

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyziologie živočichů



**Mgr. Antonín Sedlář**

Studium růstu a diferenciacie mesenchymálních kmenových buněk pro využití  
v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství  
Study of mesenchymal stem cell growth and differentiation for use in cardiovascular tissue  
engineering

Disertační práce

Školitel: RNDr. Jana Musílková, CSc.

Praha, 2024

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 4. 9. 2024

Antonín Sedlář

## Abstrakt

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní buňky, které v organismu slouží k regeneraci tkání. Jedním z nejvýznamnějších zdrojů MSC je tuková tkáň, ze které lze buňky izolovat snadno a ve velkých množstvích. Chování buněčné kultury *in vitro* je ovlivněno hlavně fyzikálně-chemickými vlastnostmi biomateriálu, vlastnostmi buněk a složením kultivačního média.

Cílem disertační práce bylo studovat chování mesenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně (ADSC). Byla zkoumána jejich adheze, růst a diferenciace směrem k hladkým svalovým buňkám v *in vitro* kultivačním prostředí ovlivněném složením kultivačního média, fyzikálně-chemickými vlastnostmi biomateriálu a dynamickou stimulací kultury.

Bylo zjištěno, že galektin-3 zprostředkovává adhezi ADSC na povrch kultivačního substrátu, a to interakcí s integrinovými receptory. ADSC také vykazovaly adhezní interakci s fibroblastovým růstovým faktorem 2 (FGF-2) a vaskulárním endotelovým faktorem A (VEGF-A). FGF-2 rovněž podporoval proliferaci ADSC, naopak VEGF-A nikoliv. ADSC byly kultivovány na polylaktidových foliích s různými povrchovými modifikacemi (úprava argonovým plasmatem, pokrytí polyethylenglykolem nebo dextranem). Povrchové modifikace měly pozitivní vliv na adhezi a růst ADSC. Povrchové modifikace neměly vliv na diferenciaci ADSC směrem k hladkým svalovým buňkám, která byla indukována biochemickými diferenciačními faktory v kultivačním médiu. ADSC rovněž proliferovaly na měkkých porézních 3D nosičích z polylaktidu a polykaprolaktonu, přičemž nejvhodnějším pro proliferaci byl materiál bez přídavku hydroxypropylcelulózy. Buňky však nepronikaly do hloubky materiálu. Dynamická stimulace kultury vedla ke zvýšené proliferaci buněk na porézním nosiči. Buňky proliferovaly také na prostorových mřížkách z polylaktidu připravených 3D tiskem. V tomto případě buňky pronikaly do hloubky materiálu a při kokultivaci s endotelovými buňkami z lidské pupečnickové žíly s dynamickou stimulací docházelo ke vzniku prekapilárních struktur.

Práce přinesla nové poznatky o chování ADSC *in vitro* za různých kultivačních podmínek. Získané výsledky budou potenciálně využity v regenerativní medicíně nebo kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství, kde jsou ADSC aplikovány.

**Klíčová slova:** mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně, adheze, proliferace, diferenciace, hladké svalové buňky, fibroblastový růstový faktor 2, vaskulární endotelový růstový faktor A, galektin-3, polylaktid, polykaprolakton, 3D tisk, kardiovaskulární tkáňové inženýrství

## **Abstract (AJ)**

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells that serve to regenerate tissue in the body. One of the most important sources of MSC is adipose tissue, from which cells can be isolated easily and in large quantities. The behavior of cell culture *in vitro* is mainly influenced by the biomaterial's physicochemical properties, the cell's properties and the culture medium's composition.

The dissertation thesis aimed to study the behavior of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSC). Their adhesion, growth and differentiation towards smooth muscle cells were investigated in an *in vitro* cultivation environment influenced by the composition of the culture medium, physicochemical properties of the biomaterial and dynamic stimulation of the culture.

Galectin-3 was found to mediate ADSC adhesion to the culture substrate surface by interacting with integrin receptors. ADSC also showed adhesion interaction with fibroblast growth factor 2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). FGF-2 also promoted ADSC proliferation, whereas VEGF-A did not. ADSC were cultured on polylactide foils with various surface modifications (argon plasma treatment, polyethylene glycol or dextran coating). The surface modifications positively affected the adhesion and growth of ADSC. Surface modifications did not affect ADSC differentiation towards smooth muscle cells, which was induced by biochemical differentiation factors in the culture medium. ADSC proliferated on soft porous 3D scaffolds made of polylactide and polycaprolactone. The material without the addition of hydroxypropyl cellulose was the most suitable for cell proliferation. However, cells did not penetrate deep into the material. Dynamic stimulation of the culture resulted in increased cell proliferation on the porous scaffold. Cells also proliferated on polylactide meshes prepared by 3D printing. In this case, the cells penetrated deep into the material, and when cocultured with human umbilical vein endothelial cells with dynamic stimulation, pre-capillary structures were formed.

This work provided new insights into the behavior of ADSC *in vitro* under different culture conditions. The obtained results will potentially be used in regenerative medicine or cardiovascular tissue engineering where ADSC are applied.

**Keywords:** mesenchymal stem cells from adipose tissue, adhesion, proliferation, differentiation, smooth muscle cells, fibroblast growth factor 2, vascular endothelial growth factor A, galectin-3, polylactide, polycaprolactone, 3D printing, cardiovascular tissue engineering

Rád bych poděkoval RNDr. Janě Musílkové, CSc. a doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za odborné vedení a možnost vypracovat svou disertační práci v Laboratoři biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR. Poděkování patří také celému kolektivu v laboratoři, díky kterému se práce na experimentech, publikacích a grantových projektech stala příjemnou zábavou. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také kocourovi Theovi, který mi svou přítomností zpříjemňoval dlouhé večery strávené pod lampičkou při učení na státní závěrečné zkoušky a při sepisování disertační práce.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Mesenchymální kmenové buňky .....	1
1.1.1	Mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně .....	3
1.1.1.1	Izolace ADSC .....	4
1.1.1.2	Kultivace ADSC .....	5
1.1.1.3	Fenotypická charakterizace ADSC .....	5
1.1.1.4	Aplikace ADSC .....	7
1.1.1.5	Diferenciace ADSC směrem k hladkým svalovým buňkám .....	8
1.2	Adheze buněk .....	11
1.2.1	Integriny .....	12
1.2.2	Fokální adheze.....	14
1.3	Interakce buněk s biomateriály.....	15
1.3.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti biomateriálu.....	15
1.3.2	Vlastnosti buněčné kultury.....	17
1.3.3	Složení kultivačního média .....	19
1.4	Tkáňové inženýrství .....	19
1.4.1	Kardiovaskulární tkáňové inženýrství.....	20
1.4.1.1	Cévní tkáňové inženýrství.....	20
2	Cíle práce.....	24
3	Materiál a metody.....	25
3.1	Příprava rekombinantních proteinů .....	25
3.1.1	Příprava VEGF-A <sub>165</sub> a FGF-2M.....	25
3.1.2	Příprava galektinu-3 .....	25
3.2	Příprava PLLA materiálů a jejich povrchová úprava .....	25
3.3	Příprava 3D materiálů na bázi PLLA/PCL.....	25
3.4	Buněčné kultury.....	26
3.4.1	Mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně .....	26
3.4.2	Endotelové buňky z lidské pupečnickové žíly .....	27
3.4.3	Cévní hladké svalové buňky z prasečí aorty .....	27
3.5	Studium inciální adheze.....	27
3.6	Kultivace buněk s růstovými faktory VEGF-A <sub>165</sub> a FGF-2M.....	28
3.7	Stanovení metabolické aktivity buněk.....	28
3.8	Imunocytochemické barvení a fluorescenční mikroskopie .....	28
3.9	Stanovení exprese markerů diferenciace na úrovni mRNA .....	29
3.10	Statistické zpracování dat .....	30
4	Výsledky.....	31

4.1	Adheze a růst buněk v přítomnosti růstových faktorů VEGF-A <sub>165</sub> a FGF-2.....	31
4.2	Adheze buněk na adsorbovaný galektin-3 .....	38
4.3	Adheze, růst a diferenciaci buněk na polymerních foliích z PLLA pro konstrukci cévních náhrad.....	46
4.4	Růst buněk na 3D biomateriálech pro konstrukci vaskularizovaných náhrad či modelů měkkých a tvrdých tkání .....	53
5	Diskuse .....	62
5.1	Izolace a charakterizace mesenchymálních kmenových buněk z tukové tkáně .....	62
5.2	Vliv růstových faktorů VEGF-A <sub>165</sub> a FGF-2 na adhezi a růst buněk .....	63
5.3	Vliv galektinu-3 na adhezi buněk .....	67
5.4	Adheze, růst a diferenciaci buněk na PLLA foliích.....	70
5.5	Růst buněk na 3D porézních PLLA/PCL biomateriálech .....	72
5.6	Růst buněk na PLLA biomateriálech připravených metodou 3D tisku.....	74
6	Závěr.....	75
7	Seznam použité literatury .....	77
8	Seznam použitých zkratk.....	99
9	Publikace .....	102
9.1	Publikace související s disertační prací .....	102
9.2	Další publikace .....	103
9.3	Manuskripty.....	103
10	Konference .....	104
11	Výuková činnost.....	105
12	Recenzní činnost .....	106
13	Příloha s publikacemi .....	107

# 1 Úvod

## 1.1 Mesenchymální kmenové buňky

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní buňky stromálního původu, které jsou charakteristické svou schopností buněčného dělení za současného zachování jejich nediferencovaného stavu. MSC se nacházejí ve vyzrálých tkáních organismu, kde slouží k obnově odumřelých buněk a regeneraci poškozené tkáně. Dle Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii musí MSC splňovat tyto tři základní charakteristiky: 1. buňky jsou adherentní na kultivačním povrchu; 2. exprimují povrchové markery CD105, CD73 a CD90 a naopak jsou negativní na přítomnost markerů CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$ , CD19 a HLA-DR; 3. diferencují *in vitro* na osteoblasty, adipocyty a chondroblasty (Dominici *et al.*, 2006). Mimo tyto tři základní charakteristické znaky bylo rovněž prokázáno, že MSC mají schopnost diferencovat *in vitro* i na další buněčné typy původem ze stejného zárodečného listu (mesodermu) – mimo již zmíněné adipocyty (Li a Wu, 2020), chondroblasty (Yang *et al.*, 2022) a osteoblasty (Shafei a Kalarestaghi, 2020) mohou diferencovat také směrem k buňkám hladkého svalu (Gu *et al.*, 2018), příčně pruhovaného svalu (Witt *et al.*, 2017) a srdečního svalu (Shen *et al.*, 2017) nebo směrem k endotelovým buňkám (Oswald *et al.*, 2004). MSC mohou vhodnou stimulací transdiferencovat také směrem k buňkám ektodermálního původu (na nervové buňky, Hernández *et al.*, 2020) a endodermálního původu, například na hepatocyty (Yu *et al.*, 2018) nebo  $\beta$ -buňky slinivky břišní (Pavathuparambil *et al.*, 2019). MSC je možné získat téměř ze všech tkání organismu. Tyto buňky byly izolovány například z kostní dřevě (Baghaei *et al.*, 2017), tukové tkáně (Travnickova *et al.*, 2020), kosterního svalu (Testa *et al.*, 2020), synoviální tekutiny (Jorgenson *et al.*, 2018) a synoviální membrány (Mochizuki *et al.*, 2006), vazů (Cheng *et al.*, 2010), kůže (Castro-Manrreza *et al.*, 2019), zubní tkáně (Huang *et al.*, 2009) nebo z krve (Kassis *et al.*, 2006) a z extrafetálních tkání jako jsou Whartonův rosol pupečníku (Zheng *et al.*, 2022), placenta (Barlow *et al.*, 2008), pupečnicková krev (Nguyen *et al.*, 2022), chorion (González *et al.*, 2015), amnion (Tamagawa *et al.*, 2007) a plodová voda (Roubelakis *et al.*, 2007). MSC je rovněž možné izolovat z moči (Bharadwaj *et al.*, 2013).

MSC jsou heterogenní populací buněk, kdy jednotlivé buňky izolované ze stejné tkáně mohou mít rozdílnou diferenciační kapacitu (Russell *et al.*, 2010). Rozdílnost v chování a expresi povrchových markerů je dána také tkání, ze které jsou MSC izolovány. Například MSC izolované z extrafetálních tkání vykazují vyšší proliferační a diferenciační potenciál ve srovnání s buňkami z dospělých tkání (Hass *et al.*, 2011). U buněk z Whartonova rosolu pupečníku byly dokonce prokázány alespoň některé markery pluripotence, jako je například



OCT4, SOX2, NANOG či SSEA4, a proto se někteří autoři domnívají, že tyto buňky stojí na hranici multipotence a pluripotence (Garzon *et al.*, 2020). Je rovněž zajímavé, že MSC jsou v řadě charakteristik *in vitro* velmi podobné s fibroblasty a pericyty. Je tedy otázka, zda MSC ve skutečnosti v organismu neplní funkce těchto dvou buněčných typů. S fibroblasty a pericyty sdílí MSC nejen podobnou morfologii a expresi povrchových markerů, ale i podobný diferenciační potenciál (Covas *et al.*, 2008). Arnold Caplan se dokonce zamyslel nad tím, proč se MSC v různých tkáních nacházejí obvykle perivaskulárně, a dospěl k závěru, že MSC jsou ve skutečnosti pericyty, či alespoň jsou z těchto buněk odvozeny. Navrhoval proto změnu významu zkratky MSC z původních „mesenchymal stem cells“ na „medicinal signalling cells“ (Caplan, 2017a). V jeho pojetí fungují MSC jako jacísi „strážci a hlídači“ („sentinels and gatekeepers“) na rozhraní tkáně a krevního řečiště, a pokud z tohoto řečiště přijde do tkáně nepříznivý signál, zahajují tyto buňky regeneraci tkáně (Caplan, 2017b). Studie jiných autorů ovšem ukazuje, že *in vivo* se pericyty chovají rozdílně ve srovnání s MSC, a podobnost mezi těmito dvěma buněčnými typy je tedy dána nejspíše umělým *in vitro* prostředím (Guimaraes-Camboa *et al.*, 2017). V některých studiích se sice nepodařilo fenotypicky rozlišit fibroblasty od MSC (Denu *et al.*, 2016), jiné však poukazují například na rozdílnou expresi CD146 a dalších markerů (Covas *et al.*, 2008) nebo na rozdíly v angiogenní a imunomodulační aktivitě (Blasi *et al.*, 2011).

V současnosti jsou MSC zkoumány zejména z hlediska svého regenerativního, imunomodulačního, angiogenního a antiapoptického účinku pro využití v regenerativní medicíně a pokročilém tkáňovém inženýrství. MSC mají vysoký potenciál pro léčbu neurodegenerativních chorob a nervových poškození jako jsou Alzheimerova (Hernández a García, 2021) a Parkinsonova choroba (Canesi *et al.*, 2016), amyotrofická laterální skleróza (Barczewska *et al.*, 2020) a poranění míchy (Vaquero *et al.*, 2018) nebo pro léčbu pacientů po cévní mozkové příhodě (Jaillard *et al.*, 2020). Dále jsou MSC použitelné pro zlepšení stavu pacientů s autoimunitními chorobami, jako je roztroušená skleróza (Harris *et al.*, 2020) nebo revmatoidní artritida (Park *et al.*, 2018). Aplikace MSC vede také ke zlepšení diabetu (Wang *et al.*, 2011) nebo kardiovaskulárních chorob, například ischemické kardiomyopatie (Heldman *et al.*, 2014) a infarktu myokardu (Hare *et al.*, 2009). MSC mohou také pomáhat v procesu léčby kožních ran (Zhou *et al.*, 2022). Velmi perspektivní jsou MSC i v moderním tkáňovém inženýrství pro regeneraci a rekonstrukci orgánů a tkání, například pro konstrukci cévních náhrad s buněčnou složkou (Murphy a Atala, 2013) nebo konstrukci kostní tkáně pro léčbu kostních defektů (Šponer *et al.*, 2018).

Regenerativní, imunomodulační, angiogenní a antiapoptický účinek MSC je zprostředkován především jejich parakrinní aktivitou. MSC jsou schopny produkovat celou škálu růstových faktorů, hormonů, interleukinů, cytokinů, chemokinů, adhezních molekul a mikroRNA, které jsou vylučovány do extracelulárního prostoru buď ve volné solubilní formě nebo vázané uvnitř extracelulárních vesikulí. Extracelulární vesikuly jsou váčky tvořené lipidickou dvojvrstvou a jsou odvozené od cytoplazmatické membrány. Slouží k přenosu různých bioaktivních molekul a tedy k intercelulární signalizaci. Podle průměru vesikuly je lze dělit na exosomy (30-150 nm), mikrovesikuly (150-500 nm) a apoptotická tělíčka (800-1500 nm). Izolované vesikuly mají v tkáních podobné biologické účinky jako samotné MSC, proto jsou rovněž využívány v klinických aplikacích jako tzv. bezbuněčná terapie založená na kmenových buňkách (stem cell-based cell-free therapy; Lotfy *et al.*, 2023). Sekreci parakrinních faktorů *in vitro* je možné stimulovat například hypoxickými podmínkami nebo kultivací MSC ve 3D sferoidních formacích (Zhang *et al.*, 2014; Burand *et al.*, 2020).

Sekrece interleukinů a cytokinů umožňuje mesenchymálním kmenovým buňkám modulovat reakce imunitního systému. MSC mají na imunitní reakce většinou tlumivý účinek. MSC mohou polarizovat makrofágy na M2 fenotyp, což vede k utlumení zánětlivé reakce a k stimulaci regenerace tkáně. Vlivem MSC rovněž dochází k inhibici proliferace a aktivace NK buněk. Vlivem parakrinních signálů produkovaných MSC mohou být inhibovány zránění a aktivita dendritických buněk. Inhibována je dále také aktivace B lymfocytů a proliferace a diferenciace T lymfocytů. Zároveň je podporována diferenciace T regulačních lymfocytů (Múzes a Sipos, 2022).

Pozitivní angiogenní účinek MSC je dán jejich sekrecí růstových faktorů, hlavně vaskulárních endotelových růstových faktorů, fibroblastových růstových faktorů, hepatocytárních růstových faktorů a angiopoetinu, které podporují vaskularizaci a růst endotelových buněk. Tyto faktory podporují také růst a proliferaci jiných buněčných typů, čímž dochází k regeneraci tkáně. Regenerace je dále stimulována také insulinu-podobným růstovým faktorem, stanniokalcinem-11, Bcl-2 nebo survivinem (Galderisi *et al.*, 2022).

### **1.1.1 Mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně**

Zjištění, že MSC lze izolovat rovněž z tukové tkáně, znamenalo značný přínos pro další výzkum a využití mesenchymálních kmenových buněk v klinických aplikacích (Zuk *et al.*, 2001). Mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně (ADSC) lze totiž získat ve velkých množstvích a tuková tkáň je navíc relativně snadno dostupná a samoobnovující se. Například v porovnání s kostní dřeví lze získat z tukové tkáně zhruba 500× větší množství

mesenchymálních kmenových buněk, což představuje výtěžek až 5000 ADSC na 1 gram tukové tkáně (Zhang *et al.*, 2012). ADSC lze izolovat z bílé i hnědé tukové tkáně a nachází se rovněž jak v podkožním, tak viscerálním tuku (Baglioni *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014).

### 1.1.1.1 Izolace ADSC

Klinicky nejvýznamnějším zdrojem ADSC je podkožní tuk získávaný při liposukcích. Nejčastějšími místy odběru jsou stehna, boky a břišní oblast. Studie porovnávající množství, proliferaci a diferenciací potenciál ADSC v závislosti na místě a způsobu odběru udávají buď protichůdné výsledky, například že chování ADSC závisí na způsobu odběru (například excízi tukové tkáně, tumescentní nebo ultrazvukovou liposukcí; Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006), nebo data ukazující, že místo odběru nemá na chování ADSC významný vliv (Jurgens *et al.*, 2008; Travnickova *et al.*, 2020).

Lipoaspirát odebraný při liposukci je promyt pufovaným fyziologickým roztokem a enzymaticky natráven pomocí kolagenasy. Po centrifugaci natráveného lipoaspirátu je možné pozorovat rozdělení vzorku do 4 fází – 1. Vrchní fáze tvořená tuky uvolněnými z tkáně; 2. Střední fáze složená z enzymaticky natrávené tukové tkáně; 3. Vodná fáze obsahující fyziologický roztok použitý při liposukci a médium nebo pufovaný fyziologický roztok použitý pro promytí vzorku; 4. Spodní fáze, tzv. stromální vaskulární frakce (SVF), která se usadí na dně ve formě pelety. SVF je tvořena především ADSC, ale obsahuje také endotelové buňky, hladké svalové buňky, pericyty, preadiocyty a krevní buňky. Buňky stromální vaskulární frakce jsou následně pěstovány *in vitro* v kultivačních lahvích, kde dojde k vyselektování buněčných populací, a výsledná adherentní buněčná kultura poté neobsahuje endotelové buňky a buňky krevní řady jako jsou lymfocyty, granulocyty a makrofágy (Brzoska *et al.*, 2005). Protokoly pro enzymatickou izolaci ADSC se mohou v publikacích mírně lišit v jednotlivých parametrech (doba inkubace s kolagenasou, koncentrace enzymu, doba a rychlost centrifugace). I přes tyto rozdíly jsou získány podobné populace ADSC se srovnatelným proliferacím a diferenciacím potenciálem (Palumbo *et al.*, 2015). Některé studie uvádějí také možnost izolace ADSC mechanickým rozmělněním tkáně a následným prorůstáním buněk z explantátů na dno kultivační lahve, což může přinést v porovnání s enzymatickou metodou izolace časovou úsporu a snížené riziko kontaminace kultury opakovanou manipulací se vzorkem (Zeng *et al.*, 2013). Relativně jednoduchá je také neenzymatická metoda izolace ADSC spočívající v odebrání vodné fáze lipoaspirátu obsahující fyziologický roztok použitý při liposukci nebo v promytí tukové tkáně pufovaným fyziologickým roztokem. Fyziologický roztok je následně centrifugován a na dně zkumavky

se usadí SVF. ADSC a další buňky SVF se totiž částečně uvolňují do fyziologického roztoku i bez použití enzymů (Bellei *et al.*, 2017).

### 1.1.1.2 Kultivace ADSC

Po izolaci SVF z lipoaspirátu jsou buňky následně expandovány *in vitro*. Expanze probíhá za standardních kultivačních podmínek (tj. 37 °C, atmosféra s 5% CO<sub>2</sub>) v běžně používaných komerčních kultivačních médiích (Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium nebo minimální esenciální médium s modifikací  $\alpha$ ) s obsahem antibiotik a 10% fetálního hovězího séra nebo s obsahem destičkového lyzátu, čímž dojde k selekci adherentních buněk z SVF. Pro klinické aplikace mohou být ADSC expandovány i v bezsérových médiích bez živočišných produktů (Patrikoski *et al.*, 2013). Expanze izolovaných ADSC *in vitro* je spojena s riziky, které mohou vést ke snížení jejich regenerativního potenciálu. Buňky mohou podléhat vlivem dlouhodobé kultivace senescenci, což vede k poškozením v buněčné DNA, které způsobují nežádoucí mutace, genovou nestabilitu a potenciální tumorigenicitu kultury (Itahana *et al.*, 2004). ADSC také ve statické *in vitro* kultuře spontánně diferencují a ztrácejí schopnost proliferace (Izadpanah *et al.*, 2006). Pro zachování multipotentního charakteru ADSC a podporu jejich růstu je nejběžněji používán fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2). FGF-2 udržuje buňky v multipotentním stavu, zároveň působí jako inhibitor senescence a stimuluje proliferaci ADSC aktivací signálních drah se zapojením ERK1/2, JNK, p38, Akt, Src a MEK1/2 (Zaragosi *et al.*, 2006; Coutu a Galipeau, 2011; Ma *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2020).

### 1.1.1.3 Fenotypická charakterizace ADSC

Fenotypická charakterizace adherentní kultury ADSC získané ze SVF je prováděna zpravidla na průtokovém cytometru detekcí povrchových markerů, které jsou minimálním kritériem pro identifikaci mesenchymálních kmenových buněk (Dominici *et al.*, 2006). Soupis pozitivních povrchových markerů u ADSC je uveden v následující tabulce (Mildmay-White a Khan, 2017; tab. 1). Naopak negativní jsou ADSC na markery uvedené v další tabulce (Mildmay-White a Khan, 2017; tab. 2).

Tabulka 1: Pozitivní povrchové markery charakteristické pro ADSC.

Povrchový marker	Název	Funkce	Zdroj
CD73	membránová ekto-5'-nukleotidasa	produkuje extracelulární adenosin regulující zánětlivé procesy, klíčová v regenerativní a protizánětlivé funkci kmenových buněk	Tan <i>et al.</i> , 2019
CD90	Thy-1	glykoprotein ukotvený v membráně přes glykosylfosfatidylinositolovou kotvu, hraje roli v diferenciaci a růstu	Moraes <i>et al.</i> , 2016

CD105	endoglin	koreceptor pro transformující růstové faktory, hraje roli při diferenciaci a imunomodulačních vlastnostech buněk	Moraes <i>et al.</i> , 2016
CD29	$\beta 1$ integrin	adhezní receptor, který zprostředkovává interakci buňky s proteiny extracelulární matrix a u ADSC se podílí na jejich regenerativní funkci a diferenciaci	Wang <i>et al.</i> , 2020
CD13	aminopeptidasa N	podílí se na adhezi, migraci buněk a endocytóze, má klíčovou roli v regenerativních vlastnostech buněk	Rahman <i>et al.</i> , 2014
CD34		protein typický pro hematopoetické kmenové buňky; ačkoli je uváděn v minimálních kritériích jako negativní marker pro MSC, byl v řadě publikací identifikován na povrchu čerstvě izolovaných ADSC, avšak vlivem <i>in vitro</i> kultivace dochází k jeho vymizení	Lin <i>et al.</i> , 2012
CD44	P-glykoprotein 1	podílí se na buněčné adhezi a migraci	Senbanjo a Chellaiah, 2017
CD166		podílí se na adhezi a migraci buněk	Swart, 2002
CD10	Nepriylisin	štěpí proteiny a peptidy v extracelulárním prostoru	Bilalovic <i>et al.</i> , 2004
CD49e	$\alpha 5$ integrin	součást adhezního receptoru $\alpha 5 \beta 1$ integrinu, který se váže na fibronektin	Kachroo <i>et al.</i> , 2020
CD59	protektin	ochraňuje buňky před aktivací komplementu	Maio <i>et al.</i> , 1998

Tabulka 2: Negativní povrchové markery u ADSC.

Povrchový marker	Název	Funkce	Zdroj
CD45	protein tyrosinfosfatasa	typický pro hematopoetické kmenové buňky a všechny buňky krevní řady, klíčový pro buněčnou signalizaci	Trowbridge <i>et al.</i> , 1994
CD14		marker monocytů, makrofágů a dendritických buněk, rozpoznává lipopolysacharidy bakterií	Zamani <i>et al.</i> , 2013
CD11b	$\alpha M$ integrin	typický pro buňky myeloidní linie, důležitý při adhezi, chemotaxi a polarizaci makrofágů	Schmid <i>et al.</i> , 2018
CD19	CVID3	imunoglobulin, klíčový pro proliferaci a diferenciaci B lymfocytů	Wang <i>et al.</i> , 2012
CD56	Adhezní molekula neuronů (NCAM)	imunoglobulin, typicky exprimovaný nervovými a imunitními buňkami	Van Acker <i>et al.</i> , 2017
CD146	Adhezní molekula melanocytů (MCAM)	imunoglobulinový adhezní receptor; izolované ADSC obsahují velmi malé procento pozitivních buněk, jeho exprese je spojena se zvýšenou regenerační a imunomodulační schopností buněk	Li <i>et al.</i> , 2019

CD31	Adhezní molekula krevních destiček a endoteliálních buněk PECAM-1	Imunoglobulinová adhezní molekula, marker endoteliálních buněk, zprostředkuje adhezi destiček a zánětlivých buněk k endotelu, reguluje propustnost cév, podporuje migraci endotelových buněk a angiogenezi.	Li <i>et al.</i> , 2019
------	--	---	-------------------------

Je nutné podotknout, že u řady povrchových markerů se míra pozitivivity nebo negativity může napříč studiemi lišit. Tyto odlišnosti jsou dány rozdílným metodickým přístupem při fenotypizaci buněk. Buněčné kultury mohou být charakterizovány v rozdílných pasážích – například marker CD105 začíná být exprimován až při *in vitro* kultivaci, ihned v čerstvě izolované SVF nemusí být detekován (Yoshimura *et al.*, 2006). Rozdílnost v expresi markerů může být dána také heterogenitou v adherentní populaci buněk v SVF. Například ve studii Li *et al.*, 2011 byly ADSC z SVF separovány na základě odlišnosti v expresi markerů CD31, CD34 a CD146 do 4 adherentních populací, které se poté lišily *in vitro* jak v proliferaci, tak v diferenciačním potenciálu.

#### 1.1.1.4 Aplikace ADSC

ADSC jsou s oblibou využívány v celé škále klinických aplikací díky své snadné dostupnosti ve velkých množstvích. Jsou používány v léčbě autoimunitních, kardiovaskulárních nebo neurodegenerativních chorob a v tkáňovém inženýrství pro rekonstrukci a regeneraci tkání či v hojení ran. Obdobné využití má také sekretom ADSC jako bezbuněčná terapie (Chan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2020).

Použití ADSC v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství s sebou přináší i některé nevýhody, které je potřeba při konkrétní aplikaci zohlednit. Například ve srovnání s MSC, které jsou izolovány z extraembryonálních tkání (Whartonova rosolu pupečníku, pupečnickové krve nebo placenty), mají ADSC nižší proliferační a diferenciační potenciál (Christodoulou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Nižší regenerační a diferenciační schopnost ADSC je také spojena s vyšším věkem dárců tukové tkáně (Maredziak *et al.*, 2016; Choudhery *et al.*, 2014). Další nevýhodou ADSC je jejich postupný přechod do buněčné senescence, který je způsobený opakovaným pasážováním a dlouhodobou *in vitro* kultivací (Turinetti *et al.*, 2016; Truong *et al.*, 2019). Dlouhodobá kultivace vede ke snížené proliferaci, a rovněž k akumulaci poškození DNA a epigenetických modifikací, což je způsobeno sníženou aktivitou DNA polymerasy a chybovostí v opravných mechanismech DNA poškození. To má za následek přechod kultury do buněčné senescence nebo její genetickou nestabilitu spojenou se zvýšeným rizikem chromozomálních abnormalit nebo transformace kultury (Neri, 2019). Nutné je také

zmínit tumorigenní potenciál ADSC, který je zprostředkován řadou mechanismů, zejména podporou angiogeneze v nádorech a odolnosti vůči chemoterapeutikům, imunosupresivními vlastnostmi a indukci vzniku metastáz v organismu. V některých případech mohou mesenchymální kmenové buňky naopak růst rakovinných buněk inhibovat (Liang *et al.*, 2021).

#### **1.1.1.5 Diferenciace ADSC směrem k hladkým svalovým buňkám**

ADSC jsou stejně jako MSC izolované z jiných tkání multipotentní a mohou tudíž diferencovat do řady buněčných typů (Bačáková *et al.*, 2018). Z hlediska využití ADSC v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství při konstrukci cévních náhrad nebo vaskularizovaných konstruktů tkání je zajímavá zejména jejich schopnost diferencovat na cévní hladké svalové buňky, které tvoří střední vrstvu cév, tzv. *tunica media*.

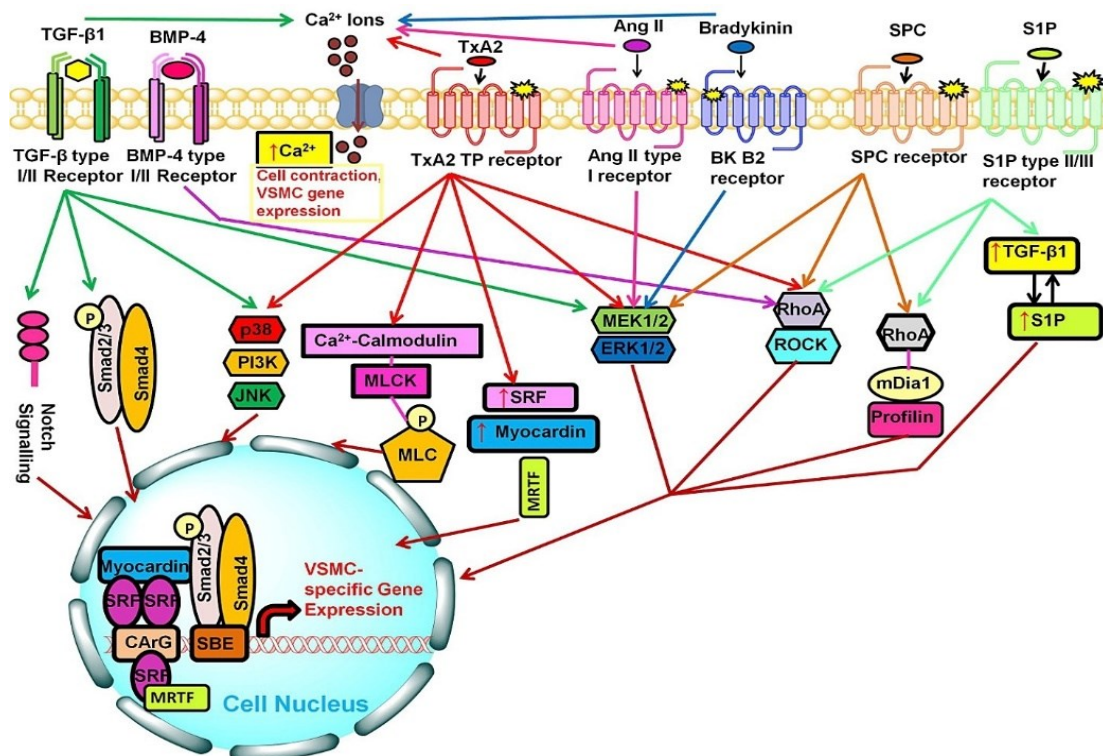
Na biochemické úrovni probíhá proces diferenciace ADSC na cévní hladké svalové buňky aktivací signálních drah transformujícím růstovým faktorem  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) a kostním morfogenetickým proteinem 4 (BMP4). Tyto faktory se vážou na příslušné receptory na povrchu buněk (TGF $\beta$  receptor typu I a II, respektive BMP4 receptor typu I a II). TGF $\beta 1$  aktivuje signální dráhy se zapojením Notch, Smad2/3-Smad4, MEK/ERK, p38, JNK a PI3K. BMP4 aktivuje signální dráhu RhoA/ROCK (obr. 1). Tyto signální dráhy následně vedou k translokaci a navázání transkripčních faktorů na CarG boxy v DNA, čímž dojde k aktivaci exprese hladkosvalových genů. Exprese je aktivována transkripčním faktorem A příbuzným s myokardinem (MRTF-A) a faktorem sérové odezvy (SRF) (Zhang *et al.*, 2017). V buňce je během diferenciace aktivována exprese genů typických pro kontraktilní aparát hladkosvalové buňky. Dochází ke zvýšené expresi  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu, který je považovaný za časný marker diferenciace a je typický pro celou řadu dalších buněčných typů, jako jsou fibroblasty a myofibroblasty (Wang *et al.*, 2006). Mezi časné markery diferenciace patří také transgelin (SM22 $\alpha$ , hladkosvalový protein 22 $\alpha$ ), který je strukturně podobný kalponinu a podílí se na regulaci kontraktility buňky vazbou na aktinová vlákna (Li *et al.*, 1996). Dále je při diferenciaci stimulována exprese kalponinu a h-kaldesmonu, které jsou označovány jako střednědobé markery diferenciace do hladkého svalu. Kalponin a h-kaldesmon jsou proteiny vázající se na aktinová vlákna a modulující tak kontrakci hladkého svalu (Wang, 2008; Liu a Jin, 2016). V diferencovaných buňkách mohou být exprimovány také těžký řetězec hladkosvalového myosinu a smoothelin-B, které jsou typickými a unikátními znaky pro zcela vyzrálou hladkosvalovou buňku a jejich exprese na proteinové úrovni značí terminální fázi diferenciace (Owens *et al.*, 2004). Většina studií se ovšem zaměřuje pouze na detekci exprese časných a střednědobých hladkosvalových markerů. Exprese markerů terminální fáze

diferenciace na proteinové úrovni spolu s funkční kontraktilní esejí, které mohou jako jediné sloužit pro jednoznačnou identifikaci kontraktilního hladkého svalu, často nejsou stanoveny. Proto je v tomto směru vhodnější označovat diferencované ADSC jako „buňky diferencované směrem k hladkému svalu“ nebo „buňky podobné hladkosvalovým buňkám“.

Mimo TGF $\beta$ 1 a BMP4 může být diferenciace indukována také jinými biochemickými stimuly, například vazoaktivními peptidy bradykininem a angiotensinem II, dále lysofosfolipidy (sfingosin-1-fosfátem, sfingosylfosforylcholinem), prostanoidy (thromboxanem A<sub>2</sub>). Pozitivní vliv na diferenciaci směrem k hladkému svalu mají také faktory, u nichž ovšem nebyl přesně charakterizován mechanismus účinku; jedná se o kyselinu L-askorbovou, heparin, PDGF-BB nebo kyselinu retinovou (Zhang *et al.*, 2017; obr. 1). Hypoxické podmínky, tj. atmosféra s obsahem kyslíku nižším než 21%, mohou rovněž podporovat hladkosvalovou diferenciaci buněk. Jako nejvhodnější pro diferenciaci se ukázala koncentrace kyslíku 5% (Wang *et al.*, 2018). To odpovídá fyziologické koncentraci kyslíku v tukové tkáni, která se pohybuje mezi 2-8% (Pasarica *et al.*, 2009). V hypoxii ADSC secernují zvýšené množství TGF $\beta$  a jiných růstových faktorů do média, což stimuluje jejich diferenciaci (Lin *et al.*, 2020).

V praxi je nejčastěji využívána indukce diferenciace pomocí biochemických stimulů přidávkem TGF $\beta$ 1, BMP4, kyseliny askorbové nebo heparinu do kultivačního média (Wang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2020; Travnickova *et al.*, 2021). Nevýhodou dlouhodobé stimulace exogenními diferenciačními faktory v médiu je ovšem možná nežádoucí fibrotizace buněčných kultur, projevující se např. zvýšenou produkcí intersticiálního kolagenu (Xu *et al.*, 2007).





Obrázek 1. Signální dráhy vedoucí k diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk směrem k hladkým svalovým buňkám. Převzato ze Zhang *et al.*, 2017.

ADSC mohou být stimulovány k diferenciaci nejenom prostřednictvím biochemických signálních molekul, které jsou přidány externě do kultivačního média, ale také parakrinním působením signálních molekul produkovaných jiným buněčným typem, který je s ADSC kokultivován. Ve studiích jsou ADSC běžně kokultivovány s endotelovými buňkami, hladkými svalovými buňkami a makrofágy, tedy s buněčnými typy, které se i v cévní stěně nacházejí v těsné blízkosti a vzájemně se ovlivňují buď parakrinní signalizací nebo přímým kontaktem buňka-buňka. ADSC kokultivované s endotelovými buňkami nebo kultivované v kondicionovaném médiu z endotelových buněk diferencovaly směrem k hladkým svalovým buňkám, což bylo prokázáno zvýšenou expresí  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu, transgelinu a kalponinu. Diferenciační účinek byl způsoben akumulací aktivinu A v kultivačním médiu (Merfeld-Clauss *et al.*, 2015). Podobně může být diferenciaci stimulována kokultivací ADSC s hladkými svalovými buňkami v poměru 1:5 (Zhang *et al.*, 2012). Diferenciaci ADSC byla rovněž indukována médiem kondicionovaným makrofágy, a to prostřednictvím prostaglandinu F<sub>2</sub> $\alpha$  (Lee *et al.*, 2012).

V přirozeném prostředí tkání jsou buňky obklopeny extracelulární matrix, která dává dané tkáni mechanickou stabilitu a rovněž dává buňkám signál pro diferenciaci. Prostředí extracelulární matrix cévní stěny bylo napodobeno řadou polymerních biomateriálů. U ADSC byla pozorována zvýšená exprese  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu a transgelinu na materiálech

z polyethylenglykoldiakrylátu. Na těchto nosičích byl rovněž studován vliv povrchové morfologie materiálu na diferenciaci buněk. Buňky nejlépe diferencovaly na povrchu s rovnoběžnými pruhy s šířkou v řádech mikrometrů (Qu *et al.*, 2013). ADSC byly diferencovány i na mikrosférách z kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, což bylo potvrzeno zvýšenou expresí kalponinu, kaldesmonu a těžkého řetězce hladkosvalového myosinu. Diferenciace na mikrosférách byla indukována přidavkem TGF $\beta$ 1 do kultivačního média, exprese kaldesmonu a kalponinu však byla zvýšená i u buněk na mikrosférách v růstovém médiu bez TGF $\beta$ 1 (Parmar *et al.*, 2015). Na kopolymeru z ethylenglykolmonomethyletheru a kaprolaktonu byly ADSC stimulovány k expresi těžkého řetězce hladkosvalového myosinu v médiu s přidavkem heparinu (Kim *et al.*, 2010). Hladkosvalovou diferenciaci stimuluje také substrát pokrytý polypyrrolem (Björninen *et al.*, 2017). ADSC je možné diferencovat biochemickou stimulací směrem k hladkému svalu i na polyethylentereftalátu vhodném pro konstrukci umělých cév, materiál ovšem samotnou diferenciaci nevyvolává (Yogi *et al.*, 2021). Podobně i PLLA folie s povrchovými modifikacemi (plasmovaný povrch nebo pokrytí dextranem a polyethylenglykolem) nebo kultivační polystyren pokrytý lamininem nebrání biochemicky stimulované diferenciaci ADSC směrem k hladkému svalu (Travnickova *et al.*, 2021; Rodríguez *et al.*, 2006).

Dalším diferenciačním faktorem je dynamická stimulace buněčné kultury. V cévní stěně jsou buňky vystaveny cyklickému napětí vlivem proudící krve, které se liší frekvencí a silou v závislosti na typu a umístění cévy. Mechanická stimulace v pulzním bioreaktoru vedla ke zvýšené expresi  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu, kalponinu a transgelinu v ADSC kultivovaných na porézním tubulárním nosiči z polytrimethylenkarbonátu pro konstrukci cévní náhrady (Parvizi *et al.*, 2016). I dynamické natahování buněk na nosiči z kopolymeru kyseliny mléčné a kaprolaktonu vede ke zvýšené expresi  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu a těžkého řetězce hladkosvalového myosinu (Park *et al.*, 2012). Pulzní bioreaktor byl použit i pro diferenciaci ADSC na tubulárních konstruktech cév z kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (Wang *et al.*, 2017).

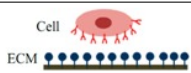
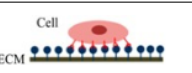
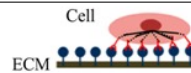



Některé studie naznačují možný diferenciační efekt elektrické stimulace (Björninen *et al.*, 2017) nebo infračerveného záření (Abrahamse, 2014), jednoznačný účinek ale v těchto případech nebyl potvrzen.

## 1.2 Adheze buněk

Tkáně organismu jsou tvořeny buňkami a extracelulární matrix, která utváří vnější prostředí buněk a dává strukturu dané tkáni. Interakce obou těchto složek je důležitá pro správnou

strukturní organizaci a mezibuněčnou komunikaci v tkáních mnohobuněčných organismů. Buňky jsou v tkáních organismu ukotveny v různých typech vnějšího prostředí. Buněčná adheze je schopnost buněk vázat se k jiným buňkám nebo k extracelulární matrix. Buněčná adheze je klíčová pro přenos signálů z vnějšího prostředí, které regulují růst a vývoj tkání. Adheze rovněž hraje roli při migraci a diferenciaci buněk (Khalili a Ahmad, 2015). MSC jsou při *in vitro* kultivaci adherentní, což znamená, že adheze k extracelulární matrix je v *in vitro* podmínkách nahrazena adhezí na kultivační biomateriál (Dominici *et al.*, 2006).

Buněčná adheze *in vitro* může být rozdělena do tří fází. První fází je iniciální sedimentace a přisednutí buňky na povrch substrátu. Další fází je rozprostírání buňky na daný povrch substrátu spojené s vazbou integrinových receptorů na vazebné ligandy na povrchu substrátu a se zplošťováním původně sferoidní buňky. Poslední fází je plné rozprostření buňky, formace fokálních adhezí mezi buňkou a substrátem a rozvinutí aktinového cytoskeletu v buňce (obr. 2, Khalili a Ahmad, 2015).

Cell Adhesion Phases	Phase I	Phase II	Phase III
Schematic diagram of cell adhesion			
Schematic diagram of the transformation of cell shape	 Initial attachment	 Flattening	 Fully spreading and structural organization
Cell adhesion intervention	Electrostatic interaction	Integrin bonding	Focal adhesion
Adhesion stages	Sedimentation	Cell attachment	Cell spreading and stable adhesion

Obrázek 2. Fáze *in vitro* buněčné adheze na kultivační substrát (převzato z Khalili a Ahmad, 2015).

### 1.2.1 Integriny

Integriny jsou transmembránové adhezni receptory. Jejich funkcí je ukotvení buňky k extracelulární matrix nebo k jiným buňkám a také přenos signálu z vnějšího prostředí, tj. integrace vnějšího a vnitřního prostředí buňky, jak napovídá již samotné označení těchto proteinů. Jedná se o heterodimerní proteiny tvořené vždy podjednotkou  $\alpha$  a podjednotkou  $\beta$ . V lidském organismu existuje 18 typů podjednotek  $\alpha$  a 8 typů podjednotek  $\beta$ , které umožňují tvorbu 24 unikátních heterodimerních receptorů.  $\beta$  podjednotky mohou vázat více typů  $\alpha$  podjednotek. Receptory vznikají nekovalentní asociací dvou podjednotek. Extracelulární doména integrinové podjednotky je zakončena globulární hlavicí tvořenou 7 otečkami. Všechny  $\beta$  podjednotky a některé  $\alpha$  podjednotky obsahují v globulární části proteinu také vazebné místo pro dvojmocné kationty. Vazba dvojmocných kationtů ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) do těchto

vazebných míst vede ke změně konformace proteinu a ke zvýšené afinitě integrinového receptoru k substrátu. Cytoplazmatická doména je krátká a obsahuje méně než 75 aminokyselin. Na intracelulární doménu se váže řada signálních nebo strukturálních proteinů. Intracelulární doména zprostředkovává přenos signálu z receptoru a jeho interakci s cytoskeletárními proteiny uvnitř buňky (Campbell a Humphries, 2011).

Integriny rozpoznávají a vážou specifické aminokyselinové sekvence v proteinech extracelulární matrix (obr. 3). Pro většinu integrinových receptorů je charakteristické, že jsou schopny rozpoznávat více typů sekvencí a nejsou přísně specifické pouze k jedinému ligandu. Integriny také mohou vázat celou škálu růstových faktorů, hormonů a nízkomolekulárních látek v extracelulárním prostředí nebo proteinů na povrchu virů a bakterií (LaFoya *et al.*, 2018). Některé integriny, které jsou typické především pro leukocyty, interagují také s receptory a membránovými proteiny na dalších buňkách, jako jsou například mezibuněčná adhezivní molekula 1 (ICAM1) nebo vaskulární adhezivní molekula (VCAM), a jsou klíčové pro dynamickou *in vivo* adhezi buněk na endotel v cévním řečišti (Mitroulis *et al.*, 2015). Integrinové receptory je možné podle jejich specifity k vazebnému substrátu dělit do 4 následujících skupin: 1. Arg-Gly-Asp (RGD) vázající integriny, mezi které patří  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$  a všechny integriny obsahující  $\alpha V$  podjednotku. Jsou označovány jako „nejvíce promiskuitní receptory“ schopné vázat různé proteiny jako fibronectin, fibrinogen, vitronektin nebo osteopontin. 2. integriny vázající Leu-Asp-Val (LDV) ligandy, mezi které patří  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha E\beta 7$  a všechny integriny obsahující  $\beta 2$  podjednotku. Vážou LDV sekvenci obsaženou například na fibronectinu nebo VCAM. 3.  $\beta 1$  integriny obsahující A doménu, jedná se o heterodimery kombinující  $\beta 1$  integrin s podjednotkou  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  nebo  $\alpha 11$ . Tyto receptory se vážou především na různé typy kolagenů a lamininů. 4. Integriny bez  $\alpha A$  domény, jedná se o  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  a  $\alpha 7\beta 1$  integriny, které vážou preferenčně sekvence na lamininu (Humphries *et al.*, 2006).

Amino acid sequence	Typical for a certain ECM molecule	Preferred by a certain cell adhesion receptor
RGD*	Vitronectin Fibronectin	Integrin $\alpha_v\beta_3$ <sup>#</sup> Integrin $\alpha_5\beta_1$
DGEA	Collagen	Integrin $\alpha_2\beta_1$
KQAGDV	Vitronectin, fibronectin	Integrin $\alpha_v\beta_3$ <sup>#</sup>
VAPG	Elastin	Non-integrin receptor
REDV	Fibronectin	Integrin $\alpha_4\beta_1$
YIGSR, IKVAV	Laminin	Integrins $\alpha_6\beta_1$ , $\alpha_7\beta_1$
KRSR	Part of the heparin binding domain	Non-integrin receptor

Obrázek 3. Příklady specifických adhezních sekvencí rozpoznávaných integrinovými receptory. U každé sekvence jsou uvedeny integrinové receptory, které je jsou schopny vázat (převzato z Bačáková a Švorčík, 2008).

### 1.2.2 Fokální adheze

Místa mechanické interakce buňky s okolním prostředím jsou v buňce lokalizována do tzv. fokálních adhezí. Na vnějším povrchu buňky jsou fokální adheze tvořeny integrinovými receptory, které rozpoznávají a vážou aminokyselinové sekvence v proteinech extracelulární matrix. Po navázání integrinu na sekvenci dojde k přenosu signálu do buňky a na vnitřní straně buněčné membrány je formován fokálně-adhezní komplex, který slouží jako ukotvení pro formaci aktinového cytoskeletu. Vazba integrinů na extracelulární matrix a tvorba fokálně adhezního komplexu tedy tvoří spojení cytoskeletu buňky s vnějším prostředím. Vytvoření fokálních adhezí spouští v buňkách signální kaskády a je nezbytné například pro regulaci migrace, proliferace či diferenciace buněk a správné fungování a regeneraci tkání. Po aktivaci integrinového receptoru dojde na jeho cytoplazmatické doméně k formaci multiproteinového komplexu (fokální adheze), který je *in vitro* kulturách patrný ve výbězcích membrány rozprostírající se buňky. Cytoplazmatická doména integrinu obsahuje tři vazebné motivy, na které se vážou různé adaptorové proteiny. Aminokyselinový motiv His-Asp-Arg-Lys (HDRK), vázající fokálně-adhezní kinasu, paxilin nebo Fyn; dále motivy NxxY a NPxY schopné vázat talin, kindlin 1 a 2 nebo Shc prostřednictvím PTB domény na těchto proteinech. Adaptorové proteiny mohou plnit ve fokálních adhezích různé funkce. Mohou mít enzymatickou funkci, díky které přenášejí signál z fokálních adhezí na příslušnou signální

dráhu (například fokálně-adhezní kinázy, Src, kinasy spojené s integriny). Některé adaptorové proteiny se mohou vázat na aktinový cytoskelet (filamin, talin,  $\alpha$ -aktinin, tensin) nebo mohou zprostředkovat vazbu dalších proteinů do fokálně-adhezního komplexu (paxillin) (Wu, 2007). Integrinová signalizace přes fokální adheze má následně vliv na regulaci buněčného cyklu a buněčného dělení (Kamranvar *et al.*, 2022), migraci a angiogenesi (Zhao a Guan, 2011). Adherentní buňky, které mají nedostatek adhezních signálů z integrinových receptorů, podstupují programovanou buněčnou smrt zvanou anoikis. Tento mechanismus zabraňuje migraci a růstu buněk v jiných tkáních, než pro které jsou tyto buňky určeny, a tím udržuje homeostázu v organismu (Taddei *et al.*, 2012).

### **1.3 Interakce buněk s biomateriály**

Chování buněk v *in vitro* kultuře (ve smyslu jejich adheze, růstu a diferenciaci) na biomateriálu je ovlivněno třemi hlavními faktory: 1. Fyzikálně-chemickými vlastnostmi biomateriálu, 2. Vlastnostmi buněčné kultury a 3. Složením kultivačního média.

#### **1.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti biomateriálu**

Jednou z fyzikálně-chemických charakteristik, které mají vliv na adhezi, růst i diferenciaci buněčné kultury je tuhost kultivačního materiálu. Tuhost materiálu je buňkami rozpoznávána pomocí integrinových receptorů. V buňce se po navázání receptorů na substrát formují kontraktilní stresová vlákna aktinového cytoskeletu a dochází k mechanotransdukci signálu, především prostřednictvím RhoA/ROCK, ale i jiných signálních drah. Adherující buňky mají tedy na měkkých materiálech ve výsledku malou plochu rozpostření a nedokonale zformovaný aktinový cytoskelet. Naopak na pevném materiálu buňky formují jasně patrné fokální adheze s dobře rozvinutým cytoskeletem a mají velký povrch rozprostření (Pelham a Wang, 1997; Lv *et al.*, 2015). Tuhost materiálu rovněž stimuluje diferenciaci MSC směrem k buněčnému typu, který se i v tkáních *in vivo* nachází v prostředí extracelulární matrix o podobné tuhosti. Kultivace ADSC na tuhém materiálu tak vede k jejich osteogenní (Zhang *et al.*, 2018) nebo chondrogenní diferenciaci (Lee *et al.*, 2020). Na středně tuhém materiálu pak může docházet k myogenní diferenciaci (Tijore *et al.*, 2018) a na měkkém k adipogenezi (Zhang *et al.*, 2018) nebo neurogenezi (Stukel *et al.*, 2018).

Dalším faktorem je povrchová struktura materiálu. Drsnost materiálu může nabývat makroskopických rozměrů v milimetrové škále až po členitosti v řádech nanometrů. Povrchová morfologie udává tvar adherující buňce. To může být nejjasněji ilustrováno na příkladu materiálu s rovnoběžnými drážkami v mikrometrových velikostech. Buňky na těchto površích adherují ve směru pruhů, což vede ke změně jejich tvaru ve srovnání s buňkami na hladkém

povrchu (Kim *et al.*, 2009). Obecně lze říct, že povrchy s větší drsností mají větší povrch pro adsorpci proteinů, adhezi a rozptýlení buněk a akumulaci proteinů extracelulární matrix. Povrchová drsnost v mikro i nanometrových řádech tedy vede ke zvýšené adsorpci adhezních proteinů ze séra, což podporuje buněčnou adhezi a také osteogenní diferenciaci (Webster *et al.*, 2000; Faia-Torres *et al.*, 2014). Mikrokanálky na povrchu hydrogelu podporují i myogenní diferenciaci buněk (Tijore *et al.*, 2018). Drážkovaný povrch rovněž podporuje vývoj neuronů (Park *et al.*, 2018) a neurogenní diferenciaci (Yang *et al.*, 2014). U některých materiálů ale může mikrodrsnost působit na buněčnou proliferaci negativně (Kim *et al.*, 2005). Buňky se totiž při adhezi rozprostírají na vzdálenosti i několika desítek mikrometrů, a tak mohou např. vyvýšeniny v řádu mikrometrů toto rozptýlení omezovat. Buňky se například musí stěsnat do prohlubní mezi vyvýšeninami, nebo naopak přemostíjí prohlubně, a nevyžívají tak efektivně celou plochu své membrány k interakci buňka-matrix. Ve snaze adherovat současně do prohlubní i na vyvýšeniny pak buňka nepřírodně deformuje svou membránu, což může mít negativní vliv na její funkce. V neposlední řadě mohou ostré vyvýšeniny buňku i mechanicky poškodit (Bačáková *et al.* 2004, 2011).

Chování buněk na biomateriálu je určeno také jeho smáčivostí a elektrostatickým nábojem. Smáčivost vyjadřuje míru hydrofobnosti/hydrofilnosti materiálu. Smáčivost je měřena pomocí kontaktního úhlu vodní kapky na povrchu materiálu. Čím větší je kontaktní úhel kapky, tím větší je hydrofobnost materiálu. Hydrofobnost má zásadní vliv na adsorpci proteinů ze séra, což významně ovlivňuje chování buněk. Příliš hydrofobní povrchy adsorbují proteiny v denaturovaném stavu, což je nevhodné pro adhezi buněk. Příliš hydrofilní povrch naopak brání adsorpci proteinů z kultivačního média. Například ve studii porovnávající adhezi MSC na škále hydrogelů s kontaktními úhly mezi 26-85° vyšlo najevo, že MSC adherují nejlépe na středně hydrofobní povrch s hodnotou kontaktního úhlu 58°. Tento povrch adsorboval největší množství fibronektinu a lamininu ze séra (Ayala *et al.*, 2011). Naopak u fibroblastů byla se stoupající hodnotou kontaktního úhlu povrchu (rozmezí 0-106°) pozorována zhoršená adheze; nejlépe buňky adherovaly na hydrofilním povrchu. Na hydrofilním povrchu byl ve zvýšené míře adsorbován fibronectin a na hydrofobním albumin (Wei *et al.*, 2007).

Elektrostatický náboj materiálu je dán jeho chemickými skupinami na povrchu a má rovněž vliv na smáčivost materiálu, adsorpci proteinů ze séra a adhezi buněk. Povrchový náboj může být modifikován povrchovou funkcionalizací, nejčastěji pomocí skupin -CH<sub>3</sub>, -OH, -COOH nebo -NH<sub>2</sub>. U rozdílných buněčných typů byl pozorován rozdílný efekt elektrostatického náboje na adhezi. Kladný náboj materiálu podporoval například adhezi fibroblastů, keratinocytů nebo hladkých svalových buněk (Guo *et al.*, 2016; Černochová *et al.*,

2020). V jiné studii byl naopak pozorován pozitivní efekt záporného náboje materiálu na adhezi fibroblastů. Záporný náboj navíc inhiboval růst bakteriálních kultur na materiálu (Guo *et al.*, 2018). Záporný náboj na tepelně oxidovaných Ti, Nb a TiNb substrátech rovněž podporoval osteogenní diferenciaci buněk linií Saos-2 a MG-63, odvozených z lidského osteosarkomu, zatímco kladný náboj podporoval proliferaci těchto buněk (Vandrovcová *et al.*, 2014).

Povrch biomateriálů může být modifikován a ztraktivněn pro buněčnou adhezi, růst i diferenciaci navázáním různých bioaktivních molekul. Biomateriál může být potažen adhezními proteiny extracelulární matrix (Aung *et al.*, 2023), adhezními peptidy (Li *et al.*, 2016), růstovými (Qu *et al.*, 2018) nebo diferenciacními faktory (Lu *et al.*, 2012). Povrch může být modifikován polymerními sloučeninami přírodního (Chen *et al.*, 2018) a syntetického původu (Kim *et al.*, 2018). Povrch může být modifikován i fyzikálními metodami, například plazmatem (Švorčík *et al.*, 2009). Úprava povrchu může rovněž spočívat ve vytváření mikrodomén (Peng *et al.*, 2011) nebo nanodomén (Cavalcanti-Adam *et al.*, 2007) na povrchu s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi ve srovnání s biomateriálem.

### **1.3.2 Vlastnosti buněčné kultury**

Vlastnosti buněk při nasazení mají rovněž významný vliv na chování buněčné kultury na biomateriálu. Tento vliv je zejména patrný při proliferaci a diferenciaci MSC.

Diferenciace je například výrazně ovlivněna hustotou násady buněčné kultury. Buňky mají při vyšší koncentraci násady menší prostor pro rozprostření a vzniká mezi nimi více mezibuněčných kontaktů. Při nižší hustotě násady mají buňky velkou plochu rozpostření ale méně mezibuněčných spojů. Tento jev byl podrobně popsán u MSC, které byly nasazeny v různé hustotě na mikrostrůvky o ploše 5600  $\mu\text{m}^2$ . Rostoucí hustota násady měla pozitivní vliv na adipogenní diferenciaci buněk, u osteogenní diferenciaci byl efekt hustoty násady zanedbatelný. Bylo zjištěno, že kladný efekt na adipogenezi je dán jednak menší plochou rozprostření buněk a také větším počtem mezibuněčných kontaktů. Naopak u osteogenní diferenciaci byly zjištěny protichůdné efekty, kdy malá plocha jednotlivých buněk inhibovala osteogenezi, která byla však zároveň stimulována četnějšími mezibuněčnými spoji (Peng *et al.*, 2012). Kladný efekt tvorby většího počtu mezibuněčných spojů na diferenciaci MSC byl popsán i ve studii Tang *et al.*, 2010. Osteogeneze je u dostatečně rozprostřených buněk aktivována přes RhoA/ROCK signální dráhu (McBeath *et al.*, 2004). Efekt hustoty buněčné násady na osteogenní diferenciaci MSC byl popsán i v případě kultivace na materiálech z fosforečnanu vápenatého. Při nízkých násadách buňky špatně diferencovaly a hůře proliferovaly (Zhou *et al.*, 2011). Pokud je ovšem iniciální násada buněk příliš velká, dochází



k tzv. kontaktní inhibici, kdy buňky v *in vitro* kultuře nemají další prostor pro růst a dochází tak k inhibici jejich proliferace (Eagle a Levine, 1967).

Dalším faktorem působícím na diferenciaci kultury je tvar buněk na substrátu. MSC mají v *in vitro* podmínkách na kultivačním polystyrenu podlouhlý, vřetenovitý tvar (Travnickova *et al.*, 2021). V jiné studii byly MSC jednotlivě nasazeny na mikrostrůvky o různých tvarech (kruh, čtverec, trojúhelník a pěticípá hvězda) se stejnou plochou a stejným poměrem délky stran. Diferenciační potenciál závisel na celkovém obvodu daného tvaru. Adipogenní diferenciaci probíhala nejvíce ve tvaru kruhu, který měl nejkratší obvod, a nejméně ve tvaru hvězdy, který měl obvod nejdelší. Při osteogenní diferenciaci byl efekt opačný a nejvíce buňky diferencovaly v hvězdicovitém tvaru (Peng *et al.*, 2011). Adipogenní diferenciaci MSC na mikrostrůvkách různých tvarů byla sledována i ve studii Song *et al.*, 2011, kde se kruhový tvar ukázal také jako nejvhodnější. Osteogenní diferenciaci naopak probíhá lépe, pokud mají buňky ostré okraje (Kilian *et al.*, 2010).

Na diferenciaci má také podstatný účinek délka buněk. Při nasazení jednotlivých buněk na mikrostrůvky o stejné ploše, ale různém poměru stran (tj. na čtverec a různě dlouhé a široké obdelníky) dochází po indukci diferenciacími médii k výraznější adipogenní diferenciaci MSC na čtvercovém tvaru. Čím delší a tenčí je buňka na substrátu, tím méně adipogenně diferencuje. Při osteogenezi je diferenciaci nejintenzivnější v buněčném tvaru obdelníku s poměrem stran 2:1. Čtvercový nebo příliš podlouhlý tvar buňky již není pro osteogenezi optimální (Peng *et al.*, 2011). Stejný jev byl pozorován i při kultivaci buněk v růstovém médiu bez biochemických diferenciacími faktorů (Yao *et al.*, 2013).

Z dosud publikovaných studií je tedy možné soudit, že diferenciaci MSC směrem k hladkým svalovým buňkám, které mají v *in vitro* kulturách protáhlý a vřetenovitý tvar, bude rovněž ovlivněna tvarem a plochou rozprostření jednotlivých buněk. Studován byl například vliv buněčné morfologie na chování vyzrálých hladkých svalových buněk. Bylo zjištěno, že hladké svalové buňky lépe proliferují při větší ploše rozprostření. Avšak je-li plocha rozprostření již příliš velká, proliferace buněk se opět snižuje, neboť je omezena velkým počtem fokálních adhezí a bohatě rozvinutým cytoskeletem. Lze tedy shrnout, že proliferační aktivita buněk je nejvyšší na středním stupni adheze (Bačáková *et al.* 2004, 2011). Na proliferaci měl negativní vliv i příliš podlouhlý tvar buňky. I exprese hladkosvalových markerů byla překvapivě snížena v buňkách s příliš podlouhlým tvarem (Thakar *et al.*, 2009).

### 1.3.3 Složení kultivačního média

Mimo základních živin (jednoduché cukry, aminokyseliny, vitamíny) a minerálů je do kultivačního média běžně přidáváno fetální hovězí sérum (FS). To obsahuje řadu proteinů, nízkomolekulárních látek a iontů, které mohou mít vliv na adhezi, růst a diferenciaci buněčné kultury.

FS obsahuje řadu adhezních molekul, které se adsorbují na povrch kultivačního polystyrenu a podporují tak buněčnou adhezi. Hlavní složkou ovlivňující adhezi ve FS jsou fibronektin a vitronektin, proteiny extracelulární matrix rozpoznávané integrinovými receptory (Hayman *et al.*, 1985; Steele *et al.*, 1992). Na druhou stranu téměř polovinu z celkového množství proteinů v séru tvoří albumin. Tento protein má při adsorpci na kultivační polystyren antiadhezivní účinky a používá se jako blokační látka při studiu adheze buněk na substrát (Yamazoe a Tanabe *et al.*, 2008; Sedlář *et al.*, 2021a; Sedlář *et al.*, 2021b). U jiných biomateriálů může adsorpce albuminu naopak adhezi buněk podporovat (Horváthy *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2023). Pokud se totiž adsorbuje v přiměřeném množství, může vylepšovat geometrickou konformaci fibronektinu a vitronektinu, a tím i dosažitelnost jejich specifických aminokyselinových sekvencí integrinovými receptory buněk (Sousa *et al.* 2008). Typ a množství proteinu, které se budou na kultivační povrch adsorbovat, závisí hlavně na fyzikálně-chemických vlastnostech biomateriálu (Wilson *et al.*, 2005). Při použití bezsérových médií může být absence adhezních molekul suplována adsorpcí některého proteinu extracelulární matrix na kultivační polystyren před samotným nasazením buněčné kultury (Li *et al.*, 2010; Sedlář *et al.*, 2021b).

Proliferace a diferenciacie buněk je ovlivněna obsahem růstových faktorů v séru. Sérum obsahuje především fibroblastové, endotelové, epidermální, transformující a insulinu podobné růstové faktory a růstové faktory odvozené z destiček (Lee *et al.*, 2022).

V některých případech, zejména při následných klinických aplikacích, je žádoucí upustit od použití živočišných produktů při *in vitro* kultivaci. Proto se v současnosti rozmáhá použití lidského destičkového lyzátu, který rovněž obsahuje celou škálu bioaktivních molekul, jako náhražky FS (Oeller *et al.*, 2021). Existuje také možnost použití bezsérových médií s přesně definovaným obsahem bioaktivních složek (Usta *et al.*, 2014).

## 1.4 Tkáňové inženýrství

Definice tkáňového inženýrství byla formulována již před více než 30 lety americkými vědci Langerem a Vacantim. Jedná se o mezioborovou disciplínu, která využívá poznatků z materiálového inženýrství a věd o živé přírodě k vývoji biologických náhrad, které obnovují,

udržují nebo zlepšují funkci poškozených tkání nebo orgánů (Langer a Vacanti, 1993). Jinými slovy, jedná se o konstrukci tkáňových náhrad pro účely regenerativní medicíny, nebo v poslední době i o vytváření modelů tkání v podmínkách buněčných kultur *in vitro* pro nejrůznější vědecké studie za účelem nahradit používání pokusných zvířat v moderní vědě 21. století.

#### **1.4.1 Kardiovaskulární tkáňové inženýrství**

Navzdory neustávajícím pokrokům v moderní medicíně jsou kardiovaskulární choroby nejčastější příčinou úmrtí v civilizovaném světě, včetně České republiky. Dle dat Eurostatu zveřejněných ve Zdravotním profilu Česka choroby oběhové soustavy v roce 2021 způsobily 34,3% všech úmrtí v České republice, což v absolutních číslech představuje přes 48000 zemřelých (OECD/European Observatory on Health Systems and Policies, 2024). Tato statistika je navíc v roce 2021 značně zkreslena zvýšeným počtem zemřelých na onemocnění COVID-19 a v předešlých letech tedy byly kardiovaskulární choroby příčinou téměř poloviny všech úmrtí. Nejčastějším kardiovaskulárním onemocněním způsobujícím úmrtí byla v roce 2021 ischemická choroba srdeční (15,7% ze všech úmrtí) následovaná mozkovou mrtvicí (5,1%). U některých chorobných stavů ovšem není farmakologická léčba dostačující a musí být proto řešeny chirurgicky nahrazením poškozených tkání. Například při selhávání srdečních chlopní mohou být poškozené chlopně vyměněny za mechanické nebo bioprostetické chlopně (Kumar *et al.*, 2023). Dalším příkladem je transplantace srdce u pacientů s pokročilým srdečním selháním (Ahmed a Jain, 2023). Nahrazovány mohou být také cévy u pacientů s výdutí břišní aorty nebo ischemickou chorobou srdeční (Hu *et al.*, 2022). Chronický nedostatek tkání oběhového systému vhodných pro transplantace vedl ke vzniku kardiovaskulárního tkáňového inženýrství. Tento obor je dále možné rozdělit na inženýrství srdeční tkáně a cévní tkáňové inženýrství, které si kladou za cíl regenerovat nebo rekonstruovat srdeční nebo cévní tkáň.

##### **1.4.1.1 Cévní tkáňové inženýrství**

Nutnost vývoje a přípravy tkáňově-inženýrských konstruktů cév pramení z neklesající potřeby nahrazovat nenávratně poškozené cévy pacientů s kardiovaskulárními chorobami. Cévní náhrady jsou potřeba například u pacientů trpících ischemickou chorobou srdeční (aortokoronární bypass) nebo u pacientů s výdutí břišní aorty. Standardně používané cévní štěpy pro aortokoronární bypass jsou nejčastěji autologní, tedy pocházející z těla pacienta. Jako autologní štěp může sloužit vnitřní hrudní tepna nebo žíla z dolních končetin. Velká část pacientů ovšem nemá vhodné cévní štěpy s dostatečnou kvalitou, které by byly pro operace

použitelné. U žilních štěpů navíc dochází po operaci často ke snížené průchodnosti vlivem neointimální hyperplasie, což může v některých případech vést k riziku jejich selhání. Důležitým faktorem ve vzniku a rozvoji intimální hyperplasie žilního štěpu je jeho implantace na arteriální pozici a náhlé vystavení vyššímu krevnímu tlaku, což vede k jeho významné dilataci a nežádoucí aktivaci proliferace hladkých svalových buněk, která může vést ke stenóze štěpu (Skalský *et al.*, 2012).

Další možností je použití syntetických cévních náhrad, které jsou pro klinické použití vyráběny z materiálů na bázi polyethylentereftalátu (PET) nebo expandovaného polytetrafluorethylenu (ePTFE), tedy materiálů s hydrofobním povrchem, který je inertní a nevhodný pro kolonizaci buňkami. Při použití těchto štěpů u náhrad cév s malým průměrem (<6 mm) ale často dochází ke vzniku krevních sraženin, proto jsou tyto syntetické materiály preferenčně využívány při náhradách cév s vnitřním průměrem větším než 6 mm (Chlupáč *et al.*, 2009). Cílem vaskulárního tkáňového inženýrství je tedy vytvořit cévní konstrukt obsahující materiálovou a buněčnou složku, který by předcházel nežádoucím vlastnostem a nevýhodám současně používaných cévních náhrad.

Vytvoření funkčního tkáňově-inženýrského konstruktury cévy vyžaduje znalosti anatomie cévy a fyzikálně-chemických vlastností její extracelulární matrix. Struktura velkých cév je tvořena třemi vrstvami. 1. vnitřní vrstva (*tunica intima*) je tvořena endotelovými buňkami, které zabraňují srážení krve a tvoří vnitřní povrch cévy. Buňky jsou uchyceny na bazální membráně, která je složena z lamininu, kolagenů typu IV, XV a XVIII, nidogenu, perlekanu a dalších proteinů. Od další vrstvy je *tunica intima* oddělena vnitřní elastickou laminou. 2. střední vrstva (*tunica media*), tvořena především hladkými svalovými buňkami, které zajišťují mechanickou sílu cévy. Obsahuje elastinová vlákna, kolagen a proteoglykany. 3. vnější vrstva (*tunica externa* nebo *tunica adventitia*) tvořená fibroblasty. Jedná se o pojivovou tkáň udržující strukturu cévy. Extracelulární matrix této vrstvy se skládá převážně z kolagenů typu I a III, chondroitinsulfátu a proteoglykanů (Wagenseil a Mecham, 2009; Xu a Shi, 2014). Ideální cévní konstrukt by tedy měl mít vhodné mechanické vlastnosti (elasticitu a odolnost proti roztržení), být biokompatibilní, biodegradabilní a antitrombogenní, měl by mít nízkou imunogenicitu (Wang *et al.*, 2022).

Ze syntetických degradovatelných materiálů je pro nově vyvíjené cévní konstrukty nejčastěji používán polykaprolakton (PCL). Tento polymer je biodegradabilní, biokompatibilní a vykazuje dobré mechanické vlastnosti. Na druhou stranu je ale příliš hydrofobní, což může způsobovat problémy při osazení konstruktury buněčnou složkou (Siddiqui *et al.*, 2018). PCL byl použit pro cévní konstrukty jako nanovlákněný tubulární nosič (Abdal-hay *et al.*, 2018)

nebo ve formě vláken potažených želatinou (Coimbra *et al.*, 2017). Dalším z často používaných polymerů je polylaktid (poly-L-kyselina mléčná, PLLA), který rovněž vykazuje dobré mechanické vlastnosti, biokompatibilitu a biodegradabilitu, kdy při rozkladu vzniká netoxická kyselina mléčná. Materiál je ale podobně jako PCL velmi hydrofobní, což působí negativně na buněčnou adhezi (Capuana *et al.*, 2022). PLLA je možné použít v nanovláknenné podobě (Chen *et al.*, 2024) a také v kombinaci s jinými syntetickými polymery jako PCL nebo PLGA (Wang *et al.*, 2018). Ve vaskulárním tkáňovém inženýrství je používán i kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA, Wang *et al.*, 2017), polyglycerolsebakát (PGS, Wu *et al.*, 2012) nebo polyglykolová kyselina (PGA, Hodge a Quint, 2020).

Cévní konstrukty mohou být připravovány i z přírodních materiálů. Běžně je používán například kolagen, který je jednou z hlavních složek extracelulární matrix cévy. Jeho nevýhodou jsou špatné mechanické vlastnosti výsledného konstruktu, spočívající v nízké pevnosti materiálu (Copes *et al.*, 2019). Kolagenový nosič pro cévy může být používán ve formě pletených vláken (Zhang *et al.*, 2019) nebo hydrogelů (Bosch-Rué *et al.*, 2022). Používán je také elastin, který rovněž tvoří extracelulární matrix nativní cévy. Materiál se vyznačuje velmi dobrými mechanickými vlastnostmi v nanovláknenné formě (McKenna *et al.*, 2012) nebo v kombinaci se syntetickými polymery (Wise *et al.*, 2011). Dalším proteinem, ze kterého lze vytvářet cévní konstrukty, je fibroin (Kiritani *et al.*, 2020). Pro konstrukci cév lze použít i přírodní polysacharid chitosan v hydrogelové podobě (Aussel *et al.*, 2017), jako povrch syntetických nosičů (Maleki *et al.*, 2022) nebo v nanovláknenné formě v kombinaci se syntetickými polymery (Yin *et al.*, 2020).

Jako přírodní materiál mohou být použity nosiče připravené decelularizací cévní tkáně. Ty si zachovávají stejné složení extracelulární matrix jako nativní cévy. Decelularizace probíhá většinou promýváním cévy roztoky obsahující detergenty (SDS, Triton X-100) a enzymy (DNasa nebo trypsin), čímž se tkáň zbaví buněčného obsahu. Decelularizovány mohou být jak allogenní, tak xenogenní tkáně (nejčastěji z prasete), protože při důkladném odstranění buněčné složky ztrácí tkáň většinu své imunogenicity. Decelularizovány byly například krkavice, aorty, věnčité tepny nebo žíly dolních končetin (Leal *et al.*, 2021)

Tkáňově-inženýrský konstrukt může být osazen autologními vyzrálými buňkami pacienta. Pro osazení jsou používány endotelové a hladké svalové buňky, které musí být ovšem odebrány invazivní biopsií. Buňky jsou navíc získány v malých množstvích a mají nízký proliferační a regenerační potenciál. Další možností je aplikovat embryonální kmenové buňky, které jsou pluripotentní a mohou tedy diferencovat do buněčných typů nacházejících se v cévní stěně. Jejich použití je ale spojeno s etickými problémy. Variantou je rovněž použití

indukovaných pluripotentních kmenových buněk, které mohou být připraveny z autologních buněk pacienta v prakticky neomezených množstvích. Genetické manipulace v těchto buňkách ale způsobují velké riziko vzniku nádorového bujení. Ideálním řešením se proto jeví použití MSC, které lze získat autologně z různých tkání pacienta. Poté je možné je expandovat a diferencovat do požadovaných buněčných typů (Jouda *et al.*, 2022).

Pro úspěšnou přípravu tkáňově-inženýrského konstruktu je tedy nutné vycházet nejen ze znalostí biologických oborů, ale také z poznatků fyzikálních a chemických disciplín, zejména z materiálového inženýrství. Při konstrukci je potřeba pečlivě zvážit veškeré aspekty ovlivňující interakci buněk s materiálem. Příprava konstruktů začíná výrobou biomateriálu s fyzikálně-chemickými vlastnostmi vhodnými pro požadovanou aplikaci. Dále je potřeba zvolit buněčnou kulturu a upravit kultivační podmínky tak, aby došlo k úspěšné kolonizaci konstruktů buněčnou složkou. Cílem této práce bylo tedy zkoumat všechny tyto aspekty přípravy tkáňově-inženýrského konstruktů. Získané výsledky mohou přispět jak k rozšíření obecných znalostí o interakcích mezi buňkou a biomateriálem, tak k dalším aplikacím v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství při konstrukci cévních náhrad a vaskularizovaných modelů tkání.

## 2 Cíle práce

Cílem této disertační práce je získat nové poznatky o adhezi, růstu a diferenciaci ADSC v různých kultivačních podmínkách *in vitro*, ovlivněných složením kultivačního média, použitým biomateriálem a dynamickou stimulací. Dílčí cíle této práce lze tudíž formulovat následovně:

- Posoudit vliv rekombinantních proteinů FGF-2M, VEGF-A<sub>165</sub> a galektinu-3 na adhezi a růst ADSC.
- Prozkoumat adhezi, růst a diferenciaci ADSC na planárních polylaktidových foliích s různou povrchovou modifikací, které zastupují 2D biomateriály vhodné pro konstrukci umělých cév.
- Vyhodnotit chování ADSC na 3D biomateriálech na bázi polylaktidu a polykaprolaktonu, které jsou potenciálně vhodné pro konstrukci vaskularizovaných náhrad a modelů měkkých a tvrdých tkání.

### **3 Materiál a metody**

#### **3.1 Příprava rekombinantních proteinů**

Rekombinantní proteiny VEGF-A<sub>165</sub>, FGF-2M a galektin-3 byly připraveny a charakterizovány Ing. Kristýnou Slámovou, PhD. v Laboratoři biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR.

##### **3.1.1 Příprava VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M**

Růstový faktor VEGF-A<sub>165</sub> (vaskulární endotelový růstový faktor A – splicing varianta s 165 aminokyselinami) byl připraven rekombinantně v kvasinkách *Pichia Pastoris* KM71H.

Růstový faktor FGF-2 (fibroblastový růstový faktor 2) byl připraven rovněž v kvasinkách *Pichia Pastoris* KM71H. Do aminokyselinové sekvence proteinu byly zavedeny mutace ve dvou pozicích polypeptidového řetězce (R31K/R129K), čímž došlo k odstranění míst, které by mohly být potenciálně štěpeny kvasinkovými endoproteasami Kex2. Proto je dále tento mutantní růstový faktor označen jako FGF-2M. Detailněji je příprava obou růstových faktorů popsána v publikaci Sedlář *et al.*, 2021a.

##### **3.1.2 Příprava galektinu-3**

Galektin-3 byl připraven jako rekombinantní protein s histidinovou kotvou na N-terminálním konci v bakteriích *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS. Podrobný popis přípravy proteinu je publikován v článku Sedlář *et al.*, 2021b.

#### **3.2 Příprava PLLA materiálů a jejich povrchová úprava**

Polylaktidové (PLLA) fólie s povrchovými modifikacemi byly připraveny a charakterizovány na Ústavu inženýrství pevných látek na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze Ing. Nikolou Slepíčkovou Kasálkovou, PhD. Povrchová úprava spočívala ve vystavení materiálu argonovému plasmatu po dobu 240 sekund (materiál značený jako 240), plazmování a navázání polyethylenglykolu ( $M_r = 20000$ ) na povrch materiálu (PEG) nebo plazmování a navázání dextranu ( $M_r = 9000 - 11000$ , Dex). Jako kontrola byl použit čistý PLLA (PLLA) a polystyren pro buněčné kultury (PS). Podrobný postup přípravy a charakterizace materiálů je popsán v článku Travnickova *et al.*, 2021.

#### **3.3 Příprava 3D materiálů na bázi PLLA/PCL**

Trojrozměrné (3D) materiály byly vyrobeny Ing. Milošem Beranem z Výzkumného ústavu potravinářského v Praze. Měkké porézní 3D materiály z PLLA/PCL byly vyrobeny metodou lyofilizace s využitím NaCl (velikost krystalů 0,25 – 0,5 mm) jako porogenu. Pro přípravu materiálů byl použit polylaktid (NatureWorks, Ingeo Biopolymer 4043D,  $M_r = 160000$ )



a polykaprolakton (Sigma-Aldrich, 440744,  $M_r = 80000$ ). Porézní materiály byly připraveny s různým hmotnostním obsahem hydroxypropylcelulózy (Klucel<sup>TM</sup> E). Mechanicky odolnější materiály pro konstrukci tvrdých tkání byly připraveny metodou 3D tisku. Pro tisk byl použit polylaktid (Aurapol PLA 3D filament Natural, Smart 3D). Bylo připraveno několik typů materiálů s různou vnitřní architekturou, které se lišily šířkou, tvarem a uspořádáním vláken a také šířkou mezer mezi jednotlivými vlákny.

### **3.4 Buněčné kultury**

#### **3.4.1 Mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně**

ADSC byly izolovány z lipoaspirátu získaného při liposukci pacientů. Lipoaspirát byl 5× promyt pufovaným fyziologickým roztokem (PBS, Sigma-Aldrich, P4417) pro odstranění znečištění krví. Následně byl lipoaspirát inkubován s 0,1% (w/v) kolagenasou typu I (Worthington, LS004214) rozpuštěnou v 1% (w/v) roztoku hovězího sérového albuminu (BSA, Sigma-Aldrich, A9148) v PBS po dobu 1h na třepačce při 37 °C. Poměr lipoaspirátu a roztoku kolagenasy byl 1:1. Lipoaspirát byl centrifugován při 300 g a pokojové teplotě po dobu 5 minut. Supernatant byl odsán, peleta promyta v 10 ml Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (DMEM, Gibco, 52100-021) s 10% (v/v) fetálního hovězího séra (FS, Gibco, 10270-106). Po další centrifugaci byl supernatant opět odsán a peleta resuspendována v 10 ml čerstvého média. Suspenze byla přefiltrována přes sítko na buňky (Biologix, 15-1100, velikost pórů 100  $\mu\text{m}$ ) a buňky byly nasazeny na 75  $\text{cm}^2$  kultivační lahve pro následnou expanzi. ADSC byly kultivovány v DMEM s 10% FS, 10 ng/ml fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF-2, GenScript, Z03116-1) a gentamicinem (40  $\mu\text{g/ml}$ , Sandoz). Postup izolace byl převzat ze studie Estes *et al.*, 2010 a je popsán v publikaci Sedlář *et al.*, 2021a. Buňky byly charakterizovány v druhé pasáži pomocí průtokového cytometru NovoCyte<sup>®</sup> Flow Cytometer (ACEA Biosciences, Agilent) pro přítomnost nebo absenci specifických povrchových markerů. U buněk byla prokázána přítomnost markerů CD105, CD90, CD73, CD29. Na izolovaných buňkách byla detekována nulová nebo téměř nevýznamná exprese markerů CD31, CD34, CD45 a CD146. V experimentech byly použity buňky vždy v druhé až čtvrté pasáži.

ADSC byly také diferencovány směrem k hladkým svalovým buňkám. Diferenciace byla indukována úpravou složení kultivačního média. Buňky byly při diferenciaci kultivovány v DMEM s přidavkem 2% FS, 2,5 ng/ml TGF $\beta$ 1 (Abcam, ab50036), 2,5 ng/ml BMP4 (Sigma-Aldrich, GF167) a 150  $\mu\text{M}$  askorbové kyseliny (Sigma-Aldrich, 49752).

### 3.4.2 Endotelové buňky z lidské pupečníkové žíly

Endotelové buňky z lidské pupečníkové žíly (HUVEC) byly zakoupeny jako komerční produkt (Lonza, C2517A, 3. pasáž). Buňky byly kultivovány v endotelovém bazálním médiu 2 (EBM2, PromoCell, C-22111) s přidavkem suplementů (PromoCell, C-39211) obsahující 2% FS, EGF, VEGF, IGF-1, FGF-2, hydrokortison, heparin a kyselinu askorbovou a s 1% (v/v) směsí antibiotik a antimykotik (ABAM, Sigma-Aldrich, A5955).

### 3.4.3 Cévní hladké svalové buňky z prasečí aorty

Cévní hladké svalové buňky (VSMC) byly izolovány z prasečí aorty explantační metodou. Postup izolace je podrobně popsán v publikaci Liskova *et al.*, 2017 (kde byl použit pro získání intersticiálních buněk srdečních chlopní). Izolace byla provedena Mgr. Elenou Filovou, PhD. (Laboratoř biomateriálů a tkáňového inženýrství, FGÚ AV ČR). Buňky byly kultivovány v DMEM s 10% FS. Buňky byly charakterizovány imunofluorescenčním barvením na přítomnost  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu, kalponinu, h-kaldesmonu, desminu a těžkého řetězce hladkosvalového myosinu.

## 3.5 Studium iniciální adheze

Pro studium iniciální adheze buněk na substrát s adsorbovanými proteiny bylo použito zařízení xCELLigence Real-Time Cell Analysis – Single Plate (RTCA SP). Dna jamek v 96jamkových deskách (E-plate view 96 PET, 300600910) byly adsorbovány rekombinantními proteiny VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M v koncentracích 0,01 až 10  $\mu$ M přes noc při 4 °C v PBS. Rekombinantní galektin-3 byl adsorbován v koncentracích 0,1 až 33  $\mu$ M. Poté byla v části jamek potenciální nespecifická vazebná místa pro protilátky blokována pomocí 1% BSA v PBS po dobu 1 hodiny při 37 °C. Část jamek byla ponechána bez blokace BSA. Buňky byly nasazeny na jamky v médiu (DMEM pro ADSC a EBM2 pro HUVEC) bez obsahu séra a suplementů ve finální koncentraci 10<sup>4</sup> buněk na jamku v 200  $\mu$ l média. Impedance v jamkách byla snímána každé 3 minuty po dobu 4 hodin v termostatu při 37 °C ve vlhké atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>.

Pro objasnění mechanismu adheze buněk na galektin-3 byly použity protilátky blokuující integrinové podjednotky nebo integrinové heterodimery. Byly použity protilátky proti  $\alpha$ V (Millipore, MAB2021Z),  $\alpha$ 3 (Millipore, MAB1952Z),  $\beta$ 1 (Millipore, MAB2253),  $\beta$ 3 (Millipore, MAB2023Z),  $\alpha$ V $\beta$ 3 (Millipore, MAB1976),  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Millipore, MAB1969) a  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrinu (Millipore, MAB1998). Jako izotypová kontrola byl použit nespecifický myší IgG1 (Millipore, MABC002). Použitá koncentrace protilátek byla 20  $\mu$ g/ml, u protilátky proti  $\alpha$ V integrinu bylo použito ředění 1:25. Dále byl použit také syntetický inhibitor  $\alpha$ V $\beta$ 1 integrinu (MedChemExpress, HY-100445A; 0,01 - 10  $\mu$ M), syntetické peptidy GRGDSP (200  $\mu$ M,

Sigma-Aldrich, SCP0157) a GRADSP (200  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, SCP0156) a ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, 0,1 – 10 mM, Sigma-Aldrich, E6758).

### **3.6 Kultivace buněk s růstovými faktory VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M**

HUVEC a ADSC byly nasazeny ve výsledné koncentraci  $3 \times 10^3$  buněk/jamka v 96jamkové kultivační desce (TPP, 92096). ADSC byly nasazeny v médiu DMEM s 10% FS a HUVEC v médiu EGM2 s 2% FS, hydrokortisonem, heparinem a kyselinou askorbovou, ale bez dalších suplementů (EGM2 weak). Do média byl přidán rekombinantní růstové faktory VEGF-A<sub>165</sub> (10 – 1000 ng/ml) a FGF-2M (5 – 250 ng/ml) připravené v laboratoři spolupracujícího pracoviště. Pro srovnání byly použity také komerční produkty VEGF-A<sub>165</sub> (GenScript, Z03073-1) a FGF-2 (GenScript, Z03116-1) ve stejných koncentracích. V dalším experimentu byly jamky v desce před nasadou buněk přes noc adsorbovány růstovými faktory VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M v koncentracích 0,01-10  $\mu$ M při 4 °C. Rekombinantní proteiny byly ředěny v PBS.

### **3.7 Stanovení metabolické aktivity buněk**

Metabolická aktivita buněk byla stanovena metodou využívající resazurin. Resazurin (Sigma-Aldrich, R7017) je intracelulárními reduktasami živých a proliferujících buněk redukován na růžový resorufin, jehož fluorescenci je možno detekovat na mikrodestičkovém fluorescenčním readeru. V publikaci Sedlař *et al.*, 2021a bylo buňkám v 96jamkové desce odsáto kultivační médium. Buňky byly promyty v PBS a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium obsahující resazurin v koncentraci 40  $\mu$ M. Buňky byly následně inkubovány 4 hodiny v termostatu při 37 °C. Poté byla v jamkách detekována fluorescence (vlnové délky excitace/emise byly 530/590 nm) na přístroji Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Mode Microplate reader. Jako blank sloužilo médium s resazurinem v jamce bez buněk. Vzorby byly měřeny v triplikátech.

### **3.8 Imunocytochemické barvení a fluorescenční mikroskopie**

Buňky byly v daných časových intervalech fixovány roztokem 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Buňky byly blokovány a permeabilizovány roztokem 1% BSA s 0,1% Tritonem X-100 v PBS (20 minut) a dále 1% roztokem Tweenu-20 v PBS (20 minut).

Pro obarvení cytoskeletu buněk byl použit faloidin-TRITC (100 ng/ml v PBS, Sigma-Aldrich, P1951) a buněčná jádra byla barvena Hoechstem 33258 (10  $\mu$ g/ml v PBS, Sigma-Aldrich, B1155). Pro vizualizaci buněčné morfologie bylo použito také barvení Texas Red C2-maleimidem (1,7  $\mu$ g/ml, Invitrogen, T6008). Barvení probíhalo 1 hodinu při pokojové teplotě.

Fokální adheze byly vizualizovány s pomocí protilátky proti vinkulinu (ředění 1:400 v PBS, Sigma-Aldrich, V9131). Markery diference ADSC směrem k hladkým svalovým buňkám byly vizualizovány pomocí protilátek proti  $\alpha$ -hladkosvalovému aktinu (1:200 v PBS, Sigma-Aldrich, A2547), kalponinu (1:200 v PBS, Abcam, ab46794) a těžkému řetězci hladkosvalového myosinu (1:200 v PBS, Santa Cruz Biotechnology, sc-6956). Buňky byly inkubovány s primární protilátkou přes noc při 4 °C. Poté byly promyty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou proti myšimu IgG konjugovanou s fluorescenční značkou Alexa Fluor 488 (1:400 v PBS, Thermo Fisher Scientific, A11017), proti králíčimu IgG konjugovanou s Alexou Fluor 488 (1:400 v PBS, Thermo Fisher Scientific, A1070) nebo proti myšimu IgG konjugovanou s Alexou Fluor 546 (1:400 v PBS, Thermo Fisher Scientific, A11003) 1 hodinu při pokojové teplotě.

Mikrofotografie byly pořízeny na epifluorescenčním mikroskopu Olympus IX71 s digitální kamerou DP71 (Olympus). Mikrofotografie buněk na 3D biomateriálech byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Andor Dragonfly 503 se skenovacím diskem, který byl vybaven kamerou Zyla 4.2 PLUS sCMOS (Andor Technology Ltd.). Počty buněk byly spočítány z mikrofotografií fluorescenčně barvených jader a morfologické parametry buněk při adhezi vyhodnoceny z mikrofotografií buněk barvených faloidinem konjugovaným s TRITC nebo Texas Red-C2 maleimidem pomocí programu ImageJ (National Institutes of Health, verze FIJI 2.0.0-rc-68/1.52h).

### **3.9 Stanovení exprese markerů diference na úrovni mRNA**

Analýza markerů diference ADSC směrem k hladkým svalovým buňkám na úrovni mRNA byla provedena pomocí qPCR.

Pro izolaci RNA byl použit kit Total RNA Purification Micro Kit (Norgen Biotek, 25700) podle instrukcí od výrobce. Koncentrace izolované RNA byla změřena na přístroji NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Vzorky RNA byly následně uchovány při -80 °C. Pro přepis RNA na cDNA byl využit Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, 205113) spolu s Random Primer Mix (New England Biolabs, S1330S). Jednotlivé vzorky byly aplikovány do reakční směsi ve výsledném množství 1  $\mu$ g RNA. Objem reakční směsi byl 20  $\mu$ l. Reverzní transkripce probíhala po dobu 1 hodiny při 37 °C. Syntetizovaná cDNA byla uchována při -20 °C.

Pro qPCR byly využity TaqMan sondy (Life Technologies) v kombinaci s pufrem 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, 08-14-00001). Celkový objem reakční směsi v jamce byl 20  $\mu$ l. Na jamku byly nanášeny vždy 2  $\mu$ l vzorku

cDNA. Pro ADSC byly použity sondy pro analýzu exprese genů COL1A1 (Hs00164004\_m1), CNN1 (Hs00154543\_m1), SMTN (Hs01022259\_m1), ACTA2 (Hs00909449\_m1), MYH11 (Hs00975796\_m1), a B2M (Hs00187842\_m1), který sloužil jako referenční gen. PCR reakce sestávala z 2 minut preinkubace při 50 °C, 10 minut iniciální aktivace enzymu a denaturace cDNA při 95 °C a následně 40 cyklech denaturace (15 sekund, 95 °C) a annealingu/elongace (1 minuta, 60 °C). Průběh reakce byl měřen na přístroji Viiia 7 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **3.10 Statistické zpracování dat**

Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí softwaru SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., USA). Parametrická data byla statisticky srovnána pomocí jednofaktorové (One-way) ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Neparametrická data byla srovnána pomocí One-way ANOVA on Ranks ( $p \leq 0,05$ ). Většina výsledků je prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, pokud není uvedeno jinak.

## 4 Výsledky

### 4.1 Adheze a růst buněk v přítomnosti růstových faktorů VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2

**Sedlář A**, Trávníčková M, Matějka R, Pražák Š, Mészáros Z, Bojarová P, Bačáková L, Křen V, Slámová K. Growth factors VEGF-A<sub>165</sub> and FGF-2 as multifunctional biomolecules governing cell adhesion and proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 Feb 12;22(4):1843. doi: 10.3390/ijms22041843.

Príspevek studenta: Z celého autorského kolektivu jsem se nejvyšší měrou podílel na vypracování všech buněčných experimentů, zahrnujících studium vlivu růstových faktorů na adhezi a růst buněčných kultur ADSC a HUVEC. Dále jsem byl zodpovědný za zpracování výsledků a sepsání publikace. Procentuální podíl studenta na publikaci: 50%.

Jedním z aspektů, které mohou ovlivňovat adhezi, růst a diferenciaci buněk na biomateriálech pro tkáňově-inženýrské konstrukty, je biochemické složení kultivačního média, respektive přítomnost růstových faktorů v médiu. Růstové faktory mohou být přítomny v médiu v rozpustné formě nebo mohou být imobilizovány na povrchu biomateriálu. V první části disertační práce byly testovány růstové faktory VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2 rekombinantně připravené v kvasinkách *Pichia pastoris*. FGF-2 obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci 2 místa, která jsou náchylná ke štěpení kvasinkovou endoproteasou Kex2. Enzymatické štěpení FGF-2 vedlo ke ztrátě jeho biologické aktivity. Faktor FGF-2 byl tedy připraven s mutací ve dvou aminokyselinových pozicích polypeptidového řetězce (R31K/R129K), čímž došlo k odstranění míst, která jsou ke štěpení náchylná. Proto je tato mutantní forma proteinu označena jako FGF-2M.

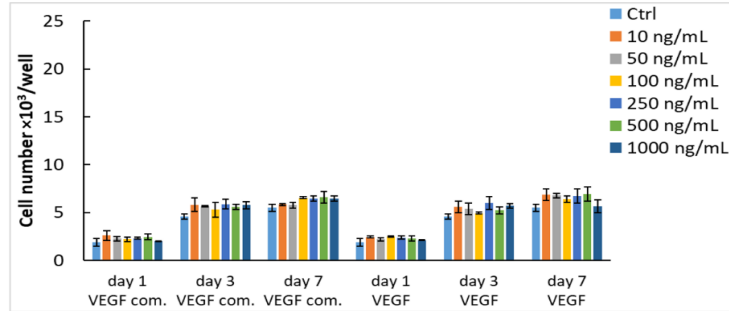
Nejprve byl testován vliv růstových faktorů v médiu na proliferaci buněk (obr. 4). Pro tuto studii byly vybrány ADSC a HUVEC, které jsou vhodné pro osazení tkáňově-inženýrských konstruktů cévních náhrad, a to jako buněčné složky reprezentující *tunica intima* (HUVEC) a *tunica media* (ADSC, které mohou být diferencovány směrem k cévním hladkým svalovým buňkám). Růstové faktory byly v koncentrační řadě (rozmezí koncentrací 10-1000 ng/ml u VEGF-A<sub>165</sub> a 5-250 ng/ml u FGF-2M) přidány do kultivačního média (pro ADSC se jednalo o DMEM s 10% FS a pro HUVEC o EBM2 s 2% FS) a byl sledován jejich účinek na růst buněk. Stanoven byl jednak počet buněk (obr. 4) a rovněž jejich metabolická aktivita (obr. 5).

Po přidání VEGF-A<sub>165</sub> do média bylo dosaženo pouze mírně zvýšené proliferace jen u HUVEC (obr. 4A). Na počet ADSC tento růstový faktor neměl žádný vliv (obr. 4C), pouze byla mírně zvýšená jejich metabolická aktivita (obr. 5C). Je zajímavé, že u HUVEC má pozitivní vliv na proliferaci již 10 ng/ml VEGF-A<sub>165</sub>, ale další zvyšování koncentrace už nevede k intenzivnější proliferaci buněk.

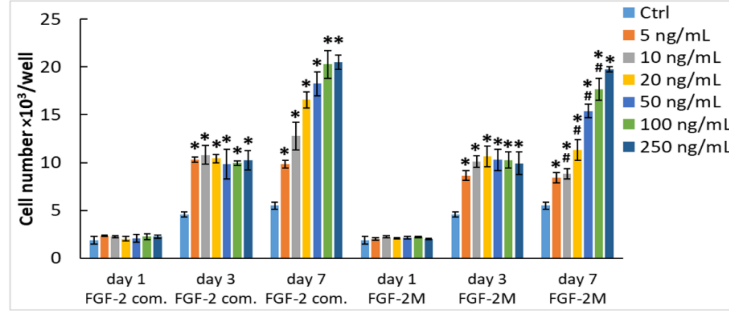
Z výsledků je jasně patrný pozitivní vliv FGF-2M v médiu na růst jak ADSC, tak HUVEC, který se zároveň se vzrůstající koncentrací faktoru v médiu dále zvyrazňuje (obr. 4B,D). Nejvyšších hodnot jak metabolické aktivity, tak počtu jader je dosaženo při koncentraci 250 ng/ml FGF-2M (obr. 4B,D a 5B,D). Pozitivní účinek růstového faktoru je nejvíce zřejmý sedmý den kultivace. První den po přidání faktoru pozitivní efekt není tolik znatelný (statisticky významně zvýšená je první den pouze metabolická aktivita u HUVEC).

Účinek připravených růstových faktorů byl také porovnán s komerčním VEGF-A<sub>165</sub> (GenScript, Z03073-1, produkován v lidské buněčné linii HEK293) a komerčním FGF-2 (GenScript, Z03116-1, produkován v bakteriích *Escherichia coli*). Laboratorně připravené růstové faktory dosahovaly podobného mitogenního efektu jako ty komerční. Pouze v některých koncentracích byl pozitivní efekt ve srovnání s komerčními mírně snížený (obr. 4B,D - FGF-2M - koncentrace 10-100 ng/ml u ADSC sedmý den kultivace a koncentrace 10-20 ng/ml u HUVEC rovněž sedmý den kultivace; obr. 5D - VEGF-A<sub>165</sub> - koncentrace 10-500 ng/ml u HUVEC třetí den kultivace rozdíl v metabolické aktivitě). Z výsledků vyplývá, že laboratorně připravené růstové faktory v kvasinkách *Pichia pastoris* mají podobnou mitogenní aktivitu jako komerční faktory připravené v buněčné linii HEK293 nebo bakteriích *E. coli*. Výsledky také ukazují, že výskyt dvou mutací v aminokyselinové sekvenci FGF-2M nemá významný vliv na jeho mitogenní aktivitu.

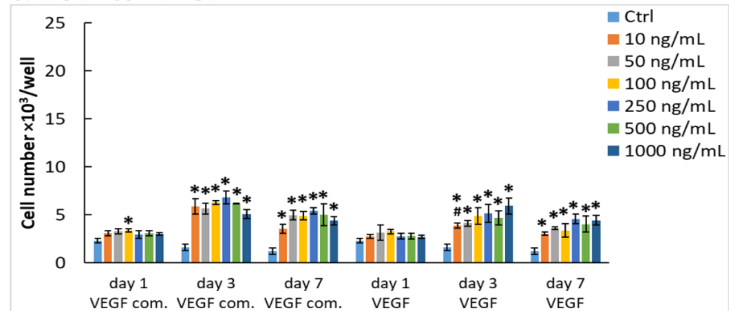
### A. ADSCs - VEGF



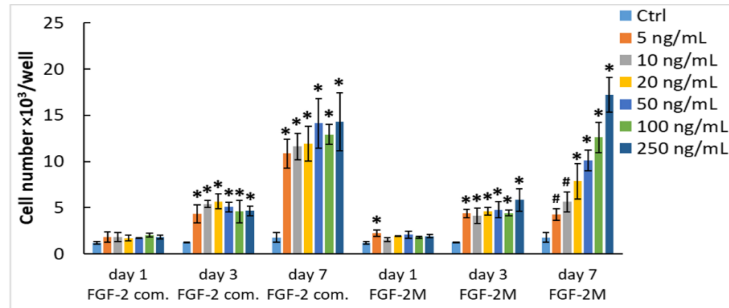
### B. ADSCs - FGF-2



### C. HUVECs - VEGF

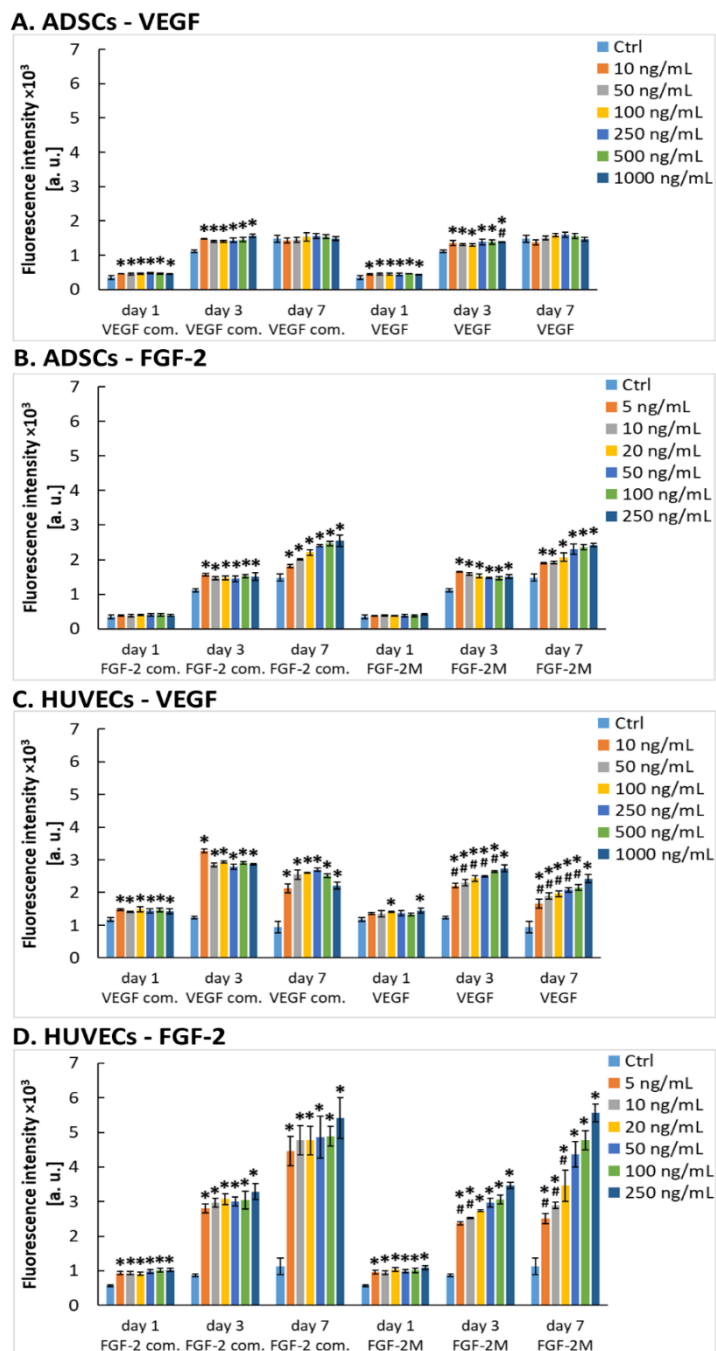


### D. HUVECs - FGF-2



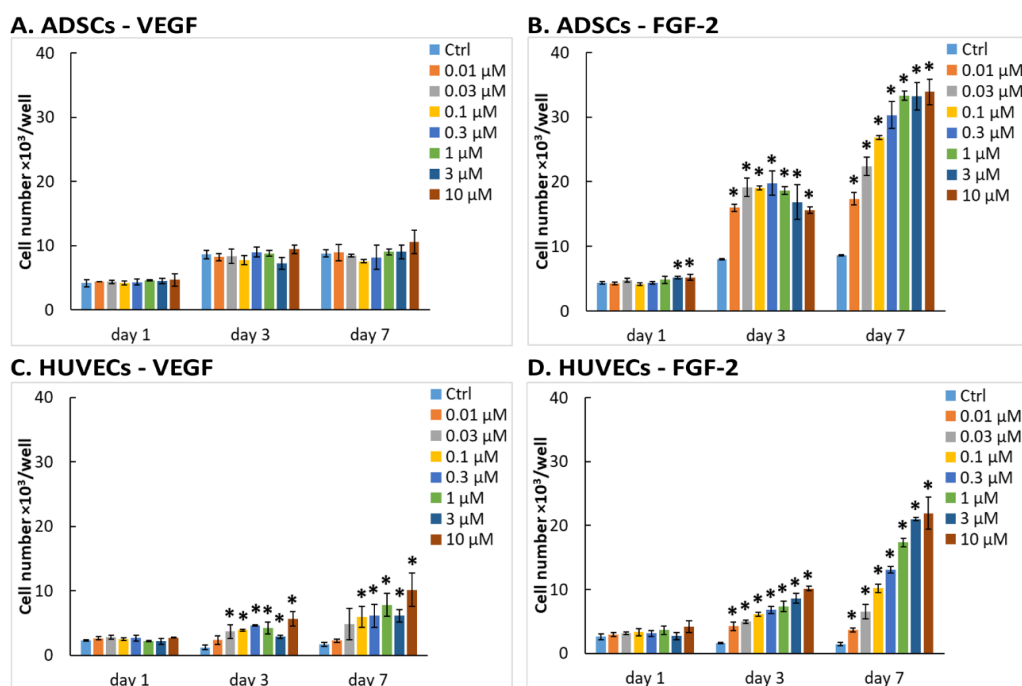
Obrázek 4. Mitogenní aktivita VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M v kultivačním médiu. ADSC (A, B) nebo HUVEC (C, D) byly kultivovány v médiu obohaceném o komerční VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF com.) nebo námi vytvořené rekombinantní VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF) v koncentracích od 10 do 1000 ng/ml (A, C) a také v médiích obohacených komerčním FGF-2 (FGF-2 com.) nebo námi vytvořeným rekombinantním FGF-2M (FGF-2M) v koncentracích od 5 do 250 ng/ml (B, D). Růstové faktory byly přidány do DMEM s 10% FBS pro ADSC (A, B) a do EGM2-weak (tj. bez růstových faktorů EGF, VEGF, IGF-1 a FGF-2) pro HUVEC (C, D). Kontrolní buňky byly kultivovány v médiu bez růstových faktorů (Ctrl). Počet buněk byl stanoven 1. den (day 1), 3. den (day 3) a 7. den (day 7) po nasazení. Průměr ± směrodatná odchylka (SD) ze 3 jamek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákova metoda,  $p \leq 0,05$ . Vzorky byly statisticky porovnány v uvedený den po nasazení. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu vzorku (Ctrl). # - statisticky významný rozdíl oproti vzorku obsahujícímu odpovídající koncentraci komerčního růstového faktoru (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021a).





Obrázek 5. Metabolická aktivita ADSC (A, B) a HUVEC (C, D) kultivovaných v médiu s VEGF-A<sub>165</sub> (A, C) nebo FGF-2M (B, D). Buňky byly kultivovány v médiu s komerčním VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF com.) nebo námi vytvořeným rekombinantním VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF) v koncentracích od 10 do 1000 ng/ml (A, C) nebo v médiu s komerčním FGF-2 (FGF-2 com.) nebo námi vytvořeným rekombinantním FGF-2M (FGF-2M) v koncentracích od 5 do 250 ng/ml (B, D). Růstové faktory byly přidány do DMEM s 10 % FS pro ADSC a do EGM2-weak (tj. bez růstových faktorů EGF, VEGF, IGF-1 a FGF-2) pro HUVEC. Kontrolní buňky byly kultivovány v médiu bez růstových faktorů (Ctrl). Metabolická aktivita byla stanovena 1. den (day 1), 3. den (day 3) a 7. den (day 7) po nasazení buněk pomocí resazurinového testu. Průměr ± SD ze 3 jamek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákova metoda,  $p \leq 0,05$ . Statisticky významné rozdíly jsou znázorněny nad sloupci. Vzorky byly statisticky porovnávány v uvedený den po nasazení. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu vzorku (Ctrl). # - statisticky významný rozdíl oproti vzorku obsahujícímu odpovídající koncentraci komerčního růstového faktoru (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021a).

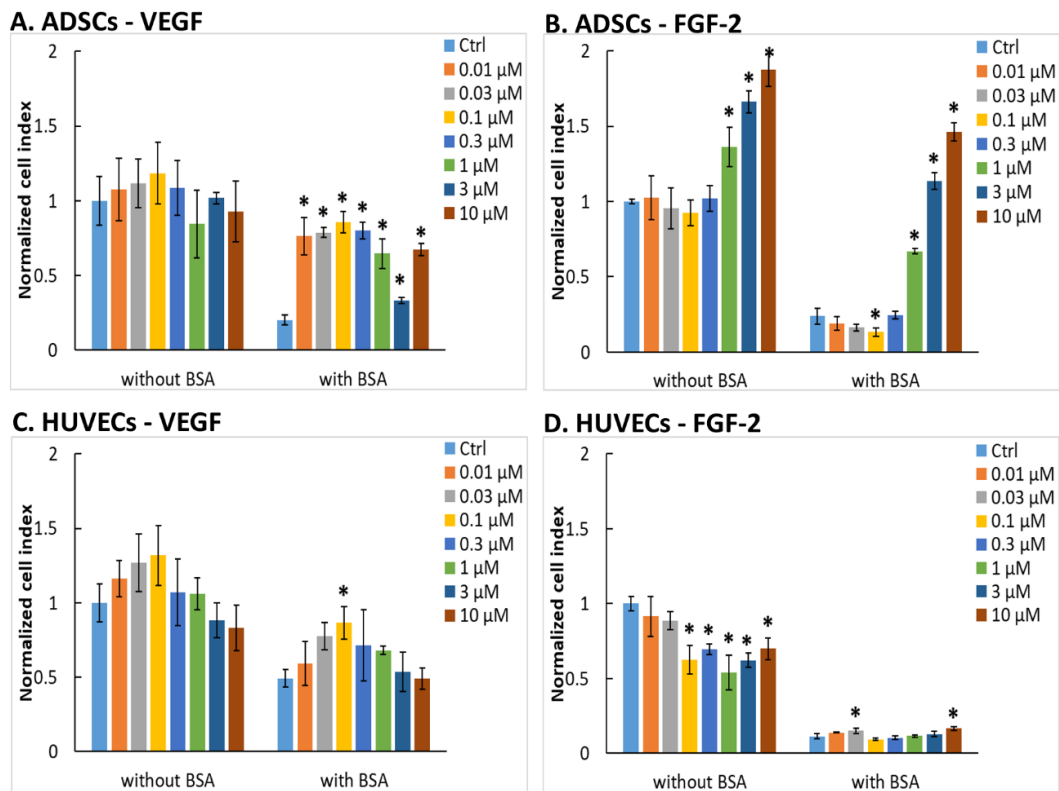
V dalším z pokusů byla sledována mitogenní aktivita růstových faktorů VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M adsorbovaných na polystyrenový kultivační substrát (rozmezí použitých koncentrací roztoku pro adsorpci bylo 0,01-10 μM, což v případě VEGF-A<sub>165</sub> odpovídá koncentracím 0,172-172 μg/ml a v případě FGF-2M koncentracím 0,192-192 μg/ml). V jamkách adsorbovaných VEGF-A<sub>165</sub> byla pozorována jeho mitogenní aktivita pouze u HUVEC, kde je opět patrná koncentrační závislost (obr. 6C). Na ADSC měl VEGF-A<sub>165</sub> pozitivní efekt pouze u metabolické aktivity v koncentracích 1 a 10 μM, počet buněk ovlivněn nebyl (obr. 6A). Z výsledků je patrný výrazně podpurný efekt FGF-2M při proliferaci ADSC a HUVEC, nejvýznamnější nárůst počtu buněk byl dosažen při nejvyšší adsorbované koncentraci 10 μM FGF-2M (obr. 6B, D). Tyto výsledky jasně ukazují možnost využití adsorpce či imobilizace růstových faktorů na povrch biomateriálu pro zlepšení jeho biokompatibility a podpory růstu buněk. Z výsledků rovněž vyplývá, že fyzikální adsorpce na povrch biomateriálu nezpůsobuje ztrátu mitogenní aktivity růstových faktorů.



Obrázek 6. Mitogenní aktivita VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M adsorbovaných na kultivačním substrátu. ADSC (A, B) nebo HUVEC (C, D) byly nasazeny do jamek 96-jamkových polystyrenových destiček pro tkáňové kultury předem adsorbovaných VEGF-A<sub>165</sub> (A, C) nebo FGF-2M (B, D) v koncentracích od 0,01 do 10 μM. Čisté jamky bez růstových faktorů sloužily jako kontrola (Ctrl). ADSC byly pěstovány v DMEM s 10 % FS. HUVEC byly pěstovány v EGM2-weak (tj. bez růstových faktorů EGF, VEGF, IGF-1 a FGF-2). Počet buněk byl stanoven 1. den (day 1), 3. den (day 3) a 7. den (day 7) po nasazení. Průměr ± SD ze 3 jamek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákova metoda,  $p \leq 0,05$ . Vzorokly byly statisticky porovnávány v uvedený den po nasazení. \* Statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolním vzorkem (Ctrl) (převzato ze studie Sedlár *et al.*, 2021a).

Pro optimální růst buněčných kultur na biomateriálu je potřeba zajistit také vhodné podmínky pro adhezi buněk. V dalším experimentu byla proto pozorována schopnost adsorbovaných růstových faktorů ovlivnit iniciální adhezi ADSC a HUVEC. Byla porovnána jednak schopnost růstových faktorů ovlivnit adhezi buněk na substrát (v našem případě zastoupen polyethylentereftalátem na dně jamek desky pro zařízení xCELLigence), a rovněž samotná interakce molekul adsorbovaného růstového faktoru s buňkami. V tomto pokuse byly jamky potažené růstovými faktory inkubovány následně s 1% BSA v PBS, čímž došlo k zablokování nespecifických vazebných míst pro adhezi buněk na povrch substrátu. BSA je antiadhezivní protein, který neobsahuje specifické aminokyselinové signální sekvence pro navázání na integriny. Integrinové receptory buněk tedy měly možnost interagovat pouze s adsorbovanými růstovými faktory.

Adsorbovaný VEGF-A<sub>165</sub> podpořil adhezi obou buněčných typů pouze mírně, k největšímu nárůstu adheze buněk došlo při koncentraci 0,1 μM VEGF-A<sub>165</sub> (obr. 7A, C). U vyšších koncentrací VEGF-A<sub>165</sub> došlo k poklesu míry adheze buněk. Adsorbovaný FGF-2M podpořil adhezi ADSC na samotný plastový materiál a rovněž byla jasně detekovatelná interakce FGF-2M s ADSCs na jamkách blokovaných BSA. Nejvyšší míra adheze byla dosažena při použití 10 μM FGF-2M (obr. 7B). Naopak při nasazení HUVEC na jamky s FGF-2M došlo k poklesu adheze buněk na materiál. Při blokaci povrchu jamky pomocí BSA navíc HUVEC neprojevovaly žádnou adhezní interakci s tímto růstovým faktorem (obr. 7D). Výsledky ukazují, že VEGF-A<sub>165</sub> má v určitých koncentracích na iniciální adhezi obou buněčných typů pouze nepatrný, mírně pozitivní vliv. Zajímavým výsledkem je skutečnost, že FGF-2M výrazně podporuje adhezi ADSC, naopak na HUVEC působí antiadhezivně.



Obrázek 7. Iničiální adheze ADSC (A, B) a HUVEC (C, D) 4 h po nasazení do jamek senzoričké desky v systému xCELLigence, předem adsorbovaných VEGF- $A_{165}$  (A, C) nebo FGF-2M (B, D) v koncentracích od 0,01 do 10  $\mu\text{M}$ . Jamky byly buď ponechány neblokované, tj. bez BSA (without BSA), nebo byly blokovány 0,5% BSA (with BSA). Hodnoty buněčného indexu byly normalizovány (normalized cell index) na kontrolní vzorek bez adsorbovaných růstových faktorů a BSA (Ctrl without BSA). Průměr  $\pm$  SD ze 3 jamek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákova metoda,  $p \leq 0,05$ . Statistické srovnání bylo provedeno mezi vzorky s BSA nebo bez BSA. \* - statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolním vzorkem (Ctrl) (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021a).

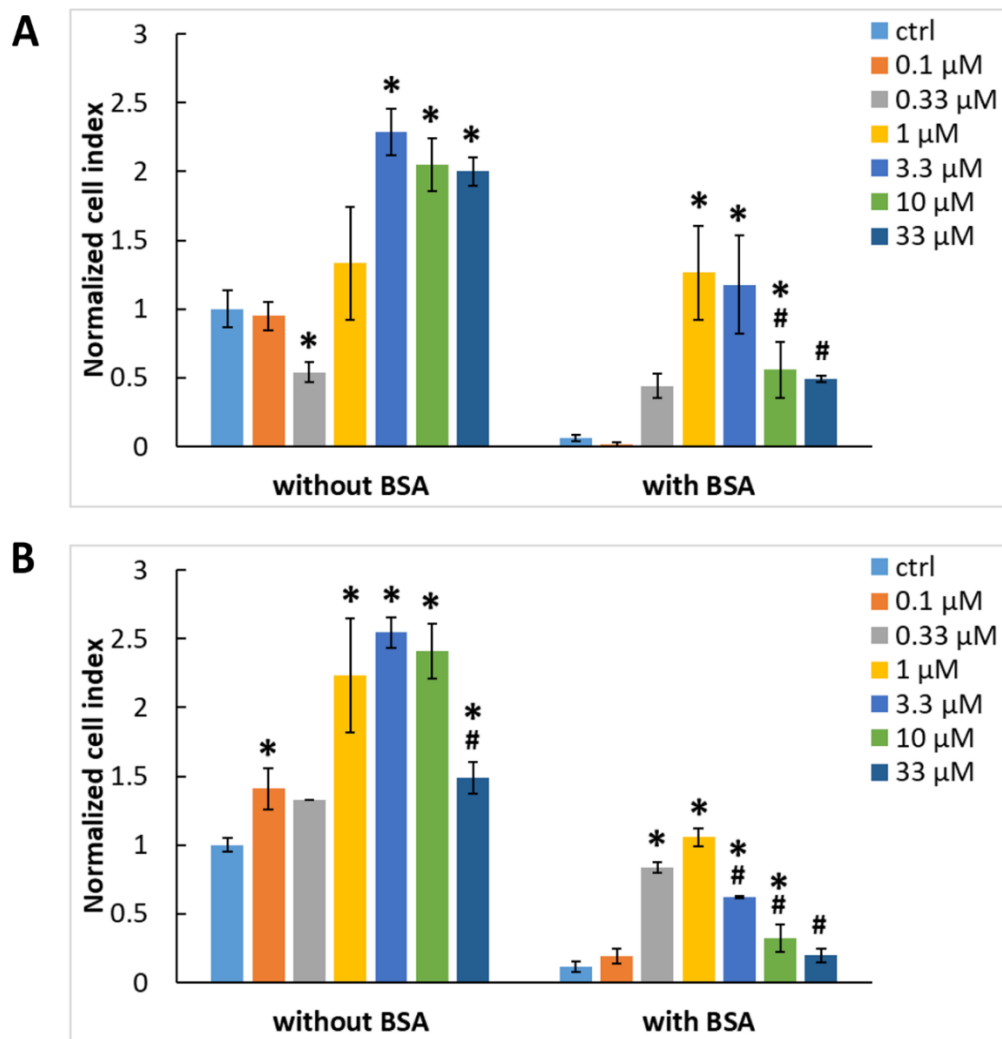
## 4.2 Adheze buněk na adsorbovaný galektin-3

**Sedlář A**, Trávníčková M, Bojarová P, Vlachová M, Slámová K, Křen V, Bačáková L. Interaction between galectin-3 and integrins mediates cell-matrix adhesion in endothelial cells and mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 May 13;22(10):5144. doi: 10.3390/ijms22105144.

Příspěvek studenta: Z celého autorského kolektivu jsem se nejvyšší měrou podílel na plánování a provedení všech buněčných experimentů, které zahrnovaly studium iniciální adheze buněčných kultur v přítomnosti galektinu-3, a rovněž na zpracování výsledků a sepsání publikace. Procentuální podíl studenta na publikaci: 60%.

Dalším cílem disertační práce bylo prozkoumání adhezních vlastností galektinu-3, což je protein vázající sacharidy, který je exprimován v určité míře všemi tkáněmi a buněčnými typy v lidském organismu. Galektin-3 by pro své adhezní vlastnosti mohl být využit také v tkáňovém inženýrství jako povrch biomateriálů pro cévní náhrady (Sciacchitano *et al.*, 2018).

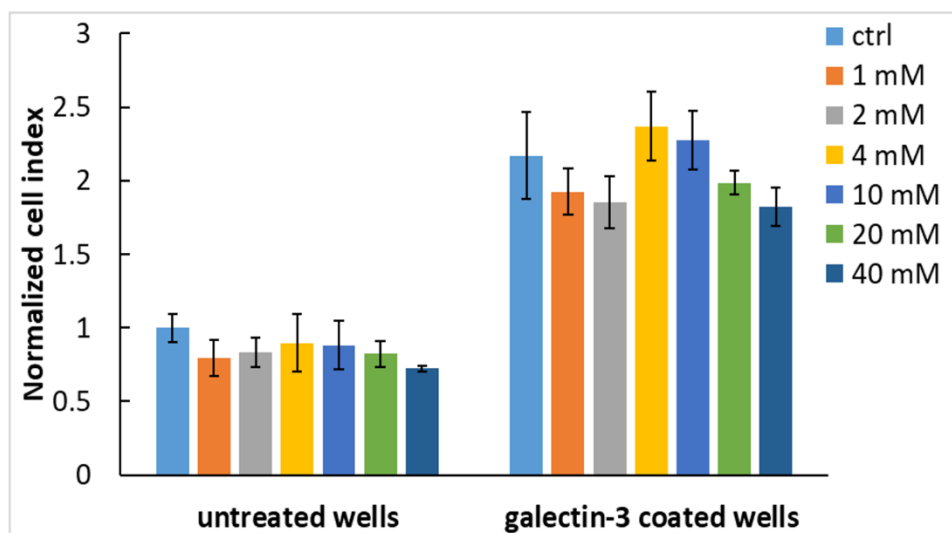
Byly zkoumány adhezivní vlastnosti galektinu-3 adsorbovaného na povrch kultivačního materiálu. Stupeň adheze ADSC a HUVEC byl detekován pomocí senzorkého přístroje xCELLigence. Výsledky ukazují, že adsorbovaný galektin-3 dokáže významně podpořit adhezi HUVEC i ADSC na kultivační materiál. Optimální koncentrace galektinu-3 pro nejvyšší míru adheze byla 3,3  $\mu\text{M}$  (obr. 8). V jamkách blokovaných BSA, kde bylo cílem zjistit, zda dochází ke specifické adhezní interakci buněk s molekulami galektinu-3, bylo dosaženo nejvyšší adheze při 1  $\mu\text{M}$  koncentraci galektinu-3. Při vyšších koncentracích adsorbovaného galektinu-3 již adheze buněk na povrch nebyla optimální a se zvyšující se koncentrací její míra klesala.



Obrázek 8. Iničiální adheze ADSC (A) a HUVEC (B) v jamkách senzorké desky v systému xCELLigence 1 h po nasazení. Jamky byly adsorbovány galektinem-3 v koncentracích od 0,1 do 33  $\mu\text{M}$  buď bez blokování (without BSA), nebo s blokováním pomocí 0,5 % BSA (with BSA). Hodnoty buněčného indexu byly normalizovány (normalized cell index) na kontrolní vzorek buněk bez adsorbovaného galektinu-3 a BSA (ctrl without BSA). Průměr  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákova metoda,  $p \leq 0,05$ . Vzorky byly statisticky porovnány buď v rámci skupiny bez BSA, nebo v rámci skupiny s BSA. \* - statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolním vzorkem bez adsorbovaného galektinu-3 (ctrl). # - statisticky významný rozdíl ve srovnání se vzorkem vykazujícím nejvyšší průměrnou hodnotu buněčného indexu (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021b).

V následujícím experimentu bylo cílem objasnit mechanismus adheze buněk na adsorbovaný galektin-3. Galektin-3 je protein vázající sacharidy, se specifickou afinitou k  $\beta$ -galaktosidům, které jsou součástí glykoproteinů na povrchu buněk. Tato vlastnost je zprostředkována CRD doménou proteinu (Saraboji *et al.*, 2012). Adhezní interakce by tedy teoreticky mohla být umožněna vazbou sacharidových ligandů v glykoproteinech na povrchu buněk s adsorbovaným galektinem-3. Pro potvrzení nebo vyloučení této možnosti byly jamky s adsorbovaným galektinem-3 preinkubovány se sacharidovým ligandem LacdiNAc, který

vykazuje vysokou afinitu k CRD doméně tohoto proteinu (Šimonová *et al.*, 2014). Poté byly jamky osazeny buněčnou suspenzí. Výsledky ukazují, že ani při použití nejvyšší koncentrace LacdiNAc (40 mM) nedošlo k zablokování adheze buněk na kultivační povrch (obr. 9). Z tohoto je možné soudit, že adheze na adsorbovaný galektin-3 zřejmě neprobíhá pomocí interakce glykosylovaných proteinů na cytoplazmatické membráně buněk s CRD doménou adsorbovaného galektinu-3.

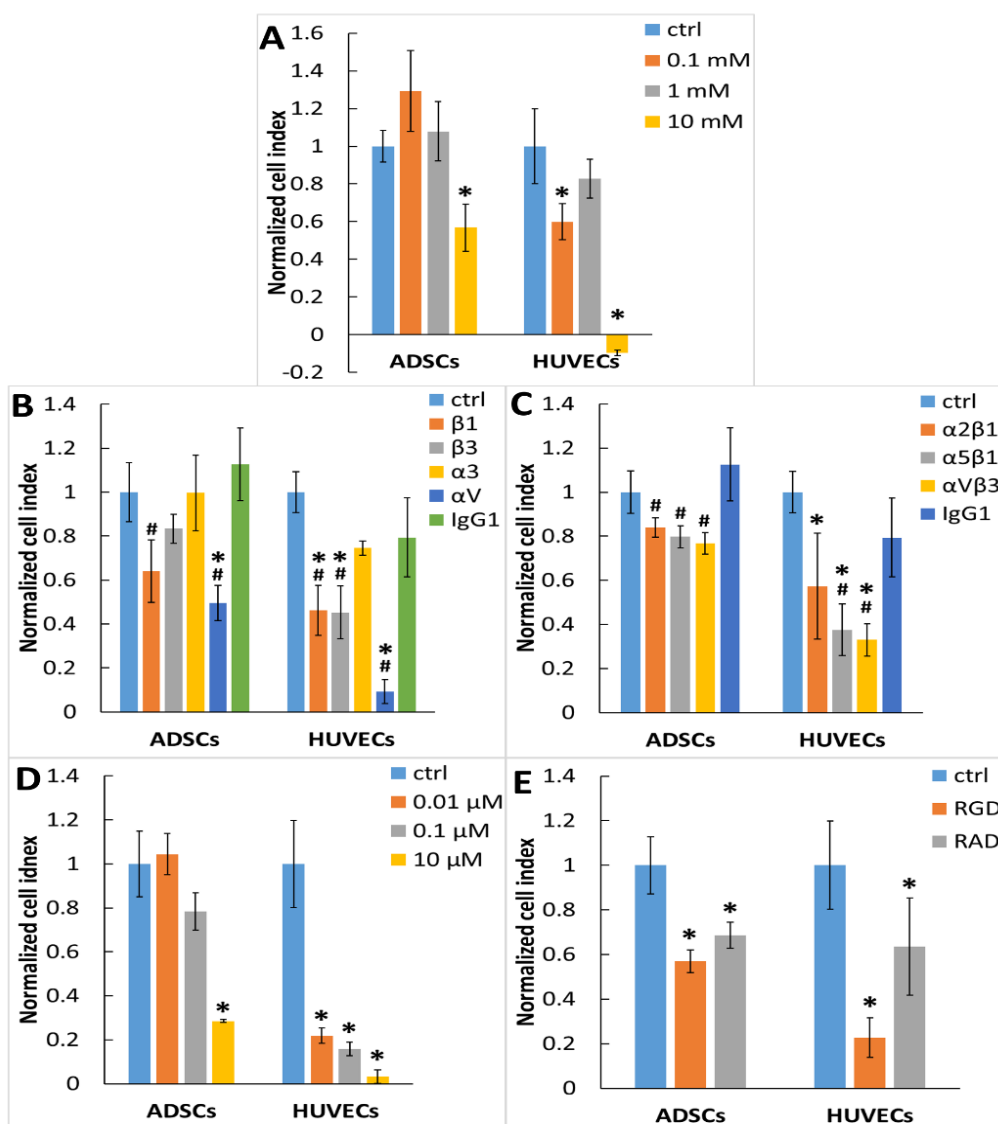


Obrázek 9. Vliv LacdiNAc na počáteční adhezi ADSC 1 hodinu po nasazení do neošetřených jamek (untreated wells) nebo jamek adsorbovaných s 1  $\mu$ M galektinem-3 a blokováných BSA (galectin-3 coated wells). Před nasazením buněk byly obě skupiny jamek preinkubovány s LacdiNAc v koncentracích od 1 do 40 mM. Jamky bez LacdiNAc sloužily jako kontrolní vzorky (ctrl). Hodnoty buněčného indexu byly normalizovány (normalized cell index) na vzorek bez adsorpce galektinu-3 a bez LacdiNAc v médiu (ctrl untreated wells). Průměr  $\pm$  SD ze 3 jamek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákův test,  $p \leq 0,05$ . Vzorky buněk byly statisticky porovnávány buď v rámci skupiny neošetřených jamek, nebo v rámci skupiny jamek s adsorbovaným galektinem-3. Nebyl detekován žádný statisticky významný rozdíl (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021b).

Adheze buněk na biomateriál nebo protein extracelulární matrix je zprostředkována především integrinovými receptory na povrchu buněk (Hynes, 2002). V dalším experimentu byly tedy použity blokační protilátky proti nejběžnějším integrinovým monomerům nebo heterodimerům. Integriny hrají významnou roli při adhezi buněk na adsorbovaný galektin-3, protože aplikace EDTA (chelátor  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a inhibitor integrinových receptorů) do média vedla k významnému potlačení adheze buněk (obr. 10A). Nejprve byly použity protilátky pro blokaci integrinových monomerů  $\alpha 3$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 3$ . Adheze ADSC byla blokována především protilátkami proti integrinům  $\beta 1$  a  $\alpha V$ , mírně také protilátkou proti integrinu  $\beta 3$ . U HUVEC došlo k významné blokaci adheze při blokaci integrinu  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 3$  (obr. 10B). Použití protilátky cílící na integrin  $\alpha 3$  nemělo vliv na adhezi obou sledovaných buněčných typů.

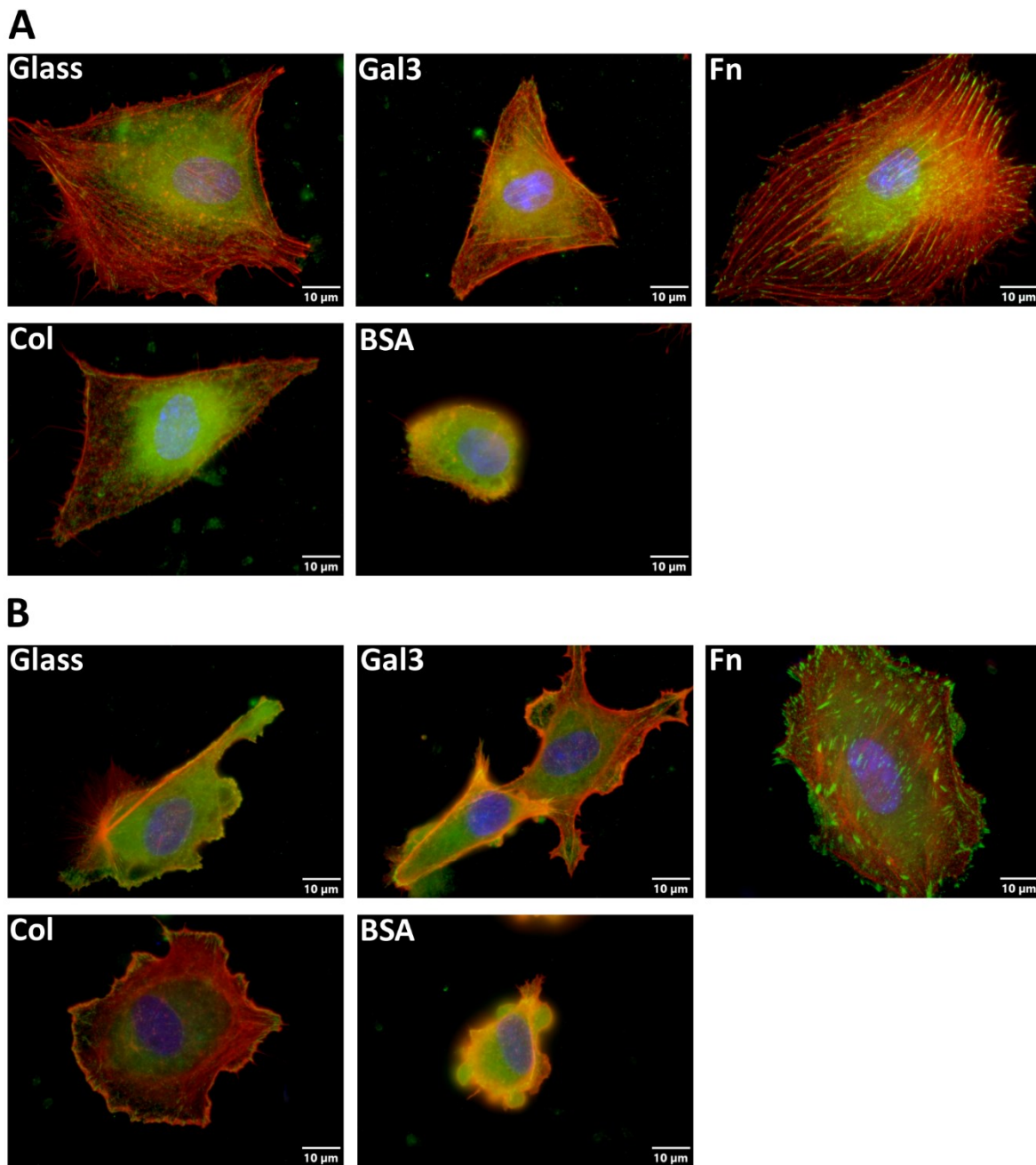
U ADSC je neschopnost blokace adheze na galektin-3 pomocí anti- $\alpha 3$  protilátky dána pravděpodobně jeho nízkou expresí na povrchu cytoplazmatické membrány (Sedlář *et al.*, 2021b). U HUVEC je mírná blokace adheze pozorována až 4 hodiny po nasazení (Sedlář *et al.*, 2021b). V dalším kroku byly použity protilátky blokující integrinové heterodimery. Záměrně byly vybrány nejběžnější heterodimery zastupující 3 skupiny integrinů podle jejich specifity k adheznímu substrátu. Byl testován integrin  $\alpha 2\beta 1$  (vazba především na kolagen),  $\alpha 5\beta 1$  (vazba na fibronektin) a  $\alpha V\beta 3$  (vazba na vitronektin). Všechny tři protilátky měly mírně negativní vliv na adhezi obou buněčných typů. Nejintenzivnější negativní efekt mělo použití protilátek  $\alpha 5\beta 1$  a  $\alpha V\beta 3$  (obr. 10C). Z výsledků je možno soudit, že ani jeden z těchto třech integrinových heterodimerů se nepodílí na adhezi ke galektinu-3 jako jediný a adheze na galektin-3 je tedy zprostředkována synergickým efektem všech tří zmíněných receptorů. Z předchozího výsledku bylo jasné, že adheze je zprostředkována hlavně integriny  $\alpha V$  a  $\beta 1$  (obr. 10B). Z tohoto důvodu byl testován také syntetický inhibitor  $\alpha V\beta 1$  integrinu (komerční protilátka proti tomuto heterodimeru neexistuje). Tento inhibitor potlačil adhezi až ve vysoké 10  $\mu\text{M}$  koncentraci, kdy již může být účinek nespecifický a může docházet i k blokaci adheze například na kolagen I (obr. 10D). V posledním z pokusů objasňujících mechanismus adheze buněk na Gal-3 byla prokázána rovněž role RGD-vázajících integrinů (obr. 10E).



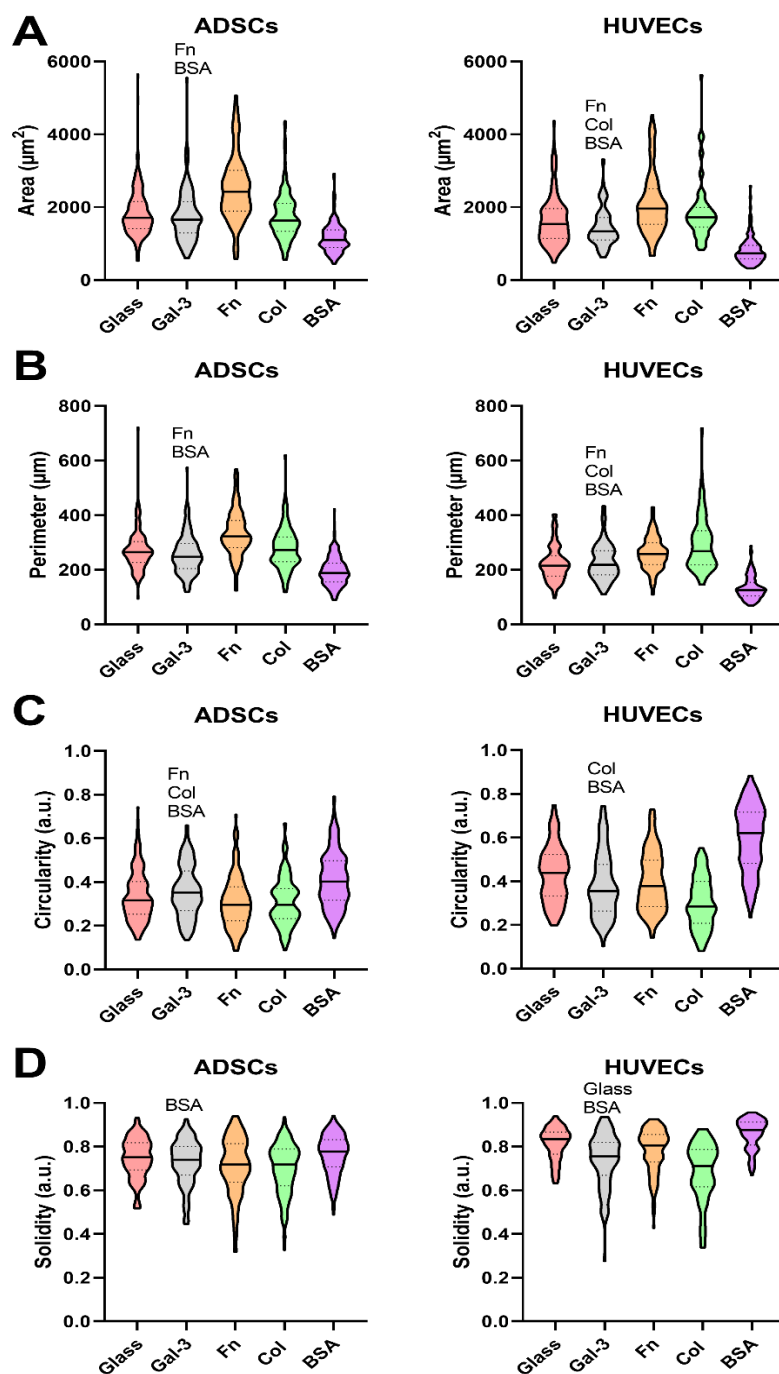


Obrázek 10. Úloha integrinů v iniciální adhezi ADSC a HUVEC ke galektinu-3 adsorbovanému na kultivační substrát (1 h po nasazení). (A) Buňky byly nasazeny v médiu obsahující EDTA v koncentracích od 0,1 do 10 mM. (B) Buňky byly nasazeny v médiu obsahující protilátky proti podjednotkám integrinů  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$  a  $\alpha V$ . Protilátka proti integrinové podjednotce  $\alpha V$  byla použita v ředění 1:25 a ostatní protilátky byly použity v koncentraci 20  $\mu g/ml$ . Jako izotypová kontrola byl použit nespecifický myši IgG1. (C) Buňky byly nasazeny v médiu obsahující protilátky proti integrinovým receptorům  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  nebo  $\alpha V\beta 3$ . Jako izotypová kontrola byl použit nespecifický myši IgG1. Protilátky byly použity v koncentraci 20  $\mu g/ml$ . (D) Buňky byly nasazeny v médiu obsahující inhibitor integrinu  $\alpha V\beta 1$  v koncentracích od 0,01 do 10  $\mu M$ . (E) Buňky byly nasazeny v médiu obsahující peptid GRGDSP. Jako negativní kontrola byl použit peptid GRADSP. Oba peptidy byly použity v koncentraci 200  $\mu M$ . Před nasazením buněk byly jamky adsorbovány 1  $\mu M$  galektinem-3 a blokovány 0,5 % BSA. Hodnoty buněčného indexu byly normalizovány (normalized cell index) na kontrolní vzorek v čistém médiu bez dalších látek (ctrl). Průměr  $\pm$  SD ze 3 jamek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA, Holm-Šidákův test,  $p \leq 0,05$ . Vzorky byly statisticky porovnány v rámci skupiny uvedeného typu buněk. \* - statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolními buňkami (ctrl). # - statisticky významný rozdíl ve srovnání s buňkami inkubovanými s izotypovou kontrolou (IgG1) (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021b).

Dále byla pozorována morfologie buněk adherovaných na adsorbovaný galektin-3 v porovnání s proteiny extracelulární matrix, které se běžně používají pro zlepšení adheze buněk. Buňky byly obarveny na F-aktinový cytoskelet a fokální adheze (protilátkou proti vinkulinu) a pozorovány v mikroskopu (obr. 11). Zhodnoceny byly také morfologické charakteristiky buněk (plocha, obvod, kruhovitost a pevnost, tj. tuhost a deformabilita buňky), což umožňuje lépe popsat buněčnou adhezi a morfologii na daném povrchu (obr. 12). U ADSC byla pozorována podobná morfologie adherovaných buněk na galektin-3 jako v případě skleněného povrchu jamek kultivační destičky bez adsorpce proteinů (obr. 11A). Na fibronektinu měly buňky větší plochu rozprostření (obr. 12A) a jasně viditelné fokální adheze s dobře rozvinutým cytoskeletem (obr. 11A – Fn). Na kolagenu I byla adheze ADSC mírně nižší než u fibronektinu, ale srovnatelná s buňkami na galektinu-3 (obr. 11A). Buňky v jamkách blokových BSA byly nedostatečně rozprostřeny a v porovnání s ostatními vzorky zaujímaly nejmenší plochu a měly nejkratší obvod (obr. 12A,B). HUVEC na skle jsou ve srovnání s ADSC více kruhovitější (obr. 12C). Na povrchu pokrytém galektinem-3 tvořily HUVEC shluky buněk s hvězdicovitou morfologií, které se na povrchu jen omezeně rozprostíraly a měly slabě vyvinutý aktinový cytoskelet lokalizovaný především ve výběžcích buněk (obr. 11B – Gal3). HUVEC na galektinu-3 měly rovněž menší plochu rozprostření, kratší obvod (obr. 12A,B) a nízkou hodnotu kruhovitosti a pevnosti (obr. 12C,D). Nízká hodnota pevnosti je spojena s přítomností velkého počtu buněčných výběžků (srovnej obr. 11B – Gal3 a 12D). Vlivem adsorbovaného fibronektinu HUVEC vytvářely zřetelně formované fokální adheze s obsahem vinkulinu a výrazný aktinový cytoskelet (obr. 11B – Fn). Na kolagenu I byl cytoskelet endotelových buněk o něco hůře zformován ve srovnání s fibronektinem. Obdobně jako u ADSC i HUVEC adherovaly velmi špatně na jamky pokryté pouze antiadhezivním BSA a nebyly schopny zformovat fokální adheze ani F-aktinový cytoskelet (obr. 11B). Z výsledků vyplývá, že galektin-3 je z hlediska svých adhezních vlastností pro buňky ADSC a HUVEC srovnatelně účinný s kolagenem I, ale nepodporuje adhezi tak významně jako fibronektin. Rovněž je patrné, že ADSC na galektin-3 adherují lépe než HUVEC.



Obrázek 11. Fluorescenční barvení ADSC (A) a HUVEC (B) adherovaných na skleněný povrch jamek 96jamkové destičky potažený proteiny 4 h po nasazení. Skleněný povrch byl ponechán bez adsorpce proteinů (glass), potažen Gal-3 (Gal3; 1  $\mu$ M), fibronektinem (Fn, 20  $\mu$ g/ml) nebo kolagenem I (Col, 50  $\mu$ g/ml) přes noc při 4 °C a blokován 0,5 % BSA (1 h; 37 °C) nebo inkubován pouze s 0,5 % BSA (1 h; 37 °C). Buňky byly obarveny protilátkou proti vinkulinu (zeleně) a faloidinem konjugovaným s TRITC pro vizualizaci F-aktinového cytoskeletu (červeně). Buněčná jádra byla obarvena Hoechstem 33258. Mikroskop Olympus IX 71, digitální kamera DP 71, objektiv 100 $\times$ , měřítko 10  $\mu$ m (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021b).



Obrázek 12. Morfologické charakteristiky ADSC a HUVEC adherovaných na skleněný povrch potažený proteiny 4 h po nasazení. Skleněný povrch byl ponechán bez adsorpce proteinů (glass), potažen galektinem-3 (Gal3; 1  $\mu$ M), fibronektinem (Fn, 20  $\mu$ g/ml) nebo kolagenem I (Col, 50  $\mu$ g/ml) přes noc při 4  $^{\circ}$ C a blokován 0,5 % BSA (1 h; 37  $^{\circ}$ C) nebo inkubován pouze s 0,5 % BSA (1 h; 37  $^{\circ}$ C). Buňky byly obarveny faloidinem konjugovaným s TRITC pro vizualizaci F-aktinového cytoskeletu. Plocha buněk (area, A), obvod (perimeter, B), kruhovitost (circularity, C) a pevnost (solidity, D) byly vyhodnoceny z mikrofotografií pomocí softwaru ImageJ. Údaje jsou prezentovány jako houslové grafy s plnou čarou představující průměr a s tečkovanými čarami představující první a třetí kvartil. Jednofaktorová (One-way) ANOVA on Ranks, Dunnova metoda,  $p \leq 0,05$ . Zobrazeny jsou pouze statisticky významné rozdíly mezi galektinem-3 a ostatními vzorky (převzato ze studie Sedlář *et al.*, 2021b).

### 4.3 Adheze, růst a diferenciaci buněk na polymerních foliích z PLLA pro konstrukci cévních náhrad

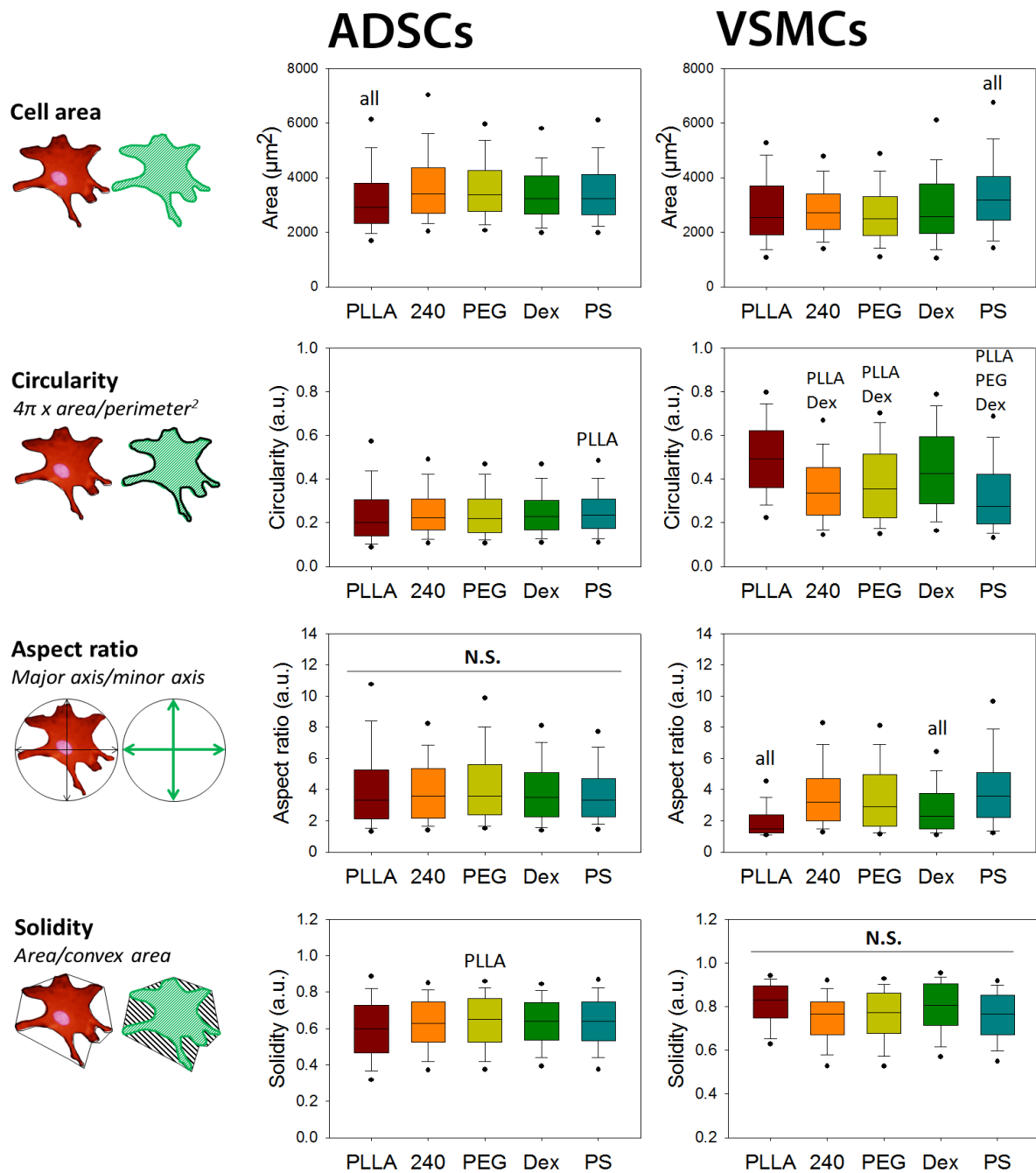
Travnickova M, Kasalkova NS, Sedlar A, Molitor M, Musilkova J, Slepicka P, Svorcik V, Bacakova L. Differentiation of adipose tissue-derived stem cells towards vascular smooth muscle cells on modified poly(L-lactide) foils. *Biomed. Mater.* 2021 Feb 18;16(2):025016. doi: 10.1088/1748-605X/abaf97.

Příspěvek studenta: Podílel jsem se na části buněčných experimentů, provedl jsem PCR analýzu vzorků při diferenciaci ADSC a VSMC a analýzu morfologických parametrů při adhezi buněk na materiál. V publikaci jsem sepsal popis těchto metodik a výsledků. Procentuální podíl studenta na publikaci: 20%.

Dalším cílem disertační práce bylo studovat chování ADSC na vybraných syntetických biomateriálech, které by mohly být potenciálně využity v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství pro konstrukci cévních náhrad. Pro tyto účely byly použity polymerní materiály na bázi polylaktidu (PLLA) s různou povrchovou úpravou. Povrchová úprava spočívala ve vystavení materiálu argonovému plasmatu po dobu 240 sekund (materiál značený jako 240), plazmování a navázání polyethylenglykolu na povrch materiálu (PEG), plazmování a navázání dextranu (Dex). Jako kontrola byl použit neošetřený PLLA (PLLA) a polystyren pro buněčné kultury (PS). Materiály byly osazeny ADSC a pro srovnání také VSMC z prasečí aorty. Na materiálech byla posouzena adheze, růst a diferenciaci těchto buněčných typů. Diferenciaci buněk byla indukována DMEM s přidavkem 2% FS, 2,5 ng/ml TGFβ1, 2,5 ng/ml BMP4 a 150 μM kyseliny askorbové.

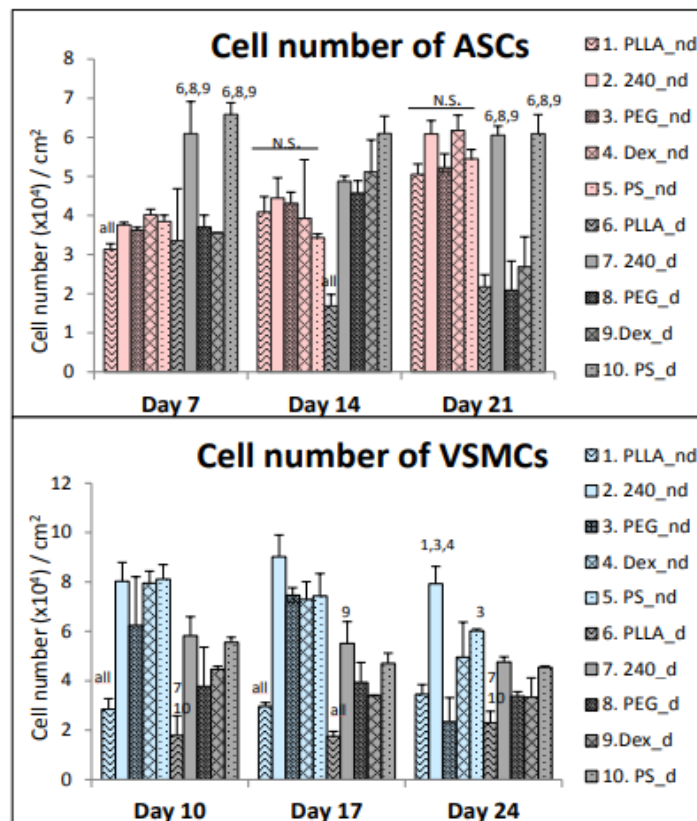
Adheze a rozprostření buněk byly stanoveny 24 hodin po jejich nasazení na studované materiály. U ADSC byla nejmenší plocha rozprostření buněk pozorována na čistém PLLA materiálu, u ostatních vzorků byly hodnoty srovnatelné (Obr. 13). Ostatní parametry (kruhovitost, poměr stran, pevnost) byly na všech vzorcích téměř stejné. V případě VSMC z prasečí aorty byla plocha rozprostření v rámci vzorků rovněž srovnatelná (mimo kontrolní polystyren, kde byly hodnoty vyšší). U parametru kruhovitosti byly pozorovány významnější rozdíly, buňky na neošetřeném PLLA a PLLA pokrytém dextranem byly více kulaté (obr. 13). Obdobný jev byl pozorován také u poměru stran, kde buňky na neošetřeném PLLA a pokrytém dextranem nabývaly nižších hodnot poměru stran ve srovnání s ostatními vzorky. Výsledky ze stanovení morfologických parametrů ukazují, že čistý PLLA a PLLA s pokryvem dextranem jsou méně vhodné pro adhezi buněk, zejména VSMC. Na iniciální adhezi ADSC nemá

typ povrchové modifikace studovaného polylaktidového materiálu výrazný vliv, ovšem na neošetřeném PLLA vykazují ADSC sníženou adhezi.



Obrázek 13. Morfologické parametry, tj. plocha buňky (cell area), kruhovitost (circularity), poměr stran (aspect ratio) a pevnost (solidity) ADSC a VSMC na neošetřeném PLLA (PLLA), plazmovaném PLLA (240), plazmovaném PLLA pokrytém PEG (PEG), plazmovaném PLLA pokrytém dextranem (Dex) a kontrolním polystyrenu pro tkáňové kultury (PS) 1. den po nasazení. Data jsou prezentována jako krabicové grafy s mediánovou čarou, vnější okraje představují 1. a 3. kvartil, zakončení úseček znázorňují maximální a minimální hodnoty, body představují 5. a 95. percentil. Jednofaktorová (One-way) ANOVA on Ranks, Dunnova metoda,  $p \leq 0,05$ . All - statisticky významné rozdíly ve srovnání se všemi ostatními skupinami vzorků (převzato ze studie Travnickova *et al.*, 2021).

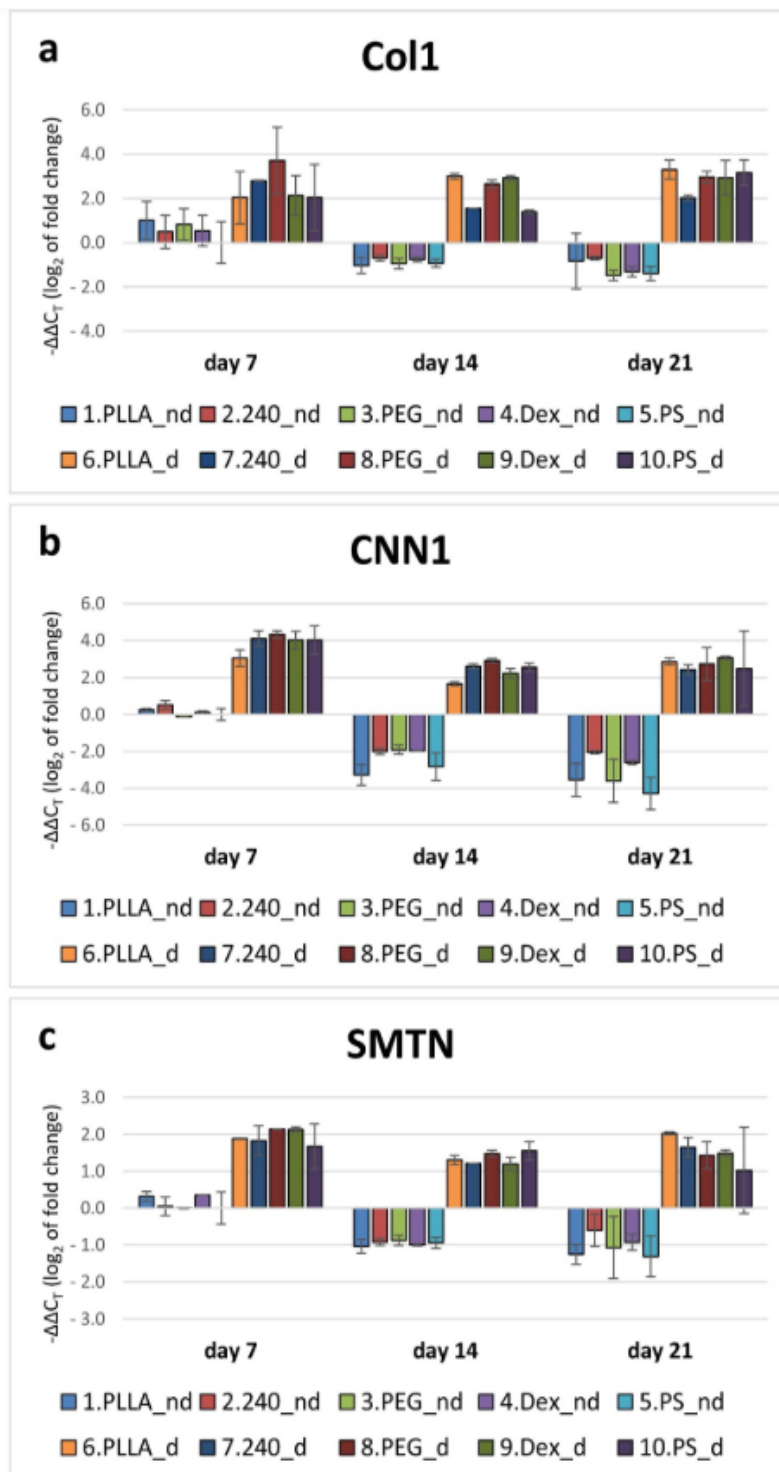
Dále byl na materiálech hodnocen růst buněk v diferenciačním i nediferenciačním (tj. standardním růstovém) kultivačním médiu. V případě ADSC nebyl u růstového média pozorován žádný rozdíl mezi vzorky, pouze u čistého PLLA sedmý den kultivace byl patrný nižší počet buněk ve srovnání se zbylými vzorky (obr. 14). U diferenciačního média (indukující diferenciaci směrem k hladkému svalu) byl pozorován nejvýraznější růst buněk na PLLA modifikovaném plazmatem (240) již 7. den kultivace. Při kultivaci VSMC byl více patrný negativní vliv čistého PLLA na růst buněk. Naopak na plasmovaném materiálu byly počty VSMC nejvyšší. Je rovněž patrné, že modifikace pomocí dextransu nebo PEG zvyšuje intenzitu růstu buněk na PLLA, ale ne do takové míry jako plasmování povrchu. Z výsledků vyplývá, že plasmovaný PLLA (240) je nejvhodnější pro růst buněk. Dále je vidět, že nediferenciační růstové médium do jisté míry maskuje rozdíly v růstu buněk na materiálech.



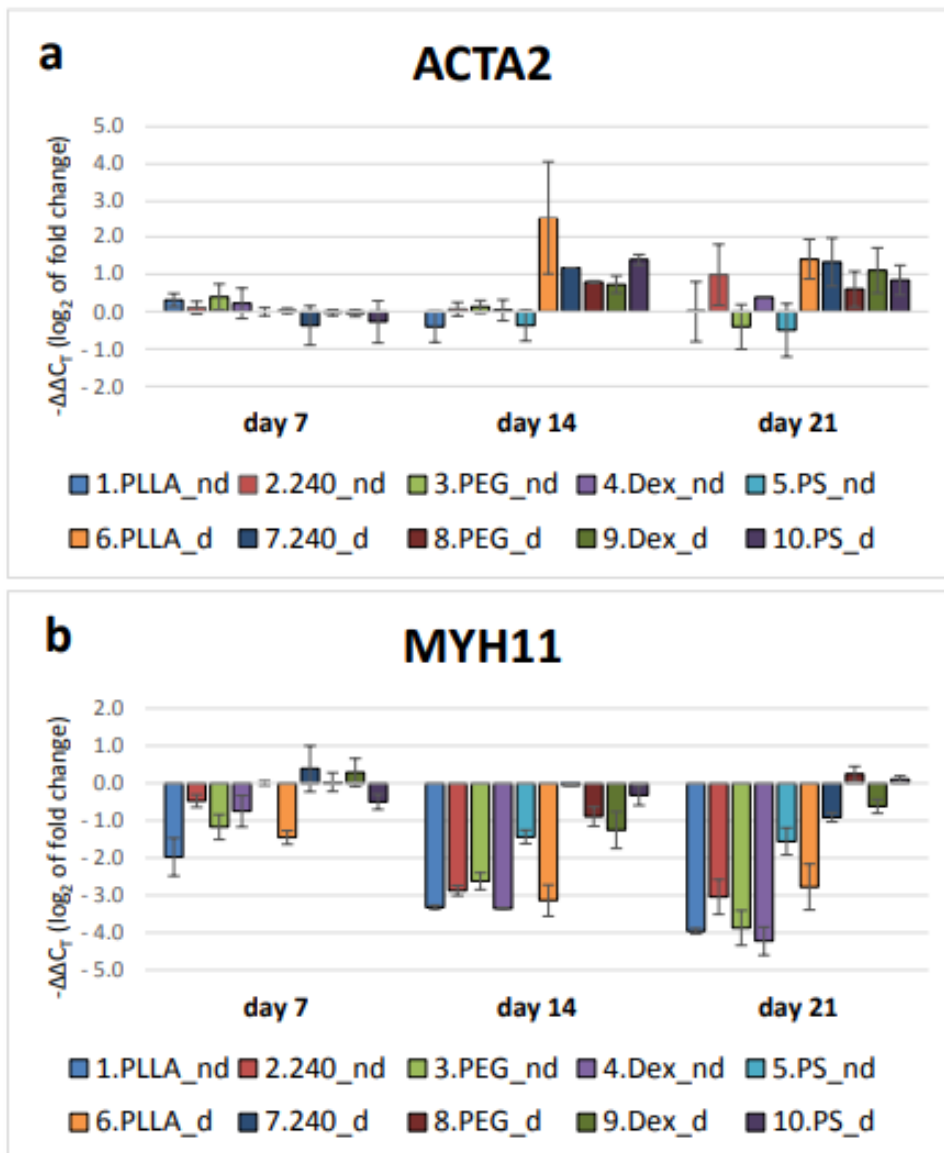
Obrázek 14. Počty buněk ve dnech 7, 14 a 21 (pro ADSC) a 10., 17. a 24. den (pro VSMC). Buňky byly kultivovány na neošetřeném PLLA (PLLA), PLLA ošetřeném plazmatem (240), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém PEG (PEG), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém dextransem (Dex) a kontrolním polystyrenu pro tkáňové kultury (PS). Od 4. dne (v kultuře ADSC) nebo od 7. dne (v kultuře VSMC) byly buňky kultivovány buď v nediferenciačním médiu (nd), nebo v diferenciačním médiu (d). Průměr + SD, jednofaktorová (One-way) ANOVA, Student-Newman-Keulsův test. Statistické srovnání mezi vzorků bylo provedeno na buňkách kultivovaných ve stejném typu média a ve stejný den kultivace. Statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny nad sloupci čísly testovaných skupin vzorků. All: statisticky významné rozdíly ve srovnání se všemi ostatními skupinami vzorků (převzato ze studie Travnickova *et al.*, 2021).

ADSC byly po několika dnech kultivace v růstovém médiu stimulovány k diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám výměnou média za diferenciacní s obsahem faktorů TGF $\beta$ 1 a BMP4. V daných časových intervalech byla detekována exprese hladkosvalových markerů pomocí PCR a vzorky byly rovněž imunofluorescenčně obarveny pro vizualizaci markerů na proteinové úrovni. Přídavkem diferenciacního média byla u všech vzorků stimulována exprese kolagenu I, kalponinu, smoothelinu a  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu (obr. 15 a 16) ve všech sledovaných časových intervalech. Je zajímavé, že exprese těžkého řetězce hladkosvalového myosinu 11 není diferenciacním médiem ve sledovaných intervalech stimulována a naopak je patrný pokles exprese u některých vzorků v intervalech 14. a 21. dní (obr. 16). U vzorků v nediferenciacním růstovém médiu je s rostoucím časem pozorován pokles exprese všech sledovaných markerů. V porovnání jednotlivých vzorků materiálů není patrný rozdíl v expresi genů, což značí, že žádný ze studovaných materiálů sice výrazně nestimuluje diferenciaci buněk směrem k hladkosvalovým buňkám, ale zároveň diferenciaci indukovanou biochemickými signály nijak neinhibuje. Je rovněž zajímavé, že u již diferencovaných VSMCs z prasečí aorty diferenciacní médium expresi hladkosvalových markerů nijak nepodporuje, ale spíše expresi na úrovni mRNA snižuje (Travnickova *et al.*, 2021). Imunofluorescenční barvení ADSC (obr. 17) jasně ukazuje pozitivní vliv média na diferenciaci buněk, kdy u diferencovaných vzorků je vidět přítomnost velkého množství kalponinu, který je u nediferencovaných vzorků vidět pouze slabě. Rovněž je patrná i zvýšená exprese  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu. Z mikrofotografií je také zřejmé, že diferenciacní markery jsou na materiálech exprimovány ve stejné míře. U vzorků v diferenciacním médiu byla pozorována také exprese kolagenu I na proteinové úrovni, ale až v pozdějším časovém intervalu 14. dní kultivace (tj. 10. dní diferenciacce). U malého množství buněk byl rovněž patrný těžký řetězec hladkosvalového myosinu (obr. 18).

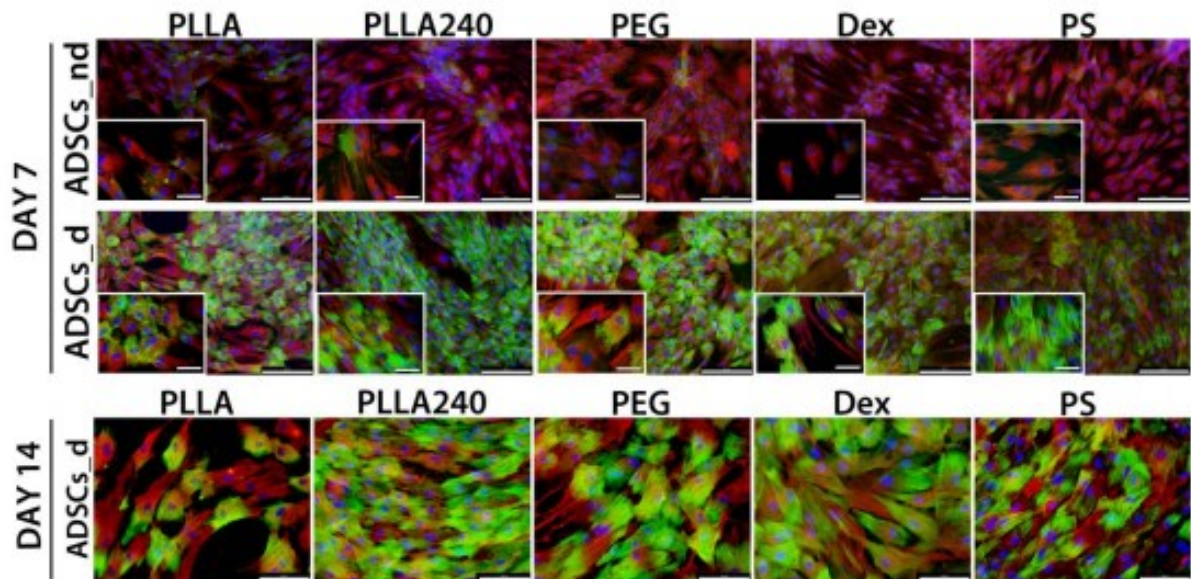




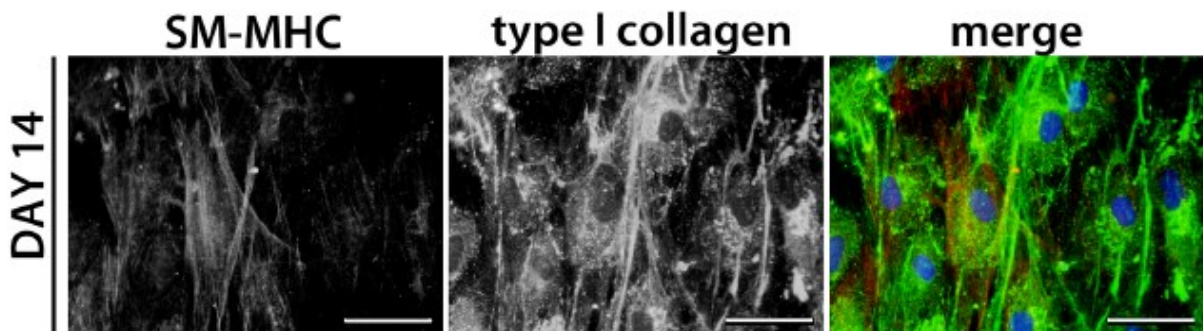
Obrázek 15. Expres genů kolagenu I (COL1) (a), kalponinu (CNN1) (b) a smoothelinu (SMTN) (c) v ADSC ve dnech 7, 14 a 21. Buňky byly kultivovány na neošetřeném PLLA (PLLA), PLLA ošetřeném plazmatem (240), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém PEG (PEG), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém dextransm (Dex) a kontrolním polystyrenu pro tkáňové kultury (PS). Zpočátku byly buňky kultivovány pouze v růstovém nediferenčním médiu. Od 4. dne byly buňky kultivovány buď v nediferenčním médiu (nd), nebo v diferenčním médiu (d). Hodnoty jsou normalizovány na PS\_nd v den 7. Průměr ± SD, ANOVA on Ranks. Statistické srovnání mezi vzorky bylo provedeno na buňkách kultivovaných ve stejném typu média a ve stejný den kultivace. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl (převzato ze studie Travnickova *et al.*, 2021).



Obrázek 16. Expresse genů  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu (ACTA2) (a) a těžkého řetězce hladkosvalového myosinu (MYH11) (b) v ADSC ve dnech 7, 14 a 21. Buňky byly kultivovány na neošetřeném PLLA (PLLA), PLLA ošetřeném plazmatem (240), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém PEG (PEG), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém dextransen (Dex) a kontrolním polystyrenu pro tkáňové kultury (PS). Zpočátku byly buňky kultivovány pouze v nediferenciačním médiu. Od 4. dne byly buňky kultivovány buď v nediferenciačním médiu (nd), nebo v diferenciačním médiu (d). Hodnoty jsou normalizovány na PS\_nd v den 7. Průměr  $\pm$  SD, ANOVA on Ranks. Statistické srovnání mezi vzorky bylo provedeno na buňkách kultivovaných ve stejném typu média a stejný den kultivace. Nebyl detekován žádný statisticky významný rozdíl (převzato ze studie Travnickova *et al.*, 2021).



Obrázek 17. Imunofluorescenční barvení  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu (červeně) a kalponinu (zeleně) v ADSC 7. den kultivace (tj. 3 dny diferenciacce) a 14. den (tj. 10 dní diferenciacce). Buňky byly kultivovány na neošetřeném PLLA (PLLA), PLLA ošetřeném plazmatem (240), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém PEG (PEG), PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém dextranem (Dex) a kontrolním polystyrenu pro tkáňové kultury (PS). ADSC\_nd byly kultivovány v nediferenciačním médiu. ADSCs\_d byly kultivovány v diferenciacčním médiu. Buněčná jádra byla obarvena Hoechstem 33258. Mikroskop Olympus IX71, digitální kamera DP71. Objektiv 10 $\times$ , měřítko 200  $\mu$ m (den 7) a objektiv 20 $\times$ , měřítko 100  $\mu$ m (den 14). U vzorků ze 7. dne kultivace také mikrofotografie při zvětšení objektivu 40 $\times$ , měřítko 50  $\mu$ m (převzato ze studie Travnickova *et al.*, 2021).



Obrázek 18. Imunofluorescenční barvení těžkého řetězce hladkosvalového myosinu (SM-MHC, červeně) a kolagenu I (type I collagen, zeleně) v ADSC 14. den kultivace (tj. 10. den v diferenciacčním médiu) na PLLA ošetřeném plazmatem a pokrytém dextranem. Buněčná jádra byla barvena Hoechstem 33258 (modře). Merge – překryv jednotlivých barevných kanálů. Mikroskop Olympus IX71, digitální kamera DP71. Objektiv 40 $\times$ , měřítko 50  $\mu$ m (převzato ze studie Travnickova *et al.*, 2021).

#### 4.4 Růst buněk na 3D biomateriálech pro konstrukci vaskularizovaných náhrad či modelů měkkých a tvrdých tkání

Příspěvek studenta: V rámci testování materiálů s *in vitro* buněčnými kulturami jsem se podílel zejména na pořízení, zpracování a vyhodnocení fotografií z konfokálního mikroskopu. Výsledky jsou součástí připravovaného manuskriptu Musílková *et al.*, 2024.

Posledním cílem disertační práce bylo vyhodnotit chování ADSC na 3D biomateriálech vhodných pro konstrukci buď vaskularizovaných náhrad měkkých a tvrdých tkání pro plastickou a rekonstrukční chirurgii, nebo modelů těchto tkání *in vitro* pro nejrůznější fyziologické, patofyziologické, vývojové, farmakologické a další studie.

Byly testovány materiály na bázi degradovatelných polyesterů s pěnovitou strukturou, připravené na spolupracujícím pracovišti, tj. na Výzkumném ústavu potravinářském, Praha (VÚPP, Ing. Miloš Beran). Materiály byly připraveny lyofilizací ze směsi polylaktidu a polykaprolaktonu (PLLA/PCL) ve váhovém poměru 3:5 s přídavkem 0, 10, 25 a 50 hmotnostních procent (hm.%) sodné soli hydropropylcelulózy, tj. Klucelu E, který byl použit jednak pro zlepšení mechanických vlastností materiálu, a jednak i pro zvýšení průniku buněk do nitra porézního nosiče. Uvedený derivát celulózy je totiž (na rozdíl od nativní celulózy) ve vodě rozpustný, a tak po jeho odmytí ve vodném prostředí se průměr pórů v nosiči zvětšuje a stoupá průchodnost pórů pro buňky. Žádoucí velikost i množství pórů lze dále nastavit i velikostí a množstvím krystalů kuchyňské soli či sacharózy (Pamula *et al.*, 2008, 2009; Bačáková *et al.*, 2022). Kombinací krystalického porogenu a Klucelu E tak lze vytvořit póry s hierarchicky organizovanou makro- a mikrostrukturou, čili od milimetrů či stovek mikrometrů až k desítkám mikrometrů, napodobující organizaci přirozených tkání. Jako porogen byla použita v tomto případě kuchyňská sůl s velikostí krystalů 0,25 – 0,5 mm.

Popsané materiály měly představovat nosiče pro konstrukci náhrad měkkých tkání, jako je například tuková tkáň pro rekonstrukci prsu, například po jeho částečném či úplném odstranění kvůli nádorovému onemocnění. Po mineralizaci nosičů uvedeného typu, například v simulované tělní tekutině (simulated body fluid, SBF), však lze uvažovat i o jejich využití k rekonstrukci kostní tkáně v nezářezových aplikacích, například pro výplně defektů v kostní tkáni (Bačáková *et al.*, 2022). V neposlední řadě mohou uvedené konstrukty sloužit i jako modely tkání *in vitro*, které by snížily potřebu laboratorních zvířat v moderní vědě 21. století, a to podle principu 3R (Refinement, Reduction, Replacement, tj. zmírňování, snižování a nahrazování). Užití laboratorních zvířat nejen naráží na etické problémy, ale je i finančně

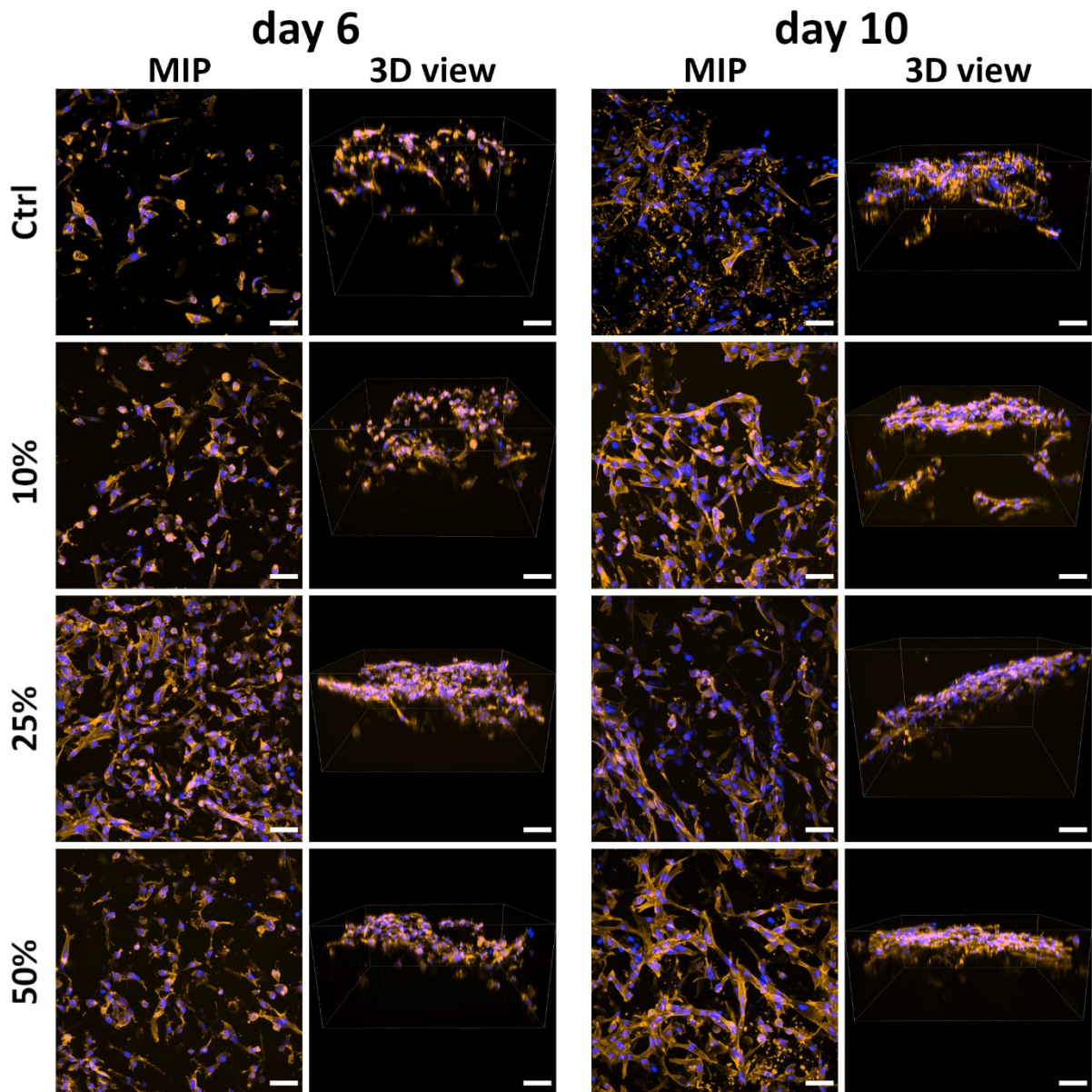
nákladné a často jím ani není možno žádoucím způsobem napodobit situaci v organismu člověka. Dalšími perspektivními alternativními přístupy, nahrazujícími klasické užití laboratorních zvířat, jsou přístupy *ex vivo* (např. využití izolovaných zvířecích tkání a orgánů, které jsou odpadem z jatek, či lidských tkání z operací), *in ovo / ex ovo* (testování biokompatibility, angiogenicity a dalších parametrů biomateriálů na kuřecích či křepelčích zárodcích v raných stádiích vývoje), *in silico* (počítačové simulace biologických dějů, matematické modely receptorů a dalších biomolekul) nebo *in chemico* (simulace biologických procesů v chemickém prostředí).

Dalším materiálem použitým v našich studiích byl polylaktid s mřížovitou strukturou, tištěný na 3D tiskárně na spolupracujícím pracovišti VÚPP (Ing. M. Beran). Bylo připraveno 10 typů materiálů s různými vnitřními architekturami. Průměr jednotlivých vláken se pohyboval mezi 200 - 240  $\mu\text{m}$ . Materiály měly různou geometrii uspořádání vláken v mřížce, kdy základním strukturálním prvkem byl šestiúhelník podobný včelí plástvi (honeycomb-like pattern) nebo přímočaré řazení vláken (rectilinear pattern). Byly připraveny vzorky jednak nemineralizované, a jednak vzorky mineralizované v simulované tělní tekutině a/nebo adsorbovány roztokem kolagenu I, který je přirozenou složkou extracelulární matrix a může tudíž zlepšit kolonizaci konstruktů buňkami. Tyto materiály měly sloužit jako náhrady či modely tvrdých tkání (zejména kostí).

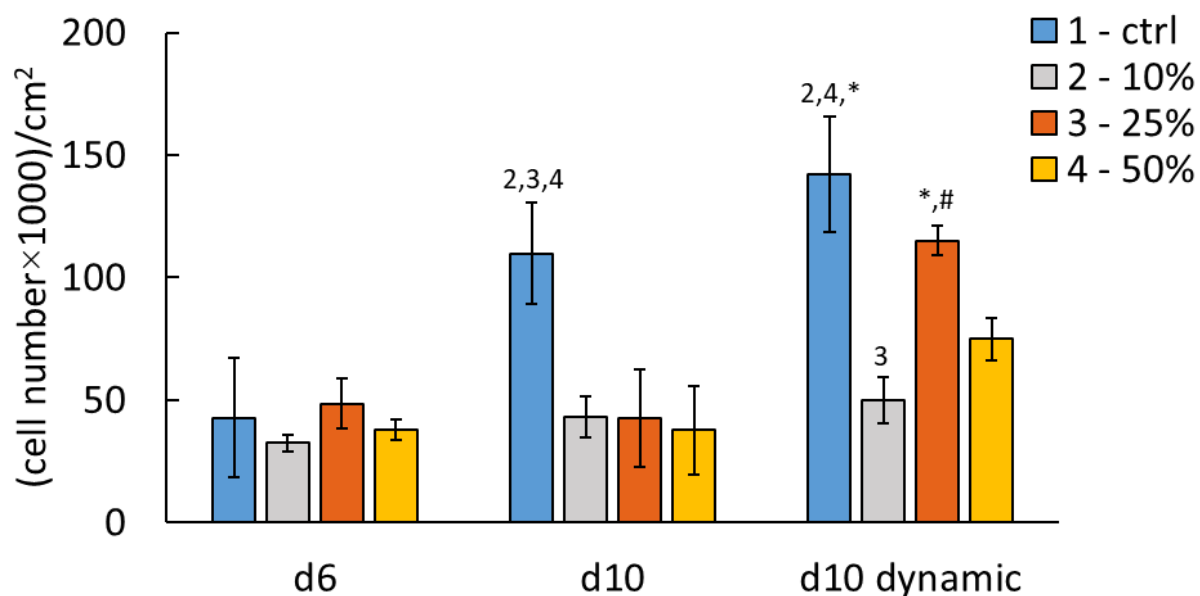
Porézní materiály s pěnovitou strukturou byly umístěny v 48jamkových deskách s přibližnou plochou dna 1  $\text{cm}^2$  a byly osazeny ADSC v množství 110 tisíc buněk na vzorek v 1 ml DMEM s 10% FS a 10 ng/ml FGF-2. Buňky na vzorcích byly kultivovány ve statickém kultivačním systému (tj. ve standardních podmínkách v termostatu při 37 °C, v atmosféře vzduchu s 5%  $\text{CO}_2$  a při vlhkosti 90%). Šestý den kultivace byla část buněk umístěna do dynamického kultivačního systému (STUART Mini Orbital Shaker SSM1) při frekvenci 60 otáček za minutu. V tomto systému se plošina s destičkami obsahujícími vzorky pohybuje po kruhové dráze s nastavitelnou délkou oběžné dráhy (tj. amplitudou) i počtem otáček za minutu (frekvencí). Tento systém tak umožňuje smykové namáhání materiálu s buňkami proudící kapalinou, a rovněž průtok kultivačního média póry v materiálu. V našich minulých studiích tento systém například zvyšoval metabolickou aktivitu (tj. aktivitu mitochondriálních enzymů měřenou testy typu XTT) v buňkách linií odvozených z lidské kostní tkáně, jako jsou buňky MG-63 (Novotna *et al.* 2014) či U-2 OS (Kopova *et al.*, 2016) i osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních buněk kostní dřevě (Brož *et al.*, 2022). Uvedené mechanické namáhání rovněž alespoň do jisté míry simuluje podmínky v cévách. Je známo, že smykové

napětí podporuje fenotypickou maturaci endotelových buněk, diferenciaci ADSC směrem k tomuto buněčnému typu i tvorbu kapilárních struktur (pro přehled viz Bačáková *et al.*, 2018).

Z výsledků je patrné, že nejlépe buňky proliferují na kontrolním materiálu (Ctrl) bez přídavku hydroxypropylcelulózy (obr. 19 – mikrofotografie a obr. 20 – počty jader). Mikrofotografie sice naznačují, že za 6 dnů po nasazení bylo v podmínkách statického kultivačního systému dosaženo nejvyššího osídlení buňkami na PLLA/PCL s přídavkem 25 hm.% Klucelu E (obr. 19). Ovšem jak vyplývá z kvantifikace počtu jader na mikrofotografiích z různých oblastí materiálu, tento rozdíl nebyl statisticky významný (obr. 20). Navíc v dalším období, konkrétně od 6. do 10. dne kultivace, buňky na vzorcích s přídavkem Klucelu E neproliferovaly, tj. jejich počet se statisticky významně neměnil, zatímco na kontrolním materiálu bez Klucelu E se počet buněk zhruba zdvojnásobil a statisticky významně tak přesáhl počet buněk na všech materiálech s Klucelem E (obr. 20).



Obrázek 19. ADSC kultivované na porézních materiálech z PLLA/PCL s přidavkem Klucelu E. Čistý PLLA/PCL (ctrl), PLLA/PCL s 10 hm.% Klucelu E (10%), s 25 hm.% Klucelu E (25%) a 50 hm.% Klucelu E (50%). Buňky byly kultivovány po dobu 6 (day 6) a 10 dní (day 10), poté fixovány 4% paraformaldehydem a obarveny faloidinem konjugovaným s TRITC (červeně) a DAPI (modře) pro vizualizaci F-aktinového cytoskeletu a buněčných jader. MIP – projekce maximální intenzity, pohled shora; 3D view – prostorové zobrazení, pohled z boku. Konfokální mikroskop Andor Dragonfly 503, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .



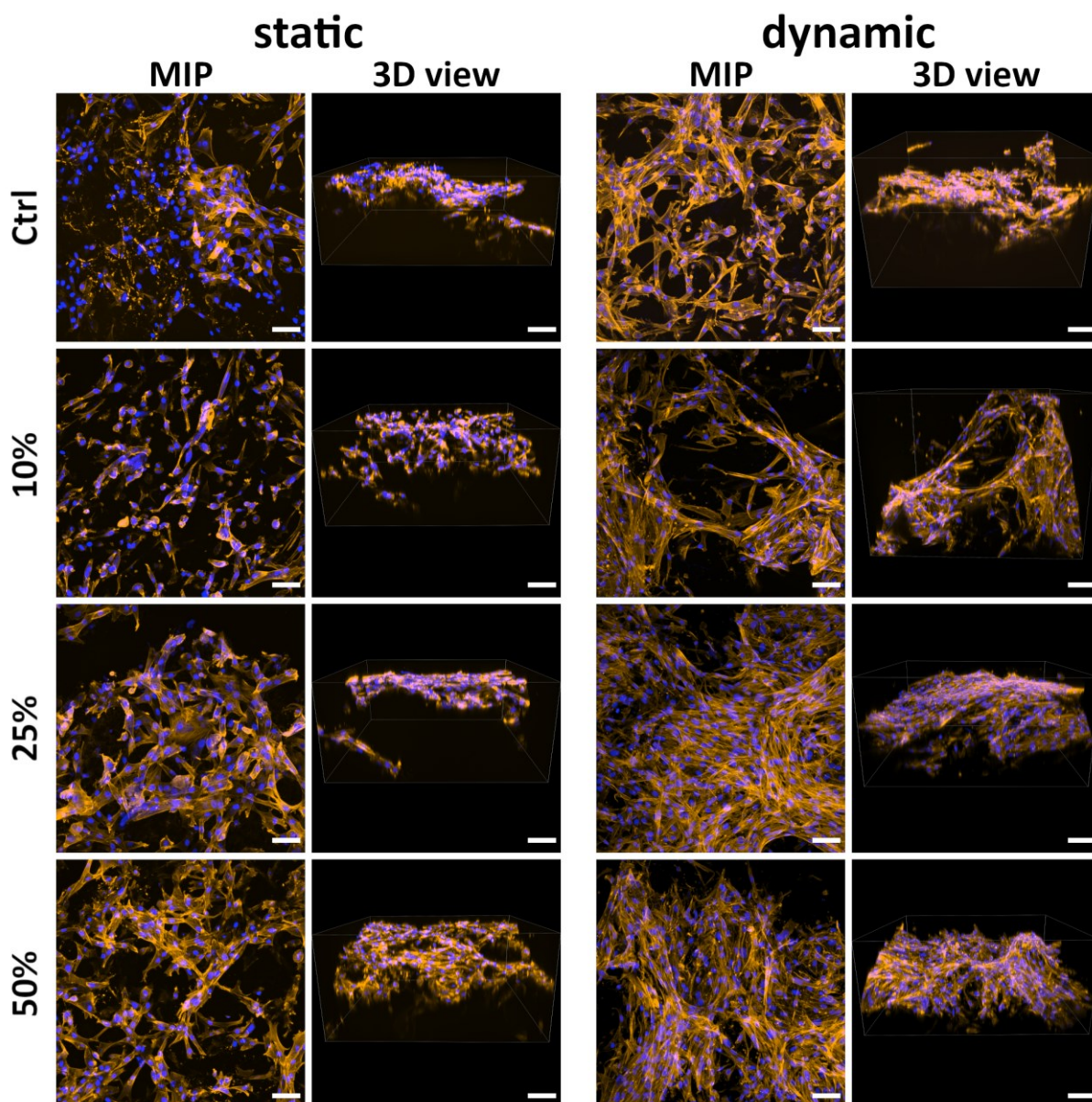
Obrázek 20. Počty ADSC na nanovláknenných materiálech PLLA/PCL s přidavkem Klucelu E. Buňky na materiálech byly kultivovány v časových intervalech 6. (d6) a 10. den (d10) kultivace. Část vzorků byla kultivována 6 dní ve statickém a poté 4 dny v dynamickém kultivačním systému (d10 dynamic). Fluorescenčně obarvená jádra byla snímána na konfokálním mikroskopu Andor Dragonfly 503. Z mikrofotografií bylo následně spočítáno množství buněk. Průměr  $\pm$  SEM z 5-6 mikrofotografií na vzorek. Jednofaktorová (One-way) ANOVA,  $p \leq 0.05$ . Statisticky významný rozdíl v rámci skupiny vzorků je označen nad sloupci číslem vzorku. \* - statisticky významný rozdíl s daným vzorkem ve dni 6. # - statisticky významný rozdíl s daným vzorkem ve dni 10.

Jak se na základě předchozích studií naší skupiny i jiných autorů dalo očekávat, kultivace buněk v dynamickém systému vedla ke zvýšenému počtu buněk na většině studovaných materiálů. Zajímavé však bylo, že toto zvýšení bylo patrné zejména na materiálech s obsahem 25 hm.% Klucelu E, kde se počet buněk ve srovnání hodnotou ve statickém systému více než zdvojnásobil (obr. 20). Naproti tomu rozdíl mezi dynamickou a statickou kultivací nebyl patrný u materiálu s 10% Klucelu E.

Na mikrofotografiích je možno vidět účinek dynamické kultivace na morfologii buněk (obr. 21). Z mikrofotografií je patrné, že ve statickém systému jsou buňky lépe rozprostřeny (tj. mají nápadněji vytvořený aktinový cytoskelet) na materiálech s obsahem Klucelu než na materiálu kontrolním. Rostou však především na povrchu materiálů, kde ani po 10 dnech kultivace nevytvářejí konfluentní vrstvu, a neprorůstají do materiálu hlouběji. Dynamická kultivace však usnadnila vytvoření souvislé vrstvy buněk na materiálech s obsahem 25 i 50 hm.% Klucelu E, i průnik buněk do nitra materiálu, třebaže ani tehdy nebyly buňky schopny osídlit celou tloušťku materiálu (pronikaly maximálně do hloubky cca 400  $\mu\text{m}$ ), a osídlení buňkami nebylo homogenní. Bylo to zřejmě způsobeno stále nedostatečnou velikostí pórů mezi vlákny, a to i po přidavku poměrně vysokého procenta Klucelu E, který zvyšuje porozitu



materiálu i velikost pórů. Vzorek s přidavkem pouhých 10 hm.% Klucelu E vytvářel hluboký reliéf povrchu, byl křehčí a při delší kultivaci buněk se rozpadal. Buňky při osídlování tohoto vzorku spíše jen sledovaly silně zvlněný povrch tohoto vzorku s hlubokým reliéfem, než aby prorůstaly do jeho hloubky (obr. 21).



Obrázek 21. Mikrofotografie ADSC kultivovaných na PLLA/PCL nanovláčkových materiálech s přidavkem Klucelu E. Čistý PLLA/PCL (Ctrl), PLLA/PCL s 10 hm.% Klucelu E (10%), s 25 hm.% Klucelu E (25%) a 50 hm.% Klucelu E (50%). Buňky byly kultivovány 10 dní ve statických podmínkách (static) nebo 6 dní ve statických a poté 4 dny v dynamických podmínkách (dynamic), fixovány 4% paraformaldehydem a obarveny faloidinem konjugovaných s TRITC (červeně) a DAPI (modře) pro vizualizaci F-aktinového cytoskeletu a buněčných jader. MIP – projekce maximální intenzity, pohled shora; 3D view – prostorové zobrazení, pohled z boku. Konfokální mikroskop Andor Dragonfly 503, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

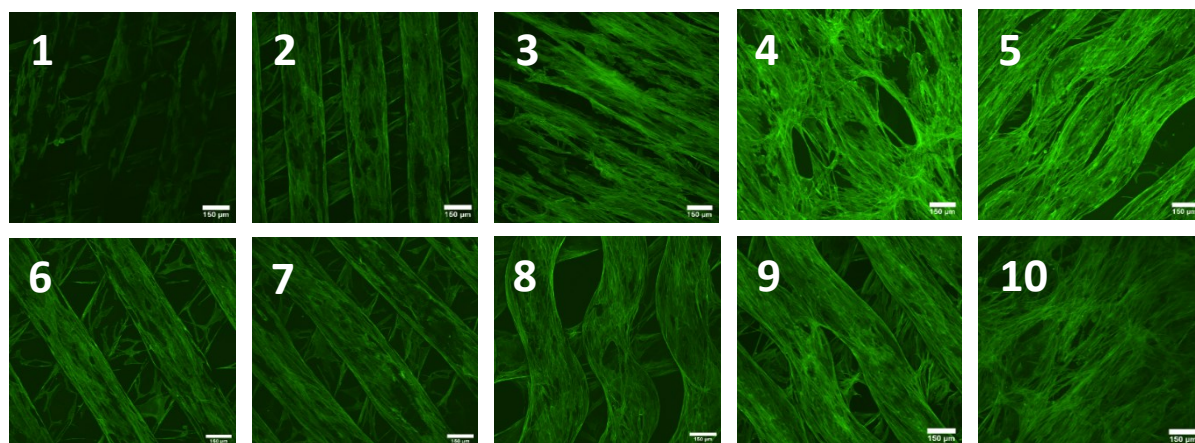
Z uvedených výsledků vyplývá, že buňky na materiálu z PLLA/PCL v kombinaci s hydroxypropylcelulózou prolifерují hůře než na čistém PLLA/PCL. Rovněž můžeme soudit, že buňky na žádném z materiálů neprorůstají dokonale do jeho hloubky, třebaže dynamická kultivace podporuje proliferaci buněk. Nicméně, z hlediska osídlení buněk v podmínkách dynamického systému se jako materiál nejperspektivnější pro vytváření náhrad a modelů měkkých tkání jeví PLLA/PCL s přídavkem 25 hm.% Klucelu E.

V dalším experimentu byl testován růst ADSC na materiálech připravených z polylaktidu metodou 3D tisku. Buňky byly kultivovány po dobu 10 dní ve statickém systému a růstovém médiu DMEM + 10% FS. Materiály se lišily typem řazení vláken v jednotlivých vrstvách - přímočaré, kdy jsou rovná vlákna řazena rovnoběžně vedle sebe (rectilinear pattern), nebo šestiúhelníkové, kdy jsou jednotlivá vlákna klikatá a v některých místech se navzájem dotýkají (honeycomb-like pattern), což vytváří strukturu podobnou včelí plástvi nebo šestiúhelníku (tab. 3). Další znakem materiálů byla odlišná šířka vláken (200 nebo 240  $\mu\text{m}$ ) a šířka mezery mezi vlákny (0 – 200  $\mu\text{m}$ ). Cílem experimentu bylo zjistit, která z vnitřních architektur materiálu je nejvhodnější pro proliferaci a pronikání buněk do materiálu. Z výsledků je patrné, že všechny námi použité varianty vzorků s různou geometrií vláken a délkou rozestupů jsou vhodné pro kultivaci ADSC (obr. 22). Cytoskelet buněk po 10 dnech zcela pokrýval jednotlivá vlákna materiálu. Délka rozestupů a tvar vláken měly vliv na pronikání buněk do hloubky materiálu. U materiálů 1, 2, 6, 7, 8 a 9 je vidět pronikání buněk i do dalších několika vrstev vláken v materiálu. U vzorků 3, 4, 5 a 10 buňky kvůli malým rozestupům jednotlivých vláken nepronikaly do hlubších vrstev materiálu a vytvořily na jeho povrchu souvislou (konfluentní) vrstvu buněk.

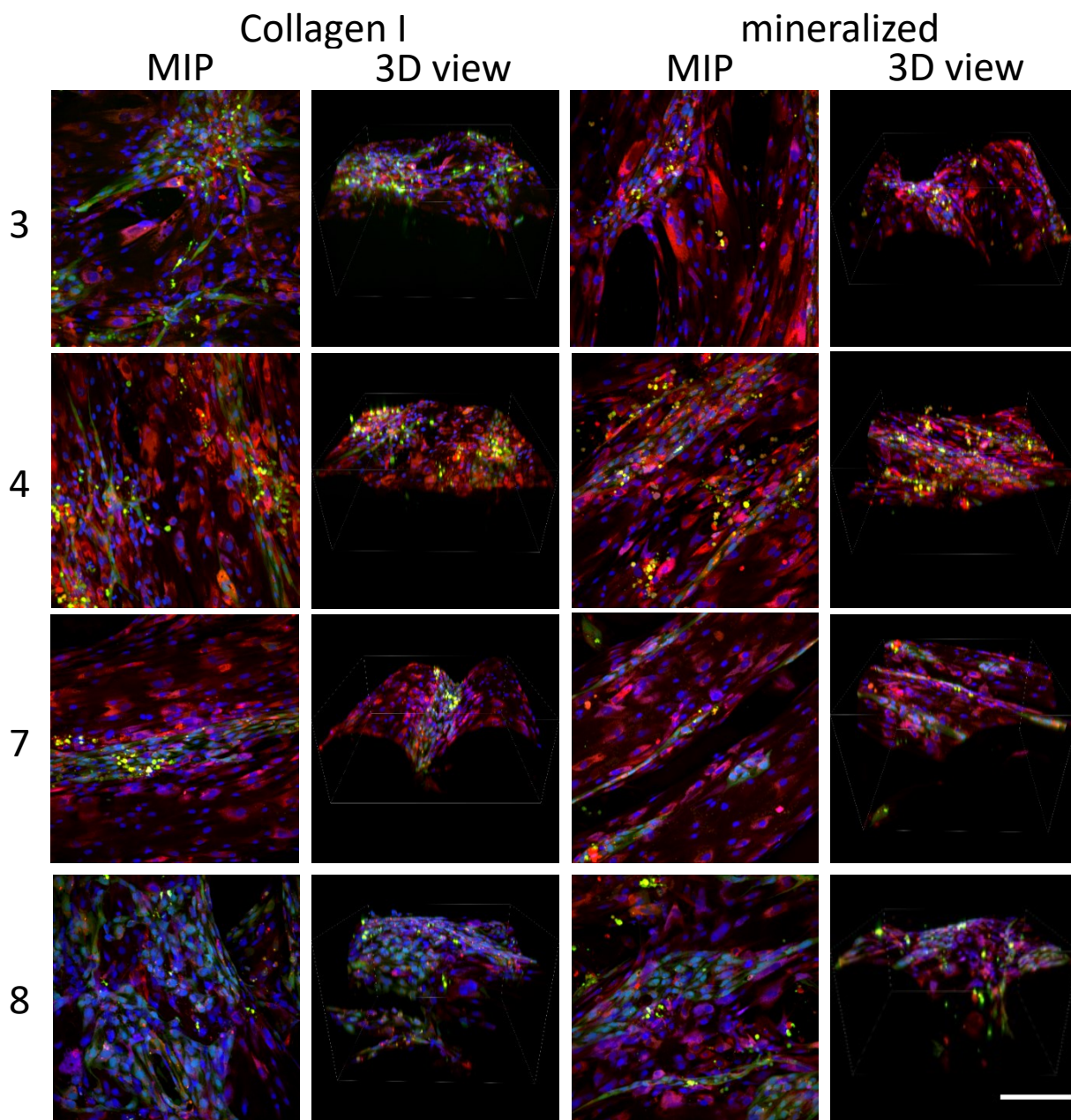
Dále byly vybrané materiály modifikovány inkubací v 1% roztoku kolagenu I pro zlepšení adhezních vlastností materiálu nebo v simulované tělné tekutině pro mineralizaci vzorků, která by měla vést k snadnější osteogenní diferenciaci buněk při tvorbě kostního tkáňově-inženýrského konstruktů. Materiály byly osazeny ADSC a HUVEC v poměru 1:1 a v celkovém množství 300 tisíc buněk na každý vzorek. Buňky na materiálech pak byly kultivovány po dobu 6 dnů v dynamickém systému STUART Mini Orbital Shaker SSM1. Na fotografiích (obr. 23) je možné pozorovat, že buňky prolifерují na mineralizovaných materiálech i na vzorcích potažených kolagenem I. Na materiálech je vidět převažující počet ADSC (červené označení). HUVEC (zelené označení) se na materiálech s větším rozestupem vláken (např. vzorky č. 7, 8) formují do vláknitých „prekapilárních struktur“. Tyto výsledky naznačují možné využití těchto 3D materiálů pro tvorbu vaskularizovaných tkáňově-inženýrských konstruktů.

Tabulka 3. Charakteristika PLLA materiálů vyrobených 3D tiskem. Připravené materiály měly řazení vláken v jednotlivých vrstvách materiálu přímočaré (rectilinear pattern, rovná vlákna řazená rovnoběžně vedle sebe, vz. 1,2,6,7) nebo šestiúhelníkové, podobné včelím plástvím (honeycomb-like pattern, klikatá vlákna, která se v některých místech dotýkají a vytváří šestiúhelníkové tvary, vz. 3-5 a 8-10). Šířka jednotlivých vláken byla 200  $\mu\text{m}$  (vz. 1-5) nebo 240  $\mu\text{m}$  (vz. 6-10). Dále se materiály lišily v šířce rozestupů mezi vlákny (0 až 200  $\mu\text{m}$ ).

Typ vzorku	Řazení vláken	Šířka vlákna ( $\mu\text{m}$ )	Šířka mezery mezi vlákny ( $\mu\text{m}$ )
1	přímočaré	200	200
2	přímočaré	200	160
3	šestiúhelník	200	80
4	šestiúhelník	200	40
5	šestiúhelník	200	0
6	přímočaré	240	200
7	přímočaré	240	160
8	šestiúhelník	240	80
9	šestiúhelník	240	40
10	šestiúhelník	240	0



Obrázek 22. ADSC kultivované na materiálech z PLLA připravených 3D tiskem. ADSC byly na materiálech kultivovány 10 dní v růstovém médiu. Jednotlivé vzorky se lišily tvarem a rozestupy mezi jednotlivými vlákny. Fluorescenčně obarvený cytoskelet buněk (faloidin-Atto 488) byl snímán na konfokálním mikroskopu Andor Dragonfly 503, měřítko 150  $\mu\text{m}$ . Fotografie byly pořízeny jako projekce maximální intenzity při pohledu shora.



Obrázek 23. Kokultura ADSC a HUVEC na vybraných PLLA materiálech připravených 3D tiskem. Část vzorků byla inkubována v 1% roztoku kolagenu I (Collagen I) a část vzorků inkubována v simulované tělní tekutině pro jejich mineralizaci (mineralized). Buňky byly kultivovány v dynamickém systému 6 dní. HUVEC byly před nasazením fluorescenčně označeny pomocí CellTracker Green CMFDA (zelená) a ADSC označeny pomocí CellTracker Red CMTX (červená). Jádra buněk byla obarvena pomocí DAPI (modrá). MIP – projekce maximální intenzity, pohled shora; 3D view – prostorové zobrazení, pohled z boku. Konfokální mikroskop Andor Dragonfly 503, měřítko 150  $\mu\text{m}$ .

## 5 Diskuse

V rámci disertační práce bylo zkoumáno chování mesenchymálních kmenových buněk z tukové tkáně v *in vitro* prostředí ovlivněném faktory jako jsou fyzikálně-chemické vlastnosti biomateriálu použitého pro kultivaci, složení kultivačního média nebo dynamická stimulace kultury. Cílem bylo získat poznatky o interakci buněk s biomateriály a s vnějším prostředím, ale také přispět novými znalostmi, které by byly potenciálně využitelné v regenerativní medicíně nebo v tkáňovém inženýrství při konstrukci umělých cév nebo vaskularizovaných modelů tkání.

### 5.1 Izolace a charakterizace mesenchymálních kmenových buněk z tukové tkáně

Mesenchymální kmenové buňky byly izolovány z lipoaspirátu získaného liposukcí od pacientů z Fakultní nemocnice Bulovka. V následných *in vitro* experimentech byly použity buňky z jednoho dárce (žena, 46 let). Data z literatury ukazují, že negativní vliv na proliferační a diferenciací schopnosti ADSC má věk dárců lipoaspirátu přesahující 50 let (Maredziak *et al.*, 2016). Lipoaspirát byl odebrán ze stehenní oblasti. Z dřívějších studií a i z našich výsledků vyplývá, že místo odběru lipoaspirátu nemá zásadní vliv na proliferační ani diferenciací potenciál buněk (Jurgens *et al.*, 2008; Travnickova *et al.*, 2020). Izolace probíhala podle postupu převzatého ze studie autorů Estes *et al.*, 2010, která využívá enzymatické natrávení tukové tkáně kolagenasou a následnou separaci stromální vaskulární frakce centrifugací. Izolace buněk explantační metodou, kdy buňky prorůstají na kultivační láhev z mechanicky rozmělněné tkáně, přináší pouze mírnou časovou výhodu a nižší riziko mikrobiální kontaminace vzorku, ale z hlediska kvality izolovaných ADSC by neměl být v porovnání s enzymatickou metodou významný rozdíl (Zeng *et al.*, 2013). Po izolaci byla v 2. pasáži prokázána přítomnost či absence typických CD markerů, které jsou minimálním kritériem pro identifikaci ADSC (Dominici *et al.*, 2006). ADSC byly kultivovány *in vitro* v DMEM s přísadkou 10% FS a 10 ng/ml FGF-2. FGF-2 bylo použito pro stimulaci proliferace buněk a také pro uchování jejich nediferencovaného stavu (Lai *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2020). V experimentech byly použity buňky v 2. až 4. pasáži, kdy jsou již dostatečně namnoženy, purifikovány od jiných buněčných typů (např. buňky krevní řady, endotelové buňky), ale ještě nejsou negativně ovlivněny buněčnou senescencí a zachovávají si svůj proliferační a diferenciací potenciál (Truong *et al.*, 2019).

## 5.2 Vliv růstových faktorů VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2 na adhezi a růst buněk

Proliferace buněk je z biochemického hlediska aktivována působením signálních molekul (ať už autokrinního, parakrinního nebo endokrinního původu), které vazbou na buněčný receptor spustí signální kaskádu, vedoucí k progresi buněčného cyklu a ve výsledku k buněčnému dělení. Takto mohou působit například některé signální proteiny, které jsou označovány jako růstové faktory (Wang, 2021). Vaskulární endotelový růstový faktor A (VEGF-A) je protein řazený do stejné rodiny růstových faktorů spolu s VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a PlGF. VEGF-A<sub>165</sub> je nejběžněji se vyskytující sestřihová (splicing) varianta tohoto proteinu, která má řadu biologických funkcí. VEGF-A<sub>165</sub> působí jako růstový faktor specificky pro endotelové buňky a hraje roli v angiogenezi a proliferaci buněk nebo také v diferenciaci kmenových buněk směrem k endotelovým buňkám. Hlavními receptory zprostředkovávajícími signalizaci VEGF-A<sub>165</sub> jsou VEGF receptory typu 1 a 2 (Bhisitkul, 2006; Apte *et al.*, 2019; Luzuriaga *et al.*, 2020). VEGF-A<sub>165</sub> může působit rovněž jako adhezivní molekula vázající se na integrinové receptory na povrchu buněk (Hutchings *et al.*, 2003; Gutierrez-Gonzalez *et al.*, 2019). Fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2) je protein z rodiny FGF růstových faktorů, kam je řazeno dalších 17 solubilních proteinů. Je schopen působit na řadu buněčných procesů přes adhezi a proliferaci až po diferenciaci. Signalizace FGF-2 v buňkách je zprostředkována 4 typy receptorů pro fibroblastové růstové proteiny (Ornitz a Itoh, 2015; Coffin *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2012). FGF-2 je používán při kultivaci ADSC, kde stimuluje proliferaci buněk, inhibuje jejich senescenci a zachovává jejich diferenciační potenciál (Cheng *et al.*, 2020).

Nové možnosti klinických aplikací mesenchymálních kmenových buněk a také tlak na používání chemicky definovaných bezsérových kultivačních médií kladou v současnosti zvýšené požadavky na produkci rekombinantních růstových faktorů (Cimino *et al.*, 2017). Růstové faktory VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M byly připraveny v expresním systému kvasinek *Pichia pastoris* KM71H. Tento expresní systém umožňuje produkci poměrně velkých množství proteinů, které jsou secernovány do média, odkud mohou být snadno izolovány pomocí iontoměničové chromatografie (Krejzova *et al.*, 2016). Rekombinantní proteiny produkované v kvasinkách rovněž není nutno přečišťovat od endotoxinů původem z bakterií, které slouží jako běžné expresní systémy, což může usnadnit potenciální klinickou aplikaci takto připravených růstových faktorů (Sauer *et al.*, 2019).

Rekombinantní růstové faktory byly nejprve testovány z hlediska jejich mitogenní aktivity v kultivačním médiu. Ve studii byl porovnán účinek faktorů u dvou buněčných typů.

Byly zvoleny lidské endotelové buňky z pupečníkové žíly (HUVEC) a mesechymální kmenové buňky z tukové tkáně (ADSC), které jsou vhodné pro konstrukci umělých cév jako buněčná složka tvořící *tunica intima*, tj. vnitřní výstelku cév (endotelové buňky) nebo *tunica media*, tj. střední vrstvu cévy (ADSC diferencované na hladké svalové buňky). Tyto buněčné typy jsou rovněž důležité pro tvorbu kapilárního systému tkáňově-inženýrských konstruktů (Ni *et al.*, 2022). VEGF-A<sub>165</sub> byl aplikován v koncentracích 10-1000 ng/ml a FGF-2M v koncentracích 5-250 ng/ml. VEGF-A<sub>165</sub> neměl na proliferaci ADSC téměř žádný vliv. Podobně i další studie neprokázala efekt VEGF-A<sub>165</sub> na proliferaci mesenchymálních kmenových buněk (Khan *et al.*, 2017). U mesenchymálních kmenových buněk stimuluje VEGF-A<sub>165</sub> spíše jejich diferenciaci směrem k endotelovým buňkám (Khan *et al.*, 2017; Luzuriaga *et al.*, 2020). Podle některých autorů ADSC neexprimují VEGF receptor typu 2, což může vysvětlovat jejich sníženou citlivost ke stimulaci proliferace pomocí VEGF-A<sub>165</sub> (Bassaneze *et al.*, 2010). Naopak FGF-2 v našich experimentech stimuloval proliferaci ADSC a HUVEC ve významné míře, kdy proliferace stoupala s rostoucí koncentrací růstového faktoru. Pozitivní vliv FGF-2 na proliferaci byl již prokázán řadou předešlých studií, což jenom potvrzuje jeho význam při kultivaci ADSC a HUVEC *in vitro* (Khan *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2020; Jia *et al.*, 2021). Je zajímavé, že některé studie poukazují také na schopnost FGF-2 podporovat endoteliální diferenciaci (Ning *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2017).

U HUVEC byl v našich experimentech patrný pozitivní vliv na proliferaci jak po přidání VEGF-A<sub>165</sub>, tak po přidání FGF-2M. FGF-2M měl na HUVEC výrazně silnější mitogenní efekt ve srovnání s VEGF-A<sub>165</sub>. Rovněž jsme pozorovali, že nejvyšších počtů dosahují buňky HUVEC 3. den po přidání VEGF-A<sub>165</sub>, ale už 7. den jsou počty buněk nižší, což potvrzuje slabší mitogenní efekt tohoto faktoru a ukazuje, že pouze samotný VEGF-A<sub>165</sub> není vhodný pro dlouhodobou kultivaci endotelových buněk. Pro kultivaci HUVEC a endotelových buněk z jiných zdrojů jsou používána komerční média, která spolu s VEGF-A<sub>165</sub> obsahují další růstové faktory, mimo jiné FGF-2, které ve společné kombinaci dokážou stimulovat proliferaci po delší časový interval (například médiu EGM2 firmy PromoCell). Byl proveden také experiment, kdy bylo médium s VEGF-A<sub>165</sub> buňkám HUVEC po třech dnech vyměněno za čerstvé s odpovídající koncentrací růstového faktoru (Sedlář *et al.*, 2021a). Porovnáním počtu buněk 7. den kultivace se ukázalo, že výměna média zabránila poklesu počtu buněk. Na druhou stranu ale ani výměnou média nedošlo k nárůstu počtu buněk na vyšší hodnoty než v den 3. VEGF má tedy pouze slabou mitogenní aktivitu a je třeba jej kombinovat s dalšími růstovými faktory.

Mitogenní účinek rekombinantních růstových faktorů produkovaných v kvasinkách *Pichia pastoris* byl srovnán s komerčními výrobky, které byly připraveny v lidské linii

HEK293 (VEGF-A<sub>165</sub>), respektive v bakteriích *E. coli* (FGF-2). V našich experimentech jsme pozorovali obdobný účinek komerčních a námi připravených růstových faktorů. Pouze v některých koncentracích byla aktivita našich faktorů mírně nižší. Tato skutečnost může být vysvětlena přítomností určitého množství nečistot (jiných proteinů), které byly pozorovány na gelech po elektroforéze jako pásy (bandy) o vyšší molekulové hmotnosti než připravené růstové faktory. Čistota VEGF-A<sub>165</sub> a FGF-2M byla kvantifikována přibližně na 85%, resp. 56% celkového množství proteinu. U FGF-2M je přítomnost většího množství pásů o vyšších molekulových hmotnostech než 17 kDa pravděpodobně způsobena tvorbou oligomerních struktur FGF-2M, které za určitých podmínek vznikají (Venkataraman *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2015). Je nutné uvést, že rekombinantní FGF-2M obsahoval dvě mutace v aminokyselinové sekvenci (R31K/R129K). Cílem této mutace bylo zabránit hydrolytickému štěpení proteinu kvasinkovými proteasami Kex2, které štěpí polypeptidový řetězec v místě obsahující aminokyseliny arginin a lysin (Rockwell *et al.*, 2002). Aminokyseliny argininu byly zaměněny za lysin záměrně z důvodu zachování lokálního elektrostatického náboje v proteinu, protože obě tyto aminokyseliny jsou bazické. FGF-2 obsahuje dvě vazebná místa pro heparin. Mutace za neutrální aminokyselinu v jednom z těchto míst (K129A) vedla pouze k mírně snížené schopnosti proteinu vázat heparin (Thompson *et al.*, 1994). Čtyřnásobná mutace ve vazebném heparinovém místě (R118Q/K119Q/K128Q/K129Q) nevedla ke ztrátě mitogenní aktivity proteinu, ale byla ovlivněna jeho schopnost vázat heparin a stimulovat chemotaxi u endotelových buněk (Presta *et al.*, 1992). Delece aminokyselinové sekvence v pozicích 27-32 rovněž nezpůsobila ztrátu mitogenní aktivity proteinu (Isacchi *et al.*, 1991). Tyto studie naznačují, že mírné změny v aminokyselinové sekvenci proteinu v uvedených pozicích nevedou ke ztrátě mitogenní aktivity proteinu. V naší studii pozorovaná mírně snížená aktivita FGF-2M ve srovnání s komerčním FGF-2 může být tedy přisouzena přítomnosti jiných proteinů nebo oligomerních formací FGF-2M v roztoku, což snižuje jeho reálnou koncentraci.

Růstové faktory byly adsorbovány na jamky kultivačního polystyrenu a pozorována jejich mitogenní aktivita. Stejně jako v kultivačním médiu, i v případě adsorbovaného VEGF-A<sub>165</sub> nebyl pozorován mitogenní účinek na ADSC. Adsorpce FGF-2M na povrch jamek vedla ke zvýšené proliferaci ADSC, pozitivní efekt byl pozorován až 3. a 7. den kultivace. U HUVEC byla patrná mitogenní aktivita obou růstových faktorů. FGF-2M působil na růst HUVEC silněji než VEGF-A<sub>165</sub>. Imobilizace VEGF-A<sub>165</sub> je hojně využívána v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství ke stimulaci růstu endotelových buněk na široké škále materiálů zahrnujících polymerní substráty vhodné pro cévní náhrady nebo 3D porézní kolagenové konstrukty (Shin *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2008; Miyagi *et al.*, 2011). VEGF-A<sub>165</sub> je ale také často kombinován



s dalšími faktory podporujícími růst buněk, jako například angiopoetin-1 (Chiu *et al.*, 2010). Může být kombinován také s FGF-2, který při imobilizaci na fibrinovou síť podporují růst endotelových buněk na cévních protézách z ePTFE (Taborska *et al.*, 2021). Na jamkách adsorbovaných FGF-2M počet a metabolická aktivita ADSC a HUVEC výrazně rostly se zvyšující se koncentrací adsorbovaného růstového faktoru. Rovněž i jiné studie ukazují, že pouhá fyzikální adsorpce FGF-2 na polystyren pro tkáňové kultury vede ke zvýšené proliferaci endotelových i mesenchymálních kmenových buněk (Underwood *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2014). Mitogenní aktivita adsorbovaného FGF-2 je zprostředkována jeho interakcí s  $\alpha V\beta 3$  integrinem a FGF receptorem typu 1 na povrchu endotelových buněk (Rusnati *et al.*, 1997; Tanghetti *et al.*, 2002). Imobilizace FGF-2 na různé syntetické a přírodní polymery příznivě ovlivňuje adhezi a proliferaci různých typů buněk (Kumorek *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2014; Firoozi *et al.*, 2020).

Adheze buněk na povrch biomateriálu v dostatečném množství a dostatečnou silou je klíčová pro úspěšné osídlení biomateriálů buněčnou složkou (Khalili a Ahmad, 2015). Proto byla vyhodnocena i adheze buněk na adsorbované růstové faktory. Oba růstové faktory působily na buňky jako adhezní molekuly. Na VEGF- $A_{165}$  adherovaly ADSC i HUVEC pouze ve velmi malé míře, kdy maximální interakce byla patrná při adsorbované koncentraci 0,1  $\mu M$  VEGF- $A_{165}$ . Jiné studie také prokázaly velmi slabou nebo téměř žádnou adhezní interakci VEGF- $A_{165}$  s mesenchymálními kmenovými buňkami (Kang *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2014). Slabá adhezní interakce s buňkami může být způsobena nepřítomností typických adhezních aminokyselinových sekvencí v molekule proteinu VEGF- $A_{165}$ , které by se mohly vázat na integrinové receptory (VEGF- $A_{165}$  neobsahuje sekvence RGD, DGEA, KQAGDV, VAPG, REDV, YIGSR, IKVAV ani KRSR; Bačáková a Švorčík, 2008). Naopak studie Gutierrez-Gonzalez *et al.* poukazuje na adhezi lymfocytů na imobilizovaný VEGF- $A_{165}$  prostřednictvím integrinu  $\alpha 4\beta 1$  a VEGFR-2 (Gutierrez-Gonzalez *et al.*, 2019), což napovídá, že adheze k tomuto růstovému faktoru závisí především na buněčném typu. Je zajímavé, že na ADSC působil adsorbovaný FGF-2M silnou adhezní interakcí, ale naopak v případě HUVEC docházelo k poklesu míry adheze vlivem FGF-2M. U ADSC výsledky korespondují s prací Kang *et al.*, 2012, kde byla zjištěna zvyšující se míra adheze ADSC v závislosti na rostoucí koncentraci adsorbovaného FGF-2. FGF-2 obsahuje dvě reverzní adhezní sekvence DGR (reverzní k sekvenci RGD) v pozicích 46-48 a 88-90 polypeptidového řetězce. Tyto sekvence mohou být rovněž rozpoznány integrinovými receptory, zejména ve své isoDGR formě, který vzniká deaminací asparaginu (Spitaleri *et al.*, 2008; Corti *et al.*, 2011). Adsorbovaný FGF-2M na HUVEC působil antiadhezivně. Tento překvapující poznatek může být způsoben

přítomností reverzní adhezní sekvence RSRK (tj. reverzní k sekvenci KRSSR). Je známo, že neobrácená sekvence KRSSR se váže na neintegrinové adhezní receptory, ale nepodporuje adhezi endotelových buněk, neboť je preferenčně rozpoznávána osteoblasty (Dee *et al.*, 1998). Řada studií naopak prokázala schopnost endotelových buněk adherovat na FGF-2, která byla zprostředkována aminokyselinovými fragmenty 24-68 a 93-120. Tyto fragmenty obsahují reverzní adhezní sekvence DGR a RSRK (Baird *et al.*, 1988; Rusnati *et al.*, 1997; Tanghetti *et al.*, 2002). Adheze HUVEC na námi připravený rekombinantní FGF-2M může být také ovlivněna mutacemi v sekvenci proteinu.

### 5.3 Vliv galektinu-3 na adhezi buněk

Galektin-3 je globulární protein charakteristický svou schopností vázat  $\beta$ -galaktosidy, které se běžně nacházejí v buňkách jako součást cukerné složky glykoproteinů. Je exprimován prakticky ve všech tkáních a účastní se řady procesů jako je proliferace nebo migrace buněk. Může účinkovat také jako adhezní molekula interagující s integrinovými receptory nebo proteiny extracelulární matrix (Sciacchitano *et al.*, 2018). V našich experimentech byly sledovány adhezní vlastnosti exogenního galektinu-3 na ADSC a HUVEC. Bylo zjištěno, že oba buněčné typy interagují s adsorbovaným galektinem-3 a nejvyšší míru adheze vykazují při použití 1  $\mu$ M koncentrace galektinu-3. V kultivačním médiu může galektin-3 adhezi podporovat i inhibovat, což se pravděpodobně odvíjí od jeho schopnosti vytvářet oligomery. Oligomerizace galektinu-3 je závislá na jeho koncentraci v roztoku (Hughes, 2001; LeMarer *et al.*, 1996). V koncentracích přesahujících 1  $\mu$ M (tj. v našem případě 3-33  $\mu$ M) již začala míra buněčné adheze klesat, ale byla stále zvýšená ve srovnání s kontrolními vzorky bez adsorbovaného galektinu-3. Adsorpce vysokých koncentrací galektinu-3 v mikromolárních řádech způsobuje tvorbu oligomerních multivalentních komplexů galektinu-3 na povrchu substrátu (Birdsall *et al.*, 2001). To vede k vytvoření vysoké hustoty molekul galektinu-3 na substrátu, což patrně způsobí sterickou inhibici interakce galektinu-3 s adhezními receptory na povrchu buněk, čímž dojde k snížené míře adheze buněk. Obdobný jev byl například pozorován již v dřívějších studiích při vysoké hustotě adhezních sekvencí RGD na povrchu substrátu (Benitez *et al.*, 2016). Adhezi buněk na galektin-3 v našich experimentech nebylo možné inhibovat disacharidem LacdiNAc, který je specifickým ligandem tohoto galektinu (Šimonová *et al.*, 2014). Adheze na adsorbovaný galektin-3 tedy neprobíhá přes vazbu mezi kanonickým vazebným místem na CRD doméně proteinu a cukernými ligandy na povrchu buňky. Z jiných prací je známo, že galektin-3 se může na povrchu buněk vázat na integrinové adhezní receptory  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  a  $\alpha 7\beta 1$ . Dále se může jednat o interakci i s proteiny jiného

charakteru, například s CD7, CD43, CD45, fibronektinem, vitronektinem, lamininem nebo membránovými proteiny asociovanými s lysozomy (Hughes, 2001; Cummings *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2015). Je otázkou, zda ve všech případech galektin-3 interaguje pouze pomocí CRD domény s cukernou složkou výše jmenovaných glykoproteinů nebo interakce probíhá také na bázi protein-protein.

Při hledání alternativních vazebných míst pro galektin-3 jsme se v dalších experimentech proto zaměřili na integrinové adhezní receptory jako nejpravděpodobnější zprostředkovatele adheze buněk na adsorbovaný galektin-3. Působením EDTA, což je inhibitor všech integrinových receptorů (pomocí chelatačního účinku na ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ), došlo k blokaci adheze HUVEC i ADSC na galektin-3. Integrinové receptory jsou heterodimery tvořené z 18  $\alpha$  a 8  $\beta$  podjednotek, které dávají vzniknout 24 unikátním výsledným kombinacím (Hynes, 2002). Řada z těchto 24 heterodimerů je ovšem typicky exprimována pouze v některých buněčných typech, například leukocytech (Hyun *et al.*, 2009). Pro tyto experimenty jsme proto použili blokační protilátky proti nejběžnějším podjednotkám  $\alpha\text{V}$ ,  $\beta\text{1}$ ,  $\beta\text{3}$ . Vybrána byla také protilátka proti  $\alpha\text{3}$  podjednotce, která je součástí heterodimeru  $\alpha\text{3}\beta\text{1}$ . Ten je schopen vázat širokou škálu proteinů jako je laminin, fibronectin nebo kolagen (da Silva *et al.*, 2010). Přítomnost vybraných podjednotek a také heterodimerů  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ ,  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  a  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  na povrchu ADSC a HUVEC byla prokázána námi (Sedlář *et al.*, 2021b) a také v dalších publikacích (Morandi *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2017; Rico *et al.*, 2019). Naše výsledky ukázaly, že adheze na galektin-3 je významně blokována pomocí anti- $\beta\text{1}$  a anti- $\alpha\text{V}$  protilátky. Protilátka proti  $\alpha\text{3}$  integrinu neměla na adhezi významný vliv. Úloha  $\beta\text{1}$  integrinu v interakci s galektinem-3 byla pozorována i v případě jiných buněčných typů jako jsou kolonocyty nebo T-lymfocyty. Rovněž je zajímavé, že interakce s galektinem-3 je ovlivněna sialylací  $\beta\text{1}$  integrinu (Fukumori *et al.*, 2003; Zhuo *et al.*, 2008). Dále byly testovány blokační protilátky proti integrinovým heterodimerům, tj. plně funkčním integrinovým receptorům. Byly vybrány nejběžnější heterodimery vázající rozdílné substráty a adhezní sekvence, a sice  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  (vázající kolagen I),  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  (fibronectin) a  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  integrin (vitronectin). Adheze na galektin-3 byla negativně ovlivněna pouze blokací  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  a  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  integrinů, což jsou adhezní receptory pro vitronectin a fibronectin. Zajímavé bylo pozorovat také některé rozdíly mezi ADSC a HUVEC v zapojení integrinů do adheze ke galektinu-3. Například u HUVEC bylo v adhezi patrně výraznější zapojení integrinů  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ ,  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  a podjednotek  $\beta\text{1}$ ,  $\beta\text{3}$  a  $\alpha\text{V}$ , což je patrně dáno rozdílnou expresí a poměrným zastoupením jednotlivých integrinů u různých buněčných typů. Integriny zapojené v našich experimentech v adhezi na galektin-3 rozpoznávají typicky RGD sekvence v molekulách proteinů, proto lze předpokládat, že i na adsorbovaném galektinu-3 rozpoznávají prozatím

neznámou specifickou adhezní sekvencí. Tomu napovídá i fakt, že adheze na galektin-3 byla blokována specifickým inhibítozem  $\alpha V\beta 1$  integrinu, který je strukturně podobný RGD motivu. Blokace ale fungovala pouze ve vyšších mikromolárních koncentracích, kdy již inhibitor není specifický a blokuje všechny integriny vázající RGD motiv (Wilkinson *et al.*, 2019). Blokace adheze na galektin-3 kanonickou RGD sekvencí byla pozorována v jiných studiích (Suzuki *et al.*, 2015) ale i v našich pokusech. Je nutné zmínit, že galektin-3 neobsahuje žádnou z kanonických adhezních sekvencí, tedy ani RGD. Některé integrinové receptory ovšem nejsou přísně specifické pouze pro jedinou adhezní sekvenci a mohou vázat i jiné strukturně podobné adhezní sekvence (Ruoslahti, 1996).

ADSC adherující na galektin-3 vykazovaly podobnou morfologii jako při adhezi na skleněný substrát. Naproti tomu HUVEC vykazovaly na galektinu-3 odlišnou morfologii ve srovnání s buňkami na fibronektinu a nebo na skleněném povrchu. Endotelové buňky tvořily shluky buněk se slabě vyvinutým cytoskeletem a "hvězdovitou" morfologií. Podobná morfologie buněk s mnoha lamelipodiemi a filopodiemi byla zaznamenána také u epitelálních buněk na galektinu-3, kde byly morfologické změny vyvolány integrinem  $\alpha 3\beta 1$  (Saravanan *et al.*, 2009). Je zajímavé, že v naší studii byla silná exprese integrinu  $\alpha 3\beta 1$  pozorována právě u HUVEC. Naproti tomu u ADSC byla povrchová exprese tohoto integrinu nižší. To by mohlo vysvětlovat rozdíly v morfologii těchto dvou typů buněk na povrchu s adsorbovaným galektinem-3. Ačkoli tedy galektin-3 interaguje s integriny a podporuje adhezi, u HUVEC nedochází k plnému rozvinutí cytoskeletárních struktur jako je tomu například u povrchu s fibronektinem. Galektin-3 tedy není typickým ligandem integrinových receptorů, který by vázal obě podjednotky integrinového receptoru, ale nejspíše váže pouze jednu z podjednotek (což naznačují i naše experimenty, ukazující silnou inhibici adheze blokací  $\alpha V$  ale již ne  $\beta 3$  integrinu), což nemůže zajistit plně funkční adhezi některých buněčných typů. V cévním tkáňovém inženýrství by mohl být galektin-3 použit jako povrchový materiál pro zlepšení adheze buněk a endotelizaci cévních náhrad. Díky jeho angiogennímu účinku (Nangia-Makker *et al.*, 2000) by mohlo na takto funkcionalizovaných syntetických materiálech docházet k snadnější tvorbě kapilár a vaskularizaci tkáňově-inženýrského konstruktů (Sivkova *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2018). Naopak oligosacharidické ligandy pro galektin-3, imobilizované na materiálu cévní náhrady, by mohly napomoci vychytávání endotelových progenitorových buněk z krve, neboť tyto buňky se vyznačují přítomností galektinu-3 (Ahrens *et al.* 2011). Vazba galektinu-3 na tyto ligandy, například na ligandy zakončené  $\beta$ -galaktosidy, pak dále podporuje diferenciaci endotelových progenitorových buněk ve zralé endotelové buňky (Nangia-Makker *et al.*, 2000).

Při potenciálním užití galektinu-3 v cévním tkáňovém inženýrství je třeba mít na paměti i fakt, že tato pleiotropní molekula může hrát i negativní roli ve vzniku a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění, například v hypoxické plicní hypertenzi. Galektin-3 je považován za jeden z důležitých biomarkerů tohoto onemocnění, a to pro své profibrotické působení a účast v remodelaci cévní stěny i myokardu. Proto byla jedna z našich nejnovějších prací věnována i vlivu glykopolymerních ligandů, syntetizovaných spolupracující skupinou prof. V. Křena a doc. P. Bojarové z Mikrobiologického ústavu AV ČR, na expresi profibrotických markerů v hladkých svalových buňkách pulmonálních arterií a srdečních fibroblastech potkanů s rozvinutou hypoxickou plicní hypertenzí. Bylo zjištěno, že glykopolymerní ligandy, tj. polyoxazolinové řetězce s karbohydrátovými ligandy typu laktózy, snižují v uvedených buňkách expresi  $\alpha$ -aktinu, kalponinu a kolagenu typu I. Tyto molekuly představují nejen markery diference a fenotypické maturace buněk hladkého svalu, ale v podmínkách hypoxické pulmonální hypertenze je lze považovat i za markery nežádoucí přestavby (ztluštění) stěny cév či pravé srdeční komory a jejich fibrotizace (např. diference fibroblastů do myofibroblastů). Příznivý účinek polyoxazolinů s karbohydrátovými ligandy se alespoň částečně projevil i u buněk pre-stimulovaných TGF $\beta$ 1, který je považován za význačný profibrotický faktor (Sedlář *et al.*, 2024).

#### **5.4 Adheze, růst a diference buněk na PLLA foliích**

Buněčná adheze, růst a diference je dána především fyzikálně-chemickými vlastnostmi použitého biomateriálu (Bačáková *et al.*, 2011). V našich experimentech jsme studovali adhezi, růst a diference ADSC a VSMC na biomateriálech na bázi PLLA. PLLA (poly-L-kyselina mléčná; polylaktid) je syntetický biomateriál. Jeho upravitelné mechanické vlastnosti spolu s jeho biokompatibilitou umožňují jeho využití jako biomateriálu v tkáňovém inženýrství. Materiál je rovněž biodegradabilní. Jako produkt degradace vzniká kyselina mléčná, která není pro organismus toxická. Nevýhodou PLLA je jeho poměrně vysoká hydrofobnost, která negativně ovlivňuje adsorpci proteinů na jeho povrch a v důsledku tedy adhezi a růst buněčných kultur (Capuana *et al.*, 2022). PLLA je používán v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství při konstrukci umělých cév, ať už ve formě nanovláken (Chen *et al.*, 2024) nebo v podobě hybridních nosičů v kombinaci s PLGA a PCL (Wang *et al.*, 2011).

V našich experimentech byly použity čisté PLLA fólie a dále jejich tři povrchové úpravy. První úprava spočívala ve vystavení materiálu argonovému plasmatu po dobu 240 sekund. Ošetření různých biomateriálů plazmatem vede ke štěpení vazeb a tvorbě volných radikálů na povrchu materiálů, dále ke zvýšení jejich povrchové energie, snížení jejich

hydrofobnosti a kontaktního úhlu a v důsledku tak k adsorpci proteinů v geometrické konformaci výhodné pro adhezi buněk a jejich následný růst (Duske *et al.*, 2012; Canullo *et al.*, 2018; Griffin *et al.*, 2019). I v naší studii vedlo vystavení čistého PLLA argonovému plazmatu k výraznému poklesu jeho hydrofobnosti. Hydrofobnost byla detekována pomocí měření kontaktního úhlu vodní kapky. Hodnoty kontaktního úhlu u plasmovaného materiálu se ale po delším časovém intervalu (10 dní) vrátily do hodnot srovnatelných s čistým PLLA, což je vysvětlováno úbytkem chemických funkčních skupin s obsahem kyslíku na povrchu materiálu a jejich reorientací směrem do nitra materiálu (Travnickova *et al.*, 2021). Na čistém PLLA jsme pozorovali nižší plochu rozprostření u ADSC. V případě VSMC byly na čistém PLLA buňky více zakulacené a méně protáhlé. Plasmování vedlo ke většímu rozprostření ADSC a ke změně morfologických parametrů VSMC. Na plasmovaném materiálu vykazovaly buňky také zvýšený růst. Zlepšení vlastností PLLA pro buněčnou kolonizaci vlivem plasmování může souviset také se změnou jeho povrchové nanodrsnosti. Naše výsledky se schodují i s předešlými publikacemi. Například ve studii Argentati *et al.*, 2018 byl pozorován růst ADSC na čistém a plasmovaném PLLA. Na neupraveném PLLA formovaly ADSC sferoidní struktury, kdežto na plasmovaném povrchu měly buňky typickou vřetenovitou morfologii. To souviselo i s naměřenou zvýšenou adsorpcí proteinů na povrch plasmovaného materiálu (Argentati *et al.*, 2018). Další povrchová úprava spočívala v navázání polyethylenglykolu ( $M = 20000$ ) na plasmovaný PLLA. Polyethylenglykol je biokompatibilní materiál používaný jako nosič léčiv pro regeneraci tkání (Sun *et al.*, 2023) nebo jako nosič buněk v tkáňově-inženýrských konstruktech (Kong *et al.*, 2017). PEG o molekulové hmotnosti 20000 byl vybrán na základě předchozí studie, která ukázala, že VSMC proliferují v nejvyšší míře právě na materiálech pokrytých PEG o této molekulové hmotnosti. Nižší molekulové hmotnosti PEG již růst buněk tak významně nepodporovaly (Švorčík *et al.*, 2012). V našem případě vedlo pokrytí materiálu polyethylenglykolem ke snížení kontaktního úhlu a menší nanodrsnosti. Buňky na materiálu s PEG vykazovaly zlepšenou adhezi i růst oproti čistému PLLA. Poslední modifikací bylo potažení plasmovaného PLLA dextranem ( $M = 9000-11000$ ). Dextran je biokompatibilní polysacharid, který byl vybrán pro pokrytí PLLA pro jeho antitrombogenní vlastnosti (Damodaran *et al.*, 2013). Pokrytí dextranem vedlo ke snížení kontaktního úhlu materiálu, které ale ovšem nebylo tak výrazné, jako v případě pokrytí polyethylenglykolem. Buňky na tento materiál adherovaly podobně jako u ostatních povrchových modifikací. Vhodnost dextranu pro *in vitro* kultivaci buněk ilustruje například také studie autorů Shi *et al.*, 2012, kde na nanovláčkách dextranu v kombinaci s dalším

polysacharidem pullulanem byl pozorován růst endotelových buněk v konfluentní vrstvě a rovněž přechod VSMC ze syntetického do kontraktálního fenotypu (Shi *et al.*, 2012).

ADSC byly diferencovány směrem k hladkým svalovým buňkám v diferenciačním médiu obsahujícím TGF $\beta$ 1, BMP4 a kyselinu askorbovou. TGF $\beta$ 1 a BMP4 jsou proteiny z rodiny transformujících růstových faktorů. Vazbou těchto růstových faktorů na receptory na povrchu buněk dojde k aktivaci signálních drah vedoucích k expresi typických hladkosvalových markerů. ADSC exprimovaly v diferenciačním médiu (nezávisle na použité modifikaci materiálu) ve zvýšené míře markery VSMC, jako je  $\alpha$ -hladkosvalový aktin, kalponin a smoothelin. Exprese  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu a kalponinu byla v buňkách přítomna i na proteinové úrovni. Naopak u těžkého řetězce hladkosvalového myosinu nebyl pozorován nárůst v expresi na úrovni mRNA, i když v malém množství buněk a po delším časovém intervalu diferenciaci byla pozorována i tvorba těžkého řetězce hladkosvalového myosinu na úrovni proteinu. Smoothelin spolu s těžkým řetězcem hladkosvalového myosinu jsou považovány za terminální markery vyvrátého hladkého svalu, zatímco  $\alpha$ -hladkosvalový aktin je markerem časným a kalponin střednědobým (Owens *et al.*, 2004).

Kyselina askorbová byla do diferenciačního média přidána pro stimulaci produkce kolagenu. Kyselina askorbová stimuluje tvorbu kolagenu jako kofaktor hydroxylas a prolylhydroxylas, což jsou klíčové enzymy syntézy kolagenu (Maione-Silva *et al.*, 2019), může ale také aktivovat expresi kolagenů I a III na úrovni mRNA (Tajima *et al.*, 1996). Kolagen I a III jsou jedny z hlavních proteinů extracelulární matrix vytvářející stěnu cévy (Kong *et al.*, 2013). Různé typy extracelulárních kolagenů pak mohou stimulovat další hladkosvalovou diferenciaci buněk (Hong *et al.*, 2008). V diferencovaných ADSC jsme pozorovali zvýšenou expresi kolagenu I na mRNA i proteinové úrovni.

## **5.5 Růst buněk na 3D porézních PLLA/PCL biomateriálech**

Rozvoj nových technologií materiálového inženýrství umožňuje přípravu 3D biomateriálů vhodných pro osazení buněčnou složkou a tvorbu tkáňových konstruktů se složitou vnitřní architekturou. Perspektivními technologiemi je například metoda elektrostatického zvlákňování (elektrospiningu), která slouží k vytváření polymerních nanovláčkových struktur (Xue *et al.*, 2019). Struktury vytvořené elektrospiningem jsou však spíše planárního, membránového charakteru, kdežto pro konstrukci většiny tkání jsou zapotřebí prostorové 3D nosiče buněk. Takovéto nosiče s vláknitou strukturou je možno vytvořit centrifugačním spinningem (Li *et al.*, 2016), zatímco nosiče s houbovitou či pěnovou strukturou je možno vytvořit lyofilizací. Tato technika byla v dřívějších studiích používána především u nosičů

buněk z biopolymerů, jako je kolagen (Bačáková *et al.* 2022) nebo bakteriální nanocelulóza (Kutová *et al.* 2021, Staňková *et al.* 2024), ale v našich současných experimentech jsme ji aplikovali i na polymery syntetické, jako jsou degradovatelné polyestery polylaktid a polykaprolakton. V našich pokusech byly ADSC kultivovány na 3D porézních biomateriálech vytvořených lyofilizací z hybridního materiálu PLLA/PCL s přísadkou Klucelu E. V klasickém statickém kultivačním systému proliferovaly ADSC nejlépe na PLLA/PCL bez přísadky Klucelu E, ačkoliv tento přísadka měl kromě mechanických vlastností a kompaktnosti materiálového nosiče zvýšit i jeho porozitu a zvětšit velikost pórů, což mělo usnadnit vrůstání buněk do nitra nosiče. Avšak póry pravděpodobně zůstávaly i nadále pro buňky příliš malé (pro tento účel je nutno v nosiči mít póry o průměru nejméně několika desítek mikrometrů, a pro konstrukty tkáně kostní o průměru i několika stovek mikrometrů; Pamula *et al.*, 2008, 2009). I v našich minulých studiích na kolagenních a nanocelulóзовých nosičích, upravených lyofilizací, byly póry často příliš malé pro dostatečný průnik buněk (Bačáková *et al.*, 2022), a dokonce někdy vytvářely na povrchu materiálu i nerovnosti v řádu mikrometrů, které omezovaly řádné rozprostření buněk při jejich adhezi (Kutová *et al.*, 2021; Staňková *et al.*, 2024). Obdobných výsledků bylo dosaženo i ve studii, kde byla elektrospiningem připravena mikrovlákna z PLLA a následně osazena ADSC. Buňky kultivované na těchto PLLA nosičích byly sice životaschopné, proliferovaly a produkovaly extracelulární matrix ve formě kolagenu, ale po 3 týdnech kultivace byl pozorován průnik buněk pouze do hloubky 20  $\mu\text{m}$ , což bylo způsobeno příliš hustou sítí připravených vláken (Hillary *et al.*, 2016). Dalším důvodem negativního vlivu přísadky Klucelu E na adhezi a růst buněk mohla být i jeho chemická podstata – jedná se o derivát celulózy, tj. polysacharid, který se nevyskytuje v organismu člověka ani dalších savců, a tudíž nenese ve své molekule žádná místa rozpoznávaná adhezními receptory savčích buněk (Kutová *et al.*, 2021; Staňková *et al.*, 2024). V případě jeho nedokonalého vymytí ve vodném prostředí a retence uvnitř materiálu, které bylo prokázáno i elektronovou mikroskopií, mohl tudíž i pasivně zabraňovat adhezi buněk k materiálu.

Naše výsledky také ukazují, že ADSC nejsou schopny pronikat do porézního PLLA/PCL nosiče příliš hluboko a zůstávají především v povrchových částech materiálu. Situace se zlepšila dynamickou kultivací buněk, a to i u nosičů s přísadkou Klucelu E. Porézní nosiče s ADSC jsme po 6 dnech kultivace vystavili smykovému tření proudícího kultivačního média po dobu 4 dní v dynamickém systému STUART Mini Orbital Shaker SSM1. Tento typ mechanického namáhání, které rovněž umožňovalo proudění média póry uvnitř nosiče, stimuloval růst buněk na všech pozorovaných materiálech, tedy i na materiálech s přísadkou Klucelu E, především v jeho vyšších koncentracích (25 a 50 hm.%), kde buňky zvýšily i svůj



průnik do nitra materiálu. Pozitivní vliv smykového tření na proliferaci byl pozorován také u endotelových progenitorových buněk (Yamamoto *et al.*, 2003) a u ADSC diferencovaných směrem k hladkému svalu na PLGA nosičích (Wang *et al.*, 2011).

## **5.6 Růst buněk na PLLA biomateriálech připravených metodou 3D tisku**

Zajímavá a prudce se rozvíjející je také metoda 3D tisku, dovolující přípravu trojrozměrných porézních biomateriálů z kovů, keramiky nebo různých přírodních a syntetických polymerů (Chia a Wu, 2015). 3D tisk je využíván v řadě medicínských aplikací nebo při tvorbě vaskularizovaných modelů tkání (Lerman *et al.*, 2018). ADSC jsme kultivovali na materiálech z PLLA připravených 3D tiskem. Nosiče se ukázaly jako biokompatibilní a vhodné pro růst ADSC. ADSC byly v případě dostatečných rozestupů mezi jednotlivými vlákny schopny pronikat hlouběji do materiálu. 3D tisk byl použit už v minulosti pro přípravu 3D mřížek z PLLA. Tyto mříže byly vyplněny želatinovým hydrogelem s obsahem ADSC a buňky byly diferencovány směrem k osteoblastům (Heo *et al.*, 2017). ADSC byly rovněž osteogenně diferencovány na tištěných PCL materiálech mineralizovaných fosforečnanem vápenatým (Ruminski *et al.*, 2018). Tištěné 3D konstrukty z PCL osazené kulturou ADSC byly dokonce aplikovány jako kostní náhrady u psů (Lee *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021). PLLA nosiče mineralizované pomocí simulované tělní tekutiny nebo potažené kolagenem I jsme osadili kokulturou ADSC a HUVEC v poměru 1:1 a buňky kultivovali 6 dní, přičemž byly buňky vystaveny smykovému tření kultivačního média. Na vzorcích jsme pozorovali, že HUVEC vytvářejí podél vláken materiálu prekapilární struktury. Pozitivní efekt ADSC na tvorbu struktur podobným kapilárám *in vitro* nebo na angiogenezi *in vivo* byl popsán již řadou předchozích studií (Gan *et al.*, 2022; Morita *et al.*, 2023). Tvorbu kapilárních struktur podporuje také smykové tření (Yamamoto *et al.*, 2003). I tím naši laboratoře pozoroval ve svých nedávných studiích spontánní vytváření tubulárních struktur z endotelových buněk v trojrozměrných fibrinových a kolagenních hydrogelech, ke kterým se zvnějšku přikládaly ADSC na způsob pericytů (Bačáková *et al.* 2018, 2024).

## 6 Závěr

V rámci disertační práce bylo studováno chování ADSC v *in vitro* kultivačním prostředí ovlivněném biochemickým složením kultivačního média, typem kultivačního substrátu a rovněž dynamickou stimulací kultury. Byly získány nové poznatky o adhezi, růstu a diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk z tukové tkáně, které mohou být využity v tkáňovém inženýrství při konstrukci bioarteficiálních cév a vaskularizovaných konstruktů měkkých a tvrdých tkání.

Ze získaných výsledků vyplývá, že adheze ADSC:

- je pozitivně ovlivněna adsorbovanými rekombinantními VEGF-A<sub>165</sub>, FGF-2M a galektinem-3. Adhezní interakce buněk s VEGF-A<sub>165</sub> je slabší ve srovnání s FGF-2M a galektinem-3.
- na adsorbovaný galektin-3 je zprostředkována interakcí s integrinovými receptory na povrchu ADSC. Adheze na galektin-3 se účastní integrinové receptory  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  a  $\alpha V\beta 3$ . Adheze na galektin-3 není zprostředkována vazbou CRD domény proteinu na cukerné ligandy na povrchu buněk.
- je ovlivněna typem a povrchovou modifikací biomateriálu. Na nemodifikovaném planárním PLLA buňky adherují v menší míře než na materiálech modifikovaných argonovým plasmatem nebo potažených polyethylenglykolem a dextranem. Adheze buněk kopíruje vnitřní strukturu 3D biomateriálů na bázi PLLA.

Růst ADSC:

- je stimulován přítomností růstového faktoru FGF-2M v kultivačním médiu. Proliferace buněk je rovněž stimulována fyzikálně adsorbovaným růstovým faktorem, který si zachovává svůj mitogenní účinek. Mutace (R31K/R129K) v sekvenci růstového faktoru nemají významný vliv na jeho mitogenní účinek.
- není ovlivněn přítomností VEGF-A<sub>165</sub> v kultivačním médiu ani růstovým faktorem adsorbovaným na kultivační substrát.
- je závislý na povrchové modifikaci biomateriálu. Buňky proliferují nejpomaleji na nemodifikovaném PLLA. ADSC ve větší míře proliferují na PLLA materiálech pokrytých polyethylenglykolem a dextranem. Nejrychleji potom proliferují na PLLA modifikovaném argonovým plasmatem.
- je ovlivněn 3D strukturou materiálu. Na porézních 3D materiálech připravených lyofilizací rostou ADSC především na povrchu materiálu a jen zřídka pronikají hlouběji do jeho struktury, což je zřejmě dáno relativně malým průměrem pórů. Na materiálech

připravených metodou 3D tisku pronikají buňky do větších hloubek, což je způsobeno velkými rozestupy mezi jednotlivými vlákny, a tím větší velikostí pórů.

- je ovlivněn dynamickou stimulací kultury – vlivem smykového napětí ADSC na porézních materiálech proliferují rychleji než ve statickém kultivačním systému, a je zvýšen i jejich průnik do nitra materiálu, zejména tam, kde jsou póry rozšířeny přidavkem Klucelu E (25 hm.%).
- na materiálech připravených 3D tiskem umožňuje kokultivace ADSC s HUVEC vznik prekapilárních struktur.

Diferenciace ADSC směrem k hladkým svalovým buňkám:

- může být stimulována biochemicky složením kultivačního média. Přidavkem TGF $\beta$ 1, BMP4 a kyseliny askorbové do kultivačního média byla stimulována diferenciace buněk směrem k hladkému sval. Byla prokázána zvýšená exprese  $\alpha$ -hladkosvalového aktinu a kalponinu na úrovni mRNA i proteinu. Na úrovni mRNA byla rovněž zvýšená exprese kolagenu I a smoothelinu. Diferenaciační médium ovšem nestimulovalo expresi těžkého řetězce hladkosvalového myosinu na úrovni mRNA. Myosin byl pozorován na proteinové úrovni u nepatrného počtu buněk v kultuře.
- nezávisí na povrchové modifikaci planárních PLLA folií. Markery diferenciace byly exprimovány v podobné míře na neošetřeném PLLA, plasmovaném PLLA a PLLA pokrytém polyethylenglykolem i dextranem.

## 7 Seznam použité literatury

- Abdal-Hay A, Bartnikowski M, Hamlet S, Ivanovski S. Electrospun biphasic tubular scaffold with enhanced mechanical properties for vascular tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Jan 1;82:10-18. doi: 10.1016/j.msec.2017.08.041.
- Abrahamse H. Genetic expression of adipose derived stem cell and smooth muscle cell markers to monitor differentiation potential following low intensity laser irradiation. *Proc. SPIE 8932, Mechanisms for Low-Light Therapy IX, 89320B* (18 February 2014); doi:10.1117/12.2041451
- Ahmed T, Jain A. Heart Transplantation. [Updated 2023 May 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557571/>
- Ahrens I, Domeij H, Topcic D, Haviv I, Merivirta RM, Agrotis A, Leitner E, Jowett JB, Bode C, Lappas M, Peter K. Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS One.* 2011;6(8):e23210. doi: 10.1371/journal.pone.0023210.
- Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS One.* 2013 Oct 4;8(10):e76979. doi: 10.1371/journal.pone.0076979.
- Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell.* 2019 Mar 7;176(6):1248-1264. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
- Argentati C, Morena F, Montanucci P, Rallini M, Basta G, Calabrese N, Calafiore R, Cordellini M, Emiliani C, Armentano I, Martino S. Surface hydrophilicity of poly(l-lactide) acid polymer gilm changes the human adult adipose stem cell architecture. *Polymers (Basel).* 2018 Feb 1;10(2):140. doi: 10.3390/polym10020140.
- Aung LM, Lin JC, Salamanca E, Wu YF, Pan YH, Teng NC, Huang HM, Sun YS, Chang WJ. Functionalization of zirconia ceramic with fibronectin proteins enhanced bioactivity and osteogenic response of osteoblast-like cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Apr 25;11:1159639. doi: 10.3389/fbioe.2023.1159639.
- Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, Brizzi V, Delmond S, Bareille R, Siadous R, James C, Ripoche J, Durand M, Montembault A, Burdin B, Letourneur D, L'Heureux N, David L, Bordenave L. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: in vitro and in vivo evaluation. *Biomed Mater.* 2017 Oct 3;12(6):065003. doi: 10.1088/1748-605X/aa78d0.
- Ayala R, Zhang C, Yang D, Hwang Y, Aung A, Shroff SS, Arce FT, Lal R, Arya G, Varghese S. Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. *Biomaterials.* 2011 May;32(15):3700-11. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.004.
- Bačáková L, Sedlář A, Musílková J, Eckhardt A, Žaloudíková M, Kolář F, Maxová H. Vascular smooth muscle cells in hypoxic pulmonary hypertension. In memory of more than twenty years of cooperation with Prof. Jan Herget. Submitted to *Physiological Research*, 2024
- Bačáková L, Novotna K, Hadraba D, Musilkova J, Slepicka P, Beran M. Influence of biomimetically mineralized collagen scaffolds on bone cell proliferation and immune activation. *Polymers (Basel).* 2022 Feb 3;14(3):602. doi: 10.3390/polym14030602.
- Bačáková L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv.* 2018 Jul-Aug;36(4):1111-1126. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.

- Bačáková L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv.* 2011 Nov-Dec;29(6):739-67. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
- Bačáková, L., Švorčík, V. Cell colonization control by physical and chemical modification of materials. In: KIMURA, Daiki, ed. *Cell Growth Processes: New research*. New York: Nova Science Publisher, 2008, s. 5-56. ISBN 978-1-60456-132-6.
- Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Svorčík V, Starý V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res.* 2004;53 Suppl 1:S35-45.
- Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rad A, Assadzadeh-Aghdaei H, Sharifian A, Zali MR. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017 Summer;10(3):208-213.
- Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J.* 2009 Oct;23(10):3494-505. doi: 10.1096/fj.08-126946.
- Baird A, Schubert D, Ling N, Guillemin R. Receptor- and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(7):2324-8. doi: 10.1073/pnas.85.7.2324.
- Barczewska M, Maksymowicz S, Zdolińska-Malinowska I, Siwek T, Grudniak M. Umbilical cord mesenchymal stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: an original study. *Stem Cell Rev Rep.* 2020 Oct;16(5):922-932. doi: 10.1007/s12015-020-10016-7.
- Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, Doody M, Venter D, Pain S, Gilshenan K, Atkinson K. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008 Dec;17(6):1095-107. doi: 10.1089/scd.2007.0154.
- Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, Krieger JE. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010 Mar;19(3):371-8. doi: 10.1089/scd.2009.0195.
- Bellei B, Migliano E, Tedesco M, Caputo S, Picardo M. Maximizing non-enzymatic methods for harvesting adipose-derived stem from lipoaspirate: technical considerations and clinical implications for regenerative surgery. *Sci Rep.* 2017 Aug 30;7(1):10015. doi: 10.1038/s41598-017-10710-6.
- Benitez PL, Mascharak S, Proctor AC, Heilshorn SC. Use of protein-engineered fabrics to identify design rules for integrin ligand clustering in biomaterials. *Integr Biol (Camb).* 2016 Jan;8(1):50-61. doi: 10.1039/c5ib00258c.
- Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T, Fan Y, Lu X, Zhou X, Liu H, Atala A, Rohozinski J, Zhang Y. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells.* 2013 Sep;31(9):1840-56. doi: 10.1002/stem.1424.
- Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol.* 2006 Dec;90(12):1542-7. doi: 10.1136/bjo.2006.098426.
- Birdsall B, Feeney J, Burdett ID, Bawumia S, Barboni EA, Hughes RC. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry.* 2001 Apr 17;40(15):4859-66. doi: 10.1021/bi002907f.
- Bilalovic N, Sandstad B, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Torlakovic EE. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod Pathol.* 2004 Oct;17(10):1251-8. doi: 10.1038/modpathol.3800174.

- Björninen M, Gilmore K, Pelto J, Seppänen-Kajjansinkko R, Kellomäki M, Miettinen S, Wallace G, Grijpma D, Haimi S. Electrically stimulated adipose stem cells on polypyrrole-coated scaffolds for smooth muscle tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2017 Apr;45(4):1015-1026. doi: 10.1007/s10439-016-1755-7. Epub 2016 Nov 14.
- Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarelli M, Soleti A, Navone SE, Canzi L, Cristini S, Invernici G, Parati EA, Alessandri G. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc Cell.* 2011 Feb 8;3(1):5. doi: 10.1186/2045-824X-3-5.
- Bosch-Rué È, Díez-Tercero L, Delgado LM, Pérez RA. Biofabrication of collagen tissue-engineered blood vessels with direct co-axial extrusion. *Int J Mol Sci.* 2022 May 17;23(10):5618. doi: 10.3390/ijms23105618.
- Brož A, Jirka I, Matějka R, Štěpanovská J, Doubková M, Sajdl P, Drahekoupil, J, Volochanskyi O, Futóová T, Bačáková L. Surface modifications of a silicalite film designed for coating orthopaedic implants. *Materials and Design.* 2022, 224(Dec)), 111373. ISSN 0264-1275. E-ISSN 1873-4197. doi: 10.1016/j.matdes.2022.111373.
- Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Apr 29;330(1):142-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.141.
- Burand AJ Jr, Di L, Boland LK, Boyt DT, Schrodt MV, Santillan DA, Ankrum JA. Aggregation of human mesenchymal stromal cells eliminates their ability to suppress human T cells. *Front Immunol.* 2020 Feb 25;11:143. doi: 10.3389/fimmu.2020.00143.
- Cai Y, Li J, Jia C, He Y, Deng C. Therapeutic applications of adipose cell-free derivatives: a review. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Jul 22;11(1):312. doi: 10.1186/s13287-020-01831-3.
- Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Mar 1;3(3):a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994.
- Canesi M, Giordano R, Lazzari L, Isalberti M, Isaias IU, Benti R, Rampini P, Marotta G, Colombo A, Cereda E, Dipaola M, Montemurro T, Viganò M, Budelli S, Montelatici E, Lavazza C, Cortelezzi A, Pezzoli G. Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: mesenchymal stromal cells for progressive supranuclear palsy. *J Transl Med.* 2016 May 10;14(1):127. doi: 10.1186/s12967-016-0880-2.
- Canullo L, Genova T, Naenni N, Nakajima Y, Masuda K, Mussano F. Plasma of argon enhances the adhesion of murine osteoblasts on different graft materials. *Ann Anat.* 2018 Jul;218:265-270. doi: 10.1016/j.aanat.2018.03.005. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29704635.
- Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017 Jun;6(6):1445-1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051.
- Caplan AI. New MSC: MSCs as pericytes are sentinels and gatekeepers. *J Orthop Res.* 2017 Jun;35(6):1151-1159. doi: 10.1002/jor.23560.
- Capuana E, Lopresti F, Ceraulo M, La Carrubba V. Poly-l-lactic acid (PLLA)-based biomaterials for regenerative medicine: a review on processing and applications. *Polymers (Basel).* 2022 Mar 14;14(6):1153. doi: 10.3390/polym14061153.
- Castro-Manrreza ME, Bonifaz L, Castro-Escamilla O, Monroy-García A, Cortés-Morales A, Hernández-Estévez E, Hernández-Cristino J, Mayani H, Montesinos JJ. Mesenchymal stromal cells from the epidermis and dermis of psoriasis patients: morphology, immunophenotype, differentiation patterns, and regulation of T cell proliferation. *Stem Cells Int.* 2019 Dec 1;2019:4541797. doi: 10.1155/2019/4541797.
- Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J.* 2007 Apr 15;92(8):2964-74. doi: 10.1529/biophysj.106.089730.

- Cimino M, Gonçalves RM, Barrias CC, Martins MCL. Xeno-free strategies for safe human mesenchymal stem/stromal cell expansion: supplements and coatings. *Stem Cells Int.* 2017;2017:6597815. doi: 10.1155/2017/6597815.
- Chan TM, Chen JY, Ho LI, Lin HP, Hsueh KW, Liu DD, Chen YH, Hsieh AC, Tsai NM, Hueng DY, Tsai ST, Chou PW, Lin SZ, Harn HJ. ADSC therapy in neurodegenerative disorders. *Cell Transplant.* 2014;23(4-5):549-57. doi: 10.3727/096368914X678445.
- Chen Meng, Jun Song, Samira Malekmohammadi, Jinmin Meng, Wenyuan Wei, Renzhi Li, Jiling Feng, R. Hugh Gong, Jiashen Li, Hierarchical porous poly (L-lactic acid) fibrous vascular graft with controllable architectures and stable structure, *Materials & Design*, Volume 240, 2024, 112829, ISSN 0264-1275, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2024.112829>.
- Cheng MT, Liu CL, Chen TH, Lee OK. Comparison of potentials between stem cells isolated from human anterior cruciate ligament and bone marrow for ligament tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010 Jul;16(7):2237-53. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0664.
- Chen ST, Wu CY, Chen HY. Enhanced growth activities of stem cell spheroids based on a durable and chemically defined surface modification coating. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018 Sep 26;10(38):31882-31891. doi: 10.1021/acsami.8b09103.
- Cheng Y, Lin KH, Young TH, Cheng NC. The influence of fibroblast growth factor 2 on the senescence of human adipose-derived mesenchymal stem cells during long-term culture. *Stem Cells Transl Med.* 2020 Apr;9(4):518-530. doi: 10.1002/sctm.19-0234.
- Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng.* 2015 Mar 1;9:4. doi: 10.1186/s13036-015-0001-4.
- Chiu LL, Radisic M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials.* 2010 Jan;31(2):226-41. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.039.
- Chlupáč J, Filová E, Bačáková L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res.* 2009;58 Suppl 2:S119-S140. doi: 10.33549/physiolres.931918.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014 Jan 7;12:8. doi: 10.1186/1479-5876-12-8. PMID: 24397850; PMCID: PMC3895760.
- Christodoulou I, Kolisis FN, Papaevangelidou D, Zoumpourlis V. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal (wharton's jelly) and adult (adipose tissue) origin during prolonged in vitro expansion: considerations for cytotherapy. *Stem Cells Int.* 2013;2013:246134. doi: 10.1155/2013/246134.
- Coffin JD, Homer-Bouthiette C, Hurley MM. Fibroblast growth factor 2 and its receptors in bone biology and disease. *J Endocr Soc.* 2018 May 28;2(7):657-671. doi: 10.1210/js.2018-00105.
- Coimbra P, Santos P, Alves P, Miguel SP, Carvalho MP, de Sá KD, Correia IJ, Ferreira P. Coaxial electrospun PCL/Gelatin-MA fibers as scaffolds for vascular tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017 Nov 1;159:7-15. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.065.
- Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafroschi F, Mantovani D. Collagen-based tissue engineering strategies for vascular medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Jul 12;7:166. doi: 10.3389/fbioe.2019.00166.
- Corti A, Curnis F. Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin-ligand recognition. *J Cell Sci.* 2011 Feb 15;124(Pt 4):515-22. doi: 10.1242/jcs.077172.
- Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY).* 2011 Oct;3(10):920-33. doi: 10.18632/aging.100369.
- Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained

- from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol.* 2008 May;36(5):642-54. doi: 10.1016/j.exphem.2007.12.015.
- Cummings, R.D.; Liu, F.T. Galectins. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed.; Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., Eds.; Cold Spring Harbor: New York, NY, USA, 2009; ISBN 9780879697709.
- Černochová P, Blahová L, Medalová J, Nečas D, Michlíček M, Kaushik P, Příbyl J, Bartošíková J, Manakhov A, Bačáková L, Zajíčková L. Cell type specific adhesion to surfaces functionalised by amine plasma polymers. *Sci Rep.* 2020 Jun 9;10(1):9357. doi: 10.1038/s41598-020-65889-y.
- da Silva RG, Tavora B, Robinson SD, Reynolds LE, Szekeres C, Lamar J, Batista S, Kostourou V, Germain MA, Reynolds AR, Jones DT, Watson AR, Jones JL, Harris A, Hart IR, Iruela-Arispe ML, Dipersio CM, Kreidberg JA, Hodivala-Dilke KM. Endothelial alpha3beta1-integrin represses pathological angiogenesis and sustains endothelial-VEGF. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1534-48. doi: 10.2353/ajpath.2010.100043.
- Damodaran VB, Leszczak V, Wold KA, Lantvit SM, Popat KC, Reynolds MM. Anti-thrombogenic properties of a nitric oxide-releasing dextran derivative: evaluation of platelet activation and whole blood clotting kinetics. *RSC Adv.* 2013 Dec 14;3(46):10.1039/C3RA45521A. doi: 10.1039/C3RA45521A.
- Dee KC, Andersen TT, Bizios R. Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1998 Jun 5;40(3):371-7. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19980605)40:3<371::aid-jbm5>3.0.co;2-c.
- Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, Hematti P. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol.* 2016;136(2):85-97. doi: 10.1159/000445096.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Duske K, Koban I, Kindel E, Schröder K, Nebe B, Holtfreter B, Jablonowski L, Weltmann KD, Kocher T. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J Clin Periodontol.* 2012 Apr;39(4):400-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01853.x.
- Eagle H, Levine EM. Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature.* 1967;213(5081):1102-1106. doi:10.1038/2131102a0.
- Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc.* 2010 Jul;5(7):1294-311. doi: 10.1038/nprot.2010.81.
- Faia-Torres AB, Guimond-Lischer S, Rottmar M, Charnley M, Goren T, Maniura-Weber K, Spencer ND, Reis RL, Textor M, Neves NM. Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. *Biomaterials.* 2014 Nov;35(33):9023-32. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.015.
- Fang J, Wei Y, Lv C, Peng S, Zhao S, Hua J. CD61 promotes the differentiation of canine ADMSCs into PGC-like cells through modulation of TGF- $\beta$  signaling. *Sci Rep.* 2017 Mar 3;7:43851. doi: 10.1038/srep43851.
- Firoozi N, Kang Y. Immobilization of FGF on poly(xylitol dodecanedioic acid) polymer for tissue regeneration. *Sci Rep.* 2020 Jun 26;10(1):10419. doi: 10.1038/s41598-020-67261-6.
- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 2003 Dec 1;63(23):8302-11.



- Galderisi U, Peluso G, Di Bernardo G. Clinical trials based on mesenchymal stromal cells are exponentially increasing: where are we in recent years? *Stem Cell Rev Rep*. 2022 Jan;18(1):23-36. doi: 10.1007/s12015-021-10231-w.
- Gan F, Liu L, Zhou Q, Huang W, Huang X, Zhao X. Effects of adipose-derived stromal cells and endothelial progenitor cells on adipose transplant survival and angiogenesis. *PLoS One*. 2022 Jan 13;17(1):e0261498. doi: 10.1371/journal.pone.0261498.
- Garzon I, Chato-Astrain J, Campos F, Fernandez-Valades R, Sanchez-Montesinos I, Campos A, Alaminos M, D'Souza RN, Martin-Piedra MA. Expanded differentiation capability of human wharton's jelly stem cells toward pluripotency: a systematic review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020 Aug;26(4):301-312. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0257.
- González PL, Carvajal C, Cuenca J, Alcayaga-Miranda F, Figueroa FE, Bartolucci J, Salazar-Aravena L, Khoury M. Chorion mesenchymal stem cells show superior differentiation, immunosuppressive, and angiogenic potentials in comparison with haploidentical maternal placental cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Oct;4(10):1109-21. doi: 10.5966/sctm.2015-0022.
- Griffin MF, Naderi N, Kalaskar DM, Seifalian AM, Butler PE. Argon plasma surface modification promotes the therapeutic angiogenesis and tissue formation of tissue-engineered scaffolds in vivo by adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Mar 29;10(1):110. doi: 10.1186/s13287-019-1195-z.
- Gu W, Hong X, Le Bras A, Nowak WN, Issa Bhaloo S, Deng J, Xie Y, Hu Y, Ruan XZ, Xu Q. Smooth muscle cells differentiated from mesenchymal stem cells are regulated by microRNAs and suitable for vascular tissue grafts. *J Biol Chem*. 2018 May 25;293(21):8089-8102. doi: 10.1074/jbc.RA118.001739.
- Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, Rockenstein E, Masliah E, Peterson KL, Stallcup WB, Chen J, Evans SM. Pericytes of multiple organs do not behave as mesenchymal stem cells in vivo. *Cell Stem Cell*. 2017 Mar 2;20(3):345-359.e5. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.006.
- Guo S, Kwek MY, Toh ZQ, Pranantyo D, Kang ET, Loh XJ, Zhu X, Jańczewski D, Neoh KG. Tailoring polyelectrolyte architecture to promote cell growth and inhibit bacterial adhesion. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Mar 7;10(9):7882-7891. doi: 10.1021/acsami.8b00666.
- Guo S, Zhu X, Li M, Shi L, Ong JL, Jańczewski D, Neoh KG. Parallel control over surface charge and wettability using polyelectrolyte architecture: effect on protein adsorption and cell adhesion. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Nov 9;8(44):30552-30563. doi: 10.1021/acsami.6b09481.
- Gutiérrez-González A, Aguilera-Montilla N, Ugarte-Berzal E, Bailón E, Cerro-Pardo I, Sánchez-Maroto C, García-Campillo L, García-Marco JA, García-Pardo A.  $\alpha 4\beta 1$  integrin associates with VEGFR2 in CLL cells and contributes to VEGF binding and intracellular signaling. *Blood Adv*. 2019 Jul 23;3(14):2144-2148. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000019.
- Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 8;54(24):2277-86. doi: 10.1016/j.jacc.2009.06.055.
- Harris VK, Stark JW, Yang S, Zanker S, Tuddenham J, Sadiq SA. Mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in progressive MS: Two-year follow-up of a phase I study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 Dec 4;8(1):e928. doi: 10.1212/NXI.0000000000000928.

- Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011 May 14;9:12. doi: 10.1186/1478-811X-9-12.
- Hayman EG, Pierschbacher MD, Suzuki S, Ruoslahti E. Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp Cell Res*. 1985 Oct;160(2):245-58. doi: 10.1016/0014-4827(85)90173-9.
- Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, Mushtaq M, Williams AR, Suncion VY, McNiece IK, Ghersin E, Soto V, Lopera G, Miki R, Willens H, Hendel R, Mitrani R, Pattany P, Feigenbaum G, Oskouei B, Byrnes J, Lowery MH, Sierra J, Pujol MV, Delgado C, Gonzalez PJ, Rodriguez JE, Bagno LL, Rouy D, Altman P, Foo CW, da Silva J, Anderson E, Schwarz R, Mendizabal A, Hare JM. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA*. 2014 Jan 1;311(1):62-73. doi: 10.1001/jama.2013.282909.
- Heo DN, Castro NJ, Lee SJ, Noh H, Zhu W, Zhang LG. Enhanced bone tissue regeneration using a 3D printed microstructure incorporated with a hybrid nano hydrogel. *Nanoscale*. 2017 Apr 20;9(16):5055-5062. doi: 10.1039/c6nr09652b.
- Hernández R, Jiménez-Luna C, Perales-Adán J, Perazzoli G, Melguizo C, Prados J. Differentiation of human mesenchymal stem cells towards neuronal lineage: clinical trials in nervous system disorders. *Biomol Ther (Seoul)*. 2020 Jan 1;28(1):34-44. doi: 10.4062/biomolther.2019.065.
- Hernández AE, García E. Mesenchymal stem cell therapy for alzheimer's disease. *Stem Cells Int*. 2021 Sep 1;2021:7834421. doi: 10.1155/2021/7834421.
- Hillary CJ, Roman S, Bullock AJ, Green NH, Chapple CR, MacNeil S. Developing repair materials for stress urinary incontinence to withstand dynamic distension. *PLoS One*. 2016 Mar 16;11(3):e0149971. doi: 10.1371/journal.pone.0149971.
- Hodge J, Quint C. Tissue engineered vessel from a biodegradable electrospun scaffold stimulated with mechanical stretch. *Biomed Mater*. 2020 Jul 27;15(5):055006. doi: 10.1088/1748-605X/ab8e98.
- Hong H, Stegemann JP. 2D and 3D collagen and fibrin biopolymers promote specific ECM and integrin gene expression by vascular smooth muscle cells. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008;19(10):1279-93. doi: 10.1163/156856208786052380.
- Horváthy DB, Vác G, Cselenyák A, Weszl M, Kiss L, Lacza Z. Albumin-coated bioactive suture for cell transplantation. *Surg Innov*. 2013 Jun;20(3):249-55. doi: 10.1177/1553350612451353.
- Hu K, Li Y, Ke Z, Yang H, Lu C, Li Y, Guo Y, Wang W. History, progress and future challenges of artificial blood vessels: a narrative review. *Biomater Transl*. 2022 Mar 28;3(1):81-98. doi: 10.12336/biomatertransl.2022.01.008.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):792-806. doi: 10.1177/0022034509340867.
- Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):667-76. doi: 10.1016/s0300-9084(01)01289-5.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 2006 Oct 1;119(Pt 19):3901-3. doi: 10.1242/jcs.03098.
- Hutchings H, Ortega N, Plouët J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J*. 2003 Aug;17(11):1520-2. doi: 10.1096/fj.02-0691fje.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6.

- Hyun YM, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res.* 2009 Dec;45(2-3):195-208. doi: 10.1007/s12026-009-8101-1.
- Isacchi A, Bergonzoni L, Statuto M, Rusnati M, Chiesa R, Caccia P, Sarmientos P, Presta M, Ragnotti G. A mutant of basic fibroblast growth factor that has lost the ability to stimulate plasminogen activator synthesis in endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;638:369-77. doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb49047.x.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology.* 2004;5(1):1-10. doi: 10.1023/b:bgen.0000017682.96395.10.
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2006 Dec 1;99(5):1285-97. doi: 10.1002/jcb.20904.
- Jaillard A, Hommel M, Moisan A, Zeffiro TA, Favre-Wiki IM, Barbieux-Guillot M, Vadot W, Marcel S, Lamalle L, Grand S, Detante O; (for the ISIS-HERMES Study Group). Autologous mesenchymal stem cells improve motor recovery in subacute ischemic stroke: a randomized clinical trial. *Transl Stroke Res.* 2020 Oct;11(5):910-923. doi: 10.1007/s12975-020-00787-z.
- Jia T, Jacquet T, Dalonneau F, Coudert P, Vaganay E, Exbrayat-Héritier C, Vollaire J, Josserand V, Ruggiero F, Coll JL, Eymin B. FGF-2 promotes angiogenesis through a SRSF1/SRSF3/SRPK1-dependent axis that controls VEGFR1 splicing in endothelial cells. *BMC Biol.* 2021 Aug 25;19(1):173. doi: 10.1186/s12915-021-01103-3.
- Jorgenson KD, Hart DA, Krawetz R, Sen A. Production of adult human synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in stirred-suspension culture. *Stem Cells Int.* 2018 Mar 27;2018:8431053. doi: 10.1155/2018/8431053.
- Jouda H, Larrea Murillo L, Wang T. Current progress in vascular engineering and its clinical applications. *Cells.* 2022 Jan 31;11(3):493. doi: 10.3390/cells11030493.
- Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 2008 Jun;332(3):415-26. doi: 10.1007/s00441-007-0555-7.
- Kachroo U, Ramasamy B, Vinod E. Evaluation of CD49e as a distinguishing marker for human articular cartilage derived chondroprogenitors. *Knee.* 2020 Jun;27(3):833-837. doi: 10.1016/j.knee.2020.04.002.
- Kamranvar SA, Rani B, Johansson S. Cell Cycle Regulation by integrin-mediated adhesion. *Cells.* 2022 Aug 14;11(16):2521. doi: 10.3390/cells11162521.
- Kang JM, Han M, Park IS, Jung Y, Kim SH, Kim SH. Adhesion and differentiation of adipose-derived stem cells on a substrate with immobilized fibroblast growth factor. *Acta Biomater.* 2012 May;8(5):1759-67. doi: 10.1016/j.actbio.2012.01.005.
- Kang J, Park HM, Kim YW, Kim YH, Varghese S, Seok HK, Kim YG, Kim SH. Control of mesenchymal stem cell phenotype and differentiation depending on cell adhesion mechanism. *Eur Cell Mater.* 2014 Nov 25;28:387-403. doi: 10.22203/ecm.v028a27.
- Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006 May;37(10):967-76. doi: 10.1038/sj.bmt.1705358.
- Khalili AA, Ahmad MR. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug 5;16(8):18149-84. doi: 10.3390/ijms160818149.
- Khan S, Villalobos MA, Chronon RL, Chang S, Brown SA, Carpenter JP, Tulenko TN, 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 May;65(5):1483-1492. doi: 10.1016/j.jvs.2016.04.034.

- Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 16;107(11):4872-7. doi: 10.1073/pnas.0903269107.
- Kim B, Jo H, Choi BY, Ryu J. Enhanced recellularization by using albumin coating with roller bottle cell culture. *Regen Ther*. 2023 Oct 31;24:568-573. doi: 10.1016/j.reth.2023.10.002.
- Kim DH, Han K, Gupta K, Kwon KW, Suh KY, Levchenko A. Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(29):5433-44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.042.
- Kim HJ, Kim SH, Kim MS, Lee EJ, Oh HG, Oh WM, Park SW, Kim WJ, Lee GJ, Choi NG, Koh JT, Dinh DB, Hardin RR, Johnson K, Sylvia VL, Schmitz JP, Dean DD. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Sep 1;74(3):366-73. doi: 10.1002/jbm.a.30327.
- Kim MH, Hong HN, Hong JP, Park CJ, Kwon SW, Kim SH, Kang G, Kim M. The effect of VEGF on the myogenic differentiation of adipose tissue derived stem cells within thermosensitive hydrogel matrices. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1213-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.057.
- Kim YK, Lee KB, Kim SY, Jang YS, Kim JH, Lee MH. Improvement of osteogenesis by a uniform PCL coating on a magnesium screw for biodegradable applications. *Sci Rep*. 2018 Sep 5;8(1):13264. doi: 10.1038/s41598-018-31359-9.
- Kiritani S, Kaneko J, Ito D, Morito M, Ishizawa T, Akamatsu N, Tanaka M, Iida T, Tanaka T, Tanaka R, Asakura T, Arita J, Hasegawa K. Silk fibroin vascular graft: a promising tissue-engineered scaffold material for abdominal venous system replacement. *Sci Rep*. 2020 Dec 3;10(1):21041. doi: 10.1038/s41598-020-78020-y.
- Kong CH, Lin XY, Woo CC, Wong HC, Lee CN, Richards AM, Sorokin VA. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013 Jan;16(1):11-5. doi: 10.1093/icvts/ivs421.
- Kong XB, Tang QY, Chen XY, Tu Y, Sun SZ, Sun ZL. Polyethylene glycol as a promising synthetic material for repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2017 Jun;12(6):1003-1008. doi: 10.4103/1673-5374.208597.
- Kopova I, Stráský J, Harcuba P, Landa M, Janeček M, Bačáková L. Newly developed Ti-Nb-Zr-Ta-Si-Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength and enhanced biocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Mar;60:230-238. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.043.
- Krejzová J, Kulík N, Slámová K, Křen V. Expression of human  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase B in yeast eases the search for selective inhibitors. *Enzyme Microb Technol*. 2016 Jul;89:1-6. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.03.003.
- Kumar T, Singh A, Thakre S, Acharya S, Shukla S, Kumar S. Scientific evolution of artificial heart valves: a narrative review. *Cureus*. 2023 Jul 19;15(7):e42131. doi: 10.7759/cureus.42131.
- Kumorek M, Kubies D, Filová E, Houska M, Kasoju N, Mázl Chánová E, Matějka R, Krýslová M, Bačáková L, Rypáček F. Cellular responses modulated by FGF-2 adsorbed on albumin/heparin layer-by-layer assemblies. *PLoS One*. 2015 May 6;10(5):e0125484. doi: 10.1371/journal.pone.0125484.
- Kutová A, Staňková L, Vejvodová K, Kvítek O, Vokatá B, Fajstavr D, Kolská Z, Brož A, Bačáková L, Švorčík V. Influence of drying method and argon plasma modification of bacterial nanocellulose on keratinocyte adhesion and growth. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Jul 26;11(8):1916. doi: 10.3390/nano11081916.

- LaFoya B, Munroe JA, Miyamoto A, Detweiler MA, Crow JJ, Gazdik T, Albig AR. Beyond the matrix: the many non-ECM ligands for integrins. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 2;19(2):449. doi: 10.3390/ijms19020449.
- Lai WT, Krishnappa V, Phinney DG. Fibroblast growth factor 2 (Fgf2) inhibits differentiation of mesenchymal stem cells by inducing Twist2 and Spry4, blocking extracellular regulated kinase activation, and altering Fgf receptor expression levels. *Stem Cells*. 2011 Jul;29(7):1102-11. doi: 10.1002/stem.661.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926. doi:10.1126/science.8493529
- Le Marer N, Hughes RC. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol*. 1996 Jul;168(1):51-8. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199607)168:1<51::AID-JCP7>3.0.CO;2-7.
- Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghirolli DI, Pranke P. Vascular tissue engineering: polymers and methodologies for small caliber vascular grafts. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Jan 11;7:592361. doi: 10.3389/fcvm.2020.592361.
- Lee DY, Lee SY, Yun SH, Jeong JW, Kim JH, Kim HW, Choi JS, Kim GD, Joo ST, Choi I, Hur SJ. Review of the current research on fetal bovine serum and the development of cultured meat. *Food Sci Anim Resour*. 2022 Sep;42(5):775-799. doi: 10.5851/kosfa.2022.e46. Epub 2022 Sep 1.
- Lee J, Jeon O, Kong M, Abdeen AA, Shin JY, Lee HN, Lee YB, Sun W, Bandaru P, Alt DS, Lee K, Kim HJ, Lee SJ, Chaterji S, Shin SR, Alsberg E, Khademhosseini A. Combinatorial screening of biochemical and physical signals for phenotypic regulation of stem cell-based cartilage tissue engineering. *Sci Adv*. 2020 May 22;6(21):eaaz5913. doi: 10.1126/sciadv.aaz5913.
- Lee JS, Park TH, Ryu JY, Kim DK, Oh EJ, Kim HM, Shim JH, Yun WS, Huh JB, Moon SH, Kang SS, Chung HY. Osteogenesis of 3D-printed PCL/TCP/bdECM scaffold using adipose-derived stem cells aggregates; an experimental study in the canine mandible. *Int J Mol Sci*. 2021 May 21;22(11):5409. doi: 10.3390/ijms22115409.
- Lee JW, Chu SG, Kim HT, Choi KY, Oh EJ, Shim JH, Yun WS, Huh JB, Moon SH, Kang SS, Chung HY. Osteogenesis of adipose-derived and bone marrow stem cells with polycaprolactone/tricalcium phosphate and three-dimensional printing technology in a dog model of maxillary bone defects. *Polymers (Basel)*. 2017 Sep 15;9(9):450. doi: 10.3390/polym9090450.
- Lee MJ, Kim MY, Heo SC, Kwon YW, Kim YM, Do EK, Park JH, Lee JS, Han J, Kim JH. Macrophages regulate smooth muscle differentiation of mesenchymal stem cells via a prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -mediated paracrine mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Nov;32(11):2733-40. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300230.
- Lerman MJ, Lembong J, Gillen G, Fisher JP. 3D printing in cell culture systems and medical applications. *Appl Phys Rev*. 2018 Dec;5(4):041109. doi: 10.1063/1.5046087.
- Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Sep;128(3):663-672. doi: 10.1097/PRS.0b013e318221db33.
- Li J, Bardy J, Yap LY, Chen A, Nurcombe V, Cool SM, Oh SK, Birch WR. Impact of vitronectin concentration and surface properties on the stable propagation of human embryonic stem cells. *Biointerphases*. 2010 Sep;5(3):FA132-42. doi: 10.1116/1.3525804.
- Li J., Zheng L., Zeng L., Zhang Y., Jiang L., Song J. RGD peptide-grafted graphene oxide as a new biomimetic nanointerface for impedance-monitoring cell behaviors. *J Nanomater*. 2016; doi: 10.1155/2016/2828512.

- Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res*. 1996 Feb;78(2):188-95. doi: 10.1161/01.res.78.2.188.
- Li SN, Wu JF. TGF- $\beta$ /SMAD signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Jan 29;11(1):41. doi: 10.1186/s13287-020-1552-y.
- Li X, Chen H, Yang B. Centrifugally spun starch-based fibers from amylopectin rich starches. *Carbohydr Polym*. 2016 Feb 10;137:459-465. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.079.
- Li X, Guo W, Zha K, Jing X, Wang M, Zhang Y, Hao C, Gao S, Chen M, Yuan Z, Wang Z, Zhang X, Shen S, Li H, Zhang B, Xian H, Zhang Y, Sui X, Qin L, Peng J, Liu S, Lu S, Guo Q. Enrichment of CD146<sup>+</sup> adipose-derived stem cells in combination with articular cartilage extracellular matrix scaffold promotes cartilage regeneration. *Theranostics*. 2019 Jul 9;9(17):5105-5121. doi: 10.7150/thno.33904.
- Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y, Chen X. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cell Mol Biol Lett*. 2021 Jan 20;26(1):3. doi: 10.1186/s11658-020-00246-5.
- Lin CS, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1159-63. doi: 10.3109/14653249.2012.729817.
- Lin J, Zhu Q, Huang J, Cai R, Kuang Y. Hypoxia promotes vascular smooth muscle cell (VSMC) differentiation of adipose-derived stem cell (ADSC) by regulating *Mettl3* and paracrine factors. *Stem Cells Int*. 2020 Feb 20;2020:2830565. doi: 10.1155/2020/2830565.
- Liskova J, Hadraba D, Filova E, Konarik M, Pirk J, Jelen K, Bacakova L. Valve interstitial cell culture: Production of mature type I collagen and precise detection. *Microsc Res Tech*. 2017 Aug;80(8):936-942. doi: 10.1002/jemt.22886.
- Liu R, Jin JP. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene*. 2016 Jul 1;585(1):143-153. doi: 10.1016/j.gene.2016.02.040.
- Lotfy A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Apr 7;14(1):66. doi: 10.1186/s13287-023-03287-7.
- Lu H, Kawazoe N, Kitajima T, Myoken Y, Tomita M, Umezawa A, Chen G, Ito Y. Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(26):6140-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.038.
- Luzuriaga J, Irurzun J, Irastorza I, Unda F, Ibarretxe G, Pineda JR. Vasculogenesis from human dental pulp stem cells grown in matrigel with fully defined serum-free culture media. *Biomedicines*. 2020 Nov 9;8(11):483. doi: 10.3390/biomedicines8110483.
- Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, Li Y. Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Res Ther*. 2015 May 27;6(1):103. doi: 10.1186/s13287-015-0083-4.
- Ma Y, Kakudo N, Morimoto N, Lai F, Taketani S, Kusumoto K. Fibroblast growth factor-2 stimulates proliferation of human adipose-derived stem cells via Src activation. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Nov 27;10(1):350. doi: 10.1186/s13287-019-1462-z.
- Maio M, Brasoveanu LI, Coral S, Sigalotti L, Lamaj E, Gasparollo A, Visintin A, Altomonte M, Fonsatti E. Structure, distribution, and functional role of protectin (CD59) in complement-susceptibility and in immunotherapy of human malignancies (Review). *Int J Oncol*. 1998 Aug;13(2):305-18. doi: 10.3892/ijo.13.2.305.
- Maione-Silva L, de Castro EG, Nascimento TL, Cintra ER, Moreira LC, Cintra BAS, Valadares MC, Lima EM. Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits

- increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. *Sci Rep.* 2019 Jan 24;9(1):522. doi: 10.1038/s41598-018-36682-9.
- Maleki S, Shamloo A, Kalantarnia F. Tubular TPU/SF nanofibers covered with chitosan-based hydrogels as small-diameter vascular grafts with enhanced mechanical properties. *Sci Rep.* 2022 Apr 13;12(1):6179. doi: 10.1038/s41598-022-10264-2.
- Marędziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2152435. doi: 10.1155/2016/2152435.
- McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 2004 Apr;6(4):483-95. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00075-9.
- McKenna KA, Hinds MT, Sarao RC, Wu PC, Maslen CL, Glanville RW, Babcock D, Gregory KW. Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials. *Acta Biomater.* 2012 Jan;8(1):225-33. doi: 10.1016/j.actbio.2011.08.001.
- Merfeld-Clauss S, Lupov IP, Lu H, Feng D, Compton-Craig P, March KL, Traktuev DO. Adipose stromal cells differentiate along a smooth muscle lineage pathway upon endothelial cell contact via induction of activin A. *Circ Res.* 2014 Oct 10;115(9):800-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304026.
- Mildmay-White A, Khan W. Cell surface markers on adipose-derived stem cells: a systematic review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017;12(6):484-492. doi: 10.2174/1574888X11666160429122133.
- Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2015 Mar;147:123-135. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.008.
- Miyagi Y, Chiu LL, Cimini M, Weisel RD, Radisic M, Li RK. Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. *Biomaterials.* 2011 Feb;32(5):1280-90. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.007.
- Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum.* 2006 Mar;54(3):843-53. doi: 10.1002/art.21651.
- Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, Pic-Taylor A, Toledo OA, Marti LC, Azevedo RB, Oliveira DM. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Jul 28;7(1):97. doi: 10.1186/s13287-016-0359-3.
- Morandi EM, Verstappen R, Zwierzina ME, Geley S, Pierer G, Ploner C. ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells. *Sci Rep.* 2016 Jul 1;6:28889. doi: 10.1038/srep28889.
- Morita M, Suyama Y, Notsu T, Fukuoka K, Ikuta K, Kanayama H, Umeda R, Teraoka S, Minato H, Ninomiya H, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Hisatome I, Yagi S. Effects of conditioned medium of adipose-derived stem cells exposed to platelet-rich plasma on the expression of endothelial nitric oxide synthase and angiogenesis by endothelial cells. *Ann Plast Surg.* 2023 Feb 1;90(2):171-179. doi: 10.1097/SAP.0000000000003368.
- Murphy SV, Atala A. Organ engineering--combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *Bioessays.* 2013 Mar;35(3):163-72. doi: 10.1002/bies.201200062.
- Müller HM, Steringer JP, Wegehingel S, Bleicken S, Münster M, Dimou E, Unger S, Weidmann G, Andreas H, García-Sáez AJ, Wild K, Sinning I, Nickel W. Formation of disulfide bridges drives oligomerization, membrane pore formation, and translocation of

- fibroblast growth factor 2 to cell surfaces. *J Biol Chem*. 2015 Apr 3;290(14):8925-37. doi: 10.1074/jbc.M114.622456.
- Múzes G, Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A potential therapeutic option for autoimmune and immune-mediated inflammatory diseases. *Cells*. 2022 Jul 26;11(15):2300. doi: 10.3390/cells11152300.
- Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):899-909. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64959-0.
- Neri S. Genetic Stability of Mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: a fundamental biosafety aspect. *Int J Mol Sci*. 2019 May 15;20(10):2406. doi: 10.3390/ijms20102406.
- Nguyen LT, Tran NT, Than UTT, Nguyen MQ, Tran AM, Do PTX, Chu TT, Nguyen TD, Bui AV, Ngo TA, Hoang VT, Hoang NTM. Optimization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell isolation and culture methods in serum- and xeno-free conditions. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jan 10;13(1):15. doi: 10.1186/s13287-021-02694-y.
- Ni R, Luo C, Ci H, Sun D, An R, Wang Z, Yang J, Li Y, Sun J. Construction of vascularized tissue-engineered breast with dual angiogenic and adipogenic micro-tissues. *Mater Today Bio*. 2022 Dec 30;18:100539. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100539.
- Ning H, Liu G, Lin G, Yang R, Lue TF, Lin CS. Fibroblast growth factor 2 promotes endothelial differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *J Sex Med*. 2009 Apr;6(4):967-979. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01172.x.
- Novotna K, Zajdlova M, Suchy T, Hadraba D, Lopot F, Zaloudkova M, Douglas TE, Munzarova M, Juklickova M, Stranska D, Kubies D, Schaubroeck D, Wille S, Balcaen L, Jarosova M, Kozak H, Kromka A, Svindrych Z, Lisa V, Balik K, Bacakova L. Polylactide nanofibers with hydroxyapatite as growth substrates for osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Nov;102(11):3918-30. doi: 10.1002/jbm.a.35061
- OECD/European Observatory on Health Systems and Policies (2024), *Česko: zdravotní profil země 2023*, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/c0c44f04-cs.
- Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-77. doi: 10.1080/14653240600621125.
- Oeller M, Laner-Plamberger S, Krisch L, Rohde E, Strunk D, Schallmoser K. Human platelet lysate for good manufacturing practice-compliant cell production. *Int J Mol Sci*. 2021 May 13;22(10):5178. doi: 10.3390/ijms22105178.
- Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015 May-Jun;4(3):215-66. doi: 10.1002/wdev.176.
- Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84. doi: 10.1634/stemcells.22-3-377.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):767-801. doi: 10.1152/physrev.00041.2003.
- Palumbo P, Miconi G, Cinque B, La Torre C, Lombardi F, Zoccali G, Orsini G, Leocata P, Giuliani M, Cifone MG. In vitro evaluation of different methods of handling human liposuction aspirate and their effect on adipocytes and adipose derived stem cells. *J Cell Physiol*. 2015 Aug;230(8):1974-81. doi: 10.1002/jcp.24965.
- Pamula E, Bacakova L, Filova E, Buczynska J, Dobrzynski P, Noskova L, Grausova L. The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human



- osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):425-35. doi: 10.1007/s10856-007-3001-1.
- Pamula E, Filová E, Bacáková L, Lisá V, Adamczyk D. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009 May;89(2):432-43. doi: 10.1002/jbm.a.31977.
- Park EH, Lim HS, Lee S, Roh K, Seo KW, Kang KS, Shin K. Intravenous infusion of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis: a phase Ia clinical trial. *Stem Cells Transl Med*. 2018 Sep;7(9):636-642. doi: 10.1002/sctm.18-0031.
- Park IS, Kim SH, Heo DN, Jung Y, Kwon IK, Rhie JW, Kim SH. Synergistic effect of biochemical factors and strain on the smooth muscle cell differentiation of adipose-derived stem cells on an elastic nanofibrous scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2012;23(12):1579-93. doi: 10.1163/092050611X587538.
- Park S, Choi KS, Kim D, Kim W, Lee D, Kim HN, Hyun H, Lim KT, Kim JW, Kim YR, Kim J. Controlled extracellular topographical and chemical cues for acceleration of neuronal development. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Volume 61, 2018, Pages 65-70, ISSN 1226-086X, doi: 10.1016/j.jiec.2017.12.001.
- Parmar N, Ahmadi R, Day RM. A novel method for differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth muscle-like cells on clinically deliverable thermally induced phase separation microspheres. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Apr;21(4):404-12. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0431.
- Parvizi M, Bolhuis-Versteeg LA, Poot AA, Harmsen MC. Efficient generation of smooth muscle cells from adipose-derived stromal cells by 3D mechanical stimulation can substitute the use of growth factors in vascular tissue engineering. *Biotechnol J*. 2016 Jul;11(7):932-44. doi: 10.1002/biot.201500519.
- Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009;58(3):718-725. doi:10.2337/db08-1098.
- Patrikoski M, Juntunen M, Boucher S, Campbell A, Vemuri MC, Mannerström B, Miettinen S. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Mar 7;4(2):27. doi: 10.1186/scrt175.
- Pavathuparambil Abdul Manaph N, Sivanathan KN, Nitschke J, Zhou XF, Coates PT, Drogemuller CJ. An overview on small molecule-induced differentiation of mesenchymal stem cells into beta cells for diabetic therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Sep 23;10(1):293. doi: 10.1186/s13287-019-1396-5.
- Pelham RJ Jr, Wang YI. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13661-5. doi: 10.1073/pnas.94.25.13661.
- Peng R, Yao X, Cao B, Tang J, Ding J. The effect of culture conditions on the adipogenic and osteogenic inductions of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(26):6008-19. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.010.
- Peng R, Yao X, Ding J. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(32):8048-57. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.035.
- Presta M, Statuto M, Isacchi A, Caccia P, Pozzi A, Gualandris A, Rusnati M, Bergonzoni L, Sarmientos P. Structure-function relationship of basic fibroblast growth factor: site-directed mutagenesis of a putative heparin-binding and receptor-binding region. *Biochem*

- Biophys Res Commun. 1992 Jun 30;185(3):1098-107. doi: 10.1016/0006-291x(92)91739-d.
- Qu X, Zhu W, Huang S, Li JY, Chien S, Zhang K, Chen S. Relative impact of uniaxial alignment vs. form-induced stress on differentiation of human adipose derived stem cells. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(38):9812-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.009.
- Qu Y, Cao C, Wu Q, Huang A, Song Y, Li H, Zuo Y, Chu C, Li J, Man Y. The dual delivery of KGF and bFGF by collagen membrane to promote skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jun;12(6):1508-1518. doi: 10.1002/term.2691.
- Rahman MM, Subramani J, Ghosh M, Denninger JK, Takeda K, Fong GH, Carlson ME, Shapiro LH. CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle. *Front Physiol*. 2014 Jan 9;4:402. doi: 10.3389/fphys.2013.00402.
- Rico P, Rodrigo-Navarro A, de la Peña M, Moulisová V, Costell M, Salmerón-Sánchez M. Simultaneous boron ion-channel/growth factor receptor activation for enhanced vascularization. *Adv Biosyst*. 2019 Jan;3(1):e1800220. doi: 10.1002/adbi.201800220.
- Robinson DE, Smith LE, Steele DA, Short RD, Whittle JD. Development of a surface to enhance the effectiveness of fibroblast growth factor 2 (FGF-2). *Biomater Sci*. 2014 Jun 7;2(6):875-882. doi: 10.1039/c4bm00018h.
- Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T, Fuller RS. Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev*. 2002 Dec;102(12):4525-48. doi: 10.1021/cr010168i.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 8;103(32):12167-72. doi: 10.1073/pnas.0604850103.
- Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, Antsaklis A, Anagnostou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007 Dec;16(6):931-52. doi: 10.1089/scd.2007.0036.
- Rumiński S, Ostrowska B, Jaroszewicz J, Skirecki T, Włodarski K, Świążkowski W, Lewandowska-Szumieł M. Three-dimensional printed polycaprolactone-based scaffolds provide an advantageous environment for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jan;12(1):e473-e485. doi: 10.1002/term.2310.
- Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:697-715. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697.
- Rusnati M, Tanghetti E, Dell'Era P, Gualandris A, Presta M.  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 1997 Dec;8(12):2449-61. doi: 10.1091/mbc.8.12.2449.
- Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*. 2010 Apr;28(4):788-98. doi: 10.1002/stem.312.
- Saraboji K, Håkansson M, Genheden S, Diehl C, Qvist J, Weininger U, Nilsson UJ, Leffler H, Ryde U, Akke M, Logan DT. The carbohydrate-binding site in galectin-3 is preorganized to recognize a sugarlike framework of oxygens: ultra-high-resolution structures and water dynamics. *Biochemistry*. 2012 Jan 10;51(1):296-306. doi: 10.1021/bi201459p. Epub 2011 Dec 7.
- Saravanan C, Liu FT, Gipson IK, Panjwani N. Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin. *J Cell Sci*. 2009 Oct 15;122(Pt 20):3684-93. doi: 10.1242/jcs.045674.

- Sauer DG, Mosor M, Frank AC, Weiß F, Christler A, Walch N, Jungbauer A, Dürauer A. A two-step process for capture and purification of human basic fibroblast growth factor from *E. coli* homogenate: yield versus endotoxin clearance. *Protein Expr Purif.* 2019 Jan;153:70-82. doi: 10.1016/j.pep.2018.08.009.
- Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, Anand S, Woo G, Leem C, Faridi MH, Geraghty T, Rajagopalan A, Gupta S, Ahmed M, Vazquez-Padron RI, Cheresch DA, Gupta V, Varner JA. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun.* 2018 Dec 19;9(1):5379. doi: 10.1038/s41467-018-07387-4.
- Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, Bellotti C, Salehi LB, Ricci A. Galectin-3: one molecule for an alphabet of diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 26;19(2):379. doi: 10.3390/ijms19020379.
- Sedlář A, Trávníčková M, Matějka R, Pražák Š, Mészáros Z, Bojarová P, Bačáková L, Křen V, Slámová K. Growth factors VEGF-A<sub>165</sub> and FGF-2 as multifunctional biomolecules governing cell adhesion and proliferation. *Int J Mol Sci.* 2021a Feb 12;22(4):1843. doi: 10.3390/ijms22041843.
- Sedlář A, Trávníčková M, Bojarová P, Vlachová M, Slámová K, Křen V, Bačáková L. Interaction between galectin-3 and integrins mediates cell-matrix adhesion in endothelial cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2021b May 13;22(10):5144. doi: 10.3390/ijms22105144.
- Sedlář A, Vrbata D, Pokorná K, Holzerová K, Červený J, Kočková O, Hlaváčková M, Doubková M, Musílková J, Křen V, Kolář F, Bačáková L, Bojarová P. Glycopolymer Inhibitors of Galectin-3 Suppress the Markers of Tissue Remodeling in Pulmonary Hypertension. *J Med Chem.* 2024 Jun 13;67(11):9214-9226. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c00341.
- Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Mar 7;5:18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.
- Shafaei H, Kalarestaghi H. Adipose-derived stem cells: An appropriate selection for osteogenic differentiation. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):8371-8386. doi: 10.1002/jcp.29681.
- Shi L, Aid R, Le Visage C, Chew SY. Biomimicking polysaccharide nanofibers promote vascular phenotypes: a potential application for vascular tissue engineering. *Macromol Biosci.* 2012 Mar;12(3):395-401. doi: 10.1002/mabi.201100336.
- Shin YM, Lee YB, Kim SJ, Kang JK, Park JC, Jang W, Shin H. Mussel-inspired immobilization of vascular endothelial growth factor (VEGF) for enhanced endothelialization of vascular grafts. *Biomacromolecules.* 2012 Jul 9;13(7):2020-8. doi: 10.1021/bm300194b.
- Shen X, Pan B, Zhou H, Liu L, Lv T, Zhu J, Huang X, Tian J. Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes is regulated by miRNA-1-2 via WNT signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017 May 10;24(1):29. doi: 10.1186/s12929-017-0337-9.
- Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater.* 2008 May;4(3):477-89. doi: 10.1016/j.actbio.2007.12.011.
- Siddiqui N, Asawa S, Birru B, Baadhe R, Rao S. PCL-based composite scaffold matrices for tissue engineering applications. *Mol Biotechnol.* 2018 Jul;60(7):506-532. doi: 10.1007/s12033-018-0084-5.
- Silva FJ, Holt DJ, Vargas V, Yockman J, Boudina S, Atkinson D, Grainger DW, Revelo MP, Sherman W, Bull DA, Patel AN. Metabolically active human brown adipose tissue derived stem cells. *Stem Cells.* 2014 Feb;32(2):572-81. doi: 10.1002/stem.1595.
- Sivkova R, Táborská J, Reparaz A, de Los Santos Pereira A, Kotelnikov I, Proks V, Kučka J, Svoboda J, Riedel T, Pop-Georgievski O. Surface design of antifouling vascular constructs

- bearing biofunctional peptides for tissue regeneration applications. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 16;21(18):6800. doi: 10.3390/ijms21186800.
- Skalský I, Szárszoi O, Filová E, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Capek M, Pirk J, Bačáková L. A perivascular system releasing sirolimus prevented intimal hyperplasia in a rabbit model in a medium-term study. *Int J Pharm.* 2012 May 10;427(2):311-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.02.023.
- Song W, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Adipogenic differentiation of individual mesenchymal stem cell on different geometric micropatterns. *Langmuir.* 2011 May 17;27(10):6155-62. doi: 10.1021/la200487w.
- Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. Osteoblast adhesion and morphology on TiO<sub>2</sub> depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Feb;84(2):281-90. doi: 10.1002/jbm.a.31201.
- Spitaleri A, Mari S, Curnis F, Traversari C, Longhi R, Bordignon C, Corti A, Rizzardì GP, Musco G. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin. *J Biol Chem.* 2008 Jul 11;283(28):19757-68. doi: 10.1074/jbc.M710273200.
- Staňková L, Kutová A, Doubková M, Kvítek O, Vokatá B, Sedlár A, Idriss H, Slepíčka P, Švorčík V, Bačáková L. Argon plasma-modified bacterial nanocellulose: Cell-specific differences in the interaction with fibroblasts and endothelial cells. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 7 (2024) 100470. doi: 10.1016/j.carpta.2024.100470.
- Steele JG, Johnson G, Underwood PA. Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene. *J Biomed Mater Res.* 1992 Jul;26(7):861-84. doi: 10.1002/jbm.820260704.
- Stukel JM, Willits RK. The interplay of peptide affinity and scaffold stiffness on neuronal differentiation of neural stem cells. *Biomed Mater.* 2018 Feb 2;13(2):024102. doi: 10.1088/1748-605X/aa9a4b.
- Sun S, Cui Y, Yuan B, Dou M, Wang G, Xu H, Wang J, Yin W, Wu D, Peng C. Drug delivery systems based on polyethylene glycol hydrogels for enhanced bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Jan 30;11:1117647. doi: 10.3389/fbioe.2023.1117647.
- Suzuki O, Abe M, Hashimoto Y. Sialylation and glycosylation modulate cell adhesion and invasion to extracellular matrix in human malignant lymphoma: Dependency on integrin and the Rho GTPase family. *Int J Oncol.* 2015 Dec;47(6):2091-9. doi: 10.3892/ijo.2015.3211.
- Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol.* 2002 Jun;81(6):313-21. doi: 10.1078/0171-9335-00256.
- Šimonová A, Kupper CE, Böcker S, Müller A, Hofbauerová K, Pelantová H, Elling L, Křen V, Bojarová P. Chemoenzymatic synthesis of LacdiNAc dimers of varying length as novel galectin ligands. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2014, 101, 47–55. doi: 10.1016/1.molcatb.2013.12.018.
- Šponer P, Kučera T, Brtková J, Urban K, Kočí Z, Měříčka P, Bezrouk A, Konrádová Š, Filipová A, Filip S. Comparative study on the application of mesenchymal stromal cells combined with tricalcium phosphate scaffold into femoral bone defects. *Cell Transplant.* 2018 Oct;27(10):1459-1468. doi: 10.1177/0963689718794918.
- Švorčík V, Makajová Z, Kasálková-Slepícková N, Kolská Z, Bačáková L. Plasma-modified and polyethylene glycol-grafted polymers for potential tissue engineering applications. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012 Aug;12(8):6665-71. doi: 10.1166/jnn.2012.4545.
- Švorčík V, Kasálková N, Slepíčka P, Záruba K, Král V, Bačáková L, Pařízek M, Lisá V, Ruml T, Gbelcová H, Rimpelová S, Macková A. Cytocompatibility of Ar<sup>+</sup> plasma treated and

- Au nanoparticle-grafted PE. *Nucl Instr Meth Phys Res B* 2009;267(11):1904–10. doi: 10.1016/j.nimb.2009.03.099.
- Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol.* 2012 Jan;226(2):380-93. doi: 10.1002/path.3000.
- Tajima S, Pinnell SR. Ascorbic acid preferentially enhances type I and III collagen gene transcription in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 1996 Mar;11(3):250-3. doi: 10.1016/0923-1811(95)00640-0.
- Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell.* 2007 Aug;20(3):77-84. doi: 10.1111/j.1749-0774.2007.00032.x.
- Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, Qiu L, Liu X, Ding Z, Deng X. CD73 expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity. *Stem Cells Int.* 2019 May 2;2019:8717694. doi: 10.1155/2019/8717694.
- Tang D, Chen S, Hou D, Gao J, Jiang L, Shi J, Liang Q, Kong D, Wang S. Regulation of macrophage polarization and promotion of endothelialization by NO generating and PEG-YIGSR modified vascular graft. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Mar 1;84:1-11. doi: 10.1016/j.msec.2017.11.005.
- Tang J, Peng R, Ding J. The regulation of stem cell differentiation by cell-cell contact on micropatterned material surfaces. *Biomaterials.* 2010 Mar;31(9):2470-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.006.
- Tanghetti E, Ria R, Dell'Era P, Urbinati C, Rusnati M, Ennas MG, Presta M. Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF2): recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts. *Oncogene.* 2002 May 30;21(24):3889-97. doi: 10.1038/sj.onc.1205407.
- Táborská J, Riedelová Z, Brynda E, Májek P, Riedel T. Endothelialization of an ePTFE vessel prosthesis modified with an antithrombogenic fibrin/heparin coating enriched with bound growth factors. *RSC Adv.* 2021 Feb 3;11(11):5903-5913. doi: 10.1039/d1ra00053e.
- Testa S, Riera CS, Fornetti E, Riccio F, Fuoco C, Bernardini S, Baldi J, Costantini M, Foddai ML, Cannata S, Gargioli C. Skeletal Muscle-Derived Human Mesenchymal Stem Cells: Influence of Different Culture Conditions on Proliferative and Myogenic Capabilities. *Front Physiol.* 2020 Sep 16;11:553198. doi: 10.3389/fphys.2020.553198.
- Thakar RG, Cheng Q, Patel S, Chu J, Nasir M, Liepmann D, Komvopoulos K, Li S. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J.* 2009 Apr 22;96(8):3423-32. doi: 10.1016/j.bpj.2008.11.074.
- Thompson LD, Pantoliano MW, Springer BA. Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry.* 1994 Apr 5;33(13):3831-40. doi: 10.1021/bi00179a006.
- Tijore A, Irvine SA, Sarig U, Mhaisalkar P, Baisane V, Venkatraman S. Contact guidance for cardiac tissue engineering using 3D bioprinted gelatin patterned hydrogel. *Biofabrication.* 2018 Jan 12;10(2):025003. doi: 10.1088/1758-5090/aaa15d.
- Travnickova M, Kasalkova NS, Sedlar A, Molitor M, Musilkova J, Slepicka P, Svorcik V, Bacakova L. Differentiation of adipose tissue-derived stem cells towards vascular smooth muscle cells on modified poly(L-lactide) foils. *Biomed Mater.* 2021 Feb 18;16(2):025016. doi: 10.1088/1748-605X/abaf97.
- Travnickova M, Pajorova J, Zarubova J, Krocilova N, Molitor M, Bacakova L. The influence of negative pressure and of the harvesting site on the characteristics of human adipose tissue-derived stromal cells from lipoaspirates. *Stem Cells Int.* 2020 Feb 10;2020:1016231. doi: 10.1155/2020/1016231.

- Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:85-116. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.000505.
- Truong NC, Bui KH, Van Pham P. Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1084:109-128. doi: 10.1007/5584\_2018\_235.
- Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 19;17(7):1164. doi: 10.3390/ijms17071164.
- Underwood PA, Whitelock JM, Bean PA, Steele JG. Effects of base material, plasma proteins and FGF2 on endothelial cell adhesion and growth. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2002;13(8):845-62. doi: 10.1163/156856202320401924.
- Usta SN, Scharer CD, Xu J, Frey TK, Nash RJ. Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. *Ann Transl Med.* 2014 Oct;2(10):97. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.05.
- Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol.* 2017 Jul 24;8:892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892.
- Vandrovcova M, Jirka I, Novotna K, Lisa V, Frank O, Kolska Z, Stary V, Bacakova L. Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of a titanium-niobium alloy. *PLoS One.* 2014 Jun 30;9(6):e100475. doi: 10.1371/journal.pone.0100475.
- Vaquero J, Zurita M, Rico MA, Aguayo C, Bonilla C, Marin E, Tapiador N, Sevilla M, Vazquez D, Carballido J, Fernandez C, Rodriguez-Boto G, Ovejero M; Neurological cell therapy group from Puerta de Hierro-Majadahonda Hospital. Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline. *Cytotherapy.* 2018 Jun;20(6):806-819. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.03.032.
- Venkataraman G, Shriver Z, Davis JC, Sasisekharan R. Fibroblast growth factors 1 and 2 are distinct in oligomerization in the presence of heparin-like glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):1892-7. doi: 10.1073/pnas.96.5.1892.
- Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009 Jul;89(3):957-89. doi: 10.1152/physrev.00041.2008.
- 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 Apr;16(4):1201-13. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0303.
- Wang CL. Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions. *Adv Exp Med Biol.* 2008;644:250-72. doi: 10.1007/978-0-387-85766-4\_19.
- Wang F, Zachar V, Pennisi CP, Fink T, Maeda Y, Emmersen J. Hypoxia enhances differentiation of adipose tissue-derived stem cells toward the smooth muscle phenotype. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 8;19(2):517. doi: 10.3390/ijms19020517.
- Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res.* 2006 Feb 1;312(3):205-14. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.004.
- Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol.* 2012 Nov 29;1(1):36. doi: 10.1186/2162-3619-1-36.
- Wang L, Zhao S, Mao H, Zhou L, Wang ZJ, Wang HX. Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl).* 2011 Nov;124(22):3622-8.

- Wang N, Zheng W, Cheng S, Zhang W, Liu S, Jiang X. In vitro evaluation of essential mechanical properties and cell behaviors of a novel polylactic-co-glycolic acid (PLGA)-based tubular scaffold for small-diameter vascular tissue engineering. *polymers (Basel)*. 2017 Jul 30;9(8):318. doi: 10.3390/polym9080318.
- Wang Q, Yang Q, Wang Z, Tong H, Ma L, Zhang Y, Shan F, Meng Y, Yuan Z. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(1):85-96. doi: 10.1080/21645515.2015.1030549.
- Wang Q, Zhang N, Hu L, Xi Y, Mi W, Ma Y. Integrin  $\beta 1$  in adipose-derived stem cells accelerates wound healing via activating PI3K/AKT pathway. *Tissue Eng Regen Med*. 2020 Apr;17(2):183-192. doi: 10.1007/s13770-019-00229-4.
- Wang W, Nie W, Liu D, Du H, Zhou X, Chen L, Wang H, Mo X, Li L, He C. Macroporous nanofibrous vascular scaffold with improved biodegradability and smooth muscle cells infiltration prepared by dual phase separation technique. *Int J Nanomedicine*. 2018 Nov 1;13:7003-7018. doi: 10.2147/IJN.S183463. Erratum in: *Int J Nanomedicine*. 2022 Oct 04;17:4697-4698. doi: 10.2147/IJN.S390401.
- Wang X, Chan V, Corridon PR. Acellular tissue-engineered vascular grafts from polymers: methods, achievements, characterization, and challenges. *Polymers (Basel)*. 2022 Nov 9;14(22):4825. doi: 10.3390/polym14224825.
- Wang X, Mäkitie AA, Paloheimo KS, Tuomi J, Paloheimo M, Sui S, Zhang Q. Characterization of a PLGA sandwiched cell/fibrin tubular construct and induction of the adipose derived stem cells into smooth muscle cells. *Materials Science and Engineering: C* 2011, 31(4), 801–808. doi:10.1016/j.msec.2010.10.007.
- Wang Z. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*. 2021 Nov 26;10(12):3327. doi: 10.3390/cells10123327.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):475-83. doi: 10.1002/1097-4636(20000905)51:3<475::aid-jbm23>3.0.co;2-9.
- Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B, Oda Y. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Apr;81(1):66-75. doi: 10.1002/jbm.b.30638.
- Wilkinson AL, Barrett JW, Slack RJ. Pharmacological characterisation of a tool  $\alpha v \beta 1$  integrin small molecule RGD-mimetic inhibitor. *Eur J Pharmacol*. 2019 Jan 5;842:239-247. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.10.045.
- Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):1-18. doi: 10.1089/ten.2005.11.1.
- Wise SG, Byrom MJ, Waterhouse A, Bannon PG, Weiss AS, Ng MK. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomater*. 2011 Jan;7(1):295-303. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.022. Epub 2010 Jul 23. Erratum in: *Acta Biomater*. 2011 Mar;7(3):1429.
- Witt R, Weigand A, Boos AM, Cai A, Dippold D, Boccaccini AR, Schubert DW, Hardt M, Lange C, Arkudas A, Horch RE, Beier JP. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. *BMC Cell Biol*. 2017 Feb 28;18(1):15. doi: 10.1186/s12860-017-0131-2.
- Wu C. Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell Adh Migr*. 2007 Jan-Mar;1(1):13-8. doi: 10.4161/cam.1.1.4081. Epub 2007 Jan 27.
- Wu W, Allen RA, Wang Y. Fast-degrading elastomer enables rapid remodeling of a cell-free synthetic graft into a neoartery. *Nat Med*. 2012 Jul;18(7):1148-53. doi: 10.1038/nm.2821.

- Xin M, Dong XW, Guo XL. Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2015 Feb;69:179-85. doi: 10.1016/j.biopha.2014.11.024.
- Xu J, Shi GP. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Nov;1842(11):2106-2119. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.07.008.
- Xu Q, Norman JT, Shrivastav S, Lucio-Cazana J, Kopp JB. In vitro models of TGF-beta-induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Aug;293(2):F631-40. doi: 10.1152/ajprenal.00379.2006.
- Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and electrospun nanofibers: methods, materials, and applications. *Chem Rev.* 2019 Apr 24;119(8):5298-5415. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Nov;95(5):2081-8. doi: 10.1152/jappphysiol.00232.2003.
- Yamazoe H, Tanabe T. Preparation of water-insoluble albumin film possessing nonadherent surface for cells and ligand binding ability. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Jul;86(1):228-34. doi: 10.1002/jbm.a.31654.
- Yang K, Jung H, Lee HR, Lee JS, Kim SR, Song KY, Cheong E, Bang J, Im SG, Cho SW. Multiscale, hierarchically patterned topography for directing human neural stem cells into functional neurons. *ACS Nano.* 2014 Aug 26;8(8):7809-22. doi: 10.1021/nn501182f.
- Yang X, Tian S, Fan L, Niu R, Yan M, Chen S, Zheng M, Zhang S. Integrated regulation of chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells and differentiation of cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2022 Apr 29;22(1):169. doi: 10.1186/s12935-022-02598-8.
- Yao X, Peng R, Ding J. Effects of aspect ratios of stem cells on lineage commitments with and without induction media. *Biomaterials.* 2013 Jan;34(4):930-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.052.
- Yin A, Zhuang W, Liu G, Lan X, Tang Z, Deng Y, Wang Y. Performance of PEGylated chitosan and poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone) bilayer vascular grafts in a canine femoral artery model. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020 Apr;188:110806. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110806.
- Yogi A, Rukhlova M, Charlebois C, Tian G, Stanimirovic DB, Moreno MJ. Differentiation of adipose-derived stem cells into vascular smooth muscle cells for tissue engineering applications. *Biomedicines.* 2021 Jul 9;9(7):797. doi: 10.3390/biomedicines9070797.
- Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006 Jul;208(1):64-76. doi: 10.1002/jcp.20636.
- Yu YB, Song Y, Chen Y, Zhang F, Qi FZ. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2018 Aug;18(2):2009-2016. doi: 10.3892/mmr.2018.9181.
- Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L, Baradaran B. Induction of CD14 expression and differentiation to monocytes or mature macrophages in promyelocytic cell lines: new approach. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):329-32. doi: 10.5681/apb.2013.053.
- Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells.* 2006 Nov;24(11):2412-9. doi: 10.1634/stemcells.2006-0006.
- Zeng G, Lai K, Li J, Zou Y, Huang H, Liang J, Tang X, Wei J, Zhang P. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells. *Organogenesis.* 2013 Oct 1;9(4):287-95. doi: 10.4161/org.27153.



- Zhang F, Xie Y, Celik H, Akkus O, Bernacki SH, King MW. Engineering small-caliber vascular grafts from collagen filaments and nanofibers with comparable mechanical properties to native vessels. *Biofabrication*. 2019 May 17;11(3):035020. doi: 10.1088/1758-5090/ab15ce.
- Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, Liu Q, Zhang Y. Adipose-derived stem cells: current applications and future directions in the regeneration of multiple tissues. *Stem Cells Int*. 2020 Dec 10;2020:8810813. doi: 10.1155/2020/8810813.
- Zhang R, Jack GS, Rao N, Zuk P, Ignarro LJ, Wu B, Rodríguez LV. Nuclear fusion-independent smooth muscle differentiation of human adipose-derived stem cells induced by a smooth muscle environment. *Stem Cells*. 2012 Mar;30(3):481-90. doi: 10.1002/stem.1023.
- Zhang T, Lin S, Shao X, Shi S, Zhang Q, Xue C, Lin Y, Zhu B, Cai X. Regulating osteogenesis and adipogenesis in adipose-derived stem cells by controlling underlying substrate stiffness. *J Cell Physiol*. 2018 Apr;233(4):3418-3428. doi: 10.1002/jcp.26193.
- Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities. *Biomed Res Int*. 2014;2014:462472. doi: 10.1155/2014/462472.
- Zhang X, Bendeck MP, Simmons CA, Santerre JP. Deriving vascular smooth muscle cells from mesenchymal stromal cells: Evolving differentiation strategies and current understanding of their mechanisms. *Biomaterials*. 2017 Nov;145:9-22. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.08.028.
- Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Jul 18;63(8):610-5. doi: 10.1016/j.addr.2010.11.001.
- Zheng S, Gao Y, Chen K, Liu Y, Xia N, Fang F. A robust and highly efficient approach for isolation of mesenchymal stem cells from wharton's jelly for tissue repair. *Cell Transplant*. 2022 Jan-Dec;31:9636897221084354. doi: 10.1177/09636897221084354.
- Zhou H, Weir MD, Xu HH. Effect of cell seeding density on proliferation and osteodifferentiation of umbilical cord stem cells on calcium phosphate cement-fiber scaffold. *Tissue Eng Part A*. 2011 Nov;17(21-22):2603-13. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0048.
- Zhou L, Wang H, Yao S, Li L, Kuang X. Efficacy of human adipose derived mesenchymal stem cells in promoting skin wound healing. *J Healthc Eng*. 2022 Mar 24;2022:6590025. doi: 10.1155/2022/6590025. Retraction in: *J Healthc Eng*. 2023 Sep 27;2023:9758310. doi: 10.1155/2023/9758310.
- Zhuo Y, Chammas R, Bellis SL. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2008 Aug 8;283(32):22177-85. doi: 10.1074/jbc.M8000015200.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859.

## 8 Seznam použitých zkratek

$\alpha$ -MEM	alfa modifikované Eaglovo médium
ACTA2	gen pro $\alpha$ -hladkosvalový aktin
ADSC	mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně
Akt	proteinkinasa B
ANOVA	analýza rozptylu
B2M	gen pro $\beta$ 2-mikroglobulin
BMP4	kostní morfogenní protein 4
BSA	hovězí sérový albumin
CarG	transkripční faktor pro hladkosvalovou diferenciaci
CD	diferenciační skupina
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRD	doména rozpoznávající cukry
CNN1	gen pro kalponin 1
COL1A1	gen pro kolagen I
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBM2	endotelové bazální médium 2
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGM2	endotelové růstové médium 2
ePTFE	expandovaný polytetrafluorethylen
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kinasa
FGF-2	fibroblastový růstový faktor 2
FGF-2M	mutantní forma fibroblastového růstového faktoru 2 (R31K/R129K)
FGÚ	Fyziologický ústav
FS	fetální hovězí sérum
HEK293	linie odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk
HUVEC	endotelové buňky z lidské pupečnickové žíly
ICAM	intercelulární adhezní molekula
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor 1
IgG	imunoglobulin G
ISCT	Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii

JNK	c-Jun-N-terminální kinasa
MEK	kinasa mitogenem aktivované proteinkinasy
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRTF-A	myokardinu příbuzný transkripční faktor A
MSC	mesenchymální kmenové buňky
MYH11	gen pro těžký řetězec hladkosvalového myosinu
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
p38	mitogenem aktivované proteinkinasa z rodiny p38
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDGF-BB	receptor pro destičkový růstový faktor
PECAM	adhezni molekula krevních destiček a endoteliálních buněk
PEG	polyethylenglykol
PET	polyethylentereftalát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIGF	placentární růstový faktor
PLGA	kyselina polymléčná-koglykolová
PLLA	kyselina polymléčná
PTB	doména vázající fosfotyrosin
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce
RhoA	Ras homologní protein A
RNA	ribonukleová kyselina
ROCK	proteinkinasa asociovaná s proteiny Rho
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SM22 $\alpha$	hladkosvalový protein 22-alfa, transgelin
SMTN	gen pro smoothelin
Src	nerceptorická tyrosinkinasa Src
SVF	stromální vaskulární frakce
TGF $\beta$ 1	transformující růstový faktor $\beta$ 1
TRITC	tetramethylrodamin isothiocyánát
VCAM	molekula vaskulární buněčné adheze
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

VEGF-A<sub>165</sub> vaskulární endotelový růstový faktor A, splicing varianta s 165 aminokyselinami  
VSMC cévní hladké svalové buňky  
VÚPP Výzkumný ústav potravinářský Praha

## 9 Publikace

### 9.1 Publikace související s disertační prací

Molitor M, Trávníčková M, Měšťák O, Christodoulou P, **Sedlář A**, Bačáková L, Lucchina S. The influence of low- and high-negative-pressure liposuction and different harvesting sites on the viability and yield of adipocytes and other nucleated cells. *Aesthet. Plast. Surg.* 2021 Dec;45(6):2952-2970. doi: 10.1007/s00266-021-02396-z.

**IF = 2,708 (2021), IF = 2,0 (2023)**

Molitor M, Trávníčková M, Měšťák O, Christodoulou P, **Sedlář A**, Bačáková L, Lucchina S. The influence of high and low negative pressure liposuction and various harvesting techniques on the viability and function of harvested cells-a systematic review of animal and human studies. *Aesthet. Plast. Surg.* 2021 Oct;45(5):2379-2394. doi: 10.1007/s00266-021-02249-9.

**IF = 2,708 (2021), IF = 2,0 (2023)**

**Sedlář A**, Trávníčková M, Bojarová P, Vlachová M, Slámová K, Křen V, Bačáková L. Interaction between galectin-3 and integrins mediates cell-matrix adhesion in endothelial cells and mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 May 13;22(10):5144. doi: 10.3390/ijms22105144.

**IF = 6,208 (2021), IF = 4,9 (2023)**

Travnickova M, Kasalkova NS, **Sedlar A**, Molitor M, Musilkova J, Slepicka P, Svorcik V, Bacakova L. Differentiation of adipose tissue-derived stem cells towards vascular smooth muscle cells on modified poly(L-lactide) foils. *Biomed. Mater.* 2021 Feb 18;16(2):025016. doi: 10.1088/1748-605X/abaf97.

**IF = 4,103 (2021), IF = 3,9 (2023)**

**Sedlář A**, Trávníčková M, Matějka R, Pražák Š, Mészáros Z, Bojarová P, Bačáková L, Křen V, Slámová K. Growth factors VEGF-A<sub>165</sub> and FGF-2 as multifunctional biomolecules governing cell adhesion and proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 Feb 12;22(4):1843. doi: 10.3390/ijms22041843.

**IF = 6,208 (2021), IF = 4,9 (2023)**

## 9.2 Další publikace

**Sedlář A**, Vrbata D, Pokorná K, Holzerová K, Červený J, Kočková O, Hlaváčková M, Doubková M, Musílková J, Křen V, Kolář F, Bačáková L, Bojarová P. Glycopolymer inhibitors of galectin-3 suppress the markers of tissue remodeling in pulmonary hypertension. *J. Med. Chem.* 2024, 67 (11), 9214–9226. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c00341.

**IF = 6,8 (2023).**

Staňková L, Kutová A, Doubková M, Kvítek O, Vokatá B, **Sedlář A**, Idriss H, Slepíčka P, Švorčík V, Bačáková L. Argon plasma-modified bacterial nanocellulose: Cell-specific differences in the interaction with fibroblasts and endothelial cells. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 7 (2024) 100470. doi: 10.1016/j.carpta.2024.100470

**IF = 6,2 (2023)**

Skvortsova A, Trelin A, **Sedlar A**, Erzina M, Travnickova M, Svobodova L, Kolska Z, Siegel J, Bacakova L, Svorcik V, Lyutakov O. SERS-CNN approach for non-invasive and non-destructive monitoring of stem cell growth on a universal substrate through an analysis of the cultivation medium, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 375, 2023, 132812. doi: 10.1016/j.snb.2022.132812.

**IF = 8,0 (2023)**

Janků M, Jedelská T, Činčalová L, **Sedlář A**, Mikulík J, Luhová L, Lochman J, Petřivalský M. Structure-activity relationships of oomycete elicitors uncover the role of reactive oxygen and nitrogen species in triggering plant defense responses. *Plant Sci.* 2022 Jun;319:111239. doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111239.

**IF = 5,2 (2022), IF = 4,2 (2023)**

## 9.3 Manuscripty

Bačáková L, **Sedlář A**, Musílková J, Eckhardt A, Žaloudíková M, Kolář F, Maxová H. Vascular smooth muscle cells in hypoxic pulmonary hypertension.

**V recenzním řízení v *Physiological Research*, IF = 1,9 (2023).**

Erzina M, Kublii E, Vokata B, Zabelin D, Chertopalov S, Hrbek T, **Sedlar A**, Svobodova L, Bacakova L, Lancok J, Kolska Z, Svorcik V, Lyutakov O. Covalent grafting of  $Ti_3C_2T_x$  for improvement of flake stability and cell cultivation.

**V recenzním řízení v Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, IF = 5,4 (2023).**

Stankova L, Kutova A, Doubkova M, Kvitek O, **Sedlar A**, Svorcik V, Bacakova L: Cellulases and their promising use in cell sheet technology and tissue engineering.

**V přípravě pro Applied Surface Science, IF = 6,3 (2023)**

Pražák Š, Matějka R, Musílková J, Štěpanovská J, **Sedlár A**, Kučerová J, Bačáková L. Differentiation of adipose-derived stem cells towards smooth muscle cells under combined biochemical and mechanical stimuli: Comparison of human and porcine cells.

**V přípravě pro Cells, IF = 5.1 (2023)**

## **10 Konference**

**Sedlár A**, Vrbata D, Pokorná K, Holzerová K, Kolář F, Bojarová P, Bačáková L. Polyoxazolines conjugated with galectin-3 inhibitors – a novel drug delivery system for the treatment of pulmonary hypertension. 12<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, Jižní Korea, Daegu, 2024. **(poster)**

**Sedlár A**, Vrbata D, Pokorná K, Kolář F, Bojarová P, Bačáková L. Testing novel oligosaccharide-based drugs on polyoxazoline carriers for pharmacological inhibition of galectin-3 in an in vitro and in vivo rat model of pulmonary hypertension. 33<sup>rd</sup> Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Švýcarsko, Davos, 2023. **(poster)**

**Sedlar A**, Travnickova M, Slamova K, Kren V, Bacakova L. Growth and osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells on  $Ti_3C_2T_x$  MXenes, newly emerging 2D nanomaterials for biomedical applications. Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, Polsko, Rytro, 2022. **(poster)**

**Sedlar A**, Pokorna K, Musilkova J, Kren V, Kolar F, Bacakova L. Galectin-3 as a potential target for reversing vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. Interdisciplinary meeting for young life scientists, Česko, Milovy, 2022. **(poster)**

**Sedlár A**, Skvortsova A, Trelin A, Trávníčková M, Kolská Z, Lyutakov O, Švorčík V, Bačáková L. Oriented growth of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on patterned plasmon-active substrates with Au grating for label-free cell sensing. *Bioimplantologie, Česko, Lednice, 2022. (poster)*

**Sedlár A**, Olshtrem A, Lyutakov O, Trávníčková M, Švorčík V, Bačáková L. Biocompatibility and physicochemical properties of MXenes: newly emerging 2D nanomaterials for biosensorics. *Bioimplantologie, Česko, Mikulov, 2021. (poster)*

**Sedlar A**, Musilkova J, Travnickova M, Beran M, Molitor M, Bacakova L. The use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for construction of bioartificial adipose tissue on 3D nanofibrous scaffolds. *ESAO/TERMIS Winter School 2021, Španělsko, Jaca, ONLINE. (přednáška)*

**Sedlar A**, Travnickova M, Slamova K, Kren V, Bacakova L. Adsorbed growth factors as modulators of cell behaviour on biomaterial surfaces. *Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, Polsko, Rytro, 2020, ONLINE. (přednáška)*

**Sedlar A**, Travnickova M, Musilkova J, Bacakova L, Kren V, Riedel T. Úloha galektinu-3 v poškození a náhradách cév. *Seminář Biomateriály a jejich povrchy, Česko, Herbertov, 2019. (přednáška)*

## **11 Výuková činnost**

Adriena Přitasilová, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Úloha galektinů v hojení kožních ran. *Bakalářská práce, 2024. (vedoucí)*

Kateřina Pokorná, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Model plicní hyperenze *in vitro* a *in vivo* u potkana pro testování nových léčiv cílících na galektin-3. *Diplomová práce, 2023. (konzultant)*

Kateřina Pokorná, České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Úloha galektinu-3 ve fyziologii a patofyziologii buněk srdce a cévní stěny. *Bakalářská práce, 2021. (konzultant)*



## **12 Recenzní činnost**

Journal of Visualized Experiments (**1 recenze**)

Physiological Research (**1 recenze**)

## **13 Příloha s publikacemi**