

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 438

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/16 (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01)
A61K 35/51 (2015.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61F 2/01 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41310**
(22) Přihlášeno: **21.09.2023**
(47) Zapsáno: **01.11.2023**

- (73) Majitel:
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ
Technická univerzita v Liberci, Liberec, Liberec I-
Staré Město, CZ
Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v. v.
i., Praha 8, Libeň, CZ
České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,
Dejvice, CZ
Krajská nemocnice Liberec, a.s., Liberec, Liberec I-
Staré Město, CZ
- (72) Původce:
Lucie Bačáková, Praha 4, Braník, CZ
Elena Filová, Praha 4, Modřany, CZ
Šimon Pražák, Plzeň, Východní Předměstí, CZ
Irena Vacková, Praha 10, Uhřetěves, CZ
Tomáš Suchý, Praha 9, Střížkov, CZ
Monika Šupová, Praha 4, Háje, CZ
Josef Šepitka, Praha 6, Dejvice, CZ
Renata Procházková, Záměstí-Blata, CZ
Věra Jenčová, Proseč pod Ještědem, CZ
Eva Kuželová Košťáková, Turnov, CZ
Maxim Lisnenko, Liberec, Liberec IV-Perštýn, CZ
David Lukáš, Liberec, Liberec VI-Rochlice, CZ
Jan Valtera, Liberec, Liberec I-Staré Město, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
Vyztužený kompozitní hydrogel s buňkami

Vyztužený kompozitní hydrogel s buňkami

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká jednoduše nebo dvojitě vyztužených kompozitních hydrogelů s kmenovými buňkami nebo kmenovými a endotelovými buňkami pro cévní záplaty.

Dosavadní stav techniky

Kolagen je vláknitý protein vyskytující se ve vysokých koncentracích převážně v kůži, šlachách a kostech. Kolagen je důležitou součástí pojivové tkáně, ve které zajišťuje strukturální a mechanickou oporu pro jiné proteiny a buňky. Díky své snadné extrakci, slabé antigenicitě, robustní biokompatibilitě a schopnosti být fyzikálně a chemicky modifikován je kolagen často
15 vybírán jako biomateriál vhodný pro lékařské aplikace (Chiu LL, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. Bioactive scaffolds for engineering vascularized cardiac tissues. *Macromol Biosci.* 2010 Nov 10;10(11):1286-301. doi: 10.1002/mabi.201000202. PMID: 20857391; PMCID: PMC3627738.). Buňkami osazené kolagenové hydrogely byly připraveny pro aplikaci při rekonstrukci natrženého
20 menisku (CN108159499A), léčbě patologií svalů (EP3666298A1) a ischemických chorob (CN113262240A). Dalším způsobem využití je podpora chondrogenní diferenciaci (CN108003360A) a podpora angiogeneze (WO9728253A1).

Nevýhodou buňkami osazených kolagenových hydrogelů je jejich tendence k postupné kontrakci, tedy smršťování se v čase a jejich poměrně rychlá enzymatická degradace. Tyto změny rozměru
25 gelu jsou způsobeny kontraktilní silou buněk (Kim S, Lee H, Kim JA, Park TH. Prevention of collagen hydrogel contraction using polydopamine-coating and alginate outer shell increases cell contractile force. *Biomater Adv.* 2022 May;136:212780. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.212780).

Smršťování kolagenového hydrogelu lze předejít úpravou jeho vlastností, například změnou koncentrace kolagenu, síťováním nebo přidáním různých přísad. Tyto modifikace ale mohou stimulovat depozici vápníku a nepříznivě ovlivňovat diferenciaci kmenových buněk (Guo Y, Qiao Y, Quan S, Yang C, Li J. Relationship of matrix stiffness and cell morphology in regulation of osteogenesis and adipogenesis of BMSCs. *Mol Biol Rep.* 2022 Apr;49(4):2677-2685. doi: 10.1007/s11033-021-07075-5. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35023006.; Sun Y, Liu J, Xu Z, Lin X, Zhang X, Li L, Li Y. Matrix stiffness regulates myocardial differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Aging (Albany NY).* 2020 Dec 9;13(2):2231-2250. doi: 10.18632/aging.202244. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33318310; PMCID: PMC7880396.). Snížení
35 smršťování u fibrinového gelu bylo dosaženo fixováním gelu ke stěně a ke dnu kultivační jamky pomocí poly-L-lysinu. Fixace pravděpodobně vytvářela pozitivní mechanický stres v hydrogelu a podporovala depozici kolagenu v těchto gelech (Stefan Jockenhoevel, Gregor Zund, Simon P. Hoerstrup, Khaled Chalabi, Jörg S. Sachweh, Lütfü Demircan, Bruno J. Messmer, Marko Turina. Fibrin gel – advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Volume 19, Issue 4, April 2001, 424–430). Podobný efekt lze
40 očekávat i u kolagenových gelů.

Samotný kolagenový hydrogel umožňuje buněčnou adhezi, ale nestimuluje diferenciaci kmenových buněk *in vitro*. Diferenciaci buněk lze podpořit vhodným složením kultivačního média a přidáním bioaktivních složek do hydrogelu. Volba bioaktivní přísady do kolagenového hydrogelu je ovlivněna zvoleným typem cílové tkáně a interakcí s kolagenem. Pro řízenou diferenciaci do buněk hladké svaloviny se používá transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) a kostní morfogenetický protein 4 (BMP-4) (Elçin AE, Parmaksiz M, Dogan A, Seker S, Durkut S, Dalva K, Elçin YM. Differential gene expression profiling of human adipose stem cells differentiating into smooth muscle-like cells by TGF $\beta 1$ /BMP4. *Exp Cell Res.* 2017 Mar 15;352(2):207-217. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.006. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28185836.; Walters B, Turner PA,
55

Rolauffs B, Hart ML, Stegemann JP. Controlled Growth Factor Delivery and Cyclic Stretch Induces a Smooth Muscle Cell-like Phenotype in Adipose-Derived Stem Cells. *Cells*. 2021 Nov 11;10(11):3123. doi: 10.3390/cells10113123. PMID: 34831345; PMCID: PMC8624888.). TGF- β 1 a další bioaktivní látky se nacházejí i v krevní plazmě a destičkovém lyzátu (Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chierigato K, Schäfer R, Sella S, Rodeghiero F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Jul 13;7(1):93. doi: 10.1186/s13287-016-0352-x. PMID: 27411942; PMCID: PMC4944312.). Proto přidání krevní plazmy nebo destičkového lyzátu (DL) do hydrogelu může mít pozitivní vliv na adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk nasazených v hydrogelu. Adhezi kmenových buněk, zlepšení jejich diferenciaci a ulehčení manipulace / implantace výsledného konstruktů do cévy dokáže podpořit i vyztužení hydrogelu, které navíc zabraňuje smršťování hydrogelu v čase. Pro kardiovaskulární aplikace je důležitá přítomnost endotelových buněk, které slouží jako antitrombogenní vrstva cévní protězy /cévní záplaty a jsou potřebné zejména u cév malého průměru. Výsledný materiál by proto měl podporovat adhezi a růst endotelových buněk na povrchu hydrogelu / kompozitu. Dosavadní pokusy o řešení těchto problémů se soustředily jenom na některý z těchto problémů, např. smršťování, rychlá degradace, nízká bioaktivita, nepřítomnost endotelové vrstvy, ale nezabývaly se jejich komplexním řešením.

20

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky odstraňuje kompozitní hydrogel, vhodný pro použití jako celularizovaná cévní záplata, který obsahuje hydrogel jednoduše nebo dvojitě vyztužený a osazený buňkami. Hydrogel je vytvořen gelací roztoku kolagenu a/nebo krevní plazmy, popřípadě s přidávkou destičkového lyzátu. Kompozitní hydrogel je vyztužen síťovanými kolagenovými mikrovláknami, popřípadě i polymerní sítí. Kompozitní hydrogel dále obsahuje kmenové buňky, a může být navíc osazen endotelovými buňkami.

Kompozitní hydrogel podle technického řešení lze využít jako cévní záplatu, která, v případě, že obsahuje endotelové buňky, bude mít antitrombogenní vlastnosti. Diferencované kmenové buňky směrem k hladkému svalu simulují *tunica media*, vrstva buněk endotelu představuje *tunica intima*. Síťovaná kolagenová mikrovláknina a polymerní síťka zabraňují kontrakci, která způsobuje deformaci gelu. Zároveň stimulují adhezi a diferenciaci kmenových buněk a zlepšují manipulaci s kompozitním hydrogelem.

Ve výhodných provedeních kompozitní hydrogel obsahuje hydrogel z kolagenu, nebo krevní plazmy, nebo směsi kolagenu a krevní plazmy v množstvích odpovídajících 30 až 95 obj. % 0,6% (hmotn./hmotn.) roztoku kolagenu a 5 až 70 obj. % krevní plazmy, nebo směsi kolagenu a destičkového lyzátu v množstvích odpovídajících 30 až 95 obj. % 0,6% (hmotn./hmotn.) roztoku kolagenu a 5 až 70 obj. % destičkového lyzátu. Pokud je přítomen destičkový lyzát, je prostý heparinu.

Mikrovláknina jsou obvykle vlákna o průměru v rozmezí 1 až 300 mikronů.

45

Kolagenem může být kolagen z jakéhokoliv zdroje, zejména výhodný z hlediska dostupnosti, ceny a sníženého rizika přenosu nemocí je prasečí kolagen.

Náhodně orientovaná síťovaná kolagenová mikrovláknina jsou degradovatelná, proto umožňují postupnou remodelaci kompozitního hydrogelu a jeho náhradu novotvořenou tkání; umožňují rovněž adhezi buněk a jejich diferenciaci.

Polymerní síťka je vyrobena z biodegradabilních a/nebo nebiodegradabilních biokompatibilních vláknenných materiálů. Může se skládat z mikrovláknenných nití různých druhů (monofilů, multifilů, přízí atd.) nebo může být tvořena z kompozitních nití kombinujících mikro a nanovláknina nebo

55

může obsahovat uvnitř nebo mezi nanovlákný prášková aditiva. Síťka musí být pružná a porézní, s výhodou vytvořená osnovním či zátažným pletením či paličkováním (jednolící, oboulící či obourubní pletenina) z nití o jemnostech 10 až 50 tex s hustotou sloupků a řádků v rozmezí 2 až 10 cm⁻¹ a plošnou hmotností 30 až 100 g/m². S výhodou je polymerní síťka z polyamidu 6 a/nebo polykaprolaktonu. Polymerní síťka podporuje adhezi hydrogelu i buněk.

Takto vyztužený kompozitní hydrogel si zachovává svůj tvar a může být s výhodou následně osazen endotelovými buňkami, které tvoří novou *tunica intima* cévní záplaty.

Výztuž hydrogelu i přítomnost krevní plazmy a/nebo destičkového lyzátu zlepšuje diferenciaci buněk. Krevní plazma i destičkový lyzát obsahují vhodné růstové faktory podporující diferenciaci buněk.

Kmenovými buňkami jsou kmenové buňky z Whartonova rosolu pupeční šňůry (WJC). Zabudované WJC diferencují do hladkého svalu a simulují cévní vrstvu *tunica media*.

S výhodou obsahuje kompozitní hydrogel alespoň 700 x 10³ WJC buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu a popřípadě alespoň 30 x 10³ endotelových buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu. Výhodněji obsahuje kompozitní hydrogel 700 x 10³ až 2000 x 10³ WJC buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu a popřípadě i 30 x 10³ až 100 x 10³ endotelových buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu.

Je zvláště výhodné, když kompozitní hydrogel podle technického řešení obsahuje polymerní síťku a je oset endotelovými buňkami.

Kompozitní hydrogel se připraví smícháním suspenze kmenových buněk, NaHCO₃ a popřípadě krevní plazmy nebo destičkového lyzátu, přidáním roztoku CaCl₂, následně nalitím směsi na kolagenová mikrovlákná, případně i na polymerní síťku, případným přidáním roztoku kolagenu (má-li kolagen být přítomen), a následnou gelací směsi. Takto připravený hydrogel lze dále držet v médiu pro kultivaci a diferenciaci kmenových buněk, a následně, například po několika dnech, osadit endotelovými buňkami. Použité roztoky jsou roztoky ve vodě, pufru či kultivačním médiu.

Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje morfologii nesítovaných kolagenových mikrovláken z rastrovacího elektronového mikroskopu.

Obr. 2 ukazuje kompozitní nit tvořenou jádrem z polyamidu 6 a nanovlákněným obalem z polykaprolaktonu vytvořeným střídavým elektrickým zvlákněním. Zleva: příčný řez (měřítko 20 μm), podélný pohled (měřítko 50 μm) na kompozitní nit a fotografie detailu polymerní sítě z kompozitní nitě (měřítko 1 mm).

Obr. 3 ukazuje počty WJC buněk na ml v jednotlivých kompozitních hydrogelech 1 až 6 vyztužených kolagenovými mikrovláknami: Kompozit 1 – roztok kolagenu 50 obj. % + DL (destičkový lyzát) 50 obj. %, kompozit 2 - roztok kolagenu 50 obj. % + krevní plazma 50 obj. %, kompozit 3 – roztok kolagenu 90 obj. % + DL 10 obj. %, kompozit 4 – roztok kolagenu 90 obj. % + krevní plazma 10 obj. %, kompozit 5 – roztok kolagenu 100%, kompozit 6 – krevní plazma 100%. Statistická významnost byla hodnocena jednocestným testem ANOVA, grafy byly vytvořeny pomocí GraphPad PRISM software. Hvězdičky se spojnicí označují významné rozdíly mezi stejným typem kompozitu v různých časových intervalech. Horní index nad sloupci označuje významné rozdíly mezi rozdílným typem kompozitu ve stejných časových intervalech. Ns: p > 0,05, *: ≤ 0,05, **: ≤ 0,01, ***: ≤ 0,001. Data jsou uvedena jako medián ± SEM.

Obr. 4 ukazuje vizualizaci buněk WJC ve vyztužených kompozitních hydrogelech 7. den kultivace po barvení alfa-aktinu a kalponinu. Dragonfly 503 - konfokální mikroskop s rotujícím diskem, obj. x10. Kompozit 1 – roztok kolagenu 50 obj. % + DL (destičkový lyzát) 50 obj. %, kompozit 2 - roztok kolagenu 50 obj. % + krevní plazma 50 obj. %, kompozit 3 – roztok kolagenu 90 obj. % + DL 10 obj. %, kompozit 4 – roztok kolagenu 90 obj. % + krevní plazma 10 obj. %, kompozit 5 – roztok kolagenu 100%, kompozit 6 – krevní plazma 100%. Kompozitní hydrogely byly připraveny s WJC a kultivovány 14 dní s diferenciací WJC směrem do hladkého svalu.

10 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Izolace kolagenu, příprava nesítovaných a sítovaných kolagenových mikrovláken

Kolagen typu I (COL), použitý pro přípravu kompozitních hydrogelů, byl izolován z prasečí kůže získané z jatek (prase plemene české bílé ušlechtilé, stáří 6 měsíců). Kůže byla zbavena tuku roztokem 70% (obj./obj.) etanolu; vlastní izolace byla provedena pomocí roztoku 0,1% (obj./obj.) kyseliny octové po dobu 48 hodin. COL byl vysrážen ze supernatantu 0,1 M roztokem hydroxidu sodného. Získaný precipitát byl poté znovu rozpuštěn v roztoku 0,1% (obj./obj.) kyseliny octové, zamražen na -30 °C a lyofilizován na přístroji BenchTop Pro při 5 Pa s teplotou kondenzoru -96 °C (Stepanovska J, Otahal M, Hanzalek K, Supova M, Matejka R. pH Modification of High-Concentrated Collagen Bioinks as a Factor Affecting Cell Viability, Mechanical Properties, and Printability. Gels. 2021 Dec 7;7(4):252. doi: 10.3390/gels7040252. PMID: 34940312; PMCID: PMC8700843.). Lyofilizovaný COL se skládá z nesítovaných kolagenových mikrovláken (Obr. 1), která byla buď použita na přípravu roztoku kolagenu nebo byla sítována a použita jako výztuž kompozitního hydrogelu. Nesítovaná kolagenová mikrovlákna získaná výše uvedeným postupem byla zesítována roztokem 95% (obj./obj.) etanolu obsahujícím N-ethyl-N'-(3-(dimethylaminopropyl)karbodiimid a N-hydroxysukcinimid v hmotnostním poměru 4 : 1 po dobu 24 h při 37 °C. Následovalo promytí 0,1 M roztokem hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄), zamražení na -30 °C a lyofilizace. Nesítovaná kolagenová mikrovlákna obsahovala 25 – 28 % (hmotn./hmotn.) dalších příměsí (tuky, glykosaminoglykany, voda), byla ozářena UV po dobu 20 min a skladována při -80 °C.

Příklad 2: Příprava roztoku kolagenu a kolagenového hydrogelu pro přípravu hydrogelových kompozitů

Roztok kolagenu pro přípravu hydrogelových kompozitů byl připraven rozpuštěním nesítovaných kolagenových mikrovláken v 0,1% (obj./obj.) kyselině octové po dobu 5 dní. Výsledná koncentrace kolagenu v roztoku kolagenu byla 6 mg/ml. Sítovaná kolagenová mikrovlákna byla 2 dny před přípravou hydrogelových kompozitů promývána ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (PBS) a následně položena na dno 24 jamkové destičky se skleněným dnem. Pro přípravu kolagenového hydrogelu je nutné neutralizovat kyselý roztok kolagenu 0,6% (hmotn./hmotn.) roztokem NaHCO₃ v poměru 1 : 0,0166 (COL : NaHCO₃). Během přípravy kompozitního hydrogelu bylo nutné uchovávat kyselý roztok kolagenu na ledu, aby se předešlo předčasné gelaci.

45 Příklad 3: Příprava buněk

WJC ve 4. pasáži byly kultivovány v médiu alfa MEM s přidavkem 5 % DL a 10 µg/ml gentamicinu. Po dosažení cca 90% konfluence byly buňky sklizeny pomocí Trypsinu/EDTA a spočítány. Byly připraveny alikvoty s 500 tis. buněk na zkuševku. Charakterizace WJC je uvedena v publikaci (Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, Chudickova M, Koci Z, Turnovcova K, Kupcova Skalnikova H, Vodicka P, Kubinova S. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. Sci Rep. 2020 Mar 9;10(1):4290. doi: 10.1038/s41598-020-61167-z. PMID: 32152403; PMCID: PMC7062771.).

55

Příklad 4: Příprava destičkového lyzátu a krevní plazmy

Lidský destičkový lyzát (DL) byl připraven v Krajské nemocnici Liberec z plné krve 4 dárců, postup byl popsán v publikaci Filova E, Supova M, Eckhardt A, Vrbacky M, Blanquer A, Travnickova M, Knitlova J, Suchy T, Ryglova S, Braun M, Burdikova Z, Schätz M, Jencova V, Lisnenko M, Behalek L, Prochazkova R, Sedlacek R, Kubasova K, Bacakova L. Adipose-Derived Stem Cells in Reinforced Collagen Gel: A Comparison between Two Approaches to Differentiation towards Smooth Muscle Cells. Int J Mol Sci. 2023 Mar 16;24(6):5692. doi: 10.3390/ijms24065692. PMID: 36982766; PMCID: PMC10058441. Stručný postup přípravy: 5 Lidský DL byl připraven z destičkového koncentrátu (843×10^6 destiček/1 ml) zamražením při -80°C nejméně po dobu 24 hod a následným rozmražením přes noc při 4°C , což způsobilo lýzu buněk. Následně byl buněčný lyzát centrifugován ($1000 \times g$, 30 min) a supernatant byl po centrifugaci skladován při -80°C až do použití (Koprivova, B.; Lisnenko, M.; Solarska-Sciuk, K.; Prochazkova, R.; Novotny, V.; Mullerova, J.; Mikes, P.; Jencova, V.: Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. Express Polymer Letters, 14, 987–1000 (2020). <http://doi:10.3144/expresspolymlett.2020.80>. 10 15

Lidská krevní plazma byla získána z Transfuzního oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze odběrem plné krve od jednoho dárce do antikoagulačního roztoku CPD (roztok citrát fosfát dextrosy). Kontaminace trombocyty byla nižší než $50 \times 10^9/\text{TU}$ (TU = transfuzní jednotka), leukocyty nižší než $0,1 \times 10^9/\text{TU}$ a erytrocyty nižší než $6 \times 10^9/\text{TU}$. Labilní koagulační faktory byly zachovány v hodnotě alespoň 70 % výchozí hladiny. 20

Příklad 5: Příprava kompozitního hydrogelu 1 (Kompozit 1) s obsahem 50 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 50 % (obj./obj.) destičkového lyzátu se síťovanými kolagenovými mikrovlákný 25

K alikvotu WJC bylo přidáno 250 μl DL a 4,17 μl NaHCO_3 . Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 6,3 μl CaCl_2 , krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenými síťovanými kolagenovými mikrovlákný v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud neztuhlým hydrogelem bylo přidáno 250 μl roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO_2 , 37°C). Po ztuhnutí kompozitního hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidávkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) roztoku antibiotik a antimykotik (ABAM)) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. 30 35

Příklad 6: Příprava kompozitního hydrogelu 2 (Kompozit 2) s obsahem 50 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 50 % (obj./obj.) krevní plazmy se síťovanými kolagenovými mikrovlákný 40

K alikvotu WJC bylo přidáno 250 μl krevní plazmy, 4,17 μl NaHCO_3 . Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 6,3 μl CaCl_2 , krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenými síťovanými kolagenovými mikrovlákný v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud neztuhlým hydrogelem bylo přidáno 250 μl roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO_2 , 37°C). Po ztuhnutí kompozitního hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidávkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. 45 50

Příklad 7: Příprava kompozitního hydrogelu 3 (Kompozit 3) s obsahem 90 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 10 % (obj./obj.) destičkového lyzátu se síťovanými kolagenovými mikrovlákný 50

K alikvotu WJC bylo přidáno 50 μl DL a 7,5 μl NaHCO_3 . Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 1,3 μl CaCl_2 , krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenými síťovanými kolagenovými mikrovlákný v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud neztuhlým hydrogelem bylo přidáno 450 μl roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO_2 , 37°C). Po 55

ztuhnutí kompozitního hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přísávkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou.

- 5 Příklad 8: Příprava kompozitního hydrogelu 4 (Kompozit 4) s obsahem 90 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 10 % (obj./obj.) krevní plazmy se síťovanými kolagenovými mikrovlákný

10 K alikvotu WJC bylo přidáno 50 μ l krevní plazmy a 7,5 μ l NaHCO₃. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 1,3 μ l CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenými síťovanými kolagenovými mikrovlákný v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud neztuhlým hydrogelem bylo přidáno 450 μ l roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí kompozitního hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přísávkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou.

Příklad 9: Příprava kompozitního hydrogelu 5 (Kompozit 5) s obsahem 100 % (obj./obj.) roztoku kolagenu se síťovanými kolagenovými mikrovlákný

20 K alikvotu WJC bylo přidáno 50 μ l růstového kultivačního média (alfa MEM s přísávkem 2% (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM). Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 8,34 μ l NaHCO₃, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenými síťovanými kolagenovými mikrovlákný ve 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení WJC buněk s hydrogelem bylo přidáno 450 μ l kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přísávkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou.

30 Příklad 10: Příprava kompozitního hydrogelu 6 (Kompozit 6) s obsahem 100 % (obj./obj.) krevní plazmy se síťovanými kolagenovými mikrovlákný

35 K alikvotu WJC bylo přidáno 500 μ l krevní plazmy. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 12,6 μ l CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenými síťovanými kolagenovými mikrovlákný v 24 jamkové destičce. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přísávkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou.

40 Příklad 11: Vlastnosti kompozitních hydrogelů osazených WJC buňkami a vyztužených síťovanými kolagenovými mikrovlákný

a) Podpora proliferace a diferenciacie WJC buněk do hladké svaloviny v kompozitních hydrogelech 1 až 6

45 Po 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno diferenciacním médiem (DMEM low glucose, 2 % (obj./obj.) fetálního hovězího séra (FBS), 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGF β 1, 50 μ g/ml kyselina askorbová a 40 μ g/ml gentamicin) pro podporu diferenciacie buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každý druhý den. Kompozitní hydrogely byly fixovány ve 4% (hmotn./hmotn.) paraformaldehydu po 7 a 14 dnech kultivace a na těchto vzorcích byly imunofluorescenčně obarveny markery buněk hladké svaloviny (alfa-aktin a kalponin) (Obr. 3). Po 14 dnech kultivace byly změřeny rozměry vzorků (Tab. 1).

Tabulka 1: Rozměry kompozitních hydrogelů 1 až 6 vyztužených síťovanými kolagenovými mikrovlákný po 14 dnech kultivace.

	Výška (mm)	Šířka (mm)
Kompozit 1	5	10
Kompozit 2	6	6
Kompozit 3	4	5
Kompozit 4	5	5
Kompozit 5	6	12
Kompozit 6	5	10

- 5 b) Imunofluorescenční barvení kompozitních hydrogelů 1 až 6 vyztužených síťovanými kolagenovými mikrovlákný, hodnocení hustoty buněk v kompozitních hydrogelech a hodnocení diferenciacie pomocí poměru pozitivních fluorescenčních signálů alfa-aktinu a kalponinu.
- 10 Vzorky byly před barvením promyty PBS a fixovány ve 4% (hmotn./hmotn.) paraformaldehydu po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Nespecifická vazba protilátek byla blokována inkubací vzorků v PBS s 1 % (hmotn./hmotn.) bovinního sérového albuminu (BSA) a 1 % (obj./obj.) Tween 20 po dobu 60 minut. Vzorky byly následně promyty čistým PBS a byly inkubovány přes noc při 4 °C v primárních protilátkách ředěných v PBS obsahujících 1 % (hmotn./hmotn.) BSA a 0,1 % (obj./obj.) Tween 20. Byly použity následující primární protilátky: anti- alfa-aktinová protilátka (myš, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab5694, přes noc), ředěná 1 : 200,
- 15 a protilátka anti-h1-kalponin (králík, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab46794) ředěná 1 : 200. Proti myši primární protilátce byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 546 (červená fluorescence, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab150116) ředěná 1 : 500, proti králičí primární protilátce byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488 (zelená fluorescence, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab199091), ředěná 1 : 400. Jádra buněk byla barvena barvivem Hoechst 34580 (modrá fluorescence, Life Technologies, USA, kat. č. H21486) ředěným v PBS v poměru 1 : 100. Snímky z každé sady byly fotografovány se stejným nastavením expozice. Pro úpravu fotografií a analýzu počtu jader byl použit Imaris Microscopy Image Analysis Software.
- 25 Počet buněk byl stanoven podle počtu pozitivně barvených jader v kompozitních hydrogelech. Vypočítané hodnoty hustoty buněk na mililitr kompozitního hydrogelu pro oba časové intervaly jsou uvedeny na obrázku 3. Imunofluorescenční barvení prokázalo přítomnost alfa-aktin (časný marker hladkých svalových buněk) i kalponin (střednědobý marker hladkých svalových buněk) pozitivních buněk (Obr. 4). Diferenciacie buněk směrem k hladkému svalu byla hodnocena pomocí poměru objemů pozitivních fluorescenčních signálů kalponinu a alfa-aktinu (Tabulka 2). Jednotlivé kompozitní hydrogely se mezi sebou statisticky nelišily.

- 35 Tabulka 2. Hodnocení diferenciacie pomocí poměru pozitivních fluorescenčních signálů kalponinu a alfa-aktinu v kompozitních hydrogelech 1 až 6.

	kalponin / alfa-aktin	
	průměr	SD
Kompozit 1	143,93	53,73
Kompozit 2	509,43	388,39
Kompozit 3	359,65	355,72
Kompozit 4	821,27	1095,00
Kompozit 5	160,52	109,36
Kompozit 6	524,56	573,63

Příklad 12: Příprava polymerní síťky z kompozitní nitě

Polymerní síťka byla vyrobena z kompozitních nití tvořených mikrovlákněným multifilem z polyamidu 6 (12 trilobálních vláken, jemnost multifilu 4,4 tex) a nanovlákněným obalem z polykaprolaktonu (Obr. 2). Kompozitní nitě byly vyrobeny principem uvedeným v WO 2016192697 A2 s odtahovou rychlostí 15 nebo 20 m/min. Rozpouštědlový systém pro střídavé elektrické zvlákňování polykaprolaktonových nanovláken byl kyselina octová/kyselina mravenčí/acetón v hmotnostním poměru 1 : 1 : 1. Koncentrace roztoku byla 10 % (hmotn./hmotn.). Vzdálenost zvlákňovací elektrody od mikrovlákněné nitě byla 355 mm, napětí jádra 30 cN, teplota v sušící zóně 35 °C, zvlákňovací elektrické napětí 40 kVef, sinusový signál. Kompozitní nit o celkové jemnosti 20 tex (pro odtah 15 m/min) a 16 tex (pro odtah 20 m/min) byla ručně pomocí osnovního pletení přetvořena do formy oboustranné síťky s hustotou 3,3 sloupku/cm a 3 řádky/cm s plošnou hmotností 50 g/m² (nit 20tex) a 40 g/m² (nit 16tex) (Obr. 2).

Příklad 13: Příprava kompozitního hydrogelu 7 (Kompozit 7) s obsahem 50 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 50 % (obj./obj.) destičkového lyzátu se síťovanými kolagenovými mikrovlákněmi a polymerní síťkou z kompozitní nitě a jeho následná endotelizace

Na dno jamky byla přidána polymerní síťka z kompozitní nitě a síťovaná kolagenová mikrovlákna. K alikvotu WJC bylo přidáno 250 µl DL a 4,17 µl NaHCO₃. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 6,3 µl CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenou polymerní síťkou z kompozitní nitě a síťovanými kolagenovými mikrovlákněmi v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud neztuhlým hydrogelem bylo přidáno 250 µl roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. Po 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno za 30 diferenciální médium (DMEM low glucose, 2 % (obj./obj.) FBS, 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGFβ1 a 50 µg/ml kyselina askorbová) pro podporu diferenciace buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro hodnocení mechanických vlastností trvala kultivace do 14. dne.

Pro endotelizaci kompozitního hydrogelu 7 byly 10. den na kompozitní hydrogel nasazeny endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (100 x 10³ na jamku) a kultivovány v kompletním endoteliálním růstovém médiu 2 (EGM-2) po dobu dalších 4 dní.

Příklad 14: Příprava kompozitního hydrogelu 8 (Kompozit 8) s obsahem 50 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 50 % (obj./obj.) lidské plazmy se síťovanými kolagenovými mikrovlákněmi a polymerní síťkou z kompozitní nitě a jeho následná endotelizace

Na dno jamky byla přidána polymerní síťka z kompozitní nitě a síťovaná kolagenová mikrovlákna. K alikvotu WJC bylo přidáno 250 µl krevní plazmy a 4,17 µl NaHCO₃. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 6,3 µl CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenou polymerní síťkou z kompozitní nitě a síťovanými kolagenovými mikrovlákněmi v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud neztuhlým hydrogelem bylo přidáno 250 µl roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. Po 50 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno za diferenciální médium (DMEM low glucose, 2 % (obj./obj.) FBS, 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGFβ1 a 50 µg/ml kyselina askorbová) pro podporu diferenciace buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro hodnocení mechanických vlastností trvala kultivace do 55

14. dne. Pro endotelizaci kompozitního hydrogelu 8 byly 10. den na kompozitní hydrogel nasazeny endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (100×10^3 na jamku) a kultivovány v kompletním EGM-2 po dobu dalších 4 dní.

- 5 Příklad 15: Příprava kompozitního hydrogelu 9 (Kompozit 9) s obsahem 90 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 10 % (obj./obj.) destičkového lyzátu se síťovanými kolagenovými mikrovláknky a polymerní sít'kou z kompozitní nitě a jeho následná endotelizace

Na dno jamky byla přidána polymerní sít'ka z kompozitní nitě a síťovaná kolagenová mikrovláknka. K alikvotu WJC bylo přidáno 50 μ l DL a 7,5 μ l NaHCO₃. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 1,3 μ l CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenou polymerní sít'kou z kompozitní nitě a síťovanými kolagenovými mikrovláknky v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud nezduhlým hydrogelem bylo přidáno 450 μ l roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. Po 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno za diferenační médium (DMEM low glucose, 2% (obj./obj.) FBS, 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGF β 1 a 50 μ g/ml kyselina askorbová) pro podporu diferenciaci buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro hodnocení mechanických vlastností trvala kultivace do 14. dne. Pro endotelizaci kompozitního hydrogelu 9 byly 10. den na kompozitní hydrogel nasazeny endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (100×10^3 na jamku) a kultivovány v kompletním EGM-2 po dobu dalších 4 dní.

25 Příklad 16. Příprava kompozitního hydrogelu 10 (Kompozit 10) s obsahem 90 % (obj./obj.) roztoku kolagenu a 10 % (obj./obj.) krevní plazmy se síťovanými kolagenovými mikrovláknky a polymerní sít'kou z kompozitní nitě a jeho následná endotelizace

30 Na dno jamky byla přidána polymerní sít'ka z kompozitní nitě a síťovaná kolagenová mikrovláknka. K alikvotu WJC bylo přidáno 50 μ l krevní plazmy a 7,5 μ l NaHCO₃. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 1,3 μ l CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenou polymerní sít'kou z kompozitní nitě a síťovanými kolagenovými mikrovláknky v 24 jamkové destičce. Okamžitě po nanesení buněk s dosud nezduhlým hydrogelem bylo přidáno 450 μ l roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. Po 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno za diferenační médium (DMEM low glucose, 2 % (obj./obj.) FBS, 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGF β 1 a 50 μ g/ml kyselina askorbová) pro podporu diferenciaci buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro hodnocení mechanických vlastností trvala kultivace do 14. dne. Pro endotelizaci kompozitního hydrogelu 10 byly 10. den na kompozitní hydrogel nasazeny endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (100×10^3 na jamku) a kultivovány v kompletním EGM-2 po dobu dalších 4 dní.

50 Příklad 17: Příprava kompozitního hydrogelu 11 (Kompozit 11) s obsahem 100 % (obj./obj.) roztoku kolagenu se síťovanými kolagenovými mikrovláknky a polymerní sít'kou z kompozitní nitě a jeho následná endotelizace

Na dno jamky byla přidána polymerní sít'ka z kompozitní nitě a síťovaná kolagenová mikrovláknka. K alikvotu WJC bylo přidáno 50 μ l růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM). Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 8,34 μ l NaHCO₃, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenou polymerní sít'kou z kompozitní nitě a síťovanými kolagenovými mikrovláknky ve 24 jamkové destičce. Okamžitě po

nanesení WJC buněk s hydrogelem bylo přidáno 450 μ l roztoku kolagenu a ihned pipetou krouživým pohybem promícháno. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. Po 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno za diferenciací médium (DMEM low glucose, 2 % (obj./obj.) FBS, 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGF β 1 a 50 μ g/ml kyselina askorbová) pro podporu diferenciací buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro hodnocení mechanických vlastností trvala kultivace do 14. dne. Pro endotelizaci kompozitního hydrogelu 11 byly 10. den na kompozitní hydrogel nasazené endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (100 x 10³ na jamku) a kultivovány v kompletním EGM-2 po dobu dalších 4 dní.

Příklad 18: Příprava kompozitního hydrogelu 12 (Kompozit 12) s obsahem 100 % (obj./obj.) krevní plazmy se síťovanými kolagenovými mikrovlákny a polymerní sítíkou z kompozitní nitě a jeho následná endotelizace

Na dno jamky byla přidána polymerní sítíka z kompozitní nitě a síťovaná kolagenová mikrovlákna. K alikvotu WJC bylo přidáno 500 μ l krevní plazmy. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 12,6 μ l CaCl₂, krátce promícháno a přeneseno pipetou do jedné jamky s předem připravenou polymerní sítíkou z kompozitní nitě a síťovanými kolagenovými mikrovlákny ve 24 jamkové destičce. Deska byla přenesena do termostatu s řízenou atmosférou (5 % CO₂, 37 °C). Po ztuhnutí hydrogelu (cca 15 min) bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml růstového kultivačního média (alfa MEM s přidavkem 2 % (obj./obj.) DL + 1 % (obj./obj.) ABAM) a kultivační deska byla vrácena do termostatu s řízenou atmosférou. Po 48 hodinách kultivace v růstovém médiu bylo růstové kultivační médium nahrazeno za diferenciací médium (DMEM low glucose, 2 % (obj./obj.) FBS, 2,5 ng/ml BMP4, 2,5 ng/ml TGF β 1 a 50 μ g/ml kyselina askorbová) pro podporu diferenciací buněk do hladké svaloviny. Médium bylo měněno každé 3 dny. Pro hodnocení mechanických vlastností trvala kultivace do 14. dne. Pro endotelizaci kompozitního hydrogelu 12 byly 10. den na kompozitní hydrogel nasazené endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (100 x 10³ na jamku) a kultivovány v kompletním EGM-2 po dobu dalších 4 dní.

Příklad 19: Charakterizace kompozitních hydrogelů vyztužených síťovanými kolagenovými mikrovlákny a polymerní sítíkou z kompozitní nitě

a) Měření mechanických vlastností

Kompozitní hydrogely připravené podle Příkladu 13 až 18 byly kultivovány s WJC 14 dní bez endotelizace. Měření mechanických vlastností proběhlo na živých preparátech mikroindentací pomocí přístrojů Hysitron BioSoft In-Situ Indenter a BioSoft PetriDishHeater, 16 indentů na každý vzorek. Měření neukázalo statisticky významné rozdíly Youngova modulu pružnosti mezi jednotlivými vzorky (Tab. 3).

Tabulka 3: Modul pružnosti (E) kompozitních hydrogelů 7 až 12 s dvojí výztuží měřený indentací 14. den kultivace. Kontrola – kompozitní hydrogel bez buněk tvořený 100% (obj./obj.) kolagenovým hydrogelem, síťovanými kolagenovými mikrovlákny a polymerní sítíkou z kompozitní nitě měřený v den 0. Měřeno mikroindentací pomocí Hysitron BioSoft In-Situ Indenter. Data jsou uvedena jako průměr \pm SD.

Vzorek	E (kPa)	SD
Kompozit 7	1,64	0,36
Kompozit 8	1,81	0,54
Kompozit 9	1,43	0,49
Kompozit 10	1,46	0,54
Kompozit 11	2,60	0,85
Kompozit 12	3,07	0,61
Kontrola	2,30	0,81

- b) Ověření přítomnosti endotelových buněk na endotelizovaných kompozitních hydrogelech vyztužených síťovanými kolagenovými mikrovláknými a polymerní sítí z kompozitní nitě pomocí imunofluorescenčního barvení von Willebrandova faktoru

5

Čtrnáctý den kultivace byly endotelizované kompozitní hydrogely 7 až 12 před barvením promyty PBS a fixovány v 4% (hmotn./hmotn.) paraformaldehydu po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Nespecifická vazba protilátek byla blokována inkubací vzorků v PBS s 1 % (hmotn./hmotn.) BSA a 1 % (obj./obj.) Tween 20 po dobu 60 minut. Vzorky byly následně promyty čistým PBS a byly inkubovány přes noc při 4 °C v primárních protilátkách ředěných v PBS obsahujícím 1 % (hmotn./hmotn.) BSA a 0,1 % (obj./obj.) Tween 20. Byly použity následující primární protilátky: protilátka proti alfa-aktinu (myš, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab5694, přes noc) ředění 1 : 200, protilátka proti von Willebrandovu faktoru (ředění 1 : 200, 3 h, pokojová teplota, F 3520, SIGMA). Proti myší primární protilátce byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 546 (červená fluorescence, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab150116) ředěná 1 : 500, proti králičí primární protilátce byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488 (zelená fluorescence, Abcam, Cambridge, UK, kat. č. ab199091), ředěná 1 : 400. Jádra buněk byla barvena barvivem Hoechst 34580 (modrá fluorescence, Life Technologies, USA, kat. č. H21486) ředěným v PBS v poměru 1 : 100. Vzorky byly skenovány mikroskopem Bruker Ultima, obj. × 25, měřítko = 100 μm. Imunofluorescenční barvení prokázalo přítomnost von Willebrand faktoru u buněk u všech hydrogelových kompozitů.

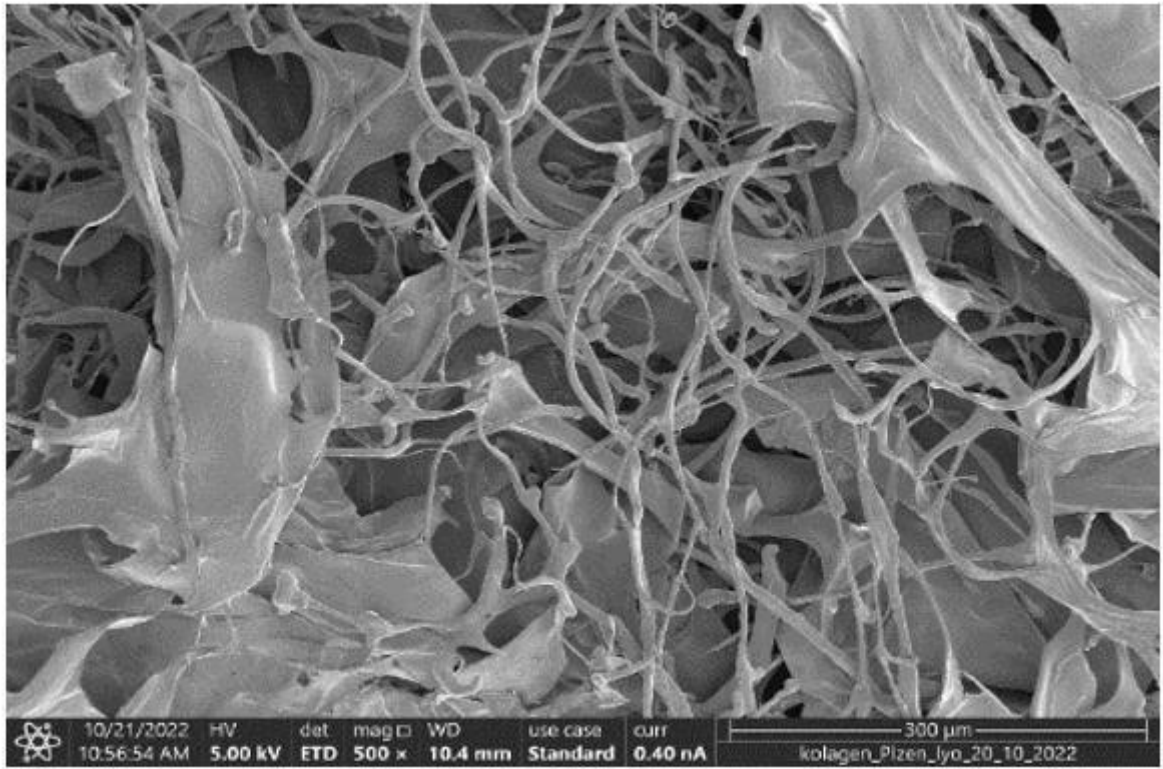
20

NÁROKY NA OCHRANU

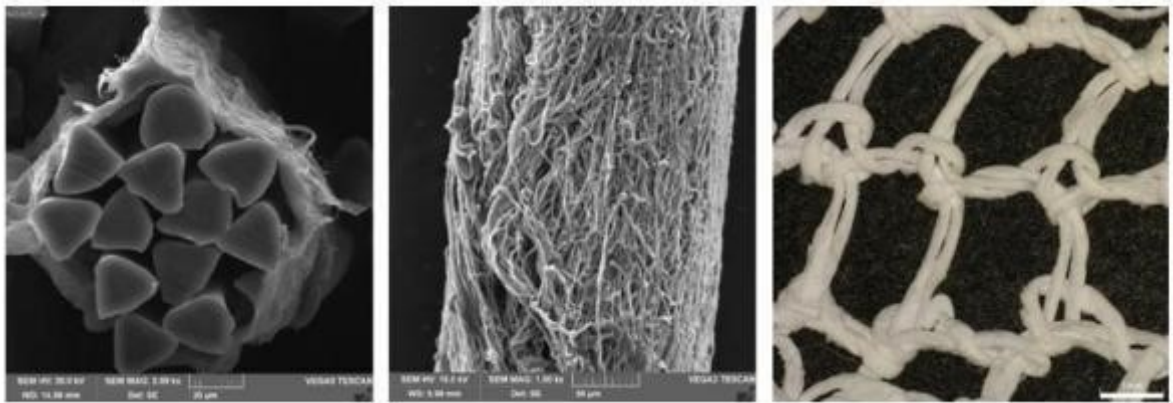
- 5 1. Kompozitní hydrogel, **vyznačující se tím**, že obsahuje hydrogel připravitelný gelací roztoku kolagenu a/nebo krevní plazmy, popřípadě s přidavkem destičkového lyzátu, přičemž tento hydrogel je vyztužený síťovanými kolagenovými mikrovláknny, popřípadě i polymerní sítčkou, a přičemž kompozitní hydrogel dále obsahuje kmenové buňky.
2. Kompozitní hydrogel podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje endotelové buňky.
- 10 3. Kompozitní hydrogel podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že hydrogel je připravitelný gelací kolagenu, nebo je připravitelný gelací krevní plazmy, nebo je připravitelný gelací směsí kolagenu a krevní plazmy v množstvích odpovídajících 30 až 95 obj. % 0,6% hmotn./hmotn. roztoku kolagenu a 5 až 70 obj. % krevní plazmy, nebo je připravitelný gelací směsí kolagenu a destičkového lyzátu v množstvích odpovídajících 30 až 95 obj. % 0,6% hmotn./hmotn. roztoku kolagenu a 5 až 70 obj. % destičkového lyzátu.
- 15 4. Kompozitní hydrogel podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že hydrogel je vyztužený síťovanými kolagenovými mikrovláknny a polymerní sítčkou.
5. Kompozitní hydrogel podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že polymerní sítka je z biokompatibilních polymerních mikrovláknenných nití nebo z kompozitních nití kombinujících mikrovláknna a nanovláknna, přičemž nitě mají jemnost 10 až 50 tex.
- 20 6. Kompozitní hydrogel podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že polymerní sítka je ve formě osnovní nebo zátažné pleteniny, s hustotou sloupek a řádků v rozmezí 2 až 10 cm⁻¹ a plošnou hmotností 30 až 100 g/m².
7. Kompozitní hydrogel podle kteréhokoliv z nároků 4 až 6, **vyznačující se tím**, že polymerní sítka je z polyamidu 6 a/nebo polykaprolaktonu.
- 25 8. Kompozitní hydrogel podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že kmenovými buňkami jsou buňky Whartonova rosolu.
9. Kompozitní hydrogel podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že kompozitní hydrogel obsahuje alespoň 700 x 10³ buněk Whartonova rosolu na 1 ml kompozitního hydrogelu, výhodněji obsahuje kompozitní hydrogel 700 x 10³ až 2000 x 10³ buněk Whartonova rosolu buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu.
- 30 10. Kompozitní hydrogel podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že kompozitní hydrogel dále obsahuje endotelové buňky v množství alespoň 30 x 10³ endotelových buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu, výhodněji obsahuje kompozitní hydrogel 30 x 10³ až 100 x 10³ endotelových buněk na 1 ml kompozitního hydrogelu.

35

3 výkresy

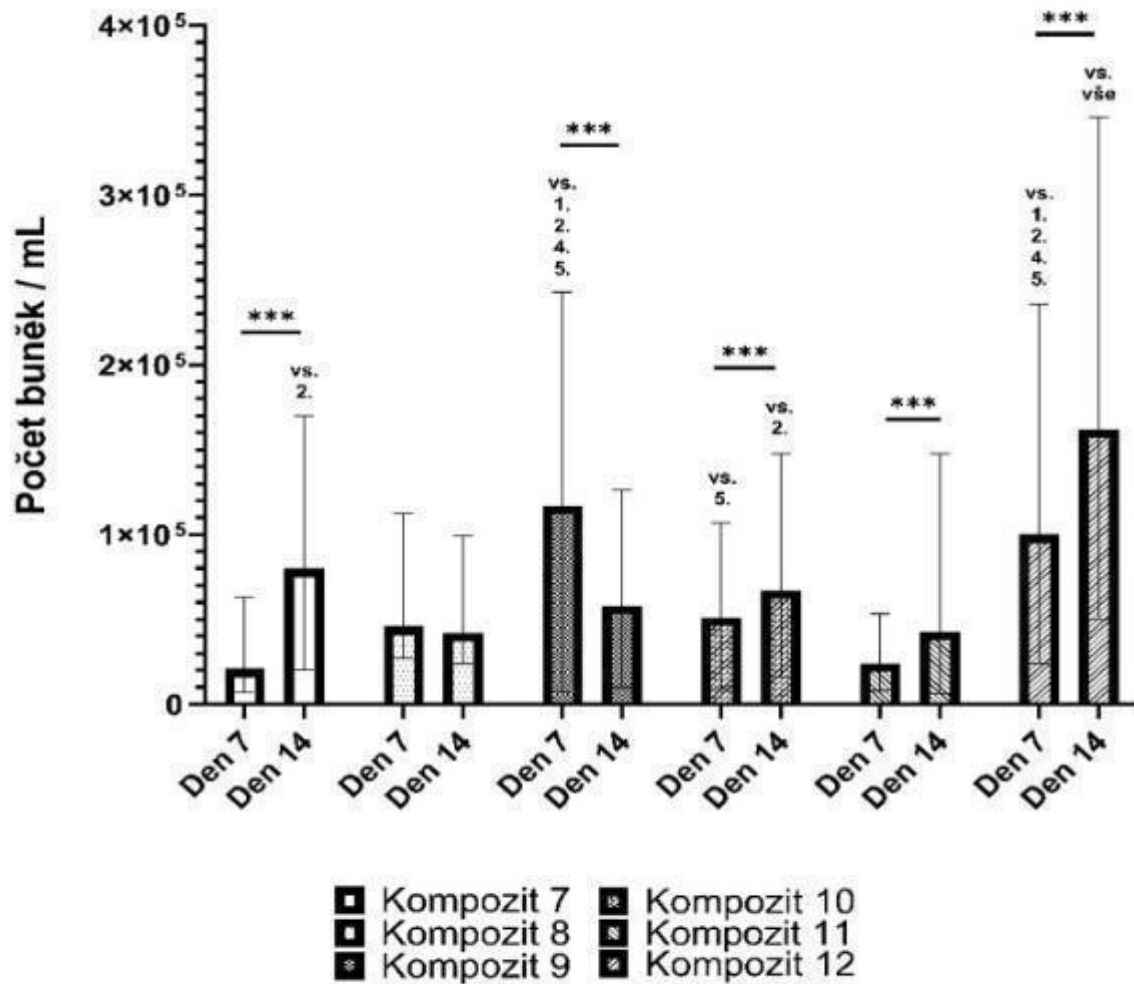


Obr. 1

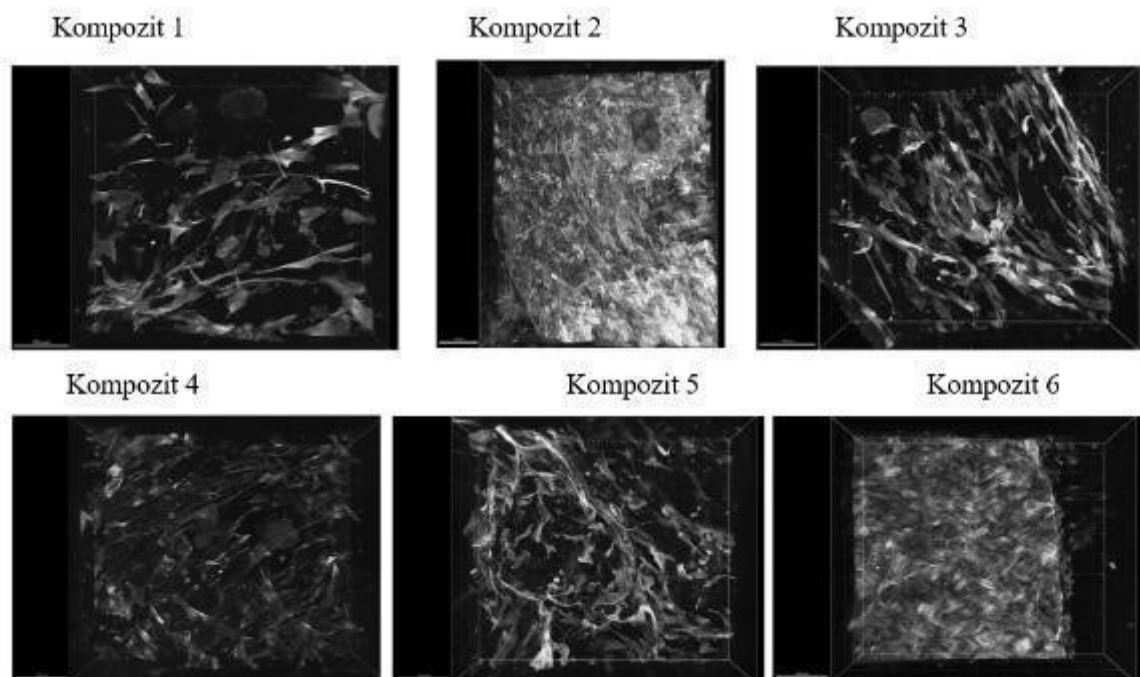


Obr. 2

Počet buněk 7. a 14. den



Obr. 3



Obr. 4