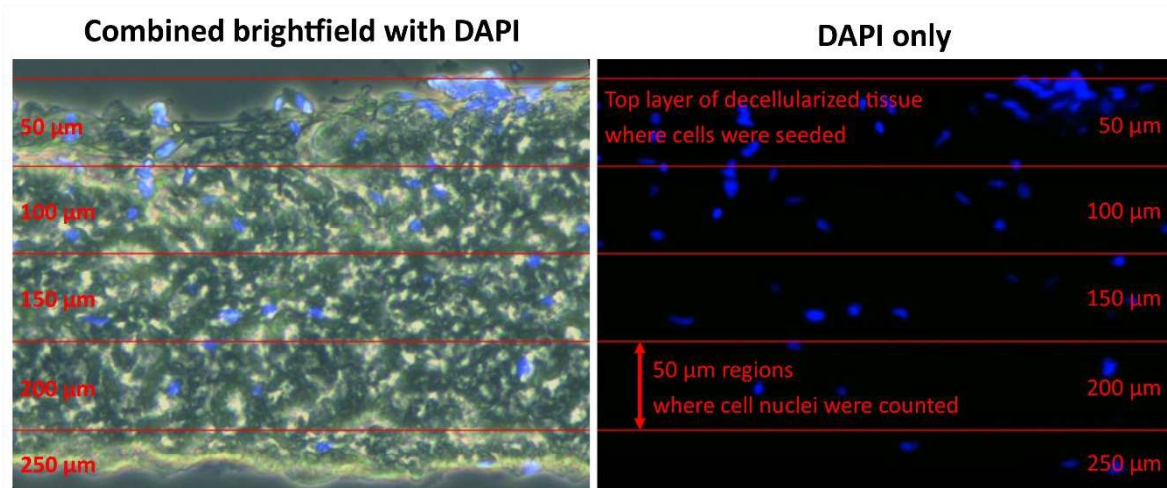
A comparative control under static cultivation conditions was performed. In order to ensure the homogeneity of the experimental setup, the second cultivation system with cultivation chambers was used. The preparation included the same preparation steps as above, until the beginning of the 2 mL/min perfusion. Instead of perfusion followed by mechanical stimulation, the system with chambers was disassembled, and the tissues were inserted into standard six-well plates. The same culture medium was used and was replaced every two days.

### 2.6. Evaluation of Cell Ingrowth

After observed cultivation intervals (5 and 10 days), the chambers were disconnected from the perfusion/stimulation. The chambers were then disassembled, and the tissues were removed. After that, the tissues were fixed using 4% paraformaldehyde (PFA) and were washed with PBS. Then, 20 µm thick cryosections were made on SuperFrost Plus glass (ThermoFisher, MA, USA). The cell membranes were then permeabilized using 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature (RT). The cell nuclei were counterstained with DAPI and mounted with Fluoroshield mounting medium (Sigma-Aldrich, MO, USA).

To quantify the overall cell ingrowth into the decellularized tissue, the images were sliced into 50 µm thick layers. The borders of the first layer were set from the surface of the decellularized tissue,

where the cells were seeded. Then, based on the scale of the image, 50  $\mu\text{m}$  layers were formed. In these layers, the cell nuclei were counted to quantify the cell ingrowth. This approach is illustrated for analysis in Figure 5. Image processing and analysis were done in ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md, USA) and MATLAB (MathWorks, Natic, MA, USA)



**Figure 5.** Example of slicing an image into 50  $\mu\text{m}$  regions used for cell counting. The original images have been cropped to maintain the same area for analyzing multiple samples.

To obtain relevant results, five random sections for each type of cultivation were analyzed in five randomly selected microscopic fields used for cell counting. The statistical significance was evaluated using nonparametric Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Dunn's Method, statistical significance ( $p \leq 0.05$ ) in MATLAB.

Immunofluorescence staining of h1-calponin, considered in various studies as an early marker or as an intermediate marker of SMC differentiation [18], was used for evaluating the differentiation of ASCs towards SMCs. The calponin-h1 Monoclonal Antibody (CALP, MA5-11620, concentration 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ThermoFisher, MA, USA), was applied as the primary antibody. The primary antibody was applied at RT for 120 min to samples in humidified chambers.

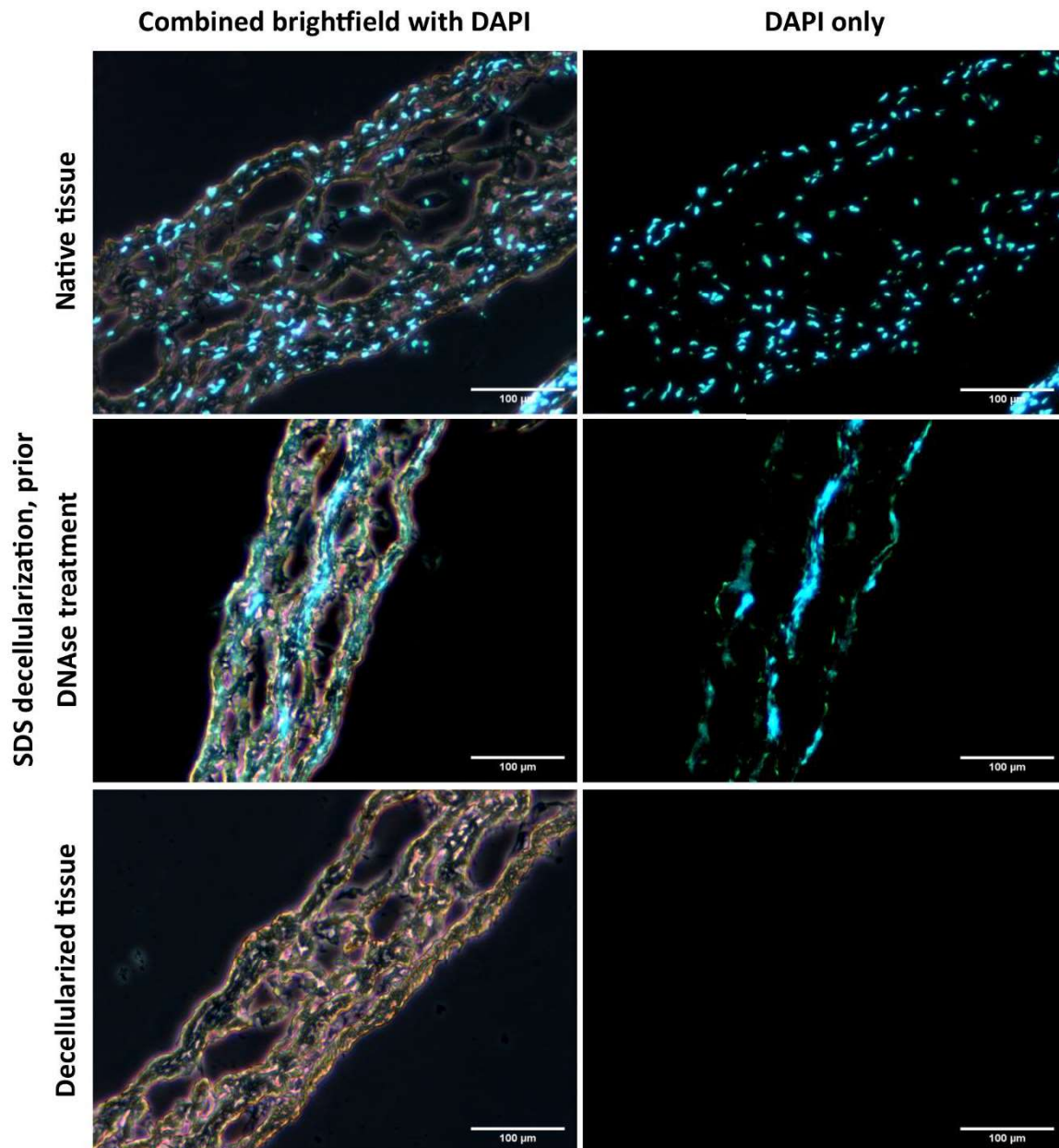
Alexa Fluor 488<sup>®</sup>-conjugated F(ab') fragment of goat anti-mouse IgG (H1L, Cat. No. A11017, Sigma-Aldrich; diluted in PBS + 1% BSA, concentration 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), together with Phalloidin conjugated with TRITC (P1951, Sigma-Aldrich; concentration 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), was applied as the secondary antibody, after the mouse monoclonal primary antibody. The cell nuclei were counterstained with DAPI (Thermo-Fisher, MA, USA; D1306, 300 nM concentration), which was added together with the secondary antibody. The samples were incubated with the secondary antibody at RT for 60 min in humidified chambers. Microscopic images were taken using Carl Zeiss LSM 880 NLO confocal microscope and Leica DMI-8 fluorescence microscope.

### 3. Results

#### 3.1. Decellularized Porcine and Ovine Pericardium Used for Autologous Recellularization

Several steps were done to check that the tissue had been decellularized properly for use as scaffolds for further recellularization and in vivo implantation. After the decellularization process and the sterilization had been completed, the tissue was histologically analyzed. As can be seen in Figure 6, the native tissue has visible cell nuclei. This sample was taken as a control. After SDS treatment, the cells were lysed, as a result of which DNA was spilt over the tissue. The DNA residues had to be removed in order to minimize any immune response; enzymatic treatment of the tissue was therefore carried out. After this treatment and a washing step, there were no visible residues of the original cells or of the DNA. Secondly, cytotoxicity tests on the decellularized tissues were performed. These tests

included cell cultivation in leachates from the decellularized tissues, and also direct seeding of cells on and near the tissues inserted in the well plates. Both methods revealed normal cell growth, which was the same as in the control cells grown without the decellularized tissue or the leachate, indicating no cytotoxicity of the decellularized matrices. In addition, the bacterial tests according to Ph. eur. 2.6.1 and ČSN EN ISO 11737-2 analysis provided negative results, which verified that sterilization using a 70% ethanol solution was sufficient. Following cell cultivation also demonstrated that the tissue decellularized by the method described here is suitable for recolonization with cells as can be seen later in this study.



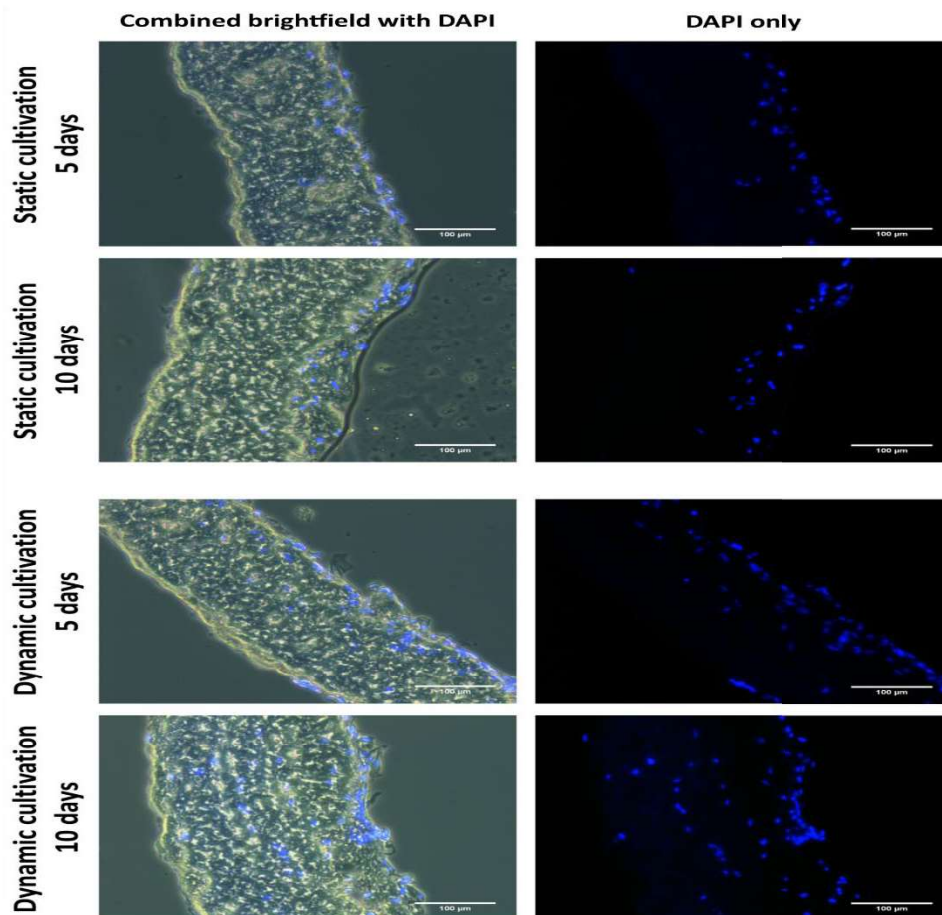
**Figure 6.** Evaluation of the decellularization process using cryosections 10 µm in thickness stained with DAPI. The brightfield images and the fluorescence images were combined to visualize both the tissue and the remaining nuclei/DNA. From top to bottom: A sample of native tissue with visible cell nuclei. The tissue after SDS cycles, where no cell nuclei are visible, but the residual DNA is spilt over the tissue. A completely decellularized tissue with no remaining visible cells or DNA residues. The Leica DMI 8 microscope, 10x objective, and scale bar 100 µm were used.

### 3.2. Ingrowing of Stromal Cells Into Decellularized Tissue and Its Differentiation Towards SMCs

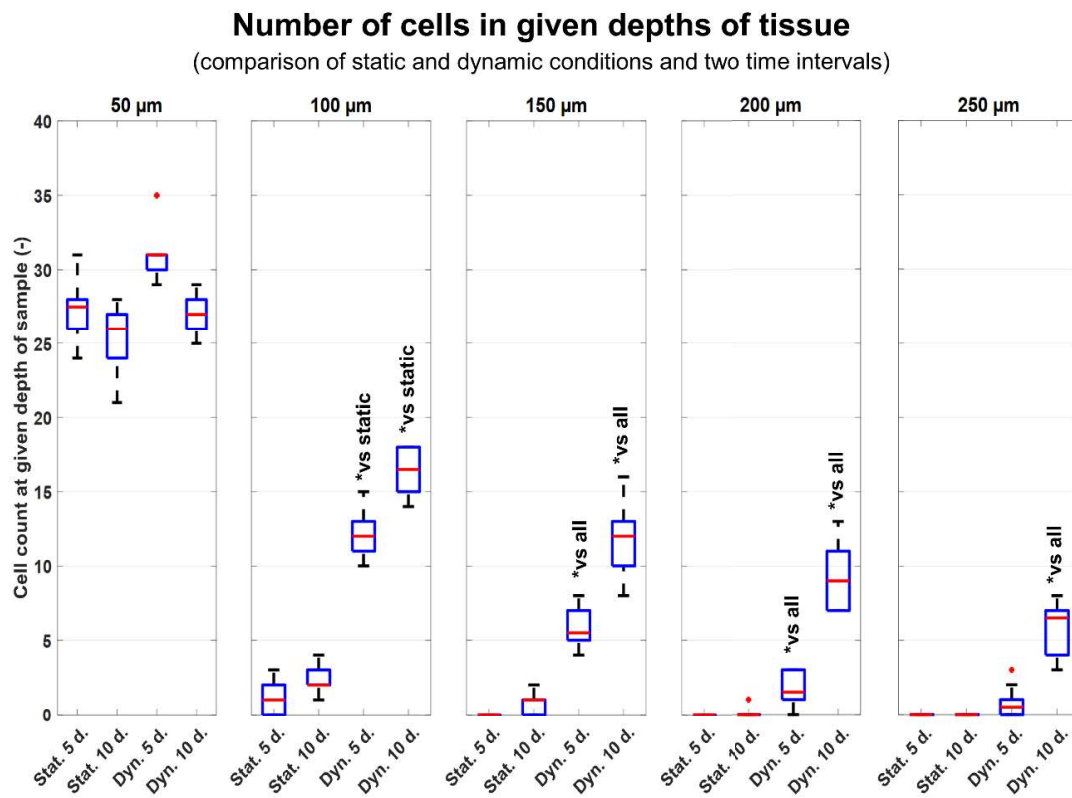
An analysis of the histological images (demonstrated in Figure 7) and the cell numbers at given depths (demonstrated in Figure 8) shows a fundamental difference between static cultivation and dynamic cultivation. In static conditions, there is no significant difference between 5 and 10 days of cultivation. In both cases, the cells penetrated to a depth of 50  $\mu\text{m}$ , but there is no evidence of cell ingrowth into deeper regions of the tissue.

However, the results for dynamic cultivation show improved penetration of the cells into all layers of the tissue, with some decreasing character where the number of cells decreases with depth. At depths  $>100 \mu\text{m}$ , there is a significant difference between static cultivation and dynamic cultivation. In both time intervals, there are observable cells in all layers of the dynamically-cultivated samples. After 10 days of dynamic cultivation, it can be seen that almost all the tissue has been newly recellularized with cells.

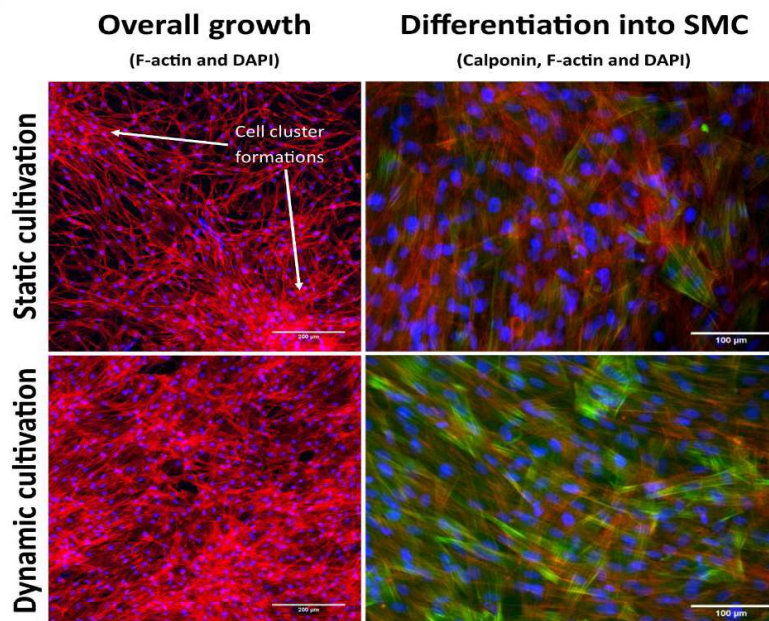
An analysis of the growth and differentiation of cells on the surface of the decellularized matrix showed that there is a major difference between static cultivation and dynamic cultivation after 10 days of cultivation. As shown in Figure 9, under static conditions, the cells form clusters instead of spreading homogeneously over the entire surface. The signal from h1-calponin is also weaker and is present in a smaller number of cells. Under dynamic conditions, however, a homogeneous cell layer is formed, and h1-calponin is present in most of the cells, including cells with well-developed calponin fibres. In this case, increased cell growth and overall improved growth of cells on the surface of decellularized tissue can also be observed under dynamic culture conditions.



**Figure 7.** DAPI counterstained cryosections of recellularized tissues cultivated in static and dynamic conditions for 5 days and for 10 days. Tissues prior to cultivation were seeded from a single side of decellularized tissue. The microscope used Leica DMi 8, 10 $\times$  objective.



**Figure 8.** The number of cells in given depths of tissue in static and dynamic conditions with single side seeding. Statistical significance is for  $p < 0.05$ . Ten samples were taken for every type of cultivation and time interval. Each of the samples was sliced to 50 µm depth regions where cell numbers were counted. Red lines represent the median values; blue boxes 1st and 3rd quartiles; whiskers are the minimum and maximum; and the red circles are outliers.



**Figure 9.** Immunofluorescence staining of the cultivated decellularized pericardium (red—F-actin, green—H1-calponin, blue—DAPI) in static and dynamic conditions for 10 days. For overall growth images, a Carl Zeiss 880 NLO confocal microscope was used with 10x objective and extended field of view. For differentiation images, a Leica DMI8 with 20x objective was used.

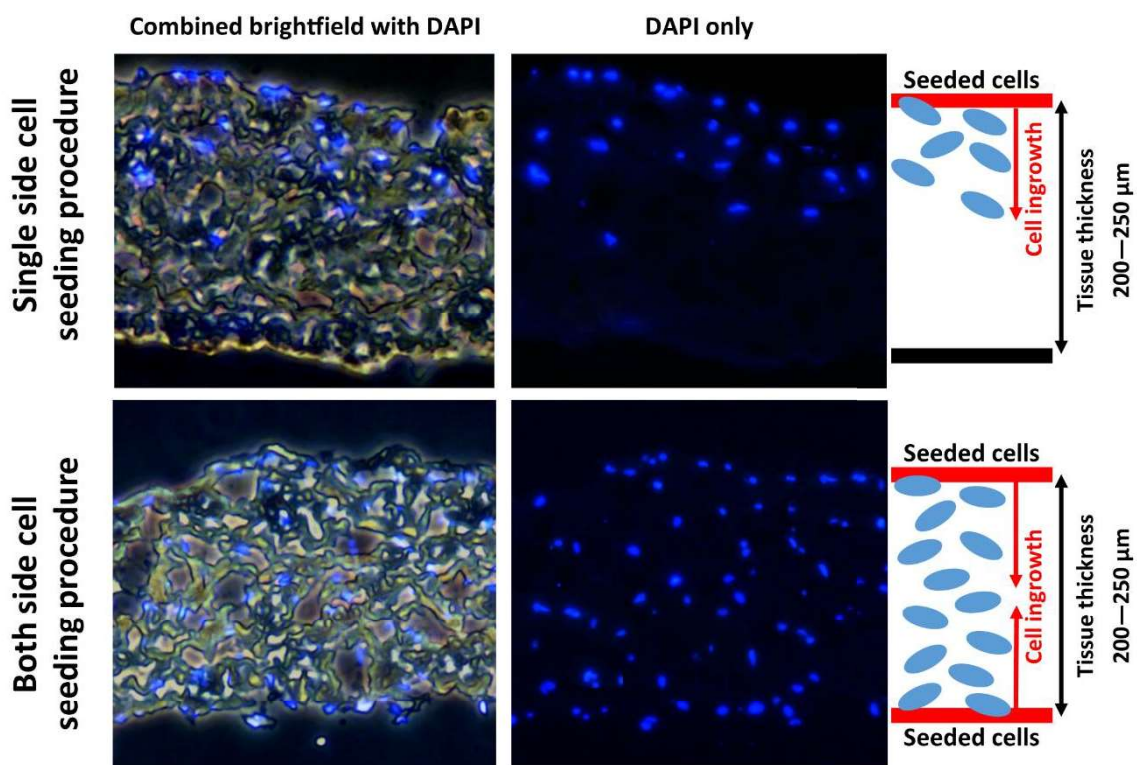


### 3.3. Preparation of Recellularized Cardiovascular Patches

As was mentioned in the Material and Methods section of this study, we tried to demonstrate the efficiency of dynamic cultivation in stimulating cell ingrowth inside the decellularized tissue. For this experiment, only one side of the pericardium was seeded with cells, and the depth of the cell penetration into the tissue was evaluated. As described above, cells were penetrating nearly the whole tissue after 10 days of dynamic cultivation. However, the density was decreasing with depth. After 5 days of dynamic cultivation, cells were able to penetrate at half of the depth of the decellularized tissue.

To achieve more homogeneous cell colonization for preparing implantable cardiovascular patches, both sides of the decellularized tissue were seeded with cells prior to pressure stimulation. The design of the cultivation chamber was also optimized when the two covers of the chamber implemented Luer-Locks (LLs) in order to use a sterile septum for cell seeding. In this case, ovine decellularized pericardium was also used. The protocol for the ovine pericardium was the same as for the porcine tissue, except that the tissue was sourced from experimental sheep. We had only a limited amount of pericardial tissue because we had access to just a small number of sheep that had originally been used for other studies. The overall method for testing and validation was, therefore, based on the porcine pericardium. However, in further studies, ovine pericardium will be used for implantation into pigs in order to simulate a xenogeneic tissue that will be repopulated with autologous porcine cells.

Also, the total dynamic cultivation time was reduced to 5 days when both sides of tissue were seeded prior to dynamic cultivation. This method offers a considerable advantage when preparing autologous cell-seeded grafts due to the reduced time needed for recellularizing the decellularized tissue. The difference between single-side and both-sides seeding after 5 days of dynamic cultivation is illustrated in Figure 10.

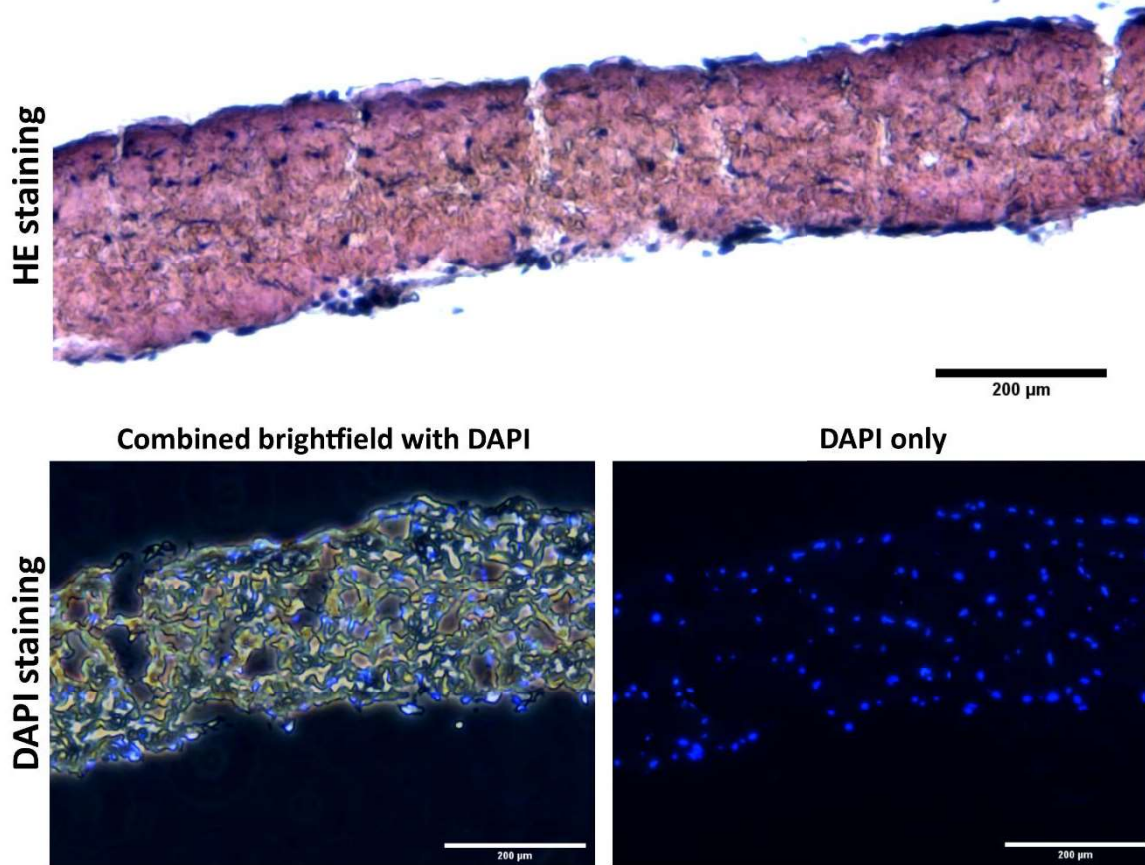


**Figure 10.** Comparison between single- and both-sides cell seeding procedures. The cultivation time in both procedures was 5 days in dynamic conditions.

As is demonstrated in Figures 11 and 12 on 20 μm paraffin-embedded sections stained with hematoxylin and eosin HE and DAPI, the PrASCs were homogeneously distributed inside the

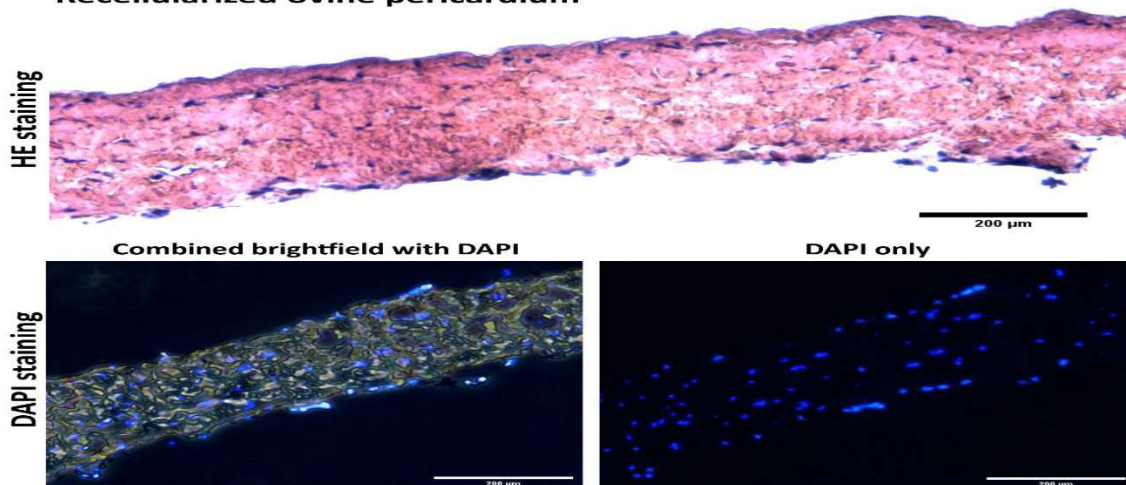
recellularized porcine tissue samples and ovine tissue samples. There was no difference between the ovine and porcine tissues in terms of cell colonization.

### Recellularized porcine pericardium



**Figure 11.** Paraffin-embedded 20 μm sections of porcine recellularized pericardium stained with hematoxylin-eosin (HE) and DAPI. Cells were seeded from both sides of the decellularized tissue prior to dynamic stimulation. Cultivation was held for 5 days in a dynamic culture system.

### Recellularized ovine pericardium



**Figure 12.** Paraffin-embedded 20 μm sections of ovine recellularized pericardium stained with hematoxylin-eosin (HE) and DAPI. Cells were seeded from both sides of the decellularized tissue prior to dynamic stimulation. Cultivation was held for 5 days in a dynamic culture system.

#### 4. Discussion

The operating protocol involving the decellularization agents, such as SDS, DNase, and deionized water, was adopted and modified according to the studies by Crapo et al. and by Gilbert et al. [10,11]. Many of the methods described require repeated steps involving changing decellularization agents or water after a certain period to maintain a chemical concentration gradient. Also, to improve the method and ensure homogenous decellularization, agitation in a shaker is used. These steps can be time-consuming. To ease these steps and ensure uninterrupted automation of the overall process, a novel system was built. This system implements a cyclic-based process of changing agents and washing water based on the desired setting. This approach alters the manual changing of them. Also, a special cultivation chamber was used where the tissue is fixed, and the chamber allows the flowing of used liquids to flow over the tissue, improving homogeneity.

As demonstrated in Figure 6, the native tissue has visible cell nuclei, whereas in the fully decellularized tissues there were no visible cell nuclei or DNA residues. The cell cultivation, both in the dynamic cultivation system and in static conditions, also demonstrated that the tissue decellularized by the method described here is suitable for recolonization with cells. The cells adhering to the surface of the decellularized tissue were able to penetrate the tissue. However, under static conditions, the cells formed clusters instead of a homogeneous spread on the surface of the tissue when observed under dynamic conditions, as illustrated in Figure 9.

It can, therefore, be summarized that this protocol, implemented into our decellularization system, provided a decellularized porcine pericardium matrix that is non-toxic, sterile, and ready for further recellularization and use as an experimental cardiovascular patch. The whole process can be completed within 24 h. The decellularization chamber designed for fixing the planar tissue can prepare tissues up to  $12 \times 8 \text{ cm}^2$  in size in a single run. As was mentioned above, the porcine pericardium was harvested from a local slaughterhouse and was a cheap and easily obtainable source of tissue for validating the method. The ovine pericardium was also decellularized and was further tested to form a xenogeneic substrate with autologous cells (PrASCs) for further implantation into a porcine in vivo model to verify low immunogenicity of decellularized matrices reported in the literature [8,9,26].

Cell seeding is an important component of vascular tissue engineering that decreases graft thrombogenicity and promotes graft patency, regardless of the cell type used. A possible mechanism is the recruitment of autologous cells in a paracrine manner and accelerated regeneration of the seeded matrices into a neovessel. A method of static seeding passively introduces cells onto a scaffold. The cell maturation and penetration into the scaffold is low.

As has been described above, the process of recellularization in static conditions does not give satisfactory results. As is illustrated in Figures 7 and 8, only 1/5 (50  $\mu\text{m}$ ) of the decellularized tissue was penetrated with cells after 10 days of static cultivation. Similar results have also been obtained in other studies, in which several weeks of cultivation were needed to overgrow various matrices with cells and to achieve cell maturation [15]. The speed of the overall recellularization process is increased when perfusion bioreactors are used to provide mechanical stimulation of the cells according to studies by Melchiorri et al. [27]. Also, many studies have investigated the correlation between pressure strain, cell proliferation, and stem cell differentiation towards SMCs. Cyclic physiological pressure (CP) of 120/80 torr altered the cellular morphology and increased the proliferation rates in stem cells over a 7-day period as described in the study by Maul et al. [28]. Moreover, dynamic seeding using a bioreactor enables preconditioning of the cells under more physiological conditions, as described in the study by Villalona et al. [15].

A custom dynamic cultivation system built in our laboratory was used in this study. This system generates a microperfusion flow and pulsatile hydrostatic pressure. As mentioned above, in static conditions, the cells penetrated only in 50  $\mu\text{m}$  depth. The tissues cultivated in dynamic conditions proved significantly better penetration rates of cells. Significant results are observable from 100  $\mu\text{m}$  depths. At depths  $>150 \mu\text{m}$  and more, there is nearly no evidence of cells ingrowing in static conditions. As is illustrated in Figures 7 and 8 after 10 days of dynamic cultivation, most of the tissue has been

newly recellularized with cells. As was mentioned, we tried to demonstrate the efficiency of a dynamic cultivation bioreactor in stimulating cell ingrowth inside the decellularized tissue. So, the technique of seeding utilized only one side of the decellularized tissue. Thus, the number of cells decreased with the penetration depth. To promote more homogenous ingrowth of cells, the cultivation chamber was optimized for dual side seeding of cells. In this approach, both sides of decellularized tissues were seeded with the same density of cells prior to cultivation. As is illustrated in Figures 11 and 12, the cells are homogeneously distributed inside the recellularized tissue. Also, the time period used to achieve this was reduced to 5 days.

Also, the differentiation of ASCs towards the SMC phenotype can be achieved via biochemical and mechanical stimulation. A positive effect on the differentiation of stem cells towards SMCs has been demonstrated in studies using a combination of TGF- $\beta$  and BMP4 growth factors. This led to an increase in the production of specific cytoskeletal protein markers of differentiation, such as  $\alpha$ -actin and h1-calponin, which are present only in differentiated SMCs [29], after 7 and more days of static cultivation. Cell differentiation towards the SMC phenotype can be further enhanced by appropriate mechanical stimulation in a dynamic cell culture system. The positive effect of mechanical stimulation on differentiation towards SMCs has been described for cells cultured either with or without the presence of TGF- $\beta$  and BMP4 [17,30]. In addition, mechanical stimulation helps to keep the cells in a differentiated state and prevents de-differentiation [31].

As for mechanical stimulation, we applied physiological hemodynamic force, which is stimulation with cyclic hydrostatic pressure (CP) 120/80 mmHg. The CP induced differentiation of the seeded adipose-derived stromal cells towards the SMC phenotype. This was proven by the expression of an SMC marker calponin. Greater cell population density and greater upregulation of early differentiation markers  $\alpha$ -actin and calponin were achieved in a pressure-stimulated culture than in static conditions [18,32]. In this context, two mechanosensitive signaling pathways associated with SMC differentiation have been described: the RhoA-associated pathway, and the FAK kinase-associated pathway. Activation of these signaling pathways leads to increased synthesis of SMC differentiation markers in the cells [33].

An analysis of the growth and differentiation of cells on the surface of the decellularized matrix showed that there is a major difference between static cultivation and dynamic cultivation after 10 days of cultivation. As shown in Figure 9, under static conditions, the cells form clusters instead of spreading homogeneously over the entire surface. The signal from h1-calponin is also weaker and is present in a smaller number of cells. Under dynamic conditions, however, a homogeneous cell layer is formed, and h1-calponin is present in most of the cells, including cells with well-developed calponin fibers. In this case, increased cell growth and overall improved growth of cells on the surface of decellularized tissue can also be observed under dynamic culture conditions.

Analogous to our study, Kobayashi et al. found upregulated expression of SMC markers, alpha smooth muscle actin (aSMA), and smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) in rat bone marrow stromal cells after exposure to pressure-dominant forces or combined flow and pressure forces for 3 days [34]. The authors attribute this differentiation to longer pre-incubation periods (7–21 days). The effects of different types of mechanical stimulation in isolation cyclic strain and cyclic pressure, including cyclic pressure alone, were previously studied in detail in rat bone marrow mesenchymal stem cells plated on collagen type-I coated culture slips [28,35]. In contrast to our study, they found no SMC markers (including no calponin) via immunohistochemistry after 5 days of CP of different magnitudes. Although the cells were increasing in number under CP in the study by Maul et al. [35], in our study, we initially seeded the cells in a much higher density (90,000 cells/cm<sup>2</sup> vs. 200 cells/cm<sup>2</sup>) to achieve confluence on a 3D biological material—decellularized pericardium. Our setting most probably resulted in simultaneous signaling from more sources: cell-cell contacts, cell-material contacts (natural matrix environment), soluble factors (TGF- $\beta$ 1 and BMP-4), and the mechanical load. These stimuli create synergy in conditioning the cells [36]. This may explain the fact that the cells differentiated towards the intended SMC-phenotype in our system. Additionally, the cells penetrated through the

entire wall of the matrix, thus resembling a newly formed vascular tunica media. Cyclic pressure is a known factor that induces the proliferation of several cell types (EC, SMC and MSC) [28,35,37]. We believe that these are desired events with respect to vascular tissue engineering and future implantation of this matrix as a cell-seeded cardiovascular patch.

In a future study, we plan to prepare autologous cell-seeded cardiovascular patches based on the protocol described here. Cultivation substrate will involve both autologous (porcine) Figure 11, and xenogenous (ovine) Figure 12 decellularized tissues as a substrate. In this planned study, the animals (Prestice pigs) will undergo two surgeries—the first surgery for fat tissue extraction and ASC isolation, and the second surgery in which a patch will be implanted onto an experimental carotid artery defect. Based on the protocol presented here, the time needed for preparing the recellularized autologous patch will be approximately 8–10 days for preparing the autologous ASCs and then 5 days of cultivation in the dynamic bioreactor to prepare the recellularized autologous seeded grafts.

## 5. Conclusions and Further Perspectives

In this study, we have prepared decellularized pericardium repopulated with adipose tissue-derived stromal cells for potential use as implantable cardiovascular patches. To achieve this aim, novel optimized dynamic decellularization and recellularization systems, fabricated in our laboratory, have been used and demonstrated in this study. In the decellularization system, the planar tissue is exposed on both sides to a continuous flow of the decellularization agents (SDS and DNase) and the washing medium (dH<sub>2</sub>O), which are automatically changed. This process, taking approximately 1 day, provided a completely decellularized non-cytotoxic matrix suitable for further recellularization. The recellularization was performed using porcine adipose tissue-derived stromal cells and a unique custom-made dynamic bioreactor generating pulsatile pressure stress. This mechanical stimulation markedly accelerated the penetration of cells inside the decellularized tissue, their proliferation, and particularly their differentiation towards smooth muscle cells, i.e., an important cell type and the most numerous cell type in the vascular wall. While the decellularization and recellularization procedures in conventional static systems usually take several weeks, our newly developed systems need only about two weeks, including decellularization (approx. 1 day), isolation, and expansion of ASCs (8–10 days) and recellularization (5 days). The newly prepared pericardium patches recellularized with pre-differentiated stromal cells are intended for treating an experimentally-induced carotid artery defect in a porcine model *in vivo* in order to develop novel cardiovascular patches that can be applied in human medicine.

**Author Contributions:** Conceptualization R.M., M.K., J.C., S.F.; Data curation R.M.; Formal analysis J.Š., R.M.; Funding acquisition P.K., L.B., S.F., J.P.; Investigation R.M., M.K., J.C., Š.P., A.B.; Methodology M.K., J.C., R.M., S.F.; Project administration J.P., P.K.; Resources J.L., Z.Š., I.M., D.T.; Software R.M., J.Š.; Supervision J.P., J.R.; Validation J.Š., Š.P.; Visualization Š.P., R.M.; Writing—original draft R.M., M.K., J.C.; Writing—review & editing S.F., J.R., L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic grants No. NV18-02-00422 and 15-29153A; by the Ministry of Education, Youth and Sports of CR by the project “BIOCEV” reg. no. CZ.1.05/1.1.00/02.0109. All rights reserved.

**Acknowledgments:** The authors thank Ivana Zajanova (Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic) for her assistance with the preparation of thin cryosections of samples; Michal Bures (Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic) caring for experimental animals and staff of Steinhäuser s.r.o. for allowing the porcine pericardium to be extracted. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Ethical statement:** The animal experiments in this study were approved by the Ministry of Health of the Czech Republic reference no MZDZ 23132/2018-4/OVZ approval no 37/2018 and reference no MZDZ 48434/2015-OVZ-30.0-21.8.15 approval no 58/2015. A minimal number of animals was used. All procedures described were done under general anaesthesia and according to ethical guidelines to minimize the pain and discomfort of animals. The Institute of Clinical and Experimental has authorized facilities and fully equipped operating theatres for performing these animal experiments.

## References

1. Pashneh-Tala, S.; MacNeil, S.; Claeysens, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2016**, *22*, 68–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fahner, P.J.; Idu, M.M.; van Gulik, T.M.; Legemate, D.A. Systematic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. *J. Vasc. Surg.* **2006**, *44*, 518–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chlupáč, J.; Filová, E.; Bacáková, L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol. Res.* **2009**, *58* (Suppl. 2), S119–S139.
4. Kumar, V.A.; Brewster, L.P.; Caves, J.M.; Chaikof, E.L. Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges. *Cardiovasc. Eng. Technol.* **2011**, *2*, 137–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Smit, F.E.; Dohmen, P.M. Cardiovascular tissue engineering: Where we come from and where are we now? *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **2015**, *21*, 1–3. [[CrossRef](#)]
6. Texakalidis, P.; Giannopoulos, S.; Charisis, N.; Giannopoulos, S.; Karasavvidis, T.; Koullias, G.; Jabbour, P. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy. *J. Vasc. Surg.* **2018**, *68*, 1241–1256. [[CrossRef](#)]
7. Rodriguez-Gabella, T.; Voisine, P.; Puri, R.; Pibarot, P.; Rodés-Cabau, J. Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 1013–1028. [[CrossRef](#)]
8. Abdolghafoorian, H.; Farnia, P.; Nia, R.; Bahrami, A.; Dorudinia, A.; Ghanavi, J. Effect of Heart Valve Decellularization on Xenograft Rejection. *Exp. Clin. Transplant.* **2016**, *15*, 329–336.
9. Lin, C.H.; Hsia, K.; Ma, H.; Lee, H.; Lu, J.H. In Vivo Performance of Decellularized Vascular Grafts: A Review Article. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2101. [[CrossRef](#)]
10. Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3233–3243. [[CrossRef](#)]
11. Gilbert, T.W.; Sellaro, T.L.; Badylak, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3675–3683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Moroni, F.; Mirabella, T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. *Am. J. Stem Cells* **2014**, *3*, 1–20. [[PubMed](#)]
13. Khan, S.; Villalobos, M.A.; Choron, R.L.; Chang, S.; Brown, S.A.; Carpenter, J.P.; Tulenko, T.N.; Zhang, P. Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells. *J. Vasc. Surg.* **2017**, *65*, 1483–1492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhou, M.; Liu, Z.; Liu, C.; Jiang, X.; Wei, Z.; Qiao, W.; Ran, F.; Wang, W.; Qiao, T.; Liu, C. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2012**, *100*, 111–120. [[CrossRef](#)]
15. Villalona, G.A.; Udelsman, B.; Duncan, D.R.; McGillicuddy, E.; Sawh-Martinez, R.F.; Hibino, N.; Painter, C.; Mirensky, T.; Erickson, B.; Shinoka, T.; et al. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2010**, *16*, 341–350. [[CrossRef](#)]
16. Bader, A.; Steinhoff, G.; Strobl, K.; Schilling, T.; Brandes, G.; Mertsching, H.; Tsikas, D.; Froelich, J.; Haverich, A. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. *Transplantation* **2000**, *70*, 7–14.
17. Bacakova, L.; Zarubova, J.; Travnickova, M.; Musilkova, J.; Pajorova, J.; Slepicka, P.; Kasalkova, N.S.; Svorcik, V.; Kolska, Z.; Motarjemi, H.; et al. Stem cells: Their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells—A review. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1111–1126. [[CrossRef](#)]
18. Bacakova, L. *The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2018; pp. 229–257.
19. Vondrášek, D.; Hadraba, D.; Matějka, R.; Lopot, F.; Svoboda, M.; Jelen, K. Uniaxial tensile testing device for measuring mechanical properties of biological tissue with stress-relaxation test under a confocal microscope. *Manuf. Technol.* **2018**, *18*, 866–872. [[CrossRef](#)]
20. ISO. 11737-2:2019 Sterilization of health care products—Microbiological methods. In *Part 2: Tests of Sterility Performed in the Definition, Validation and Maintenance of A Sterilization Process*; ISO: Geneva, Switzerland, 2019.
21. Estes, B.T.; Diekman, B.O.; Gimble, J.M.; Guilak, F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1294–1311. [[CrossRef](#)]

22. Bunnell, B.A.; Flaas, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* **2008**, *45*, 115–120. [[CrossRef](#)]
23. Megalioikonomos, P.D.; Panagopoulos, G.N.; Bami, M.; Igoumenou, V.G.; Dimopoulos, L.; Milonaki, A.; Kyriakidou, M.; Mitsiokapa, E.; Anastassopoulou, J.; Mavrogenis, A.F. Harvesting, Isolation and Differentiation of Rat Adipose-Derived Stem Cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 19–29. [[CrossRef](#)]
24. Matejka, R.; Stepanovska, J.; Rosina, J.; Kneppo, P.; Brynda, E.; Riedel, T.; Filova, E.; Travnickova, M.; Zarubova, J.; Riedelova, Z. *A Cultivation Chamber for Stimulation of Planar Samples of Decellularized Pericardium*; Utility model CZ 30 705; Industrial Property Office: Prague, Czech Republic, 2016.
25. Matejka, R.; Stepanovska, J.; Kneppo, P.; Konarik, M.; Chlupac, J.; Pirk, J. *Pressure Stimulation Microperfusion System for Sterile Dynamic Cell Culture*; Utility model CZ 33 917; Industrial Property Office: Prague, Czech Republic, 2020.
26. Boccafoschi, F.; Botta, M.; Fusaro, L.; Copes, F.; Ramella, M.; Cannas, M. Decellularized biological matrices: An interesting approach for cardiovascular tissue repair and regeneration. *J. Tissue Eng. Regen Med.* **2017**, *11*, 1648–1657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Melchiorri, A.J.; Bracaglia, L.G.; Kimerer, L.K.; Hibino, N.; Fisher, J.P. In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng. Part C Methods* **2016**, *22*, 663–670. [[CrossRef](#)]
28. Maul, T.M.; Hamilton, D.W.; Nieponice, A.; Soletti, L.; Vorp, D.A. A New Experimental System for the Extended Application of Cyclic Hydrostatic Pressure to Cell Culture. *J. Biomech. Eng.* **2007**, *129*, 110–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lagna, G.; Ku, M.M.; Nguyen, P.H.; Neuman, N.A.; Davis, B.N.; Hata, A. Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 244–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dan, P.; Velot, É.; Decot, V.; Menu, P. The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 2415–2422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Wang, C.; Yin, S.; Cen, L.; Liu, Q.; Liu, W.; Cao, Y.; Cui, L. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 1201–1213. [[CrossRef](#)]
32. Bacakova, L. *Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2018; pp. 289–308.
33. Miralles, F.; Posern, G.; Zaromytidou, A.I.; Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **2003**, *113*, 329–342. [[CrossRef](#)]
34. Kobayashi, N.; Yasu, T.; Ueba, H.; Sata, M.; Hashimoto, S.; Kuroki, M.; Saito, M.; Kawakami, M. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* **2004**, *32*, 1238–1245. [[CrossRef](#)]
35. Maul, T.M.; Chew, D.W.; Nieponice, A.; Vorp, D.A. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2011**, *10*, 939–953. [[CrossRef](#)]
36. Henderson, K.; Sligar, A.D.; Le, V.P.; Lee, J.; Baker, A.B. Biomechanical Regulation of Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sumpio, B.E.; Widmann, M.D.; Ricotta, J.; Awolesi, M.A.; Watase, M. Increased ambient pressure stimulates proliferation and morphologic changes in cultured endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **1994**, *158*, 133–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



# The Gene Expression of Human Endothelial Cells Is Modulated by Subendothelial Extracellular Matrix Proteins: Short-Term Response to Laminar Shear Stress

Jaroslav Chlupac, MD,<sup>1,2</sup> Elena Filova, MSc, PhD,<sup>1</sup> Jana Havlikova, MSc,<sup>1</sup> Roman Matejka, MSc,<sup>3</sup> Tomas Riedel, PhD,<sup>4</sup> Milan Houska, PhD,<sup>4</sup> Eduard Brynda, PhD,<sup>4</sup> Elzbieta Pamula, PhD, DSc,<sup>5</sup> Murielle Rémy, PhD,<sup>6</sup> Reine Bareille,<sup>6</sup> Philippe Fernandez, MD, PhD,<sup>6</sup> Richard Daculsi, MD,<sup>6</sup> Chantal Bourget,<sup>6</sup> Lucie Bacakova, MD, PhD,<sup>1</sup> and Laurence Bordenave, MD, PhD<sup>6</sup>

Vascular surgery for atherosclerosis is confronted by the lack of a suitable bypass material. Tissue engineering strives to produce bio-artificial conduits to provide resistance to thrombosis. The objectives of our study were to culture endothelial cells (EC) on composite assemblies of extracellular matrix proteins, and to evaluate the cellular phenotype under flow. Cell-adhesive assemblies were fabricated on glass slides as combinations of collagen (Co), laminin (LM), and fibronectin (FN), resulting in three samples: Co, Co/LM, and Co/FN. Surface topography, roughness, and wettability were determined. Human saphenous vein EC were harvested from cardiac patients, cultured on the assemblies and submitted to laminar shear stress (SS) of 12 dyn/cm<sup>2</sup> for 40, 80, and 120 min. Cell retention was assessed and qRT-PCR of adhesion genes (VE-cadherin, vinculin, *KDR*, *CD-31* or *PECAM-1*,  $\beta_1$ -integrins) and metabolic genes (*t-PA*, *NF- $\kappa$ B*, *eNOS* and *MMP-1*) was performed. Quantitative immunofluorescence of VE cadherin, vinculin, *KDR*, and vonWillebrand factor was performed after 2 and 6 h of flow. Static samples were excluded from shearing. The cells reached confluence with similar growth curves. The cells on Co/LM and Co/FN were resistant to flow up to 120 min but minor desquamation occurred on Co corresponding with temporary downregulation of VE cadherin and vinculin-mRNA and decreased fluorescence of vinculin. The cells seeded on Co/LM initially more upregulated vinculin-mRNA and also the inflammatory factor *NF- $\kappa$ B*, and the cells plated on Co/FN changed the expression profile minimally in comparison with the static control. Fluorescence of VE cadherin and vonWillebrand factor was enhanced on Co/FN. The cells cultured on Co/LM and Co/FN increased the vinculin fluorescence and expressed more VE cadherin and *KDR*-mRNA than the cells on Co. The cells plated on Co/FN upregulated the mRNA of VE cadherin, *CD-31*, and MMP 1 to a greater extent than the cells on Co/LM and they enhanced the fluorescence of VE cadherin, *KDR*, and vonWillebrand factor. Some of these changes sustained up to 6 h of flow, as confirmed by immunofluorescence. Combined matrices Co/LM and Co/FN seem to be more suitable for EC seeding and retention under flow. Moreover, Co/FN matrix promoted slightly more favorable cellular phenotype than Co/LM under SS of 2–6 h.

## Introduction

**A**THEROSCLEROSIS OF CORONARY and peripheral arteries has become a major disease in industrialized countries. The annual number of lower extremity interventions totals more than 120 bypass procedures per 100,000 inhabitants in

the United States.<sup>1</sup> Cardiovascular surgery, however, confronts a shortage of available material for bypass grafting, since the gold-standard patients' own artery or vein is frequently lacking. Currently used synthetic blood vessel prostheses, namely polyethylene terephthalate (PET, Dacron) and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), have

<sup>1</sup>Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

<sup>2</sup>Department of Transplant Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup>Department of Medical Biophysics and Informatics, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

<sup>4</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

<sup>5</sup>Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland.

<sup>6</sup>Bioingénierie tissulaire, U1026, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.



achieved excellent results in bypassing large-diameter vessels, for example, the aorta and iliac arteries; however, they do not perform well in low-flow or small-diameter vessels (<6 mm), for example, in coronary, below the knee, or microvascular regions. One of the main reasons for this failure is the surface thrombogenicity and the development of intimal hyperplasia as a result of a mismatch in the viscoelastic properties of native tissue and the synthetic material.<sup>2</sup>

Large areas of cardiovascular implants, such as heart valves and vascular prostheses, do not spontaneously cover with endothelial cells (EC) in humans, and it has been shown that preimplant seeding and preconditioning of the patient's autologous EC improves the long-term patency and performance of synthetic grafts.<sup>3</sup> Tissue engineering of vascular grafts has become a meaningful objective of research in the last three decades, and advances in materials science<sup>4</sup> together with culturing and seeding living cells has proven the concept of a bio-artificial vascular bypass to be practicable. To fabricate a vascular graft, some of the major drawbacks that need to be overcome in cell seeding are as follows: first, the attachment of EC to the adhesive substrate, second, their retention under flow and, third, maintaining the complex physiological functions of the endothelial lining, for example, synthesis of molecules important for cell-matrix adhesion, vasodilation, fibrinolysis, and reduced immune responses, which are essential in normal vascular homeostasis and remodeling.<sup>5</sup>

We assume that the protein composition of the extracellular matrix (ECM) should have a potential role in the following physiological processes of EC: adhesion and proliferation in the culture, resistance to the flow in a parallel-plate flow chamber, and finally shear stress (SS)-mediated gene expression of EC. We therefore studied the flow-dependent response of EC to three different assemblies of adhesive matrix proteins: collagen type I gel (Co), collagen I with attached laminin (Co/LM), and collagen I with attached fibronectin (Co/FN). Protein assemblies of this type have been recognized to be practicable in coating scaffolds for tissue engineering.<sup>6</sup> In the flow experiment, we chose to explore a set of five genes that are involved in cell-cell (vascular endothelial cadherin [VE-cadherin]) and cell-matrix (vinculin,  $\beta_1$ -integrins) adhesion and also in mechanical force sensing (kinase insert domain receptor [KDR], cluster of differentiation molecule-31 [CD-31]), or platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 [PECAM-1]), and a set of four genes involved in cell metabolism related to coagulation (tissue plasminogen activator [*t-PA*]), vasodilation (endothelial nitric oxide synthase [*eNOS*]), immune response (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells [*NF- $\kappa$ B*]), and vascular remodeling (matrix metalloproteinase-1 [*MMP-1*]). The protein assemblies were characterized in terms of their surface topography, roughness, and wettability. In addition, the growth curves, SS resistance (12 dyn/cm<sup>2</sup> up to 2 h) and gene expression profiles were determined in human saphenous vein EC with a view to tissue engineering of blood vessels.

## Materials and Methods

### Preparation and characterization of the protein assemblies

The assemblies were prepared from collagen type I (rat tail, CN-354236; Bioscience), LM (Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane, CN-L2020; Sigma-Aldrich), and FN (human plasma, CN-10688851001;

Roche). A stock solution of Co was diluted by 0.02M acetic acid to a concentration of 75  $\mu$ g/mL. A standard microscopic glass slide (4.5  $\times$  2.5 cm<sup>2</sup>) was coated with 2 mL of the solution to obtain a solution layer containing 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. The solution layer was converted into a Co gel by exposing the sample to ammonia vapor for 5 min and rinsing it with phosphate-buffered saline (PBS) diluted with water to 10%. LM was attached to the Co film by incubation with 2 mL PBS solutions at a LM concentration of 40  $\mu$ g/mL, or FN at a concentration of 50  $\mu$ g/mL overnight. Samples coated only with collagen gel were rinsed with water, and the samples Co/LM and Co/FN were rinsed with 10% PBS. All the samples were finally air dried and UV sterilized for 30 min.

The attachment of LM and FN from PBS to a Co layer prepared on the gold surface of a surface plasmon resonance (SPR) chip was observed *in situ* using an SPR instrument custom-built at the Institute of Photonics and Electronics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague. A four-channel flow cell was pressed on the collagen-coated SPR chip and the SPR responses to LM and FN solutions driven by a peristaltic pump simultaneously through independent channels were recorded.

The surface wettability of the assemblies was characterized by measuring the sessile drop contact angles using the Laplace-Young method (OCA 20; Dataphysics). Millipore Q water droplets 2  $\mu$ L in volume were put on the surface and the average contact angle values were obtained by measuring the contact angles of individual droplets.

The surface topography was observed using a multimode AFM (Nanoscope IIIa; Digital Instruments). The images were recorded using the tapping mode and silicon tips with a spring constant of 42 N/m and a nominal radius of curvature of 7 nm (OTESPA; Bruker AFM Probes). Average roughness (Ra) was calculated for all scanned areas based on the program provided with the instrument.

### EC seeding, shearing, and evaluation

Human saphenous vein endothelial cells (HSVEC) were harvested from human patients after an aorto-coronary bypass procedure as a primary cell culture according to methods described elsewhere.<sup>7</sup> Briefly, saphenous vein graft was cannulated, washed with PBS, and filled with collagenase type 2 (Sigma Aldrich) at 37°C for 15 min. EC were recovered, pooled, and amplified in plastic flasks (Falcon, BD Biosciences) in an M199 culture medium (Invitrogen) supplemented with 20% of fetal calf serum (FCS; PAA), heparin 50 IU/mL (Choay), basic fibroblast growth factor 10 ng/mL (Promocell), and a mixture solution of penicillin (10  $\times$  10<sup>3</sup> IU/mL) and streptomycin (10  $\mu$ g/mL) 1:100 (Sigma). For the proliferation assay, the HSVEC of passage number P5 were seeded in a lower density of 3  $\times$  10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> onto each of the surfaces. The adhering cells were observed 6, 24, 48, 72, and 144 h after seeding (Olympus IX50 light microscope); six randomly chosen microscopic fields were photographed (Olympus DP70 digital camera, magnification 20 $\times$ ) and the cell numbers were evaluated by counting the cell nuclei.

For the flow experiment, the HSVEC were seeded at a higher density of 5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. When reaching confluence at 48 h, the HSVEC were exposed to a parallel-plate flow chamber, which simulated the blood stream. The circulating medium (37°C) was composed of M199, 10% FCS, and

heparin 50 IU/mL. The tested surfaces were submitted to a flow of 20 mL/min and the laminar SS=12 dyn/cm<sup>2</sup> was applied for 40, 80, and 120 min. For the purposes of immunofluorescence imaging and quantification, the flow was applied for 2 h and then extended up to 6 h. Static control samples were kept without shearing. After SS administration, the adhering cells were photographed and counted to assess their resistance to desquamation during flow.

### Molecular biology

Immediately after flow exposure, the samples were immersed into cold (4°C) Hanks solution (HBSS; Invitrogen) and the cells were trypsinized from the support with Trypsin+EDTA (Sigma) solution (TE) and frozen. The total messenger ribonucleic acid (mRNA) was then extracted and treated according to Fernandez *et al.*<sup>7</sup> A quantitative real-time polymerase chain reaction of the following nine genes was performed: VE-cadherin (VE-cad.), vinculin, *KDR* or vascular endothelial growth factor receptor-2 (*VEGFR-2*) or *Flk-1*, *CD-31* or *PECAM-1*,  $\beta_1$ -integrin chain, *t-PA*, *NF- $\kappa$ B*, *eNOS*, and *MMP-1*. The up- or downregulation of the mRNA expression is shown as a relative value in relation to the housekeeping gene *P0* that encodes for a ribosomal protein and is not influenced by the experimental conditions. The primer, temperatures, and length of polymerase chain reaction products are listed elsewhere.<sup>8,9</sup> The normalized mRNA level in cells under static conditions was arbitrarily set at "1," and the data are presented as fold values that are compared either to the static control or to another sample.

### Immunofluorescence analysis

To evaluate whether the differential expression of mRNA was translated into protein, the samples were fixed with 70% ethanol, rinsed with PBS, and stained with anti-human antibodies: rabbit anti-VE-cadherin IgG (AHP628Z; AbD Serotec), mouse anti-Vinculin IgG1 (V9131; Sigma), mouse anti-*KDR/VEGFR2* IgG1 (LS-C109100; LS Biosciences), and rabbit anti-von Willebrand factor (vWF, F3520; Sigma). Anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 488-conjugated goat IgG (A11070, A11017; Invitrogen) was used as a secondary antibody. The cell nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (861405; Sigma). The cells were observed using an Olympus IX50 light microscope. Nine randomly chosen microscopic fields were photographed with the same exposure settings (Olympus DP70 digital camera, magnification 20 $\times$  for VE-cadherin, vinculin, and 100 $\times$  for *KDR* and vWF). A threshold was set on every image to remove the nonprotein area from the image data. The threshold setting was the same for each image for a given protein. Then, the cumulative sum of all pixel intensities was computed and the background intensity of the negative staining control was subtracted. The total immunofluorescence intensity of the protein was expressed in relative values and normalized to the number of cells in the microscopic field. The intensity of the static samples was arbitrarily set to "1."

### Statistical analysis

The data within one experiment were expressed as mean and standard deviation. However, an effort was made to perform each step of the experiment in triplicate ( $n=3$ ).

These data were pooled and expressed as mean and standard error of mean. In some data groups  $n=2$  or  $n=1$ , since some of the measurements had to be erased, either due to repeated technical difficulties (e.g., cell desquamation on Co) or because some of the values were numerically distant outliers and thus unlikely. The data were compared using one-way analysis of variance (Holm-Sidak test) for multiple comparison (SigmaStat 3.1 2004; Systat Software, Inc.). The difference between groups was considered significant at  $p<0.05$ .

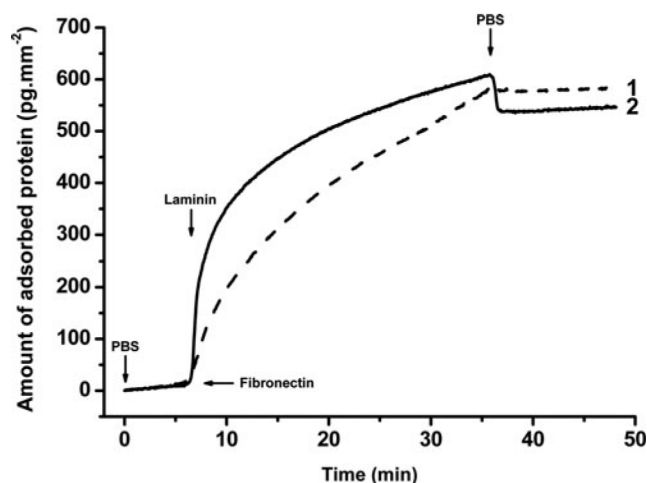
## Results

### Surface composition

Figure 1 shows the attachment of LM and FN from PBS to a Co layer prepared on the gold surface of a SPR chip. The SPR response was observed *in situ* simultaneously on the same surface located in different flow channels through which the LM or FN solutions were pumped. The proteins remained attached after replacing their solutions with PBS.

### Surface wettability and roughness

While FN is capable of binding to Co type I via specific binding sites, LM binds in this way only to collagen type IV. The electrostatic interaction between the Co of isoelectric point  $pI=7.8$  and FN ( $pI=5.4$ ), or LM ( $pI=4.8$ ), positively and negatively charged in PBS ( $pH=7.4$ ), respectively, might provide the driving forces for LM and FN adsorption to the Co I coating prepared in this work. The water sessile drop contact angles,  $\theta$ , measured on the Co, Co/LM, and Co/FN surfaces are shown in Table 1. An increase in the contact angle from  $30^\circ \pm 3^\circ$  on Co to  $63^\circ \pm 1^\circ$  and  $64^\circ \pm 1^\circ$  on Co/LM and Co/FN, respectively, indicated a decrease in the wettability of the Co coating. The wettability probably decreased by a drop in the number of strongly hydrated positively charged Co groups due to the formation of ionic bonds between some of them, and negatively charged groups on the adsorbed FN or LM. In addition, some nonpolar amino acid residues of adsorbed proteins could be exposed to



**FIG. 1.** Attachment of fibronectin (curve 1) and laminin (curve 2) to a collagen type I layer observed by surface plasmon resonance (SPR). Arrows indicate replacement of the solutions: phosphate-buffered saline (PBS), fibronectin (50  $\mu$ g/mL), and laminin (40  $\mu$ g/mL) in PBS.

TABLE 1. SURFACE WETTABILITY (SESSILE WATER DROP CONTACT ANGLE  $\theta$ ) AND SURFACE ROUGHNESS OF PROTEIN ASSEMBLIES ON A GLASS SUBSTRATE

	(A) Glass	(B) Co	(C) Co/LM	(D) Co/FN
$\theta$ (deg)	37 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3	63 $\pm$ 1	64 $\pm$ 1
$p < 0.001$	vs. B, C, D	vs. A, C, D	vs. A, B	vs. A, B
Ra (nm)	0.18 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.09
$p < 0.001$	vs. B, C, D	vs. A, C, D	vs. A, B	vs. A, B

Mean  $\pm$  SD,  $\theta$  n=4.

Ra n=5; deg., degrees; vs., versus; Co, collagen type I; Co/LM, collagen/laminin; Co/FN, collagen/fibronectin; Ra, average roughness.

water, thus increasing the free coating/water interfacial energy. The formation of polar bonds, probably ionic, with the Co surface overcomes the increase in interfacial energy.

Figure 2 shows a representative surface morphology of the protein assemblies prepared on microscopic glass slides. Similar collagen fibers are visible on all the samples. Even if the individual fibers extend more from the Co/FN surface than from the Co/LM surface, the average roughness values measured on the surfaces were nearly the same on the Co/FN and Co/LM surfaces (Table 1). The marked difference between the high wettability of the Co surface and the low wettability of the Co/FN and Co/LM surfaces (Table 1) evidently does not correspond with the similar topography of these surfaces. Assuming Co density of about 1.2 mg/cm<sup>3</sup> and thickness of the deposited collagen film containing 0.005 mg/cm<sup>2</sup>, film thickness of 2.4  $\mu$ m can be estimated. No defects deeper than 20 nm were observed in the coatings that could indicate areas of uncoated glass surface.

#### Cell adhesion, proliferation, and flow experiment

The growth curves of the HSVEC seeded at lower density over a period of 6 days are shown in Figure 3A. Though a statistical difference in contact angle and in surface roughness was detected between Co and Co/LM or Co/FN, ( $p < 0.001$ ) (Table 1), no difference in proliferation rate was noted among the surfaces. The cells seeded at higher density reached confluence 48 h after seeding on all tested surfaces and were subsequently submitted to flow. The cell densities on Co, Co/LM, and Co/FN after 40, 80, and 120 min SS of 12 dyn/cm<sup>2</sup> are displayed in Figure 3B. Postflow detachment of some of the cells was observed mainly on the Co surface; however, this difference was not statistically significant.

#### Molecular biology

The relative amount of mRNA of nine selected genes extracted from the cells at 40, 80, and 120 min intervals and

the corresponding gene expression profiles on Co, Co/LM and Co/FN are displayed in Figure 4A–C, respectively. The data were compared with the corresponding static control. On the collagen sample, downregulation of the expression of some of the adhesion genes was observed, and this was statistically significant at the 80-min interval for VE-cadherin ( $p < 0.02$ ) and vinculin ( $p < 0.05$ ).

As for Co/LM, most of the adhesive genes were upregulated at 40 min with a gradual return to a static value at 80 and 120 min. However, this upregulation was considered significant only in vinculin at 40-min ( $p < 0.01$ ). Metabolic genes were mostly downregulated, although nonsignificantly, with the exception of *NF- $\kappa$ B*, which was increased at both 40 min ( $p < 0.01$ ) and 80 min ( $p < 0.05$ ).

The effect of SS on the cells on Co/FN was as follows: most of the adhesive genes were also upregulated, but with temporary attenuation at 80 min. A decreased amount of mRNA was detected in metabolic genes, with the exception of *NF- $\kappa$ B*, although a slight trend to return to a static level was observed. However, none of these changes was statistically significant.

A statistical comparison of the gene expression in cells cultured on Co, Co/LM, and Co/FN substrata at 40, 80, and 120-min intervals of SS is visualized in Figure 5. Adding LM onto Co generally resulted in enhanced expression of cell adhesion genes, which was significant in VE-cadherin, vinculin ( $p < 0.01$ ) and *KDR* ( $p < 0.05$ ) at 40 min and in *CD-31* ( $p < 0.05$ ) at 80 min, respectively. However, this significant increase became less marked after 120-min exposure to flow. Significant changes were not demonstrated in the expression of the metabolic genes in the course of the experiment. Only the amount of mRNA of *t-PA* decreased ( $p < 0.01$ ) temporarily at the 40-min point.

Supplementing FN on to Co also led to augmented expression of cell adhesion genes, significantly in VE-cadherin and *KDR* ( $p < 0.05$ ) at 40 min. The elevation of mRNA was nonsignificant at the 80-min interval, and it was significant again in VE-cadherin ( $p < 0.05$ ) and *CD-31* ( $p < 0.01$ ) at 120 min. As in the case of Co/LM, the expression of metabolic genes was not remarkably changed over time, except for temporary attenuation of *t-PA* at 40 min ( $p < 0.01$ ).

A comparison of Co/LM versus Co/FN showed that the mRNA of cell adhesion genes at 40 min was expressed variously. Co/LM provided significantly more expression of vinculin ( $p < 0.01$ ) at 40 min and *CD-31* ( $p < 0.01$ ) at 80 min. However, after 120 min the adhesive genes were more elevated on Co/FN (with the exception of vinculin), VE-cadherin ( $p < 0.05$ ), and *CD-31* ( $p < 0.01$ ) being significant. The synthesis of the mRNA of metabolic genes was comparable at the 40-min and 80-min time points, with the exception of augmented *MMP-1* ( $p < 0.05$ ) on Co/FN at

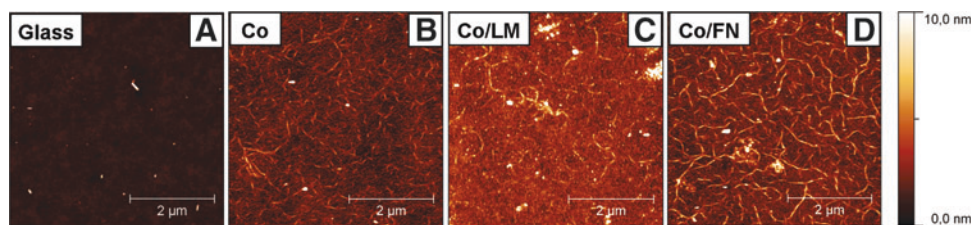
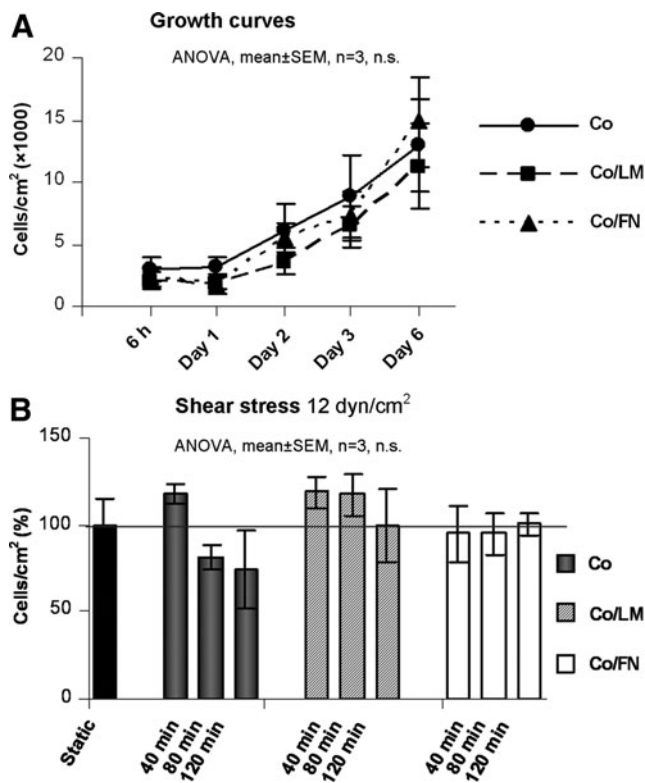


FIG. 2. Surface topography of a microscopic glass slide (A), collagen type I (B), collagen/laminin (C), and collagen/fibronectin (D) surfaces visualized by atomic force microscopy of dry samples. Scanning area 5  $\times$  5  $\mu$ m. Color images available online at [www.liebertpub.com/tea](http://www.liebertpub.com/tea)



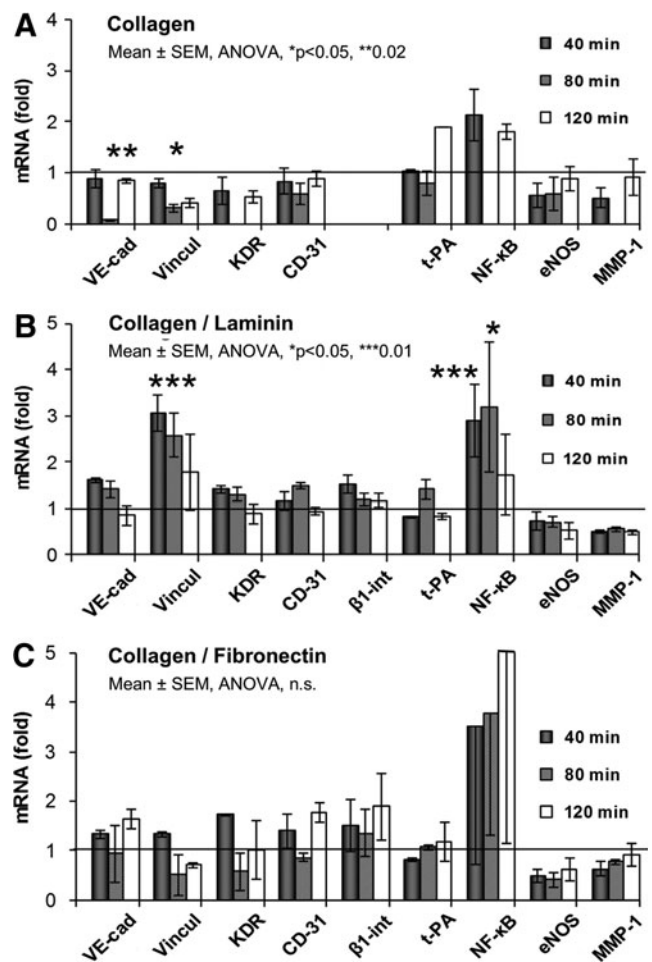
**FIG. 3.** Growth curves (A) and flow resistance (B) of human saphenous vein endothelial cells (HSVEC) on collagen type I (Co), collagen/laminin (Co/LM), and collagen/fibronectin (Co/FN) assemblies. The seeding density was  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and the culture period was 6 days (A) and seeding density  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and culture period 48 h, static control = 100% (B). ANOVA, analysis of variance; n.s., nonsignificant; SEM, standard error of mean.

80 min. Co/FN support generated upregulation of all of the metabolic genes at the 120-min interval, although this was not statistically significant.

**Immunofluorescence**

The relative immunofluorescence intensities of VE-cadherin, vinculin, *KDR*, and vWF in static, 2 and 6 h flow samples are shown in Figure 6, including the levels of statistical significance. On the collagen surface, vinculin, *KDR*, and vWF were significantly decreased at 2 h compared with static. This decrease was still significant at 6 h; however, vinculin and *KDR* increased their intensities between 2 and 6 h. VE-cad. remained unchanged. VE-cad. and vinculin were temporarily downregulated at mRNA level—significantly at 80 min but insignificantly at 2 h. The decrease of *KDR* mRNA was not significant (Fig. 4A).

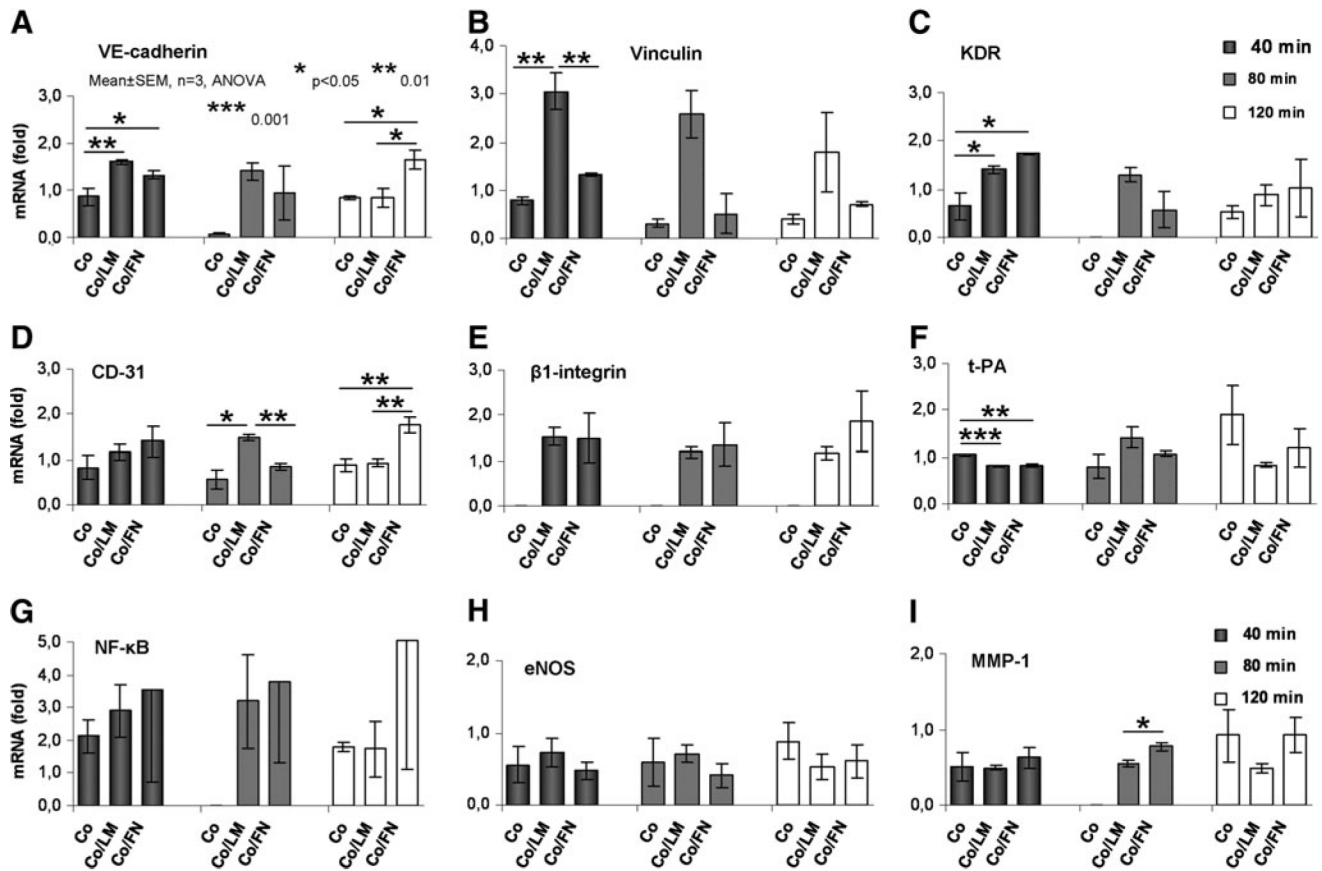
On the Co/LM surface, the intensities of VE-cad. and vinculin were unchanged at 2 h but significantly decreased at 6 h. The intensities of *KDR* and vWF significantly dropped at 2 h and vWF also at 6 h. The intensities of *KDR* and vWF were augmented between 2 and 6 h; however, vWF did not reach a static level. The unchanged intensities of VE-cad. and vinculin correspond with the mRNA levels. The decrease of *KDR* mRNA was not significant (Fig. 4B).



**FIG. 4.** Gene expression profiles of HSVEC under shear stress on collagen type I (Co) (A), Co/LM (B), and Co/FN (C) assemblies. Fold values of mRNA obtained by qRT-PCR. Static control = 1 was measured separately for each of the surfaces. See Introduction/Discussion for the gene description. mRNA, messenger ribonucleic acid; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction.

As for Co/FN, the intensities of VE-cad. and vWF increased significantly, vinculin was unchanged, and *KDR* significantly dropped after 2 h flow. At 6 h, VE-cad. decreased to a static level, vinculin dropped, *KDR* remained decreased, and vWF remained increased. VE-cad. and vinculin decreased and *KDR* and vWF did not change in intensity between 2 and 6 h. VE-cad. mRNA also increased (nonsignificantly) after 2 h, vinculin was similarly unchanged, and *KDR* mRNA was also unchanged (Fig. 4C).

The results of the immunofluorescence staining are presented in Figure 7. The cells are confluent and display a cobble-stone morphology in static cultures (Fig. 7A–D, 1, 4, 7). They become elongated and oriented with the direction of flow, slightly after 2 h of flow (Fig. 7A–D, 2, 5, 8) and more after 6 h of flow (Fig. 7A–D, 3, 6, 9). VE-cadherin stains continuously at the cell–cell interface under static (Fig. 7A, 1, 4, 7) and becomes slightly disintegrated under flow (Fig. 7A, 2–3, 5–6, 8–9). Vinculin-containing focal adhesions are somewhat better developed under flow on Co/LM (Fig. 7B, 5–6) and on Co/FN (Fig. 7B, 8–9) than on Co (Fig. 7B, 2–3). The *KDR* stain becomes more fine-grained



**FIG. 5.** Comparison of gene expression in HSVEC on collagen type I (Co), Co/LM, and Co/FN surfaces. Fold values of mRNA obtained by qRT-PCR. See Introduction/Discussion for the gene description.

under flow (Fig. 7C, 2–3, 5–6, 8–9) compared with the more dispersed distribution under static (Fig. 7C, 1, 4, 7). vWF staining is localized intracellular in Weibel–Palade bodies under static (Fig. 7D, 1, 4, 7) and appears also extracellular under flow (Fig. 7D, 2–3, 5–6, 8–9).

A comparison of the fluorescence intensities of Co, Co/LM, and Co/FN is given in Figure 8, including the statistical significances. Comparing Co/LM to Co at 2 h, vinculin increased (the increase in vinculin mRNA was nonsignificant, Fig. 5B), vWF decreased, and VE-cad. and *KDR* were unchanged (similar to the VE-cad. and *KDR* mRNA levels, Fig. 5A, C). Most importantly, the intensity of all four proteins (VE-cad., vinculin, *KDR*, and vWF) was significantly higher on Co/FN than on both Co and Co/LM at the 2 h time-point (except for vinculin on Co/LM, which was similar to Co/FN). This closely corresponds with the amount of VE-cad. mRNA (Fig. 5A); however, the changes in vinculin and *KDR* mRNA were nonsignificant (Fig. 5B, C).

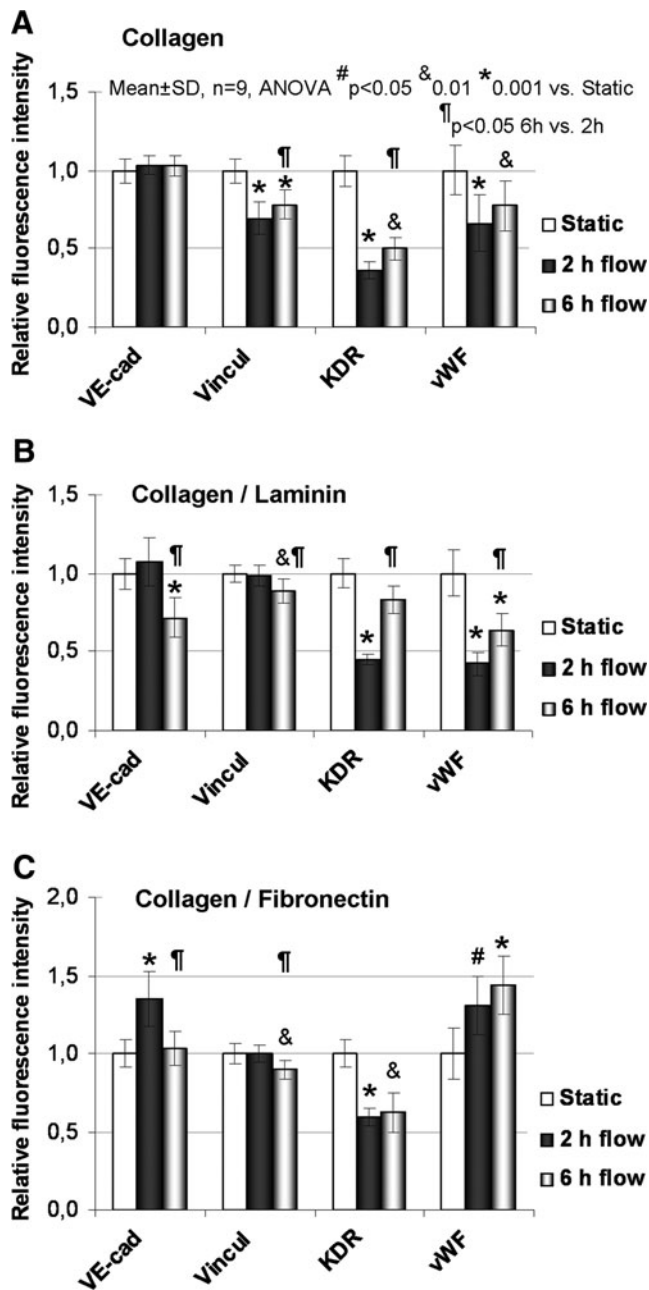
At 6 h, VE-cad. and vWF on Co/FN were still increased, while vinculin and *KDR* were comparable to Co/LM. Vinculin and vWF on Co/FN were increased, VE-cad. and *KDR* were comparable to Co at 6 h. Vinculin and *KDR* on Co/LM increased, VE-cad. and vWF on Co/LM decreased compared with Co at 6 h.

## Discussion

The concept of autologous EC seeding on to the lumen of a vascular prosthesis was introduced in the early 1980s.<sup>10</sup> A

healthy normal endothelial lining ensures a blood-compatible surface,<sup>11</sup> and the combination of polymeric artificial material and seeding of living cells onto a protein-based scaffold is still a prevailing option in vascular tissue engineering.<sup>12–14</sup>

The surface topography and the wettability of biomaterials have a great impact on the adhesion and growth of cultured cells.<sup>15</sup> In our study, glass coated with Co alone was a more hydrophilic surface, while Co/LM and Co/FN bi-layers were shown to be more hydrophobic. However, EC' adhesion and proliferation followed a similar growth curve on all three samples. This can be explained by the similar surface topography, by the relatively high seeding density and by the capability of primary endothelium with a low passage number (P5) to reach rapidly confluence, in particular on an ECM matrix support of any kind.<sup>16</sup> However, under dynamic conditions, the cell adhesion genes were slightly downregulated on Co, which may correspond with their relatively high hydrophilicity (contact angle ~30°). Cell adhesion is optimal on moderately hydrophilic surfaces, that is, those with a contact angle of 50–90°, while on highly hydrophilic or highly hydrophobic surfaces the cell adhesion is lower (for a review, see Bacakova *et al.*<sup>4</sup>). In accordance with this, the adhesion genes tended to be upregulated in cells on Co/LM and Co/FN, that is, on surfaces having contact angles on an average of 63° and 64°, respectively. Moreover, cell retention under flow showed a tendency to be better (although nonsignificantly) on these bi-layers. This confirms our concept that cells can grow,<sup>17</sup>



**FIG. 6.** Relative immunofluorescence intensity of VE-cadherin (VE-cad), vinculin (Vincul), kinase domain receptor (*KDR*), and von Willebrand factor (vWF) in HSVEC cultured on collagen (A), Co/LM (B), and Co/FN (C) assemblies. A comparison of static, 2 and 6 h flow samples is presented.

and particularly resist flow, better on composite matrices<sup>18</sup> resembling the natural ECM, and show more physiological gene expression under SS, depending on the underlying matrix.

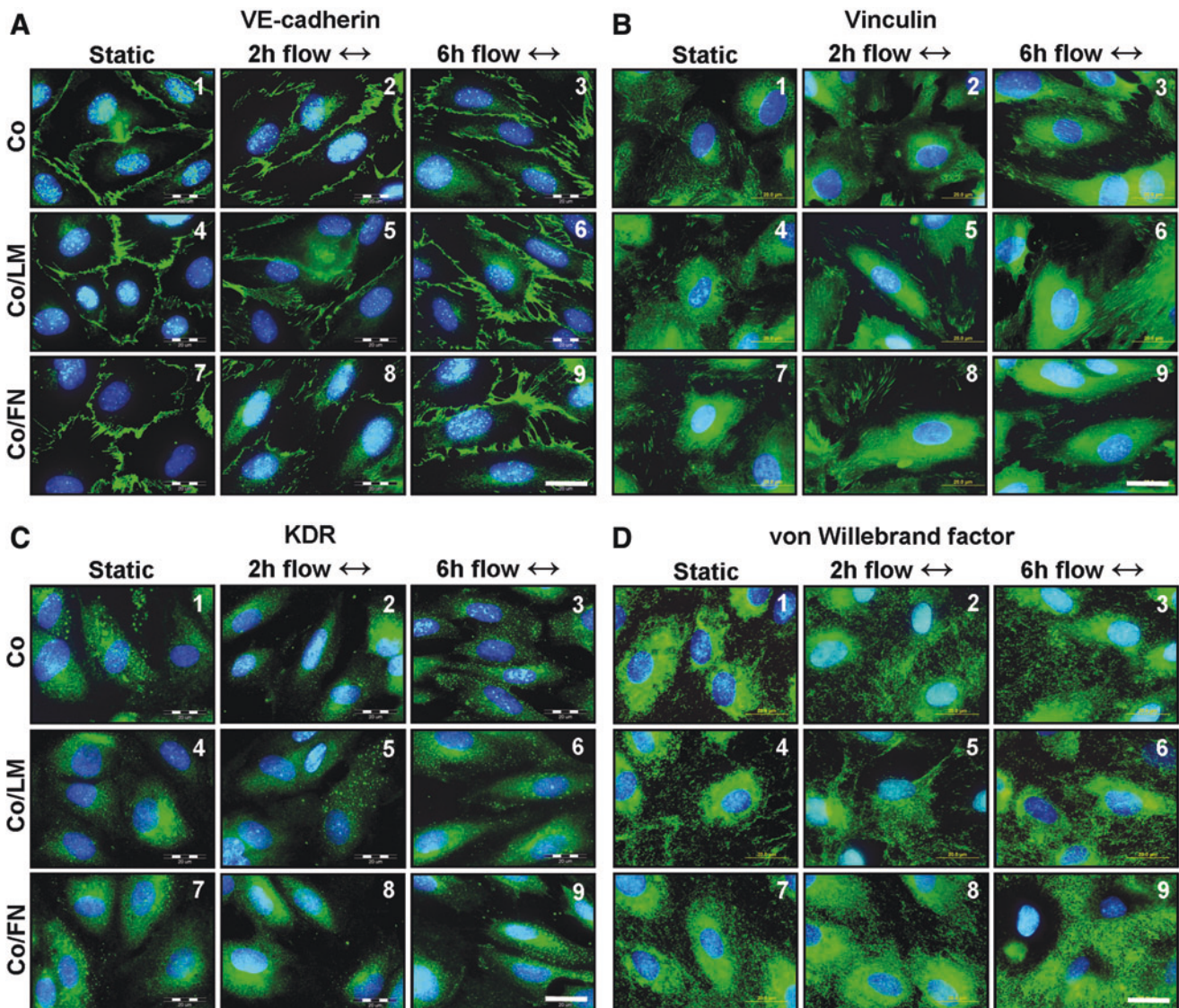
Balcells and Edelman<sup>19</sup> seeded bovine aortic endothelial cells (BAEC) in serum-free media on tissue culture polystyrene coated with FN or LM or gelatin. They did not find significant differences in cell adhesion and proliferation. They suggest that preadsorbed proteins nonspecifically enhance cell adhesion, but they specifically influence cell function, as was shown by the increased prostacyclin pro-

duction on FN or LM compared to gelatin. The authors explain this observation by the existence of different types and/or affinity of the integrins that regulate cell function in dependence on adhesive support. These findings are in full agreement with our study, where the functional gene profile of the EC under flow proved to be better on the Co/LM samples, and mainly on Co/FN.

The main challenge for current vascular tissue engineering is to maintain the retention and the function of the endothelial layer. Exposing EC to physiological long-term laminar SS (10–20 dyn/cm<sup>2</sup>) can provide an analogy with the native endothelial lining in the straight part of arteries.<sup>20,21</sup> Physiological laminar SS produces atheroprotective endothelial phenotype, while turbulent flow and low levels of SS produce atherothrombosis-susceptible phenotype both *in vitro*<sup>22</sup> and *in vivo*.<sup>23,24</sup> We are aware that a 2-h-gene profile may represent an “acute onset” response to SS that may transiently be pro-inflammatory, and that chronic effects of normal SS (cell alignment and steady state of gene expression) would have been achieved several hours later.<sup>25,26</sup> To confirm the cell phenotype, we extended the flow up to 6 h for the immunofluorescence study. Last but not least, 2 h interval may produce some of the early changes in mRNA levels related to endothelial dysfunction<sup>27</sup> and it is theoretically an acceptable time for potential seeding and preconditioning of human cells on body implants during surgery.<sup>28</sup>

We investigated nine genes and four proteins, which were previously shown to be differentially expressed in cultured EC after submitting to flow. Although they play a clear role in vascular health, the reference data for comparison regarding the expression profiles of EC on engineered surfaces typically contain some contradictory results.<sup>29,30</sup> VE-cadherin is a cell–cell adhesion and permeability-associated glycoprotein, which also serves as an adaptor in blood flow sensing. Increased endothelial permeability is associated with localization of atherosclerosis. Disintegration of VE-cad. stain at 2 and 6 h under laminar flow is physiological and transient and neither the expression level of VE-cad., nor its distribution between membrane and cytosol are changed upon shearing of BAEC (12 dyn/cm<sup>2</sup>, 6–24 h) on pure glass<sup>23</sup> or on type I collagen.<sup>31</sup> Our experiment revealed transitory downregulation of VE-cad. on the Co sample at 80 min, suggesting a temporary disintegration of cell–cell junctions. However, VE-cad. mRNA was significantly more expressed at the 120-min point on Co/FN (1.6-fold) (protein 1.4-fold) than on both Co and Co/LM, indicating better reorganization of the cell–cell contacts. Parallel to this, Fernandez *et al.*<sup>8</sup> found 1.6-fold augmentation on gelatin and 2.8-fold augmentation in cells on fibrin glue-coated slides after 4 h.

Vinculin is a membrane-cytoskeletal protein localized in focal adhesion plaques, and it employs the linkage of integrin adhesion molecules to the actin cytoskeleton.<sup>32,33</sup> The onset of flow does not significantly change the mean remodeling rate of the adhesion sites in confluent cells, but it promotes a shift of adhesion displacement in the downstream direction.<sup>32</sup> Cells under increased shear reinforce their adhesion to the substrate; however, the extent of the increased expression of vinculin and paxillin is not extremely high.<sup>34</sup> In our experiment, EC significantly downregulated vinculin on the Co substratum—mRNA at 80 min and



**FIG. 7.** Morphology of HSVEC on collagen (Co), Co/LM, and Co/FN assemblies. Immunofluorescence of VE-cadherin (**A1–9**), Vinculin (**B1–9**), *KDR* (**C1–9**), and vWF (**D1–9**) (green), cell nuclei counterstained with Hoechst (blue). The flow direction is from left to right, as indicated by the two-way arrows. Epifluorescence microscope Olympus IX50, Olympus DP70 digital camera, magnification 100 $\times$ , scale bar = 20  $\mu$ m. Color images available online at [www.liebertpub.com/tea](http://www.liebertpub.com/tea)

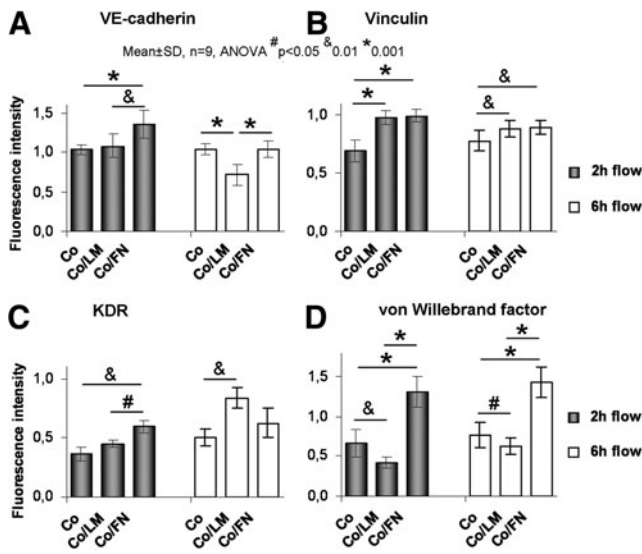
protein fluorescence at 2 h, suggesting disintegration of cell adhesion under flow. By contrast, cells on Co/LM and Co/FN increased the total fluorescence of vinculin compared with Co, and cells on Co/LM increased the amount of mRNA for vinculin (significantly at 40 min) possibly indicating improved cell attachment to combined matrices.

*KDR* (*VEGFR-2*, *Flk-1*) is a membrane-bound receptor for VEGF. It is involved in signaling transduction, angiogenesis, and cell survival. Long-term physiological SS (6–24 h) has been shown to selectively upregulate the expression of *KDR*.<sup>35</sup> In our setting, testing *KDR* mRNA and protein gave mixed results, as the period of flow was probably too short to see clear activation of *KDR* similar to the activation in other studies.<sup>8,36,37</sup>

*CD-31* (*PECAM-1*) is found in intercellular junctions, and plays an important role in the EC-leukocyte interaction. In the EC stimulated by fluid SS, *CD-31* is directly involved in

transmitting the flow mechanical forces.<sup>38</sup> Moreover, *PECAM-1*, VE-cadherin, and *KDR* molecules together comprise a mechanosensory complex of EC.<sup>39</sup> HSVEC exposed to 12 dyn/cm<sup>2</sup> for 4 h significantly downregulated *CD-31* when seeded on planar gelatin, but the level was unchanged on planar fibrin glue or inside tubular vascular grafts.<sup>8,40</sup> In our study, *CD-31* expression was significantly more stimulated at 80 min on Co/LM than on Co and Co/FN and, conversely, the mRNA level was significantly greater (1.77-fold) on Co/FN at 120 min than on Co and Co/LM.

$\beta_1$ -integrin is a part of the integrin super-family of adhesion molecules that directly bind to ECM proteins, and interact with signaling and cytoskeletal proteins (grouped in focal adhesions) to regulate cellular adherence, focal adhesion plasticity, cell motility, and survival. Integrins are also directly involved in mechanosensing of flow.<sup>41</sup> HUVECs under physiologically high SS (15 dyn/cm<sup>2</sup>) enhance more than 2.5-fold the expression of integrin subunits  $\alpha_5$  and  $\beta_1$ ,



**FIG. 8.** Relative immunofluorescence intensity of VE-cadherin (A), vinculin (B), *KDR* (C), and vWF (D) in HSVEC. A comparison of collagen (Co), Co/LM, and Co/FN assemblies is presented.

which are preferential receptors for FN. This increases cell-matrix attachment, migration, and survival, thus being an atheroprotective change.<sup>42</sup> In our experiment,  $\beta_1$ -integrin was insignificantly upregulated on both Co/LM and Co/FN at 40 min compared to static. At 80 min and mainly at 120 min, it was more increased on Co/FN (1.89-fold) than on Co/LM (1.16-fold), but this was not significant. We were unable to measure the mRNA for  $\beta_1$ -integrin on pure Co for major cell loss during flow. Increased upregulation of integrin on Co/FN compared with Co/LM may be in accordance with Urbich's study,<sup>42</sup> since the preferential receptor for LM ( $\alpha_6$ ) was only slightly upregulated by shear compared with FN receptor  $\beta_1$ . Moreover, FN integrin receptors  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  play a major role in the adaptation of EC to flow.<sup>43,44</sup> This may explain the slightly better cellular response on Co/FN than on Co or Co/LM under SS in this study.<sup>45</sup>

*t-PA* is an important enzyme involved in blood clot lysis, and it is related to normal vascular health. Its recombinant form is widely used as a therapeutic agent. McCormick *et al.*<sup>46</sup> found the DNA microarray ratios for *t-PA* 1.03 at 6 h and 1.28 at 24 h of SS (25 dyn/cm<sup>2</sup>). However, the Northern ratio (protein) for *t-PA* at 6 h was 2.23, twice that of the *t-PA* Northern ratio at 24 h. The authors conclude that this discrepancy, although not significant, may be due to the low expression level in HUVEC. However, HSVEC exposed to SS of 12 dyn/cm<sup>2</sup> for 4 h increased the expression of *t-PA* 2.2-fold ( $p < 0.05$ ), 2.9-fold (nonsignificant), and 2.56-fold ( $p < 0.05$ ) on planar gelatin, planar fibrin-glue, and tubular fibrin glue-coated ePTFE grafts, respectively, suggesting regulation of EC under laminar SS in an anti-thrombotic way.<sup>8</sup> In our setting, the expression levels of mRNA for *t-PA* were variable and nonsignificant among the samples (apart from temporary upregulation on Co at 40 min).

*NF- $\kappa$ B* is a protein complex controlling transcription of DNA. In almost all cell types, it is integrated in responses to stress, and plays a key role in inflammation. BAEC cultured

on tissue culture plastic and exposed to 12 dyn/cm<sup>2</sup> showed a transient increase (two to three-fold) in *NF- $\kappa$ B* at 30 and 60 min, and no further increase was observed at 120 min.<sup>47</sup> In human aortic EC (HAEC) the activation of *NF- $\kappa$ B* was significantly elevated when exposed to prolonged (>2 h) steady low shear (2 dyn/cm<sup>2</sup>) compared with exposure to prolonged high (i.e., physiological) shear of 16 dyn/cm<sup>2</sup>.<sup>48</sup> This is in accordance with our study, where EC on Co/LM and Co/FN upregulated *NF- $\kappa$ B* around three-fold, being significant on Co/LM at 40 min and 80 min and nonsignificant at 120 min, and never significant on Co/FN for any interval. We assume that prolonged stimulation (up to 24 h) would probably reverse this temporary augmentation.<sup>49</sup> In addition, *NF- $\kappa$ B* expression under laminar SS potentially exerts dual functions by inducing both pro-inflammatory and cytoprotective transcripts.<sup>50</sup> Thus, upregulation of *NF- $\kappa$ B* by physiologically high SS is only transitory, in contrast to disturbed flow, which can cause prolonged activation and early atherosclerotic changes.

Human cells *in vivo* are constantly exposed to multi-component matrices varying in composition. Flow-induced early signaling in BAEC plated on various ECM proteins was previously studied,<sup>51,52</sup> and the authors found that SS-induced *NF- $\kappa$ B* activation is more pronounced in cells cultured on FN and fibrinogen, which are transitional ECM proteins deposited more in case of inflammation, injury, and angiogenesis. However, BAEC plated on Co and LM retained more quiescent phenotype under shear, consistent with low cell turnover. Thus, including collagen in mixed artificial basement membrane actively suppressed the FN-dependent activation of *NF- $\kappa$ B* by flow, as shown in cells on combined matrix Co/FN. However, the causal relationship *in vivo* between ECM remodeling and *NF- $\kappa$ B* activation remains to be elucidated.<sup>51</sup> Moreover, mixed matrices in certain concentrations, such as Co/FN, may result in signaling co-operativity in EC.<sup>52</sup> This is in agreement with our study, which was also performed on a two-component matrix, although the increased activation of some molecules on Co/FN was not statistically significant compared to Co and Co/LM, due to variation among the experiments. Another example of matrix-specific activation of the inflammatory signaling pathway under SS (45 min) is the activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases in EC cultured on FN, but not on Co.<sup>53</sup> However, this happens transiently after the acute onset of laminar SS or after chronic stimulation with oscillatory flow, and this pro-inflammatory pathway would be quiescent for cells under prolonged application of laminar shear.<sup>54</sup>

*eNOS* generates the production of NO in blood vessels, and is vital in cell signaling and in regulating normal vascular tone. SS is believed to be the most important stimulus for NO production. Porcine aortic EC were proved to enhance two-fold the production of *eNOS* upon 16 dyn/cm<sup>2</sup> shear for 6 h when seeded on glass with LM support; however, culturing on Co or FN was noninductive for *eNOS* under SS thanks to additional cell-laminin interaction via nonintegrin proteins.<sup>55</sup> *eNOS* is also clearly upregulated by SS in BAEC. However, the evidence is less convincing in HUVEC (25 dyn/cm<sup>2</sup>, 6 h), since the output of NO from EC is promoted by a number of other mechanisms for example, synthesis of NO precursor L-arginine.<sup>46</sup> To support this, we did not observe significant changes in *eNOS* mRNA in HSVEC up to 2 h in any of our samples.



*MMP-1* is a member of the family of enzymes involved in the breakdown of ECM in both physiological and pathological processes. Twenty-four hours of laminar SS of 12 dyn/cm<sup>2</sup> significantly (2.8-fold) increases the amount of *MMP-1* in HAEC as a manifestation of normal vascular remodeling and potential wound healing.<sup>35</sup> 1.7-fold induction was reported in HUVEC subjected to a similar experimental setting and, on the other hand, a 1.4-fold increase was noted under turbulent (athero-inductive) flow.<sup>56</sup> We did not observe relevant changes, probably due to the short time of shearing; however, cells on Co/FN augmented *MMP-1* more than on Co/LM (significantly at the 80 min point).

vWF is an adhesive glycoprotein involved in blood coagulation and serves as a marker of EC differentiation.<sup>57</sup> SS induces physiological release of vWF from EC both into the medium and into basolateral ECM without enhanced vWF mRNA expression.<sup>58</sup> However, we observed increased fluorescence of vWF protein (probably both intracellular + extracellular) on Co/FN compared with Co and Co/LM at 2 h and at 6 h. Since vWF mediates EC adhesion to the vessel wall in physiologic conditions, we regard this as improved cellular phenotype on Co/FN rather than a pathologic pro-thrombotic change.<sup>5,8,58</sup>

In conditions of tissue engineering, the goal is to achieve rapid surface endothelialization of vascular implants, possible preconditioning by laminar flow, and maintaining the function of the seeded cells, mainly their anti-thrombogenic properties.<sup>30</sup> The contribution of our study consists of defining the short-term (up to 2 h) effect of physiological laminar SS on phenotypic modulation of human patient-derived EC in close dependence on precoating composite ECM matrices for the purposes of vascular tissue engineering.

## Conclusion

Primary cultures of HSVEC rapidly formed a confluent monolayer on Co, Co/LM and Co/FN planar substrates. Despite the divergence in surface roughness and wettability, there were no differences in cell adhesion and growth. However, combined Co/LM and Co/FN matrices seemed to be more suitable for EC retention under flow than Co surface alone. Moreover, Co/FN matrix promoted slightly more favorable cellular phenotype than Co/LM, as shown by the upregulated expression of some of the adhesion and metabolic genes under SS up to 2 h and corresponding enhanced immunofluorescence of proteins under flow up to 6 h.

## Acknowledgments

We are grateful for the support received from various grant agencies: Grant Agency of the Czech Republic (projects P108/10/1106, P108/11/1857, P305/08/0108, and P205/12/1702). Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project Barrande 2005-06-036-1, BIOPOL EE2.3.30.0029, and BIOCEV CZ.1.05/1.1.00/02.0109). Grant Agency of the Ministry of Health CR (project No NT11270-4/2010). Grant Agency of Charles University in Prague, Czech Republic (grant GAUK-637712). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague, Czech Republic) is gratefully acknowledged for his language revision of the article.

## Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

1. Goodney, P.P., Beck, A.W., Nagle, J., Welch, H.G., and Zwolak, R.M. National trends in lower extremity bypass surgery, endovascular interventions, and major amputations. *J Vasc Surg* **50**, 54, 2009.
2. Chlupac, J., Filova, E., and Bacakova, L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res* **58(Suppl. 2)**, 119, 2009.
3. Meinhart, J.G., Deutsch, M., Fischlein, T., Howanietz, N., Fröschl, A., and Zilla, P. Clinical autologous *in vitro* endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg* **71(5 Suppl)**, 327, 2001.
4. Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., and Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* **29**, 739, 2011.
5. McGuigan, A.P., and Sefton, M.V. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials* **28**, 2547, 2007.
6. Brynda, E., Pacherník, J., Houska, M., Pientka, Z., and Dvořák, P. Surface immobilized protein multilayers for cell seeding. *Langmuir* **21**, 7877, 2005.
7. Fernandez, P., Daculsi, R., Rémy-Zolghadri, M., Bareille, R., and Bordenave, L. Endothelial cells cultured on engineered vascular grafts are able to transduce shear stress. *Tissue Eng* **12**, 1, 2006.
8. Fernandez, P., Bourget, C., Bareille, R., Daculsi, R., and Bordenave, L. Gene response in endothelial cells cultured on engineered surfaces is regulated by shear stress. *Tissue Eng* **13**, 1607, 2007.
9. Rémy, M., Bareille, R., Rerat, V., Bourget, C., Marchand-Brynaert, J., and Bordenave, L. Polyethylene terephthalate membrane grafted with peptidomimetics: endothelial cell compatibility and retention under shear stress. *J Biomater Sci Polym Ed* **24**, 269, 2013.
10. Herring, M., Gardner, A., and Glover, J. Seeding human arterial prostheses with mechanically derived endothelium. The detrimental effect of smoking. *J Vasc Surg* **1**, 279, 1984.
11. Deutsch, M., Meinhart, J., Zilla, P., Howanietz, N., Gortlitz, M., Fröschl, A., Stuempflen, A., Bezuidenhout, D., and Grabenwoeger, M. Long-term experience in autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg* **49**, 352, 2009.
12. Stegemann, J.P., Kaszuba, S.N., and Rowe, S.L. Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng* **13**, 2601, 2007.
13. De Visscher, G., Mesure, L., Meuris, B., Ivanova, A., and Flameng, W. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1 $\alpha$ . *Acta Biomater* **8**, 1330, 2012.
14. Williams, S.K., Kleinert, L.B., and Patula-Steinbrenner, V. Accelerated neovascularization and endothelialization of vascular grafts promoted by covalently bound laminin type 1. *J Biomed Mater Res A* **99**, 67, 2011.
15. Vandrovcová, M., and Bačáková, L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res* **60**, 403, 2011.

16. Prasad, C.K., and Krishnan, L.K. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 5658, 2005.
17. Sreerekha, P.R., and Krishnan, L.K. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Artif Organs* **30**, 242, 2006.
18. Prasad, C.K., and Krishnan, L.K. Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater* **4**, 182, 2008.
19. Balcells, M., and Edelman, E.R. Effect of pre-adsorbed proteins on attachment, proliferation, and function of endothelial cells. *J Cell Physiol* **191**, 155, 2002.
20. Li, Y.S., Haga, J.H., and Chien, S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* **38**, 1949, 2005.
21. Chien, S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1209, 2007.
22. Brooks, A.R., Lelkes, P.I., and Rubanyi, G.M. Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: relevance for focal susceptibility to atherosclerosis. *Endothelium* **11**, 45, 2004.
23. Miao, H., Hu, Y.L., Shiu, Y.T., Yuan, S., Zhao, Y., Kaunas, R., Wang, Y., Jin, G., Usami, S., and Chien, S. Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: *in vivo* and *in vitro* investigations. *J Vasc Res* **42**, 77, 2005.
24. Davies, P.F. Endothelial transcriptome profiles *in vivo* in complex arterial flow fields. *Ann Biomed Eng* **36**, 563, 2008.
25. Wasserman, S.M., Mehraban, F., Komuves, L.G., Yang, R.B., Tomlinson, J.E., Zhang, Y., Spriggs, F., and Topper, J.N. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics* **12**, 13, 2002.
26. Wasserman, S.M., and Topper, J.N. Adaptation of the endothelium to fluid flow: *in vitro* analyses of gene expression and *in vivo* implications. *Vasc Med* **9**, 35, 2004.
27. Hsieh, H.J., Li, N.Q., and Frangos, J.A. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am J Physiol* **260(2 Pt 2)**, H642, 1991.
28. Bordenave, L., Menu, P., and Baquey, C. Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes. *Expert Rev Med Devices* **5**, 337, 2008.
29. Punchard, M.A., Stenson-Cox, C., O'Ceirbhail, E.D., Lyons, E., Gundy, S., Murphy, L., Pandit, A., McHugh, P.E., and Barron, V. Endothelial cell response to biomechanical forces under simulated vascular loading conditions. *J Biomech* **40**, 3146, 2007.
30. Vara, D.S., Punshon, G., Sales, K.M., Hamilton, G., and Seifalian, A.M. Haemodynamic regulation of gene expression in vascular tissue engineering. *Curr Vasc Pharmacol* **9**, 167, 2011.
31. Kondapalli, J., Flozak, A.S., and Albuquerque, M.L. Laminar shear stress differentially modulates gene expression of p120 catenin, Kaiso transcription factor, and vascular endothelial cadherin in human coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem* **279**, 11417, 2004.
32. Mott, R.E., and Helmke, B.P. Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1616, 2007.
33. Albuquerque, M.L., and Flozak, A.S. Lamellipodial motility in wounded endothelial cells exposed to physiologic flow is associated with different patterns of beta1-integrin and vinculin localization. *J Cell Physiol* **195**, 50, 2003.
34. Kano, Y., Katoh, K., and Fujiwara, K. Lateral zone of cell-cell adhesion as the major fluid shear stress-related signal transduction site. *Circ Res* **86**, 425, 2003.
35. Chen, B.P., Li, Y.S., Zhao, Y., Chen, K.D., Li, S., Lao, J., Yuan, S., Shyy, J.Y., and Chien, S. DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress. *Physiol Genomics* **7**, 55, 2001.
36. Staalesen, T., Risberg, B., and Mattsson, E. The kinase insert domain-containing receptor (KDR) is regulated by shear stress. *Scand Cardiovasc J* **36**, 368, 2002.
37. Urbich, C., Stein, M., Reisinger, K., Kaufmann, R., Dimmeler, S., and Gille, J. Fluid shear stress-induced transcriptional activation of the vascular endothelial growth factor receptor-2 gene requires Sp1-dependent DNA binding. *FEBS Lett* **535**, 87, 2003.
38. Fujiwara, K. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. *J Intern Med* **259**, 373, 2006.
39. Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M.A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426, 2005.
40. Vara, D.S., Punshon, G., Sales, K.M., Sarkar, S., Hamilton, G., and Seifalian, A.M. Endothelial cell retention on a viscoelastic nanocomposite vascular conduit is improved by exposure to shear stress preconditioning prior to physiological flow. *Artif Organs* **32**, 977, 2008.
41. Shyy, J.Y., and Chien, S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* **91**, 769, 2002.
42. Urbich, C., Walter, D.H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis. *Circ Res* **87**, 683, 2000.
43. Hahn, C., and Schwartz, M.A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 53, 2009.
44. Jalali, S., del Pozo, M.A., Chen, K., Miao, H., Li, Y., Schwartz, M.A., Shyy, J.Y., and Chien, S. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1042, 2001.
45. Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E., and Schwartz, M.A. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* **279**, 12001, 2004.
46. McCormick, S.M., Eskin, S.G., McIntire, L.V., Teng, C.L., Lu, C.M., Russell, C.G., and Chittur, K.K. DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8955, 2001.
47. Lan, Q., Mercurius, K.O., and Davies, P.F. Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 950, 1994.
48. Mohan, S., Mohan, N., and Sprague, E.A. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. *Am J Physiol* **273(2 Pt 1)**, C572, 1997.

49. Lehoux, S., Castier, Y., and Tedgui, A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* **259**, 381, 2006.
50. Partridge, J., Carlsen, H., Enesa, K., Chaudhury, H., Zakkar, M., Luong, L., Kinderlerer, A., Johns, M., Blomhoff, R., Mason, J.C., Haskard, D.O., and Evans, P.C. Laminar shear stress acts as a switch to regulate divergent functions of NF-kappaB in endothelial cells. *FASEB J* **21**, 3553, 2007.
51. Orr, A.W., Sanders, J.M., Bevard, M., Coleman, E., Sarembock, I.J., and Schwartz, M.A. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *J Cell Biol* **169**, 191, 2005.
52. Orr, A.W., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., Deckmyn, H., and Schwartz, M.A. Matrix-specific suppression of integrin activation in shear stress signaling. *Mol Biol Cell* **17**, 4686, 2006.
53. Hahn, C., Orr, A.W., Sanders, J.M., Jhaveri, K.A., and Schwartz, M.A. The subendothelial extracellular matrix modulates JNK activation by flow. *Circ Res* **104**, 995, 2009.
54. Shyy, J.Y. Extracellular matrix differentiating good flow versus bad flow. *Circ Res* **104**, 931, 2009.
55. Gloe, T., Riedmayr, S., Sohn, H.Y., and Pohl, U. The 67-kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem* **274**, 15996, 1999.
56. Garcia-Cardena, G., Comander, J., Anderson, K.R., Blackman, B.R., and Gimbrone, M.A., Jr. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4478, 2001.
57. Tsai, H.M. von Willebrand factor, shear stress, and ADAMTS13 in hemostasis and thrombosis. *ASAIO J* **58**, 163, 2012.
58. Galbusera, M., Zoja, C., Donadelli, R., Paris, S., Morigi, M., Benigni, A., Figliuzzi, M., Remuzzi, G., and Remuzzi, A. Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium. *Blood* **90**, 1558, 1997.

Address correspondence to:

*Jaroslav Chlupac, MD*

*Department of Biomaterials and Tissue Engineering*

*Institute of Physiology*

*Academy of Sciences of the Czech Republic*

*Videnska 1083*

*142 20 Prague 4-Krc*

*Czech Republic*

*E-mail: jarach@centrum.cz*

*Received: March 5, 2013*

*Accepted: January 31, 2014*

*Online Publication Date: April 21, 2014*



Review

# Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine

Lucie Bacakova <sup>1,\*</sup>, Julia Pajorova <sup>1</sup>, Maria Tomkova <sup>2</sup>, Roman Matejka <sup>1</sup>, Antonin Broz <sup>1</sup>, Jana Stepanovska <sup>1</sup>, Simon Prazak <sup>1</sup>, Anne Skogberg <sup>3</sup>, Sanna Siljander <sup>4</sup> and Pasi Kallio <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 14220 Prague, Czech Republic; Julia.Pajorova@fgu.cas.cz (J.P.); Roman.Matejka@fgu.cas.cz (R.M.); Antonin.Broz@fgu.cas.cz (A.B.); Jana.Stepanovska@fgu.cas.cz (J.S.); Simon.Prazak@fgu.cas.cz (S.P.)

<sup>2</sup> Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia; xtomkovam2@uniag.sk

<sup>3</sup> BioMediTech Institute and Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Korkeakoulunkatu 3, 33014 Tampere, Finland; anne.skogberg@tuni.fi (A.S.); pasi.kallio@tuni.fi (P.K.)

<sup>4</sup> Automation Technology and Mechanical Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Tampere University, Korkeakoulunkatu 6, 33720 Tampere, Finland; sanna.siljander@tuni.fi

\* Correspondence: Lucie.Bacakova@fgu.cas.cz; Tel.: +420-2-9644-3743

Received: 27 December 2019; Accepted: 21 January 2020; Published: 23 January 2020



**Abstract:** Nanocellulose/nanocarbon composites are newly emerging smart hybrid materials containing cellulose nanoparticles, such as nanofibrils and nanocrystals, and carbon nanoparticles, such as “classical” carbon allotropes (fullerenes, graphene, nanotubes and nanodiamonds), or other carbon nanostructures (carbon nanofibers, carbon quantum dots, activated carbon and carbon black). The nanocellulose component acts as a dispersing agent and homogeneously distributes the carbon nanoparticles in an aqueous environment. Nanocellulose/nanocarbon composites can be prepared with many advantageous properties, such as high mechanical strength, flexibility, stretchability, tunable thermal and electrical conductivity, tunable optical transparency, photodynamic and photothermal activity, nanoporous character and high adsorption capacity. They are therefore promising for a wide range of industrial applications, such as energy generation, storage and conversion, water purification, food packaging, construction of fire retardants and shape memory devices. They also hold great promise for biomedical applications, such as radical scavenging, photodynamic and photothermal therapy of tumors and microbial infections, drug delivery, biosensors, isolation of various biomolecules, electrical stimulation of damaged tissues (e.g., cardiac, neural), neural and bone tissue engineering, engineering of blood vessels and advanced wound dressing, e.g., with antimicrobial and antitumor activity. However, the potential cytotoxicity and immunogenicity of the composites and their components must also be taken into account.

**Keywords:** nanofibrillated cellulose; cellulose nanocrystals; fullerenes; graphene; carbon nanotubes; diamond nanoparticles; sensors; drug delivery; tissue engineering; wound dressing

## 1. Introduction

Nanocellulose/nanocarbon composites are hybrid materials containing cellulose and carbon nanoparticles. Integration of nanocarbon materials with nanocellulose provides functionality of nanocarbons, using an eco-friendly, low-cost, strong, dimension-stable, nonmelting, nontoxic and nonmetal matrix or carrier, which alone has versatile applications in industry, biotechnology and biomedicine (for a review, see [1,2]). In addition to its advantageous combination with nanocarbon materials, nanocellulose is an appealing material for biomedical applications due to its tunable chemical

properties, nonanimal origin, and resemblance to biological molecules in dimension, chemistry and viscoelastic properties, etc. [3–6].

Cellulose nanomaterials include cellulose nanofibrils (CNFs) and cellulose nanocrystals (CNCs) [3]. CNFs are manufactured using either a bottom-up or a top-down approach. The bottom-up approach involves bacterial (*Gluconacetobacter*) biosynthesis to obtain bacterial cellulose (BC), while, in the top-down method, cellulosic biomass from plant fibers is disintegrated into smaller CNFs [7] that contain amorphous and crystalline regions [3]. The fibrillation of cellulose is achieved using mechanical forces, chemical treatments, enzymes or combinations of these. After fibrillation, the width of CNFs is typically between 3 and 100 nm, and the length can be several micrometers [8]. Separation of the crystalline parts from the amorphous regions of the fibers or fibrils to obtain CNCs typically requires acid hydrolysis, which destroys the amorphous regions [9]. Entangled CNFs are longer, while CNCs possess shorter needle- or rod-like morphology with a similar diameter and a more rigid molecule due to their higher crystallinity [3,9]. In general, the properties of nanocelluloses are variable and depend on their origin, type, processing, pretreatments and functionalization. Integration with other materials, as well as fabrication of the final product, further affects the properties of the resulting composite or hybrid structure.

Carbon nanoparticles include fullerenes (usually C<sub>60</sub>), graphene-based particles (graphene, graphene oxide, reduced graphene oxide, graphene quantum dots), nanotubes (single-walled, double-walled, few-walled or multi-walled) and nanodiamonds (for a review, see [10–20]). The most frequently used nanocellulose nanocarbon composites contain graphene or carbon nanotubes, while composites of nanocellulose with nanodiamond, and particularly with fullerenes, are less frequently used. Other carbon nanostructures, which are less frequently used in nanocellulose nanocarbon composites, at least for biomedical applications, include carbon nanofibers [21–25], carbon quantum dots [26–28] activated carbon [29,30] and carbon black [31–33].

Nanocellulose nanocarbon composites can be prepared in one-dimensional (1D), two-dimensional (2D) or three-dimensional (3D) forms. 1D composites are represented, for example, by C<sub>60</sub> fullerenes grafted onto cellulose nanocrystals that have undergone amination or oxidation [34,35]. 2D composites are represented by films, which can be self-standing or supported, i.e., in the form of free-standing membranes [29,36–41] or in the form of coatings deposited on bulk materials [33,42]. The films can be formed by depositing carbon nanoparticles on a nanocellulose layer [43,44]. More frequently, however, they are fabricated from aqueous dispersions of nanocellulose and carbon nanoparticles [39,42]. It should be pointed out that cellulose nanoparticles are excellent dispersive agents for carbon nanoparticles, as they prevent the aggregation of these nanoparticles and maintain them in long-term stable homogeneous suspensions without the need to subject them to chemical functionalization [45,46]. Suspensions of cellulose and carbon nanoparticles are also starting materials for the creation of 3D nanocellulose nanocarbon composites in the form of aerogels, foams or sponges [45,47–50]. In addition, composite 3D scaffolds, especially for tissue engineering and for regenerative medicine, can be fabricated by 3D printing using bioinks based on cellulose and carbon nanoparticles [51,52]. Both 2D composites and 3D composites can also be created by adding carbon nanoparticles to cultures of cellulose-producing bacteria, such as *Gluconacetobacter xylinus*. These nanoparticles are then incorporated into bacterial nanocellulose in situ during its growth [53–57]. Another approach is via the electrospinning or wet spinning of solutions containing cellulose and carbon nanoparticles [58–60].

Nanocellulose nanocarbon composites exhibit several more advantageous properties than materials containing only cellulose nanoparticles or only carbon nanoparticles. Adding carbon nanoparticles to nanocellulose materials can further increase their mechanical strength [59,61]. At the same time, the presence of nanocellulose promotes the flexibility and stretchability of the materials [52,62,63]; for a review, see [64]. Adding graphene, carbon nanotubes or boron-doped diamond nanoparticles endows nanocellulose materials with electrical conductivity [39,50,57,65,66]. Other advantageous properties of nanocellulose nanocarbon composites include their thermal stability [67–69], tunable thermal conductivity and optical transparency [48,57,70], intrinsic

fluorescence and luminescence [26,71,72] photothermal activity [56], hydrolytic stability [61], nanoporous character and high adsorption capacity [49,61]. Nanocellulose nanocarbon composites can therefore be used in a wide range of industrial and technological applications, such as water purification [22,29,43,49,54,56,61,73–76], the isolation and separation of various molecules [22,74,77–79], energy generation, storage and conversion [21,23,44,47,64,80–85], biocatalysis [86], food packaging [67–69,87], construction of fire retardants [48], heat spreaders [70] and shape memory devices [38,88–90]. These composites are also used as fillers for various materials, usually polymers, in order to improve their mechanical, electrical and other physical and chemical properties [67–69,87,91].

In addition, nanocellulose nanocarbon composites are promising for biomedical applications, though these applications are less frequent than industrial applications. Biomedical applications include radical scavenging [34,92], photothermal ablation of pathogenic bacteria [93], photodynamic and combined chemophotothermal therapy against cancer [35,94], drug delivery [16,28,65,72,95–97], biosensors [31–33,63,66,71,91,98–104], and particularly tissue engineering and wound dressings. Hybrid materials containing nanocellulose and nanocarbons stimulated the growth and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [37,59]. They provided good substrates for the attachment, growth and differentiation of SH-SH5Y human neuroblastoma cells [51] and PC12 neural cells, particularly under electrical stimulation [105]. They enhanced the outgrowth of neurites from rat dorsal root ganglions *in vitro* and stimulated nerve regeneration in rats *in vivo* [106]. They also promoted the growth of vascular endothelial cells, enhanced angiogenesis and arteriogenesis in a chick chorioallantoic membrane model [107], and improved cardiac conduction when applied to surgically disrupted myocardium in dogs [52]. In addition, these materials supported the growth of human dermal fibroblasts [108] and mouse subcutaneous L929 fibroblasts [58,62], promoted wound healing *in vivo* in mice [109] and showed an antibacterial effect [30]. These materials are therefore promising for bone, neural and vascular tissue engineering, for creating cardiac patches and for advanced wound dressings. The biomedical applications of nanocellulose nanocarbon composites are summarized in Table 1.

**Table 1.** Biomedical applications of nanocellulose nanocarbon composites.

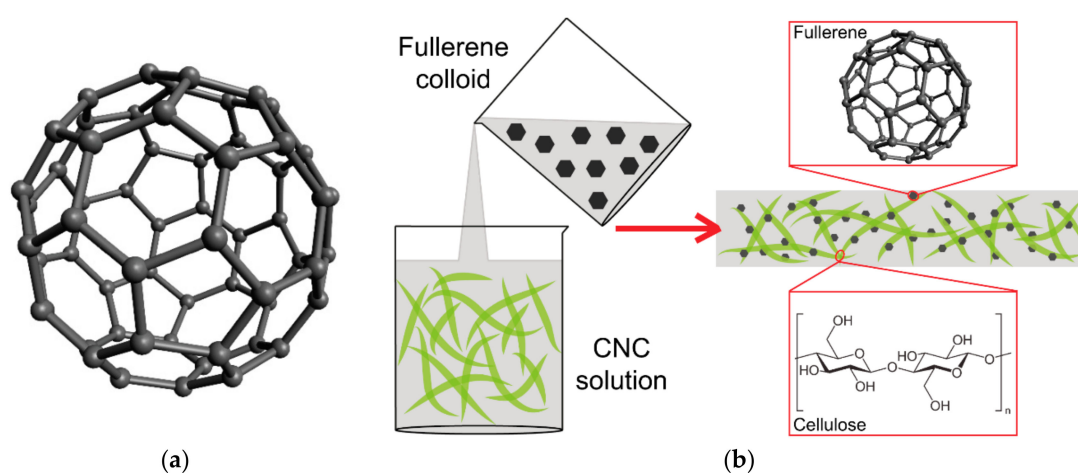
Application	Nanocellulose Nanocarbon Composites Containing:				
	Fullerenes	Graphene	CNTs	Nanodiamonds	Others
Radical scavenging	NH <sub>2</sub> -CNC C <sub>60</sub> [34]; CNC C <sub>60</sub> (OH) <sub>30</sub> [92]				
Photodynamic cancer therapy	TEMPO-oxidized CNC C <sub>60</sub> -NH <sub>2</sub> [35]				
Photothermal, chemo-photothermal therapy		Bacteria: [93]			
		Cancer: [94]			
Drug delivery		Anticancer drugs (doxorubicin) [72,95,96]	Anticancer and other drugs [16]	Anticancer drugs (doxorubicin) [97]	Carbon quantum dots: Anticancer drugs (temozolomide) [28]
(Bio)sensors		Electrochemical: cholesterol [98]; glucose and bacteria [110]; avian leucosis virus [111]; organic liquids [112]	Electrochemical: ATP metabolites [102]; oxygen [84]	Electrochemical: Biotin [66]	Carbon black: Electrochemical aptasensor for <i>S. aureus</i> [32]; electrochemical sensor for H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [33]
		Piezoelectric: strain, human motion [63,99,113]	Piezoresistance and thermoelectric-based: pressure and temperature [103]; pressure [17]; strain, human motion [90,91,114]; humidity, human breath [104]		Carbon black: Strain, human motion [31,33]
	Optical: oxygen and temperature [115]; oxygen [116]	Optical: SERS: bilirubin [100]; Fluorescence: laccase [71] Acoustic: ammonia [101]			Carbon quantum dots: optical sensor for biothiols [26]
Isolation of biomolecules		Histidine-rich proteins, hemoglobin [77]; bovine serum albumin [79]			
Electrical stimulation of tissues			Cardiac tissue [52]; neural tissue [106]		
Tissue engineering (TE)		General cell biocompatibility [68,69,87]; bone TE [37,59]; neural TE [105]; vascular TE [107]	Neural tissue engineering [51]; TE in general [117]		
Wound dressing healing	Polysaccharides fullerene C <sub>60</sub> derivatives [118]	Human dermal fibroblasts in vitro [108]; mouse model in vivo [109]		L929 fibroblasts in vitro [58,62]; HeLa cells in vitro, wound dressings delivering doxorubicin [97]	Activated carbon: antibacterial wound dressing [30]

This review summarizes recent knowledge on the types, properties and applications of nanocellulose nanocarbon-based hybrid materials, particularly in biotechnology, biomedicine and tissue engineering, and reports on the experience acquired by our group.

## 2. Nanocellulose Fullerene Composites

### 2.1. Characterization of Fullerenes

Fullerenes are spheroidal cage-like molecules composed entirely of carbon atoms (Figure 1a). Fullerenes with 60 and 70 carbon atoms ( $C_{60}$  and  $C_{70}$ ) are the most stable molecules, and they are therefore most frequently used in industrial and biomedical applications. Fullerenes were discovered in 1985 by Sir Harold Walter Kroto (1939–2016) and his co-workers Richard Smalley, Robert Curl, James Heath and Sean O'Brien. Kroto, Smalley and Curl were awarded the Nobel Prize in 1996. Fullerenes were named after Richard Buckminster "Bucky" Fuller (1895–1983), an American architect, designer, futurist, inventor, poet and visionary, who designed his geodesic dome on similar structural principles (for a review, see [12,13,18,119,120]). Fullerenes are carbon nanoparticles with diverse biological activities. This is due to the fact that they can act as either acceptors or donors of electrons (for a review, see [121]). The acceptor activity can lead to oxidative damage to cell components, such as DNA, cell membrane, mitochondria and various enzymes, to the activation of inflammatory reactions, and to cell apoptosis. These harmful effects of fullerenes can, however, be utilized for photodynamic therapy against tumors and pathogenic microorganisms (for a review, see [122]). The electron donor activity is associated with quenching oxygen radicals, which can be used in protecting skin against UV irradiation, in anti-inflammatory therapy against osteoarthritis, in cardioprotection during ischemia, in neuroprotection during amyloid-related diseases, damage by alcohol or heavy metals, in obesity treatment and in the treatment of diabetes-related disorders. Due to their structural analogy with clathrin-coated vesicles, fullerenes are also promising candidates for drug and gene delivery (for a review, see [12,13,18,119]).



**Figure 1.** Scheme of fullerene  $C_{60}$  (a) and of the preparation and structure of nanocellulose fullerene composites (b).

However, fullerenes have low solubility in many solvents, especially in water. This is a major drawback for their wider application in biomedical applications. The water solubility of fullerenes can be achieved by functionalizing them with hydrophilic groups, but this approach does not solve problems arising from the aggregation and clustering of fullerenes. In addition, the formation of singlet oxygen, which is needed for photodynamic therapy, decreases after functionalization due to the perturbation of the fullerene system. These problems can be mitigated by the complexation of fullerenes with water-soluble agents, including nanocellulose [35].



## 2.2. Preparation and (Bio)Application of Nanocellulose Fullerene Composites

Cellulose nanocrystals (CNCs) were used to create nanocellulose fullerene composites. These nanocrystals are typically produced by acid hydrolysis of cellulose fibers, employing either sulfuric acid or hydrochloric acid in order to destroy the amorphous regions of the cellulose, while the crystalline segments remain intact. CNCs can have a needle-like or rod-like morphology, and are also referred to as nanowhiskers or nanorods. This morphology is characterized by a high aspect ratio (i.e., high length to diameter ratio), and thus by a relatively large surface area. In addition, CNCs have a wide range of other advantageous properties, such as high mechanical resistance, broad chemical-modifying capacity, renewability, biodegradability and low cytotoxicity [34,35]; for a review, see [2]. From these points of view, CNCs were considered ideal for immobilization of fullerene nanoparticles [92]. A scheme of preparation of nanocellulose fullerene composites is depicted in Figure 1b. Composites of CNCs with fullerenes  $C_{60}$  were prepared by amine functionalization of CNCs and by subsequently grafting  $C_{60}$  onto the surface of amine-terminated CNCs [34]. Conversely, functionalized fullerenes, e.g., polyhydroxylated fullerenes  $C_{60}(OH)_{30}$ , were conjugated with the surface of CNCs [92]. Both of these composites showed a higher radical scavenging capacity *in vitro* than fullerenes alone, and therefore are promising for biomedical application in antioxidant therapies, e.g., as components of skin care products. In the third type of composites, both cellulose nanocrystals and fullerenes were functionalized, i.e., amino-fullerene  $C_{60}$  derivatives were covalently grafted onto the surface of 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxylradical (TEMPO)-oxidized nanocrystalline cellulose [35]. These composites hold promise for photodynamic cancer therapy (Table 1). When these composites were added to the culture medium of human breast cancer MCF-7 cells in the dark, they were taken up by these cells without changes in the cell viability, as revealed by a resazurin assay. However, when irradiated with light, these composites showed dose-dependent toxicity for MCF-7 cells [35].

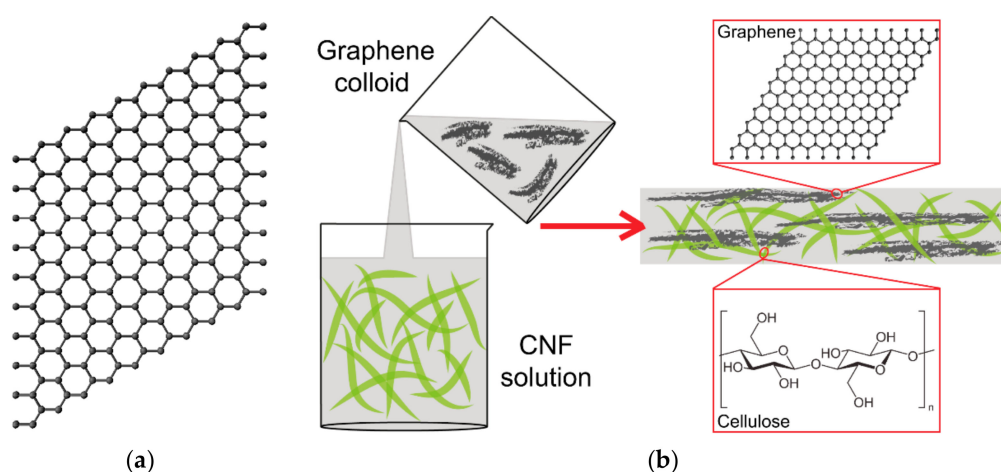
However, fullerenes are less widely used in nanocellulose nanocarbon composites than other carbon allotropes, particularly graphene and carbon nanotubes. More frequently, fullerenes are incorporated into a non-nanostructured cellulose matrix. For example, fullerene  $C_{70}$ , characterized by a strong thermally activated delayed fluorescence at elevated temperatures, which is extremely oxygen sensitive, was incorporated into ethyl cellulose, i.e., a highly oxygen-permeable polymer. This composite was used for construction of an optical dual sensor for oxygen and temperature [115]. An oxygen sensor was constructed using isotopically enriched carbon-13 fullerene  $C_{70}$ , dissolved in an ethyl cellulose matrix [116]. Mixed-matrix membranes, consisting of ethyl cellulose as a continuous matrix and fullerenes  $C_{60}$  as a dispersed phase, were prepared for propylene propane separation [78]. Electrospun cellulose acetate nanofibers reinforced with fullerenes were used in the construction of dry-type actuators [123]. Cellulose impregnated with fullerenes  $C_{60}$  dissolved in *o*-xylene showed greater extraction efficiency for  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  ions from an aqueous environment than the pure polymer [124]. Biocompatible composites containing polysaccharides (cellulose, chitosan and gamma-cyclodextrin) and fullerene derivatives (amino- $C_{60}$  and hydroxy- $C_{60}$ ) were developed for various applications ranging from dressing and treating chronically infected wounds to nonlinear optics, biosensors, and therapeutic agents [118].

## 3. Nanocellulose Graphene Composites

### 3.1. Characterization of Graphene

Graphene is a single layer of  $sp^2$ -hybridized carbon atoms arranged into a two-dimensional honeycomb-like lattice (Figure 2a). In other words, graphene is a one-atom-thick layer of graphite. It is a basic building block for other carbon allotropes, such as fullerenes, carbon nanotubes and graphite. Graphene is a very thin, nearly transparent sheet, but it is remarkably strong (about 100 times stronger than steel), and highly electrically and thermally conductive (for a review, see [19,20,125,126]). Graphene can be prepared by various methods, which can be divided into two main categories, namely the top-down approach and the bottom-up approach. The top-down approaches include treatment of

graphite by mechanical or electrochemical exfoliation, intercalation or sonication, and also nanotube slicing. The bottom-up approaches include growth of graphene from carbon-metal melts, epitaxial growth of graphene on silicon carbide, the dry ice method, and deposition methods such as chemical vapor deposition or dip coating a substrate with graphene oxide (GO), followed by GO reduction (for a review, see [19,20,125,126]). Graphene can be prepared in the form of monolayer or bilayer sheets, nanoplatelets, nanoflakes, nanoribbons and nanoscrolls. Chemically, graphene-based materials include pure graphene sheets, GO or reduced graphene oxide (rGO). Pure graphene sheets can be produced by mechanical exfoliation of graphite or by chemical vapor deposition. GO, a highly oxidative and water-soluble form of graphene, can be obtained by the exfoliation of graphite oxide. Reduced GO can be prepared by chemical, thermal or pressure reduction, and even by bacteria-mediated reduction of GO, which improves its electrical properties (for a review, see [13,18,19,37,125,126]). Graphene and graphene-based materials hold a great promise not only for a wide range of industrial and technology applications, but also for biomedical applications, such as drug, gene and protein delivery, photothermal therapy, construction of biosensors, bioimaging, antimicrobial treatment, and also as scaffolds for tissue engineering (for a review, see [20]).



**Figure 2.** Scheme of graphene (a) and of the preparation and structure of nanocellulose graphene composites (b).

### 3.2. Preparation and Industrial Application of Nanocellulose Graphene Composites

Similarly as in fullerenes, cellulose nanoparticles in the form of nanofibrils and nanocrystals increase the dispersion of graphene nanoparticles in water-based environments and prevent their aggregation without the need to subject them to chemical functionalization [46]. A water-based dispersion is the starting material for fabricating nanocellulose graphene composites (Figure 2b). These composites can be created by filtration [127], filtration combined with hot pressing for fabricating films [128], or by freeze-drying [75] and freeze-casting [48] for fabricating 3D materials, such as aerogels and foams. Other methods are deposition of graphene on a nanocellulose layer [43] and incorporation of graphene into nanocellulose during its biological synthesis by bacteria [54–56].

All forms of nanocellulose and graphene have been used for constructing nanocellulose graphene composites, i.e., CNFs, CNCs, unmodified graphene, GO and rGO. In order to modulate the properties of nanocellulose graphene composites for specific applications, these materials can be further enriched by various substances, such as metallic or ceramic nanoparticles, oxides, carbides, sulfides, vitamin C, synthetic and natural polymers, enzymes and antibodies. For example, nanocellulose graphene composites have high adsorption, filtration and photocatalytic ability, and they are therefore widely used for water purification, e.g., for removing antibiotics [75], dyes [43], heavy metals, such as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Ag}^{+}$  [61,76], or for their bactericidal effect [56]. The water-cleaning capacity of these composites can be further enhanced by introducing additional photocatalytic agents, i.e., palladium

nanoparticles [54] or zinc oxide (ZnO) nanoparticles [73]. An optimized ultrafiltration membrane for water purification was constructed from polyvinylidene fluoride (PVDF), modified by cellulose nanocrystals functionalized with common bactericides, such as dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride, ZnO and GO nanosheets [129]. Another important additive is vitamin C, which reduces the GO in nanocellulose GO composites, increases the surface area of the material and increases pore formation, and thus enhances the capacity of the composites for water purification [49]. A combination of rGO-coated cellulose nanofibers with hydrophobic and oleophilic trimethyl chlorosilane enhanced the adsorption capacity of this composite, which is necessary for effective removal of oil-based pollutants from water [74].

Another important industrial application of nanocellulose graphene composites is in energy storage, generation and conversion. Devices for these purposes include supercapacitors [64,80,130], hydrogen storage devices [131], electrodes for hydrogen evolution reaction [132], lithium ion batteries [133], actuators [81], solar steam generators [82] and electric heating membranes [83]. These devices can be based on pure nanocellulose nanocarbon composites without additives [80–83]. However, they often contain additives such as manganese oxide (MnO), which contributes to faradaic pseudocapacitance in supercapacitors [130] or polypyrrole, which acts as an insulator, but its oxidized derivatives are good electrical conductors [134]. Other additives are palladium or platinum nanoparticles for enhanced hydrogen storage [131], nitrogen-doped molybdenum carbide nanobelts in electrocatalysts for hydrogen evolution reaction [132], and silicon oxide nanoparticles in lithium ion batteries [133].

Other important industrial applications of nanocellulose graphene composites are in the construction of fire retardants, shape memory devices, biocatalysts and materials for food packaging. Super-insulating, fire-retardant, mechanically strong anisotropic foams were produced by freeze-casting suspensions of cellulose nanofibers, GO and sepiolite nanorods, and they performed better than traditional polymer-based insulating materials [48]. Shape memory devices are based on GO CNC thin films and nanomembranes [38,88] or on GO introduced into a nanocellulose paper made of nanofibers extracted from sisal fibers [89]. An example of a biocatalyst is a nanocellulose polypyrrole GO nanocomposite for immobilization of lipase, a versatile hydrolytic enzyme. This biocatalyst was employed for synthesizing ethyl acetoacetate, a fruit flavor compound [86]. Food packaging materials were constructed by filling CNCs and rGO, either separately or in the form of CNC rGO nanohybrids, into poly (lactic acid) (PLA) matrix or in a poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) matrix. These composite materials exhibited better mechanical properties than the pristine polymers, and possessed antibacterial activity. In addition, the composites with CNC rGO nanohybrids performed better than those with a single component nanofiller, i.e., either CNCs or rGO. Due to their antibacterial activity, antioxidant properties and good in vitro cytocompatibility, these composites are also promising for biomedical applications, e.g., as scaffolds for tissue engineering [67–69,87].

### 3.3. Biomedical Application of Nanocellulose Graphene Composites

The biomedical applications of nanocellulose nanographene composites include photothermal ablation of pathogenic bacteria, combined chemo-photothermal therapy against cancer, drug delivery, biosensorics, isolation and separation of various biomolecules, wound dressing and particularly tissue engineering (Table 1).

For photothermal ablation of pathogenic bacteria, a composite paper containing nanocellulose with Au linked to GO using quaternized carboxymethyl chitosan was developed. When excited by near-infrared laser irradiation, the paper generated a rise in temperature of more than 80 °C, sufficient for photothermal ablation, both on Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) and on Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Additionally, the composite paper showed a remarkable enhancement in tensile strength, bursting index and tear index in comparison with the properties of pure nanocellulose paper [93].

For chemophotothermal synergistic therapy of colon cancer cells, dual stimuli-responsive polyelectrolyte nanoparticles were developed by layer-by-layer (LbL) assembly of aminated nanodextran and carboxylated nanocellulose on the surface of chemically modified GO. Tests on the HCT116 human colon cancer cell line revealed that these nanoparticles allowed for the intracellular delivery of curcumin, which was released in response either to acidic environments or to near-infrared excitation [94]. In this context, nanocellulose graphene composites are good candidates as carriers for controlled drug delivery, particularly of anticancer drugs. Systems releasing doxorubicin, a model drug with broad-spectrum anticancer properties, were developed. These systems included nanocomposite carboxymethyl cellulose GO hydrogel beads [95], nanocomposite films made of graphene quantum dots incorporated into a carboxymethyl cellulose hydrogel [72] or macroporous polyacrylamide hydrogels. These hydrogels were prepared using an oil-in-water Pickering emulsion, containing GO and hydroxyethyl cellulose with a quaternary ammonium group [96].

Sensing and biosensing is another important application of nanocellulose graphene composites. These sensors can be divided into electrochemical, piezoelectric, optical and acoustic wave-based sensors. Electrochemical sensors were constructed for detecting cholesterol [98], glucose and pathogenic bacteria [110], avian leucosis virus [111] and organic liquids [112]. The biosensor for detecting cholesterol was based on chemically-modified nanocellulose, grafted with silylated GO and enriched with ZnO nanoparticles in order to enhance its electrical conductivity [98]. The biosensor for detecting glucose and pathogenic bacteria was based on nanocellulose paper coated with GO, reduced by vitamin C and functionalized with platinum nanoparticles with a cauliflower-like morphology in order to enhance the electrical conductivity of the composite. The platinum surface was functionalized either with glucose oxidase (via chitosan encapsulation) or with an RNA aptamer [110]. The biosensor for the avian leucosis virus was an immunosensor, based on graphene-*perylene-3, 4, 9, 10-tetracarboxylic acid* nanocomposites as carriers for primary antibodies, on composites of nanocellulose and Au nanoparticles as carriers for secondary antibodies, and on the alkaline phosphatase catalytic reaction [111]. The sensor for organic liquids, mainly organic solvents, was based on cellulose nanocrystal-graphene nanohybrids, selectively located in the interstitial space between the natural rubber latex microspheres [112].

Piezoelectric nanocellulose graphene-based sensors have usually been designed for strain sensing, i.e., as wearable electronics for monitoring the motion of various parts of the human body, e.g., fingers [63,99,113]. For these purposes, the flexibility and stretchability of nanocellulose was further enhanced by adding other polymers, such as elastomers, represented e.g., by polydimethylsiloxane (PDMS) [113], or hydrogels, represented e.g., by poly(vinyl alcohol) (PVA), crosslinked (together with cellulose nanofibers and graphene) with borax [63].

Optical sensors can be based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) or fluorescence. Cellulose SERS strips decorated with plasmonic nanoparticles, termed graphene-isolated-Au-nanocrystals (GIANs), were developed for constructing portable sensors for detecting complex biological samples, e.g., for detecting free bilirubin in the blood of newborns [100]. A fluorescence sensor, based on sulfur and nitrogen-co-doped graphene quantum dots, immersed into nanocellulosic hydrogels, was developed for detecting laccase. This enzyme is widely used in industrial and technological applications, such as bleaching of fabrics, tooth whitening, decoloration of hair, water purification and in oxidizing dyes in beer, must and wines [71].

An example of an acoustic wave-based sensor is an ammonia sensor, based on a quartz crystal microbalance (QCM) with a sensing coating. This coating is composed of negatively-charged electrospun cellulose acetate nanofibers, positively-charged polyethylenimine and negatively-charged GO, and it was created by the electrostatic LbL self-assembly technique [101].

For protein isolation, a metal affinity carboxymethyl cellulose-functionalized magnetic graphene was prepared by successive modifications of GO nanosheets with magnetic nanoparticles, carboxymethyl cellulose and iminodiacetic acid, and then chelated with copper ions. This composite exhibited high adsorption selectivity toward histidine-rich proteins, which was utilized for isolating hemoglobin from human whole blood, and also for isolating a polyhistidine-tagged recombinant

protein from *Escherichia coli* lysate, namely *Staphylococcus aureus* enterotoxin B [77]. For macromolecular separation, cellulose acetate nanocomposite ultrafiltration membranes were fabricated using 2D layered nanosheets, e.g., GO and exfoliated molybdenum disulfide (MoS<sub>2</sub>), and were successfully tested using macromolecular bovine serum albumin [79].

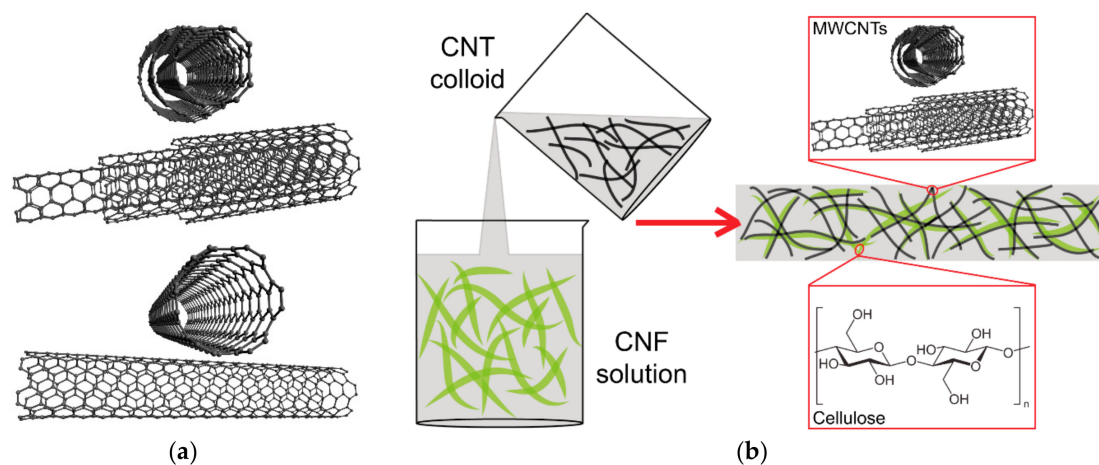
Nanocellulose graphene composites are also important components of tissue engineering scaffolds, improving their mechanical properties and their bioactivity. In the studies by Pal et al. (2017), mentioned above, a PLA CNC rGO nanocomposite film showed antibacterial activity against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and against Gram-negative *Escherichia coli*. At the same time, this film exhibited negligible cytotoxicity against a mouse NIH-3T3 fibroblast cell line, as revealed by an MTT assay of the activity of mitochondrial oxidoreductase enzymes [87]. Nanocomposites of CNCs and rGO, incorporated into PLA matrix through the melt-mixing method, were noncytotoxic and cytocompatible with epithelial human embryonic kidney 293 (HEK293) cells [68]. PLA incorporated with rGO and TEMPO-oxidized CNCs, grafted with poly(ethylene glycol) (PEG), displayed radical scavenging activity and negligible toxicity and cytocompatibility to mouse embryonic C3H10T1/2 cells [69]. A composite film consisting of hydrophilic bacterial cellulose nanofibers and hydrophobic rGO, prepared from GO using a bacterial reduction method, supported the adhesion, viability and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a similar way to standard cell culture polystyrene, and better than pure rGO films [37]. Incorporating GO into electrospun cellulose acetate nanofibrous scaffolds enhanced the adhesion and growth of human umbilical cord mesenchymal stem cells. It also enhanced osteogenic differentiation of these cells, manifested by the activity of alkaline phosphatase, and biomineralization of the scaffolds in a simulated body fluid [59]. Nanofibrous composites of bacterial nanocellulose, a conductive poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT) polymer and GO, mimicking the native extracellular matrix and allowing electrical stimulation of neural PC12 cells, induced specific orientation and differentiation of these cells [105]. Polyvinyl alcohol carboxymethyl cellulose (PVA CMC) scaffolds loaded with rGO nanoparticles, prepared by lyophilization, enhanced the proliferation of EA.hy926 endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo using a chick chorioallantoic membrane model [107]. Polyacrylamide-sodium carboxymethylcellulose hybrid hydrogels reinforced with GO and or CNCs also have potential for tissue engineering applications due to their tunable mechanical properties [135]. Genetically modified hydrophobin, a fungal cysteine-rich protein, was used to connect nanofibrillated cellulose of wood origin and graphene flakes in order to construct biomimetic mechanically-resistant materials similar to nacre and combining high toughness, strength and stiffness [136].

Nanocellulose graphene composites also have great potential for the fabrication of antibacterial textiles and for advanced wound dressing. Antibacterial textiles were prepared by electrospinning a mixture containing cellulose acetate, TiO<sub>2</sub> and GO sheets. These textiles showed high antibacterial activity with an inhibition rate higher than 95% against *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* [137]. Bacterial cellulose is considered as one of the most suitable materials for advanced wound dressing, due to its appropriate mechanical properties, such as strength, Young's modulus, elasticity and conformability, and also due to its great capacity to retain moisture in the wound (for a review, see [2]). These favorable properties can be further enhanced by adding graphene-based materials and by crosslinking with synthetic polymers, such as poly(ethylene glycol), poly(vinyl alcohol), poly(acrylic acid) and poly(acrylamide). In a study by Chen et al. (2019), a bacterial nanocellulose-grafted poly(acrylic acid) GO composite hydrogel was prepared as a potential wound dressing. The inclusion of GO improved the attachment and proliferation of human dermal fibroblasts in cultures on the composites [108]. Similarly, hydroxypropyl cellulose matrix incorporated with GO and silver-coated ZnO nanoparticles showed improved tensile strength, and also anti-ultraviolet, antibacterial and immunostimulatory effects, which promoted wound healing in an in vivo mouse model [109].

## 4. Nanocellulose Carbon Nanotube Composites

### 4.1. Characterization of Carbon Nanotubes

Carbon nanotubes (CNTs; Figure 3a) are tubular structures formed by a single cylindrical graphene sheet (single-walled carbon nanotubes, referred to as SWCNTs or SWNTs) or several graphene sheets arranged concentrically (multiwalled carbon nanotubes, referred to as MWCNTs or MWNTs, which also include double-walled CNTs (DWCNTs [16]), and few-walled CNTs (FWCNTs [17])). Carbon nanotubes were discovered as a by-product of fullerene synthesis, and were first described by Iijima et al. (1991) [138]. CNTs have a high aspect ratio (i.e., length to diameter ratio) and thus a relatively large surface area. Their diameter is on the nanometer scale (e.g., from 0.4 nm to 2–3 nm in single-walled nanotubes), but their length can reach several micrometers or even centimeters. Due to these properties, CNTs are suitable candidates for hydrogen storage, for the removal of contaminants from water and air, and also for drug delivery. CNTs have excellent mechanical properties, mainly due to the  $sp^2$  bonds. The tensile strength of SWCNTs has been reported to be almost 100 times higher than that of steel, while their specific weight is about six times lower. CNTs can therefore be used for reinforcing various synthetic and natural polymers for industrial and biomedical applications, e.g., for hard tissue engineering. When added to a polymer matrix, CNTs can resemble inorganic mineral nanoparticles in the bone tissue, and they can form nanoscale irregularities on the surface of 2D materials and in the pores of 3D materials, which improve the cell adhesion and growth. CNTs are electrically conductive and enable electrical stimulation of cells, which further improves the adhesion, growth and differentiation of cells (for a review, see [10–14,18,139]). However, free CNTs can be cytotoxic, which is attributed to their ability to cause oxidative damage, and also to their contamination with transition metals (e.g., Fe, Ni, Y), which serve as catalysts during CNT preparation. Methods for producing metal-free CNTs have therefore been developed, e.g., arc-discharge evaporation of graphite rods [139].



**Figure 3.** Scheme of multi-walled and single-walled carbon nanotubes (a) and of the preparation and structure of nanocellulose carbon nanotube composites (b).

CNTs also resemble CNFs from the point of view of their morphology and their mechanical properties. For example, highly crystalline, thick CNFs derived from tunicates exhibited mean strength of 3–6 GPa, which was comparable with commercially available MWCNTs. However, the mean strength of other types of CNFs is lower; for example, in wood-derived CNFs the mean strength ranged from 1.6 to 3 GPa [140]. CNTs therefore improve the mechanical strength of nanocellulose CNT composites, and endow them with electrical conductivity, similarly as graphene. As a result, nanocellulose CNT composites are used in similar industrial and biomedical applications as nanocellulose graphene composites, e.g., water purification, energy generation, storage and conversion, filling polymeric materials, constructing sensors and biosensors, drug delivery, cancer treatment, electrical stimulation of tissues, and tissue engineering.

#### 4.2. Preparation and Industrial Application of Nanocellulose CNT Composites

The nanocellulose component in the nanocellulose CNT composites is used in the form of nanofibrils and nanocrystals, and carbon nanotubes usually in the form of SWCNTs or MWCNTs. Similarly as in composites containing graphene and other carbon allotropes, cellulose nanoparticles facilitate the homogeneous dispersion of CNTs in aqueous environments (Figure 3b), where the two types of nanoparticles are linked by noncovalent interactions, e.g., hydrophobic and electrostatic interactions [42,46]. The dispersion of CNTs can be further facilitated by TEMPO-mediated oxidation of cellulose nanoparticles, which endows them with abundant anionic carboxyl groups [141]. Other ways include the functionalization of CNTs with self-assembling amphiphilic glycosylated proteins [142] or the use of oil-in-water Pickering emulsions of cellulose nanoparticles [143]. From the aqueous dispersions, 2D and 3D nanocellulose CNT composites can be formed, e.g., by vacuum filtration, centrifugal cast molding, foam forming, casting and printing [39,45,50,141]. Pickering emulsions of cellulose nanocrystals and SWCNTs or MWCNTs were used for fabricating aerogels and foams by freeze-drying [143]. Similarly as in nanocellulose graphene composites, CNTs can be added to cultures of bacteria producing nanocellulose, and incorporated into the bacterial nanocellulose during its growth [53,57]. Composite nanocellulose SWCNT films can be transparent or semitransparent [39,45,141], and can transmit radiant energy [144].

Like nanocellulose graphene composites, nanocellulose CNT composites can be combined with various atoms, molecules and nanoparticles in order to enhance their properties for specific applications. For example, Ag nanoparticles attached to the surface of MWCNTs influenced the electrochemical properties of CNT-based films developed on a bacterial nanocellulose membrane [36]. Nanocellulose and CNTs can be also used as additives to various hybrid materials. For example, a hybrid material, created by combination of poly (3,4-ethylenedioxythiophene)-poly (styrenesulfonate) (PEDOT:PSS), silver nanoparticles (AgNPs), CNTs and a nanocellulose layer, was used for constructing a tactile sensor [103]. Incorporation of polypyrrole-coated CNTs into chemically cross-linked CNC aerogels created promising materials for flexible 3D supercapacitors [145]. A combination of cellulose acetate, chitosan and SWCNTs with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{TiO}_2$  in electrospun nanofibers enables combined removal of  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ , methylene blue and Congo red from aqueous solutions via the adsorption and photocatalytic reduction processes [146].

Energy-related applications of nanocellulose CNT composites include biofuel cells, varactors, supercapacitors, and electrodes for lithium batteries, thermoelectric generators for heat-to-electricity conversion or for constructing heating elements [50]. A biofuel cell comprising electrodes based on supercapacitive materials, i.e., on CNTs and a nanocellulose polypyrrole composite, was utilized to power an oxygen biosensor. Laccase, immobilized on naphthylated MWCNTs, and fructose dehydrogenase, adsorbed on a porous polypyrrole matrix, were used as cathode and anode bioelectrocatalysts, respectively [84]. Another biofuel cell was based on a conductive MWCNT network, developed on a bacterial nanocellulose film, and functionalized with redox enzymes, including pyroquinoline quinone glucose dehydrogenase (anodic catalyst) and bilirubin oxidase (cathodic catalyst). This system generated electrical power via the oxidation of glucose and the reduction of molecular oxygen [44]. Microelectromechanical system varactors, i.e., voltage-controlled capacitors, consisted of a freestanding SWCNT film, which was employed as a movable component, and a flexible nanocellulose aerogel filling [85]. Supercapacitors with high physical flexibility, desirable electrochemical properties and excellent mechanical integrity were realized by rationally exploiting the unique properties of bacterial nanocellulose, CNTs, and ionic liquid-based polymer gel electrolytes [147]. Other flexible 3D supercapacitor devices were fabricated by incorporating polypyrrole nanofibers, polypyrrole-coated CNTs, and manganese dioxide ( $\text{MnO}_2$ ) nanoparticles in chemically cross-linked cellulose nanocrystal aerogels [145]. Electrospun core-shell nanofibrous membranes, containing CNTs stabilized with cellulose nanocrystals, were developed for use as high-performance flexible supercapacitor electrodes with enhanced water resistance, thermal stability and mechanical toughness [40]. Electrodes for lithium batteries were based on freestanding

LiCoO<sub>2</sub> MWCNT cellulose nanofibril composites, fabricated by a vacuum filtration technique [148], or on freestanding CNT-nanocrystalline cellulose composite films [41]. Thermoelectric generators for heat-to-electricity conversion were based on large-area bacterial nanocellulose films with an embedded dispersed CNT percolation network, incorporated into the films during nanocellulose production by bacteria in culture [57]. Electrical energy can also be converted into thermal energy, as demonstrated by the composite structure of wood-derived nanocellulose, MWCNTs and pulp, designed for a heating element application [50].

#### 4.3. Biomedical Application of Nanocellulose CNT Composites

Biomedical applications of composites of cellulose and CNTs are summarized in Table 1. These composites are important systems for drug delivery. The CNTs in the composites can be conjugated with many therapeutics, usually anticancer drugs, but also other types of drugs. For example, an osmotic pump tablet system coated with cellulose acetate membrane containing MWCNTs was developed for delivery of indomethacin (for a review, see [16,65]). Cancer cells can be killed by nanocellulose-CNT dispersions even without the presence of anticancer drugs. For example, nonmercerized type-II cellulose nanocrystals in dispersions with SWCNTs displayed cytotoxicity for human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells, but they enhanced the mitochondrial metabolism of normal cells [149].

Construction of sensors and biosensors is another important application of nanocellulose CNT composites useful for (bio) technology and medicine. A tactile piezoresistance and thermoelectric-based sensor, mentioned above, which is capable of simultaneously sensing temperature and pressure, is fabricated from TEMPO-oxidized cellulose, PEDOT:PSS, AgNPs and CNTs [103]. Another pressure sensor was developed using aerogels consisting of plant cellulose nanofibers and functionalized few-walled CNTs [17]. Highly conductive and flexible membranes with a semi-interpenetrating network structure, fabricated from MWCNTs and cellulose nanofibers, showed the electrical features of capacitive pressure sensors and were promising for various electronics applications, e.g., touch screens [150]. Advanced flexible strain sensors for controlling the human body motion were fabricated by pumping hybrid fillers consisting of CNTs CNCs into porous electrospun thermoplastic polyurethane membranes [91]. Other strain sensors were fabricated by a facile latex assembly approach, in which CNCs played a key role in tailoring the percolating network of conductive natural rubber CNT composites [114]. A water-responsive shape memory hybrid polymer, based on a thermoplastic polyurethane matrix crosslinked with hydroxyethyl cotton cellulose nanofibers and MWCNTs, was also developed for constructing a strain sensor [90]. A flexible and highly sensitive humidity sensor, capable of monitoring human breath, was based on TEMPO-oxidized nanofibrillated cellulose and CNTs [104]. An electrochemical biosensor for three adenosine triphosphate (ATP) metabolites, namely uric acid, xanthine and hypoxanthine, was based on a composite of NH<sub>2</sub>-MWCNT black phosphorene AgNPs, dispersed in carboxymethyl cellulose [102]. Another electrochemical molecularly-imprinted sensor was based on a nanofibrous membrane prepared by the electrospinning technique from cellulose acetate, MWCNTs and polyvinylpyrrolidone, and was used for determining ascorbic acid [151]. An oxygen biosensor powered by a biofuel cell containing MWNCTs, a nanocellulose polypyrrole composite, laccase and fructose dehydrogenase, was mentioned above [84]. Versatile wearable textile sensors, e.g., for gas sensing, were produced from cellulose nanofibers extracted from tunicates, homogeneously composited with SWCNTs, by wet spinning in an aligned direction [60].

Other important biomedical applications of nanocellulose CNT composites are in electrical stimulation of cells and tissues in order to improve their regeneration and function, and in tissue engineering. For example, stretchable, flexible and electrically conductive biopatches for restoring conduction in damaged cardiac regions and for preventing arrhythmias were prepared. These patches were based on nanofibrillated cellulose SWCNT ink three-dimensionally printed onto bacterial nanocellulose. They restored cardiac conduction after its disruption by a surgical incision made in the ventricular part of the heart in experimental dogs [52]. For neural tissue stimulation, multiblock

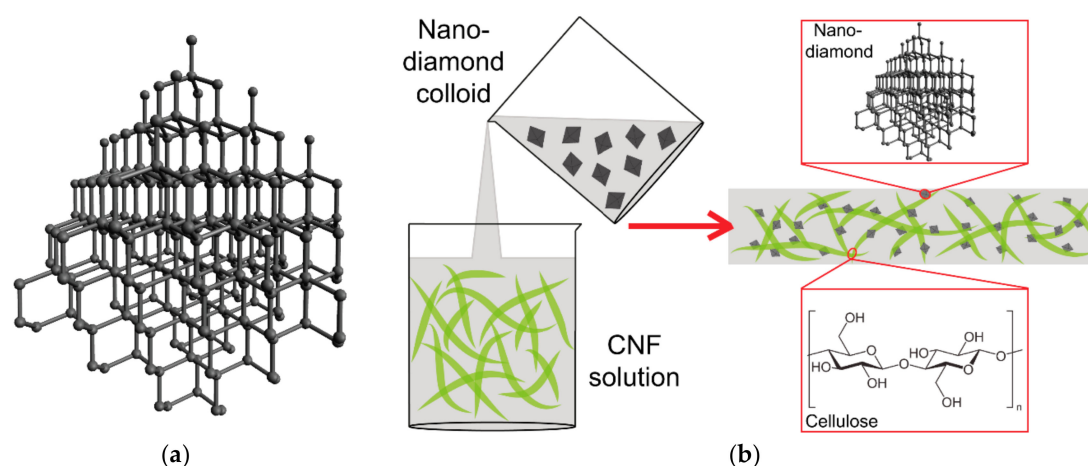


conductive nerve scaffolds with self-powered electrical stimulation were prepared. These scaffolds were based on polypyrrole bacterial nanocellulose composites with platinum nanoparticles on the anode side for glucose oxidation, and nitrogen-doped CNTs on the cathode side for oxygen reduction. These scaffolds enhanced the elongation of neurites outgrowing from rat dorsal root ganglions *in vitro* and stimulated nerve regeneration in a rat sciatic nerve gap model *in vivo* in comparison with composites containing only polypyrrole and bacterial nanocellulose. These scaffolds could replace the metal needles that are currently used for external electrical stimulation of neural tissue, which may cause pain and a risk of infection [106]. 3D printing was also used for creating scaffolds based on a conductive ink composed of wood-derived CNFs and SWCNTs. These scaffolds were intended for neural tissue engineering for experimental brain studies, and supported the attachment, growth and viability of human neuroblastoma SH-SH5Y cells [51]. Other scaffolds for tissue engineering consisted of electrospun cellulose acetate nanofibers, assembled with positively-charged chitosan and negatively-charged MWCNTs via an LbL technique. These scaffolds promoted the adsorption of cell adhesion-mediating molecules from the serum supplement of the culture medium and the adhesion and growth of mouse subcutaneous L929 fibroblasts [117]. Our own results related to the potential application of nanocellulose CNT composites as scaffolds for tissue engineering are reported in Appendix A.

## 5. Nanocellulose Nanodiamond Composites

### 5.1. Characterization of Nanodiamond

Diamond is an allotrope of carbon, consisting of carbon atoms arranged in a cubic crystal structure covalently bonded in  $sp^3$  hybridization (Figure 4a). Like all nanostructured materials, nanodiamonds or diamond nanoparticles are defined as features not exceeding 100 nm in at least one dimension, although some larger diamond particles, i.e., 125–210 nm, are still referred to as nanodiamonds (for a review, see [152]). At the same time, the size of ultrananocrystalline diamond particles is 3–5 nm [153,154]. Diamond nanoparticles can be prepared by various methods. The most widely used techniques are detonation of carbon-containing explosives in an oxygen-deficit environment and microwave-enhanced plasma chemical vapor deposition (MECVD). Other techniques include the radiofrequency plasma-assisted chemical vapor deposition (PACVD) method, milling of diamond microcrystals, hydrothermal synthesis, ion bombardment, laser bombardment, ultrasound synthesis and electrochemical synthesis (for a review, see [10,152–156]). Nanodiamonds are considered to be the most advanced carbon materials in the world. This is due to their excellent mechanical, optical, electrical, thermal and chemical properties. The mechanical properties of nanodiamonds include the highest hardness of all materials on earth, a high Young's modulus, high fracture toughness, high pressure resistance and a low friction coefficient. Their optical properties include transparency, high optical dispersion, and their ability to display various colors and to emit intrinsic luminescence (fluorescence), which is due to defects in the diamond lattice or contamination of the lattice with foreign atoms, such as N, B, H, Ni, Co, Cr or Si. Regarding their electrical properties, nanodiamonds can act as good insulators in their pristine state and as semiconductors after doping, usually with boron. Their thermal properties include superior thermal conductivity and low thermal expansion. The chemical properties of nanodiamonds include low chemical reactivity and resistance to liquid- and gas-phase oxidations. However, nanodiamonds can be doped with various atoms, and their surface can be functionalized by various atoms, chemical groups and (bio)molecules ([152,153,157,158]; for a review, see [10–15,155]).



**Figure 4.** Scheme of a nanodiamond (a) and of the preparation and structure of nanocellulose nanodiamond composites (b).

### 5.2. Preparation and (Bio)Application of Nanocellulose Nanodiamond Composites

There is greater use of diamond nanoparticles than of fullerenes in nanocellulose nanocarbon composites, but diamond nanoparticles are used less than graphene and carbon nanotubes. This may be because a nanodiamond is more expensive and is electrically nonconductive in its pristine state. In composites with nanofibrillated cellulose (Figure 4b), a nanodiamond was used for constructing highly thermally conductive, mechanically resistant and optically transparent films with potential application as lateral heat spreaders for portable electronic equipment [70]. A highly mechanically resistant and optically transparent nanopaper was made of cationic CNFs and anionic nanodiamond particles by filtration from a hydrocolloid and subsequent drying [159]. Moreover, a diamond can be rendered electrically semiconductive by doping it with boron, and then can be used for constructing biosensors. For example, a sensor for biotin was developed by the adsorption of captavidin, a nitrated avidin with moderate affinity to biotin, on a carboxymethylcellulose layer stabilized on a boron-doped diamond electrode by a Nafion film. This biosensor was used for analyzing biotin in blood plasma [66] (Table 1).

The reinforcing effect of diamond nanoparticles, coupled with their optical transparency, has also been used advantageously for other biomedical applications, particularly for wound dressing. Nanocellulose nanodiamond composites are more mechanically resistant than purely nanocellulose-based materials, but they retain their flexibility and stretchability. In addition, their optical transparency enables direct inspection of wounds without the need to remove the dressing. For example, incorporating diamond nanoparticles in a concentration of 2 wt % into chitosan bacterial nanocellulose composite films resulted in a 3.5-fold increase in the elastic modulus of these films. These composite films were transparent, but their transparency can be modulated by the concentration of diamond nanoparticles, turning them gray and semitransparent at higher nanodiamond concentrations (3 and 4 wt %). The viability of mouse subcutaneous L929 fibroblasts in cultures on these films, evaluated by an MTT test of the activity of cell mitochondrial enzymes, was more than 90% at 24 h after seeding. However, at 48 h, it had dropped to about 75%, which indicated that diamond nanoparticles are slightly cytotoxic [62]. A similar result was obtained on L929 fibroblasts grown on electrospun composite nanofibrous mats containing chitosan, bacterial cellulose and 1–3 wt % medical-grade nanodiamonds [58]. The viability of these cells, estimated by the MTT assay, dropped from approx. 90% on day 1 to approx. 75% on day 3. Nevertheless, the addition of nanodiamonds facilitated the electrospinning process, reduced the diameter of the nanofibers in the mats, regulated the water vapor permeability of the mats, enhanced their hydrophilicity and improved their mechanical properties to a similar level as in native skin [58].

Adding diamond nanoparticles per se did not significantly increase the antibacterial activity of chitosan bacterial nanocellulose composites [62]. This activity can be further enhanced, e.g., by

adding silver nanoparticles [160]. Nanocellulose nanodiamond composites can also act as a suitable platform for drug delivery. This was demonstrated on transparent doxorubicin-loaded carboxylated nanodiamonds cellulose nanocomposite membranes, which are promising candidates for wound dressings. These membranes are porous, transparent, with appropriate mechanical properties, and without doxorubicin they are noncytotoxic for HeLa cells [97].

## 6. Composites of Nanocellulose with Other Carbon Nanoparticles

In addition to fullerenes, graphene, nanotubes and nanodiamonds, other important carbon nanoparticles used in industrial, biotechnological and biomedical applications include carbon nanofibers, carbon quantum dots and nanostructures formed by activated carbon and carbon black. All these nanomaterials can be used in nanocellulose nanocarbon composites. The biomedical applications of these composites are summarized in Table 1.

### 6.1. Composites of Nanocellulose and Carbon Nanofibers

Carbon nanofibers can be created by carbonization of cellulose nanofibers originating from bacterial nanocellulose [21,23,161], urea [161], filter paper [162] or plant-derived cellulose [22,24]. Another method of preparing carbon nanofibers is chemical vapor deposition (CVD; [25]). These carbon nanofibers can be further combined with other carbon nanoparticles, mainly graphene. For example, a composite paper consisting of nitrogen-doped carbon nanofibers, reduced graphene oxide (rGO) and bacterial cellulose was designed as a high-performance, mechanically tough, and bendable electrode for a supercapacitor. The bacterial nanocellulose in this paper is exploited both as a biomass precursor for the creation of carbon nanofibers by pyrolysis and as a supporting substrate for the newly-created material [21]. In another study, highly conductive freestanding cross-linked carbon nanofibers, derived from bacterial cellulose in a rapid plasma pyrolysis process, were used as substrates for the growth of vertically-oriented graphene sheets for constructing alternating current filtering supercapacitors [23]. A small amount of rGO can also act as an effective initiator of carbonization of cellulose nanofibers through microwave treatment [24]. Carbonization of aerogels, prepared from a mixture of PVA, cellulose nanofibers and GO by freeze-drying, enhanced the hydrophobic properties, the specific surface area and the adsorption capacity of these aerogels. These materials then became suitable candidates for oil-water separation and environmental protection [22]. In addition to graphene, cellulose-derived carbon nanofibers can be combined with various other nanoparticles and nanostructures, such as Pt nanoparticles for methanol oxidation reaction [161], TiO<sub>2</sub> films and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for lithium ion batteries [162], tin oxide (SnO) nanoparticles for lithium-sulfur batteries [163] or NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> nanoparticles for hydrogen evolution reaction [164]. Carbon nanofibers are also promising for biomedical applications, particularly bone tissue engineering. Their nanoscale diameter produced a nanoscale surface roughness of their compacts or of their composite with poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA). This nanoroughness promoted preferential adhesion of osteoblasts from other cell types, particularly fibroblasts, which could prevent fibrous encapsulation of bone implants [25].

### 6.2. Composites of Nanocellulose and Carbon Quantum Dots

Carbon quantum dots (CQDs) are quasispherical carbon nanoparticles (less than 10 nm in diameter) with a chemical structure and physical properties similar to those of graphene oxide. These nanoparticles emit a strong wavelength-dependent fluorescence. By changing the CQD size, the color of the emitted light can be tuned from deep ultraviolet to visible and near-infrared light. In addition, the fluorescence of CQDs, and also their water solubility, can be further modulated by functionalizing their surface with various atoms, chemical functional groups and molecules, such as metals, carboxyl groups, organic dyes and polymers. CQDs present good photostability, low photobleaching and relatively low cytotoxicity, and they are therefore considered to be suitable for biomedical applications such as bioimaging, biosensing, photodynamic and photothermal therapy of cancer, and drug delivery [165].

In hybrid materials with nanocellulose, CQDs were applied for constructing biosensors and drug delivery systems, and also for water purification. An optical sensor for visual discrimination of biothiols was based on a bacterial cellulose nanopaper substrate with ratiometric fluorescent sensing elements. These elements included N-acetyl L-cysteine capped green cadmium telluride (CdTe) quantum dots-rhodamine B and red CdTe quantum dots-carbon dots [26]. Hybrid materials containing carbon quantum dots and cellulose are also promising carriers for drug delivery. Composite core shell chitosan-poly (ethylene oxide)-carbon quantum dots carboxymethyl cellulose-poly(vinyl alcohol) nanofibers were prepared through coaxial electrospinning as a biodegradable implant for local delivery of temozolomide (TMZ), an anticancer drug. When tested in vitro, the antitumor activity of TMZ conjugated with carbon quantum dots against the tumor U251 cell lines was higher than the activity of the free drug [28]. Last but not least, carbon quantum dots, homogeneously dispersed together with magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in electrospun cellulose nanofibers, were promising for the removal of Hg(II) ions from water [27].

### 6.3. Composites of Nanocellulose and Activated Carbon

Activated carbon is a form of carbon processed to have small, low-volume pores that increase the surface area, which is then available for the adsorption and removal of various toxic contaminants and microorganisms. Composite membranes consisting of a bilayer of porous activated carbon and TEMPO-oxidized plant-derived CNFs showed high capability for removing *Escherichia coli* from water [29]. Activated carbon was also a component of a wound dressing material consisting of a polyvinyl alcohol and cellulose acetate phthalate polymeric composite film, reinforced with Cu Zn bimetal-dispersed activated carbon micro nanofibers. This material suppressed the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, the most prevalent bacteria in infected wounds caused by burns, surgery and traumatic injuries [30].

### 6.4. Composites of Nanocellulose and Carbon Black

Carbon black is a form of paracrystalline carbon, produced industrially by partial combustion or thermal decomposition of gaseous or liquid hydrocarbons under controlled conditions. Carbon black has a high surface-area-to-volume ratio, though not so high as that of activated carbon. Although it is considered to have low toxicity, the International Agency for Research on Cancer has classified it as possibly carcinogenic to humans. In addition, as a component of environmental pollution, carbon black can cause oxidative damage and an inflammatory reaction, which further mediate genotoxicity, reproductive toxicity, neurotoxicity and diseases of the respiratory and cardiovascular systems [166,167]. Nevertheless, carbon black is currently used as a filler in tires and in other rubber products, and as a pigment in inks, paints and plastics.

Composites of nanocellulose and carbon black have been used mainly for constructing biosensors, particularly wearable sensors for strain and human body motion, e.g., motion of the fingers, the elbow joint and the throat. A strain-sensing device with excellent waterproof, self-cleaning and anticorrosion properties was based on a superhydrophobic electrically conductive paper. This paper fabricated by dip-coating a printing paper into a carbon black carbon nanotube methyl cellulose suspension and into a hydrophobic fumed silica suspension [33]. Another strain-sensing device was fabricated by printing carbon black conductive nanostructures on cellulose acetate paper. At the same time, this material had electrochemical properties promising for the detection of hydrogen peroxide [31]. An electrochemical aptasensor for detecting *Staphylococcus aureus*, e.g., in human blood serum, was designed as a nanocomposite of Au nanoparticles, carbon black nanoparticles and cellulose nanofibers, and was endowed with a thiolated specific *S. aureus* aptamer as a sensing element [32].

## 7. Potential Cytotoxicity and Immunogenicity of Nanocellulose Nanocarbon Composites

The vast majority of studies dealing with potential biomedical applications of nanocellulose nanocarbon composites have reported no cytotoxicity or negligible cytotoxicity

of these composites, namely of nanocellulose fullerene composites [35], nanocellulose graphene composites [68,69,72,87,107], nanocellulose CNT composites [51,149] and nanocellulose nanodiamond composites [58,62,97]. Composites containing other carbon nanoparticles, such as activated carbon nanoparticles [30] or carbon quantum dots [28] have also shown no significant cytotoxic effects. In the mentioned studies, cytotoxicity was mainly tested *in vitro* on various cell types, such as fibroblasts, epithelial and endothelial cells, and mainly on cell lines, including tumor cell lines. The cell viability and proliferation were usually evaluated by tests of the activity of mitochondrial enzymes, such as MTT assay, resazurin (Alamar Blue) assay, or by a direct microscopic examination of the cells. Some composites have also been tested *in vivo*, e.g., in a rat model (nanocellulose CNT composites; [106]), a canine model (nanocellulose CNT composites; [52]), or using a chick chorioallantoic membrane model (nanocellulose graphene composites, [107]), without adverse effects.

However, the individual components of nanocellulose nanocarbon composites, particularly carbon nanoparticles, can act as cytotoxic, if they are not bound to any matrix and are free to move. Graphene and graphene-based carbon nanomaterials, such as fullerenes and nanotubes, are hydrophobic in their pristine state, and can enter into hydrophobic interactions with cholesterol in the cell membrane, which can be extracted from the membrane. In this manner, carbon nanoparticles can damage cells even without penetrating them. Another mechanism of cell membrane damage is the generation of reactive oxygen species (ROS) by carbon nanoparticles. In addition, the nanoparticles can penetrate the cell membrane, and can cause oxidative damage to mitochondria, and can also enter the cell nucleus and act as genotoxic agents (for a review, see [10,12,19,20]). Nanodiamonds have been considered to be relatively nontoxic in comparison with other carbon nanoparticles. However, as shown in our earlier studies, hydrophobic, hydrogen-terminated and positively-charged diamond nanoparticles can enter the cells, impair their growth and cause cell death [152,156]. The mechanism of cell damage by nanodiamonds is by generating ROS, and by excessive delivery of sodium ions adsorbed on the nanodiamond surface [168]. Last but not least, carbon nanoparticles can be immunogenic, i.e., they can activate inflammatory reactions, which can be, as has been demonstrated on carbon black, the main pathogenic mechanism of respiratory, cardiovascular and other serious diseases [166,167].

Cellulose nanoparticles, which are generally considered to be biocompatible [34,114] and of a low ecological toxicity [169], can also act as cytotoxic and immunogenic. It has even been speculated that, due to their high aspect ratio and stiffness, CNCs may cause similar pulmonary toxicity as carbon nanotubes and asbestos [170]. In a mouse model, cellulose nanocrystals induced oxidative stress, caused pulmonary inflammation and damage, increased levels of collagen and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in lungs, and impaired pulmonary functions [170]. In addition, these effects were markedly more pronounced in female mice than in male mice. The immunogenicity of CNCs was also proven *in vitro*. CNCs and their cationic derivatives CNC-aminoethylmethacrylate and CNC-aminoethylmethacrylamide evoked an inflammatory response in mouse macrophage J774A.1 cells and in peripheral blood mononuclear cells by increasing the level of ROS in mitochondria, the release of ATP from mitochondria and by stimulating the secretion of interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) [171]. The cytotoxicity and immunogenicity of CNCs depend on the preparation conditions and are increased under harsh and caustic conditions, e.g., the so-called mercerization process, i.e., an alkali treatment [149]. CNFs can also cause cytotoxicity and oxidative damage, which can be even more pronounced than in the case of CNCs, and can evoke an inflammatory response (for a review, see [2,172]). The potential cytotoxicity and immunogenicity of nanocellulose, nanocarbon and their composites should therefore be taken into account when they are for use in biomedical applications.

## 8. Conclusions

Nanocellulose nanocarbon composites and other hybrid materials containing cellulose nanoparticles (nanofibrils or nanocrystals) and carbon nanoparticles (fullerenes, graphene, carbon nanotubes, nanodiamonds and other carbon nanoparticles) are novel materials that are promising for a wide range of applications in industry, (bio)technology and medicine. This is due to their unique

properties, such as high mechanical strength coupled with flexibility and stretchability (composites with graphene, carbon nanotubes and nanodiamond), shape memory (composites with graphene and carbon nanotubes), photodynamic and photothermal activity (composites with fullerenes and graphene), electrical conductivity (composites with graphene and carbon nanotubes), semiconductivity (composites with boron-doped diamond), thermal conductivity (composites with graphene and nanodiamonds), tunable optical transparency (composites with single-walled carbon nanotubes and nanodiamonds), intrinsic fluorescence and luminescence (composites with graphene quantum dots and carbon quantum dots), and high adsorption and filtration capacity (composites with graphene, carbon nanotubes and carbon quantum dots). These properties arise mainly from the advantageous combination of nanocellulose and nanocarbon, which associates and enhances the desirable effects of each of these components. These materials can be prepared relatively easily from a water-based suspension, which is advantageous particularly for biomedical applications. These applications include drug delivery, biosensors, isolation of various biomolecules, electrical stimulation of damaged tissues, and particularly tissue engineering (bone, neural and vascular) and wound dressing. Our results have proven supportive effects of nanocellulose carbon nanotube composites on the adhesion and growth of human and porcine adipose tissue-derived stem cells, particularly under dynamic cultivation in a pressure-generating lab-made bioreactor (see Appendix A). However, it should be pointed out that the biomedical applications of nanocellulose nanocarbon composites are associated with the risk of their potential cytotoxicity and immunogenicity, although this risk appears to be lower than for the single components of these materials.

**Author Contributions:** All authors have read and agree to the published version of the manuscript. Conceptualization, L.B., S.S. and A.S.; methodology, J.P., M.T., R.M., J.S., S.P., A.S., S.S.; software, R.M., J.S., A.B.; validation, L.B., R.M.; formal analysis, L.B., A.B., A.S., S.S.; investigation, J.P., M.T., R.M., J.S., S.P., A.S., S.S.; resources, L.B., P.K.; data curation, J.P., R.M., A.B., A.S.; writing—original draft preparation, L.B., J.P., R.M.; writing—review and editing, A.B., A.S., S.S., P.K.; visualization, J.P., M.T., R.M., A.B.; supervision, L.B., P.K.; project administration, L.B.; funding acquisition, L.B.

**Funding:** This research was funded by the Czech Science Foundation (grant no. 17-00885S). Another support was provided by the BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University project (CZ.1.05 1.1.00 02.0109), funded by the European Regional Development Fund.

**Acknowledgments:** Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript. Panu Lahtinen from VTT (Technical Research Center of Finland, Espoo, Finland) is acknowledged for providing nanocellulose for collaborative work between Tampere University of Technology and Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## Appendix A

In our own experiments, we have contributed to the knowledge on potential biomedical applications of nanocellulose carbon nanotube composites, namely regarding their application in tissue engineering. In these experiments, a PurCotton cellulose mesh (Winner Industrial Park, Shenzhen, China) was modified with an aqueous dispersion of positively-charged (i.e., cationic) wood-derived CNFs, described in our earlier review article [2], and MWCNTs. Two types of composite samples were prepared, namely the samples with “thick” and “thin” coating of the fibers in the cellulose mesh. For thick coating, square-shaped samples of the cellulose mesh were fully immersed in an aqueous suspension of CNFs MWCNTs, and during this immersion, the samples were homogeneously impregnated with the nanoparticles. For thin coating, only one corner of the cellulose samples was submerged into the CNF MWCNT suspension, which resulted in infiltration of the suspension throughout the cellulose mesh by capillary forces. Both types of samples were then dried for 5 h at 60 °C. Both types of samples displayed a grayish color, which was more intense in samples with a thick coating. A pure CNF coating was prepared similarly to the thick coatings, and the meshes without coating were used as a control.

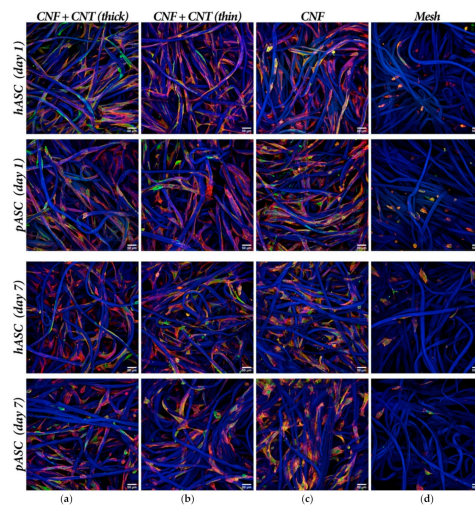
The samples were sterilized by UV light (20 min for each side), fixed into CellCrowns inserts (Sca dex Ltd., Tampere, Finland), placed into 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) and seeded with human adipose tissue-derived stem cells (hASC) or porcine adipose tissue-derived stem cells (pASC). Human ASC were isolated from subcutaneous fat tissue, obtained by liposuction from the abdominal region of healthy female donors after their informed consent, under ethical approval issued by the Ethics Committee of Hospital "Na Bulovce" in Prague, and in compliance with the tenets of the Declaration of Helsinki on experiments involving human tissues. The isolation was described in more details in our earlier studies [173,174]. Porcine ASC were isolated by enzymatic disintegration of subcutaneous fat tissue samples obtained by excision from laboratory pigs in collaboration with the Institute of Clinical and Experimental Medicine (IKEM) in Prague, Czech Republic. Characterization of cells by flow cytometry revealed the positivity of cells for standard surface markers of ASCs, namely CD105, CD90, CD73 and CD29 in hASC, and CD105, CD90, CD29 and CD44 in pASCs. The ASCs from both species were negative or almost negative for hematopoietic markers, such as CD34 and CD45, and for CD31, an endothelial marker [174,175].

The cells were seeded on the material samples at a density of 50,000 cells per well into 1.5 mL of the culture media. Human ASCs were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) with 10% of fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Gibco), 40 µg/mL of gentamicin (LEK, Ljubljana, Slovenia) and 10 ng/mL of recombinant human fibroblast growth factor basic (FGF2; GenScript, Piscataway, NJ, USA). Porcine ASCs were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's Medium (Low glucose, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and Ham's Nutrient Mixture F12 medium (DMEM F 12, Sigma-Aldrich Co.) in a ratio of 1:1 with 10% of fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Gibco), 1% Antibiotic Antimycotic solution (Sigma-Aldrich Co.) and 10 ng/mL of recombinant human fibroblast growth factor basic (FGF2; GenScript).

After one or seven days of cultivation, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Co.) for 20 min, and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) was applied for 20 min at room temperature in order to permeabilize the cell membranes. Nonspecific binding sites for antibodies were then blocked by a solution of 1% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20 in PBS (all Sigma-Aldrich Co.). Vinculin, a protein of focal adhesion plaques associated with integrin adhesion receptors, was visualized by treating the samples for 1 h at 37 °C with primary antibody against human vinculin (V9131, monoclonal mouse antibody, clone hVIN-1, Sigma-Aldrich Co.), diluted in the blocking solution (1% albumin and 0.1% Tween 20 in PBS) in a ratio of 1:200. After washing with PBS, the samples were incubated for 1 h at room temperature in the dark with a secondary antibody, i.e., goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> fragments of IgG (H L), conjugated with Alexa Fluor 488 (A11017; Molecular Probes, Eugene, OR, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluted in PBS to a ratio of 1:400. Finally, cytoskeletal F-actin filaments were stained by phalloidin conjugated with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) fluorescent dye (Sigma-Aldrich Co.), diluted in PBS to a final concentration of 5 µg/mL, for 1 h at room temperature in the dark. Microscopy images were acquired using spinning disk confocal system Dragonfly 503 (Andor, Belfast, UK) with Zyla 4.2 PLUS sCMOS camera (Andor, Belfast, UK) mounted on microscope Leica DMI8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with objective HC PL APO 20x 0.75 IMM CORR CS2; Free Working Distance 0.66 mm or HC PL APO 40x 1.10 W CORR CS2; Free Working Distance 0.65 mm.

We found that the initial adhesion and subsequent growth of cells, evaluated by the cell number and spreading on days 1 and 7, were similar on all coated samples. There was no apparent difference between samples coated with thick and thin layers of CNFs MWCNTs and samples coated only with CNFs. However, all types of coatings markedly improved the adhesion and growth of cells in comparison with a pure uncoated cellulose mesh (Figure A1). In general, the cell growth was relatively slow in all tested samples. On day 7, the cell number in all tested samples was only slightly higher than on day 1. In addition, hASCs grew slightly better than pASCs, particularly on samples coated with CNFs MWCNTs. Therefore, we decided to cultivate pASCs on the tested samples under dynamic

conditions, which are known to improve the growth of cells by their mechanical stimulation, by a better supply of nutrients and oxygen and by quicker waste removal.

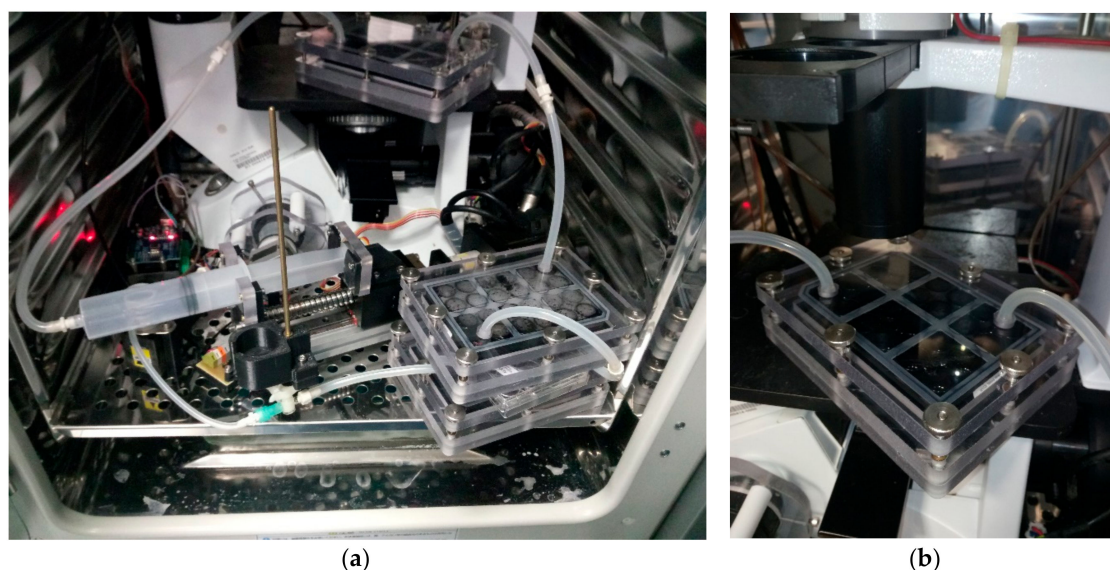


**Figure A1.** Human adipose tissue-derived stem cells (hASC) and porcine adipose tissue-derived stem cells (pASC) on days 1 and 7 after seeding on a cellulose mesh with thick or thin CNF MWCNT coating (column (a) and (b), respectively), with CNF coating (column (c)), and without any coating (column (d)). Cells were stained by immunofluorescence for vinculin (green), with TRITC-conjugated phalloidin for F-actin (red) and with Hoechst #33258 for the nuclei (blue). Cellulose mesh had autofluorescence in the blue channel. Dragonfly 503 spinning disk confocal microscope with a Zyla 4.2 PLUS sCMOS camera, objective HC PL APO 20x 0.75 IMM CORR CS2. Scale bar: 50  $\mu$ m.

The dynamic cultivation was held in a unique lab-made cultivation chamber (Figure A2). This chamber allows for fixing a standard well plate with tested substrates and its hermetical sealing to maintain the desired pressure. This chamber was connected to a custom pressure stimulator. This stimulator consists of a servo-controlled linear stage with piston pump and special controlling software. This software allows for setting stimulation parameters that include high low pressure, motor speed, pulsatile frequency and the shape of the pressure wave.

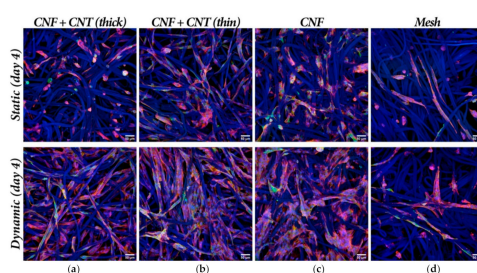
Porcine ASCs were seeded on CellCrown-fixed substrates in 24-well plates at the same number and in the same cultivation medium as mentioned above. Afterwards, the well plate for dynamic cultivation was fixed into the cultivation chamber, and this chamber was sealed and connected to the pressure stimulator. In the initial phase, the cells were left for 24 h without any pressure stimulation in order to allow their adhesion to the materials. The system was opened through a 220-nm filter to atmosphere forced with slow motion of pump piston to equilibrate CO<sub>2</sub> level and pH of medium. After this resting phase, the pressure stimulation was set to 15.9–10.6 kPa (120–80 mmHg) high low pressure with frequency of 1 Hz (60 pulses per minute) with triangular pulse shape with 1:1 ratio. This dynamic cultivation lasted for 72 h (96 h of cultivation in total including the 24-h rest phase). Static control samples were cultivated for 96 h in a well plate with standard lid in the same CO<sub>2</sub> incubator as the dynamic samples.





**Figure A2.** Lab-made dynamic cultivation system for pressure stimulation of cells on the tested material samples. The whole system in a cell incubator (a); detail of a cultivation chamber (b).

We found that dynamic cell cultivation markedly improved the adhesion and subsequent growth of pASCs. The cells were better spread and their number after three days of dynamic cultivation (day 4 after seeding) was markedly higher than in the corresponding samples incubated under static conditions for four days (Figure A3), and also for seven days (Figure A1). The improvement in cell colonization by dynamic cultivation was observed particularly on samples with thin CNF MWCNT coating. On both thick and thin CNF MWCNT coatings, the cells under dynamic conditions were distributed almost homogeneously, while on the pure CNF coating, the cells tended to form clusters. A similar picture was observed in our earlier study performed on human dermal fibroblasts in four-day-old static cultures on the same cationic CNFs, where the cells were less widespread and distributed less homogeneously than on anionic CNFs [2]. Therefore, it can be concluded that the addition of MWCNTs to cationic CNFs improved the colonization of the material with pASCs under dynamic cell culture conditions.



**Figure A3.** Porcine adipose tissue-derived stem cells (pASC) cultivated in a conventional static cell culture system for four days or in a pressure-generating dynamic cell culture system for three days (after one day of static cultivation). The cells were grown on a cellulose mesh with thick or thin CNF MWCNT coating (column (a) and (b), respectively), with CNF coating (column (c)), and without any coating (column (d)). Cells were stained by immunofluorescence for vinculin (green), with TRITC-conjugated phalloidin for F-actin (red) and with DAPI for the nuclei (blue). Cellulose mesh had autofluorescence in the blue channel. Dragonfly 503 spinning disk confocal microscope with a Zyla 4.2 PLUS sCMOS camera, objective HC PL APO 20x 0.75 IMM CORR CS2. Scale bar: 50  $\mu$ m.

## References

1. Zhang, H.; Dou, C.; Pal, L.; Hubbe, M.A. Review of Electrically Conductive Composites and Films Containing Cellulosic Fibers or Nanocellulose. *Bioresources* **2019**, *14*.
2. Bacakova, L.; Pajorova, J.; Bacakova, M.; Skogberg, A.; Kallio, P.; Kolarova, K.; Svorcik, V. Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Nanomaterials (Basel)* **2019**, *9*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zhang, Y.X.; Nypelo, T.; Salas, C.; Arboleda, J.; Hoeger, I.C.; Rojas, O.J. Cellulose Nanofibrils: From Strong Materials to Bioactive Surfaces. *J Renew Mater* **2013**, *1*, 195–211. [[CrossRef](#)]
4. Lin, N.; Dufresne, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *Eur Polym J* **2014**, *59*, 302–325. [[CrossRef](#)]
5. Bhattacharya, M.; Malinen, M.M.; Lauren, P.; Lou, Y.R.; Kuisma, S.W.; Kanninen, L.; Lille, M.; Corlu, A.; GuGuen-Guillouzo, C.; Ikkala, O.; et al. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *J Control Release* **2012**, *164*, 291–298. [[CrossRef](#)]
6. Lou, Y.R.; Kanninen, L.; Kuisma, T.; Niklander, J.; Noon, L.A.; Burks, D.; Urtti, A.; Yliperttula, M. The Use of Nanofibrillar Cellulose Hydrogel As a Flexible Three-Dimensional Model to Culture Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* **2014**, *23*, 380–392. [[CrossRef](#)]
7. Julkapli, N.M.; Bagheri, S. Nanocellulose as a green and sustainable emerging material in energy applications: a review. *Polym Advan Technol* **2017**, *28*, 1583–1594. [[CrossRef](#)]
8. *Nanotechnologies — Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial*. ISO TS 20477:2017(E), 1st ed.; ISO TS 20477:2017; ISO: Vernier, Switzerland; Geneva, Switzerland, 2017.
9. Habibi, Y.; Lucia, L.A.; Rojas, O.J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem Rev* **2010**, *110*, 3479–3500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bacakova, L.; Grausova, L.; Vandrovцова, M.; Vacik, J.; Frazcek, A.; Blazewicz, S.; Kromka, A.; Vanecek, M.; Nesladek, M.; Svorcik, V.; et al. Carbon nanoparticles as substrates for cell adhesion and growth. In *Nanoparticles: New Research*; Lombardi, S.L., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2008; pp. 39–107. ISBN 978-1-60456-704-5.
11. Bacakova, L.; Grausova, L.; Vacik, J.; Kromka, A.; Biederman, H.; Choukourov, A.; Sary, V. Nanocomposite and nanostructured carbon-based films as growth substrates for bone cells. In *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*; Reddy, B., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2011; pp. 399–435. ISBN 978-953-307-202-9.
12. Bacakova, L.; Kopova, I.; Vacik, J.; Lavrentiev, V. Interaction of fullerenes and metal-fullerene composites with cells. In *Fullerenes: Chemistry, Natural Sources and Technological Applications*; Ellis, S.B., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2014; pp. 1–33.
13. Bacakova, L.; Kopova, I.; Stankova, L.; Liskova, J.; Vacik, J.; Lavrentiev, V.; Kromka, A.; Potocky, S.; Stranska, D. Bone cells in cultures on nanocarbon-based materials for potential bone tissue engineering: A review. *Phys Status Solidi A* **2014**, *211*, 2688–2702. [[CrossRef](#)]
14. Bacakova, L.; Filova, E.; Liskova, J.; Kopova, I.; Vandrovцова, M.; Havlikova, J. Nanostructured materials as substrates for the adhesion, growth, and osteogenic differentiation of bone cells. *Appl Nanobiomater* **2016**, *4*, 103–153. [[CrossRef](#)]
15. Bacakova, L.; Broz, A.; Liskova, J.; Stankova, L.; Potocky, S.; Kromka, A. Application of nanodiamond in biotechnology and tissue engineering. In *Diamond and Carbon Composites and Nanocomposites*; Aliofkhazraei, M., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2016; pp. 59–88. ISBN 978-953-51-2453-5. [[CrossRef](#)]
16. Wong, B.S.; Yoong, S.L.; Jagusiak, A.; Panczyk, T.; Ho, H.K.; Ang, W.H.; Pastorin, G. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65*, 1964–2015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wang, M.; Anoshkin, I.V.; Nasibulin, A.G.; Korhonen, J.T.; Seitsonen, J.; Pere, J.; Kauppinen, E.I.; Ras, R.H.; Ikkala, O. Modifying native nanocellulose aerogels with carbon nanotubes for mechanoresponsive conductivity and pressure sensing. *Adv Mater* **2013**, *25*, 2428–2432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yin, R.; Agrawal, T.; Khan, U.; Gupta, G.K.; Rai, V.; Huang, Y.Y.; Hamblin, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (Lond)* **2015**, *10*, 2379–2404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Liao, C.; Li, Y.; Tjong, S.C. Graphene Nanomaterials: Synthesis, Biocompatibility, and Cytotoxicity. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 3564. [[CrossRef](#)]

20. Placha, D.; Jampilek, J. Graphenic Materials for Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel)* **2019**, *9*, 1758. [[CrossRef](#)]
21. Ma, L.; Liu, R.; Niu, H.; Xing, L.; Liu, L.; Huang, Y. Flexible and Freestanding Supercapacitor Electrodes Based on Nitrogen-Doped Carbon Networks Graphene Bacterial Cellulose with Ultrahigh Areal Capacitance. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8*, 33608–33618. [[CrossRef](#)]
22. Xu, Z.; Zhou, H.; Tan, S.; Jiang, X.; Wu, W.; Shi, J.; Chen, P. Ultralight super-hydrophobic carbon aerogels based on cellulose nanofibers poly(vinyl alcohol) graphene oxide (CNFs PVA GO) for highly effective oil-water separation. *Beilstein J Nanotechnol* **2018**, *9*, 508–519. [[CrossRef](#)]
23. Li, W.; Islam, N.; Ren, G.; Li, S.; Fan, Z. AC-Filtering Supercapacitors Based on Edge Oriented Vertical Graphene and Cross-Linked Carbon Nanofiber. *Materials (Basel)* **2019**, *12*, 604. [[CrossRef](#)]
24. Shi, Q.; Liu, D.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Yang, X.; Huang, J. High-Performance Sodium-Ion Battery Anode via Rapid Microwave Carbonization of Natural Cellulose Nanofibers with Graphene Initiator. *Small* **2019**, *15*, e1901724. [[CrossRef](#)]
25. Price, R.L.; Ellison, K.; Haberstroh, K.M.; Webster, T.J. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res A* **2004**, *70*, 129–138. [[CrossRef](#)]
26. Abbasi-Moayed, S.; Golmohammadi, H.; Bigdeli, A.; Hormozi-Nezhad, M.R. A rainbow ratiometric fluorescent sensor array on bacterial nanocellulose for visual discrimination of biothiols. *Analyst* **2018**, *143*, 3415–3424. [[CrossRef](#)]
27. Li, L.; Wang, F.; Lv, Y.; Liu, J.; Bian, H.; Wang, W.; Li, Y.; Shao, Z. CQDs-Doped Magnetic Electrospun Nanofibers: Fluorescence Self-Display and Adsorption Removal of Mercury(II). *ACS Omega* **2018**, *3*, 4220–4230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Shamsipour, M.; Mansouri, A.M.; Moradipour, P. Temozolomide Conjugated Carbon Quantum Dots Embedded in Core Shell Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning as an Implantable Delivery System for Cell Imaging and Sustained Drug Release. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hassan, M.; Abou-Zeid, R.; Hassan, E.; Berglund, L.; Aitomaki, Y.; Oksman, K. Membranes Based on Cellulose Nanofibers and Activated Carbon for Removal of Escherichia coli Bacteria from Water. *Polymers (Basel)* **2017**, *9*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ashfaq, M.; Verma, N.; Khan, S. Highly effective Cu Zn-carbon micro nanofiber-polymer nanocomposite-based wound dressing biomaterial against the P. aeruginosa multi- and extensively drug-resistant strains. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2017**, *77*, 630–641. [[CrossRef](#)]
31. Santhiago, M.; Correa, C.C.; Bernardes, J.S.; Pereira, M.P.; Oliveira, L.J.M.; Strauss, M.; Bufon, C.C.B. Flexible and Foldable Fully-Printed Carbon Black Conductive Nanostructures on Paper for High-Performance Electronic, Electrochemical, and Wearable Devices. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 24365–24372. [[CrossRef](#)]
32. Ranjbar, S.; Shahrokhian, S. Design and fabrication of an electrochemical aptasensor using Au nanoparticles carbon nanoparticles cellulose nanofibers nanocomposite for rapid and sensitive detection of Staphylococcus aureus. *Bioelectrochemistry* **2018**, *123*, 70–76. [[CrossRef](#)]
33. Li, Q.M.; Liu, H.; Zhang, S.D.; Zhang, D.B.; Liu, X.H.; He, Y.X.; Mi, L.W.; Zhang, J.X.; Liu, C.T.; Shen, C.Y.; et al. Superhydrophobic Electrically Conductive Paper for Ultrasensitive Strain Sensor with Excellent Anticorrosion and Self-Cleaning Property. *ACS Appl Mater Inter* **2019**, *11*, 21904–21914. [[CrossRef](#)]
34. Lin, J.; Zhong, Z.; Li, Q.; Tan, Z.; Lin, T.; Quan, Y.; Zhang, D. Facile Low-Temperature Synthesis of Cellulose Nanocrystals Carrying Buckminsterfullerene and Its Radical Scavenging Property in Vitro. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 4034–4040. [[CrossRef](#)]
35. Herreros-Lopez, A.; Carini, M.; Da Ros, T.; Carofiglio, T.; Marega, C.; La Parola, V.; Rapozzi, V.; Xodo, L.E.; Alshatwi, A.A.; Hadad, C.; et al. Nanocrystalline cellulose-fullerene: Novel conjugates. *Carbohydr Polym* **2017**, *164*, 92–101. [[CrossRef](#)]
36. Kim, Y.; Kim, H.S.; Yun, Y.S.; Bak, H.; Jin, H.J. Ag-doped multiwalled carbon nanotube polymer composite electrodes. *J Nanosci Nanotechnol* **2010**, *10*, 3571–3575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Jin, L.; Zeng, Z.; Kuddannaya, S.; Wu, D.; Zhang, Y.; Wang, Z. Biocompatible, Free-Standing Film Composed of Bacterial Cellulose Nanofibers-Graphene Composite. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8*, 1011–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kim, S.; Xiong, R.; Tsukruk, V.V. Probing Flexural Properties of Cellulose Nanocrystal-Graphene Nanomembranes with Force Spectroscopy and Bulging Test. *Langmuir* **2016**, *32*, 5383–5393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Siljander, S.; Keinanen, P.; Raty, A.; Ramakrishnan, K.R.; Tuukkanen, S.; Kunnari, V.; Harlin, A.; Vuorinen, J.; Kanerva, M. Effect of Surfactant Type and Sonication Energy on the Electrical Conductivity Properties of Nanocellulose-CNT Nanocomposite Films. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Han, J.; Wang, S.; Zhu, S.; Huang, C.; Yue, Y.; Mei, C.; Xu, X.; Xia, C. Electrospun Core-Shell Nanofibrous Membranes with Nanocellulose-Stabilized Carbon Nanotubes for Use as High-Performance Flexible Supercapacitor Electrodes with Enhanced Water Resistance, Thermal Stability, and Mechanical Toughness. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11*, 44624–44635. [[CrossRef](#)]
41. Nguyen, H.K.; Bae, J.; Hur, J.; Park, S.J.; Park, M.S.; Kim, I.T. Tailoring of Aqueous-Based Carbon Nanotube(-)Nanocellulose Films as Self-Standing Flexible Anodes for Lithium-Ion Storage. *Nanomaterials (Basel)* **2019**, *9*, 655. [[CrossRef](#)]
42. Jiang, M.; Seney, R.; Bayliss, P.C.; Kitchens, C.L. Carbon Nanotube and Cellulose Nanocrystal Hybrid Films. *Molecules* **2019**, *24*, 2662. [[CrossRef](#)]
43. Liu, P.; Zhu, C.; Mathew, A.P. Mechanically robust high flux graphene oxide - nanocellulose membranes for dye removal from water. *J Hazard Mater* **2019**, *371*, 484–493. [[CrossRef](#)]
44. Hasan, M.Q.; Yuen, J.; Slaughter, G. Carbon Nanotube-Cellulose Pellicle for Glucose Biofuel Cell. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2018**, *2018*, 1–4. [[CrossRef](#)]
45. Hamed, M.M.; Hajian, A.; Fall, A.B.; Hakansson, K.; Salajkova, M.; Lundell, F.; Wagberg, L.; Berglund, L.A. Highly conducting, strong nanocomposites based on nanocellulose-assisted aqueous dispersions of single-wall carbon nanotubes. *ACS Nano* **2014**, *8*, 2467–2476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hajian, A.; Lindstrom, S.B.; Pettersson, T.; Hamed, M.M.; Wagberg, L. Understanding the Dispersive Action of Nanocellulose for Carbon Nanomaterials. *Nano Lett* **2017**, *17*, 1439–1447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hamed, M.; Karabulut, E.; Marais, A.; Herland, A.; Nystrom, G.; Wagberg, L. Nanocellulose aerogels functionalized by rapid layer-by-layer assembly for high charge storage and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52*, 12038–12042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Wicklein, B.; Kocjan, A.; Salazar-Alvarez, G.; Carosio, F.; Camino, G.; Antonietti, M.; Bergstrom, L. Thermally insulating and fire-retardant lightweight anisotropic foams based on nanocellulose and graphene oxide. *Nat Nanotechnol* **2015**, *10*, 277–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Yousefi, N.; Wong, K.K.W.; Hosseinidoust, Z.; Sorensen, H.O.; Bruns, S.; Zheng, Y.; Tufenkji, N. Hierarchically porous, ultra-strong reduced graphene oxide-cellulose nanocrystal sponges for exceptional adsorption of water contaminants. *Nanoscale* **2018**, *10*, 7171–7184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Siljander, S.; Keinanen, P.; Ivanova, A.; Lehmonen, J.; Tuukkanen, S.; Kanerva, M.; Bjorkqvist, T. Conductive Cellulose based Foam Formed 3D Shapes-From Innovation to Designed Prototype. *Materials (Basel)* **2019**, *12*, 430. [[CrossRef](#)]
51. Kuzmenko, V.; Karabulut, E.; Pernevik, E.; Enoksson, P.; Gatenholm, P. Tailor-made conductive inks from cellulose nanofibrils for 3D printing of neural guidelines. *Carbohydr Polym* **2018**, *189*, 22–30. [[CrossRef](#)]
52. Pedrotty, D.M.; Kuzmenko, V.; Karabulut, E.; Sugrue, A.M.; Livia, C.; Vaidya, V.R.; McLeod, C.J.; Asirvatham, S.J.; Gatenholm, P.; Kapa, S. Three-Dimensional Printed Biopatches With Conductive Ink Facilitate Cardiac Conduction When Applied to Disrupted Myocardium. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **2019**, *12*, e006920. [[CrossRef](#)]
53. Shah, N.; Ul-Islam, M.; Khattak, W.A.; Park, J.K. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym* **2013**, *98*, 1585–1598. [[CrossRef](#)]
54. Xu, T.; Jiang, Q.; Ghim, D.; Liu, K.K.; Sun, H.; Derami, H.G.; Wang, Z.; Tadepalli, S.; Jun, Y.S.; Zhang, Q.; et al. Catalytically Active Bacterial Nanocellulose-Based Ultrafiltration Membrane. *Small* **2018**, *14*, e1704006. [[CrossRef](#)]
55. Jun, Y.S.; Wu, X.; Ghim, D.; Jiang, Q.; Cao, S.; Singamaneni, S. Photothermal Membrane Water Treatment for Two Worlds. *Acc Chem Res* **2019**, *52*, 1215–1225. [[CrossRef](#)]
56. Jiang, Q.; Ghim, D.; Cao, S.; Tadepalli, S.; Liu, K.K.; Kwon, H.; Luan, J.; Min, Y.; Jun, Y.S.; Singamaneni, S. Photothermally Active Reduced Graphene Oxide Bacterial Nanocellulose Composites as Biofouling-Resistant Ultrafiltration Membranes. *Environ Sci Technol* **2019**, *53*, 412–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Abol-Fotouh, D.; Dorling, B.; Zapata-Arteaga, O.; Rodriguez-Martinez, X.; Gomez, A.; Reparaz, J.S.; Laromaine, A.; Roig, A.; Campoy-Quiles, M. Farming thermoelectric paper. *Energy Environ Sci* **2019**, *12*, 716–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Mahdavi, M.; Mahmoudi, N.; Rezaie Anaran, F.; Simchi, A. Electrospinning of Nanodiamond-Modified Polysaccharide Nanofibers with Physico-Mechanical Properties Close to Natural Skins. *Mar Drugs* **2016**, *14*, 128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Liu, X.; Shen, H.; Song, S.; Chen, W.; Zhang, Z. Accelerated biomineralization of graphene oxide - incorporated cellulose acetate nanofibrous scaffolds for mesenchymal stem cell osteogenesis. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2017**, *159*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Cho, S.Y.; Yu, H.; Choi, J.; Kang, H.; Park, S.; Jang, J.S.; Hong, H.J.; Kim, I.D.; Lee, S.K.; Jeong, H.S.; et al. Continuous Meter-Scale Synthesis of Weavable Tunicate Cellulose Carbon Nanotube Fibers for High-Performance Wearable Sensors. *ACS Nano* **2019**, *13*, 9332–9341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Zhu, C.; Liu, P.; Mathew, A.P. Self-Assembled TEMPO Cellulose Nanofibers: Graphene Oxide-Based Biohybrids for Water Purification. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 21048–21058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ostadhosseini, F.; Mahmoudi, N.; Morales-Cid, G.; Tamjid, E.; Navas-Martos, F.J.; Soriano-Cuadrado, B.; Paniza, J.M.L.; Simchi, A. Development of Chitosan Bacterial Cellulose Composite Films Containing Nanodiamonds as a Potential Flexible Platform for Wound Dressing. *Materials (Basel)* **2015**, *8*, 6401–6418. [[CrossRef](#)]
63. Zheng, C.; Yue, Y.; Gan, L.; Xu, X.; Mei, C.; Han, J. Highly Stretchable and Self-Healing Strain Sensors Based on Nanocellulose-Supported Graphene Dispersed in Electro-Conductive Hydrogels. *Nanomaterials (Basel)* **2019**, *9*, 937. [[CrossRef](#)]
64. Xing, J.; Tao, P.; Wu, Z.; Xing, C.; Liao, X.; Nie, S. Nanocellulose-graphene composites: A promising nanomaterial for flexible supercapacitors. *Carbohydr Polym* **2019**, *207*, 447–459. [[CrossRef](#)]
65. Shi, Z.; Phillips, G.O.; Yang, G. Nanocellulose electroconductive composites. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3194–3201. [[CrossRef](#)]
66. Buzid, A.; Hayes, P.E.; Glennon, J.D.; Luong, J.H.T. Captavidin as a regenerable biorecognition element on boron-doped diamond for biotin sensing. *Anal Chim Acta* **2019**, *1059*, 42–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Li, F.; Yu, H.Y.; Wang, Y.Y.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Yao, J.M.; Abdalkarim, S.Y.H.; Tam, K.C. Natural Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Nanocomposites with Multifunctional Cellulose Nanocrystals Graphene Oxide Hybrids for High-Performance Food Packaging. *J Agric Food Chem* **2019**, *67*, 10954–10967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Pal, N.; Banerjee, S.; Roy, P.; Pal, K. Melt-blending of unmodified and modified cellulose nanocrystals with reduced graphene oxide into PLA matrix for biomedical application. *Polym Advan Technol* **2019**, *30*, 3049–3060. [[CrossRef](#)]
69. Pal, N.; Banerjee, S.; Roy, P.; Pal, K. Reduced graphene oxide and PEG-grafted TEMPO-oxidized cellulose nanocrystal reinforced poly-lactic acid nanocomposite film for biomedical application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2019**, *104*, 109956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Song, N.; Cui, S.; Hou, X.; Ding, P.; Shi, L. Significant Enhancement of Thermal Conductivity in Nanofibrillated Cellulose Films with Low Mass Fraction of Nanodiamond. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 40766–40773. [[CrossRef](#)]
71. Ruiz-Palomero, C.; Benitez-Martinez, S.; Soriano, M.L.; Valcarcel, M. Fluorescent nanocellulosic hydrogels based on graphene quantum dots for sensing laccase. *Anal Chim Acta* **2017**, *974*, 93–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Javanbakht, S.; Namazi, H. Doxorubicin loaded carboxymethyl cellulose graphene quantum dot nanocomposite hydrogel films as a potential anticancer drug delivery system. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *87*, 50–59. [[CrossRef](#)]
73. Anirudhan, T.S.; Deepa, J.R. Nano-zinc oxide incorporated graphene oxide nanocellulose composite for the adsorption and photo catalytic degradation of ciprofloxacin hydrochloride from aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci* **2017**, *490*, 343–356. [[CrossRef](#)]
74. Xu, Z.; Zhou, H.; Jiang, X.; Li, J.; Huang, F. Facile synthesis of reduced graphene oxide trimethyl chlorosilane-coated cellulose nanofibres aerogel for oil absorption. *IET Nanobiotechnol* **2017**, *11*, 929–934. [[CrossRef](#)]
75. Yao, Q.; Fan, B.; Xiong, Y.; Jin, C.; Sun, Q.; Sheng, C. 3D assembly based on 2D structure of Cellulose Nanofibril Graphene Oxide Hybrid Aerogel for Adsorptive Removal of Antibiotics in Water. *Sci Rep* **2017**, *7*, 45914. [[CrossRef](#)]
76. Alizadehgiashi, M.; Khuu, N.; Khabibullin, A.; Henry, A.; Tebbe, M.; Suzuki, T.; Kumacheva, E. Nanocolloidal Hydrogel for Heavy Metal Scavenging. *ACS Nano* **2018**, *12*, 8160–8168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

77. Liang, Y.; Liu, J.; Wang, L.; Wan, Y.; Shen, J.; Bai, Q. Metal affinity-carboxymethyl cellulose functionalized magnetic graphene composite for highly selective isolation of histidine-rich proteins. *Talanta* **2019**, *195*, 381–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Sun, H.X.; Ma, C.; Wang, T.; Xu, Y.Y.; Yuan, B.B.; Li, P.; Kong, Y. Preparation and Characterization of C60-Filled Ethyl Cellulose Mixed-Matrix Membranes for Gas Separation of Propylene Propane. *Chem Eng Technol* **2014**, *37*, 611–619. [[CrossRef](#)]
79. Vetrivel, S.; Saraswathi, M.S.A.; Rana, D.; Nagendran, A. Fabrication of cellulose acetate nanocomposite membranes using 2D layered nanomaterials for macromolecular separation. *Int J Biol Macromol* **2018**, *107*, 1607–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Blomquist, N.; Wells, T.; Andres, B.; Backstrom, J.; Forsberg, S.; Olin, H. Metal-free supercapacitor with aqueous electrolyte and low-cost carbon materials. *Sci Rep* **2017**, *7*, 39836. [[CrossRef](#)]
81. Xu, X.; Hsieh, Y.L. Aqueous exfoliated graphene by amphiphilic nanocellulose and its application in moisture-responsive foldable actuators. *Nanoscale* **2019**, *11*, 11719–11729. [[CrossRef](#)]
82. Jiang, Q.; Tian, L.; Liu, K.K.; Tadepalli, S.; Raliya, R.; Biswas, P.; Naik, R.R.; Singamaneni, S. Bilayered Biofoam for Highly Efficient Solar Steam Generation. *Adv Mater* **2016**, *28*, 9400–9407. [[CrossRef](#)]
83. Li, X.; Shao, C.; Zhuo, B.; Yang, S.; Zhu, Z.; Su, C.; Yuan, Q. The use of nanofibrillated cellulose to fabricate a homogeneous and flexible graphene-based electric heating membrane. *Int J Biol Macromol* **2019**, *139*, 1103–1116. [[CrossRef](#)]
84. Kizling, M.; Draminska, S.; Stolarczyk, K.; Tammela, P.; Wang, Z.; Nyholm, L.; Bilewicz, R. Biosupercapacitors for powering oxygen sensing devices. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, 34–40. [[CrossRef](#)]
85. Generalov, A.A.; Anoshkin, I.V.; Erdmanis, M.; Lioubtchenko, D.V.; Ovchinnikov, V.; Nasibulin, A.G.; Raisanen, A.V. Carbon nanotube network varactor. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 045201. [[CrossRef](#)]
86. Asmat, S.; Husain, Q. Exquisite stability and catalytic performance of immobilized lipase on novel fabricated nanocellulose fused polypyrrole graphene oxide nanocomposite: Characterization and application. *Int J Biol Macromol* **2018**, *117*, 331–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Pal, N.; Dubey, P.; Gopinath, P.; Pal, K. Combined effect of cellulose nanocrystal and reduced graphene oxide into poly-lactic acid matrix nanocomposite as a scaffold and its anti-bacterial activity. *Int J Biol Macromol* **2017**, *95*, 94–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Valentini, L.; Cardinali, M.; Fortunati, E.; Kenny, J.M. Nonvolatile memory behavior of nanocrystalline cellulose graphene oxide composite films. *Appl Phys Lett* **2014**, *105*. [[CrossRef](#)]
89. Song, L.; Li, Y.; Xiong, Z.; Pan, L.; Luo, Q.; Xu, X.; Lu, S. Water-Induced shape memory effect of nanocellulose papers from sisal cellulose nanofibers with graphene oxide. *Carbohydr Polym* **2018**, *179*, 110–117. [[CrossRef](#)]
90. Wu, G.; Gu, Y.; Hou, X.; Li, R.; Ke, H.; Xiao, X. Hybrid Nanocomposites of Cellulose Carbon-Nanotubes Polyurethane with Rapidly Water Sensitive Shape Memory Effect and Strain Sensing Performance. *Polymers (Basel)* **2019**, *11*, 1586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Zhu, L.; Zhou, X.; Liu, Y.; Fu, Q. Highly Sensitive, Ulstretchable Strain Sensors Prepared by Pumping Hybrid Fillers of Carbon Nanotubes Cellulose Nanocrystal into Electrospun Polyurethane Membranes. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11*, 12968–12977. [[CrossRef](#)]
92. Awan, F.; Bulger, E.; Berry, R.M.; Tam, K.C. Enhanced radical scavenging activity of polyhydroxylated C-60 functionalized cellulose nanocrystals. *Cellulose* **2016**, *23*, 3589–3599. [[CrossRef](#)]
93. Luo, J.; Deng, W.; Yang, F.; Wu, Z.; Huang, M.; Gu, M. Gold nanoparticles decorated graphene oxide nanocellulose paper for NIR laser-induced photothermal ablation of pathogenic bacteria. *Carbohydr Polym* **2018**, *198*, 206–214. [[CrossRef](#)]
94. Anirudhan, T.S.; Sekhar, V.C.; Shainy, F.; Thomas, J.P. Effect of dual stimuli responsive dextran nanocellulose polyelectrolyte complexes for chemophotothermal synergistic cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *135*, 776–789. [[CrossRef](#)]
95. Rasoulzadeh, M.; Namazi, H. Carboxymethyl cellulose graphene oxide bio-nanocomposite hydrogel beads as anticancer drug carrier agent. *Carbohydr Polym* **2017**, *168*, 320–326. [[CrossRef](#)]
96. Wang, X.D.; Yu, K.X.; An, R.; Han, L.L.; Zhang, Y.L.; Shi, L.Y.; Ran, R. Self-assembling GO modified HEC hybrid stabilized pickering emulsions and template polymerization for biomedical hydrogels. *Carbohydr Polym* **2019**, *207*, 694–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

97. Luo, X.; Zhang, H.; Cao, Z.; Cai, N.; Xue, Y.; Yu, F. A simple route to develop transparent doxorubicin-loaded nanodiamonds cellulose nanocomposite membranes as potential wound dressings. *Carbohydr Polym* **2016**, *143*, 231–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Anirudhan, T.S.; Deepa, J.R.; Binussreejayan. Electrochemical sensing of cholesterol by molecularly imprinted polymer of silylated graphene oxide and chemically modified nanocellulose polymer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *92*, 942–956. [[CrossRef](#)]
99. Fu, W.; Dai, Y.; Meng, X.; Xu, W.; Zhou, J.; Liu, Z.; Lu, W.; Wang, S.; Huang, C.; Sun, Y. Electronic textiles based on aligned electrospun belt-like cellulose acetate nanofibers and graphene sheets: portable, scalable and eco-friendly strain sensor. *Nanotechnology* **2019**, *30*, 045602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Zou, Y.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Chen, Y.; Huang, S.; Lyu, Y.; Duan, H.; Chen, Z.; Tan, W. Portable and Label-Free Detection of Blood Bilirubin with Graphene-Isolated-Au-Nanocrystals Paper Strip. *Anal Chem* **2018**, *90*, 13687–13694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Jia, Y.; Yu, H.; Zhang, Y.; Dong, F.; Li, Z. Cellulose acetate nanofibers coated layer-by-layer with polyethylenimine and graphene oxide on a quartz crystal microbalance for use as a highly sensitive ammonia sensor. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2016**, *148*, 263–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Xue, T.; Sheng, Y.Y.; Xu, J.K.; Li, Y.Y.; Lu, X.Y.; Zhu, Y.F.; Duan, X.M.; Wen, Y.P. In-situ reduction of Ag on black phosphorene and its NH<sub>2</sub>-MWCNT nanohybrid with high stability and dispersibility as nanozyme sensor for three ATP metabolites. *Biosens Bioelectron* **2019**, *145*. [[CrossRef](#)]
103. Jung, M.; Kim, K.; Kim, B.; Lee, K.J.; Kang, J.W.; Jeon, S. Vertically stacked nanocellulose tactile sensor. *Nanoscale* **2017**, *9*, 17212–17219. [[CrossRef](#)]
104. Zhu, P.; Liu, Y.; Fang, Z.; Kuang, Y.; Zhang, Y.; Peng, C.; Chen, G. Flexible and Highly Sensitive Humidity Sensor Based on Cellulose Nanofibers and Carbon Nanotube Composite Film. *Langmuir* **2019**, *35*, 4834–4842. [[CrossRef](#)]
105. Chen, C.; Zhang, T.; Zhang, Q.; Chen, X.; Zhu, C.; Xu, Y.; Yang, J.; Liu, J.; Sun, D. Biointerface by Cell Growth on Graphene Oxide Doped Bacterial Cellulose Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Nanofibers. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8*, 10183–10192. [[CrossRef](#)]
106. Sun, Y.; Quan, Q.; Meng, H.; Zheng, Y.; Peng, J.; Hu, Y.; Feng, Z.; Sang, X.; Qiao, K.; He, W.; et al. Enhanced Neurite Outgrowth on a Multiblock Conductive Nerve Scaffold with Self-Powered Electrical Stimulation. *Adv Healthc Mater* **2019**, *8*, e1900127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Chakraborty, S.; Ponrasu, T.; Chandel, S.; Dixit, M.; Muthuvijayan, V. Reduced graphene oxide-loaded nanocomposite scaffolds for enhancing angiogenesis in tissue engineering applications. *R Soc Open Sci* **2018**, *5*, 172017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Chen, X.Y.; Low, H.R.; Loi, X.Y.; Merel, L.; Mohd Cairul Iqbal, M.A. Fabrication and evaluation of bacterial nanocellulose poly(acrylic acid) graphene oxide composite hydrogel: Characterizations and biocompatibility studies for wound dressing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2019**, *107*, 2140–2151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Wang, Y.; Shi, L.; Wu, H.; Li, Q.; Hu, W.; Zhang, Z.; Huang, L.; Zhang, J.; Chen, D.; Deng, S.; et al. Graphene Oxide-IPDI-Ag ZnO@Hydroxypropyl Cellulose Nanocomposite Films for Biological Wound-Dressing Applications. *ACS Omega* **2019**, *4*, 15373–15381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Burrs, S.L.; Bhargava, M.; Sidhu, R.; Kiernan-Lewis, J.; Gomes, C.; Claussen, J.C.; McLamore, E.S. A paper based graphene-nanocauliflower hybrid composite for point of care biosensing. *Biosens Bioelectron* **2016**, *85*, 479–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Liu, C.; Dong, J.; Waterhouse, G.I.N.; Cheng, Z.Q.; Ai, S.Y. Electrochemical immunosensor with nanocellulose-Au composite assisted multiple signal amplification for detection of avian leukosis virus subgroup J. *Biosens Bioelectron* **2018**, *101*, 110–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Cao, J.; Zhang, X.X.; Wu, X.D.; Wang, S.M.; Lu, C.H. Cellulose nanocrystals mediated assembly of graphene in rubber composites for chemical sensing applications. *Carbohydr Polym* **2016**, *140*, 88–95. [[CrossRef](#)]
113. Yan, C.Y.; Wang, J.X.; Kang, W.B.; Cui, M.Q.; Wang, X.; Foo, C.Y.; Chee, K.J.; Lee, P.S. Highly Stretchable Piezoresistive Graphene-Nanocellulose Nanopaper for Strain Sensors. *Advanced Materials* **2014**, *26*, 2022–2027. [[CrossRef](#)]
114. Wang, S.; Zhang, X.; Wu, X.; Lu, C. Tailoring percolating conductive networks of natural rubber composites for flexible strain sensors via a cellulose nanocrystal templated assembly. *Soft Matter* **2016**, *12*, 845–852. [[CrossRef](#)]

115. Baleizao, C.; Nagl, S.; Schaferling, M.; Berberan-Santos, M.N.; Wolfbeis, O.S. Dual fluorescence sensor for trace oxygen and temperature with unmatched range and sensitivity. *Anal Chem* **2008**, *80*, 6449–6457. [[CrossRef](#)]
116. Kochmann, S.; Baleizao, C.; Berberan-Santos, M.N.; Wolfbeis, O.S. Sensing and imaging of oxygen with parts per billion limits of detection and based on the quenching of the delayed fluorescence of (13)C70 fullerene in polymer hosts. *Anal Chem* **2013**, *85*, 1300–1304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Luo, Y.; Wang, S.; Shen, M.; Qi, R.; Fang, Y.; Guo, R.; Cai, H.; Cao, X.; Tomas, H.; Zhu, M.; et al. Carbon nanotube-incorporated multilayered cellulose acetate nanofibers for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym* **2013**, *91*, 419–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Duri, S.; Harkins, A.L.; Frazier, A.J.; Tran, C.D. Composites Containing Fullerenes and Polysaccharides: Green and Facile Synthesis, Biocompatibility, and Antimicrobial Activity. *ACS Sustain Chem Eng* **2017**, *5*, 5408–5417. [[CrossRef](#)]
119. Kopova, I.; Bacakova, L.; Lavrentiev, V.; Vacik, J. Growth and potential damage of human bone-derived cells on fresh and aged fullerene C60 films. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 9182–9204. [[CrossRef](#)]
120. Kopova, I.; Lavrentiev, V.; Vacik, J.; Bacakova, L. Growth and potential damage of human bone-derived cells cultured on fresh and aged C60 Ti films. *PLoS One* **2015**, *10*, e0123680. [[CrossRef](#)]
121. Sheka, E.F. Chapter 1: Concepts and grounds. In *Fullerenes: Nanochemistry, Nanomagnetism, Nanomedicine, Nanophotonics*; Sheka, E.F., Ed.; CRC Press Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2011; pp. 1–14. ISBN 9781439806425.
122. Sheka, E.F. Chapter 9: Nanomedicine of fullerene C60. In *Fullerenes: Nanochemistry, Nanomagnetism, Nanomedicine, Nanophotonics*, 1st ed.; Sheka, E.F., Ed.; CRC Press Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2011; pp. 175–191. ISBN 9781439806425.
123. Li, J.; Kee, C.D.; Vadahanambi, S.; Oh, I.K. A Novel Biocompatible Actuator based on Electrospun Cellulose Acetate. *Adv Mater Res-Switz* **2011**, *214*, 359. [[CrossRef](#)]
124. Alekseeva, O.V.; Bagrovskaya, N.A.; Noskov, A.V. The Sorption Activity of a Cellulose-Fullerene Composite Relative to Heavy Metal Ions. *Prot Met Phys Chem* **2019**, *55*, 15–20. [[CrossRef](#)]
125. Shams, S.S.; Zhang, R.Y.; Zhu, J. Graphene synthesis: a Review. *Mater Sci-Poland* **2015**, *33*, 566–578. [[CrossRef](#)]
126. Coros, M.; Pogacean, F.; Magerusan, L.; Socaci, C.; Pruneanu, S. A brief overview on synthesis and applications of graphene and graphene-based nanomaterials. *Front Mater Sci* **2019**, *13*, 23–32. [[CrossRef](#)]
127. Malho, J.M.; Laaksonen, P.; Walther, A.; Ikkala, O.; Linder, M.B. Facile Method for Stiff, Tough, and Strong Nanocomposites by Direct Exfoliation of Multilayered Graphene into Native Nanocellulose Matrix. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1093–1099. [[CrossRef](#)]
128. Zhang, X.F.; Lu, Z.X.; Zhao, J.Q.; Li, Q.Y.; Zhang, W.; Lu, C.H. Exfoliation dispersion of low-temperature expandable graphite in nanocellulose matrix by wet co-milling. *Carbohydr Polym* **2017**, *157*, 1434–1441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Zhang, G.Q.; Lv, J.L.; Yang, F.L. Optimized anti-biofouling performance of bactericides cellulose nanocrystals composites modified PVDF ultrafiltration membrane for micro-polluted source water purification. *Water Sci Technol* **2019**, *79*, 1437–1446. [[CrossRef](#)]
130. Yuan, H.; Pan, H.; Meng, X.; Zhu, C.L.; Liu, S.Y.; Chen, Z.X.; Ma, J.; Zhu, S.M. Assembly of MnO CNC rGO fibers from colloidal liquid crystal for flexible supercapacitors via a continuous one-process method. *Nanotechnology* **2019**, *30*. [[CrossRef](#)]
131. Dhar, P.; Gaur, S.S.; Kumar, A.; Katiyar, V. Cellulose Nanocrystal Templated Graphene Nanoscrolls for High Performance Supercapacitors and Hydrogen Storage: An Experimental and Molecular Simulation Study. *Sci Rep-Uk* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
132. Li, G.X.; Yu, J.Y.; Zhou, Z.Q.; Li, R.K.; Xiang, Z.H.; Cao, Q.; Zhao, L.L.; Peng, X.W.; Liu, H.; Zhou, W.J. N-Doped Mo2C Nanobelts Graphene Nanosheets Bonded with Hydroxy Nanocellulose as Flexible and Editable Electrode for Hydrogen Evolution Reaction. *Iscience* **2019**, *19*, 1090. [[CrossRef](#)]
133. Zhou, X.M.; Liu, Y.; Du, C.Y.; Ren, Y.; Li, X.L.; Zuo, P.J.; Yin, G.P.; Ma, Y.L.; Cheng, X.Q.; Gao, Y.Z. Free-Standing Sandwich-Type Graphene Nanocellulose Silicon Laminate Anode for Flexible Rechargeable Lithium Ion Batteries. *ACS Appl Mater Inter* **2018**, *10*, 29638–29646. [[CrossRef](#)]
134. Wang, Z.H.; Tammela, P.; Stromme, M.; Nyholm, L. Nanocellulose coupled flexible polypyrrole/graphene oxide composite paper electrodes with high volumetric capacitance. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3418–3423. [[CrossRef](#)]



135. Kumar, A.; Rao, K.M.; Han, S.S. Mechanically viscoelastic nanoreinforced hybrid hydrogels composed of polyacrylamide, sodium carboxymethylcellulose, graphene oxide, and cellulose nanocrystals. *Carbohydr Polym* **2018**, *193*, 228–238. [[CrossRef](#)]
136. Laaksonen, P.; Walther, A.; Malho, J.M.; Kainlahti, M.; Ikkala, O.; Linder, M.B. Genetic Engineering of Biomimetic Nanocomposites: Diblock Proteins, Graphene, and Nanofibrillated Cellulose. *Angew Chem Int Edit* **2011**, *50*, 8688–8691. [[CrossRef](#)]
137. Jia, L.L.; Huang, X.Y.; Liang, H.E.; Tao, Q. Enhanced hydrophilic and antibacterial efficiencies by the synergistic effect TiO<sub>2</sub> nanofiber and graphene oxide in cellulose acetate nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *132*, 1039–1043. [[CrossRef](#)]
138. Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58. [[CrossRef](#)]
139. Stankova, L.; Fraczek-Szczypta, A.; Blazewicz, M.; Filova, E.; Blazewicz, S.; Lisa, V.; Bacakova, L. Human osteoblast-like MG 63 cells on polysulfone modified with carbon nanotubes or carbon nanohorns. *Carbon* **2014**, *67*, 578–591. [[CrossRef](#)]
140. Saito, T.; Kuramae, R.; Wohlert, J.; Berglund, L.A.; Isogai, A. An Ultrastrong Nanofibrillar Biomaterial: The Strength of Single Cellulose Nanofibrils Revealed via Sonication-Induced Fragmentation. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 248–253. [[CrossRef](#)]
141. Koga, H.; Saito, T.; Kitaoka, T.; Nogi, M.; Suganuma, K.; Isogai, A. Transparent, Conductive, and Printable Composites Consisting of TEMPO-Oxidized Nanocellulose and Carbon Nanotube. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1160–1165. [[CrossRef](#)]
142. Fang, W.; Linder, M.B.; Laaksonen, P. Modification of carbon nanotubes by amphiphilic glycosylated proteins. *J Colloid Interf Sci* **2018**, *512*, 318–324. [[CrossRef](#)]
143. Mougel, J.B.; Bertoini, P.; Cathala, B.; Chauvet, O.; Capron, I. Macroporous hybrid Pickering foams based on carbon nanotubes and cellulose nanocrystals. *J Colloid Interf Sci* **2019**, *544*, 78–87. [[CrossRef](#)]
144. Trigueiro, J.P.C.; Silva, G.G.; Pereira, F.V.; Lavall, R.L. Layer-by-layer assembled films of multi-walled carbon nanotubes with chitosan and cellulose nanocrystals. *J Colloid Interf Sci* **2014**, *432*, 214–220. [[CrossRef](#)]
145. Yang, X.; Shi, K.Y.; Zhitomirsky, I.; Cranston, E.D. Cellulose Nanocrystal Aerogels as Universal 3D Lightweight Substrates for Supercapacitor Materials. *Advanced Materials* **2015**, *27*, 6104–6109. [[CrossRef](#)]
146. ZabihiSahebi, A.; Koushkbaghi, S.; Pishnamazi, M.; Askari, A.; Khosravi, R.; Irani, M. Synthesis of cellulose acetate chitosan SWCNT Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> TiO<sub>2</sub> composite nanofibers for the removal of Cr(VI), As(V), Methylene blue and Congo red from aqueous solutions. *Int J Biol Macromol* **2019**, *140*, 1296–1304. [[CrossRef](#)]
147. Kang, Y.J.; Chun, S.J.; Lee, S.S.; Kim, B.Y.; Kim, J.H.; Chung, H.; Lee, S.Y.; Kim, W. All-solid-state flexible supercapacitors fabricated with bacterial nanocellulose papers, carbon nanotubes, and triblock-copolymer ion gels. *ACS Nano* **2012**, *6*, 6400–6406. [[CrossRef](#)]
148. Zhou, Y.; Lee, Y.; Sun, H.; Wallas, J.M.; George, S.M.; Xie, M. Coating Solution for High-Voltage Cathode: ALF<sub>3</sub> Atomic Layer Deposition for Freestanding LiCoO<sub>2</sub> Electrodes with High Energy Density and Excellent Flexibility. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 9614–9619. [[CrossRef](#)]
149. Gonzalez-Dominguez, J.M.; Anson-Casaos, A.; Grasa, L.; Abenia, L.; Salvador, A.; Colom, E.; Mesonero, J.E.; Garcia-Bordeje, J.E.; Benito, A.M.; Maser, W.K. Unique Properties and Behavior of Nonmercerized Type-II Cellulose Nanocrystals as Carbon Nanotube Biocompatible Dispersants. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3147–3160. [[CrossRef](#)]
150. Zhang, H.; Sun, X.; Hubbe, M.A.; Pal, L. Highly conductive carbon nanotubes and flexible cellulose nanofibers composite membranes with semi-interpenetrating networks structure. *Carbohydr Polym* **2019**, *222*, 115013. [[CrossRef](#)]
151. Zhai, Y.; Wang, D.; Liu, H.; Zeng, Y.; Yin, Z.; Li, L. Electrochemical Molecular Imprinted Sensors Based on Electrospun Nanofiber and Determination of Ascorbic Acid. *Anal Sci* **2015**, *31*, 793–798. [[CrossRef](#)]
152. Broz, A.; Bacakova, L.; Stenclova, P.; Kromka, A.; Potocky, S. Uptake and intracellular accumulation of diamond nanoparticles - a metabolic and cytotoxic study. *Beilstein J Nanotechnol* **2017**, *8*, 1649–1657. [[CrossRef](#)]
153. Williams, O.A. Ultrananocrystalline diamond for electronic applications. *Semicond Sci Tech* **2006**, *21*, R49–R56. [[CrossRef](#)]
154. Shenderova, O.A.; Gruen, D.M. *Ultrananocrystalline Diamond: Synthesis, Properties and Applications of UNCD*, 2nd ed.; Shenderova, O.A., Gruen, D.M., Eds.; William Andrew Publishing: Oxford, UK, 2012; p. 584. ISBN 9781437734652.

155. Mochalin, V.N.; Shenderova, O.; Ho, D.; Gogotsi, Y. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat Nanotechnol* **2011**, *7*, 11–23. [[CrossRef](#)]
156. Stankova, L.; Musilkova, J.; Broz, A.; Potocky, S.; Kromka, A.; Kozak, H.; Izak, T.; Artemenko, A.; Stranska, D.; Bacakova, L. Alterations to the adhesion, growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on nanofibrous polylactide scaffolds with diamond nanoparticles. *Diam Relat Mater* **2019**, *97*. [[CrossRef](#)]
157. Grausova, L.; Kromka, A.; Burdikova, Z.; Eckhardt, A.; Rezek, B.; Vacik, J.; Haenen, K.; Lisa, V.; Bacakova, L. Enhanced Growth and Osteogenic Differentiation of Human Osteoblast-Like Cells on Boron-Doped Nanocrystalline Diamond Thin Films. *PLoS ONE* **2011**, *6*. [[CrossRef](#)]
158. Liskova, J.; Babchenko, O.; Varga, M.; Kromka, A.; Hadraba, D.; Svindrych, Z.; Burdikova, Z.; Bacakova, L. Osteogenic cell differentiation on H-terminated and O-terminated nanocrystalline diamond films. *Int J Nanomed* **2015**, *10*, 869–884. [[CrossRef](#)]
159. Morimune-Moriya, S.; Salajkova, M.; Zhou, Q.; Nishino, T.; Berglund, L.A. Reinforcement Effects from Nanodiamond in Cellulose Nanofibril Films. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2423–2431. [[CrossRef](#)]
160. Juknius, T.; Ruzauskas, M.; Tamulevicius, T.; Siugzdiniene, R.; Jukniene, I.; Vasiliauskas, A.; Jurkeviciute, A.; Tamulevicius, S. Antimicrobial Properties of Diamond-Like Carbon Silver Nanocomposite Thin Films Deposited on Textiles: Towards Smart Bandages. *Materials* **2016**, *9*, 371. [[CrossRef](#)]
161. Yuan, F.S.; Huang, Y.; Fan, M.M.; Chen, C.T.; Qian, J.S.; Hao, Q.L.; Yang, J.Z.; Sun, D.P. N-Doped Carbon Nanofibrous Network Derived from Bacterial Cellulose for the Loading of Pt Nanoparticles for Methanol Oxidation Reaction. *Chem-Eur J* **2018**, *24*, 1844–1852. [[CrossRef](#)]
162. Li, S.; Wang, M.Y.; Luo, Y.; Huang, J.G. Bio-Inspired Hierarchical Nanofibrous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub>-Carbon Composite as a High-Performance Anode Material for Lithium-Ion Batteries. *ACS Appl Mater Inter* **2016**, *8*, 17343–17351. [[CrossRef](#)]
163. Celik, K.B.; Cengiz, E.C.; Sar, T.; Dursun, B.; Ozturk, O.; Akbas, M.Y.; Demir-Cakan, R. In-situ wrapping of tin oxide nanoparticles by bacterial cellulose derived carbon nanofibers and its application as freestanding interlayer in lithium sulfide based lithium-sulfur batteries. *J Colloid Interf Sci* **2018**, *530*, 137–145. [[CrossRef](#)]
164. Xu, J.C.; Rong, J.; Qiu, F.X.; Zhu, Y.; Mao, K.L.; Fang, Y.Y.; Yang, D.Y.; Zhang, T. Highly dispersive NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> nanoparticles anchored on nitrogen-doped carbon nanofibers for efficient hydrogen evolution reaction. *J Colloid Interf Sci* **2019**, *555*, 294–303. [[CrossRef](#)]
165. d’Amora, M.; Giordani, S. Carbon Nanomaterials for Nanomedicine. In *Micro and Nano Technologies*; Ciofani, G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 103–113. ISBN 978-0-12-814156-4. [[CrossRef](#)]
166. Chaudhuri, I.; Fruijtier-Polloth, C.; Ngiewih, Y.; Levy, L. Evaluating the evidence on genotoxicity and reproductive toxicity of carbon black: a critical review. *Crit Rev Toxicol* **2018**, *48*, 143–169. [[CrossRef](#)]
167. Niranjan, R.; Thakur, A.K. The Toxicological Mechanisms of Environmental Soot (Black Carbon) and Carbon Black: Focus on Oxidative Stress and Inflammatory Pathways. *Front Immunol* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
168. Zhu, Y.; Li, W.X.; Zhang, Y.; Li, J.; Liang, L.; Zhang, X.Z.; Chen, N.; Sun, Y.H.; Chen, W.; Tai, R.Z.; et al. Excessive Sodium Ions Delivered into Cells by Nanodiamonds: Implications for Tumor Therapy. *Small* **2012**, *8*, 1771–1779. [[CrossRef](#)]
169. Kovacs, T.; Naish, V.; O’Connor, B.; Blaise, C.; Gagne, F.; Hall, L.; Trudeau, V.; Martel, P. An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose (NCC). *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 255–270. [[CrossRef](#)]
170. Shvedova, A.A.; Kisin, E.R.; Yanamala, N.; Farcas, M.T.; Menas, A.L.; Williams, A.; Fournier, P.M.; Reynolds, J.S.; Gutkin, D.W.; Star, A.; et al. Gender differences in murine pulmonary responses elicited by cellulose nanocrystals. *Part Fibre Toxicol* **2016**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Sunasee, R.; Araoye, E.; Pyram, D.; Hemraz, U.D.; Boluk, Y.; Ckless, K. Cellulose nanocrystal cationic derivative induces NLRP3 inflammasome-dependent IL-1beta secretion associated with mitochondrial ROS production. *Biochem Biophys Res* **2015**, *4*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Ede, J.D.; Ong, K.J.; Goergen, M.; Rudie, A.; Pomeroy-Carter, C.A.; Shatkin, J.A. Risk Analysis of Cellulose Nanomaterials by Inhalation: Current State of Science. *Nanomaterials (Basel)* **2019**, *9*, 337. [[CrossRef](#)]
173. Przekora, A.; Vandrovcova, M.; Travnickova, M.; Pajorova, J.; Molitor, M.; Ginalska, G.; Bacakova, L. Evaluation of the potential of chitosan beta-1,3-glucan hydroxyapatite material as a scaffold for living bone graft production in vitro by comparison of ADSC and BMDSC behaviour on its surface. *Biomed Mater* **2017**, *12*, 015030. [[CrossRef](#)]

174. Bacakova, L.; Zarubova, J.; Travnickova, M.; Musilkova, J.; Pajorova, J.; Slepicka, P.; Kasalkova, N.S.; Svorcik, V.; Kolska, Z.; Motarjemi, H.; et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv* **2018**, *36*, 1111–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Filova, E.; Bullett, N.A.; Bacakova, L.; Grausova, L.; Haycock, J.W.; Hlucilova, J.; Klima, J.; Shard, A. Regionally-selective cell colonization of micropatterned surfaces prepared by plasma polymerization of acrylic acid and 1,7-octadiene. *Physiol Res* **2009**, *58*, 669–684.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Biomedical Materials



## PAPER

# Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies

### RECEIVED

1 July 2019

### REVISED

28 October 2019

### ACCEPTED FOR PUBLICATION

30 October 2019

### PUBLISHED

9 December 2019

Jana Musilkova<sup>1</sup>, Elena Filova<sup>1</sup> , Jan Pala<sup>2</sup>, Roman Matejka<sup>1,3</sup>, Daniel Hadraba<sup>1,4</sup>, David Vondrasek<sup>1</sup>, Ondrej Kaplan<sup>1</sup>, Tomas Riedel<sup>5</sup>, Eduard Brynda<sup>5</sup>, Johanka Kucerova<sup>5</sup>, Miroslav Konarik<sup>6</sup>, Frantisek Lopot<sup>4</sup>, Jan Pirk<sup>6</sup> and Lucie Bacakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Biomedical Technology, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Kladno, Czech Republic

<sup>4</sup> Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup> Institute of Macromolecular Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague 6, Czech Republic

<sup>6</sup> Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

E-mail: [elena.filova@fgu.cas.cz](mailto:elena.filova@fgu.cas.cz)

**Keywords:** fibronectin, human pericardium, genipin, glutaraldehyde, endothelial cells

## Abstract

Decellularized human pericardium is under study as an allogenic material for cardiovascular applications. The effects of crosslinking on the mechanical properties of decellularized pericardium were determined with a uniaxial tensile test, and the effects of crosslinking on the collagen structure of decellularized pericardium were determined by multiphoton microscopy. The viability of human umbilical vein endothelial cells seeded on decellularized human pericardium and on pericardium strongly and weakly crosslinked with glutaraldehyde and with genipin was evaluated by means of an MTS assay. The viability of the cells, measured by their metabolic activity, decreased considerably when the pericardium was crosslinked with glutaraldehyde. Conversely, the cell viability increased when the pericardium was crosslinked with genipin. Coating both non-modified pericardium and crosslinked pericardium with a fibrin mesh or with a mesh containing attached heparin and/or fibronectin led to a significant increase in cell viability. The highest degree of viability was attained for samples that were weakly crosslinked with genipin and modified by means of a fibrin and fibronectin coating. The results indicate a method by which *in vivo* endothelialization of human cardiac allografts or xenografts could potentially be encouraged.

## List of abbreviations

ABAM	antibiotic–antimycotic solution	MTA	cell metabolic activity
DP	decellularized human pericardium	MTS assay	CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay
Fb	fibrin	PBS	phosphate-buffered saline
Fbg	fibrinogen	SHG	second-harmonic generation microscopy
FS	fetal calf serum	SPR	surface plasmon resonance
FN	fibronectin	TB	Tris buffer
GA	glutaraldehyde	TPEF	two-photon autofluorescence microscopy
H	heparin		
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells		

## 1. Introduction

Allogenic human pericardium and xenogeneic pericardium are used as biomaterials for various applications in cardiovascular surgery [1]. The pericardia must be processed prior to implantation in order to reduce the immunological response of the recipient organism [2]. The traditional approach consists of treating commercially available cryopreserved human cardiac allografts (e.g. CryoLife) and xenografts [3] with glutaraldehyde (GA), which immobilizes the potential adverse effects of foreign cells, cell debris and potential donor-derived pathogens. The immunogenicity of the pericardia may also be reduced by decellularizing pericardial tissue, which results in a cell-free scaffold composed of generally less immunogenic extracellular matrix (ECM) proteins [4, 5]. Even following the removal of the cellular content, the tissue is often treated with GA. Cross-linking acts to block immunogenic cellular residues from remaining, in certain cases, within the decellularized tissue, improves the mechanical properties and enhances graft durability by reducing its biodegradability. However, GA-treated tissues are prone to calcification following long-term implantation [3, 4, 6]; moreover, GA fixation also fails to remove xeno-antigens such as the Gal $\alpha$ 1,3-Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R epitope [7], which is responsible for chronic rejection of xenogeneic implants. In addition, GA-fixed tissues lead to an increase in circulating cytotoxic T cells, helper T cells and anti-HLA antibodies [8, 9]. Inflammation processes induced by GA cytotoxicity are most likely involved in the calcification mechanism [4]. As with GA, the natural agent genipin crosslinks proteins by means of a reaction with amino groups; however, its cytotoxicity has been found to be approximately 10 000 times lower than that of GA [10]. An *in vivo* evaluation indicated that the degree of inflammatory reaction to genipin-fixed cellular and decellularized bovine pericardia was significantly lower than in GA-fixed pericardia [11]. Moreover, it has also been noted that inflammatory reactions to GA-fixed tissues lasted much longer, and the regeneration rate of genipin-fixed tissue was significantly faster.

In this study, the pericardium was decellularized, crosslinked with GA and genipin, and subsequently coated with fibrin (Fb) meshes. Then the meshes were modified by the attachment of heparin (H) and/or fibronectin (FN). The viability and metabolic activity of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) seeded on these samples were then assessed in order to determine a potential means by which the *in situ* endothelialization of non-autologous pericardial grafts might be encouraged.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical and biochemical substances

Glutaraldehyde (Polysciences, Inc., cat. no 00216) and genipin (Sigma, cat. no G4796) were employed for pericardial crosslinking. Sodium deoxycholate and DNase, fibrinogen (Fbg), thrombin, H and sodium periodate were purchased from Sigma. Antithrombin III was purchased from Chromogenix. Human plasma FN purified protein (cat. no FC010-100MG) was purchased from MERCK. The following buffers were used: phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, Sigma Aldrich, P4417-100TAB; Tris buffer (TB), 0.05 M, pH 7.4 with 0.1 M NaCl and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.01 M citrate buffer pH 4.0. HUVECs were obtained from Lonza, Switzerland (cat. no C2517A, passage 3).

### 2.2. Pericardial harvesting

Human pericardium was harvested from six patients during heart surgery. All the patients had signed an informed consent form prior to enrollment in the study. Pericardial patches were withdrawn from the anterior, i.e. mediastinal, portion of the pericardial sac, which is the most accessible part, in order to minimize potential surgical risks for the donors. Since closure of the pericardium is not a standard part of surgical management, the amount of pericardium that was removed would not cause problems for the patient. Scissors were used to minimize any damage to the edge of the pericardial sample (for the same reason, cauterization would be inadmissible). All the samples were gathered during elective cardiovascular procedures in the phase when the pericardial sac was open. The pericardial samples were harvested in a rectangular shape, where the longer side correlated with the long axis of the heart. Subsequently, these samples were cut into longitudinal samples parallel to the long heart axis (direction 1) and transverse samples perpendicular to the long heart axis (direction 2) with dimensions 5 mm  $\times$  35 mm. The size of the samples was chosen to achieve at least a 5:1 (length:width) ratio for the stress-strain relaxation uniaxial tensile test and for fixing in the machine. The study was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and the Thomayer Hospital in Prague (approval nos G 09-12-30, C.j. 2401/09 and G14-08-63, approved on 13 August 2014). The harvested pericardium was transported in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; all the chemicals were obtained from Sigma Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FS). The pericardial samples were subsequently frozen in DMEM supplemented with 10% dimethyl sulfoxide and 20% FS. The thawed samples were washed with PBS and were cut out before the experiments were performed.

### 2.3. Decellularized human pericardium (DP)

The human pericardium was washed in PBS and decellularized in 4% sodium deoxycholate for 48 h. Decellularization was performed via repeated (seven times) incubation in 4% sodium deoxycholate, on each occasion for 2 h at room temperature, followed by washing three times in PBS with 2.5% antibiotic–antimycotic solution (ABAM; Sigma); all the procedures were performed on a shaker (IKA MTS 2/4). The pericardium was stored overnight in PBS with 2.5% ABAM at 2 °C–8 °C. The pericardium was subsequently incubated in 20 mM Tris HCl buffer, pH 7.4 with DNase (17 U ml<sup>-1</sup>) for 2 h, and was washed with the buffer without the presence of DNase.

### 2.4. Modification of DP via crosslinking with GA and genipin

DP, DP crosslinked with 0.4 wt% GA, or DP crosslinked with 0.25 wt% genipin was used for all experiments. The samples intended for uniaxial tensile testing and multiphoton microscopy were crosslinked for 48 h, while those intended for measurements of the metabolic activity (MTA) of the seeded cells were crosslinked for 4 h (weak crosslinking) and for 48 h (strong crosslinking). All the samples were washed intensively with deionized water following crosslinking for cell culturing (60 min, water conductivity lower than 0.2  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , Goro, CR), after which the water was exchanged two or three times per day for a period of 1 week; 400 ml of deionized water was used for 20 cm<sup>2</sup> of pericardium.

### 2.5. Stress–strain relaxation uniaxial tensile test

Stress–strain relaxation testing was performed on the three groups of samples (unmodified DP, DP crosslinked with GA for 48 h, and DP crosslinked with genipin for 48 h; each group and each sample orientation  $n = 8$ ), using a customized uniaxial tensile instrument. The samples were dissected from the pericardium in two orthogonal directions. The width of the samples was extracted from camera images, and the thickness was extracted by confocal reflection microscopy (Leica TCS SPE confocal microscope,  $z$  scan mode, objective ACS APO 10 $\times$ /0.30; Leica Microsystems GmbH, Germany); the initial length  $l_0$  was defined by the distance between the grips. The uniaxial tensile instrument with the wet sample was placed on the stage of a microscope (Leica DMi8, Leica Microsystems) and was loaded with a linear ramp to 3% isometric strain (stepper actuators NEMA 8, Series 21000-N, maximum output force 45 N at speed 5.0 mm s<sup>-1</sup>, step size 3  $\mu\text{m}$ ; Servo-Drive s.r.o., Czech Republic). The isometric strain was increased successively every 40 s by 3% of the initial length. The whole stress–strain relaxation test was controlled by the LabView 2015 interface (National Instruments, USA). The force was detected using a semiconductor strain

gauge sensor (sensitivity 0.004 N, frequency 250 Hz; VTS Zlin s.r.o., Czech Republic).

The relaxation curve for each strain step was plotted against time, and the stress  $\sigma_0$  was selected as the residual stress at fully relaxed time  $\tau_\infty$ . The  $\sigma_0$  values (MPa) were plotted against particular strains in order to construct a stress–strain curve. The slope of the linear regression model  $\sigma_0(\varepsilon)$  was represented by the elastic modulus  $E$  of the sample. The data were tested for normality (Q–Q plot) and were statistically compared by means of the paired-sample  $t$ -test or a one-way ANOVA with Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc test. The data and statistical analyses were performed in Matlab 2017a (Mathworks, USA).

### 2.6. Multiphoton microscopy

At the end of each strain step, second-harmonic generation (SHG) microscopy images and two-photon autofluorescence (TPEF) microscopy images were acquired using a confocal microscope (Leica TCS SP8, objective HC PL FLUOTAR 10 $\times$ /0.30, Leica Microsystems) equipped with a mode-locked Ti:sapphire pulse laser (Chameleon Ultra, Coherent Inc., USA). The excitation wavelength was set at 860 nm. The SHG signal was detected using an HQ430/20 M-2P band pass filter (Chroma, USA) and the TPEF signal was detected using an HQ610/75 M band pass filter (Chroma) situated before the HyD-RLD non-descanned detectors (Leica). The images acquired in this way served for observing sample sliding and the internal reorganization of the collagen fibers. The signal for both channels was detected in all cases for the same parameters in the excitation and emission light beam path. The intensity of the signal was measured at three random locations over three different cycles of the stress–strain relaxation test. The number of human pericardial samples in each group was 16, i.e. 8 in one direction and 8 in the perpendicular direction. All the intensity data groups were tested for normality (Q–Q plot) and were compared by means of a one-way ANOVA test and the Tukey HSD post-hoc test.

### 2.7. Modification of DP and DP crosslinked with GA or genipin with a Fb mesh

The Fb mesh was grown from DP (Fb\_n), from DP strongly crosslinked for 48 h (Fb\_s) and from DP weakly crosslinked for 48 h (Fb\_w) via the catalytic action of surface-bound thrombin in an ambient Fbg solution, according to a previously published procedure [12, 13]. Briefly, the DP samples (0.8 cm  $\times$  1.2 cm) or the model surfaces were subsequently incubated with a Fbg solution (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  TB) for 90 min, in a thrombin solution (2.5 U ml<sup>-1</sup> TB) for 60 min and in a TB solution containing Fbg (500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and antithrombin III (0.5 U ml<sup>-1</sup>) for 150 min. The samples were washed thoroughly with TB between the individual stages. The Fb mesh on the DP cryocut slices (20  $\mu\text{m}$  thick) was visualized via

immunofluorescence staining. DP was incubated in a solution of 1% albumin with 0.1% Triton for 20 min, then washed in PBS, and was incubated in 1% Tween 20 for 20 min. After washing with PBS, DP was incubated overnight with polyclonal rabbit anti-human Fbg antibody (dilution 1:200; Dako Denmark A/S, Denmark) at 4 °C, followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated F(ab') fragment of goat anti-rabbit immunoglobulin G (H + L) (A11070, dilution 1:400; Thermo Fisher Scientific) at room temperature in the dark for 2 h, followed by washing three times with PBS. Images were then taken under a Leica SP8 AOBS WLL MP confocal microscope.

### 2.8. Attachment of chemically activated H to Fb-coated DP (Fb + H<sub>n</sub>), Fb-coated strongly crosslinked DP (Fb + H<sub>s</sub>) and Fb-coated weakly crosslinked DP (Fb + H<sub>w</sub>)

Activated H with pendant aldehyde groups along the H chain was prepared from native sodium heparin by means of sodium periodate oxidation, using a previously published procedure [14]. A solution of 35 mg of H in 2.0 ml PBS was added to 6 mg NaIO<sub>4</sub> in 0.5 ml of H<sub>2</sub>O and reacted in the dark at room temperature for 90 min. Subsequently, the solution was transferred to a 0.01 M citrate buffer, pH 4.0, and centrifuged three times at 7200 × g for 30 min in an Amicon Ultra-4 Centrifugal filter device. The DP-Fb sample was immediately incubated for 2 h with the activated H solution. Sodium cyanoborohydride (315 mg ml<sup>-1</sup>) in 1 M sodium hydroxide was then added to the solution, and incubation proceeded overnight at room temperature. The sample was washed with PBS on the following day. The activated H was attached to the Fb via covalent bonds between the H aldehyde groups and the Fb amine groups.

### 2.9. Attachment of FN to Fb-coated DP (Fb + FN<sub>n</sub>), Fb-coated DP with attached H (Fb + H + FN<sub>n</sub>), Fb-coated strongly crosslinked DP (Fb + FN<sub>s</sub>), Fb-coated weakly crosslinked DP (Fb + FN<sub>w</sub>), strongly crosslinked DP coated with FN and H (Fb + H + FN<sub>s</sub>) and weakly crosslinked DP coated with Fb and H (Fb + H + FN<sub>w</sub>)

FN was attached by incubating the samples with a FN solution (50 μg ml<sup>-1</sup> PBS) at room temperature overnight. The modified and non-modified DP samples were thoroughly rinsed with PBS and were sterilized by means of UV radiation for 30 min. Modifications of human pericardium by decellularization, crosslinking and by coating with protein layers, and methods of pericardium evaluation is shown in Scheme 1.

### 2.10. Surface plasmon resonance (SPR)

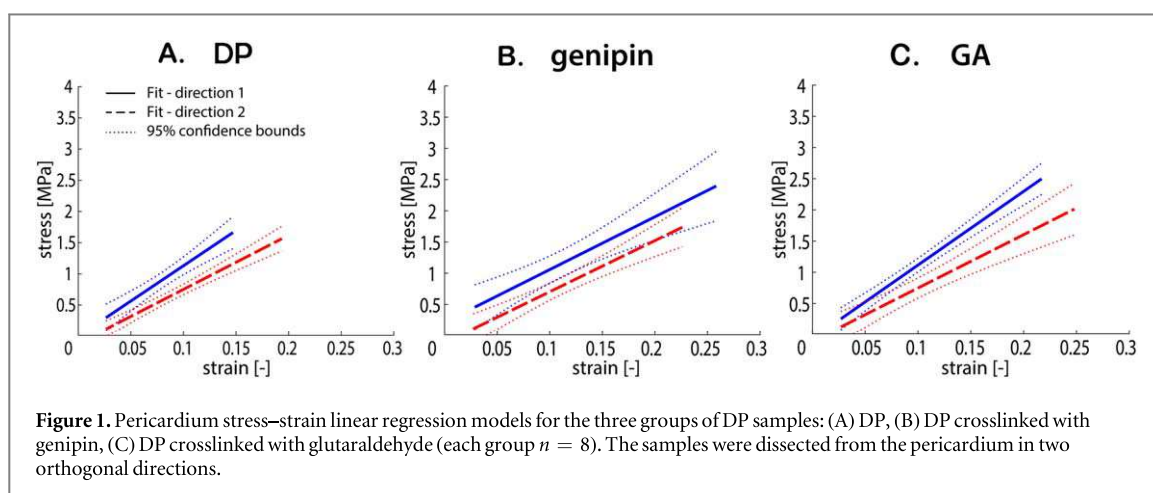
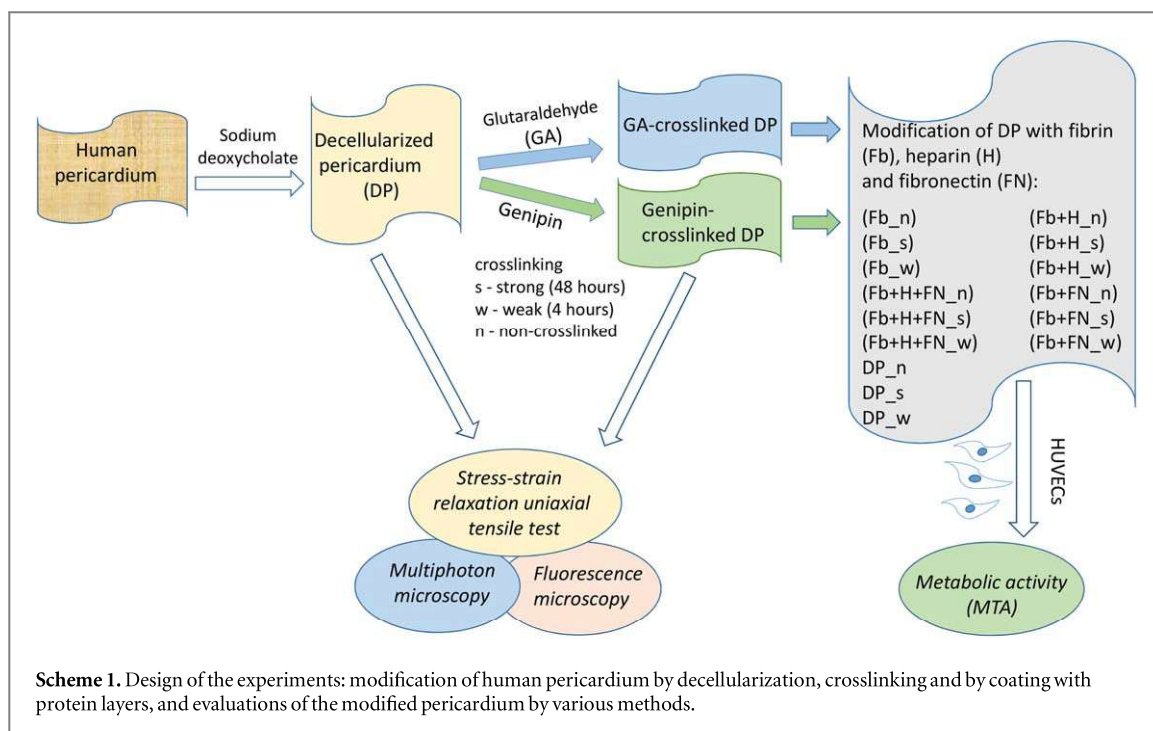
The attachment of H and FN to a Fb mesh prepared on the gold surface of SPR chips was observed *in situ* using an SPR instrument designed by the Institute of Photonics and Electronics (Prague, Czech Republic) based on

the wavelength spectroscopy of surface plasmons and the attenuated total reflection method [15]. Changes in the mass attached to the surface induced changes in the SPR resonance wavelength; an increase in wavelength of 1 nm corresponded to an increase in the mass of the attached proteins of around 15 ng cm<sup>-2</sup>.

### 2.11. MTA of HUVECs seeded on DP and DP modified via crosslinking with GA or with genipin, coating with Fb, and via the attachment of H and FN

Samples of DP and modified DP (sample 2 cm<sup>2</sup> in area) were placed in a 12-well culture dish (TPP, Switzerland), fixed with Cell Crown holders (Scaffdex Ltd, Finland) and seeded with HUVECs at a density of 60 000 cells per well in EGM medium (Lonza) with 2% FS. The smooth and fat-free inner surface of the pericardium (i.e. the surface oriented towards the heart) was then seeded with the cells. Each pericardial modification was seeded with cells in triplicate—quintuplicate for GA, and in quadruplicate—sextuplicate for genipin from various patients. Tissue culture polystyrene was used as the control. HUVECs were seeded on the samples as follows: unmodified DP coated with Fb and FN (Fb + FN<sub>n</sub>), DP strongly crosslinked for 48 h and coated with Fb and FN (Fb + FN<sub>s</sub>), DP weakly crosslinked for 4 h and coated with Fb and FN (Fb + FN<sub>w</sub>), unmodified DP coated with Fb, H and FN (Fb + H + FN<sub>n</sub>), DP strongly crosslinked for 48 h and coated with Fb, H and FN (Fb + H + FN<sub>s</sub>), DP weakly crosslinked for 4 h and coated with Fb, H and FN (Fb + H + FN<sub>w</sub>), unmodified DP coated with Fb and H (Fb + H<sub>n</sub>), DP strongly crosslinked for 48 h and coated with Fb and H (Fb + H<sub>s</sub>), DP weakly crosslinked for 4 h and coated with Fb and H (Fb + H<sub>w</sub>), unmodified DP coated with Fb (Fb<sub>n</sub>), DP strongly crosslinked for 48 h and coated with Fb (Fb<sub>s</sub>), DP weakly crosslinked for 4 h and coated with Fb (Fb<sub>w</sub>), unmodified DP (DP<sub>n</sub>), DP strongly crosslinked for 48 h (DP<sub>s</sub>) and DP weakly crosslinked for 4 h (DP<sub>w</sub>).

MTA was measured on day 4 using the CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (MTS assay, Promega) according to the manufacturer's instructions. The principle of this assay consists of converting a tetrazolium compound into a water-soluble formazan product via the dehydrogenase enzymes present in metabolically active (and thus viable) cells. The formazan product is then detectable in the cell culture media via spectrophotometry. Briefly, 0.2 ml CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Reagent was added to 1 ml of the cell culture medium and was incubated for 75 min at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Absorbance was measured in 96-well plates (F 96 Maxisorp, NUNC Imuno-plate) using a Versa Max microplate reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) at 490 nm and 660 nm (the control wavelength).



### 3. Results

#### 3.1. Mechanical properties and multiphoton microscopy of DP and DP crosslinked with genipin or with GA

The samples in the three groups (DP, genipin-crosslinked DP and GA-crosslinked DP) displayed a mechanically isotropic response (figure 1). No significant change was detected with respect to stiffness between the groups; however, table 1 indicates a lower elastic modulus in tension of genipin-crosslinked DP than of DP and GA-crosslinked DP.

In the multiphoton microscopy images, the TPEF signal was found to be strongest for genipin-crosslinked DP [DP:genipin:GA = 1:15:3 (au)]. A significant difference was determined between the TPEF signal for genipin and for the DP groups ( $p < 0.001$ ) and for genipin and the GA groups ( $p < 0.001$ ), respectively. The SHG signal (figure 2) was strongest

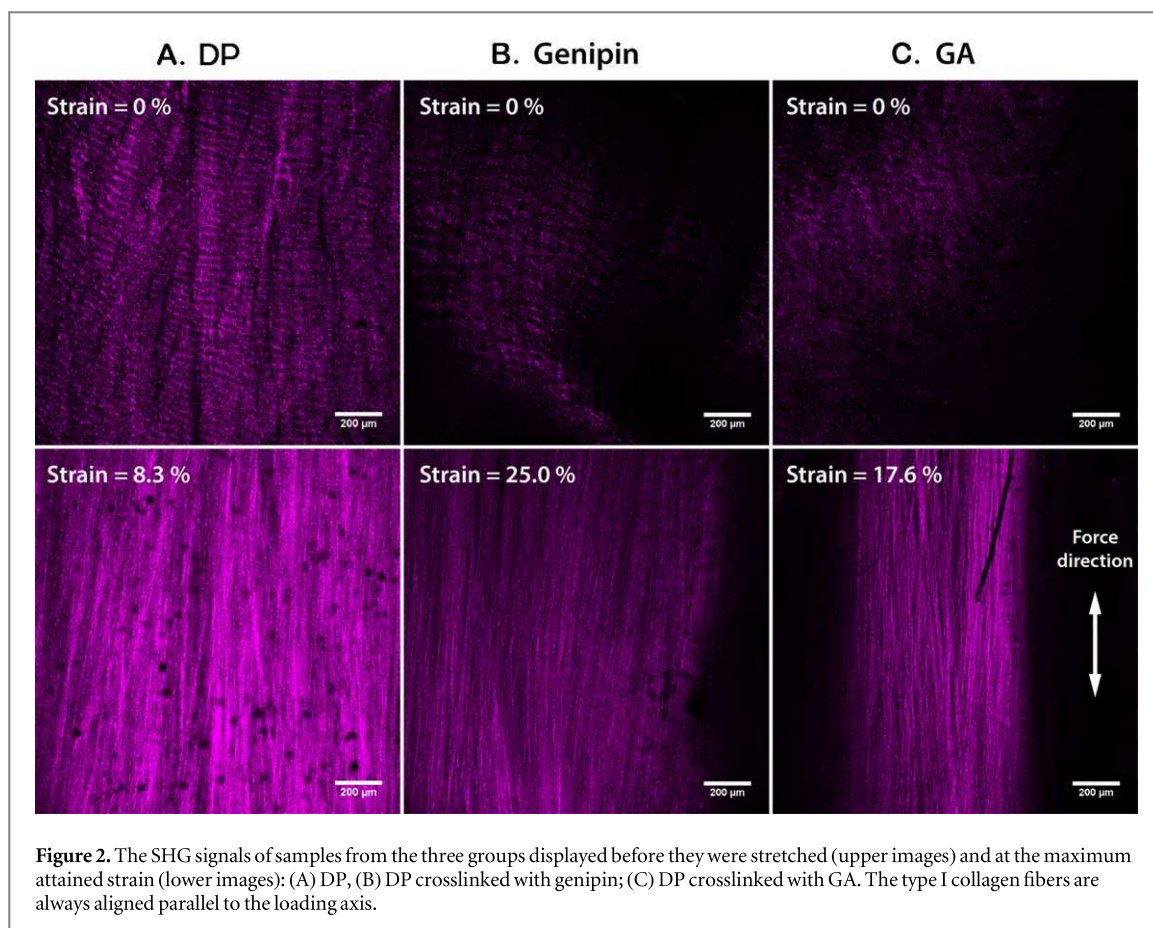
**Table 1.** The elastic modulus  $E$  of the linear regression model with the standard error of the regression.

Group	Direction 1	Direction 2	
	$E$ (MPa $\pm$ SE)	Group	$E$ (MPa $\pm$ SE)
DP	$11.30 \pm 1.6$	DP	$8.67 \pm 0.8$
Genipin	$8.46 \pm 1.7$	Genipin	$8.20 \pm 1.2$
GA	$11.76 \pm 0.9$	GA	$8.51 \pm 1.3$

No significant difference was detected between the directions or groups (the minimum obtained  $p$ -value = 0.1805). Although the maximum stress attained following the final strain cycle did not differ significantly between most of the groups (a significant difference was detected only between the DP and the genipin-crosslinked DP,  $p$ -value = 0.020) (table 2), there was a tendency towards obtaining higher values for crosslinking.

for the DP group [DP:genipin:GA = 2.8:1.0:1.5 (au)]. A significant difference was determined between the SHG signals of the DP and genipin groups ( $p = 0.001$ )





**Figure 2.** The SHG signals of samples from the three groups displayed before they were stretched (upper images) and at the maximum attained strain (lower images): (A) DP, (B) DP crosslinked with genipin; (C) DP crosslinked with GA. The type I collagen fibers are always aligned parallel to the loading axis.

**Table 2.** The maximum stress measured at the end of the final strain increase. The data are stated in the form of means with the mean standard error and post-hoc comparison  $p$ -values.

Maximum stress (MPa)			Maximum strain (–)		
Group	Mean $\pm$ SE	$p$ -value	Group	Mean $\pm$ SE	$p$ -value
DP	0.92 $\pm$ 0.13		DP	0.13 $\pm$ 0.01	
Genipin	1.44 $\pm$ 0.16		Genipin	0.18 $\pm$ 0.01	
GA	1.27 $\pm$ 0.21		GA	0.15 $\pm$ 0.02	
DP:genipin		0.130	DP:genipin		<b>0.020</b>
DP:GA		0.488	DP:GA		0.427
Genipin:GA		0.710	Genipin:GA		0.336

and between the DP and GA groups ( $p = 0.007$ ), respectively. After adopting the SAAID index [SAAID = (SHG – TPEF)/(SHG + TPEF)], which is used for indexing dermis aging based on the collagen-to-elastic ratio, the strong increase in autofluorescence in the genipin group led to a negative index value [ $-0.82 \pm 0.08$  ( $\pm$ SD)], while the lack of autofluorescence in the DP group led to a positive index value ( $0.60 \pm 0.16$ ); moreover, the SHG and TPEF signals for the GA group attained similar values, i.e. a SAAID of close to zero ( $-0.11 \pm 0.23$ ). A significant difference was determined for all the groups ( $p < 0.001$ ).

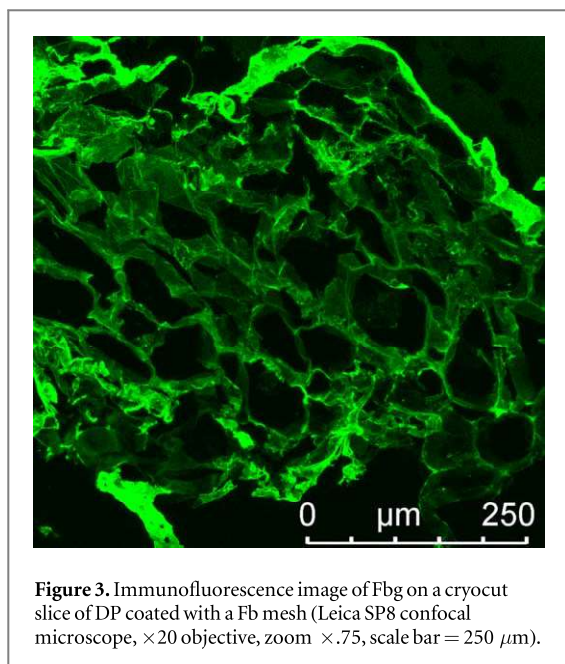
### 3.2. Coating DP with a Fb mesh

Figure 3 shows a confocal microscope image of immunofluorescence-stained Fbg on cryocut slices of

DP coated with Fb mesh prepared by the procedure described in section 2.7. In addition to the dense Fb mesh on the DP surface, Fb was formed via penetration of the solutions used for preparation of Fb inside the DP structure.

### 3.3. Attachment of H and FN to a Fb mesh prepared on a model surfaces (glass or gold)

The mass of Fb of  $3800 \text{ ng cm}^{-2}$  contained in the mesh prepared on glass was determined by means of a Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) (Fb). Around  $600 \text{ ng cm}^{-2}$  of H (determined using the colorimetric method from [16]) was attached to the Fb mesh prepared on glass when the mesh was incubated with chemically activated H using the procedure applied to the DP (Fb + H). The attachment of FN to



**Figure 3.** Immunofluorescence image of Fbg on a cryocut slice of DP coated with a Fb mesh (Leica SP8 confocal microscope,  $\times 20$  objective, zoom  $\times .75$ , scale bar = 250  $\mu\text{m}$ ).

the Fb mesh (1500  $\text{ng cm}^{-2}$  of Fb via the BCA Protein Assay) prepared on a gold SPR chip, and to the mesh with immobilized H, is shown in figure 4, curves 1 and 2, respectively. The mass of FN attached to the Fb–H coating (180  $\text{ng cm}^{-2}$  by SPR) after 30 min was considerably higher than the mass attached to the Fb-only coating (23  $\text{ng cm}^{-2}$ ). The non-covalent bonds of FN via the FN–H binding sites [17] appeared to be much more effective than the non-covalent bonds of FN via the FN–Fb binding sites [18].

### 3.4. MTA of HUVECs on day 4 after seeding on DP and on DP modified by crosslinking with GA or with genipin and further modified by coating with a Fb mesh and by the attachment of H and FN

The results are shown in figure 5, to which this discussion refers. GA crosslinking (a): with the exception of column 5, all black and gray columns are significantly lower than the empty columns, indicating that crosslinking with GA decreased the MTA of HUVECs seeded on all the samples. A statistically significant increase in MTA was obtained when DP was weakly crosslinked with GA and coated with Fb and FN (column 5, Fb + FN\_w) compared with all other columns, except for column 16 (PS).

Genipin crosslinking (b): empty column 3 (DP\_n) is significantly lower than all black or gray columns, indicating that genipin crosslinking increased the MTA of HUVECs seeded on all the samples. The MTA of HUVECs seeded on DP weakly crosslinked with genipin was significantly higher than the value on strongly crosslinked DP. The significantly highest MTA was obtained when HUVECs were seeded on DP weakly crosslinked with genipin and coated with Fb and FN (column 5: Fb + FN\_n) compared with all other columns.

## 4. Discussion

### 4.1. The structure of DP and DP crosslinked with GA or with genipin

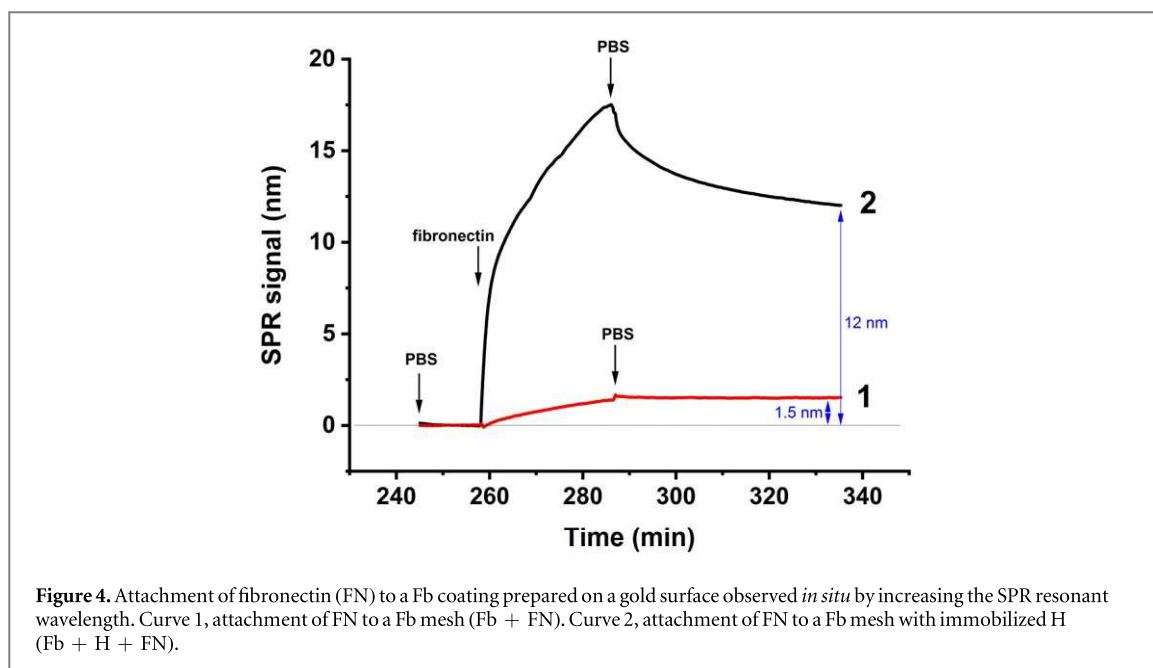
A sharp increase in autofluorescence in the genipin group was expected as the genipin fluorescence emission maximum decreases at 630 nm [19]. However, the fluorescence emission maximum of GA occupies 560 nm [19] and, therefore, only a part of the GA emission spectrum reached the dedicated detector. The very low or zero autofluorescence signal suggests a minimum presence of intrinsic fluorophores in the selected spectrum, for example elastic fibers.

The SHG signal of the genipin group was barely detectable, in contrast to autofluorescence, which is consistent with the knowledge obtained when studying collagen hydrogels, i.e. that genipin induces possible remodeling of the collagen microstructure, which lowers the SHG signal [20, 21]. Although the SHG signal of GA also differed significantly from the DP group, the difference was one order of magnitude lower than for genipin, using the DP group comparison. This difference may have been caused by the orientation isotropy levels of the collagen fibers in the samples and, thus, by the differing SHG intensity when interacting with linearly polarized light in a certain directionality rather than the GA treatment.

### 4.2. Mechanical properties of the modified DP

The elastic moduli of the GA and genipin groups indicated no significant changes in the stiffness of the ECM. Zhai *et al* [22] drew the same conclusion for a porcine heart valve ECM treated with GA; however, Gao *et al* [23] reported a significant increase in the elastic modulus during compression and tensile testing on GA-treated porcine menisci [23]. Similar disagreement is evident when one compares the published elastic moduli of genipin-treated tissue. Sun stated that the elastic modulus of genipin-treated tracheas was significantly higher ( $2.06 \pm 0.18$  MPa) than that of decellularized tissues ( $1.43 \pm 0.12$  MPa) [24]; however, a study by Sung revealed a decrease in this parameter following genipin crosslinking [25]. These contradictory results may have been due to the use of different types of tissue and mechanical tests, due to the setting of the sample geometry, the decellularization methods employed, the percentage of crosslinking agents and/or individual variability.

When comparing the maximum attained stress–strain values, a clear trend was evident towards an increase in extensibility with crosslinking. This finding is in accordance with a previously published study [14, 25]. An increase in extensibility is usually assigned to tissue shrinkage following crosslinking. A similar phenomenon was also revealed for the maximum attained tensile strength, which increased following the use of crosslinking agents, albeit not significantly. In addition, the stress relaxation applied here provided



strain rate independence, and as a result the nature of the biological tissue can be described as viscoelastic.

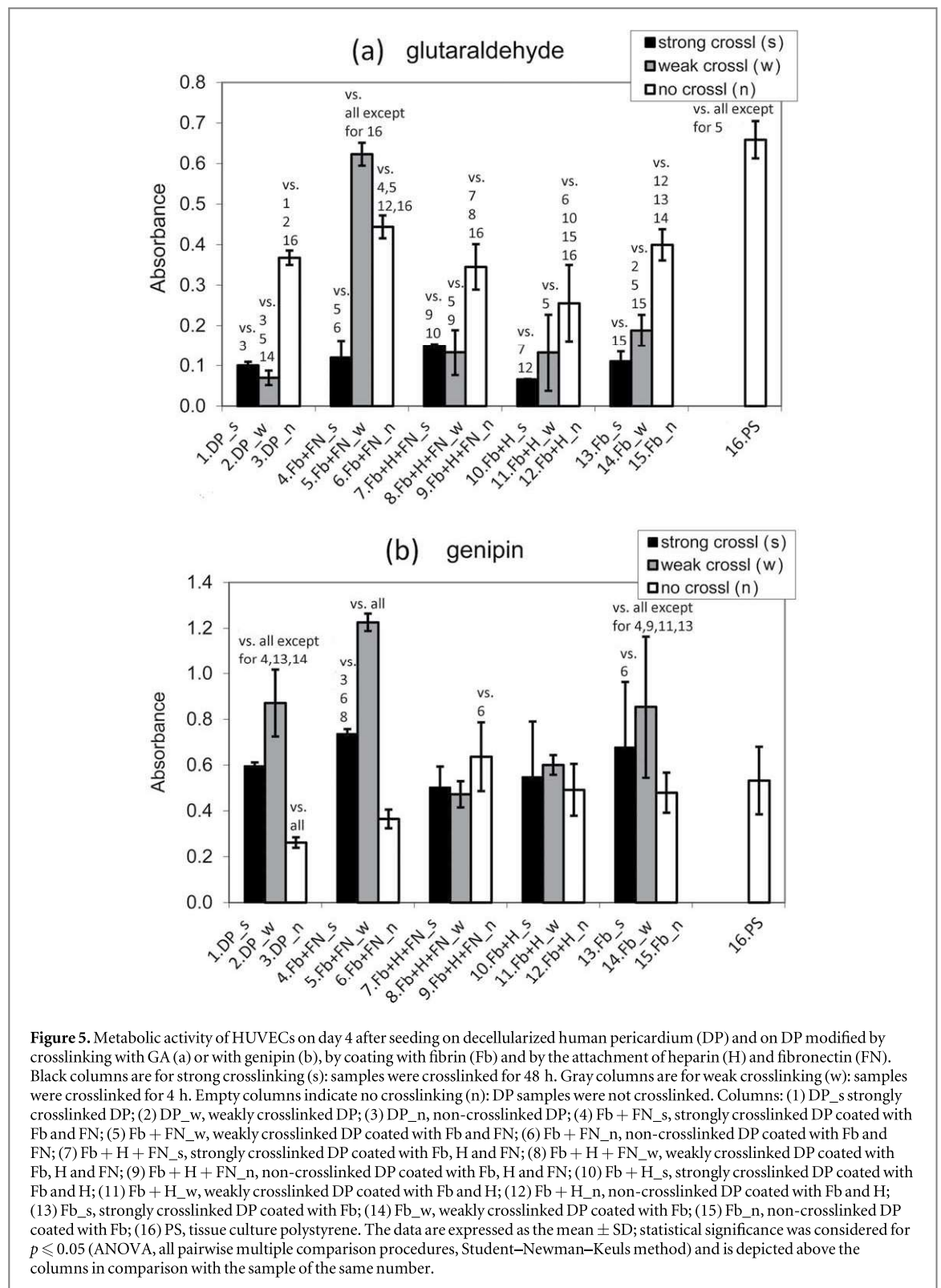
#### 4.3. The effect of GA and genipin crosslinking on the MTA of HUVECs seeded on DP

GA fixation is often used to improve the mechanical properties and durability of DP xenografts [26, 27]. As standard treatment with 0.4% GA for 48 h did not significantly change the mechanical properties of allogenic DP (section 4.2), we tested the effect of weaker GA crosslinking (for 4 h) on the MTA of HUVECs, assuming that the well-known GA cytotoxicity would be decreased while the mechanical properties would be unchanged. The exclusively negative effect of GA treatment on MTA (figure 5(a)) was probably due to the cytotoxic products formed in the DP by a reaction with GA that remained in the tissue even after 2 weeks of washing with PBS containing 0.2 M glycine. The seeded HUVECs may have been inhibited by cytotoxic structures that formed on the surface of the DP, or by compounds released into the culture medium. Even if no significant improvement in cytotoxicity was observed when DP weakly crosslinked with GA was used instead of strongly GA-crosslinked DP, extremely high MTA was observed on DP weakly crosslinked with GA and coated with a Fb + FN assembly (figure 5(a), column 5 versus column 4). The significantly positive effect of genipin crosslinking on MTA (figure 5(b)) may have been due to the fixation of certain cytotoxic compounds remaining in the DP after the decellularization procedure. A further positive effect of genipin crosslinking on the MTA of HUVECs may have been associated with remodeling the collagen structure at the DP surface, which was suggested by multiphoton microscopy and/or may have been associated with changes in the mechanical properties of the genipin-

crosslinked DP (sections 4.1 and 4.2), which is indicated by a lower elastic modulus in tension of genipin-crosslinked DP compared with DP and GA-crosslinked DP (table 1), and by a significantly lower maximum strain (table 2).

#### 4.4. The effect of biomolecular coatings on the MTA of HUVECs seeded on DP and DP crosslinked with GA and with genipin

Fb and FN are generally acknowledged to be biological macromolecules that potentially support endothelialization [28, 29]. The positive effects of immobilized H on the endothelialization of various surfaces have been described in several publications (e.g. [30]). A substantial improvement in blood compatibility and in the proliferation of vascular endothelial cells seeded *in vitro* was attained when sodium periodate-activated H was covalently attached to a Fb coating prepared on a PVC surface [1]. The highest and most statistically significant MTA values were obtained in this study via the coating of weakly crosslinked DP with the Fb + FN assembly; moreover, the Fb + FN coating even overcame the harmful effect of GA crosslinking, which was not affected by any of the other coatings. The significantly highest MTA value was attained for genipin-crosslinked DP coated with the Fb + FN assembly. Various coatings increased the cell MTA on the non-crosslinked DP without any significant differences between the individual biomolecular assemblies. Modifying DP by means of genipin crosslinking combined with Fb-based coating offers a potential means for stimulating the *in situ* endothelialization of non-autologous pericardial grafts. Although the MTA values on the DP modified by Fb + H and Fb + H + FN coatings were not as high as the value on the DP coated with Fb + FN, their previously reported [1] anticoagulation and anti-inflammatory



properties [1] may be capable of suppressing blood coagulation prior to graft endothelialization.

## 5. Conclusion

This study has investigated the effects of crosslinking with glutaraldehyde (GA) and genipin on the mechanical properties of decellularized human pericardium

(DP) and on the DP fibrous structure, and the effects of various biomolecular coatings on the viability/cell metabolic activity (MTA) of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) seeded on the surfaces of DP and crosslinked DPs.

The significant changes in the maximum stress attained following the final strain cycle indicated that the mechanical properties of the DP changed after crosslinking with genipin. Similarly, significant

changes in the DP surface morphology were observed via multiphoton microscopy after crosslinking with genipin.

The usual cytotoxicity of GA crosslinking was confirmed by the significant decrease in MTA on strongly and weakly crosslinked DP. However, the MTA of HUVECs increased significantly if DP was crosslinked with genipin.

The increase of MTA for DP weakly crosslinked with genipin was significantly higher than the increase on the strongly crosslinked DP.

The surprising increase in the MTA may be associated with the observed changes in the surface morphology and the mechanical properties of the genipin-crosslinked DP.

The highest and most statistically significant MTA values were obtained in this study when weakly crosslinked DP was coated with the fibrin + fibronectin assembly; in addition, the fibrin + fibronectin coating even overcame the harmful effect of GA crosslinking.

## Acknowledgments

The research was supported by the Czech Health Research Council, Ministry of Health of the Czech Republic, project no. 15-29153A. The authors thank Ivana Zajanova (Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Prague) for her assistance with immunofluorescence staining.

## ORCID iDs

Elena Filova  <https://orcid.org/0000-0001-6215-197X>

## References

- [1] Kaplan O et al 2017 *J. Biomed. Mater. Res. A* **105** 2995
- [2] Badyalak SF and Gilbert T W 2008 *Semin. Immunol.* **20** 109
- [3] Lee C, Lim H G, Lee C H and Kim Y J 2017 *Interact. Cardiovasc. Thoracic Surg.* **24** 402
- [4] Collatusso C, Roderjan J G, de Noronha L, Klosowski A, Suss P H, Guarita-Souza L C and Costa F D A D 2019 *Interact. Cardiovasc. Thoracic Surg.* **29** 302
- [5] Jonas R A 2014 *Comprehensive Surgical Management of Congenital Heart Disease* 2nd edn (London: CRC Press) pp 247–8
- [6] Lam M T and Wu J C 2012 *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **10** 1039
- [7] Konakci K Z et al 2005 *Eur. J. Clin. Invest.* **35** 2005
- [8] Vinci C et al 2013 *PLoS One* **8** e64769
- [9] Welters M J, Oei F B, Vaessen L M, Stegmann A P, Bogers A J and Weimar W 2001 *Clin. Exp. Immunol.* **124** 353
- [10] Sung H W, Huang R N, Huang L L H and Tsai C C 1999 *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **10** 63
- [11] Chang Y, Tsai C C, Liang H C and Sung H W 2002 *Biomaterials* **23** 2447
- [12] Riedel T, Brynda E, Dyr J E and Houska M 2009 *J. Biomed. Mater. Res. A* **88** 437
- [13] Riedelova-Reicheltova Z, Brynda E and Riedel T 2016 *Physiol. Res.* **65** (supplementum 2) S263-S272
- [14] Jayakrishnan A and Jameela S R 1996 *Biomaterials* **17** 471
- [15] Springer T, Piliarik M and Homola J 2010 *Anal. Bioanal. Chem.* **398** 1955
- [16] Smith P K, Mallia A K and Hermanson G T 1980 *Anal. Biochem.* **109** 466
- [17] Raitman I, Huang M L, Williams S A, Friedman B, Godula K and Schwarzbauer J E 2018 *Matrix Biol.* **67** 107
- [18] Makogonenko E, Tsurupa G, Ingham K and Medved L 2002 *Biochemistry* **41** 7907
- [19] Hwang Y J, Larsen J, Krasieva T B and Lyubovitsky J G 2011 *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3** 2579
- [20] Lang X, Spousta M J and Lyubovitsky J G 2015 *Proc. SPIE* **9329** 93293V
- [21] Collins J S and Goldsmith T H 1981 *J. Histochem. Cytochem.* **29** 411
- [22] Zhai W, Lü X, Chang J, Zhou Y and Zhang H 2010 *Acta Biomater.* **6** 389
- [23] Gao S, Yuan Z, Guo W, Chen M, Liu S, Xi T and Guo Q 2017 *Mater. Sci. Eng. C* **71** 891
- [24] Sun F et al 2016 *Sci. Rep.* **6** 24429
- [25] Sung H W, Chang W H, Ma C Y and Lee M H 2003 *J. Biomed. Mater. Res. A* **64** 427
- [26] Grefen L, König F, Grab M, Hagl C and Thierfelder N 2018 *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **29** 172
- [27] Liu J, Jing H M, Qin Y B, Li B H, Sun Z T, Kong D L, Leng X G and Wang Z H 2019 *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5** 1452
- [28] Barsotti M C, Felice F, Balbarini A and Di Stefano R 2011 *Biotechnol. Appl. Biochem.* **58** 301
- [29] Lenselink E A 2015 *Int. Wound J.* **12** 313
- [30] Ding Y H, Yang M, Yang Z L, Luo R F, Lu X, Huang N, Huang P B and Leng Y 2015 *Acta Biomater.* **15** 150

## Uniaxial Tensile Testing Device for Measuring Mechanical Properties of Biological Tissue with Stress-Relaxation Test under a Confocal Microscope

David Vondrášek<sup>1,2</sup>, Daniel Hadraba<sup>1,2</sup>, Roman Matějka<sup>2</sup>, František Lopot<sup>1</sup>, Martin Svoboda<sup>3</sup>, Karel Jelen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, Prague, Czech Republic, E-mail: david.vondrasek@fgu.cas.cz, daniel.hadraba@fgu.cas.cz, flopot@seznam.cz, jelen@ftvs.cuni.cz

<sup>2</sup>Institute of Physiology, Czech Academy, Prague, Czech Republic, E-mail: roman.matejka@fgu.cas.cz

<sup>3</sup>Faculty of Mechanical Engineering, Jan Evangelista Purkyně University in Ústí nad Labem, Pasteurova 1, Ústí nad Labem, Czech Republic, E-mail: martin.svoboda@ujep.cz

**Biological soft tissue is a non-linear and viscoelastic material and its mechanical properties can greatly affect quality of life. Many external mechanical factors can alter the tissue, for example the tissue of talipes equinovarus congenitus, also known as clubfoot, which is the most frequent congenital deformity affecting lower extremities with pathological changes of connective tissue. In clubfoot, the presence of disc-like mass of fibrous tissue, resembling intervertebral disc tissue, is described to be between the medial malleolus and the medial side of the navicular bone. The clubfoot tissue is often referred to be stiffer or rigid by clinicians, or it is referred to as contracted and less contracted tissue, however relevant evidence about mechanical properties is missing. Therefore, the description “disc-like” is informing only about relative mechanical properties of clubfoot tissue. We aim to prepare methodical approach to quantify mechanical properties of biological tissue with uniaxial tensile stress-relaxation test, in order to help clinicians and scientist to identify precisely the mechanical properties of normal and pathological tissue and their structural behaviour during mechanical testing. In this study, we test and tune the uniaxial tensile stress-relaxation test on biological tissue with high content of connective tissue such as collagen. The model tissue is porcine pericardium. The tissue has clear collagen fibres aligning parallel to the force applied. Modulus of elasticity measured here is comparable to other studies.**

**Keywords:** uniaxial tensile test, stress-relaxation test, biomechanical models, Maxwell-Wiechert’s model, talipes equinovarus congenitus, porcine pericardium, mechanical properties of biological tissues, fibroproliferative diseases

### 1 Introduction

Biological soft tissues are materials exhibiting viscoelastic and non-linear behaviour to mechanical stimuli [1]. Some natural tissues are being used due to this very behaviour in tissue engineering [2] and in engineering [3]. Various types of healthy soft tissues are being studied in regards to their mechanical properties, for example tendons [4], blood vessels [5], muscles [6], brain tissue [7] and eye cornea [8]. External mechanical stress can disrupt the soft tissue [9,10], creating abnormalities or forcing the body to start regenerative process [11]. Disruption in the regenerative process of connective tissue can occur [12]. One such disrupted connective tissue is localised at talipes equinovarus congenitus, also known as clubfoot [13,14]. Clubfoot, a severe congenital deformity observed at the area of the foot and lower leg [13,14], is in particular interesting, because it shows signs of fibrosis [12]. Fibrosis is defined as a process of healing damaged tissue, that has gone out of control and the connective tissue is excessively produced at the location of the process [11]. Fibrosis is apparent at medial side of the clubfoot [14], where extracellular matrix is abundant due to fibroproliferative cell activity [15]. Even though the aetiology of the anatomical abnormalities remains unclear, there are suggestions of mechanical causative [12]. It seems, that external forces might have caused the clubfoot deformity [16] with distinct anatomical abnormalities, which keep the foot in apparent supinated position [13].

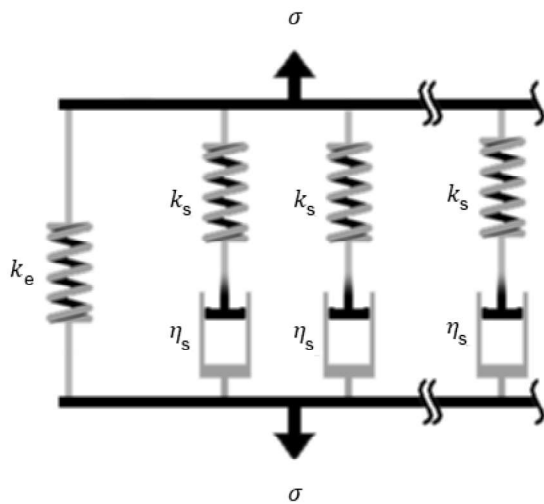
One important feature of the fibrotic tissue is its increased stiffness compared to other tissue textures [11].

Fibrotic tissue is located on the medial side of the clubfoot, where the tissue is contracted with maximally contracted part being localized between the medial malleolus and the medial side of the navicular bone, while the lateral side of the clubfoot is elongated [14]. Maximally contracted part of the clubfoot, known as ‘disc-like tissue’, is macroscopically different from surrounding tissue in terms of stiffness, in which it is similar to intervertebral disks [14]. The clubfoot tissue is often referred to be stiffer or rigid by clinicians [17], or it is referred to as contracted and less contracted tissue [18]. Almost all of the clubfoot’s connective tissue is under mechanical tension [14], however quantitative data about clubfoot’s mechanical properties is absent. Increasing diameter of the connective tissue due to proliferation and deposition of extracellular matrix would result in stiffness [19]. However the increase in stiffness would be only relative to the diameter of the tissue, meaning that once normalised, a same amount of tensile stress would be required [20]. On the other hand, if cross-links in the pathological tissue were formed, they could contribute to the stiffness and so mechanical properties of the tissue would change even after normalisation compared with normal state [19]. Therefore, both proper modelling of mechanical behaviour and visualisation are required to uncover properly mechanical properties of an observed tissue.

Looking at stiffness and rigidity of both normal and abnormal soft tissue, we have to always consider its extracellular matrix, to which mechanical properties are tight to [21]. In general, extracellular matrix consists of collagen amongst other proteins [21]. Fibrillary collagen

is in particular interesting due to its non-centrosymmetric structure, which is suitable for label-free second harmonic generation microscopy [22]. Second harmonic generation microscopy (SHG) is used to visualize biological tissues, in our case type I and II collagen fibrils [22], without introducing artifacts to the structures by fluorescent staining [23]. Type I collagen fibrils, main component of connective tissue [22], are thick with diameter close to the resolution limits of visible light [24].

Describing the full behaviour of soft tissue requires nonlinear viscoelastic models [1], however linear assumptions can be applied over a narrow band of stress, where equal stress causes equal strains [25]. Extracellular matrix within soft tissue is viscoelastic, therefore its mechanical properties are time/frequency dependent [21]. Time/frequency dependent behaviour of biological tissue can be demonstrated by applying fixed external stress to the tissue and observe a decrease of the initial stress generated within the tissue over time [21]. This is known as stress-relaxation test [21].



**Fig. 1** Maxwell-Wiechert's model for materials with linear mechanical response to external stress.

Viscoelastic behaviour of biological tissue can be modelled for example by using Maxwell-Wiechert's model, also known as generalized Maxwell model [26] (Fig. 1). This model is normally used only for linear behaviour of the biological tissue under isothermal conditions [1]. In the model, a spring is connected in parallel with several Maxwell models, which uses springs and dashpot connected in series to describe viscoelastic behaviour [26]. When elastic elements are modelled as springs with constant stiffness, the mechanical response of the elastic component is described by an equation:

$$\sigma_s = k\epsilon \quad (1)$$

where  $\sigma$  represent a stress in the tissue and  $\epsilon$  displacement or constant strain level, while  $k$  is constant, analogous to the Young's modulus  $E$  [4,26]. Viscose elements are modelled as dashpots and described by an equation:

$$\sigma_d = \eta \dot{\epsilon} \quad (2)$$

where  $\eta$  is viscosity and  $\dot{\epsilon}$  is time derivative of strain (velocity of deformation). The strain of the Maxwell model is equal to the sum of strain  $\epsilon_s$  of the spring and the strain  $\epsilon_d$  of the dashpot:

$$\epsilon = \epsilon_s + \epsilon_d \quad (3)$$

while the stress of the Maxwell model is the same for the spring  $\sigma_s$  and for the dashpot  $\sigma_d$ :

$$\sigma = \sigma_s + \sigma_d \quad (4)$$

When the Maxwell model is connected in parallel with an arm containing another spring, the stress of the model is equal to the sum of the stress  $\sigma_m$  in Maxwell model arm with the stress  $\sigma_e$  in parallel spring arm:

$$\sigma = \sigma_m + \sigma_e \quad (5)$$

where  $\sigma_e$  is defined formally with the same relationship as in (1) with its own stiffness (modulus of elasticity). This is an equation for Maxwell-Wiechert's model with only one Maxwell model arm, which has been used in this study. Because both arms of the model are connected in parallel, both of the arms of the model are deformed with the same strain:

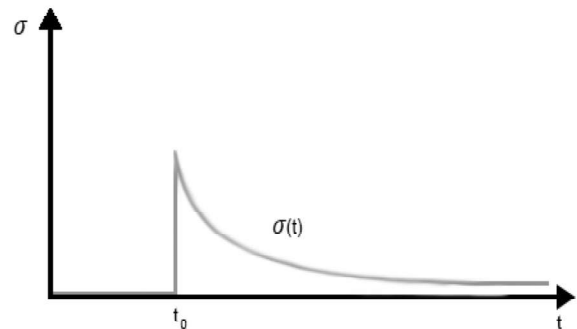
$$\epsilon = \epsilon_m + \epsilon_e \quad (6)$$

where  $\epsilon_m$  is a strain in Maxwell model arm and  $\epsilon_e$  is a strain in spring arm.

When the described model is used in stress-relaxation test with the relationships described so far, then the decrease of stress is described with equation:

$$\sigma = (\epsilon_0 \cdot k_e) + (\epsilon_0 \cdot k_s \cdot e^{-\frac{k_s}{\eta} \times t}) \quad (7)$$

where  $\epsilon_0$  is a strain at time  $t = 0$ ,  $k_e$  is modulus of elasticity in the parallel spring arm,  $k_s$  is modulus of elasticity in spring within Maxwell model arm,  $e$  is Euler's number and  $t$  is time. When the time is approaching the infinity (fully relaxed state), the residual stress is equal to the stress in the parallel spring, therefore only to the elastic element of the model. At the time  $t = 0$ , which is the time when we apply initial stress through deformation  $\epsilon_0$ , the stress is equal to the sum of parallel and serial stiffness (Fig. 2).



**Fig. 2** Stress-relaxation curve. After a sample-specific time, the sample relaxes.

The purpose of this study is to create methodical approach to quantify mechanical properties of connective tissue and soft tissue in general using stress-relaxation tensile testing with simultaneous visualization of the tissue using SHG microscopy. We expect that samples of connective tissue will not be showing increased stiffness with greater diameter, rather all the samples will require same amount of tensile stress after normalization to the diameter of the sample. This study is preliminary for testing pathological fibrous tissue of clubfoot.

## 2 Materials and methods

We used tissue model for uniaxial tensile stress-relaxation test. The tissue model used was porcine pericardium, which was decellularized using sodium dodecyl sulphate (SDS) with concentration of 0.5 %. Remaining SDS was washed out with phosphate-buffered saline (PBS). The tissue should retain its mechanical properties even without cells [27]. Altogether, we used 20 porcine pericardia (one individual), which were cut into rectangles with dimensions of 18.3 mm ( $\pm 2.2$  mm) x 2.5 mm ( $\pm 0.4$  cm). Two types of groups were created, rectangles with fibres perpendicular to the axis of cutting and rectangles with parallel fibres to the axis of cutting. The height of the samples was measured using reflectance mode of imaging on Leica SPE upright microscope, where we detected reflected light from the surface of rectangles and calculated their height comparing its position to the position of the reflected light from glass surface. The height of the samples was 0.283 mm ( $\pm 0.064$  mm) and the diameter of the pericardium was calculated. Diameter of perpendicular rectangles was 0.64 mm ( $\pm 0.15$  mm), while diameter of parallel rectangles was 0.75 mm ( $\pm 0.29$ ).

Pericardium rectangles were placed into uniaxial tensile device as shown in Fig. 3. Pericardium rectangles were placed into the jaw grips at 9 mm of starting length and were stretched at the rate of 0.201 mm/s with elongation being 3 % of starting length. Altogether, 25 cycles have been collected, unless tissue rupture has occurred. Between each cycle, we waited for 20 seconds for the tissue to relax, due to its viscosity, which appeared to be sufficient to get resting tension. This approach allowed us to separated response of the sample during constant tension into elastic component and viscose component. We modelled the mechanical response using generalised Maxwell-Wiechert's model with one Maxwell model arm (described above). The uniaxial testing device measured force response of the sample dependent on the stress. The measured force in the tissue was normalised by the diameter of the sample:

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{A_0} \quad (8)$$

where  $F(t)$  is the immediate force and  $A_0$  is the cross-sectional area of the pericardium before stress loading the sample. Because the focus of the experiment was the modulus of elasticity, the parameter of the elastic component of the sample, we used the following equation:

$$\sigma = E \quad (9)$$

where  $E$  is the Young's modulus of elasticity and  $\epsilon$  is a deformation of the sample  $l$  relative to the previous length  $l_0$ :

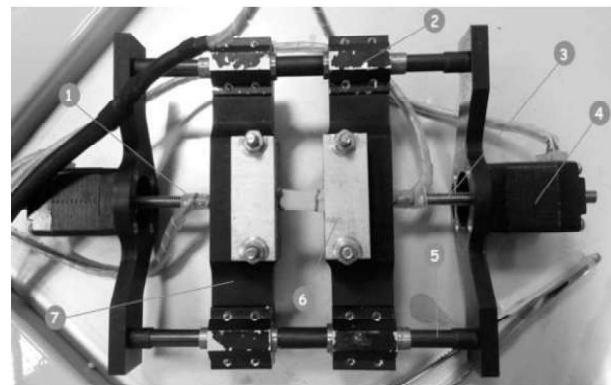
$$\epsilon = \frac{l}{l_0} \quad (10)$$

Viscose component as a time dependent component is only present as a decrease in the tension within the sample during relaxation until the forces in the sample settle down. Looking at equation (7), at the time  $t = 0$ , the viscose element is not contributing to the tension of the Maxwell-Wiechert's model and only the spring of the Maxwell model arm with parallel spring are contributing to

the tension. After initial deformation was applied, the sample starts to relax (decrease in tension), because the dashpot is now active. When the forces in the sample settle down, then only the elastic component of the parallel spring is contributing to the resting tension. The elastic component is dependent only on the value of initial stress applied, and not on time. We have evaluated Young's modulus of elasticity, in order to compare the elastic mechanical response of the sample to literature. The data to calculate Young's modulus were obtained from charts containing resting tension plotted against elongation of the sample, which was fitted by linear regression.

Uniaxial tensile device used during testing was self-assembled. The base of the device is two carrying heads with stepper motors, which are moving alongside screw-threaded leading poles. Screw-threaded leading poles are connected to jaws carrying jaw grips for sample placement. Motors are moving against each other and final position of the sample remains unchanged relative to the solid construction of the uniaxial tensile device. Unchanged position of the sample allows placing the device under either upright or inverted microscope and observes the changes with sample's structure "on-line". Small dimensions of the device are compatible with the microscope being used in this study, while using air objective HC PL FLUOTAR 10x/0.30 NA with working distance of 11 mm. Mechanical data were collected using Lab-View software and were processed in Excel and Matlab.

We used ARDUINO to control the motors and to collect the data from sensors with combination of factory drivers of motors. The minimal step of the jaw's positioning is 0.005 mm. The maximum force of the device is 80 N at the rate of the movement ranging from 0.02 to 1.2 mm/s.



**Fig. 3** Uniaxial tensile device. 1) Force sensor, 2) jaw carrier, 3) screw-threaded leading pole for motors, 4) motor, 5) leading pole, 6) jaw grip, 7) jaws.

During the relaxing period of the tissue, we collected image data from the samples. Images were collected with Leica SP8 AOBs WLL MP inverted microscope. Multiphoton laser, Chameleon Ultra I (Coherent Inc., CA) was used to generate SHG signal. SHG signal was collected on non-descanned hybrid detectors with superior signal-to-noise ratio. Laser was tuned to 860 nm and emitted light was collected using a bandpass filter 430DF15 for SHG signal and 610/75 for tissue autofluorescence. Image data were processed in ImageJ/Fiji.



### 3 Results and discussion

Visual data suggest that during stretching of the samples, fibres always align parallel to the force direction

(Fig. 4 and Fig. 5). Autofluorescence of the samples was mostly absent. It seems that pericardium tissue exhibits optical anisotropy, when comparing parallel and perpendicular rectangles.

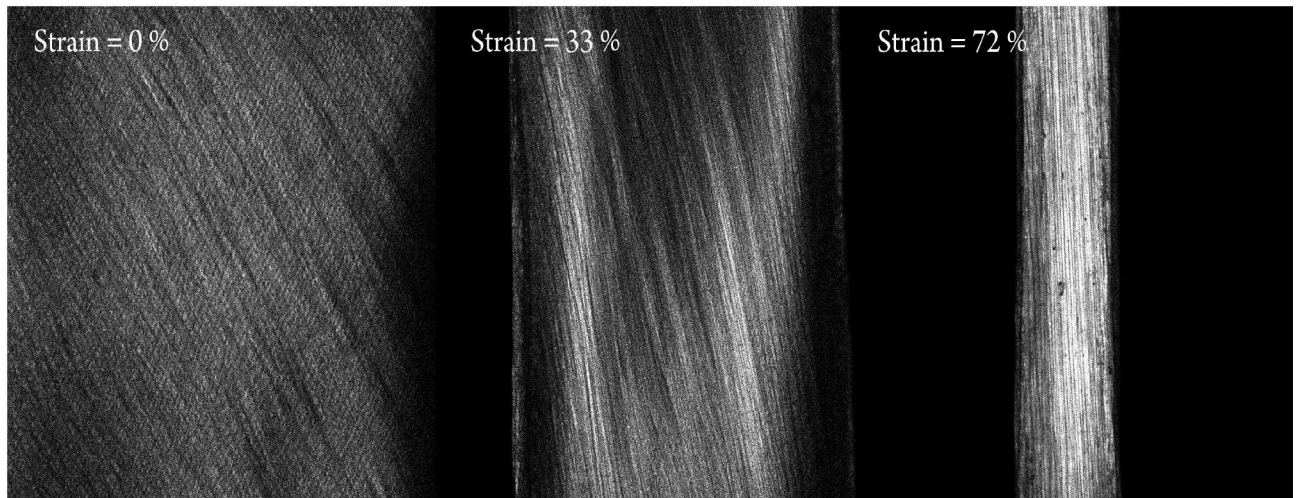


Fig. 4 Representative pericardium sample, from group of parallel rectangles, three image sequence dependent on the strain applied.

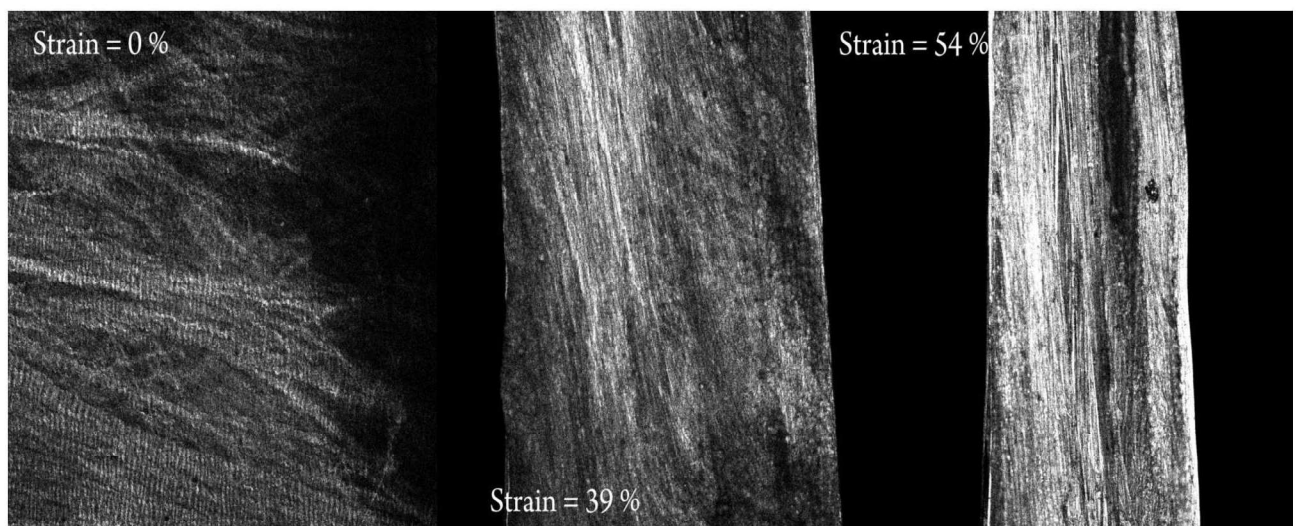


Fig. 5 Representative pericardium sample, from group of perpendicular rectangles, three image sequence dependent on the strain applied.

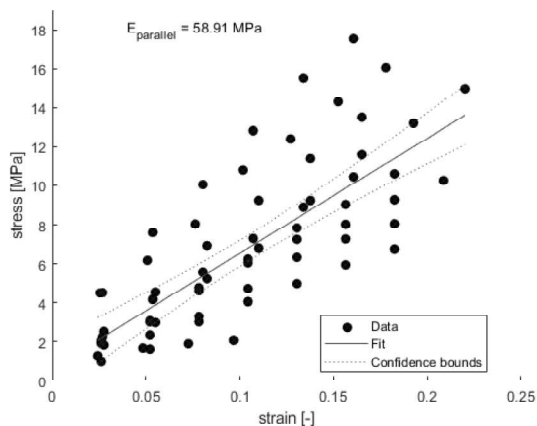


Fig. 6 Young's modulus of elasticity in pericardium with parallel oriented fibres. Red line is fitting the data.

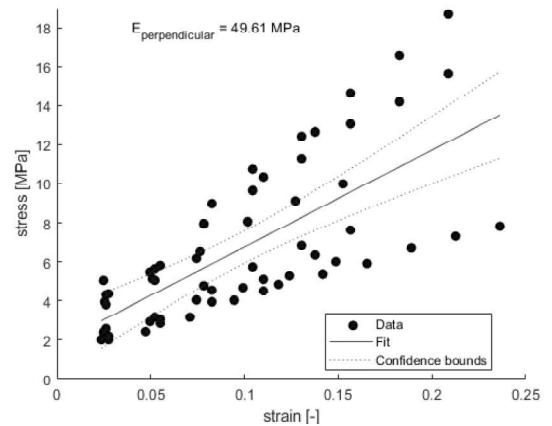


Fig. 7 Young's modulus of elasticity in pericardium with perpendicular oriented fibres. Red line is fitting the data.

Porcine pericardium has a modulus of elasticity of 58.91 MPa, when stress is applied in parallel to macroscopic visual orientation of fibres (Fig. 6). When applying stress perpendicular to the orientation, the modulus of elasticity is 49.61 MPa (Fig. 7). Similarity in values of elasticity moduli between two orthogonal directions of pericardium suggest its overall isotropic behaviour, as it was stated in other studies of pericardium's mechanical properties [28], but does not necessarily dispute optical and mechanical anisotropy of the tissue [29]. Our results are corresponding to previously measured moduli of elasticity in bovine pericardium by Sizeland *et al.*, who have measured modulus of elasticity in neonatal (80 MPa) and adult (30 MPa) individuals, with younger individuals having higher modulus of elasticity [30]. It seems that modulus of elasticity is age dependent and it should be considered when combining samples from young and old individuals. Our data also correspond with values found in donkey's pericardium (80 MPa) [31] and other bovine pericardia [32]. Many other studies have measured the modulus of elasticity in various pericardia, however, values are ranging from 10 MPa to 300 MPa [29,33]. Gauvin *et al.* have showed differences between bovine and porcine pericardium [34], suggesting high variability in-between species.

It is important to note another potential source of variability in mechanical properties of biological soft tissue. One of the most influential factors affecting mechanical response of the tissue to external pressure is hydration [35]. For example, mechanical behaviour of pig-arterial elastin changes with hydration in such a way, that modulus of elasticity in dry elastin increases so much that it loses its rubber-like behaviour and behaves like a brittle polymeric glass [36]. Individual collagen fibres behave in a similar way. Grant *et al.* tested individual fibres of collagen from bovine Achilles tendons and observed significant drop in Young's modulus of elasticity, when measured dry and hydrated, from  $1.9 \pm 0.5$  GPa to just  $1.2 \pm 0.1$  MPa, respectively [37]. Furthermore, Andriotis *et al.* observed shrinking and stiffening of collagen fibres, when dehydrating fibres by controlling osmotic pressure in the measuring solution [35]. Therefore, it is important to improve the uniaxial tensile stress-relaxation testing device solely for upright microscope, so that it would be possible for the user of the device to have the sample in solution and control the osmotic pressure and hydration of the sample.

#### 4 Conclusion

The pericardium sample is clearly isotropic material, which is compliant with the literature. The design of the uniaxial tensile device ensures stable position of the sample relative to the objective of the microscope and so it allows direct visualisation of the changes within the structure during the application of external mechanical stress.

The potential of uniaxial tensile stress-relaxation tests using our device remains to be explored further, as a high variability exists in between individuals and with hydration conditions of the sample. The values measured by the uniaxial tensile device in stress-relaxation are comparable with literature, however further tests of the tensile device

are required with various types of biological samples. Using uniaxial tensile testing with other means of testing, such as image acquisition, may resolve uncertainties in mechanical testing and can help enlarge the knowledge of tissue's mechanical properties. Further development of the uniaxial device will focus on keeping the sample hydrated with additional option of controlling the osmotic pressure.

#### Acknowledgement

*We acknowledge support by project PROGRES Q41. Furthermore, we acknowledge the BioImaging Facility, Institute of Physiology, supported by the Czech-BioImaging large RI project (LM2015062 funded by MEYS CR) for their support with obtaining scientific data presented in this paper.*

#### References

- [1] HASLACH, H. W. (2005) "Nonlinear Viscoelastic, Thermodynamically Consistent, Models for Biological Soft Tissue," *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 3(3), pp. 172-189.
- [2] BADYLAK, S., FREYTES, D., AND GILBERT, T. (2009) "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function," *Acta Biomater.*, 5(1), pp. 1-13.
- [3] VALÁŠEK, P. (2017). "Tensile Strength of Sisal/Epoxy Composites Prepared by Vacuum Infusion," *Manuf. Technol.*, 17, pp. 869-874.
- [4] DUENWALD, S. E., VANDERBY, R., AND LAKES, R. S. (2009). "Viscoelastic Relaxation and Recovery of Tendon," *Ann. Biomed. Eng.*, 37(6), pp. 1131-1140.
- [5] L'HEUREUX, N., PÂQUET, S., LABBÉ, R., GERMAIN, L., AND AUGER, F. A. (1998). "A Completely Biological Tissue-Engineered Human Blood Vessel," *FASEB J.*, 12(1), pp. 47-56.
- [6] KJAER, M. (2004). "Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading," *Physiol. Rev.*, 84(2), pp. 649-698.
- [7] MILLER, K., AND CHINZEI, K. (2002). "Mechanical Properties of Brain Tissue in Tension," *J. Biomech.*, 35(4), pp. 483-490.
- [8] THOMASY, S. M., KRISHNA RAGHUNATHAN, V., WINKLER, M., REILLY, C. M., SADELI, A. R., RUSSELL, P., JESTER, J. V., AND MURPHY, C. J. (2014). "Elastic Modulus and Collagen Organization of the Rabbit Cornea: Epithelium to Endothelium," *Acta Biomater.*, 10(2), pp. 785-791.
- [9] SVOBODA, M., SOUKUP, J., JELEN, K., AND KUBOVÝ, P. (2015). "Effect of Impacts on Human Head," *Manuf. Technol.*, 15, pp. 226-231.

- [10] BITTNER, V., TUČEK, R., PANSKÁ, Š., SVOBODA, M., AND JELEN, K. (2017). "Using the Fourier Transform in the Analysis of Vibration Load Tests of Heterogeneous Mechanical Systems," *Manuf. Technol.*, 17, pp. 836–841.
- [11] HINZ, B. (2009). "Tissue Stiffness, Latent TGF- $\beta$ 1 Activation, and Mechanical Signal Transduction: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Fibrosis," *Curr. Rheumatol. Rep.*, 11(2), pp. 120–126.
- [12] SIAPKARA, A., AND DUNCAN, R. (2007). "Congenital Talipes Equinovarus," *Bone Jt. J.*, 89(8), pp. 995–1000.
- [13] COOKE, S. J., BALAIN, B., KERIN, C. C., AND KIELY, N. T. (2008). "Clubfoot," *Curr. Orthop.*, 22(2), pp. 139–149.
- [14] OŠTĀDAL, M., ECKHARDT, A., HERGET, J., MIKŠÍK, I., DUNGL, P., CHOMIAK, J., FRYDRYCHOVÁ, M., AND BURIAN, M. (2015). "Proteomic Analysis of the Extracellular Matrix in Idiopathic Pes Equinovarus," *Mol. Cell. Biochem.*, 401(1–2), pp. 133–139.
- [15] SANO, H., UHTHOFF, H. K., JARVIS, J. G., MANSINGH, A., AND WENCKEBACH, G. F. C. (1998). "Pathogenesis of Soft-Tissue Contracture in Club Foot," *J. Bone Jt. Surg.*, 80(4), p. 4.
- [16] ANAND, A., AND SALA, D. A. (2008). "Clubfoot: Etiology and Treatment," *Indian J. Orthop.*, 42(1), pp. 22–28.
- [17] RAMPAL, V., CHAMOND, C., BARTHES, X., GLORION, C., SERINGE, R., AND WICART, P. (2013). "Long-Term Results of Treatment of Congenital Idiopathic Clubfoot in 187 Feet: Outcome of the Functional 'French' Method, If Necessary Completed by Soft-Tissue Release," *J. Pediatr. Orthop.*, 33(1), pp. 48–54.
- [18] POON, R., LI, C., AND ALMAN, B. A. (2009). "Beta-Catenin Mediates Soft Tissue Contracture in Clubfoot," *Clin. Orthop.*, 467(5), pp. 1180–1185.
- [19] CHRISTIANSEN, D. L., HUANG, E. K., AND SILVER, F. H. (2000). "Assembly of Type I Collagen: Fusion of Fibril Subunits and the Influence of Fibril Diameter on Mechanical Properties," *Matrix Biol.*, 19(5), pp. 409–420.
- [20] LAKES, R. (1993). "Materials with Structural Hierarchy," *Nature* [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/361511a0>. [Accessed: 09-Jul-2018].
- [21] PURSLOW, P. P., WESS, T. J., AND HUKINS, D. W. (1998). "Collagen Orientation and Molecular Spacing during Creep and Stress-Relaxation in Soft Connective Tissues," *J. Exp. Biol.*, 201(1), pp. 135–142.
- [22] SU, P.-J., CHEN, W.-L., LI, T.-H., CHOU, C.-K., CHEN, T.-H., HO, Y.-Y., HUANG, C.-H., CHANG, S.-J., HUANG, Y.-Y., LEE, H.-S., AND DONG, C.-Y. (2010). "The Discrimination of Type I and Type II Collagen and the Label-Free Imaging of Engineered Cartilage Tissue," *Biomaterials*, 31(36), pp. 9415–9421.
- [23] OLIVIER, N., LUENGO-OROZ, M. A., DULOQUIN, L., FAURE, E., SAVY, T., VEILLEUX, I., SOLINAS, X., DEBARRE, D., BOURGINE, P., SANTOS, A., PEYRIERAS, N., AND BEAUREPAIRE, E. (2010). "Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Nonlinear Microscopy," *Science*, 329(5994), pp. 967–971.
- [24] CRAIG, A. S., AND PARRY, D. A. D. (1981). "Growth and Development of Collagen Fibrils in Immature Tissues from Rat and Sheep," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 212(1186), pp. 85–92.
- [25] DEL POZO, R., TANAKA, E., TANAKA, M., OKAZAKI, M., AND TANNE, K. (2002). "The Regional Difference of Viscoelastic Property of Bovine Temporomandibular Joint Disc in Compressive Stress-Relaxation," *Med. Eng. Phys.*, 24(3), pp. 165–171.
- [26] ROYLANCE, D., "ENGINEERING VISCOELASTICITY," p. 37.
- [27] SCHANER, P. J., MARTIN, N. D., TULENKO, T. N., SHAPIRO, I. M., TAROLA, N. A., LEICHTER, R. F., CARABASI, R. A., AND DIMUZIO, P. J. (2004). "Decellularized Vein as a Potential Scaffold for Vascular Tissue Engineering," *J. Vasc. Surg.*, 40(1), pp. 146–153.
- [28] LEE, J. M., AND BOUGHNER, D. R. (1981). "Tissue Mechanics of Canine Pericardium in Different Test Environments. Evidence for Time-Dependent Accommodation, Absence of Plasticity, and New Roles for Collagen and Elastin," *Circ. Res.*, 49(2), pp. 533–544.
- [29] ZIOUPOS, P., BARBENEL, J. C., AND FISHER, J. (1994). "Anisotropic Elasticity and Strength of Glutaraldehyde Fixed Bovine Pericardium for Use in Pericardial Bioprosthesis Valves," *J. Biomed. Mater. Res.*, 28(1), pp. 49–57.
- [30] SIZELAND, K. H., WELLS, H. C., HIGGINS, J., CUNANAN, C. M., KIRBY, N., HAWLEY, A., MUDIE, S. T., AND HAVERKAMP, R. G. (2014). "Age Dependent Differences in Collagen Alignment of Glutaraldehyde Fixed Bovine Pericardium," *BioMed Res. Int.*, 2014, pp. 1–10.

- [31] CHEN, S., XU, L., LIU, Y., LI, Q., WANG, D., WANG, X., AND LIU, T. (2013). “Donkey Pericardium as an Alternative Bioprosthetic Heart Valve Material: DONKEY PERICARDIUM AS BIOPROSTHETIC HEART VALVE,” *Artif. Organs*, 37(3), pp. 248–255.
- [32] HÜLSMANN, J., GRÜN, K., EL AMOURI, S., BARTH, M., HORNING, K., HOLZFUß, C., LICHTENBERG, A., AND AKHYARI, P. (2012). “Transplantation Material Bovine Pericardium: Biomechanical and Immunogenic Characteristics after Decellularization vs. Glutaraldehyde-Fixing: Transplantation Material Bovine Pericardium,” *Xenotransplantation*, 19(5), pp. 286–297.
- [33] GALVÃO BARROS, J. A., FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., DE OLIVEIRA, E. M., CAMPA, A., CATALANI, L. H., DE NOGUEIRA MORAES PITOMBO, R., AND POLAKIEWICZ, B. (2014). “Cytotoxicity of PVPAC-Treated Bovine Pericardium: A Potential Replacement for Glutaraldehyde in Biological Heart Valves: Cytotoxicity of PVPAC-Treated Bovine Pericardium,” *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 102(3), pp. 574–582.
- [34] GAUVIN, R., MARINOV, G., MEHRI, Y., KLEIN, J., LI, B., LAROUCHE, D., GUZMAN, R., ZHANG, Z., GERMAIN, L., AND GUIDOIN, R. (2013). “A Comparative Study of Bovine and Porcine Pericardium to Highlight Their Potential Advantages to Manufacture Percutaneous Cardiovascular Implants,” *J. Biomater. Appl.*, 28(4), pp. 552–565.
- [35] ANDRIOTIS, O. G., DESISSAIRE, S., AND THURNER, P. J. (2018). “Collagen Fibrils: Nature’s Highly Tunable Nonlinear Springs,” *ACS Nano*, 12(4), pp. 3671–3680.
- [36] GOSLINE, J., LILLIE, M., CARRINGTON, E., GUERETTE, P., ORTLEPP, C., AND SAVAGE, K. (2002). “Elastic Proteins: Biological Roles and Mechanical Properties,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 357(1418), pp. 121–132.
- [37] GRANT, C. A., BROCKWELL, D. J., RADFORD, S. E., AND THOMSON, N. II. (2008). “Effects of Hydration on the Mechanical Response of Individual Collagen Fibrils,” *Appl. Phys. Lett.*, 92(23), p. 233902.

---

## Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors

---

Lucie Bacakova, Martina Travnickova, Elena Filova,  
Roman Matejka, Jana Stepanovska, Jana Musilkova,  
Jana Zarubova and Martin Molitor

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77108>

---

### Abstract

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) play important roles in the physiology and pathophysiology of the blood vessels. In a healthy adult organism, VSMCs are quiescent, but after a blood vessel injury, they undergo phenotypic modulation from the contractile phenotype to the synthetic phenotype, characterized by high activity in migration, proliferation and proteosynthesis. This behavior of VSMCs can lead to stenosis or obliteration of the vascular lumen. For this reason, VSMCs have tended to be avoided in the construction of blood vessel replacements. However, VSMCs are a physiological and the most numerous component of blood vessels, so their presence in novel advanced vascular replacements is indispensable. Either differentiated VSMCs or stem cells as precursors of VSMCs can be used in the reconstruction of the *tunica media* in these replacements. VSMCs can be obtained from blood vessels (usually from subcutaneous veins) taken surgically from the patients and can be expanded *in vitro*. During *in vitro* cultivation, VSMCs lose their differentiation markers, at least partly. These cells should therefore be re-differentiated by seeding them on appropriate scaffolds by composing cell culture media and by mechanical stimulation in dynamic bioreactors. Similar approaches can also be applied for differentiating stem cells, particularly adipose tissue-derived stem cells, toward VSMCs for the purposes of vascular tissue engineering.

**Keywords:** vascular replacements, adipose tissue-derived stem cells, transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-4, mechanical loading, dynamic bioreactors, smooth muscle cell differentiation, tissue engineering, regenerative medicine

---

## 1. Introduction

VSMCs are the most numerous cell types in blood vessels, where they are located in the medial layer of the vascular wall, that is, in the *tunica media*. These cells are necessary for the physiological functioning of blood vessels, particularly for vasoconstriction, for vasodilatation and for synthesis of vascular extracellular matrix. These cells are also implicated in pathological changes in blood vessels during atherosclerosis, hypertension, diabetic angiopathy and other vascular disorders. After biochemical or mechanical damage to blood vessels, VSMCs undergo phenotypic modulation, that is, they make the transition from their original quiescent contractile phenotype to a synthetic phenotype, characterized by increased proteo-synthesis and by activation of the migration and growth of VSMCs [1–4]. These changes often lead to irreversible damage to blood vessels, including stenosis and occlusion. Ischemia of the tissues supplied by the damaged vessels is then manifested by serious disorders, for example, heart failure, brain stroke or necrosis of leg tissues, which can result in amputation of the leg.

Low patency of arteries can be treated by balloon angioplasty or by endarterectomy. However, in cases of severe blood vessel damage, vascular replacements need to be implanted, usually in the form of bypasses spanning the damaged region of the original vessel.

Vascular bypass grafts can be obtained from four sources: autologous, allogeneous, xenogeneous or artificial. Autologous grafts, that is, grafts derived from the patient, have the drawbacks of limited availability, donor site morbidity, burden to the patient due to additional surgery and, in the case of implantation of a vein into an arterial position, also mechanical mismatch. Allogeneous transplants, that is, transplants derived from the same species, or xenogeneous transplants, that is, transplants derived from a different species, are associated with a risk of immune rejection, disease transmission and, when they are fixed in glutaraldehyde, also potential release of cytotoxic molecules [5, 6]). In view of these problems, artificially constructed vascular grafts have been considered as very promising for future applications.

Artificial grafts currently used in clinical practice are made of synthetic polymers, namely polyethylene terephthalate (PET), expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) and, in some cases, also polyurethane [5, 7, 8]. The first generation of these prostheses was constructed as cell-free, that is, without the reconstruction of any layer of the natural blood vessel. However, the inner surface of the prosthesis attracted cell types participating in thrombus formation, immune reaction and prosthesis restenosis, that is, thrombocytes, inflammatory cells (leucocytes, lymphocytes, monocytes, macrophages), and also VSMCs. VSMCs migrated on the prosthesis mainly from the sites of the anastomosis of the graft with the original vessel and were prone to excessive proliferation. In addition, precursors of VSMCs, originating from the bone marrow and circulating in the blood, can adhere to the inner surface of the prosthesis and can proliferate [9]. All these events can lead to considerable stenosis, obliteration and failure of vascular prostheses, especially medium-diameter vascular grafts (up to 8 mm in diameter) and small-diameter vascular grafts (up to 4 mm in diameter). Attempts have therefore been made to cover the luminal surface of the prosthesis with a confluent, phenotypically mature and semi-permeable endothelial cell layer, which is considered optimal for preventing thrombosis, inflammatory cell adhesion and VSMC hyperplasia [5, 7, 8].

However, in advanced vascular replacements, it is necessary to reconstruct not only the endothelial cell layer, that is, the main component of the *tunica intima*, but also the other layers of the vascular wall, particularly the *tunica media* with VSMCs as the physiological component of natural blood vessels. It is necessary only to control the proliferation activity of these cells precisely and to direct them toward a differentiated quiescent contractile phenotype. In modern tissue engineering, it is also desirable to differentiate stem cells toward VSMCs, particularly stem cells derived from adipose tissue, which is relatively easily accessible and is available in sufficient quantities [10, 11].

This chapter summarizes our own experience and the experience of other authors in re-differentiating VSMCs on vascular constructs via appropriate cultivation substrates, the composition of cell culture media, cell–cell interaction and mechanical stimulation in dynamic bioreactors. Similar approaches have also been applied for differentiating stem cells, particularly adipose tissue-derived stem cells, toward VSMCs for the purposes of vascular tissue engineering.

## 2. Use of differentiated VSMCs in blood vessel tissue engineering

As mentioned earlier, attempts have been made to reconstruct the *tunica intima* on artificial vascular replacements, and these replacements have been used sporadically in clinical practice [7, 8]. At the same time, the *tunica media* has been reconstructed only rarely in vascular replacements, due to the tendency of VSMCs to proliferate excessively, and these attempts still remain at the experimental level. However, as was mentioned earlier, the presence of the *tunica media* enhances the functionality of artificially constructed blood vessels, if the VSMCs gain their quiescent contractile phenotype [12]. This phenotype is usually lost during the expansion of VSMCs after they have been harvested from blood vessels obtained surgically from patients. The contractile phenotype can be restored by an appropriate structure and composition of the scaffolds, by appropriate composition of cell culture media, by appropriate cell–cell interactions and by appropriate mechanical stimulation of VSMCs in dynamic cell culture systems, especially if the factors mentioned here are applied in combination.

### 2.1. Structure and composition of the scaffolds

As concerns the structure of the scaffolds, three-dimensional (3D) porous scaffolds are more physiological than two-dimensional (2D) scaffolds, because 3D scaffolds better mimic the architecture of the native *tunica media* and enable a multilayered arrangement of VSMCs [13, 14]. The differentiation response of VSMCs to the uniaxial stress generated by a dynamic cell culture system was more pronounced in 3D scaffolds than on 2D scaffolds [15].

As concerns the chemical composition of the scaffolds, attempts are being made to fabricate these scaffolds from degradable materials, such as synthetic polymers (e.g., polylactides, polyglycolides, polycaprolactone and their copolymers), natural polymers (collagen, elastin, fibronectin, laminin, fibrin) and combinations of these materials [14–20]. Degradable scaffolds are used for vascular tissue engineering, because the scaffolds will gradually be removed and replaced by a newly regenerated vascular tissue. In addition, some natural polymers maintain the VSMCs in a differentiated contractile phenotype, for example, elastin and proteins of the

cell basement membrane, namely type IV collagen and laminin, while other natural polymers, such as fibronectin and vitronectin, stimulate the phenotypic modulation of VSMCs toward the synthetic phenotype and VSMC migration and proliferation [18, 21, 22]. The role of type I collagen is ambiguous. Polymeric fibrillary type I collagen in a healthy blood vessel keeps the VSMCs in their quiescent state, but degraded or denatured type I collagen supports VSMC proliferation [21, 23]. Scaffolds obtained by decellularization of various tissues, including blood vessels, recently emerged as very promising structures for cardiovascular tissue engineering. After decellularization, the tissues lose most of their immunogenicity and could even be used for xenogeneic transplantation. At the same time, these scaffolds retain their original biochemical composition and mechanical properties [11, 12, 19, 20, 24].

## 2.2. Composition of the cell culture medium

Another important issue in the reconstruction of the *tunica media* is the composition of the cell culture medium. In the initial phase of colonization of the scaffolds with VSMCs, the migration and proliferation of these cells and their synthesis of ECM molecules is desirable, and therefore a standard serum-supplemented medium can be used. At the same time, the scaffolds should be seeded with a high number of VSMCs in order to shorten their migratory and proliferative phase as much as possible. It is known that the confluence of VSMCs and the development of cell–cell contact support the re-differentiation of VSMCs toward the contractile phenotype [25]. When the scaffolds are well populated with VSMCs, it is necessary to achieve the quiescent differentiated contractile phenotype of VSMCs. For this purpose, chemically defined serum-free or serum-low media are used, for example, media supplemented with transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [26–28] or with heparin [29]. At the same time, heparin supports endothelialization of the prosthesis [30], which also contributes to the development of the contractile phenotype in VSMCs, for example, by producing sulfated heparin-like glycosaminoglycans [2, 18, 31], nitric oxide [32, 33] and by developing contacts between VSMC and endothelial cells, that is, myoendothelial gap junctions [27].

## 2.3. Interactions of VSMCs with endothelial cells and with other VSMCs

VSMCs co-cultured in direct contact with endothelial cells showed more pronounced differentiation toward the contractile phenotype (manifested by increased expression of contractile proteins, that is, SM1 and SM2 isoforms of smooth muscle myosin heavy chain, calponin 1 and smooth muscle  $\alpha$ -actin) than VSMCs co-cultured with endothelial cells without direct contact with these cells. This effect was mediated by connexin 43 (Cx43), an important component of myoendothelial gap junctions. Inhibition of gap junctional communication pharmacologically or by knock down of Cx43 in endothelial cells blocked TGF- $\beta$  signaling and VSMC differentiation [27]. However, the gap junctions between VSMCs are a more controversial issue. On the one hand, an increased number of these junctions and upregulation of Cx43 have been shown to be associated with undesirable VSMC proliferation and vascular diseases. On the other hand, when increased expression of Cx43 in VSMCs was induced by TGF- $\beta$ 1, these cells enhanced the expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin (SM  $\alpha$ -actin), calponin and SM1 myosin heavy chain, that is, markers of VSMC differentiation toward the contractile phenotype [34].

In comparison with other connexins, for example, Cx37, Cx43 is highly mechanosensitive. The exposure of human coronary artery smooth muscle cell to shear stress of 5 dyn/cm<sup>2</sup>, but not



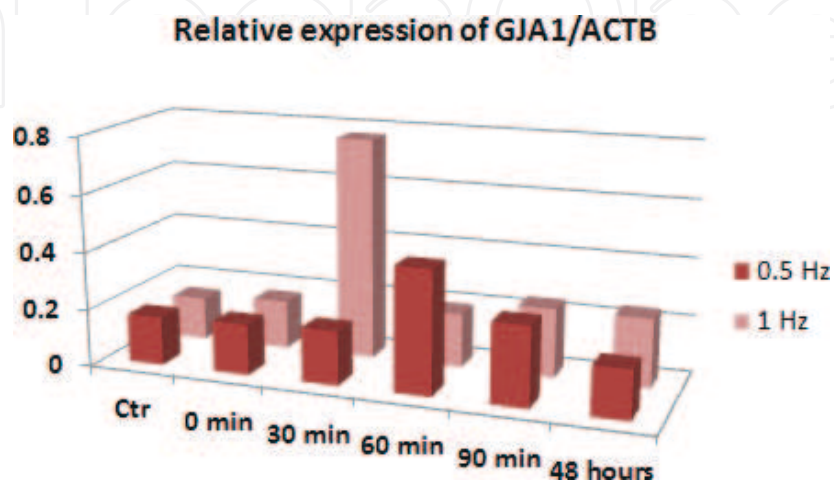
to physiological shear stress of 12 dyn/cm<sup>2</sup>, caused the dysfunction of Cx40/Cx43 heterotypic myoendothelial gap junctions, which may be replaced by homotypic Cx43/Cx43 channels and induced the transition of VSMCs to the synthetic phenotype, which was manifested by decreased expression of smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) and calponin and by increased release of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). At the same time, the VSMCs under shear stress of 5 dyn/cm<sup>2</sup> were randomly oriented, while under shear stress of 12 dyn/cm<sup>2</sup>, these cells were aligned in the flow direction [35].

In our experiments, we investigated the effects of periodical uniaxial stretching of VSMCs on the Cx43 expression. Mechanical stimulation of VSMCs was performed using STREX equipment (B Bridge International, Ltd). VSMCs were seeded in flexible silicone chambers coated with type I collagen and fibronectin. After a 2-day static culture, the VSMCs were subjected to stretch at a frequency of 0.5 Hz and an amplitude of 5%. After a further period of 48 h, the frequency was changed to 1 Hz. The changes in Cx43 expression were tested by qRT-PCR. At near-physiological conditions (frequency of 1 Hz and amplitude of 5%), the expression immediately rose almost 5 fold, with the maximum in the first 30 min. At a lower degree of stimulation (at a frequency of 0.5 Hz and an amplitude of 5%), the maximal expression was delayed to about 60 min, and it was considerably lower. For longer time periods, the expression of Cx43 decreased again (**Figure 1**). VSMCs were also stained by immunofluorescence to show the changes in the arrangement and the distribution of the contractile protein SM  $\alpha$ -actin. After stretching, the SM  $\alpha$ -actin was more intensely stained than in the control static culture and was organized into filaments, especially in cells after 24 h of stretching (**Figure 2**).

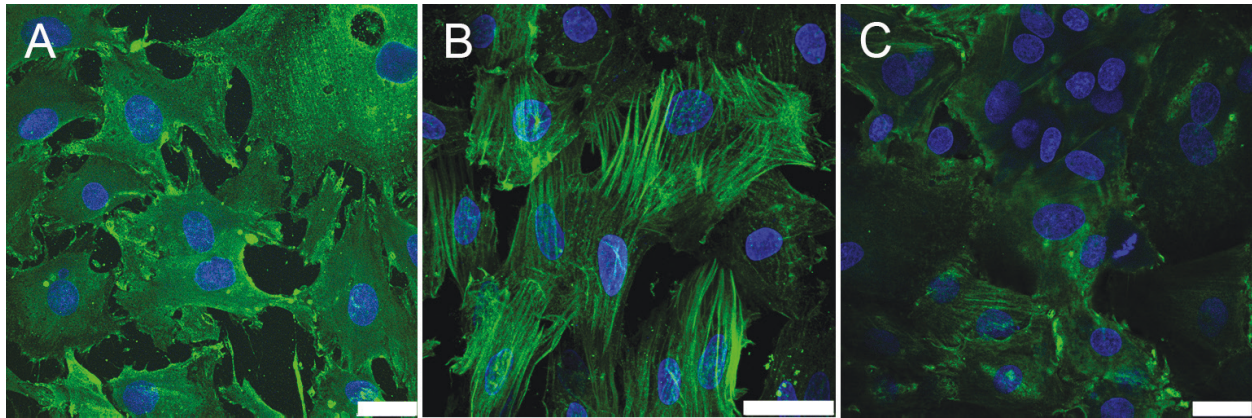
#### 2.4. Mechanical loading of VSMCs in a dynamic culture system

In general, dynamic cultivation of VSMCs is an important tool for restoring the contractile differentiated phenotype of these cells [16, 19]. It has been shown repeatedly that differentiation of VSMCs requires pulsatile stress and cyclic strain, that is, components of the hemodynamic stress to which blood vessels are exposed in vivo [36].

As concerns **pulsatile stress**, rabbit aortic VSMCs were seeded onto rubber-like elastic, three-dimensional poly(lactide-co-caprolactone) scaffolds and were exposed to a pulsatile flow of



**Figure 1.** Relative mRNA expression of connexin 43 (GJA1) in rat aortic smooth muscle cells after uniaxial stretching in the STREX dynamic cell culture system (B bridge international, ltd.) for 0–48 h at a frequency of 0.5 Hz (dark) or 1 Hz (light).



**Figure 2.** Immunofluorescence of SM  $\alpha$ -actin in rat aortic smooth muscle cells in 2-day-old cultures after exposure to uniaxial stretching at a frequency of 1 Hz for 4 h (A), 24 h (B) and in control cells without stretching (C). Leica SPE confocal microscope (DM 2500 CSQ V-VIS), obj. 63 $\times$ . Scale bar = 25  $\mu$ m.

the culture medium (flow rate 130 ml/min, pressure 25 mmHg with a pulse of 1 Hz, amplitude of radial distention 5%, exposure 8 weeks). The pulsatile strain and the shear stress enhanced the VSMC proliferation and collagen production. However, at the same time, the expression of SM  $\alpha$ -actin, an early marker of VSMC differentiation, was upregulated 2.5-fold in comparison with the value in VSMCs under static conditions, and the VSMCs were aligned in a direction radial to the distending direction, that is, similarly as in native blood vessels *in vivo*, whereas the VSMCs were randomly oriented under static conditions [37].

The behavior of VSMCs in a pulsatile bioreactor can be further modulated by the presence or absence of endothelial cells. Endothelial cells were seeded on the opposite side of a porous polycarbonate membrane and were placed in contact with a collagen gel containing VSMCs. The presence of the endothelial cells increased the VSMC size and the expression of the contractile proteins, namely SM  $\alpha$ -actin and SM-MHC. Absence of endothelial cells decreased the expression of SM  $\alpha$ -actin and SM-MHC without affecting the size of the VSMCs. The proliferation of VSMCs was not affected by the presence or absence of endothelial cells [38].

As concerns **cyclic strain**, collagen-based gels laden with primary human umbilical artery VSMCs were exposed to a 10% cyclic strain at 0.5 Hz for 5 days. Cyclic stimulation promoted cell-driven collagen matrix bi-axial compaction, enhancing the mechanical strength of the strained samples with respect to the static controls. Moreover, cyclic strain had a positive effect on VSMC behavior: the cells maintained their contractile phenotype and spread uniformly throughout the thickness of the walls of collagen-based tubular structures [39].

The effect of cyclic strain can be further modulated by the presence of various growth factors. For example, VSMCs in a 3D collagen type 1 matrix were exposed to a 10% circumferential strain at a frequency of 1 Hz. These conditions increased the gel compaction and the VSMC proliferation, which was further enhanced by adding PDGF into the cell culture medium. Conversely, the addition of TGF- $\beta$  strongly inhibited cell proliferation and increased the expression of SM  $\alpha$ -actin [40]. In a study by Yao et al. [41], rat aortic VSMCs in 70% confluence and after starving in a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without serum for 24 h were subjected to cyclic strain of 10% elongation at 1.25 Hz for 24 h in the Flexercell Tension

Plus system. The strain stimulated the secretion of TGF- $\beta$ 1 by VSMCs and upregulated the expression of contractile phenotype markers in these cells, namely smooth muscle protein 22- $\alpha$  (SM22- $\alpha$ ), SM  $\alpha$ -actin and calponin.

The parameters of the cyclic strain also strongly modulate the VSMC response. For example, rat aortic VSMCs were exposed to cyclic strains in vitro with defined parameters, that is, 5% strain, considered as physiological, and 15% strain, considered as pathological. Both types of strain had a frequency of 1.25 Hz and were applied for 24 h. The results showed that 15% strain significantly increased VSMC migration and proliferation in comparison with 5% strain [42].

### **3. Use of stem cells as a source of VSMCs for blood vessel tissue engineering**

Stem cells have emerged as a promising resource for advanced tissue engineering, including vascular tissue engineering. Differentiated VSMCs are often obtained from aged and polymorbid patients. These cells show lower proliferation potential than is desirable, as the harvested cells need to be expanded in cell culture conditions. In addition, the VSMCs also show a higher tendency toward senescence. Another consideration is that these VSMCs are mostly of venous origin because it is easier and less invasive to isolate subcutaneous veins than arteries. However, venous VSMCs have different properties from those of arterial VSMCs, for example, they are adapted for lower pressure and slower blood circulation in the vein system.

Stem cells are a component of the blood vessels themselves, where they are distributed throughout the entire vascular wall, that is, in the subendothelial space of the *tunica intima*, in the *tunica media* and also in the *tunica adventitia*. Their primary function is postnatal vasculogenesis and regeneration of the vascular wall after injury, but they can also be a cell source for vascular tissue engineering [43–45]. However, harvesting stem cells and isolating differentiated VSMCs are associated with similar problems [46].

Other sources of stem cells with the potential to be differentiated into VSMCs are human pluripotent stem cells, obtained from embryonic tissues [47, 48] and induced pluripotent stem cells (iPSCs) [49–51]. However, the use of these cells, although promising, is associated with ethical and legal issues in human embryonic stem cells and with a risk of potential tumorigenicity of iPSCs. These complications can be overcome by the use of stem cells isolated from extrafetal tissues, for example, placenta [52] and umbilical cord [53] or by the use of stem cells from adult tissues, such as bone marrow [36, 54, 55], epidermis, namely hair follicles [56] or skeletal muscle [57]. In addition, adult stem cells can be applied in autologous form. However, harvesting the adult tissues mentioned here is often invasive and painful, and the tissues are obtained in relatively small quantities. Consequently, adipose tissue-derived stem cells (ASCs) seem to be the most promising source because the adipose tissue, located subcutaneously, can be obtained by a less invasive method, that is, liposuction, and in relatively large quantities.

ASCs have been used relatively widely for experimental vascular tissue engineering. The main tools for differentiating ASCs toward VSMCs include composing cell culture

media and exerting mechanical stress in dynamic cell culture systems, similarly as for the re-differentiation of VSMCs. Examples of results obtained by various authors [10, 11, 58–67] are summarized in **Table 1**.

Author	Scaffolds	Medium supplement	Cultivation system	Obtained VSMC markers
Rodríguez et al. [10]	Uncoated tissue culture polystyrene dishes or dishes coated with laminin or collagen	Medium MCDB 131 with 1% FBS plus 100 units/ml of heparin	Static	SM $\alpha$ -actin, calponin, caldesmon, SM22- $\alpha$ , SM-MHC, smoothelin
Kim et al. [58]	Tissue culture polystyrene	Angiotensin II	Static	SM $\alpha$ -actin, calponin, h-caldesmon, SM-MHC
Kim et al. [59]	Tissue culture polystyrene	Bradykinin	Static	SM $\alpha$ -actin
Kim et al. [60]	Tissue culture polystyrene	Thromboxane A <sub>2</sub> mimetic U46619	Static	SM $\alpha$ -actin, calponin, SM-MHC, smoothelin
Nincheri et al. [61]	Tissue culture polystyrene, microscope slides coated with gelatine	Sphingosine 1-phosphate	Static	SM $\alpha$ -actin, transgelin, cytoskeletal F-actin assembly, Ca <sup>2+</sup> currents
Wang et al. [62]	Tissue culture polystyrene dishes	TGF- $\beta$ 1, BMP-4	Static	SM $\alpha$ -actin, SM22- $\alpha$ , calponin, SM-MHC
Aji et al. [63]	Tissue culture polystyrene	TGF- $\beta$ 1, BMP-4	Static	SM $\alpha$ -actin, SM22 $\alpha$ , calponin, SM-MHC
Elçin et al. [64]	8-chamber slides (Labtek)	TGF- $\beta$ 1, BMP-4, angiotensin II	Static	SM $\alpha$ -actin, calponin, h-caldesmon SM-MHC
Lachaud et al. [65]	Tissue culture polystyrene dishes	EGF	Static	SM $\alpha$ -actin, calponin, caldesmon, SM22 $\alpha$ , desmin, SM-MHC, smoothelin-B
Wang et al. [66]	Polyglycolic acid mesh	TGF- $\beta$ 1, BMP-4	Pulsatile stress	SM $\alpha$ -actin, calponin, SM-MHC
Harris et al. [11]	Decellularized saphenous vein	angiotensin II, SPC, TGF- $\beta$ 1	Bioreactor generating: Tension Compression Pressure Perfusion	calponin, caldesmon, SM-MHC
Rashidi et al. [67]	Plasma-treated silicon membranes with collagen I	TGF- $\beta$ 1	Cyclic strain	SM $\alpha$ -actin, SM22- $\alpha$ , h-caldesmon, calponin3

TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor- $\beta$ 1; BMP-4: bone morphogenetic protein-4 (a polypeptide belonging to the TGF- $\beta$  superfamily); SM  $\alpha$ -actin:  $\alpha$ -isoform of smooth muscle actin; SM22- $\alpha$ : smooth muscle protein 22- $\alpha$ ; SM-MHC: smooth muscle myosin heavy chain; Transgelin: actin cross-linking/gelling protein in fibroblasts and smooth muscle cells; SPC: sphingosylphosphorylcholine; EGF: epidermal growth factor.

**Table 1.** Culture conditions for differentiation of ASCs into VSMCs and the obtained markers of differentiation.

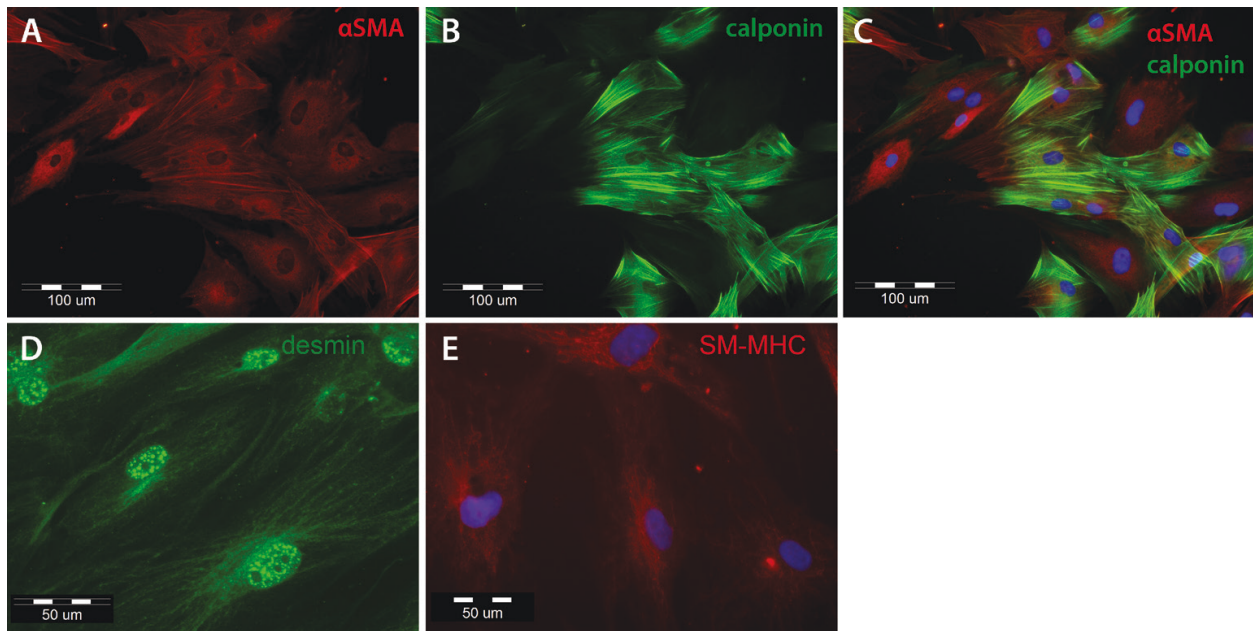
For our experiments, the ASCs were isolated from lipoaspirates obtained from patients by liposuction under their informed consent and ethical approval. Lipoaspirates of subcutaneous adipose tissue were taken from three different regions, that is, the abdominal region and the inner or outer side of the thighs. Liposuction was performed under low negative pressure (-200 mmHg) and under high negative pressure (-700 mmHg). The ASCs were then harvested by a method originally described by Estes et al. [68], with a slight modification described in our earlier study [69].

### **3.1. Differentiation of ASCs toward VSMCs by the composition of the cell culture medium**

In our first set of experiments, we attempted to optimize the composition of the cell culture media in a conventional static cell culture system in order to differentiate the ASCs toward VSMCs. First, three types of culture media were tested, namely a DMEM medium (Sigma-Aldrich, Cat. No. D5648) with 10% of fetal bovine serum (FBS), SmGM®-2 Smooth Muscle Growth Medium-2 BulletKit® (SMGM, Lonza, USA, Cat. No. CC-3182) and Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2, Lonza, USA, Cat. No. 3162). These media alone, that is, without additional supplementation, did not promote the differentiation of ASCs into VSMCs. Therefore, we supplemented the media with transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1; 2.5 ng/mL, Abcam) and with bone morphogenetic protein-4 (BMP-4; 2.5 ng/ml, Sigma-Aldrich) because this combination of growth factors showed greater differentiation efficiency than TGF- $\beta$ 1 or BMP-4 alone or in combination with angiotensin II [64]. The addition of TGF- $\beta$ 1 into SMGM-2 and EGM-2 media caused rapid proliferation and subsequent detachment of the ASCs. The differentiation experiments were therefore performed with DMEM +2% of FBS + TGF- $\beta$ 1 + BMP-4. The addition of TGF- $\beta$ 1 increased the proliferation of ASCs in comparison with DMEM +2% FBS without any supplement. When the ASCs were cultured with TGF- $\beta$ 1 and BMP-4 for three days, immunofluorescence staining revealed the formation of SM  $\alpha$ -actin-containing filaments and an increasing number of calponin-positive cells (**Figure 3A-C**). In later culture intervals (days 14–17), cells with slight positivity for desmin and sporadic SM-MHC-positive cells were also detected. Cells cultured without the supplements only sporadically contained SM  $\alpha$ -actin filaments or calponin (**Figure 3D and E**). In our experiments, we observed individual differences in proliferation and differentiation among the ASCs from various patients and also among the cells taken from the same patient but from different regions of the body.

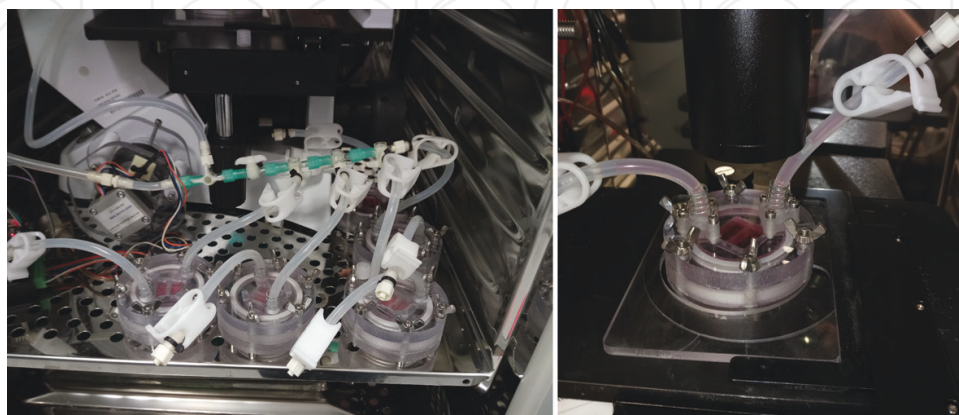
### **3.2. Differentiation of ASCs toward VSMCs by the composition of the cell culture medium and by mechanical load**

In our second set of experiments, we studied the differentiation of ASCs toward VSMCs by combining cell differentiation media with mechanical load. The blood pumped by the heart generates several mechanical stimuli on the arterial wall, such as the wall shear stress affecting endothelial cells, and also the pressure force and the cyclic strain stress. These types of stimuli promote or accelerate the differentiation and the phenotypic maturation of ASCs and other stem cells into VSMCs [36, 55, 66]. In order to simulate the effects of these mechanical stimuli, we have developed a unique dynamic cultivation system. This system consists of special cultivation chambers

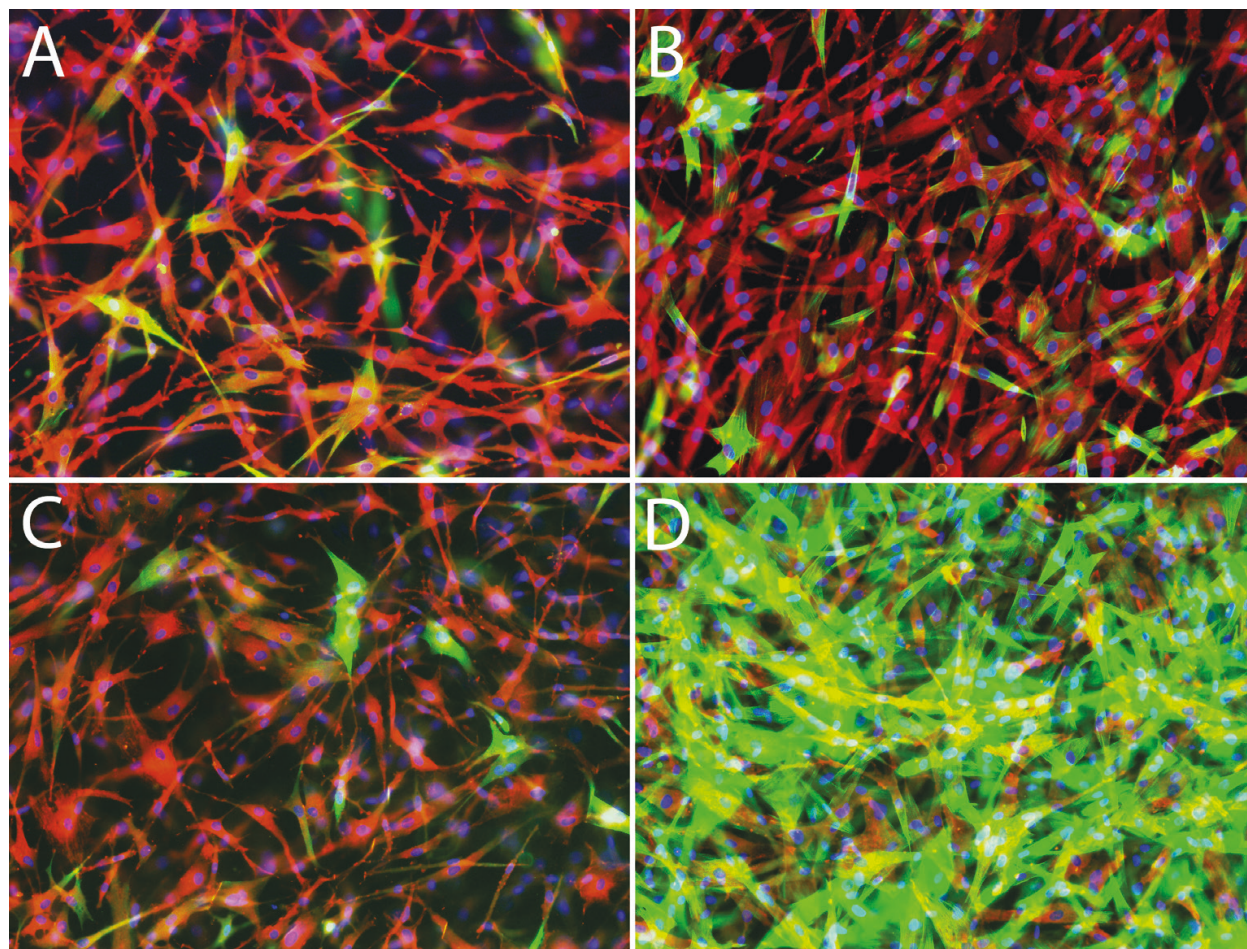


**Figure 3.** Immunofluorescence staining of SM  $\alpha$ -actin (red) and calponin (green) in ASCs on day 3 of differentiation (A–C) in a medium containing TGF- $\beta$  and BMP-4. Immunofluorescence staining of desmin (D) on day 14 and of SM-MHC (E) on day 17. Cell nuclei are visualized with Hoechst #33258 (blue). Olympus IX 71 microscope, objective  $\times 20$  and  $\times 40$ , scale 100  $\mu\text{m}$  and 50  $\mu\text{m}$ , respectively.

and a pressure generation system. The design of the chamber allows the use of rigid substrates (glass) or flexible substrates (cast silicone). A rigid substrate is used for evaluating the effect of the pressure force. A flexible substrate simulates an elastic arterial wall. The pressure force that is applied mimics the dilatation and constriction of the arterial wall by generating cyclic strain stress. To improve their hydrophilicity, the substrates are plasma treated. In addition, these substrates can be coated with collagen or fibrin gels to improve the adhesion and the initial proliferation of the cells. After cell seeding, the chamber is hermetically sealed to allow controlled stimulation (**Figure 4**). The pressure generation is maintained by a computer-controlled custom-built linear syringe pump. A pressure-based feedback-controlling algorithm is implemented to



**Figure 4.** Cultivation chambers used for mechanical stimulation (left). The use of transparent surfaces allows microscopic live-cell imaging (right).



**Figure 5.** Immunofluorescence staining of SM  $\alpha$ -actin (red) and calponin (green) in ASCs cultured embedded in a fibrin gel on glass under static conditions (A, C) and under dynamic conditions (B, D), using the system depicted in **Figure 4**. A, B: 3 days of cultivation; C, D: 7 days of cultivation. Cell nuclei are counterstained with Hoechst #33258. IX71 Olympus microscope, DP71 digital camera, obj.  $\times$  10.

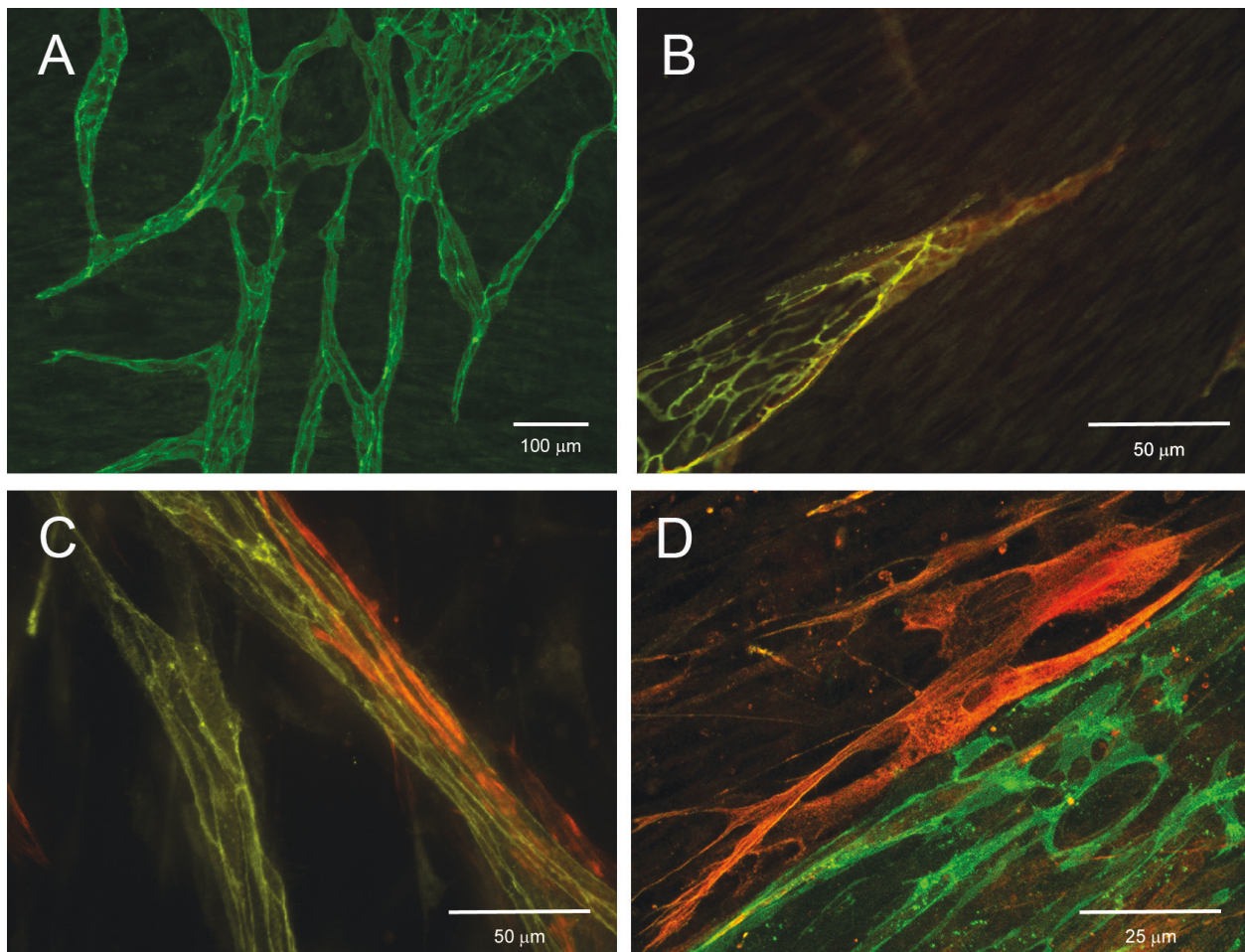
maintain stable conditions. Pressure pulses are generated between two set points that simulate systolic and diastolic pressure. Maximum pressure can be set up to 300 mmHg (40 kPa), with a maximum pulse rate of up to 180 beats per minute (3 Hz).

Our experimental results, obtained in the dynamic culture system described above, indicated positive effects of pressure stimulation on the differentiation of ASCs toward VSMCs. ASCs in low passages 2–4, with initial density of approx. 70,000 cells/cm<sup>2</sup>, were cultured in high glucose DMEM medium (Sigma-Aldrich, Cat. No. D5648), supplemented with 2% FBS, TGF- $\beta$ 1 (2.5 ng/mL, Abcam) and BMP-4 (2.5 ng/ml, Sigma-Aldrich) for 3 or 7 days under static culture conditions or under dynamic pulse pressure stimulation. This stimulation was set to physiological 120/80 mmHg (15.9/10.6 kPa) and pulse rate simulating 60 beats per minute (1 Hz). The cell culture medium was replaced after 3 days. The ASCs were stained for SM  $\alpha$ -actin (Sigma-Aldrich, Cat. No. S2547), an early marker of VSMC differentiation, and for calponin (Abcam, Cat. No. ab46794), an intermediate marker of VSMC differentiation, and the cell nuclei were counterstained with Hoechst #33258. Pressure loading supported ASC proliferation after 3 days (**Figure 5B**) and after 7 days (**Figure 5D**). This was manifested by a higher cell population

density than in the static culture (**Figure 5A** and **C**). The ASCs were positively stained for SM  $\alpha$ -actin on all samples. Moreover, increased numbers of cells positively stained for calponin were found in ASCs cultured in fibrin gel under pulse pressure on day 7 (**Figure 5D**). This suggests that the differentiation of ASCs into VSMCs in the presence of TGF- $\beta$ 1 and BMP-4 was significantly enhanced by dynamic pressure loading.

### 3.3. Differentiation of ASCs in co-culture with vascular endothelial cells

In our third set of experiments, we studied the behavior of ASCs in co-culture with vascular endothelial cells. ASCs are known to possess the ability to stimulate endothelial cells to form capillaries. In a co-culture model of ASCs and endothelial cells, the ASCs in close contact with endothelial cells differentiated after 7 days into pericyte-like cells, which stained positively for SM  $\alpha$ -actin and stabilized the wall of newly formed capillaries (**Figure 6**). Similar results were achieved in a study by Rohringer et al. [70], who co-cultured ASCs



**Figure 6.** Capillary formation in the co-culture model of ASCs with endothelial cells. A: Vascular network formed by endothelial cells in the co-culture model, endothelial cells stained against VE-cadherin. B: Detail of vascular sprouting; VE-cadherin in green, CD146 (a marker of pericytes) in red. C: Stabilization of capillaries by perivascular cells after 7 days of co-culture; VE-cadherin in green, SM  $\alpha$ -actin in red. D: Detail of the close contact between perivascular cells and endothelial cells; VE-cadherin in green, SM  $\alpha$ -actin in red. Nikon Ti-E inverted fluorescence microscope with a CARV II confocal scanner.



and vascular endothelial cells in a fibrin gel and demonstrated that the proximity of ASCs and endothelial cells stimulated the formation of tubular structures by endothelial cells, which were stabilized by ASCs developing the characteristics of pericytes. Recent studies have documented similarities between mesenchymal stem cells and pericytes. Pericytes are contractile cells that are in close contact with endothelial cells in capillaries and serve to control the blood flow. When grown in vitro, pericytes express similar surface antigens as ASCs (CD73, CD90 or CD105) [71] and lack hematopoietic markers (CD45) and endothelial markers (CD31, von Willebrand factor, VE-cadherin). Pericytes are also capable of multipotential differentiation, for example, adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic differentiation [72]. However, the level of CD146, which is considered to be a marker of pericytes, differs greatly among different isolations of ASCs (in our experience from 0.5–90%). CD146 (also known as MCAM, S-endo-1, MUC18 or P1H12) is not expressed solely in pericytes. It is also considered to be a marker of endothelial progenitor cells and endothelial cells. It was recently shown that CD146 acts as a receptor for Wnt5a and regulates cell migration [73] or that it is involved in controlling the formation of the blood–brain barrier, where it ensures communication between endothelial cells and pericytes [74]. In the co-culture model of endothelial cells with ASCs, it remains elusive whether every ASC that is in close contact with an endothelial cell can act as a pericyte, or whether pericytes form a subpopulation of the heterogeneous population of ASCs with a specific, irreplaceable function.

#### 4. Conclusion

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are the most numerous component of the arterial and venous wall, and they ensure the physiological functions of blood vessels. Under pathological conditions, however, VSMCs lose their differentiation markers, which is accompanied by activation of migration and proliferation of these cells. This can lead to stenosis or obliteration of the injured blood vessels. For this reason, VSMCs were not included in the early generations of vascular replacements, which were either cell-free or pre-endothelialized in vitro. Reconstruction of the *tunica media* containing VSMCs remains at the experimental level. The *tunica media* can be reconstructed with the use of differentiated VSMCs taken from blood vessels (usually subcutaneous veins), isolated surgically or with the use of stem cells, which is a more advanced approach. Various types of stem cells have been used for differentiation into VSMCs and for constructing vascular replacements, including embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, stem cells from extrafetal tissues and stem cells isolated from adult tissues, such as bone marrow, skeletal muscle, epidermis and adipose tissue. Adipose-tissue derived stem cells (ASCs) seem to be the most promising source of VSMCs because they can be isolated in relatively large quantities, by relatively non-invasive methods (liposuction) and in autologous form. Differentiation of ASCs into VSMCs can be induced by appropriate scaffolds (preferably three-dimensional and compliant) by appropriate composition of the cell culture media (e.g., a low-serum medium supplemented with TGF- $\beta$ 1 and BMP-4) and particularly by mechanical stimulation in dynamic cell culture systems generating pulsatile stress, cyclic strain and pressure stress. In co-cultures with endothelial cell forming tubular structures, ASCs form pericyte-like cells.

## Acknowledgements

This study was supported by the Czech Health Research Council, Ministry of Health of the Czech Republic (project No. 15-33018A) and by the Grant Agency of Charles University (GAUK, project No. 642217). Further support was provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within LQ1604 National Sustainability Program II (BIOCEV-FAR project) and within the framework of project No. LM2015062 (Czech-BioImaging) and also by the European Regional Development Fund, OPVK Mikroskopický Systém (project No. CZ.2.16/3.1.00/28034). Mr. Robin Healey (Czech Technical University in Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Author details

Lucie Bacakova<sup>1\*</sup>, Martina Travnickova<sup>1</sup>, Elena Filova<sup>1</sup>, Roman Matejka<sup>1</sup>, Jana Stepanovska<sup>1</sup>, Jana Musilkova<sup>1</sup>, Jana Zarubova<sup>1</sup> and Martin Molitor<sup>2</sup>

\*Address all correspondence to: lucie.bacakova@fgu.cas.cz

1 Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

2 Clinic of Plastic Surgery, Faculty Hospital Na Bulovce, Prague, Czech Republic

## References

- [1] Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circulation Research*. 1986;**58**(4):427-444. DOI: 10.1161/01.RES.58.4.427
- [2] Campbell JH, Campbell GR. Smooth muscle phenotypic modulation--a personal experience. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;**32**(8):1784-1789. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.243212
- [3] Shinohara S, Shinohara S, Kihara T, Miyake J. Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells. In: Haruo Sugi, editor. *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues—From Molecules to Humans*, InTech, 2012, Chapter 14, pp. 331-344. DOI: 10.5772/3003, ISBN 978-953-51-0679-1. Available from: <https://www.intechopen.com/books/current-basic-and-pathological-approaches-to-the-function-of-muscle-cells-and-tissues-from-molecules-to-humans/regulation-of-differentiated-phenotypes-of-vascular-smooth-muscle-cells>

- [4] Saleh Al-Shehabi T, Iratni R, Eid AH. Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Phytomedicine*. 2016;**23**(11):1068-1081. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.10.016
- [5] Chlupac J, Filova E, Bacakova L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiological Research*. 2009;**58** (Suppl 2):S119-S139. PMID: 20131930
- [6] Filova E, Straka F, Mirejovsky T, Masin J, Bacakova L. Tissue-engineered heart valves. *Physiological Research*. 2009;**58**(Suppl 2):S141-S158. PMID: 20131932
- [7] Bordenave L, Fernandez P, Rémy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: Clinical update 20 years after the first realization. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2005;**33**(3):227-234. PMID: 16215288
- [8] Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, Howanietz N, Gorlitzer M, Froeschl A, Stuempflen A, Bezuidenhout D, Grabenwoeger M. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *Journal of Vascular Surgery*. 2009;**49**(2):352-362. discussion 362. DOI: 10.1016/j.jvs.2008.08.101
- [9] Hegner B, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Hypertension*. 2005;**23**(6):1191-1202. DOI: 10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d
- [10] Rodríguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;**103**(32):12167-12172. DOI: 10.1073/pnas.0604850103
- [11] Harris LJ, Abdollahi H, Zhang P, McIlhenny S, Tulenko TN, DiMuzio PJ. Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *The Journal of Surgical Research*. 2011;**168**(2):306-314. DOI: 10.1016/j.jss.2009.08.001
- [12] Neff LP, Tillman BW, Yazdani SK, Machingal MA, Yoo JJ, Soker S, Bernish BW, Geary RL, Christ GJ. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *Journal of Vascular Surgery*. 2011;**53**(2):426-434. DOI: 10.1016/j.jvs.2010.07.054
- [13] Yamamoto M, Nakamura H, Yamato M, Aoyagi M, Yamamoto K. Retardation of phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells in three-dimensional primary culture. *Experimental Cell Research*. 1996;**225**(1):12-21. DOI: 10.1006/excr.1996.0152
- [14] Hu J, Sun X, Ma H, Xie C, Chen YE, Ma PX. Porous nanofibrous PLLA scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;**31**(31):7971-7977. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.028
- [15] Bono N, Pezzoli D, Levesque L, Loy C, Candiani G, Fiore GB, Mantovani D. Unraveling the role of mechanical stimulation on smooth muscle cells: A comparative study between 2D and 3D models. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016;**113**(10):2254-2263. DOI: 10.1002/bit.25979

- [16] Tschoeke B, Flanagan TC, Koch S, Harwoko MS, Deichmann T, Ellå V, Sachweh JS, Kellomäki M, Gries T, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S. Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold. *Tissue Engineering. Part A*. 2009;**15**(8):1909-1918. DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0499
- [17] Aper T, Wilhelmi M, Gebhardt C, Hoeffler K, Benecke N, Hilfiker A, Haverich A. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix. *Acta Biomaterialia*. 2016;**29**:21-32. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.10.012
- [18] Parizek M, Novotna K, Bacakova L. The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. *Physiological Research*. 2011;**60**(3):419-437. PMID: 21401306
- [19] Huang AH, Niklason LE. Engineering of arteries in vitro. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;**71**(11):2103-2118. DOI: 10.1007/s00018-013-1546-3
- [20] Thottappillil N, Nair PD. Scaffolds in vascular regeneration: Current status. *Vascular Health and Risk Management*. 2015;**11**:79-91. DOI: 10.2147/VHRM.S50536
- [21] Yamamoto M, Yamamoto K, Noumura T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Experimental Cell Research*. 1993;**204**(1):121-129. DOI: 10.1006/excr.1993.1016
- [22] Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*. 2003;**130**(2):411-423. DOI: 10.1242/dev.00223
- [23] Raines EW, Koyama H, Carragher NO. The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;**902**:39-51. discussion 51-52. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06299.x
- [24] Boccafoschi F, Botta M, Fusaro L, Copes F, Ramella M, Cannas M. Decellularized biological matrices: An interesting approach for cardiovascular tissue repair and regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2017;**11**(5):1648-1657. DOI: 10.1002/term.2103
- [25] Babij P, Kawamoto S, White S, Adelstein RS, Periasamy M. Differential expression of SM1 and SM2 myosin isoforms in cultured vascular smooth muscle. *The American Journal of Physiology*. 1992;**262**(3 Pt 1):C607-C613. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.262.3.C607
- [26] Topouzis S, Majesky MW. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Developmental Biology*. 1996;**178**(2):430-445. DOI: 10.1006/dbio.1996.0229
- [27] Gairhe S, Bauer NN, Gebb SA, McMurtry IF. Myoendothelial gap junctional signaling induces differentiation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2011;**301**(4):L527-L535. DOI: 10.1152/ajplung.00091.2011
- [28] Tang Y, Yang X, Friesel RE, Vary CP, Liaw L. Mechanisms of TGF- $\beta$ -induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Vascular Research*. 2011;**48**(6):485-494. DOI: 10.1159/000327776

- [29] Delmolino LM, Stearns NA, Castellot JJ Jr. COP-1, a member of the CCN family, is a heparin-induced growth arrest specific gene in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;**188**(1):45-55. DOI: 10.1002/jcp.1100
- [30] Yao Y, Wang J, Cui Y, Xu R, Wang Z, Zhang J, Wang K, Li Y, Zhao Q, Kong D. Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization. *Acta Biomaterialia*. 2014;**10**(6):2739-2749. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.042
- [31] Bacakova L, Novotna K, Parizek M. Polysaccharides as cell carriers for tissue engineering: The use of cellulose in vascular wall reconstruction. *Physiological Research*. 2014;**63**(Suppl 1):S29-S47. PMID: 24564664
- [32] Sugimoto M, Yamanouchi D, Komori K. Therapeutic approach against intimal hyperplasia of vein grafts through endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide (eNOS/NO) and the rho/rho-kinase pathway. *Surgery Today*. 2009;**39**(6):459-465. DOI: 10.1007/s00595-008-3912-6
- [33] Uzarski JS, Cores J, McFetridge PS. Physiologically modeled pulse dynamics to improve function in vitro-endothelialized small-diameter vascular grafts. *Tissue Engineering. Part C, Methods*. 2015;**21**(11):1125-1134. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0110
- [34] Rama A, Matsushita T, Charolidi N, Rothery S, Dupont E, Severs NJ. Up-regulation of connexin43 correlates with increased synthetic activity and enhanced contractile differentiation in TGF-beta-treated human aortic smooth muscle cells. *European Journal of Cell Biology*. 2006;**85**(5):375-386
- [35] Zhang Z, Chen Y, Zhang T, Guo L, Yang W, Zhang J, Wang C. Role of Myoendothelial gap junctions in the regulation of human coronary artery smooth muscle cell differentiation by laminar shear stress. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;**39**(2):423-437. DOI: 10.1159/000445636
- [36] Kurpinski K, Park J, Thakar RG, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Molecular and Cellular Biomechanics*. 2006;**3**(1):21-34. PMID: 16711069
- [37] Jeong SI, Kwon JH, Lim JI, Cho SW, Jung Y, Sung WJ, Kim SH, Kim YH, Lee YM, Kim BS, Choi CY, Kim SJ. Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials*. 2005;**26**(12):1405-1411. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.036
- [38] Scott D, Tan Y, Shandas R, Stenmark KR, Tan W. High pulsatility flow stimulates smooth muscle cell hypertrophy and contractile protein expression. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013;**304**(1):L70-L81. DOI: 10.1152/ajplung.00342.2012
- [39] Bono N, Meghezi S, Soncini M, Piola M, Mantovani D, Fiore GB. A dual-mode bioreactor system for tissue engineered vascular models. *Annals of Biomedical Engineering*. 2017;**45**(6):1496-1510. DOI: 10.1007/s10439-017-1813-9
- [40] Stegemann JP, Nerem RM. Phenotype modulation in vascular tissue engineering using biochemical and mechanical stimulation. *Annals of Biomedical Engineering*. 2003;**31**(4):391-402. PMID: 12723680

- [41] Yao QP, Zhang P, Qi YX, Chen SG, Shen BR, Han Y, Yan ZQ, Jiang ZL. The role of SIRT6 in the differentiation of vascular smooth muscle cells in response to cyclic strain. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2014;**49**:98-104. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.01.016
- [42] Qi YX, Qu MJ, Yan ZQ, Zhao D, Jiang XH, Shen BR, Jiang ZL. Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via rho-GDIalpha, Rac1, and p38 pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010;**109**(5):906-914. DOI: 10.1002/jcb.22465
- [43] Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of Physiology*. 2015;**593**(14):3013-3030. DOI: 10.1113/JP270033
- [44] Majesky MW, Dong XR, Hognlund V, Mahoney WM Jr, Daum G. The adventitia: A dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;**31**(7):1530-1539. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221549
- [45] Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Holroyd EW, Simari RD. Resident vascular progenitor cells--diverse origins, phenotype, and function. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2011;**4**(2):161-176. DOI: 10.1007/s12265-010-9248-9
- [46] de Villiers JA, Houreld N, Abrahamse H. Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: Implications for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*. 2009;**5**(3):256-265. DOI: 10.1007/s12015-009-9084-y
- [47] Wanjare M, Agarwal N, Gerecht S. Biomechanical strain induces elastin and collagen production in human pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2015;**309**(4):C271-C281. DOI: 10.1152/ajpcell.00366.2014
- [48] Steinbach SK, Husain M. Vascular smooth muscle cell differentiation from human stem/progenitor cells. *Methods*. 2016;**101**:85-92. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.12.004
- [49] Wang Y, Hu J, Jiao J, Liu Z, Zhou Z, Zhao C, Chang LJ, Chen YE, Ma PX, Yang B. Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPS cells and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2014;**35**(32):8960-8969. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.011
- [50] Dash BC, Jiang Z, Suh C, Qyang Y. Induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells: Methods and application. *The Biochemical Journal*. 2015;**465**(2):185-194. DOI: 10.1042/BJ20141078
- [51] Maguire EM, Xiao Q, Xu Q. Differentiation and application of induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;**37**(11):2026-2037. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309196
- [52] Chen CY, Liu SH, Chen CY, Chen PC, Chen CP. Human placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells involved in placental angiogenesis via the PDGF-BB and STAT3 pathways. *Biology of Reproduction*. 2015;**93**(4):103. DOI: 10.1095/biolreprod.115.131250
- [53] Mesure B, Huber-Villaume S, Menu P, Velot É. Transforming growth factor-beta 1 or ascorbic acid are able to differentiate Wharton's jelly mesenchymal stem cells towards

a smooth muscle phenotype. *Bio-medical Materials and Engineering*. 2017;**28**(s1):S101-S105. DOI: 10.3233/BME-171630

- [54] Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *The FASEB Journal*. 2008;**22**(6):1635-1648. DOI: 10.1096/fj.07-087924
- [55] Hamilton DW, Maul TM, Vorp DA. Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: Implications for vascular tissue-engineering applications. *Tissue Engineering*. 2004;**10**(3-4):361-369. DOI: 10.1089/107632704323061726
- [56] Xu ZC, Zhang Q, Li H. Human hair follicle stem cell differentiation into contractile smooth muscle cells is induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 and platelet-derived growth factor BB. *Molecular Medicine Reports*. 2013;**8**(6):1715-1721. DOI: 10.3892/mmr.2013.1707
- [57] Soletti L, Hong Y, Guan J, Stankus JJ, El-Kurdi MS, Wagner WR, Vorp DA. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Acta Biomaterialia*. 2010;**6**(1):110-122. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.06.026
- [58] Kim YM, Jeon ES, Kim MR, Jho SK, Ryu SW, Kim JH. Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008;**40**(11):2482-2491. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.04.016
- [59] Kim YM, Jeon ES, Kim MR, Lee JS, Kim JH. Bradykinin-induced expression of alpha-smooth muscle actin in human mesenchymal stem cells. *Cellular Signalling*. 2008;**20**(10):1882-1889. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.06.021
- [60] Kim MR, Jeon ES, Kim YM, Lee JS, Kim JH. Thromboxane  $\alpha$ (2) induces differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. *Stem Cells*. 2009;**27**(1):191-199. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0363
- [61] Nincheri P, Luciani P, Squecco R, Donati C, Bernacchioni C, Borgognoni L, Luciani G, Benvenuti S, Francini F, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards smooth muscle cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;**66**(10):1741-1754. DOI: 10.1007/s00018-009-9181-8
- [62] Wang C, Yin S, Cen L, Liu Q, Liu W, Cao Y, Cui L. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Engineering. Part A*. 2010;**16**(4):1201-1123. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0303
- [63] Aji K, Maimaijiang M, Aimaiti A, Rexiati M, Azhati B, Tusong H, Cui L. Differentiation of human adipose derived stem cells into smooth muscle cells is modulated by CaMKII $\gamma$ . *Stem Cells International*. 2016;**2016**:1267480. DOI: 10.1155/2016/1267480
- [64] Elçin AE, Parmaksiz M, Dogan A, Seker S, Durkut S, Dalva K, Elçin YM. Differential gene expression profiling of human adipose stem cells differentiating into smooth muscle-like cells by TGF $\beta$ 1/BMP4. *Experimental Cell Research*. 2017;**352**(2):207-217. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.02.006

- [65] Lachaud CC, López-Beas J, Soria B, Hmadcha A. EGF-induced adipose tissue mesothelial cells undergo functional vascular smooth muscle differentiation. *Cell Death and Disease*. 2014;**5**:e1304. DOI: 10.1038/cddis.2014.271
- [66] Wang C, Cen L, Yin S, Liu Q, Liu W, Cao Y, Cui L. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2010;**31**(4):621-630. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.086
- [67] Rashidi N, Tafazzoli-Shadpour M, Haghighipour N, Khani MM. Morphology and contractile gene expression of adipose-derived mesenchymal stem cells in response to short-term cyclic uniaxial strain and TGF- $\beta$ 1. *Biomed Tech (Berl)*; 2017, in press. pii: /j/bmte.ahead-of-print/bmt-2016-0228/bmt-2016-0228.xml. DOI: 10.1515/bmt-2016-0228
- [68] Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature Protocols*. 2010;**5**(7):1294-1311. DOI: 10.1038/nprot.2010.81
- [69] Przekora A, Vandrovцова M, Travnickova M, Pajorova J, Molitor M, Ginalska G, Bacakova L. Evaluation of the potential of chitosan/ $\beta$ -1,3-glucan/hydroxyapatite material as a scaffold for living bone graft production in vitro by comparison of ADSC and BMDSC behaviour on its surface. *Biomedical Materials*. 2017;**12**(1):015030. DOI: 10.1088/1748-605X/aa56f9
- [70] Rohringer S, Hofbauer P, Schneider KH, Husa AM, Feichtinger G, Peterbauer-Scherb A, Redl H, Holnthoner W. Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells. *Angiogenesis*. 2014;**17**(4):921-933. DOI: 10.1007/s10456-014-9439-0
- [71] Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;**30**(6):1104-1109. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.191643
- [72] Avolio E, Alvino VV, Ghorbel MT, Campagnolo P. Perivascular cells and tissue engineering: Current applications and untapped potential. *Pharmacology and Therapeutics*. 2017;**171**:83-92. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.002
- [73] Ye Z, Zhang C, Tu T, Sun M, Liu D, Lu D, Feng J, Yang D, Liu F, Yan X. Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension. *Nature Communications*. 2013;**4**:2803. DOI: 10.1038/ncomms3803
- [74] Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, Feng J, Zhang J, Yan X. CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;**114**(36):E7622-E7631. DOI: 10.1073/pnas.1710848114



# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 31 066

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A61F 2/06* (2013.01)  
*C12M 3/04* (2006.01)  
*B25J 21/00* (2006.01)  
*A61L 27/36* (2006.01)  
*A61L 27/38* (2006.01)  
*A61L 27/50* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-33823**  
(22) Přihlášeno: **19.06.2017**  
(47) Zapsáno: **03.10.2017**

- (73) Majitel:  
České vysoké učení technické v Praze, Fakulta  
biomedicínského inženýrství, Kladno, CZ  
Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Brno - Starý  
Lískovec, CZ  
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Praha 4, CZ
- (72) Původce:  
Ing. Roman Matějka, Zlín, CZ  
Ing. Jana Štěpanovská, Praha 5, CZ  
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., Praha 6, CZ  
MUDr. Dagmar Hružová, Brno, CZ  
Ing. Jana Zárubová, Ph.D., Praha 9, CZ
- (74) Zástupce:  
Ing. Václav Kratochvíl, Husníkova 2086/22, 158 00  
Praha 5

- (54) Název užitného vzoru:  
**Systém pro rotační endotelizaci cévních  
protéz**

CZ 31066 U1

## Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz

### Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Jedná se o nasazovací systém pro endotelizaci tubulárních nosičů - decelularizovaných, uměle pletených a nepletených, s možností pro další využití jako cévní protéza pro experimentální účely a pilotní *in-vivo* experimenty.

### Dosavadní stav techniky

Kardiovaskulární choroby představují jednu z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Mezi tyto choroby patří například ischemická choroba srdeční způsobená zúžením věnčitých tepen, které přivádějí krev do srdeční svaloviny a vyživují ji. Jedinou vhodnou náhradou cév s průměrem menším než 6 mm, jakými jsou i věnčité tepny, jsou v současnosti autologní cévy. Tyto štěpy jsou přirozeně antitrombogenní, nicméně jejich dostupnost je často omezena věkem nebo zdravotním stavem pacienta. Tento problém postihuje přibližně jednu třetinu všech pacientů indikovaných pro koronární bypass. Poměrně významná skupina pacientů nemá žilní štěpy vhodné pro koronární bypass kvůli vaskulárnímu onemocnění či předchozímu odebrání žíly.

Umělé protézy, které představují alternativu k autologním štěpům, jsou v současnosti vyrobeny z relativně inertních nedegradovatelných materiálů, jako je expandovaný polytetrafluorethylen (ePTFE) a polyethylentereftalát (PET), běžně známý jako Dacron. Tyto polymery jsou úspěšně používány k náhradě cév s vysokým průtokem krve a vnitřním průměrem větším než 6 mm. Bohužel syntetické protézy s vnitřním průměrem menším než 6 mm vykazují velmi nízkou dlouhodobou průchodnost, což je z velké části způsobeno trombogenicitou umělého povrchu za nízkých průtoků. Navíc jsou tyto štěpy ve srovnání s biologickými cévami tuhé, což přispívá k rozvoji intimální hyperplazie.

Jednou z možností jak tyto negativní vlivy minimalizovat je endotelizace povrchu této protézy, protože jednou z hlavních funkcí endotelových buněk je antitrombogenicita. K tomu, aby tuto funkci plnily, je nutná souvislá nepoškozená vrstva. Spontánní endotelizace v těle je především u starších pacientů prakticky nemožná. Jednou z alternativ je právě osazení endotelem před samotnou implantací zvláště pak využití endotelových buněk pacienta, což by dalo vzniknout autolognímu štěpu. Samotná endotelizace vyžaduje specifické postupy tak, aby bylo docíleno homogenního pokrytí nosiče a usednutí buněk na jeho povrch a zároveň byly zajištěny vhodné podmínky pro buněčnou proliferaci.

Vzhledem ke specifické aplikaci se jedná o unikátní řešení. Komerční řešení obdobného druhu neexistuje. V odborné literatuře jsou zmínky o komorách určených pro osídlování obdobných nosičů, ovšem zde se jedná o rze experimentální sestavy.

### Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky jsou do značné míry odstraněny zařízením pro endotelizaci tubulárního nosiče, zejména cévní protézy podle tohoto technického řešení. Jeho podstatou je to, že obsahuje adaptér ve tvaru válce opatřený nástrčnými trny pro uchycení cévní protézy. Adaptér je na svých koncích opatřen jednocestnými ventily pro přívod buněčné suspenze. Na svých stranách je adaptér opatřen výřezem a otvory pro aplikaci buněčné suspenze na vnější stranu cévní protézy. Adaptér je umístěn v osazovací komoře opatřené zátkami. Osazovací komora je uchycena do rotačního systému pro zajištění plynulého otáčení osazovací komory s adaptérem.

Tubulární nosič jako základ cévní protézy je ve výhodném provedení tvořen decelularizovanou prasečí karotidou o průměru 2 až 7 mm a buněčná suspenze obsahuje 80 až 130 tis. buněk/cm<sup>2</sup>. Nástrčné trny jsou upraveny pro uchycení cévní protézy s vnitřním rozměrem 2 až 7 mm a délkou 50 až 300 mm.

Osazovací komora je s výhodou tvořena silikonovou trubicí s vnitřním průměrem 17 až 23 mm a délkou 150 až 180 mm opatřenou na jednom konci zátkou a na druhém konci další zátkou s fitinkou pro uvolnění přetlaku v osazovací komoře.

5 Rotační systém je s výhodou opatřen krokovým motorem, s možností nastavení otáček v rozmezí 0,05 až 1 ot/min a s možností zastavení v určité poloze. Rotační jednocestné ventily mohou být opatřeny spojkami Luer-Lock.

10 Podstatou řešení je rotační osazovací systém, do kterého je uchycena válcová osazovací komora tvořena silikonovou trubicí opatřenou zátkami, do nichž je vložen válcový adaptér opatřený kuželovými trny s jednocestnými ventily, na které je uchycena cévní protéza nebo jiný tubulární nosič. Jednocestné ventily jsou vybaveny koncovkami typu Luer-Lock (dále jen LL), aby bylo možné používat jednorázový spotřební materiál pro vpravení buněčné suspenze – injekční stříkačkou.

15 Rotační systém pro uchycení kompletu osazovací komory a adaptéru má s výhodou elektronicky řízený pohon krokovým motorem, který umožňuje nastavení plynulých otáček v rozmezí 0,05 až 1 ot/min nutných pro adhezi buněk na povrch cévní protézy a/nebo jiného tubulárního nosiče. Druhým režimem je možnost natáčení o požadovaný úhel a setrvání v této poloze. Tento režim je vhodný pro další experimentální činnost.

20 Adaptér může být tvořen kruhovou tyčí, do které je vyfrézován profil pro umístění cévní protézy nebo jiného tubulárního nosiče, kuželovitých trnů a jednocestných ventilů. Adaptér obsahuje na bocích a spodní straně vyfrézované drážky umožňující přístup pipetou pro nasazení buněčné suspenze jiného buněčného typu, např. hladké svalové buňky, kmenové buňky, z vnější strany. Adaptér je ve výhodném provedení vyroben z netoxických materiálů, pro umožnění parní a/nebo chemické sterilizace.

25 Konstrukčním materiálem adaptéru a komory je hlavně třískově obráběný teflon (PTFE), nylon (PA6), a silikonové těsnící prvky. Pro lepení částí byla použita epoxidová lepidla s atestem pro medicínské použití. Pro ověření vhodnosti byly všechny použité materiály testovány na cytotoxicitu. Konstrukce umožňuje opakovanou sterilizaci v autoklávu - testováno pro > 10 cyklů, aniž by došlo k deformaci, poškození, uvolnění lepených dílů apod. Celá konstrukce komory byla optimalizována tak, aby bylo možné pracovat ve sterilních podmínkách, v laminárním boxu v rukavicích bez nutnosti použití speciálních nástrojů.

### Objasnění výkresů

35 Zařízení pro endotelizaci tubulárního nosiče, zejména cévní protézy podle tohoto technického řešení bude podrobněji popsáno na konkrétním příkladu provedení s pomocí přiložených výkresů a ilustrací, kde na Obr. 1 je v axonometrickém pohledu zobrazen adaptér pro uchycení cévní protézy nebo jiného tubulárního nosiče. Na Obr. 2 je zobrazen tento adaptér v řezu. Na Obr. 3 je znázorněn v axonometrickém pohledu řez sestavenou osazovací komorou s adaptérem. Na Obr. 4 je v axonometrickém pohledu znázorněn komplet rotačního systému s osazovací komorou a adaptérem pro uchycení cévní protézy nebo jiného tubulárního nosiče. Na Obr. 5 je homogenně endotelizovaná cévní protéza tvořená decelularizovanou prasečí krkavicí.

### Příklady uskutečnění technického řešení

45 Příkladné zařízení pro endotelizaci cévní protézy obsahuje adaptér 1 ve tvaru válce opatřený nástrčnými trny 4 pro uchycení cévní protézy 2, který je na svých koncích opatřen jednocestnými ventily 3 pro přívod buněčné suspenze a na svých stranách výřezem 5 a otvory 6 pro aplikaci buněčné suspenze na vnější stranu cévní protézy 2. Adaptér 1 je umístěn v osazovací komoře 7 opatřené zátkami 8, 9, která je uchycena do rotačního systému 10 pro zajištění plynulého otáčení osazovací komory 7 s adaptérem 1.

Příkladné tělo adaptéru 1 pro uchycení cévní protézy délky 80 mm je tvořeno frézovanou tyčí z PTFE, a obsahuje hlavní výřez 5 pro cévní protézu 2 nebo jiný tubulární nosič a profily pro jednocestné ventily 3 s LL porty pro vpravení buněčné suspenze a trny 4. Po bocích a na spodní

straně jsou vyfrézované otvory 6 a spolu s hlavním výřezem 5 umožňují aplikaci buněčné suspenze z vnější strany cévní protězy 2.

Osazovací komora 7 pro adaptér 1 délky 120 mm je tvořena silikonovou trubicí o délce 160 mm, které vymezuje prostor adaptéru 1. Komora je uzavřena teflonovými zátkami 8 a 9, kde zátky 8  
5 obsahuje vnitřní závit M8 pro uchycení v rotačním systému a zátky 9 obsahuje fitinky pro uvolnění přetlaku v komoře.

Rotační osazovací systém 10 pro komoru délky 160 mm je tvořen polykarbonátovou konstrukcí upravenou pro délku komory 160 mm. Pro změnu délky je nutná pouze úprava délky obdélníkové základny rotačního systému 10. Rotaci zajišťuje elektronicky řízený krokový motor 11,  
10 který obsahuje unášec se závitem M8, na který je uchycena osazovací komora 7.

Nosič homogenně endotelizované cévní protězy 2 je tvořen decelularizovanou prasečí karotidou o průměru 3 mm. Buněčná suspenze má 120 tis. buněk/cm<sup>2</sup>. Rotační osazování probíhá rychlostí 0,2 ot/min po dobu 2 hodin.

Cévní protěza 2 nebo jiný tubulární nosič, který je zarovnán do požadované délky dle adaptéru 1,  
15 je nasunut na trny 4 s jednocestnými ventily 3 a fixován chirurgickým šitím. Konstrukční řešení umožňuje uchycení cévních protéz 2 nebo jiných tubulárních nosičů o vnitřním průměru 2 až 7 mm. Takovéto uchycení nosič umožňuje vpravení buněčné suspenze do vnitřního prostoru, stejně tak nanesení buněčné suspenze jiného buněčného typu na vnější stěnu.

Rychlost otáčení ovlivňuje schopnost adheze buněk. Příliš malá rotace způsobuje tvorbu buněčných shluků a nehomogenit. Naopak velké otáčky znemožňují adhezi buněk na povrch. Optimalní nastavení otáček pro endotelové buňky se pohybuje v rozmezí 0,1 až 0,25 ot/min.  
20

#### Průmyslová využitelnost

Navržené zařízení pro endotelizaci tubulárního nosiče, zejména cévní protězy nalezne využití na pracovištích zabývajících se tkáňovým inženýrstvím v oblasti umělých cévních náhrad.

25

## N Á R O K Y   N A   O C H R A N U

1. Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz, **vyznačující se tím**, že obsahuje adaptér (1) ve tvaru válce opatřený nástrčnými trny (4) pro uchycení cévní protězy (2), který je na svých koncích opatřen jednocestnými ventily (3) pro přívod buněčné suspenze a na svých stranách otvory (6) pro aplikaci buněčné suspenze na vnější stranu cévní protězy (2), přičemž  
30 adaptér (1) je umístěn v osazovací komoře (7) opatřené zátkami (8, 9), která je uchycena do rotačního systému (10) pro zajištění plynulého otáčení osazovací komory (7) s adaptérem (1).

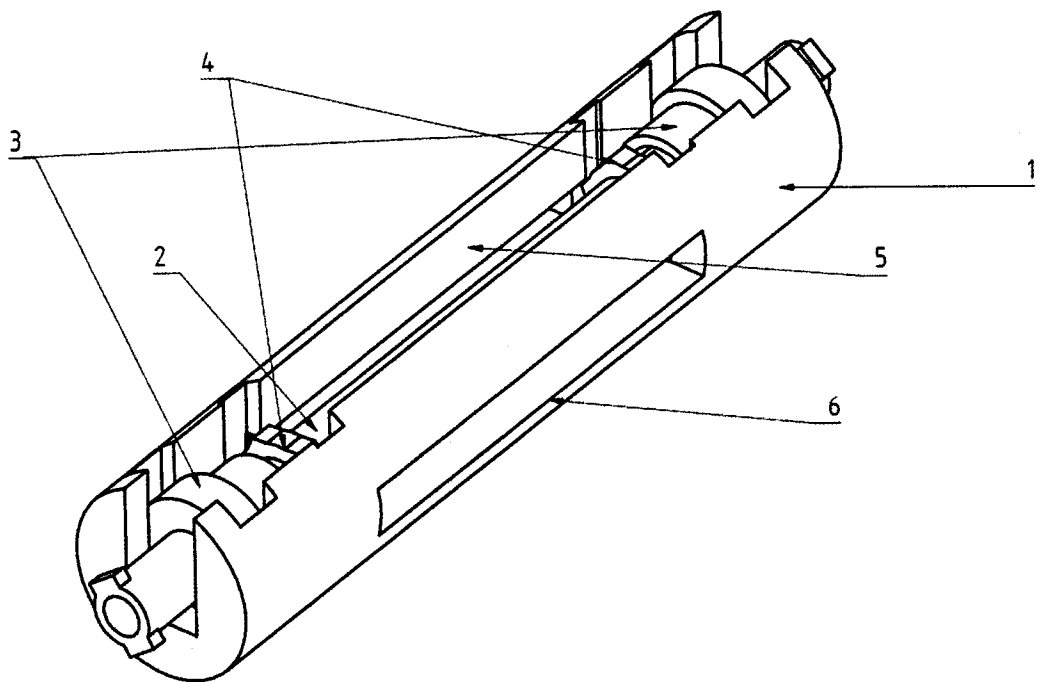
2. Systém podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že tubulární nosič jako základ cévní protězy (2) je tvořen decelularizovanou prasečí karotidou o průměru 2 až 7 mm a buněčná suspenze obsahuje 80 až 130 tis. buněk/cm<sup>2</sup>.

3. Systém podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že nástrčné trny (4) jsou upraveny pro uchycení cévní protězy (2) s vnitřním rozměrem 2 až 7 mm a délkou 50 až 300 mm.  
35

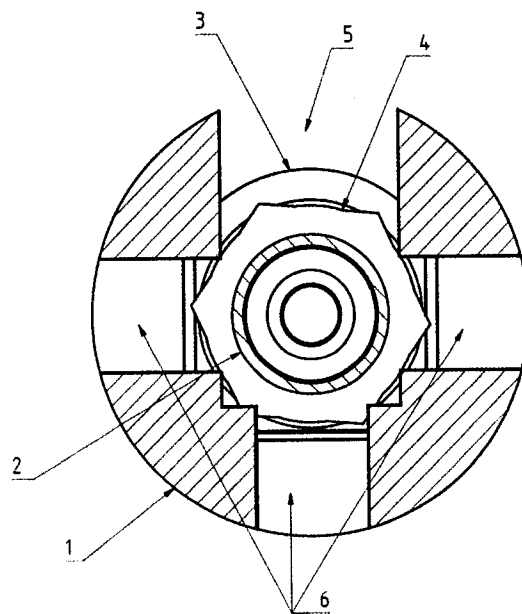
4. Systém podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že osazovací komora (7) je tvořena silikonovou trubicí s vnitřním průměrem 17 až 23 mm a délkou 150 až 180 mm opatřenou na jednom konci zátkou (8) a na druhém konci další zátkou (9) s fitinkou pro uvolnění přetlaku v osazovací komoře (7).  
40

5.    System podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že rotační systém (10) je opatřen krokovým motorem (11), s možností nastavení otáček v rozmezí 0,05 až 1 ot/min a s možností zastavení v určité poloze.
- 5    6.    System podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že rotační jednocestné ventily (3) jsou opatřeny spojkami Luer-Lock.

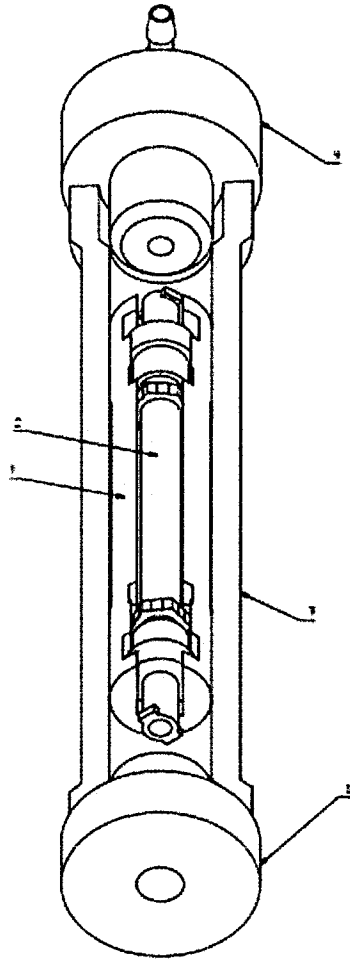
3 výkresy



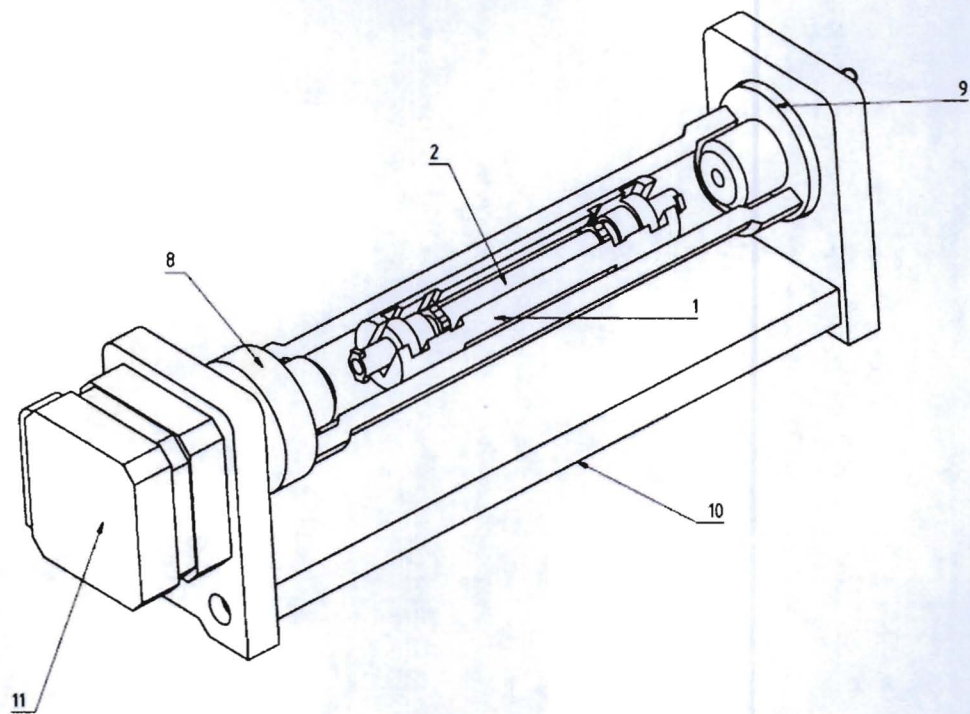
Obr. 1



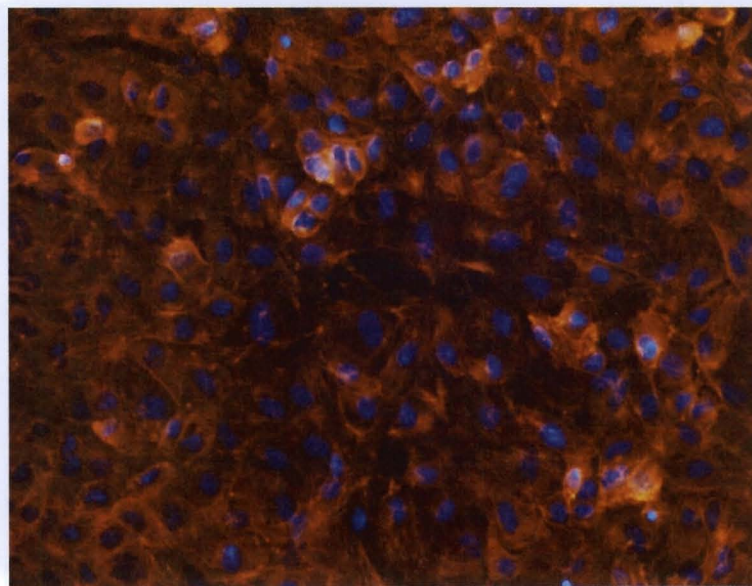
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

Konec dokumentu



# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 30 441

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12M 3/00*

(2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33170**  
(22) Přihlášeno: **13.12.2016**  
(47) Zapsáno: **07.03.2017**

(73) Majitel:  
České vysoké učení technické v Praze, Fakulta  
biomedicínského inženýrství, Kladno, CZ  
Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Brno, Starý  
Lískovec, CZ  
Fyziologický ústav AVČR, v. v. i., Praha 4, CZ

(72) Původce:  
Ing. Roman Matějka, Zlín, CZ  
Ing. Jana Štěpanovská, Praha 5, CZ  
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., Praha 6, CZ  
MUDr. Dagmar Hružová, Brno, CZ  
Ing. Jana Zárubová, Ph.D., Praha 9, CZ  
Mgr. Elena Filová, Ph.D., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:  
Ing. Václav Kratochvíl, Husníkova 2086/22, 158 00  
Praha 5

(54) Název užitného vzoru:

**Kultivační komora pro dynamickou  
kultivaci buněk na tubulárních nosičích**

**CZ 30441 U1**

## Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích

### Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Jedná se o kul-  
 5 tivační komoru pro *in vitro* dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích umožňující defi-  
 novanou stimulaci buněk.

### Dosavadní stav techniky

Mezi nejběžněji používané cévní náhrady patří v současné době autologní cévní štěpy, jejichž  
 dostupnost je však často omezena zdravotním stavem pacienta. Alternativou k autologním cévám  
 10 mohou být umělé cévní protézy nebo cévní štěpy ze zemřelých dárců. Ty však s sebou nesou  
 řadu problémů, jako je imunní reakce doprovázená trombotizací cévy. Zvláště problematické jsou  
 pak cévní protézy o průměru menším než 6 mm, u kterých dochází často k trombotické okluzi  
 a jejich životnost je všeobecně špatná. Osazení vnitřní strany cévní protézy endotelovými buň-  
 15 kami, tzv. endotelizace, by mohlo výrazně snížit riziko vzniku trombu a prodloužit tak životnost  
 cévního štěpu. Aby byla endotelizace cévní protézy v *in vitro* podmínkách úspěšná, je nutné co  
 nejvěrněji simulovat fyziologické podmínky, kterým jsou vystaveny buňky v těle pacienta. To  
 zahrnuje jednak cirkulaci kultivačního média, které simuluje krev a slouží jako zdroj živin  
 a kyslíku a také odvádí odpadní produkty buněk a dále je nutné zajistit definované proudění  
 20 média, jež udržuje cévu v antitrombogenním stavu. Toho lze docílit ve specializovaných kul-  
 tivačních komorách, které umožní uchycení tubulárního nosiče a zajistí vhodné podmínky.

Vzhledem ke specifické aplikaci se jedná o unikátní řešení. Komerčně je vyráběno velmi malé  
 množství takovýchto typů a zpravidla se jedná pouze o zakázkovou výrobu. Jedno z komerčních  
 řešení obdobného typu kultivační komory umožňuje uchycení tubulárního nosiče v rozměrech  
 3 až 6 mm. Toto uchycení je však realizováno přímo na vnitřních zátkách trubicového těla kul-  
 25 tivační komory, což činí manipulaci velmi obtížnou a je vysoké riziko poškození tohoto nosiče.

### Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky jsou do značné míry odstraněny kultivační komorou pro dynamickou  
 kultivaci buněk na tubulárních nosičích, podle tohoto technického řešení. Jeho podstatou je to, že  
 obsahuje válcové tělo opatřené na svých koncích zátkami, ke kterým je uvnitř těla připojena dutá  
 30 válcová kazeta, která je na svých koncích opatřena adaptéry s jednocestnými ventily. Adaptéry  
 slouží pro připojení tubulárního nosiče. Ventily jsou přes trubici připojeny k perfuznímu okruhu  
 a zátky jsou opatřeny kanálem připojeným přes další trubici k perfuznímu okruhu pro vnější pro-  
 plach.

Kazeta pro uchycení tubulárního nosiče má s výhodou průměr 1 až 8,5 mm a délku 40 až  
 35 500 mm. Kultivační komora je ve výhodném provedení vyrobena z netoxických materiálů, pro  
 umožnění parní a/nebo chemické sterilizace. Jednocestné ventily, trubice a další trubice jsou  
 s výhodou opatřeny spojkami s koncovkami typu Luer-Lock. Adaptéry na koncích kazety mohou  
 mít navzájem různou velikost pro připojení tubulárního nosiče kónického tvaru.

Podstatou kultivační komory je komplet kultivační komory s fluidickým systémem a kazety pro  
 uchycení tubulárního nosiče, který je následně osazen buňkami. Přípojné prvky fluidického sys-  
 40 tému jsou tvořeny spojkami s koncovkami typu Luer-Lock (dále jen LL), aby bylo možné použí-  
 vat jednorázový spotřební materiál pro propojení - injekční stříkačky, infuzní hadičky apod.

Kazeta pro uchycení tubulárního nosiče je tvořena dutou tyčí kruhového profilu, do kterého je  
 vyfrézován profil pro uchycení prvků nesoucích tubulární nosič. Rozměr kruhového profilu je  
 1 až 8,5 mm a délka celé této kazety je dána požadovanou délkou tubulárního nosiče, jež bude  
 45 osídlen. Praktické rozměry se mohou pohybovat v rozmezí od 40 mm do 500 mm. Díky plně  
 symetrické konstrukci je tato změna bezproblémová.

Samotný tubulární nosič, který je zarovnan do požadované délky, je nastrčen na hadicové LL  
 adaptéry potřebné velikosti a fixován chirurgickým šitím nebo převlečeným silikonovým krouž-

kem. Tento nosič může mít i kónický tvar, díky tomu, že mohou být použity adaptéry s rozdílnou velikostí na obou stranách. Konstrukční řešení umožňuje uchycení tubulárních nosičů v rozmezí 1 až 8,5 mm. Na tyto LL adaptéry jsou následně připojeny jednocestné ventily, opět vybavené LL koncovkami. Následně je tato sestava vložena do odpovídajících vyfrézovaných vybrání v kazetě, čímž je zafixovaná pro další manipulaci.

Do takto sestavené kazety je možné vpravit buněčnou suspenzi pro osazení tubulárního nosiče buňkami. Jednocestné ventily zajišťují možnost vpravení suspenze s minimalizací rizika jejího úniku. To je důležité pro iniciační fázi adheze buněk na stěny nosiče. Zároveň však umožňují připojení k perfuznímu okruhu.

Oproti konkurenčnímu řešení poskytuje použití této kazety výrazně vyšší komfort pro sestavení a uchycení tubulárního nosiče, následné nasazení buněk a další manipulaci. Díky tomu, že je tubulární nosič pevně uchycen a je vymezen jeho prostor, nemůže dojít například k jeho ohybu nebo zkroucení, které by mohlo mít za následek například zničení nosiče nebo případného funkcionalizovaného povrchu, odtržení buněčné kultury, kontaminaci kultury apod. Navíc jsou výrazně sníženy požadavky na množství buněk a kultivačního média, což přináší také finanční úsporu.

Sestavená kazeta je vložena do samotné kultivační komory, jež je tvořena skleněnou trubicí o průměru a délce odpovídající rozměrům kazety s nosičem a dvěma zátkami s přípojnými porty pro fluidický okruh. Tyto zátky obsahují odpovídající LL adaptéry pro připojení sestavené kazety s adaptérem a dále odpovídající adaptéry pro připojení k perfuznímu systému. Zátky jsou ve skleněné trubicí zatěsněny prostřednictvím o-kroužku. Konstrukce umožňuje jednak perfuzi vnitřní části nosiče, kde je možné na základě velikosti průtoku vytvářet definovanou mechanickou stimulaci - smykové napětí, a dále také výměnu kultivačního média na vnější straně nosiče. Toto řešení poskytuje výhodu z hlediska možnosti vytvoření gradientu, tj. využití jiné koncentrace růstových faktorů v médiu pro vnitřní a vnější část nosiče, který podporuje prorůstání buněk skrz buněčný nosič, což je klíčové v případě vývoje cévních protéz.

Konstrukčním materiálem kazety a komory je hlavně třískově obráběný PTFE (teflon), sklo, PA6 (nylon), silikonové hadice a těsnící prvky. Pro lepení částí byla použita epoxidová lepidla s atestem pro medicínální použití. Pro ověření vhodnosti byly všechny použité materiály testovány na cytotoxicitu. Konstrukce umožňuje opakovanou sterilizaci v autoklávu - testováno pro > 10 cyklů, aniž by došlo k deformaci, poškození, uvolnění lepených dílů apod. Celá konstrukce komory byla optimalizována tak, aby bylo možné pracovat ve sterilních podmínkách, v laminárním boxu v rukavicích, bez nutnosti dalších nástrojů.

#### Objasnění výkresů

Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích podle tohoto technického řešení bude podrobněji popsána na konkrétním příkladu provedení s pomocí přiložených výkresů, kde na Obr. 1 je v axonometrickém pohledu znázorněna kazeta s uchyceným tubulárním nosičem. Na Obr. 2 je znázorněn v bokorysu řez kazetou s uchyceným cévním nosičem. Na Obr. 3 je znázorněn v bokorysu řez sestavenou kultivační komorou s kazetou s uchyceným tubulárním nosičem a na Obr. 4 je v axonometrickém pohledu sestavená celá kultivační komora.

#### Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1 – kazeta pro tubulární nosič délky 70 mm.

Technické řešení kazety 1 je vyobrazeno na obr. 1 a v řezu na obr. 2. Kazeta 1 je tvořena profilovaným tělem z PTFE v celkové délce 110 mm. Tubulární nosič 2 délky 70 mm je upevněn na LL adaptéry 3, ke kterým jsou připojeny jednocestné ventily 4. Tento celek je vložen do odpovídajících vyfrézovaných profilů těla kazety 1 tak, aby byla zajištěna jeho fixace.

Příklad 2 – kultivační komora pro kazetu s tubulárním nosičem délky 70 mm.

Technické řešení kultivační komory je vyobrazeno detailně v řezu na obr. 3 a na obr. 4. Kultivační komoru tvoří PTFE zátky 5, které obsahují adaptér 6 pro připojení kazety 1 s nosičem 2,

adaptéry 3 a jednocestnými ventily 4. Vývod tohoto připojení je řešen trubicí 7 s LL adaptérem pro připojení k perfuznímu okruhu. Vnější proplach je řešen kanálem 8, který je vyveden pro připojení k perfuznímu okruhu další trubicí 9 s LL adaptérem. Zatěsnění je řešeno o-kroužky 10, které utěsňují zátky 5 se skleněným tělem 11.

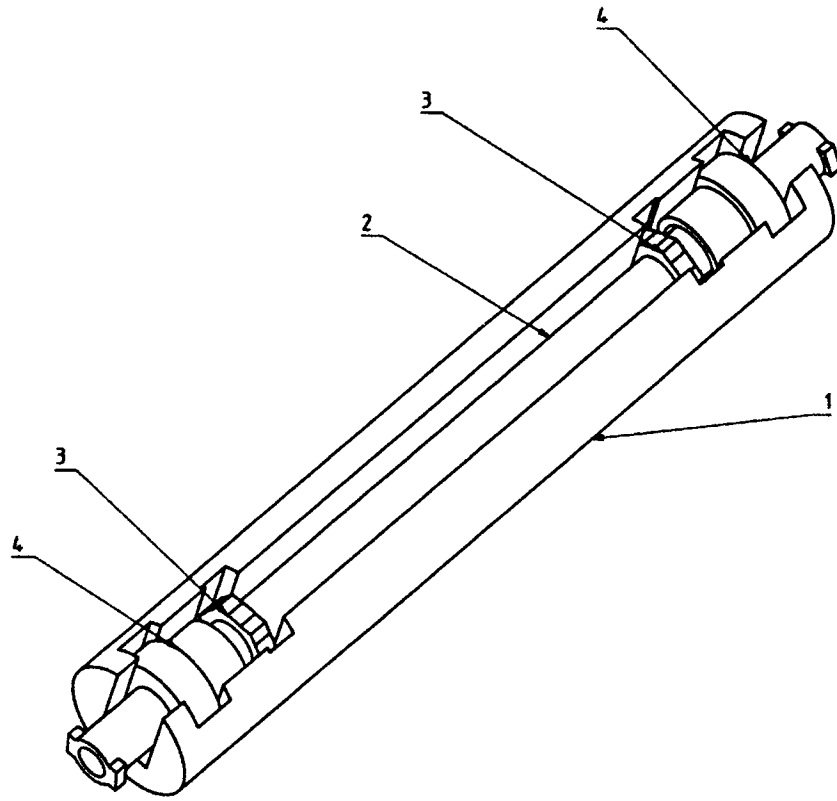
- 5 Sestavená kazeta 1 je vložena do samotné kultivační komory se skleněným tělem 11 o průměru a délce odpovídající rozměrům kazety 1 s nosičem 2 a dvěma zátkami 5 s přípojnými porty pro fluidický okruh. Tyto zátky 5 obsahují odpovídající LL adaptéry pro připojení sestavené kazety 1 s adaptérem 3 a dále odpovídající adaptéry pro připojení k perfuznímu systému. Zátky 5 jsou ve  
10 vnitřní části nosiče 2, kde je možné na základě velikosti průtoku vytvářet definovanou mechanicou stimulaci, a dále také výměnu kultivačního média na vnější straně nosiče 2.

### Průmyslová využitelnost

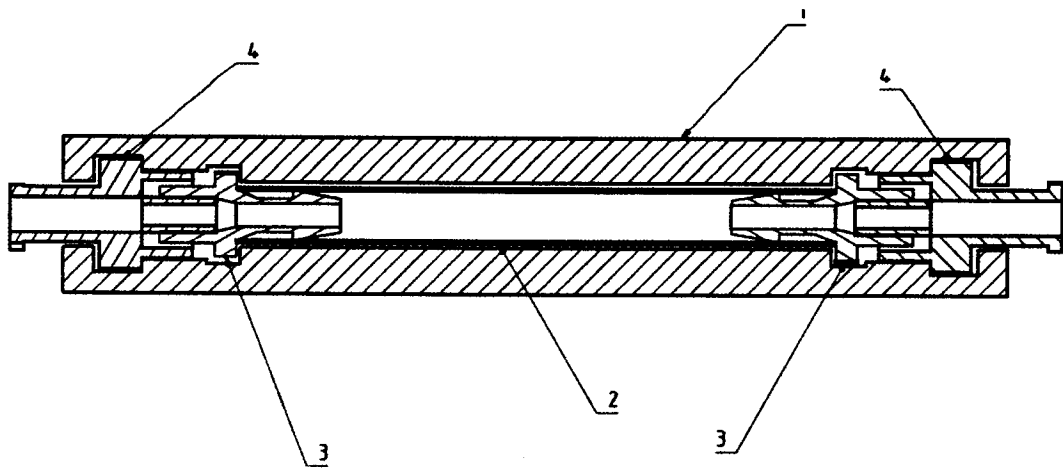
Navržená kultivační komora nalezne využití na pracovištích zabývajících se tkáňovým inženýrstvím v oblasti umělých cévních náhrad.

## 15 NÁROKY NA OCHRANU

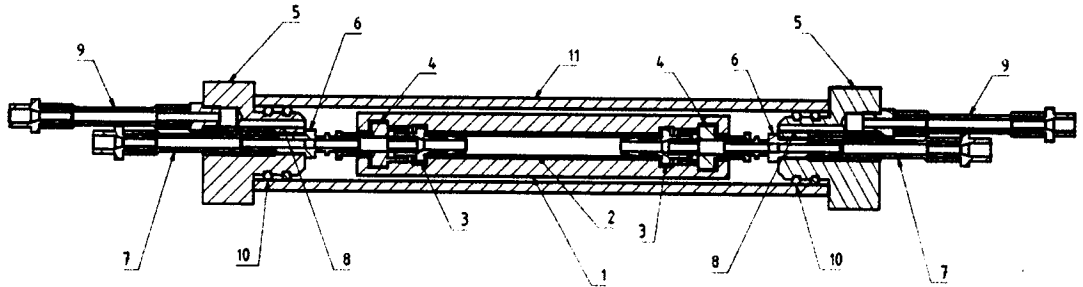
1. Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích, **v y z n a -**  
**č u j í c í s e t í m**, že obsahuje válcové tělo (11) opatřené na svých koncích zátkami (5),  
ke kterým je uvnitř těla (11) připojena dutá válcová kazeta (1), která je na svých koncích  
opatřena adaptéry (3) s jednocestnými ventily (4), pro připojení tubulárního nosiče (2), přičemž  
20 ventily (4) jsou přes trubicí (7) připojeny k perfuznímu okruhu a zátky (5) jsou opatřeny kanálem  
(8) připojeným přes další trubicí (9) k perfuznímu okruhu pro vnější proplach.
2. Kultivační komora podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kazeta (1) pro uchycení tubulárního nosiče (2) má průměr 1 až 8,5 mm a délku 40 až 500 mm.
3. Kultivační komora podle nároku 1 a 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je vyrobena  
25 z netoxických materiálů vybraných ze skupiny teflon PTFE, sklo a nylon PA6 pro umožnění  
parní a/nebo chemické sterilizace.
4. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**,  
že jednocestné ventily (4), trubice (7) a další trubice (9) jsou opatřeny spojkami s koncovkami  
typu Luer-Lock.
- 30 5. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**,  
že adaptéry (3) na koncích kazety (1) mají navzájem různou velikost pro připojení tubulárního  
nosiče (2) kónického tvaru.
6. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**,  
že adaptéry (3) jsou zafixovány ve vnitřním vybrání kazety (1).
- 35 7. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**,  
že válcové tělo (11) je tvořeno skleněnou trubicí.



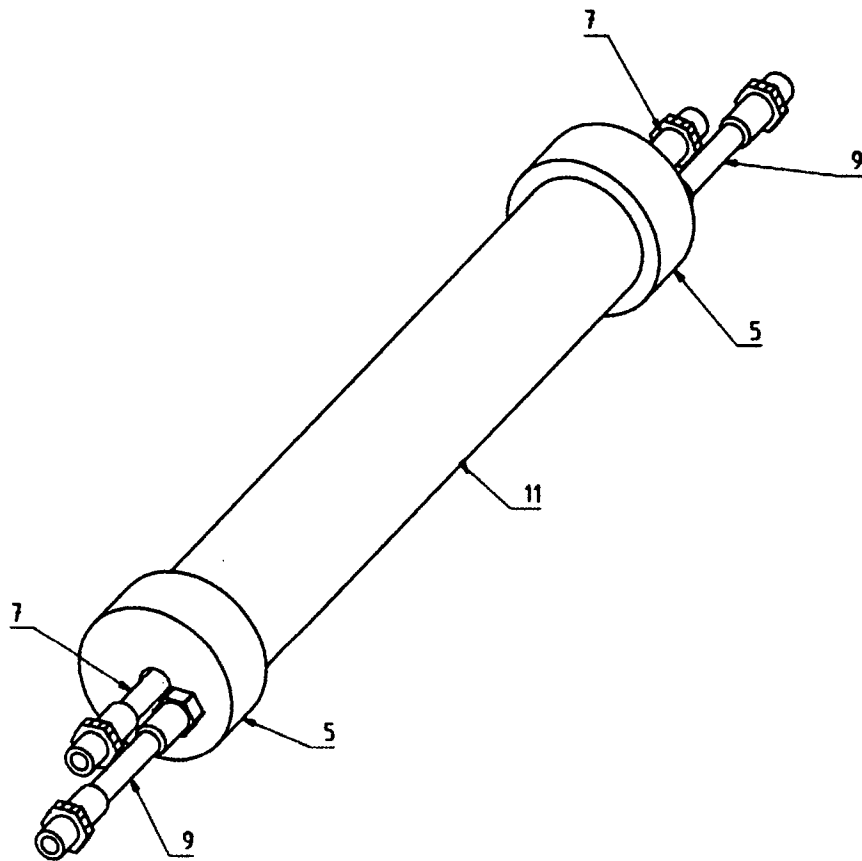
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 33 916

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37152**  
(22) Přihlášeno: **21.01.2020**  
(47) Zapsáno: **14.04.2020**

- (73) Majitel:  
České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,  
Dejvice, CZ  
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Praha 4, Krč, CZ  
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha  
4, Krč, CZ
- (72) Původce:  
Ing. Roman Matějka, Kladno, Rozdělov, CZ  
Ing. Jana Štěpanovská, Praha 5, Stodůlky, CZ  
prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc., 81102 Bratislava,  
SK  
Mgr. Šimon Pražák, Plzeň, Východní Předměstí,  
CZ  
doc. MUDr. Lucie Bačáková, Ph.D., Praha 4,  
Braník, CZ  
MUDr. Miroslav Koňářík, Praha 8, Libeň, CZ  
MUDr. Jaroslav Chlupáč, Ph.D., Praha 4, Modřany,  
CZ  
prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc., Praha 3, Žižkov, CZ
- (74) Zástupce:  
Ing. Václav Kratochvíl, Husníkova 2086/22, 158 00  
Praha 5, Stodůlky

- (54) Název užitého vzoru:  
**Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v  
kultivačních jamkách**

## Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách

### Oblast techniky

5

Technické řešení se týká oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Jedná se o kultivační komoru pro *in vitro* dynamickou kultivaci a stimulaci buněk ve standardních více jamkových kultivačních deskách umožňující kontinuální stimulaci pomocí pulzatilního tlaku s možností průběžného mikroskopického sledování.

10

### Dosavadní stav techniky

Je známo, že dynamická kultivace buněk podporuje růst a diferenciaci buněk navozením fyziologičtějších podmínek kultivace, než je tomu v klasickém statickém systému. Vedle lepšího zásobení kyslíkem a živinami a rychlejšího odstraňování zplodin metabolismu jsou buňky vystaveny cílenému a řízenému mechanickému namáhání, které v případě buněk kmenových navozuje diferenciaci směrem k žádoucímu fenotypu, a u buněk diferencovaných dále prohlubuje jejich fenotypickou maturaci převážně směrem k hladkému svalu (SMC) příp. kostním buňkám.

20

Diferenciace k hladkému svalu je výrazně ovlivněna mechanickým napětím. Většina typů kmenových buněk, jako jsou například kmenové buňky z tukové tkáně, jsou vysoce mechanosenzitivní. Buňky jsou schopné reagovat na mechanické síly prostřednictvím mechanosenzitivních receptorů. Tyto receptory jsou schopny převést mechanické napětí na biochemické signály procesem mechanotransdukce. Účelem použití mechanického stresu během kultivace *in vitro* je vytvoření fyziologických podmínek, kterým jsou buňky v těle vystaveny. Mechanotransdukční mechanismy zahrnují integriny, mechanicky řízené iontové kanály, receptory spojené s G proteiny apod. Bylo publikováno mnoho studií pro stanovení korelace tlakového kmene, buněčné proliferace a diferenciaci SMC. Byly popsány dvě mechanosenzitivní signální dráhy spojené s diferenciací SMC, jmenovitě dráha spojená s RhoA a dráha spojená s FAK kinázou. Aktivace těchto signálních drah vede ke zvýšené produkci SMC diferenciacních markerů.

Běžným způsobem kultivace buněčné kultury je použití tzv. více jamkových kultivačních desek. Tyto kultivační desky jsou standardizované z hlediska rozměrů a obsahují podle typu 6 až 96 kultivačních jamek pro nasazení kultury. Jejich povrch je chemicky nebo plazmaticky upraven tak, aby buněčná kultura mohla adherovat na povrch kultivační jamky a dále proliferovat. Diferenciace je řešená v tomto případě pouze chemickou cestou, tj. použitím přísad do kultivačního média jako jsou např. růstové faktory. Dostupné dynamické kultivační systémy sice umožňují vytvářet mechanickou stimulaci ovšem využívají specializované kultivační komory, které tvarově a materiálově se liší od běžně používaných kultivačních desek. Z hlediska studie vyžadující srovnání tak statická kultivace často probíhá v kultivační více jamkové desce a dynamická kultivace ve specializované komoře. Tím pádem je výsledek ovlivněn nejenom samotnou metodou, ale i povrchem a tvarem použité kultivační komory apod.

45

### Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky jsou do značné míry odstraněny kultivační komorou pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách podle tohoto technického řešení. Jeho podstatou je to, že obsahuje základnu, ke které je připojen vymezení člen pro umístění standardizované kultivační více jamkové desky, na které je přes ploché silikonové těsnění umístěn kryt, který je opatřen hadičkami se spojkami pro připojení generátoru tlakových pulzů, přičemž základna a kryt jsou vzájemně staženy šrouby s maticemi.

55



Vymezovací člen má prostor pro uchycení a utěsnění standardní více jamkové desky vybrané ze skupiny jamkových kultivačních desek s 6, 12, 24, 48 a 96 jamkami.

5 Spojky hadiček jsou s výhodou opatřeny spojkami Luer-Lock pro připojení generátoru tlakových pulzů a/nebo dalších kultivačních komor. Kultivační komora je ve výhodném provedení z polykarbonátu všechny její části jsou sterilizovatelné pomocí parní sterilizace – autoklávu.

10 Kultivační komora podle tohoto technického řešení umožňuje uchycení standardní více jamkové kultivační komory a v této kultivační desce tlakově stimulovat buněčnou kulturu.

15 Samotná kultivační komora je tvořena dvěma částmi, základnou a krytem. Konstruktivním materiálem je třískově obráběný polykarbonát. Základna komory je tvořena dvěma sendvičovými díly, kde spodní část vytváří mechanickou podporu a vrchní díl vymezuje prostor pro použití standardizované kultivační více jamkové desky. Tato základna je stažena pomocí nerezových šroubů s vnitřním šestihranem. Tyto šrouby jsou zapuštěny do spodního dílu tak, aby výsledná sestava byla hladká v celé ploše. Díky tomu je možné umístit uzavřenou komoru do optického mikroskopu a průběžně pozorovat buněčnou kulturu při kultivaci. Tyto šrouby trčí pro uchycení krytu kultivační komory. Zároveň tyto šrouby jsou umístěny vně kultivačních prostor, aby nedošlo ke kontaminaci kultury.

20 Kryt komory je tvořen jedním dílem obsahujícím hadicové olivky. Tyto olivky jsou vyfrézované přímo do těla krytu tak aby nebylo nutné používat další hadicové fitinky a řešit jejich utěsnění. K těmto olivkám jsou připojeny silikonové hadičky se spojkami typu Luer-Lock pro připojení k tlakovému generátoru a řetězení více komor. Stažení krytu se základnou komory je realizováno pomocí křídlových matic M4. Utěsnění vložené kultivační více jamkové desky v kultivační komoře je realizováno pomocí 1 mm plochého silikonového těsnění jež tvarově kopíruje obvod více jamkové desky a má vyřezané otvory podle použité kultivační více jamkové desky tak, aby bylo možné kulturu pozorovat ve světelném mikroskopu.

30 Pro ověření vhodnosti byly všechny použité materiály využité pro konstrukci testovány na cytotoxicitu. Konstrukce umožňuje opakovatelnou parní sterilizaci v autoklávu >10 cyklů, aniž by došlo k deformaci, poškození nebo celkové degradaci komory. Celá konstrukce komory byla optimalizována tak, aby bylo možné pracovat ve sterilních podmínkách v laminárním boxu bez nutnosti použití speciálních nástrojů pro sestavení. Komora s uzavřenou více jamkovou kultivační deskou byla testována pro maximální přetlak 100 kPa.

### Objasnění výkresů

40 Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách podle tohoto technického řešení bude podrobněji popsána na konkrétním příkladu provedení s pomocí přiloženého výkresu a mikroskopického snímku, kde na Obr. 1 je v axonometrickém pohledu znázorněna rozložená kultivační komora. Na Obr. 2 je znázornění sestavené komory v řezu. Na Obr. 3 je mikroskopický a imunofluorescenčně značený snímek buněčné kultury lidských kmenových buněk z tukové tkáně (HmASC) při statické kultivaci, bez zátěže, v kultivační desce a kultura kultivovaná při pulzativním tlaku v navržené kultivační komoře.

### Příklady uskutečnění technického řešení

50 Příkladná kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách obsahuje základnu 1, ke které je připojen vymezovací člen 2 pro umístění standardizované kultivační vícejamkové desky 4 s šesti jamkami, na které je přes ploché silikonové těsnění 5 umístěn průhledný kryt 6, který je opatřen hadičkami 8 se spojkami Luer-Lock pro připojení generátoru tlakových pulzů,

příčemž základna 1 a kryt 6 jsou vzájemně staženy šrouby 3 s maticemi 7. Kultivační komora je z polykarbonátu a všechny její části jsou sterilizovatelné pomocí parní sterilizace – autoklávu.

5 Příkladná kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách je tvořena základnou 1 a vymešovacím členem 2, jež jsou navzájem staženy pomocí osmi stahovacích nerezových šroubů 3 M 4 x 45. Tato základna 1 s vymešovacím členem 2 vytváří definovaný prostor pro umístění standardní kultivační jamkové desky 4. Utěsnění komory zajišťuje ploché silikonové těsnění 5, kde tvar těsnění je upraven podle použité kultivační jamkové desky 4 tak, aby zajistil utěsnění a zároveň nezakrýval velký prostor jednotlivých kultivačních jamek kvůli možnosti mikroskopické pozorování v průběhu experimentu. Celá komora je uzavřena průhledným krytem 6 jež obsahuje průchozí otvory pro stahovací šrouby 3 a je následně zajištěna pomocí osmi nerezových rýhovaných matic 7 M4. Kryt 6 je dále opatřen dvěma nátrubky se silikonovými hadičkami 8 opatřenými porty Luer-Lock určenými pro připojení k perfuznímu/tlakovému generátoru a možnosti řetězení více komor.

15 **Příklad kultivace buněčné kultury lidských kmenových buněk z tukové tkáně (HmASC) při dynamické tlakové zátěži**

20 V případě dynamické kultivace byla kultivační jamková deska 4 uzavřena do příkladné kultivační komory pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách, následně byla tato komora připojena ke generátoru tlakových pulzů. Tyto pulzy byly nastaveny na hodnoty horního tlaku 120 mmHg (15,9 kPa), spodního tlaku 80 mmHg (10,6 kPa) při frekvenci 60 pulzů za minutu (1 Hz). Kultivace byla jak v případě statické, tak dynamické, realizována po dobu 7 dní.

25 Na imunofluorescenčně značeném mikroskopickém snímku jsou znázorněny proteiny F-actin (červeně), calponin (zeleně) a buněčná jádra (modře). F-actin znázorňuje aktinový cytoskelet buněčné kultury. Calponin je tzv. střednědobý ukazatel buněčné diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám. Při porovnání statické a dynamické tlakové stimulace je patrné, že v případě dynamické stimulace jsou patrné fragmenty calponinu jež signalizují diferenciaci buněčné kultury směrem k hladkému svalu. Stejně tak i celková morfologie aktinových vláken v případě dynamické kultivace je seřazená v jednom směru pro kontraktilní funkci, kdežto u statické kultivace se jedná o všesměrové uspořádání.

### 35 Průmyslová využitelnost

Navržená kultivační komora nalezne využití na pracovištích zabývajících se výzkumem v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny.

40

## NÁROKY NA OCHRANU

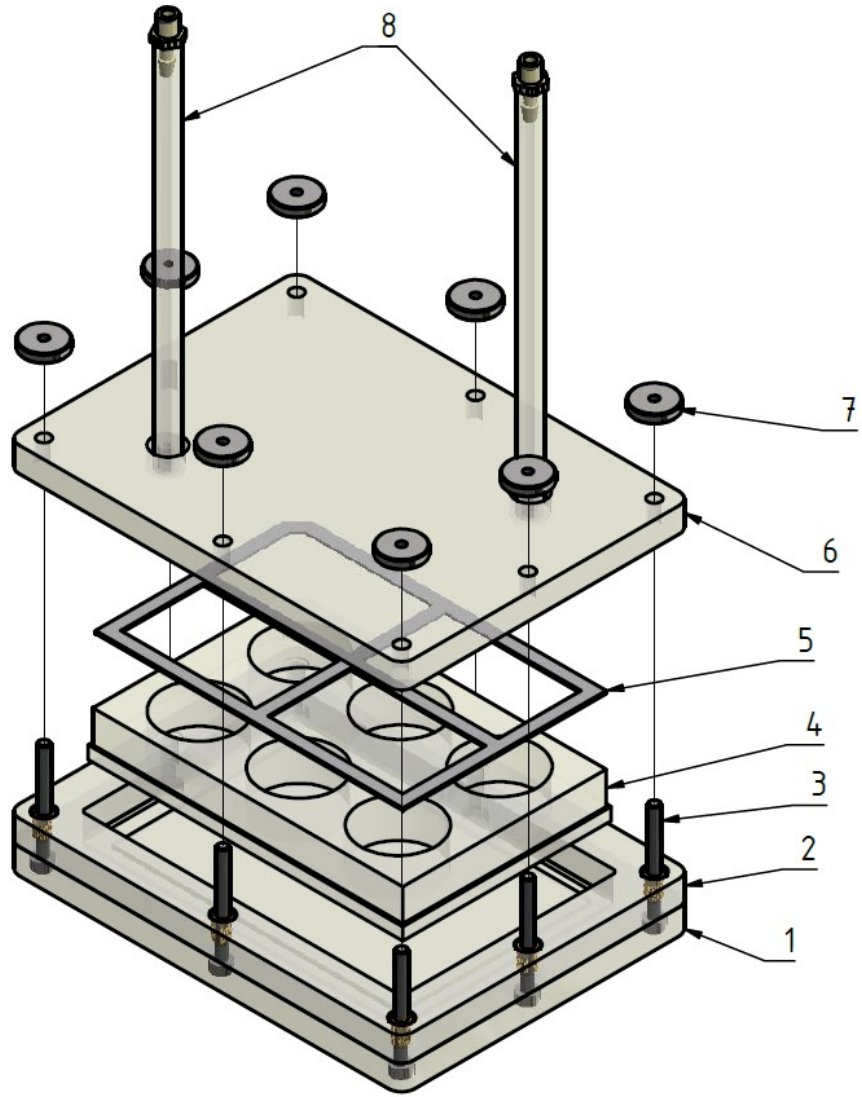
45 1. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách, **vyznačující se tím**, že obsahuje základnu (1), ke které je připojen vymešovacím člen (2) pro umístění standardizované kultivační vícejamkové desky (4), na které je přes ploché silikonové těsnění (5) umístěn kryt (6), který je opatřen hadičkami (8) se spojkami pro připojení generátoru tlakových pulzů, přičemž základna (1) a kryt (6) jsou vzájemně staženy šrouby (3) s maticemi (7).

50 2. Kultivační komora podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vymešovacím člen (2) má prostor pro uchycení a utěsnění standardní více jamkové desky (4) vybrané ze skupiny kultivačních jamkových desek (4) s 6, 12, 24, 48 a 96 jamkami.

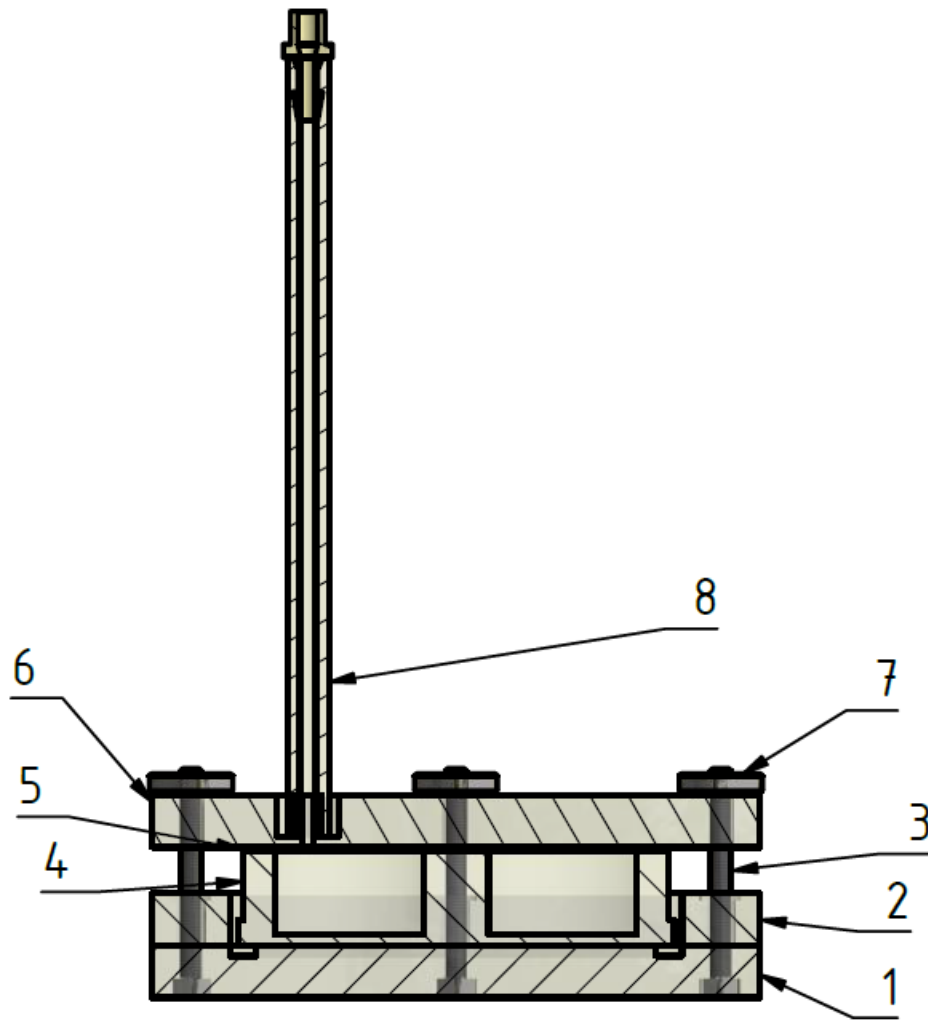
3. Kultivační komora podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že spojky hadiček (8) jsou opatřeny spojkami Luer-Lock pro připojení generátoru tlakových pulzů a/nebo dalších kultivačních komor.
- 5 4. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že je z polykarbonátu.
5. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že všechny její části jsou sterilizovatelné pomocí parní sterilizace – autoklávu.

10

3 výkresy



Obr. 1

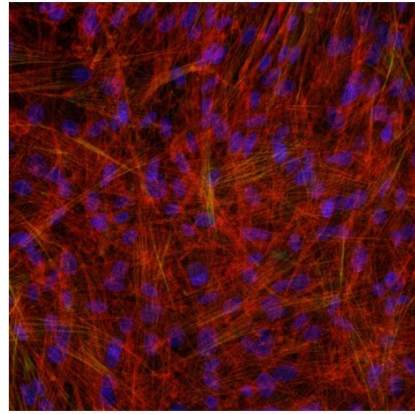
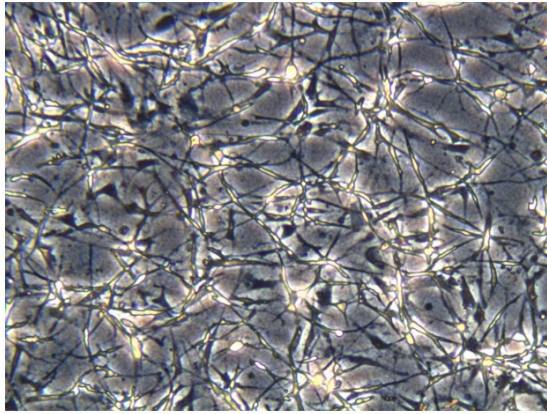


Obr. 2

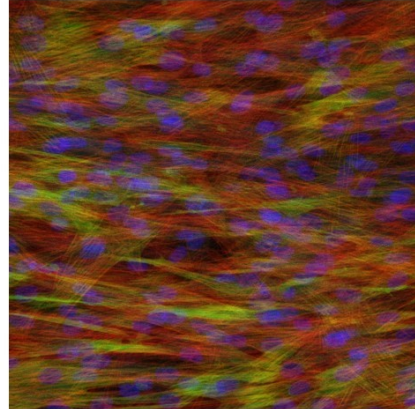
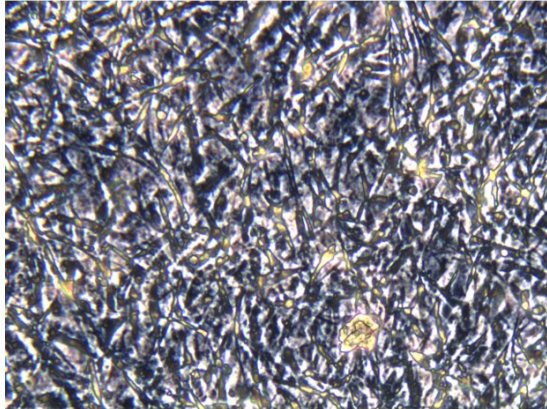
Zobrazení ve fázovém kontrastu

Fluorescenční zobrazení

Statická kultivace



Dynamická tlaková stimulace



Obr. 3

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 30 705

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33237**  
(22) Přihlášeno: **27.12.2016**  
(47) Zapsáno: **30.05.2017**

(73) Majitel:  
České vysoké učení technické v Praze, Fakulta  
biomedicínského inženýrství, Kladno, CZ  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,  
Praha 6, CZ  
Fyziologický ústav AVČR, v. v. i., Praha 4, CZ

(72) Původce:  
Ing. Roman Matějka, Zlín, CZ  
Ing. Jana Štěpanovská, Praha 5, CZ  
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., Praha 6, CZ  
prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc., 811 02 Bratislava,  
SK  
RNDr. Eduard Brynda, CSc., Praha 2, CZ  
Ing. Tomáš Riedel, Ph.D., Praha 4 - Chodov, CZ  
Mgr. Elena Filová, Ph.D., Praha 4, CZ  
MUDr. Martina Trávníčková, Slatiňany, CZ  
Ing. Jana Zárubová, Ph.D., Praha 9, CZ  
Ing. Zuzana Riedelová, Ph.D., Praha 4 - Chodov,  
CZ

(74) Zástupce:  
Ing. Václav Kratochvíl, Husníkova 2086/22, 158 00  
Praha 5

(54) Název užitého vzoru:  
**Kultivační komora pro stimulaci planárních  
vzorků decelularizovaného perikardu**

**CZ 30705 U1**

## Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu

### Oblast techniky

5 Technické řešení se týká oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Jedná se o kul-  
tivační komoru pro *in vitro* dynamickou kultivaci a stimulaci buněk na planárních nosičích tvoře-  
ných decelularizovanou tkání perikardu.

### Dosavadní stav techniky

Stárnutí populace přináší i vzestup onemocnění kardiovaskulárního systému a zvýšenou poptávku  
po chlopenních náhradách. V současnosti se používají srdeční chlopenní náhrady mechanické  
10 nebo biologické. Mechanické náhrady aortální chlopně jsou vyrobeny se slitin ušlechtilých kovů,  
z polymerů, z pyrolytického uhlíku, a jsou trvanlivé, ale vyžadují soustavnou antikoagulační  
léčbu. Jejich použití mohou doprovázet nežádoucí účinky, jako jsou krvácení, chlopenní dys-  
funkce, trombóza, infekční endokarditida apod. Biologické náhrady chlopni se vyrábí šitím  
z hovězího decelularizovaného perikardu, nebo se používá prasečí aortální chlopeň, nebo  
15 allogenní lidská chlopeň. Tyto náhrady nejsou osazené buňkami pacienta, po čase degenerují,  
obvykle u 2 až 4 % pacientů/rok, ztrácí funkčnost a musí se operačně vyměnit - asi u 65 %  
pacientů po 15 letech. To představuje zátěž pro pacienta i náklady pro zdravotnictví a společnost.  
Problém je i u dětí, kde neexistuje náhrada, která by rostla současně s pacientem. Proto jsou  
vyvíjeny protézy tkáňovým inženýrstvím tak, aby chlopenní náhrada byla živá, obnovovala se,  
20 byla dlouhodobě funkční a rostla s dětským pacientem. Vhodný biologický nosič je například  
prasečí perikard osazený autologními buňkami pacienta. Vhodnými buňkovými typy jsou  
endotelové buňky, kmenové buňky, hladké svalové buňky, intersticiální buňky chlopně, nebo  
jejich kombinace. Decelularizace perikardu a jeho rovnoměrné osazení buňkami je důležitým  
krokem zabezpečujícím funkčnost srdeční chlopňové protézy. Toto osazení musí probíhat ve  
speciálně navržených kultivačních komorách, které zajišťují jednak optimální životní podmínky,  
25 tak také vytvářejí fyziologickou stimulaci tkáně a buněčné kultury, která podporuje buněčnou  
diferenciaci a tvorbu specifických proteinů, které zpevňují celou strukturu. Pro zvýšení schop-  
nosti buněk adherovat a prorůstat do decelularizované tkáně je nutné tkáň modifikovat např.  
fibrinovým povlakem postupně uvolňujícím růstové faktory a připojením dalších biomolekul  
interagujících s buňkami, jako jsou heparin, fibronectin, laminin. Zároveň je možné tento proces  
30 ještě podpořit vytvořením koncentračního gradientu v kultivačních médiích, jež perfundují tuto  
tkáň nebo využívat vzájemného působení různých typů buněk.

Chlopenní náhrada je však morfologicky komplexní tkáň, u které je složitá analýza chování bu-  
něčné kultury v závislosti na změně chemických a mechanických stimulů. Proto je vhodnější na  
testování a optimalizaci osídlení decelularizovaných tkání vytvořit vhodný model, jež může slou-  
žit pro potřeby srovnání. Právě tento model vytváří navržené technické řešení, v podobě kulti-  
35 vační komory.

Vzhledem ke specifické aplikaci se jedná o unikátní řešení. Komerční řešení obdobného druhu  
neexistuje. V odborné literatuře jsou zmínky o komorách určených pro osídlování decelularizo-  
vaných tkání, ovšem zde se jedná o ryze experimentální sestavy.

### Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky jsou do značné míry odstraněny kultivační komorou pro stimulaci  
planárních vzorků decelularizovaného perikardu, podle tohoto technického řešení. Jeho podstatou  
je to, že obsahuje držák decelularizované tkáně - perikardu, který vymezuje dva nezávislé kom-  
párty na obou stranách této tkáně pro nasazení buněčné suspenze a tvoří dva rezervoáry pro  
45 kultivační médium. Tyto kompartmenty jsou uzavřeny kryty obsahujícími fluidické spojky pro  
výměnu kultivačního média a porty typu Luer-Lock (dále jen LL) určené pro vpravení buněčné  
suspenze, připojení systému tlakové stimulace a možnost přidání dalších chemických látek do  
této komory. Použití spojek LL je výhodné z hlediska možnosti používat jednorázový spotřební  
materiál pro propojení - injekční stříkačky, infuzní hadičky apod.



5  
10  
15  
20

Systém držáku s dvěma nezávislými kompartmenty umožňuje s výhodou uchycení decelularizovaného perikardu s aktivní plochou pro kultivaci v rozměru od 15 do 35 mm kruhového nebo čtvercového tvaru. Toto dvou kompartmentové řešení dále umožňuje s výhodou nezávislou chemickou modifikaci každého kompartmentu prostřednictvím např. fibrinových sítí s růstovými faktory a zároveň umožňuje proplach různými látkami např. s rozdílnou koncentrací, což vytváří gradient podporující prorůstání buněk tkání, jež je důležitý pro další použití v oblasti konstrukce chlopenních náhrad. Připojení k systému tlakové stimulace dále podporuje buněčnou diferenciaci a tvorbu specifických proteinů např. kolagenu a elastinu, které zvyšují pevnost celé struktury.

10  
15  
20

Držák decelularizovaného perikardu je tvořen dvěma třískově obráběnými díly z polykarbonátu (PC). Oba tyto díly mají vyfrézovaný otvor, jenž vymezuje aktivní kultivační plochu na decelularizovaném perikardu a zároveň vytváří jeden z dvou kompartmentů s rezervoárem kultivačního média. Praktické rozměry těchto kompartmentů mohou být upraveny dle potřeby od 15 mm do 30 mm a to buď ve čtvercovém, nebo kruhovém tvaru. Spodní díl tohoto držáku obsahuje, kromě otvoru kompartmentu, ještě drážku pro silikonový o-kroužek rozměru 50 x 4 mm, jež zatěsňuje celý komplet. Zbylá část je hladká, aby bylo možné pohodlně decelularizovaný perikard roztáhnout do držáku. Horní díl obsahuje drážku čtvercového/kruhového tvaru, do níž je vlepen silikonový těsnicí prvek kruhového profilu, jež fixuje decelularizovaný perikard po stažení obou dílů držáku. Tento těsnicí prvek zároveň zajišťuje těsnost mezi jednotlivými kompartmenty. Oba tyto díly držáku jsou k sobě staženy nerezovými šrouby M4 x 20 s vnitřním šestihranem. Aby nedošlo ke kontaminaci kultury, jsou tyto šrouby vně aktivní kultivační oblasti.

25

K takto sestavenému držáku jsou připevněny kryty s fluidickými prvky. Tyto kryty jsou tvořeny třískově obráběným PC. Oba kryty obsahují drážku pro silikonový o-kroužek rozměru 50 x 4 mm, jež zatěsňuje celou sestavu. Tyto kryty obsahují vždy dva páry fitinek. Jeden pár tvoří L-fitinky s připojenými hadičkami a spojkami LL pro připojení k perfuznímu systému zajišťujícímu výměnu kultivačního média. Druhý pár je tvořen panelovými spojkami LL umožňujícími vpravení buněčné suspenze, látek pro chemickou modifikaci decelularizovaného perikardu, připojení lineárního čerpadla pro tlakovou stimulaci apod.

30  
35

Takto sestavená komora zajišťuje fixaci decelularizovaného perikardu definovaného rozměru a minimalizuje riziko jeho poškození, zkroucení a kontaminaci. V uzavřené komoře pak mohou být, za sterilních podmínek, postupně vyměňovány roztoky látek, ze kterých jsou vytvářeny molekulární bioaktivní soubory modifikující perikard, zaváděny suspenze různých typů buněk a průběžně měněno složení kultivačního média. Po připojení k perfuznímu systému je možné vytvářet ještě rozdílný koncentrační gradient růstových faktorů prostřednictvím rozdílných médií, jež proplachují každý z kompartmentů. Tímto způsobem je možné aktivně ovlivňovat chování buněčné suspenze a její prorůstání do decelularizovaného perikardu. Připojení k tlakové stimulaci aktivně podporuje diferenciaci buněk a produkci specifických proteinů.

40

Konstrukčním materiálem komory je hlavně třískově obráběný polykarbonát (PC), nylon (PA6), a silikonové těsnicí prvky. Pro lepení částí byla použita epoxidová lepidla s atestem pro medicínské použití. Pro ověření vhodnosti byly všechny použité materiály testovány na cytotoxicitu. Konstrukce umožňuje opakovanou sterilizaci v autoklávu - testováno pro > 10 cyklů, aniž by došlo k deformaci, poškození, uvolnění lepených dílů apod. Celá konstrukce komory byla optimalizována tak, aby bylo možné pracovat ve sterilních podmínkách, v laminárním boxu v rukavicích a použití pouze imbusového klíče vel. 3 pro stažení držáku.

#### Objasnění výkresů

45  
50

Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu podle tohoto technického řešení bude podrobněji popsána na konkrétním příkladu provedení s pomocí příložených výkresů, kde na Obr. 1 je v axonometrickém pohledu znázorněn držák decelularizovaného perikardu. Na Obr. 2 je znázorněn v bokorysu řez držákem s uchyceným decelularizovaným perikardem. Na Obr. 3 je znázorněn v axonometrickém pohledu řez sestavenou kultivační komorou s držákem s uchyceným decelularizovaným perikardem a na Obr. 4 je v axonometrickém pohledu sestavená celá kultivační komora.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příkladná kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu, obsahuje držák decelularizovaného perikardu obsahující spodní díl 1 a horní díl 3, které jsou opatřeny dvěma nezávislými kompartmenty 5, 6 na obou stranách vzorku decelularizovaného perikardu pro kultivační médium. Spodní díl 1 a horní díl 3 držáku jsou překryty kryty 10 s fluidickými spojkami 12 pro výměnu kultivačního média a porty 13 pro přívod buněčné suspenze, připojení systému tlakové stimulace a přidání dalších chemických látek. Porty 13 jsou opatřeny spojkami Luer-Lock. Držák má aktivní plochu pro kultivaci o rozměru od 15 do 35 mm kruhového tvaru nebo čtvercového tvaru. Kultivační komora je z polykarbonátu. Kryty 10 jsou na straně přilehlé k držáku opatřeny drážkou pro silikonový o-kroužek 7. Spodní díl 1 a horní díl 3 jsou navzájem staženy šrouby 8. Kryty 10 jsou navzájem staženy dalšími šrouby 11.

Příklad - držák decelularizovaného perikardu s rozměry 20 x 20 mm

Technické řešení držáku decelularizovaného perikardu je vyobrazeno na obr. 1 a v řezu na obr. 2. Na spodní díl 1 držáku je rozvinut decelularizovaný perikard 2, který je zafixován horním dílem 3 držáku, který obsahuje vymežovací silikonový těsnicí profil 4. Tím jsou vytvořeny dva kompartmenty 5, 6 na obou stranách decelularizovaného perikardu 2. Zatěsnění celého kompletu držáku je realizováno o-kroužkem 7 umístěným v drážce. Stažení držáku zajišťují čtyři nerezové šrouby 8 M4 x 20. Držák dále obsahuje otvory 9, jež jsou určeny pro uchycení krytů 10.

Držák je umístěn v kultivační komoře. Sestavený držák uzavírají kryty 10 komory, jež opět obsahují drážky s těsnícími o-kroužky 7. Pro stažení kompletu kultivační komory s držákem decelularizovaného perikardu 2 jsou použity nerezové šrouby 11 s rýhovanými maticemi, jež prochází otvory 9 v držáku. Kryty 10 komory obsahují jednak fitinky s hadičkami s fluidickými spojkami 12 pro přívod a odvod média do jednotlivých kompartmentů 5, 6 a porty 13 LL pro vpravení dalších chemických látek a buněčné suspenze.

#### 25 Průmyslová využitelnost

Navržená kultivační komora nalezne využití na pracovištích zabývajících se tkáňovým inženýrstvím v oblasti umělých chlopenních náhrad.

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje držák decelularizovaného perikardu (2) obsahující spodní díl (1) a horní díl (3), které jsou opatřeny dvěma nezávislými kompartmenty (5, 6) na obou stranách vzorku decelularizovaného perikardu (2) pro kultivační médium, přičemž spodní díl (1) a horní díl (3) držáku jsou překryty kryty (10) s fluidickými spojkami (12) pro výměnu kultivačního média a s porty (13) pro přívod buněčné suspenze, připojení systému tlakové stimulace a přidání dalších chemických látek.

2. Kultivační komora podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že porty (13) jsou opatřeny spojkami Luer-Lock.

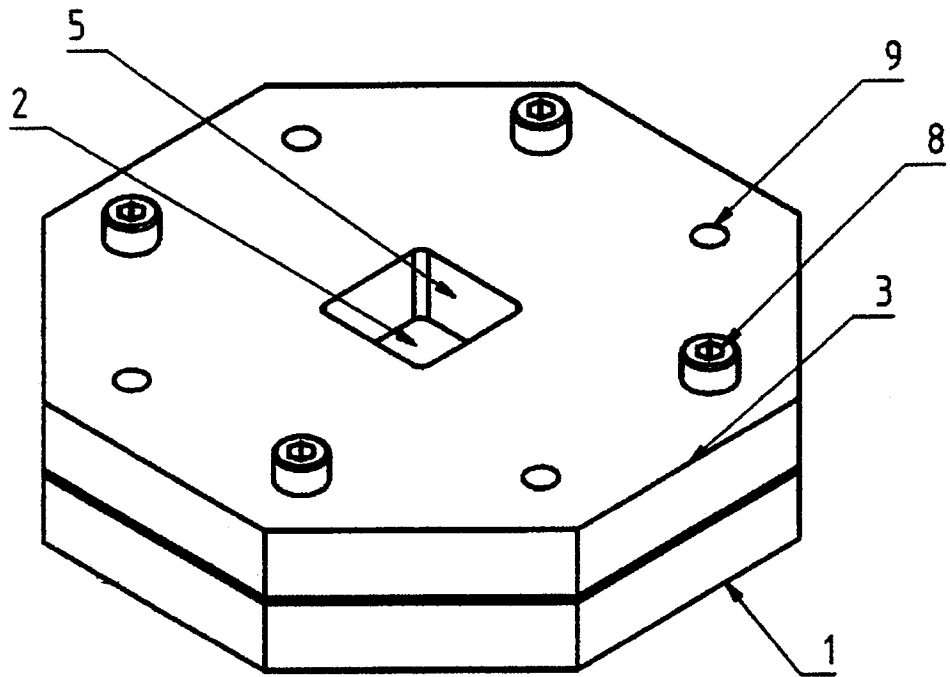
3. Kultivační komora podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že držák má aktivní plochu pro kultivaci o rozměru od 15 do 35 mm kruhového tvaru.

4. Kultivační komora podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že držák má aktivní plochu pro kultivaci o rozměru od 15 do 35 mm čtvercového tvaru.

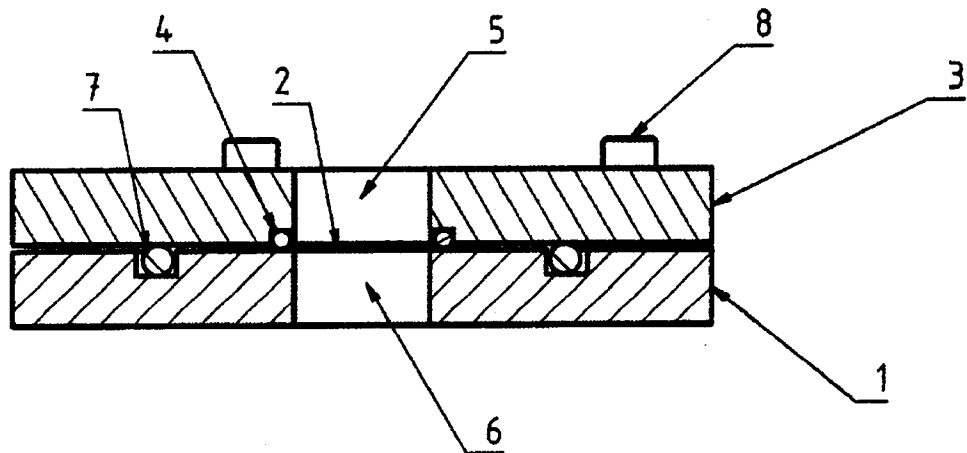
5. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že je z polykarbonátu.

6. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kryty (10) jsou na straně přilehlé k držáku opatřeny drážkou pro silikonový o-kroužek (7).
7. Kultivační komora podle kteréhokoli z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že je spodní díl (1) a horní díl (3) držáku jsou navzájem staženy šrouby (8) a kryty (10) jsou navzájem staženy dalšími šrouby (11).
- 5

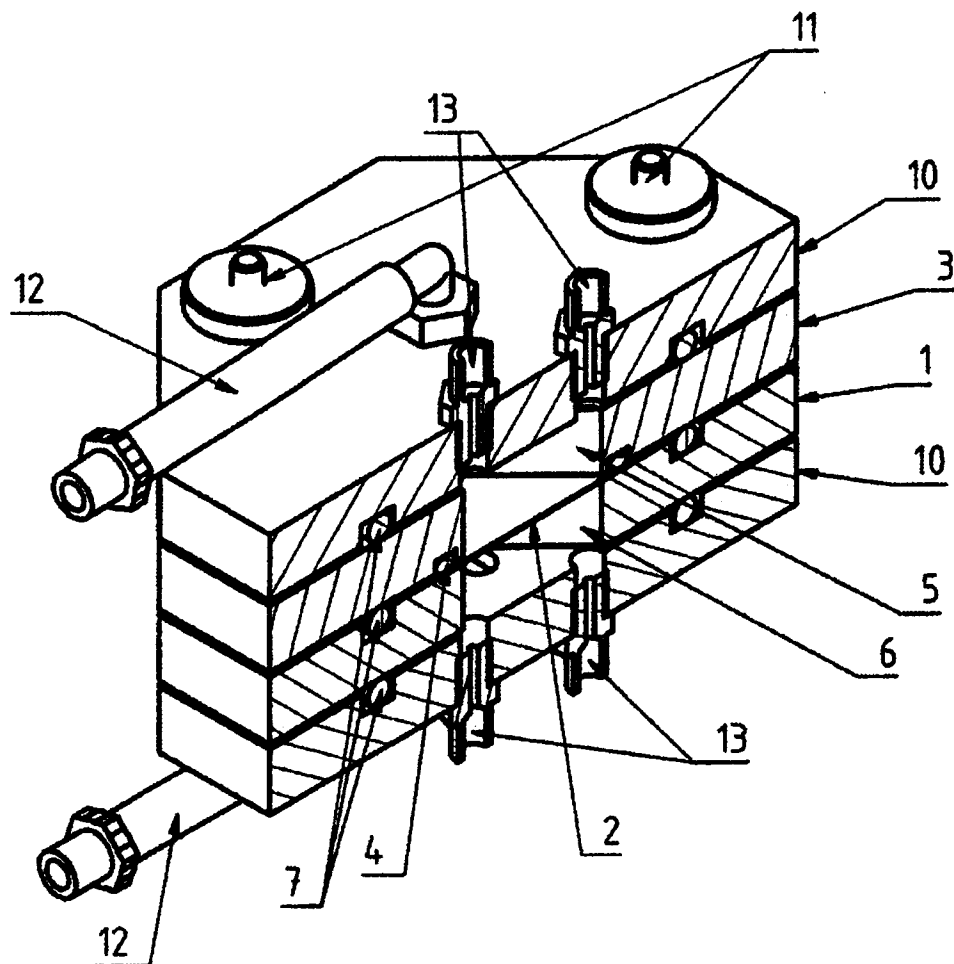
3 výkresy



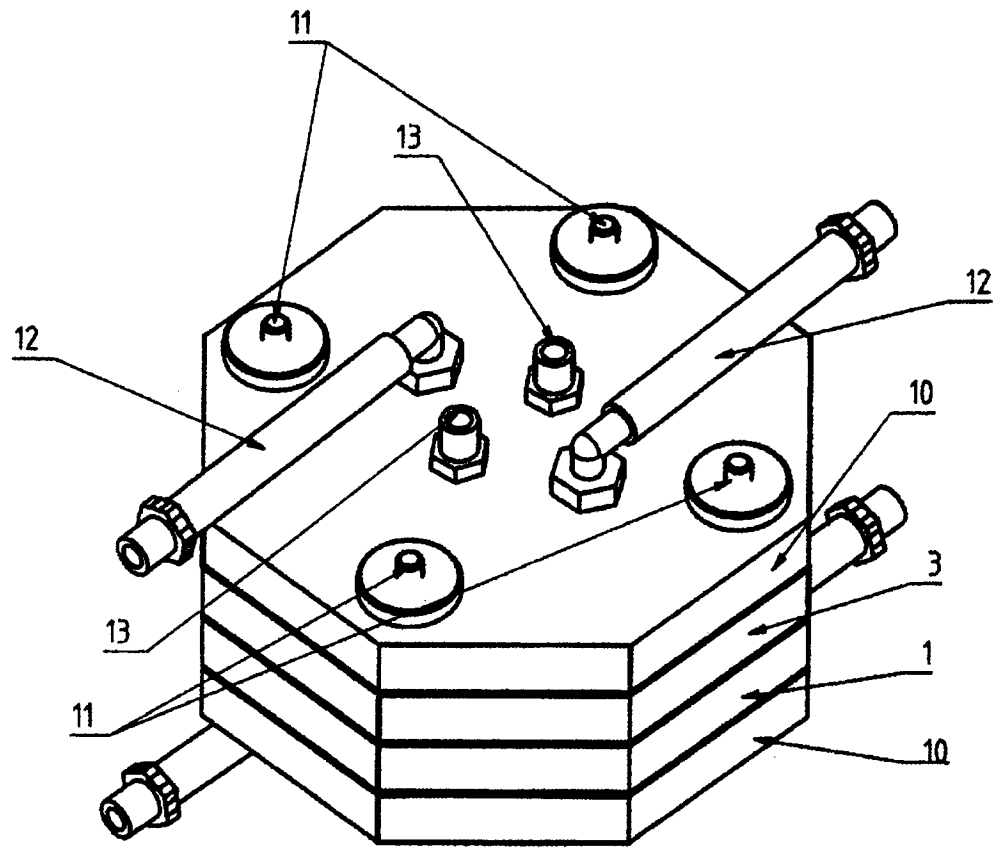
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

---

Konec dokumentu

---

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 33 917

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37192**  
(22) Přihlášeno: **30.01.2020**  
(47) Zapsáno: **14.04.2020**

(73) Majitel:  
České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,  
Dejvice, CZ  
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha  
4, Krč, CZ

(72) Původce:  
Ing. Roman Matějka, Kladno, Rozdělov, CZ  
Ing. Jana Štěpanovská, Praha 5, Stodůlky, CZ  
prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc., 81102 Bratislava,  
SK  
MUDr. Miroslav Koňářík, Praha 8, Libeň, CZ  
MUDr. Jaroslav Chlupáč, Ph.D., Praha 4, Modřany,  
CZ  
prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc., Praha 3, Žižkov, CZ

(74) Zástupce:  
Ing. Václav Kratochvíl, Husníkova 2086/22, 158 00  
Praha 5, Stodůlky

(54) Název užitného vzoru:  
**Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací  
pro sterilní dynamickou kultivaci buněk**

## Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk

### Oblast techniky

5

Technické řešení se týká oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Jedná se o mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk, který vytváří definovaný průtok s možností generování tlakových pulzů pro dynamickou kultivaci buněk v kultivačních komorách.

10

### Dosavadní stav techniky

Dynamická kultivace buněk simuluje fyziologické podmínky, které jsou podstatné pro růst, diferenciaci a genovou expresi buněčné kultury. Základním principem dynamické kultivace je mechanická stimulace buněk, tj. generování průtočného smykového napětí a tlakových změn podobně, jak je tomu v cévním řečišti. Průtočné smykové napětí pozitivním způsobem ovlivňuje fenotypickou maturaci endotelových buněk, jejich orientaci ve směru proudění a celkově jejich růst. Tlakové poměry zase mechanicky působí jednak hydrostatickým tlakem na cévní stěny, což má za následek její částečnou kompresi nebo změnu geometrického tvaru celé cévy. Tento jev je zase klíčový pro vývoj buněk hladké svaloviny.

Jednou možností je využití peristaltických pump. Tyto pumpy umožňují relativně jednoduché řízení průtočného objemu změnou jejich otáček ovšem velkým negativem je fakt, že samotný způsob čerpání, při kterém dochází k periodickému stlačování okluzní hadice generuje tlakové pulzy. Frekvence a amplituda těchto pulzů je navíc ovlivněna geometrií hadic, celkovým odporem a poddajností zbylého kultivačního okruhu, geometrií čerpadla a jeho otáčkami. Pro potlačení pulzů je nutné do kultivačního okruhu vložit vzduchový tlumič pulzů. To sebou však nese nevýhodu v celkově větším objemu kultivačního média a zároveň znemožňuje následné generování kontrolovaných tlakových pulzů při kultivaci, vzhledem k dynamice celé soustavy.

Druhou možností je využití lineárních dávkovačů využívajících injekční stříkačky coby rezervoár média. Řada komerčních řešení umožňuje i modulaci řízení pohybu pístu, čímž je možné vytvořit definovaný průtok a při zavedení odporu do kultivačního okruhu i tlakové pulzy. Nevýhodou tohoto řešení je však fakt, že se jedná pouze o jednocestné řešení, kdy médium je postupně vytlačováno z injekční stříkačky přes komoru a odtéká pryč. Po vyprázdnění stříkačky je nutná její výměna. Toto řešení je používáno např. pro mikrofluidické systémy, kde je docíleno vhodné stimulační i při mikrolitrových objemech a zároveň celkový objem dostatečný pro realizaci celého pokusu. Na druhou stranu toto řešení neumožňuje generování vyšších objemových průtoků a recirkulaci kultivačního média.

### Podstata technického řešení

Základním prvkem celého systému je lineární pohybová platforma s elektronicky řízeným servopohonem. K této platformě jsou uchyceny držáky injekčních stříkaček. Tyto držáky jsou řešeny jako výměnné a umožňují uchycení jako maloobjemových, tj. 5, 10 ml, tak i velkoobjemových a výplachových stříkaček, tj. 50, 150 ml, pro vytvoření velkých objemových průtoků. Kromě toho je k pohybové platformě uchycen držák rezervoáru kultivačního média a držáky s kleštinovým přepínacím dvoucestným ventilem.

Samotný perfuzní okruh je pak tvořen injekční stříkačkou, jež je uchycena do držáku v pohybové platformě. Za injekční stříkačkou je perfuzní okruh rozdělen Y spojkou na dvě větve, které prochází kleštinovým ventilem. Kleštinový ventil je zvolen cíleně, aby nedocházelo k možné kontaminaci kultivačního média. Jedna větev následně pokračuje přes kultivační komoru a škrťací

55



ventil do rezervoáru kultivačního média. Výstup z rezervoáru je připojen k druhé větvi procházející kleštinovým ventilem. Takto vznikne celý uzavřený kultivační okruh.

5 Rezervoár kultivačního média je tvořen silikonovou trubicí, jež dává celkový objem a dvěma zátkami obsahující již zmíněné porty pro nátok a odtok média v jedné ze zátek. V druhé zátku je port pro připojení hadičky s 220 nm filtrem. Tento filtr zajišťuje výměnu plynů a vyrovnání tlaku při zachování sterilních podmínek uvnitř celého kultivačního okruhu.

10 Ve fázi generování průtoku je kleštinový ventil otevřený ve směru kultivační komory, stříkačka se pohybuje ve směru, že vytlačí medium přes kultivační komoru a škrťací ventil do rezervoáru. Nastavení škrťacího ventilu v kombinaci s rychlostí posuvu stříkačky, tj. objemovým průtokem, vytváří odpor generující nárůst tlaku v kultivačním okruhu, jež také stimuluje buněčnou kulturu.

15 Po vyprázdnění stříkačky je ventil přepnut tak, že uzavírá část ke kultivační komoře, a naopak otevírá odtok z rezervoáru. V této fázi se stříkačka pohybuje ve směru, kdy nasává kultivační médium z rezervoáru. V této fázi nedochází k průtoku kultivační komorou.

20 Jednotlivé díly, tj. držáky injekčních stříkaček, držák rezervoáru a ventilu, jsou vyrobeny pomocí 3D tisku a umožňují tak jednoduchou úpravu a modifikaci pro jiný typ stříkačky, jiný objem rezervoáru apod.

25 Fluidické díly, jako jsou hadičky, zátky a tělo rezervoáru, jsou vyrobeny z materiálů, jež nevykazují toxické vlastnosti pro buněčnou kulturu a zároveň umožňují opakovanou parní sterilizaci v autoklávu. Pro připojení jednotlivých fluidických prvků jsou použity standardizované spojky typu Luer-Lock.

### Objasnění výkresů

30 Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk podle tohoto technického řešení bude podrobněji popsán na konkrétním příkladu provedení s pomocí příložených výkresů, schémat a mikroskopických snímků, kde na Obr. 1 je v axonometrickém pohledu znázorněn kompletní mikroperfuzní systém s jednotlivými komponenty. Na Obr. 2 je axonometrické znázornění rezervoáru v řezu. Na Obr. 3 je schematicky znázorněna fáze generování průtoku v kultivační komoře. Na Obr. 4 je schematicky znázorněna fáze doplnění injekční stříkačky z rezervoáru pro další cyklus generování průtoku. Na Obr. 5 zachycen celý systém při buněčném experimentu a jeho instalace v inkubátoru. Na Obr. 6. jsou imunofluorescenčně značené snímky buněčné kultury lidských endotelových buněk ze safény (HSVEC) při statické a dynamické kultivaci pomocí mikroperfuzního systému.

40

### Příklady uskutečnění technického řešení

45 Příkladný mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk, je tvořen lineární pohybovou platformou 1 s elektronicky řízeným servopohonem, na této platformě 1 jsou uchyceny držáky 2 pro injekční stříkačku 5 umožňující její pohyb coby lineární dávkovač, další držák 3 rezervoáru 6 kultivačního média umožňující jednoduché vložení a vyjmutí samotného rezervoáru 6 a ještě další držák 4 kleštinového ventilu s uchyceným kleštinovým ventilem 12.

50

55 Rezervoár 6 kultivačního média je tvořen dvěma zátkami 8, kdy spodní zátko 8 obsahuje dva kapalinné porty pro připojení silikonové hadičky pro nátok 9 a odtok 10 kultivačního média. Horní zátko 8 obsahuje jeden port 11 pro připojení hadičky s 220 nm filtrem pro zajištění sterilní výměny plynů. Tyto zátky 8 jsou vloženy do silikonové trubice 7 jež vytváří samotný objem rezervoáru 6.

Kultivační okruh systému je tvořen injekční stříkačkou 5 s Luer-Lock portem vloženou do odpovídajících držáku 2 na lineární platformě 1. Za injekční stříkačkou 5 je vložena Y spojka 13 jež rozděluje kultivační okruh tvořeny silikonovou hadičkou na dvě větve které prochází  
 5 přepínacím kleštinovým ventilem 12. Z tohoto kleštinového ventilu 12 pokračuje jedna větev do vstupního portu 14 kultivační komory dále pokračuje z výstupního portu 15 přes škrťací ventil 16, umožňující vytvoření odporu a tlakového přírůstku při průtoku média, do nátoky 9 rezervoáru 6 kultivačního média. Druhá větev je připojena k odtoku 10 rezervoáru 6.

10 Při dynamické kultivaci buněčné kultury je v první fázi kleštinový ventil 12 otevřen tak, aby otevíral větev jdoucí přes kultivační komoru a škrťací ventil 16. Injekční stříkačka 5 se pohybuje ve směru při kterém vytlačuje kultivační médium, jež prochází kultivační komoru a škrťacím ventilem 16 přes nátok 9 rezervoáru 6. Vyrovnání tlaku v rezervoáru 6 je řešeno pomocí dalšího portu 11, který je doplněn o hadičku s 220 nm filtrem zajišťujícím sterilitu celého okruhu.

15 V druhé fázi je kleštinový ventil 12 přepnut na odtokovou větev a injekční stříkačka 5 se posouvá ve směru pro nasátí média, které je postupně čerpáno z rezervoáru 6, přičemž vyrovnání tlaku je opět řešeno dalším portem 11 s hadičkou doplněnou o 220 nm filtr.

20 Pro kultivaci buněk jsou tyto cykly opakovány pro zajištění průtoku média a kombinací rychlosti pojezdu stříkačky 5 a uzavření škrťacího kleštinového ventilu 12 je dosaženo požadovaného průtočného objemu a tlaku, včetně možnosti generování pulzu při modulaci řízení servopohonu.

Příklad – kultivace lidských endotelových buněk při dynamické zátěži

25 Buněčná kultura buněk HSVEC (Human Saphenous Vein Endothelial Cells – endotelové buňky ze safény) byly nasazeny v iniciální hustotě 60 tis. buněk na cm<sup>2</sup> do PPFC kultivační komory. Poté byla tato komora připojena k mikroperfuznímu systému a byla vytvořena průtočná zátěž odpovídající smykovému napětí 15 dynů/cm<sup>2</sup> (1,5 Pa) s cyklickou pulzací hodnoty horní tlak  
 30 120 mmHg (15,9 kPa), spodní tlak 80 mmHg (10,6 kPa) při frekvenci 60 pulzů za minutu (1 Hz). V těchto podmínkách byla kultura kultivována po dobu 5 dní.

Na imunofluorescenčně značeném mikroskopickém snímku jsou znázorněny proteiny F-actin (červeně), v části A při statické kultivaci a v části B při dynamické kultivaci, kde je jasně patrná  
 35 směrová orientace aktinového cytoskeletu ve směru proudění, protáhlý tvar, jež odpovídá fyziologické morfologii. Naopak u statické kultivace je pouze dlaždicové patologické uspořádání, typické pouze pro statické podmínky. V části C je znázorněn protein Talin (zeleno oranžově) a VE-Cadherin (červeně) u dynamické kultivace, kde je patrná mezibuněčná vazba.

40

#### Průmyslová využitelnost

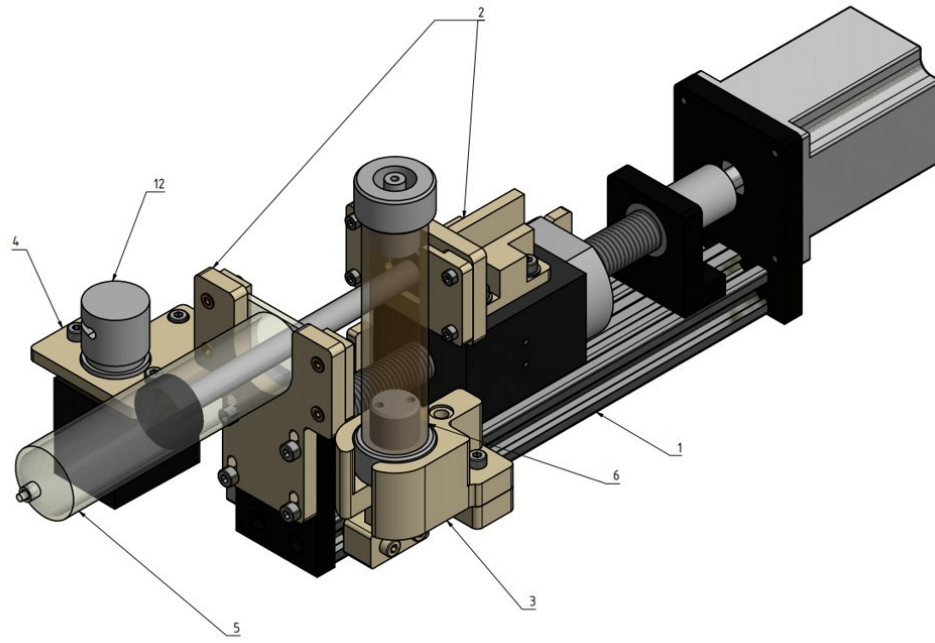
Navržená kultivační komora nalezne využití na pracovištích zabývajících se výzkumem v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny.

45

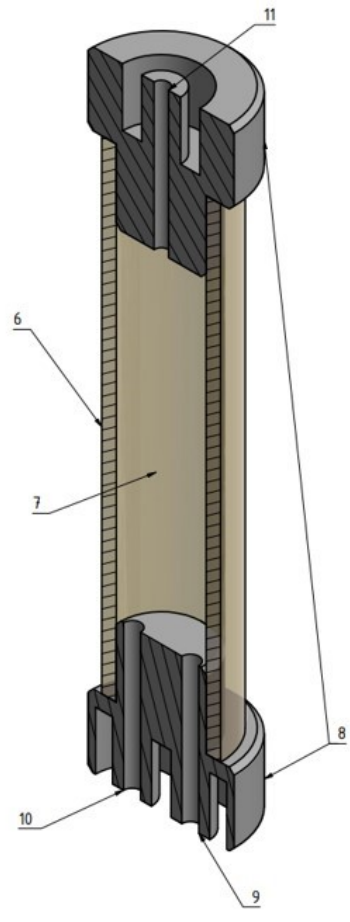
## NÁROKY NA OCHRANU

- 5
1. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk, **vyznačující se tím**, že obsahuje lineární pohybovou platformu (1), ke které jsou uchyceny držáky (2) stříkaček (5), další držák (3) rezervoáru (6) kultivačního média, a ještě další držák (4) ventilu s kleštinovým ventilem (12), přičemž ke stříkačce (5) je připojena uzavřená soustava
- 10 silikonových hadiček procházejících přes kleštinový ventil (12) a rezervoár (6) do kultivační komory.
2. Mikroperfuzní systém podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že držák (2) stříkaček (5) odpovídá umístění maloobjemové injekční stříkačky (5) o objemu 5 a 10 ml a/nebo
- 15 velkoobjemové a výplachové stříkačky (5) o objemu 50, 60 ml a 150 ml.
3. Mikroperfuzní systém podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že rezervoár (6) kultivačního média obsahuje 220 nm filtr pro zajištění sterilní výměny plynů a vyrovnání tlaku.
- 20 4. Mikroperfuzní systém podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že všechny části perfuzního okruhu jsou sterilizovatelné pomocí parní sterilizace – autoklávu.

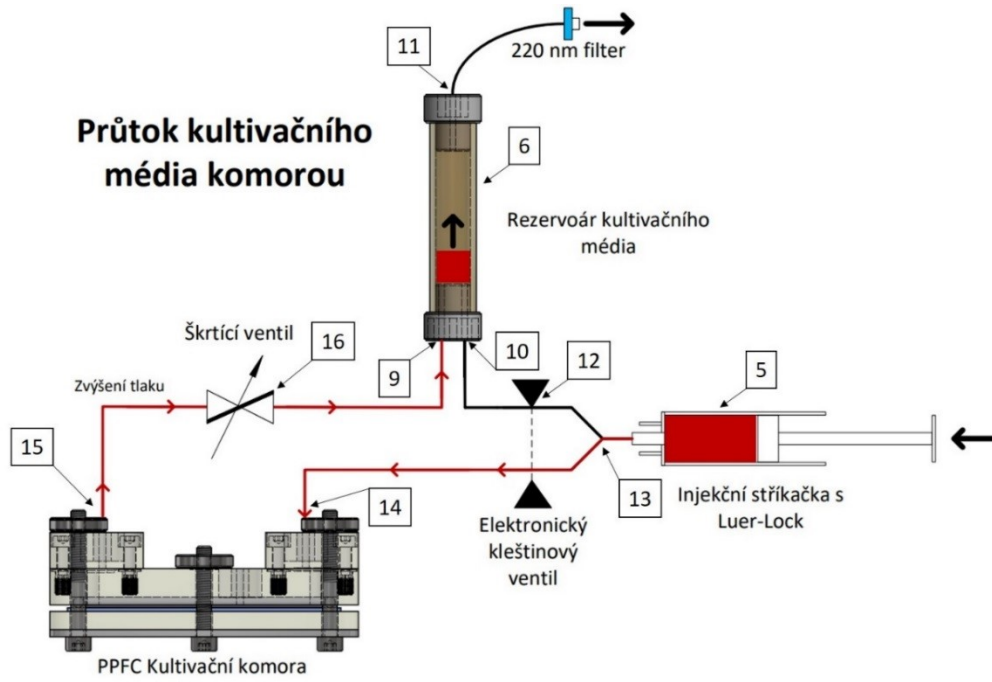
4 výkresy



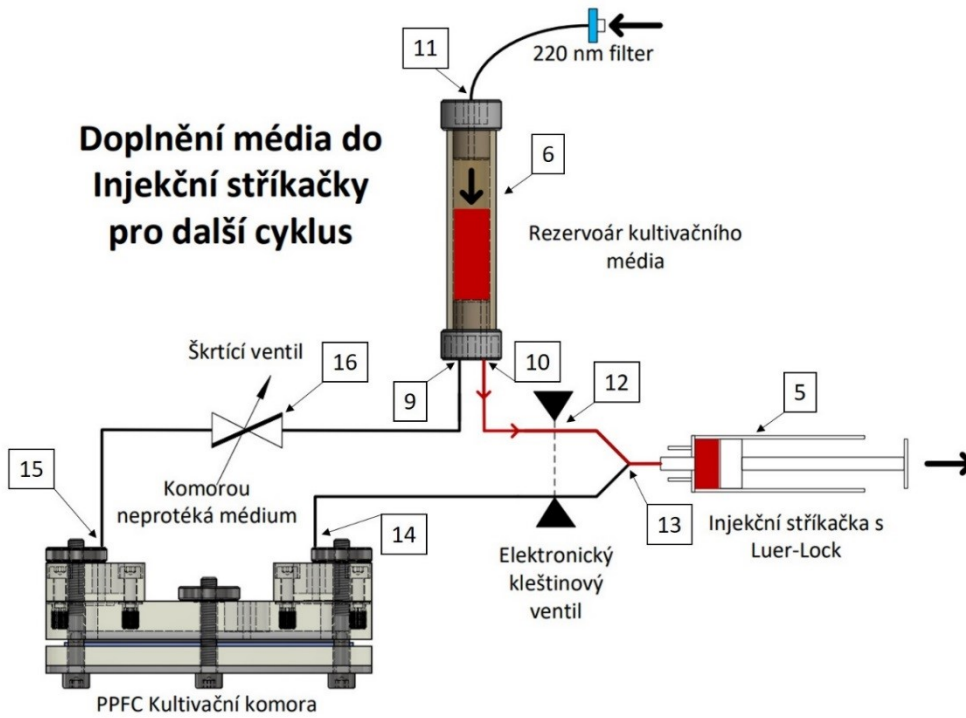
Obr. 1



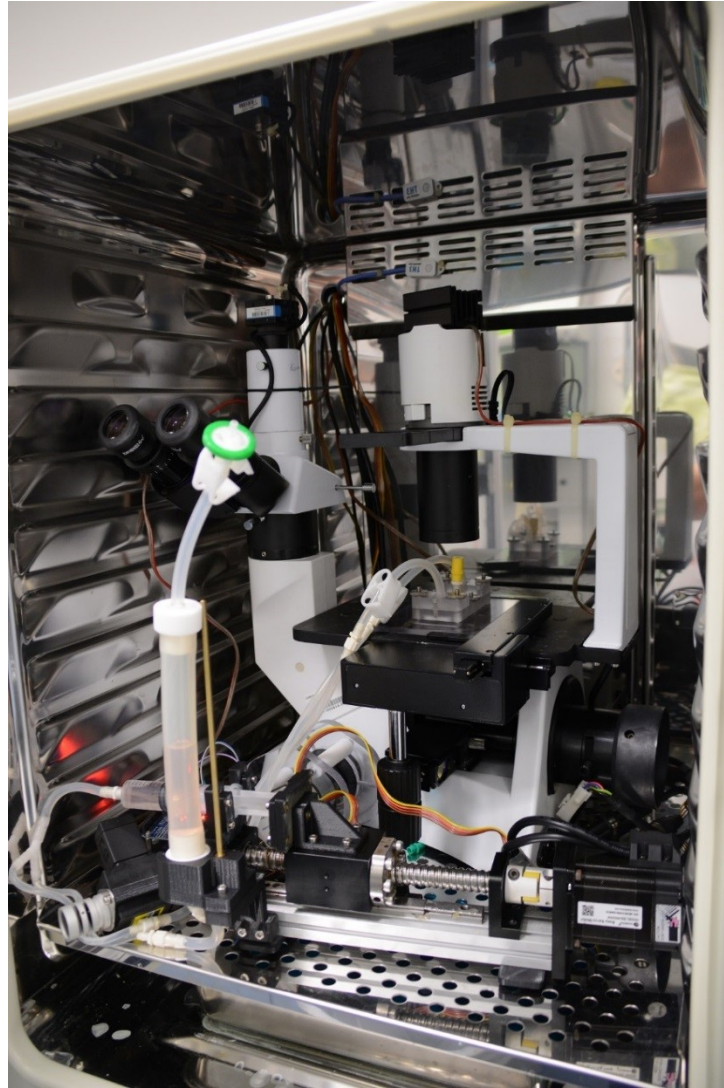
Obr. 2



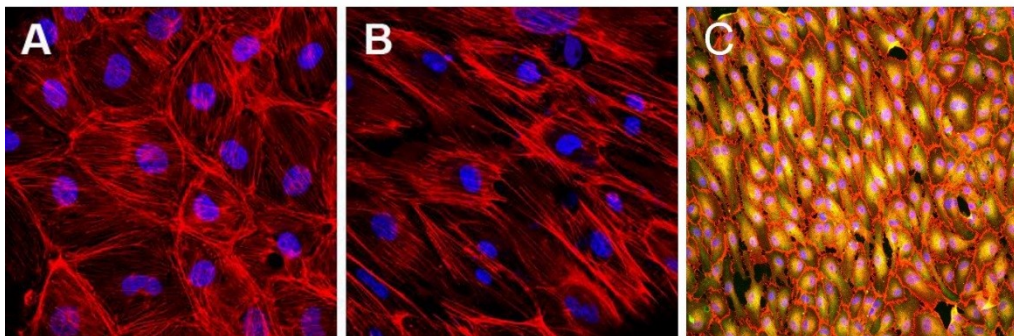
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6