

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

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

V aplikaci pro kardiovaskulární náhrady

..

Ing. Roman Matějka

2020

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Lékařská biofyzika

Předseda oborové rady: prof. RNDr. MUDr. Jiří Beneš, CSc.

Školicí pracoviště: 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky a lékařské informatiky

Autor: Ing. Roman Matějka

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

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne v hod.

kde

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah

1.	Úvod.....	6
1.1	Cévní náhrady a tkáňové inženýrství.....	6
1.1.1.	Dynamiccká kultivace endotelových buněk a buněk hladkého svalstva cév.....	8
2.	Cíle práce.....	11
2.1.	Decelularizace tkání a jejich příprava pro rekolonizaci buňkami.....	11
2.2.	Stimulace smykovým napětím pro modulaci růstu endotelových buněk v in vitro podmínkách.....	11
2.3.	Stimulace hydrodynamickým tlakem pro modulaci růstu a diferenciaci hladkých svalových buněk v in vitro podmínkách.....	11
2.4.	Příprava implantabilních kardiovaskulárních náhrad v bioreaktoru in vitro.....	12
2.5.	Implantace připravených náhrad a jejich pilotní testování in vivo.....	12
3.	Materiály a metody.....	13
3.1.	Systém pro automatizovanou decelularizaci zvířecích planárních a tubulárních tkání.....	14
1.2	Kultivační komory pro stimulaci pomocí smykového napětí.....	15
3.2.	Kultivační komory pro hydrodynamickou stimulaci.....	17
3.3.	Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací.....	18
4.	Výsledky a diskuze.....	19
4.1.	Příprava decelularizovaných tkání.....	19
4.2.	Podpora endotelizace povrchů a vliv smykového napětí.....	21
4.3.	Vliv tlakové stimulace na proliferaci kmenových a stromálních buněk diferenciaci směrem k hladkému svalu.....	23
4.4.	Recelularizace decelularizovaných tkání pro přípravu implantabilních cévních náhrad v kultivačním bioreaktoru.....	25
5.	Závěr.....	30
6.	Použitá literatura.....	32
	Publikace, užité vzory a kapitoly v knihách se vztahem k dizertační práci.....	36
	Další publikace bez přímého vztahu k dizertační práci.....	38

Souhrn

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 biorektoru 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.

Summary

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.

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 obnovení cévního zásobení do postižené tkáně spočívají v angioplastice, umístění stentu nebo přemostěním, tzv. bypassesem. 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 Cévní náhrady a tkáňové inženýrství

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. Autologní náhrady jsou obecně brány za zlatý standard pro náhradu poškozených cév malého průměr (< 4 - 6 mm) a jsou branné jako první možné řešení. Na druhou stranu je pro použití autologních náhrad vyžadován invazivní přístup pro jejich získání a stejně tak je jejich množství limitované.

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.

Současně používané náhrady lze tedy dle použitého původu řešení rozdělit na náhrady s využitím syntetických, přírodních nebo hybridních materiálů. Přírodní polymery mohou být dále rozříděny 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. 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 řešení z přírodních polymerů získaných z ECM. Přírodní 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 strukturu 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).

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 nevasculární 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).

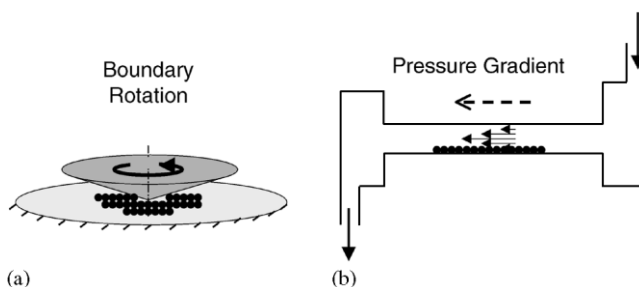
1.1. Dynamická kultivace endotelových buněk a buněk hladkého svalstva cév

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/cm² a je umocněn pulzní charakteristikou průtoku, čímž vzniká gradient smykového napětí o daném rozsahu (Langille et al. 1986).

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).

Proliferace endotelových 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 1). Jednou je rotace kónického kužele kolmo uloženého nad povrchem desky (tzv. orbitální třepačka, Obrázek 1a). Druhou hlavní konfigurací je sestava rovnoběžných desek, mezi kterými protéká médium (Obrázek 1b).

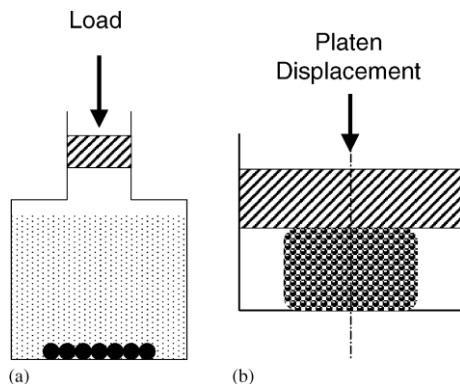


Obrázek 1 - konfigurace systémů s průtokovým namáháním: a) rotující kužel, b) paralelní desky. Obrázek převzat z (Brown 2000).

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). Diferenciace kmenových buněk vůči VSMC vyžaduje pulzující tlak a cyklické namáhání, podobně jako působí hemodynamické namáhání na cévy *in vivo*.

Pro mechanické namáhání SMC a diferenciaci kmenových buněk směrem k hladké svalovině se nejčastěji používají systémy na bázi kompresivního tlaku a podélné jednoosé tenze. Hydrostatická komprese (Obrázek 2) 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 systémem desky, nevzniká žádné nebezpečí

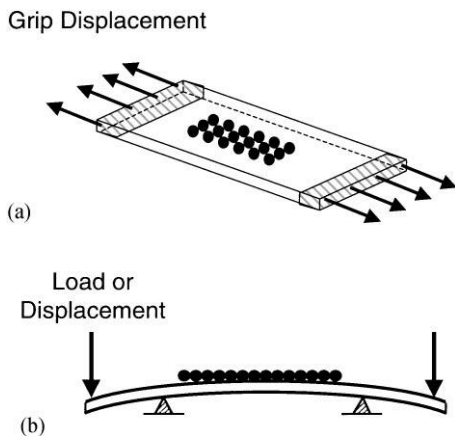
ohledně lokálního stlačení vzorků a dochází tak k plynulému přenosu metabolitů mezi kultivační vrstvou a živným médiem.



Obrázek 2 - 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 3) 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 tkáň.



Obrázek 3 - Systémy s jednoosým namáháním a) podélnou tenzí, b) flexí substrátu. Obrázek převzat z (Brown 2000).

2. Cíle práce

Cílem práce bylo prokázat pozitivní vliv dynamické kultivace buněk v kulturačních systémech (bioreaktorech) na proliferaci, diferenciaci a genovou expresy buněk oproti běžné používané statické kultivaci. Hlavním záměrem bylo využití těchto kulturačních 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 tkáň u níž je potlačen imunogenní komplex. Takto připravená tkáň 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 předkultivováním v kulturačním bioreaktoru napomůže fenotypické maturaci endotelu pro vytvoření souvislé odolné vrstvy. Publikováno v rámci prací (Chlupac et al. 2014; Matějka 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- β , 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*

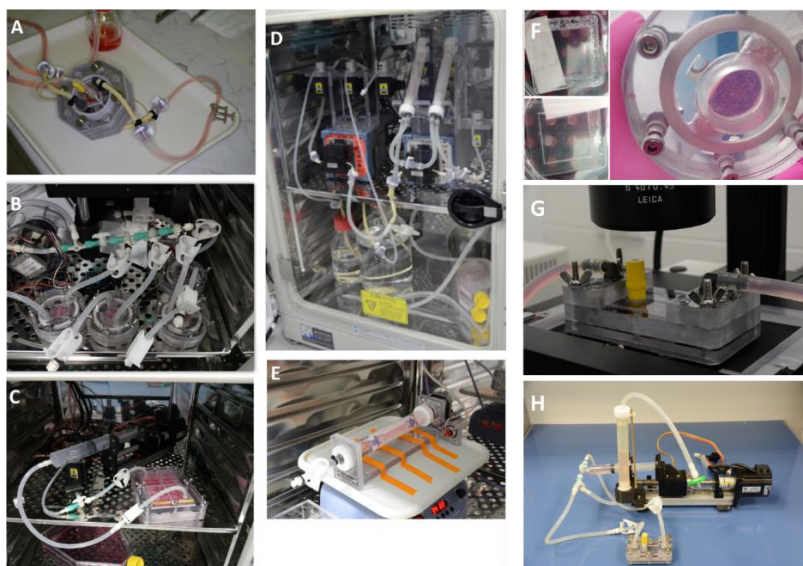
Kombinace decelularizovaných nosičů rekolonizovaných autologními stromálními buňkami je možností přípravy kardiovaskulárních náhrad u kterých bude urychlena schopnost regenerace *in vivo* a bude podpořena následná endotelizace. Klíčovým prvkem je získání homogenně rekolonizovaného nosiče k čemuž je možné 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

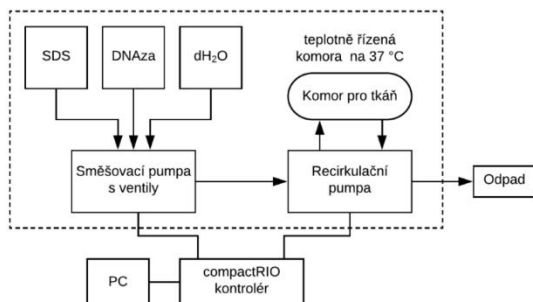
V rámci realizace práce byla vytvořena řada kultivačních systémů skládajících se ze speciálně navržených kultivačních komor a systému pro zajištění perfuze kultivačního média a generování mechanických stimulů. Jak kultivační komory, tak stimulační systémy byly postupně optimalizovány pro zajištění vhodných 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. Valná většina systému byla chráněna formou užitných vzorů, jež dokumentují detailněji technické řešení a jsou uvedeny v přílohách. Na Obrázek 4 jsou zachyceny vybrané systémy.



Obrázek 4 - 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.

3.1. Systém pro automatizovanou decelularizaci zvířecích planárních a tubulárních tkání

Pro potřeby automatizace procesů decelularizace 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. 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. Pro uchycení tkání vznikly dvě speciální komory – pro planární a tubulární tkáně. Optimalizovány byly protokoly pro prasečí a ovčí perikardy a karotidy. Schématické zobrazení systému a jeho instalace je znázorněna na Obrázek 5.

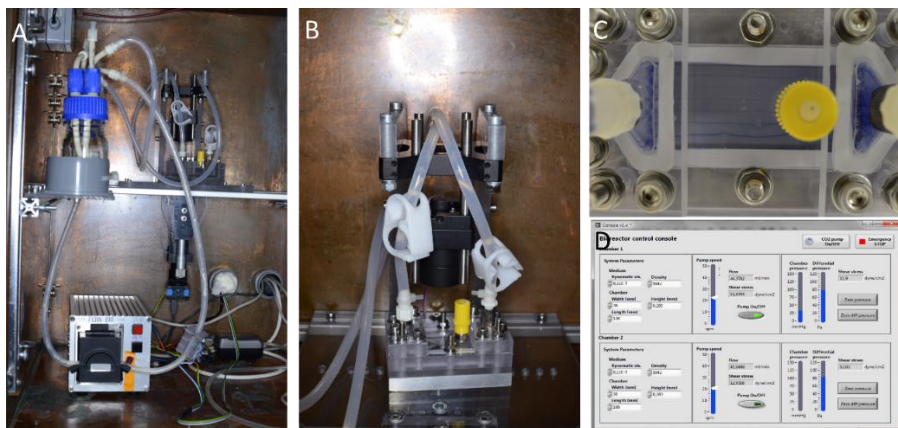


Obrázek 5 - schématické znázornění systému na decelularizaci tkání a jeho instalace v temperované komoře.

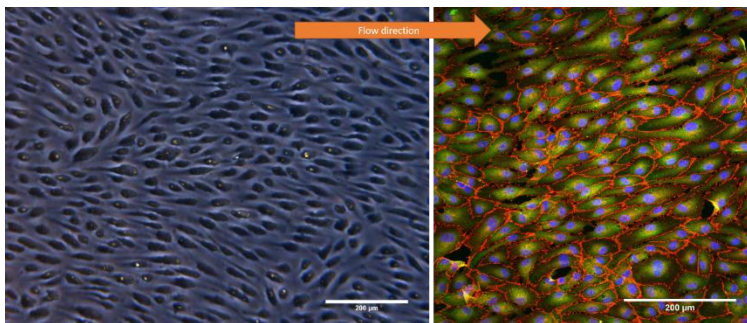
1.2 Kultivační komory pro stimulaci pomocí smykového napětí

Pro stimulaci endotelových buněk a testování endotelizace povrchu byla vytvořena speciální kultivační komora. Návrh na kultivační komory vycházel z osvědčených řešení typu PFFC, tj. planparalelní desky s úzkou průtočnou štěrbinou. Konstrukce byla realizovaná z třískovně obráběného polykarbonátu. Substrát pro kultivaci bylo standardní krycí sklíčko rozměru 24x40 mm. V rámci práce vznikly dvě postupné realizace. První konstrukce vyžadovala předpěstování buněk na substrátu (sklíčko s potahem) které bylo následně sterilně vloženo do komory, která byla připojena k perfuznímu stimulačnímu systému.

Modifikovaná verze (znázorněna na Obrázek 6) již používala rozhraní se septem. Komora byla tak sestavena se suchým substrátem, což zjednodušilo manipulaci a minimalizovalo riziko poškození nebo infikování kultury. Následně byla komora připojena k perfuznímu okruhu a zaplavena. V celém kultivačním okruhu bylo poté vyrovnáno pH, teplota, minimalizovaly se veškeré vytvořené bubliny a až poté byla vstříknuta buněčná suspenze. Vliv na buněčnou stimulaci je znázorněn na Obrázek 7, kde je jasně patrná orientace buněk ve směru proudění a na fluorescenčně značeném obrázku tvorba kadherinových a integrinových proteinů.

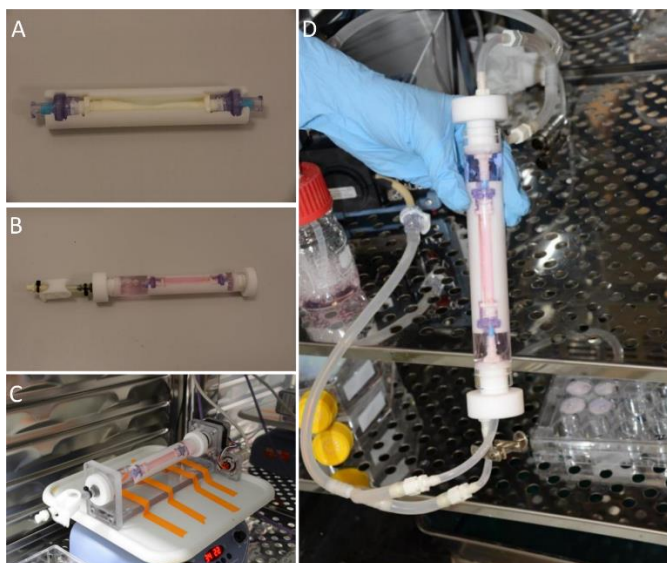


Obrázek 6 – A – nová verze kultivační komory a perfuzního systému v buněčném inkubátoru, B – detail kultivační komory v mikroskopu pro živé snímání buněk, C – barvivová zkouška tvorby laminárního proudění v komoře a D – ovládací SW systému.



Obrázek 7 - 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.

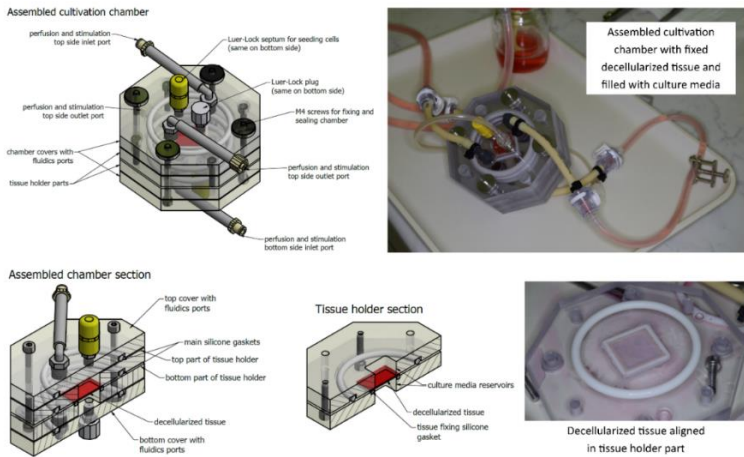
Pro osazení a stimulaci v tubulárních substrátech (umělé cévní náhrady, decelularizované cévy) bylo vytvořeno řešení umožňující jejich osazení a dynamickou kultivaci, jak je znázorněno na Obrázek 8



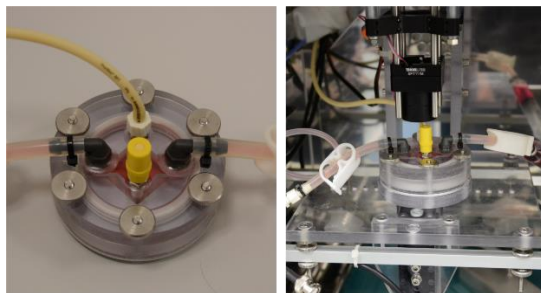
Obrázek 8 - A držák cévy s decelularizovanou cévou, B - rotační osazovací komory, C - rotační systém umístěný na kývne podložce, D - komora pro stimulaci.

3.2. Kultivační komory pro hydrodynamickou stimulaci

Pro vytvoření hydrodynamické stimulace pomocí pulzujícího tlaku byly vytvořeny další kultivační komory. Tyto komory umožňují uchycení plochých substrátů jako je např. sklo s potahy fibrinu, kolagenu, nanovláknna nebo filmy a hlavně decelularizovanou tkáň pro přípravu rekolonizovaných záplat. Pro zvýšení možnosti kultivace paralelních vzorků bylo vytvořeno i řešení využívající vícejamkovou kultivační desku. Komory kombinují mikroperfuzi pro výměnu kultivačního média a hydrodynamickou tlakovou kultivaci tvořenou cyklicky se měnícím hydrostatickým tlakem. Funkční celky komory pro tlakovou stimulaci na decelularizovaných tkáních jsou znázorněny na Obrázek 9 a pro použití s jinými substráty na Obrázek 10.



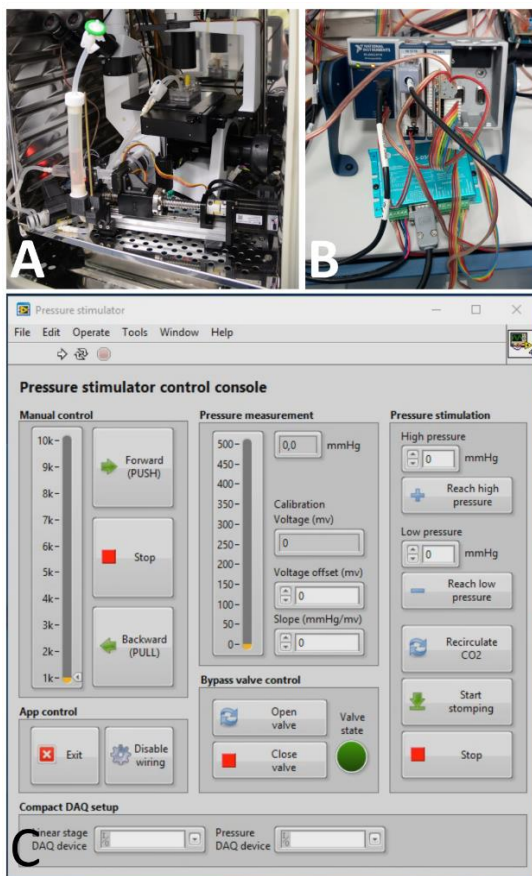
Obrázek 9 - Celkový pohled na sestavenou kultivační komoru (nahore). Vlevo dole řez komorou a jednotlivými částmi, uprostřed dole detail držáku tkáně s rezervoáry, vpravo dole detail decelularizované tkáně po kultivačním experimentu.



Obrázek 10 - Kultivační komora pro tlakovou stimulaci na skle a jiných substrátech, vlevo sestavená komora, vpravo umístěna v mikroskopu pro živé snímání buněk.

3.3. Mikroperfuční 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. Pro tlakovou stimulaci je v systému implementováno zpětnovazební řízení. V tomto režimu využívá systém tlakový kapalinový senzor. Systém, ovládací elektronika a uživatelské rozhraní systému je zachyceno na Obrázek 11. Tento systém byl využit při použití s většinou navržených komor a nahradil i původně používané peristaltické čerpadlo.



Obrázek 11 - A - instalovaný perfuzní systém v buněčném inkubátoru, B - ovládací elektronika, C - uživatelské rozhraní pro nastavení parametrů.

4. Výsledky a diskuze

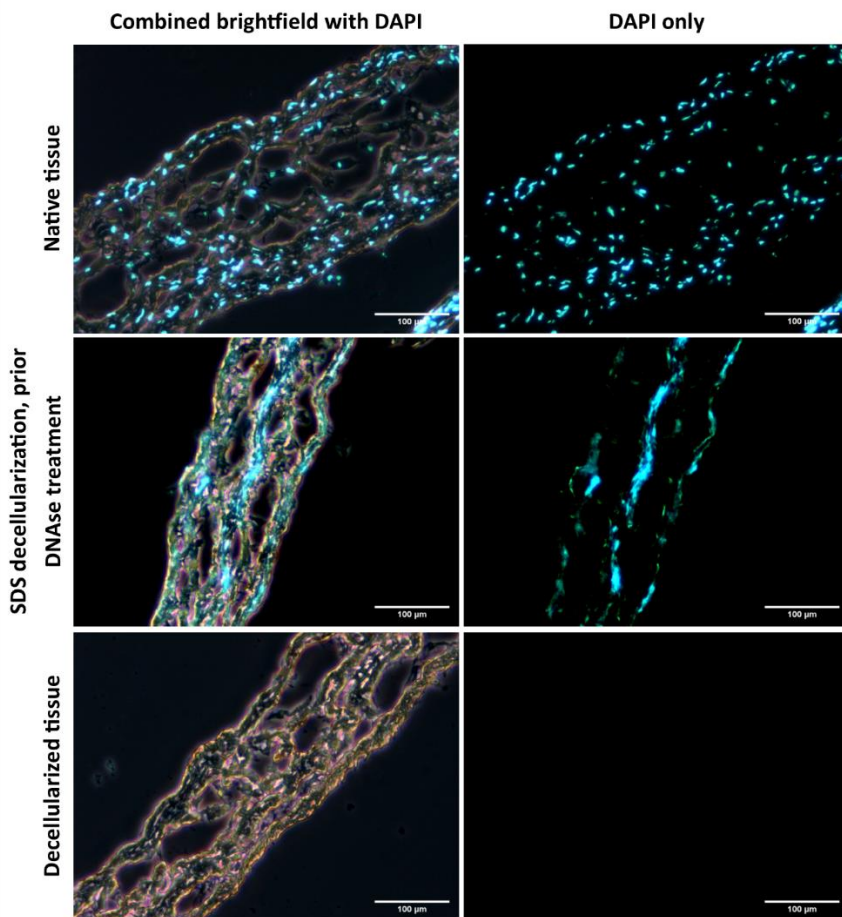
4.1. Příprava decelularizovaných tkání

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).

Zhodnocení účinnosti procesu a optimálního nastavení jednotlivých kroků decelularizace bylo hodnoceno pomocí histologického barvení kryořezu o tloušťce 10 μm , jež byly průběžně připravovány v průběhu decelularizace. Jak je patrné na Obrázek 12, tak v nativní tkáni jsou patrná 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.

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)



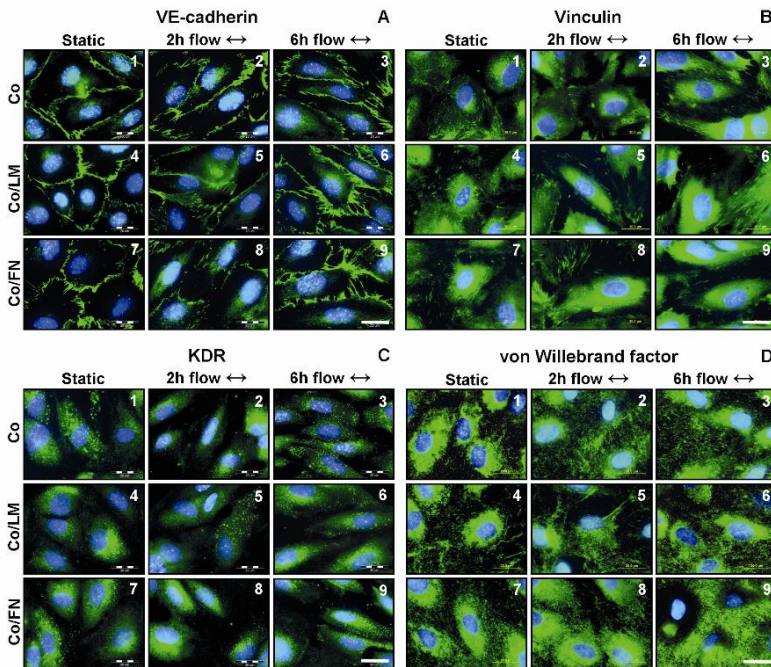
Obrázek 12 – Průběh decelularizace prasečího perikardu. Histologické kryosezy o tloušťce 10 µm a barvené pomocí DAPI. Nahoře nativní tkáň s patrnými jádry buněk. Uprostřed tkáň po cyklech SDS před použitím DNAzy s patrnými zbytků DNA. Dole plně decelularizovaná tkáň bez patrných zbytků jader a DNA.

4.2. Podpora endotelizace povrchů a vliv smykového napětí

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 protězy (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 prekonkondicionování buněčné kultury na povrchu této protězy (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 sklíčka modifikované kolagenem I (Co), kolagenem s navázaným lamininem (Co / LM) a kolagenem s navázaným fibronektinem pro zvýšení schopnosti adheze buněk. Takto připravené kultury byly vystaveny krátkodobému laminárnímu smykovému napětí o velikosti 12 dyn/cm² (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 13.

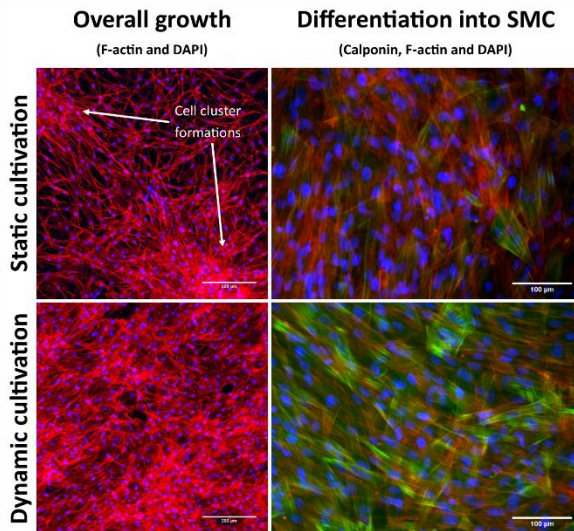


Obrázek 13 - Morfologie HSVEC na kolagenu (Co), Co / LM a Co / FN. Imunofluorescence VE-kadherinu (A1–9), Vinculin (B1–9), KDR (C1–9) a vWF (D1–9) (zelená), jádra buněk kontrastně barvená Hoechstem (modrá). Proudění je zleva doprava, jak je naznačeno obousměrnými šipkami. Epifluorescenční mikroskop Olympus IX50, Olympus Digitální fotoaparát DP70, zvětšení 100, stupnice měřítka = 20 mm. Obrázek publikován v (Chlupac, et al. 2014).

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 diferenciaci směrem k hladkému svalu

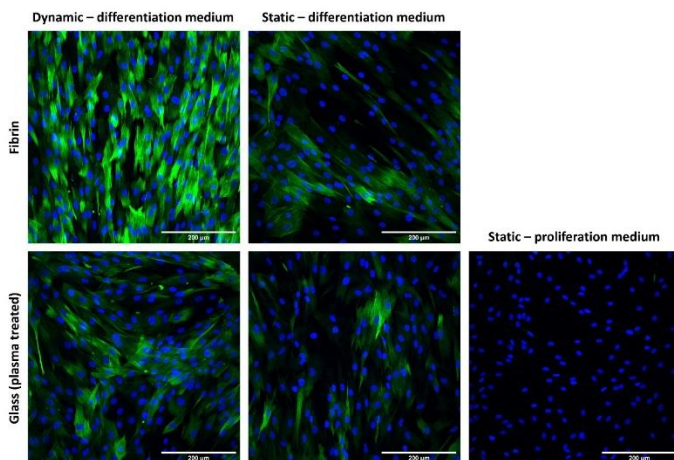
Analýza růstu a diferenciacie buněk na povrchu decelularizované matrice ukázala, že mezi statickou kultivací a dynamickou kultivací je hlavní rozdíl po 10 dnech kultivace. Jak je znázorněno na Obrázek 14, buňky vytvářejí za statických podmínek shluky místo toho, aby se rovnoměrně šířily po celém povrchu. 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 14 - Růst a diferenciacie PrASC na decelularizovaném porcinním perikardu.

Pozitivní účinek na diferenciaci kmenových buněk směrem k SMC byl prokázán ve studiích využívajících kombinaci růstových faktorů TGF- β 1 a BMP-4 viz Obrázek 15. To vedlo ke zvýšení produkce specifických diferenciacních markerů cytoskeletálních proteinů, jako je α -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- β 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).

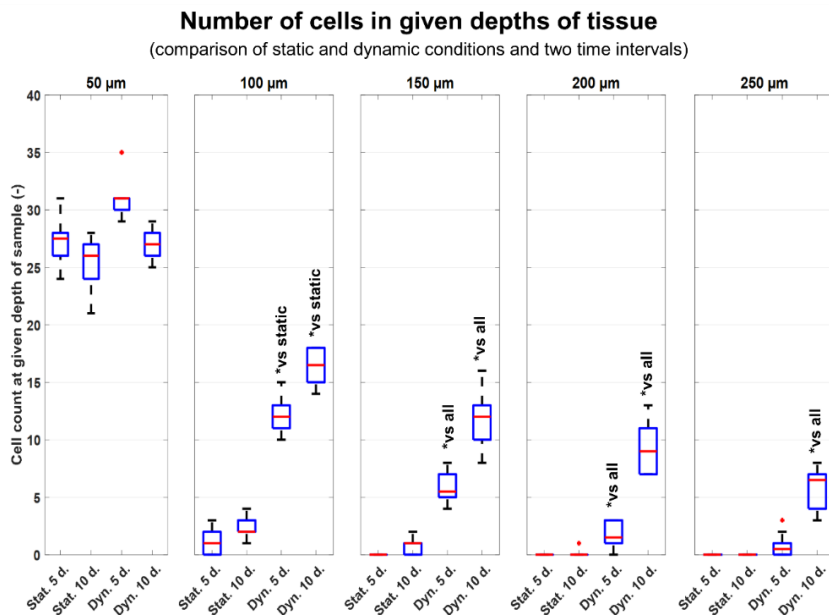


Obrázek 15 - imunofluorescenčně barvený H1-kalponin při různých typech kultivace na skle a fibrinovém potahu.

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. 2004) také našli zvýšenou expresi SMC markerů ve stromálních buňkách kostní dřeně krysy 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.

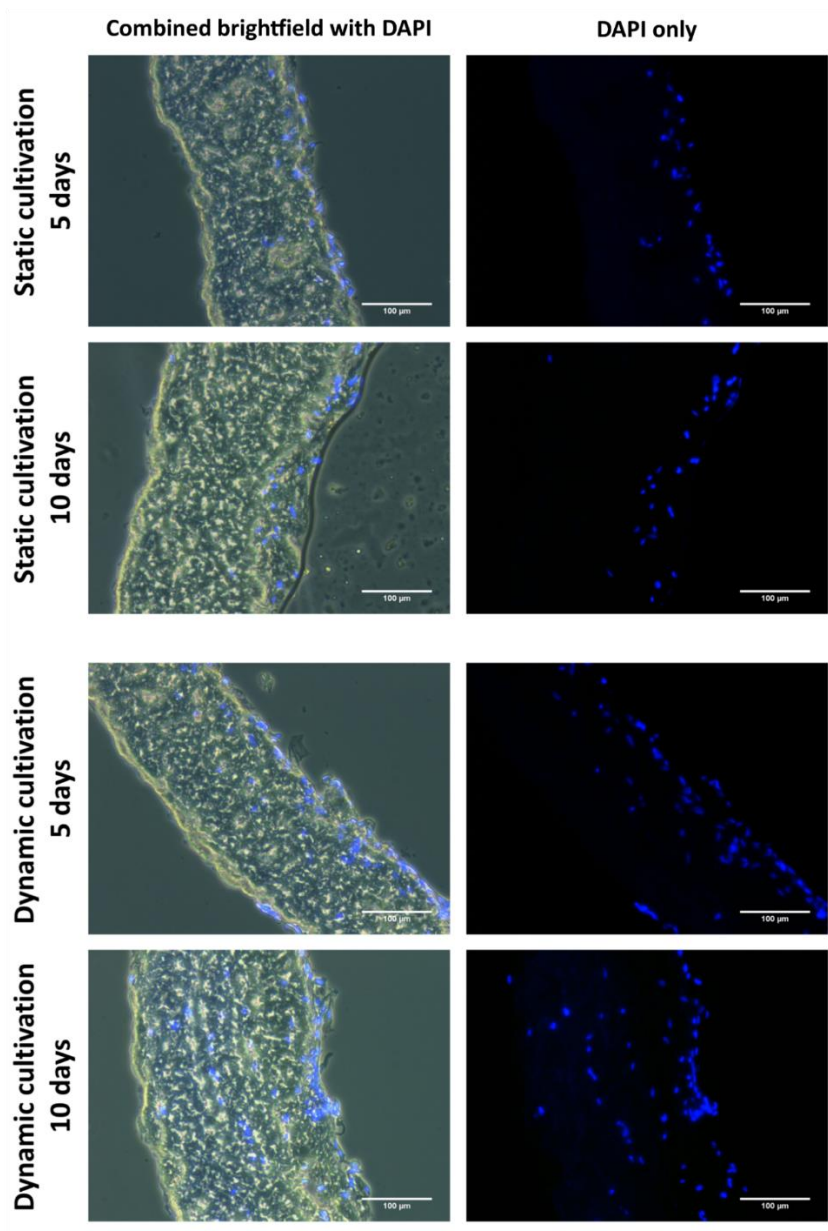
4.4. Recelularizace decelularizovaných tkání pro přípravu implantabilních cévních náhrad v kultivačním bioreaktoru

Analýza histologických vzorků (Obrázek 17) a počtu buněk v daných hloubkách (Obrázek 16, data získány z dalších histologických vzorků) 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 μm , ale není prokázán růst buněk do hlubších oblastí tkáně.



Obrázek 16 - 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; hrabba ohraničuje minimální a maximální hodnoty a červené body jsou odlehle hodnoty.

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

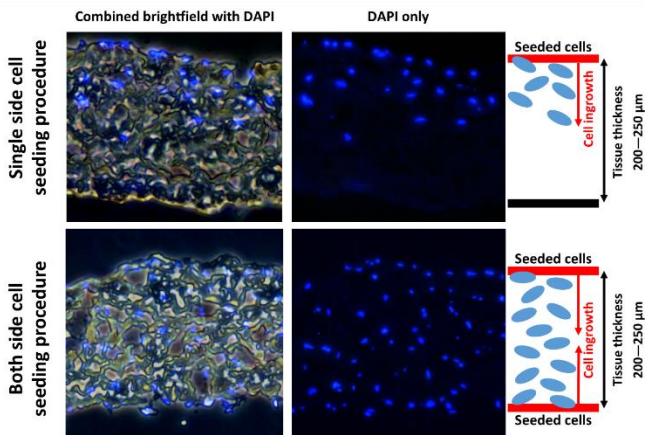


Obrázek 17 – Srovnání rekolonizace decelularizované tkáně pomocí PrASC při statických a dynamických podmínkách, doba kultivace 5 a 10 dní, 20 µm kryžeřezy barvené pomocí DAPI. Mikroskop Leica Dmi8, objektiv 10x

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.

Podobné výsledky byly získány v jiných studiích, ve kterých bylo zapotřebí několik týdnů kultivace, aby došlo k rekolonizaci připravených tkáňových matic 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). 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 prekonkondiovaní před použitím pro implantaci díky simulovaným více fyziologickým podmínkám, jak je popsáno ve studii autorů (Villalona, et al. 2010).

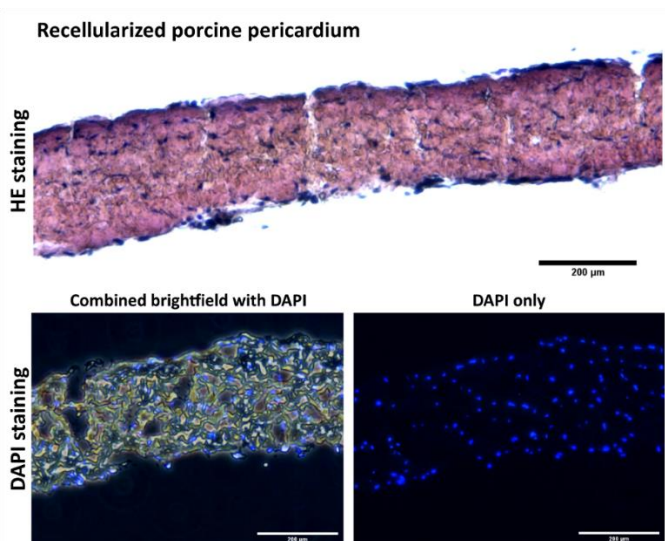
Návrh kultivační komory umožňuje osazení decelularizované tkáně z obou stran. Díky tomu bylo docíleno homogenní rekolonizace celé tkáně v průběhu již 5 dní dynamické kultivace. Rozdílný způsob nasazení buněk a vliv na rekolonizaci tkáně je znázorněn na Obrázek 18.



Obrázek 18 - Srovnání metod osazení decelularizovaných tkání před kultivací v reaktoru.

Nahore jednostranné dole oboustranné osazení decelularizované tkáně. Dynamická kultivace 5 dní, buňky prasečí stromální buňky PrASC. 20 µm histologické řezy v parafinu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI.

Dále, jak je demonstrováno na 20 µm histologických řezech na Obrázek 19 je prasečí i (a v práci uvedený i ovčí) perikard homogenně rekolonizovaný buňkami pro implantabilních použití. Takto připravené tkáně sloužily pro vytvoření autologně osídlených cévních záplat na bázi decelularizované alogenní (prasečí perikard) a xenogenní (ovčí perikard) tkáně.

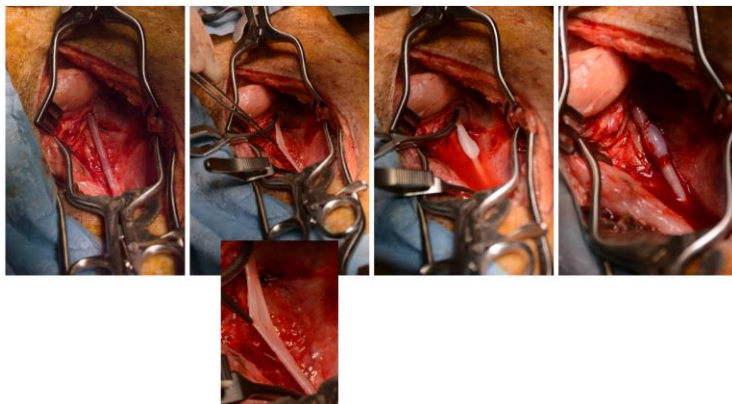


Obrázek 19 - Decelularizovaný prasečí perikard a jeho následná recelularizace prasečími stromálními buňkami PrASC. Oboustranné osazení tkáně v kultivační komoře. Dynamická kultivace v reaktoru 5 dní. 20 µm histologické řezy v parafinu, barvené pomocí hematoxylinu-eozinu a DAPI.

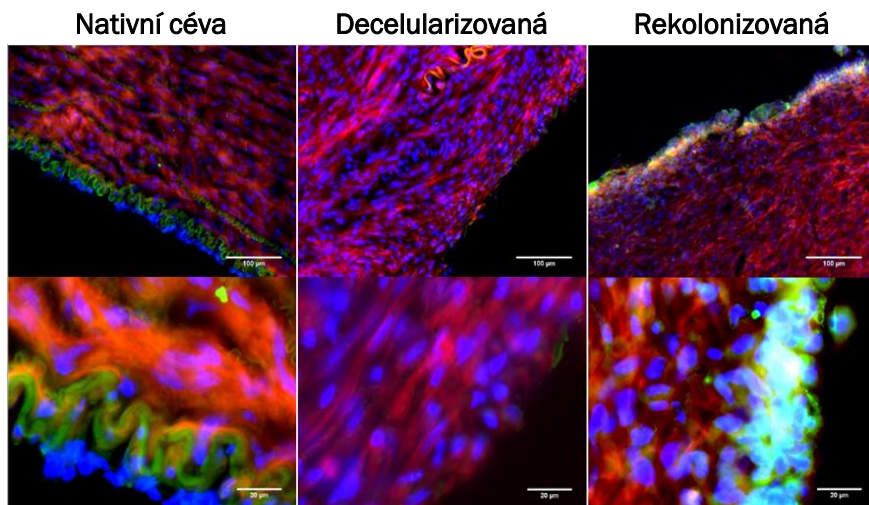
Výše uvedené výsledky byly využity pro *in vivo* ověření připravených autologně osídlených kardiovaskulárních záplat v praseti. Cévní záplaty osídlené autologními buňkami daného prasete byly implantovány na uměle vytvořený defekt na karotickém povodí, jak je znázorněno na Obrázek 20.

Po měsíční observaci zvířete byly tyto části cévy se záplatou explantovány a byla provedena imunohistologická analýza. Jak je patrné na Obrázek 21, 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 20 - Zleva, operační preparace a.caritis, příprava umělého defektu, našití cévní záplaty, obnovení průtoku.



Obrázek 21 - 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 k práci.

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 laminimem 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- β 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.

6. Použitá literatura

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., 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.

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.

BROWN, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics*, 2000/01/01/ 2000, 33(1), 3-14.

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).

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.

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 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 α . *Acta Biomater*, Mar 2012, 8(3), 1330-1338.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 2004, 32(12), 1238-1245.

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., 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.

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).

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. Mikroperfuzeční systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, et al. Česká republika Užitiný 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 Užitiný 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 Užitiný 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 Užitiný 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 Užitiný 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

Publikace

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). 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.

Užité vzory

České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuční 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 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.

Kapitoly v knihách

BACA KOVA, 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.

BACA KOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, **R. MATEJKA**, 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.

BACA KOVA, 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.

Další publikace bez přímého vztahu k dizertační práci

STEPANOVSKA, J. *, **R. MATEJKA***, M. OTAHAL, J. ROSINA a L. BACA KOVA 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. BACA KOVA 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. MATEJKA**, 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**

PROCHÁZKA, 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).

MOLACEK, J., V. OPATRŇY, 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.

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. ŠTĚPANOVSKÁ, A. KROMKA, M. TRÁVNÍČKOVÁ a L. BAČÁKOVÁ Česká Republika Užiténý vzor 30691. 15.5.2017.