

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Obor: Lékařská biofyzika



**Mgr. Věra Sovková**

**Příprava, charakterizace a testování krevních derivátů pro aplikace v regenerativní  
medicíně**

Preparation, characterization and testing of blood derivatives for applications in  
regenerative medicine

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 21.2.2019

Věra Sovková

Identifikační záznam:

Sovková, Věra. *Příprava, charakterizace a testování krevních derivátů pro aplikace v regenerativní medicíně. [Preparation, characterization and testing of blood derivatives for applications in regenerative medicine]*. Praha 2019. Počet stran 170. Disertační práce (Ph.D).  
Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav biofyziky.

Vedoucí práce Amler, Evžen.

Klíčová slova: trombocyty, nanovlákná, růstové faktory, řízené dodávání léčiv.

Key words: platelets, nanofibers, growth factors, drug delivery.

## Seznam zkratek

ADP	Adenosindifosfát
ALP	Alkalická fosfatáza
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adosintrifosfát
BC	Buffy coat
BDNF	Z mozku odvozený neurotrofický faktor ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
bFGF	Bazický růstový faktor fibroblastů ( <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
BMP	Kostní morfogenetický protein ( <i>bone morphogeneic protein</i> )
BMP-7	Kostní morfogenetický protein 7 ( <i>bone morphogeneic protein 7</i> )
BSA	Hovězí sérový albumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CCL5	chemokinový ligand 5 s C-C motivem ( <i>C-C Motif Chemokine Ligand 5</i> )
CD znaky	Diferenciační znaky ( <i>Cluster of differentiation</i> )
CXCL10	Chemokinový ligand 10 s C-C motivem ( <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i> )
CXCL12	Chemokinový ligand 12 s C-C motivem ( <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i> )
CXCL4	Chemokinový ligand 4 s C-C motivem ( <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 4</i> )
CXCL7	Chemokinový ligand 7 s C-C motivem ( <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 7</i> )
dH <sub>2</sub> O	Destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
ELISA	Enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze ( <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> )
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FGF	Růstový faktor fibroblastů ( <i>Fibroblast growth factor</i> )
FGF-1	Růstový faktor fibroblastů 1 ( <i>Fibroblast growth factor 1</i> )
FGF-2	Růstový faktor fibroblastů 2 ( <i>Fibroblast growth factor 2</i> )
FK	Fyziologická koncentrace
G-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů ( <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> )
GDP	Guanosindifosfát
GF	Růstový faktor ( <i>growth factor</i> )

GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů ( <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
Gp Ia/IIa	Glykoprotein Ia/IIa
Gp Ib/IX/V	Glykoprotein Ib/IX/V
Gp IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
Gp VI	Glykoprotein VI
HGF	Růstový faktor hepatocytů ( <i>Hepatocyte growth factor</i> )
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex ( <b>H</b> uman <b>l</b> eukocyte <b>a</b> ntigen)
hMSC	Lidské mezenchymální kmenové buňky ( <i>Human mesenchymal stem cells</i> )
hPL	Lidský trombocytární lyzát ( <i>Human platelet lysate</i> )
HRP	Křenová peroxidáza ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
IGF	Růstový faktor podobný inzulinu ( <i>Insulin-like growth factor</i> )
IGF-1Eb	Insulinu podobný růstový faktor 1Eb ( <i>Insulin-like growth factor 1Eb</i> )
IGF-I	Růstový faktor podobný inzulinu I ( <i>Insulin-like growth factor I</i> )
IGF-II	Růstový faktor podobný inzulinu II ( <i>Insulin-like growth factor II</i> )
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-15	Interleukin-15
IL-17	Interleukin-17
IL-1b	Interleukin-1b
IL-1ra	Interleukin 1ra
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-7	Interleukin-7
IL-8	Interleukin-8
IL-9	Interleukin-9
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
IU	Mezinárodní jednotka ( <i>International unit</i> )
L-PRF	Fibrin bohatý na trombocyty a leukocyty ( <i>Leukocyte- and platelet-rich fibrin</i> )
L-PRP	Plazma bohatá na trombocyty a leukocyty ( <i>Leukocyte- and platelet-rich plasma</i> )

MCP-1	Protein atrahující monocyty ( <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> )
MEM	Minimum Essential Medium
MIP 1b	Zánětlivý protein makrofágů 1b ( <i>Macrophage inflammatory protein 1b</i> )
MIP-1a,	Zánětlivý protein makrofágů 1a ( <i>Macrophage inflammatory protein 1a</i> )
mi-R-133a	MikroRNA 133a
MSC	Mezenchymální kmenové buňky ( <i>Mesenchymal stem cells</i> )
Myf5	Myogenní faktor 5
MyoD1	Myogenní determinační protein 1
NADH	Nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NK buňky	Přirození zabíječi ( <i>Natural killer</i> )
OCN	Osteokalcin
OCS	Otevřený kanálkový systém ( <i>Open canalicular system</i> )
Pax7	Paired box protein
PBS	Fosfátový pufr ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PDGF	Růstový faktor odvozený od trombocytů ( <i>Platelet derived growth factor</i> )
PDGF-AA	Růstový faktor odvozený od trombocytů AA ( <i>Platelet derived growth factor AA</i> )
PDGF-AB	Růstový faktor odvozený od trombocytů AB ( <i>Platelet derived growth factor AB</i> )
PDGF-BB	Růstový faktor odvozený od trombocytů BB ( <i>Platelet derived growth factor BB</i> )
PDGF-CC	Růstový faktor odvozený od trombocytů CC ( <i>Platelet derived growth factor CC</i> )
PDGF-DD	Růstový faktor odvozený od trombocytů DD ( <i>Platelet derived growth factor DD</i> )
PEG	Polyetylenglykol
PEO-PPO-PEOPluronic	
PGA	Kyselina polyglykolová
pHPL	Směsný lidský trombocytární lyzát ( <i>Pooled human platelet lysate</i> )
PI	Propidium jodid
PL	Trombocytární lyzát ( <i>Platelet lysate</i> )
PLA	Kyselina polymléčná ( <i>Polylactic acid</i> )
PLGF	Placentální růstový faktor ( <i>Placental growth factor</i> )
PNPP	P-nitrofenyl fosfát
PPP	Plazma chudá na trombocyty ( <i>platelet poor plasma</i> )

P-PRF	Čistý fibrin bohatý na trombocyty ( <i>Pure platelet-rich fibrin</i> )
P-PRP	Čistá plazma bohatá na trombocyty ( <i>Pure platelet-rich plasma</i> )
PRF	Chokrounův fibrin bohatý na trombocyty ( <i>Platelet rich fibrin</i> )
PRP	Plazma bohatá na trombocyty ( <i>Platelet rich plasma</i> )
PRR	Receptory pro rozpoznávání vzorů ( <i>Pattern recognition receptor</i> )
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrolidon
RNA	Ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDF-1	Faktor odvozený od stromálních buněk 1 ( <i>Stromal cell-derived factor 1</i> )
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie ( <i>scanning electron microscopy</i> )
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor beta ( <i>Transforming growth factor beta</i> )
TGF- $\beta$ 1	Transformující růstový faktor beta 1 ( <i>Transforming growth factor beta 1</i> )
TGF- $\beta$ 2	Transformující růstový faktor beta 2 ( <i>Transforming growth factor beta 2</i> )
TGF- $\beta$ 3	Transformující růstový faktor beta 3 ( <i>Transforming growth factor beta 3</i> )
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$
TPA	12- O-Tetradecanoylforbol-13-acetát
UTP	Uridintrifosfát
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
VEGF-A	Vaskulární endotelový růstový faktor 1 ( <i>Vascular endothelial growth factor A</i> )
VEGF-B	Vaskulární endotelový růstový faktor 2 ( <i>Vascular endothelial growth factor B</i> )
VEGF-C	Vaskulární endotelový růstový faktor 3 ( <i>Vascular endothelial growth factor C</i> )
VEGF-D	Vaskulární endotelový růstový faktor 4 ( <i>Vascular endothelial growth factor D</i> )
VEGF-E	Vaskulární endotelový růstový faktor 5 ( <i>Vascular endothelial growth factor E</i> )
VEGFR	Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor ( <i>receptor for vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR-1	Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor 1 ( <i>receptor for vascular endothelial growth factor 1</i> )
VEGFR-2	Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor 2 ( <i>receptor for vascular endothelial growth factor 2</i> )
VEGFR-3	Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor 3 ( <i>receptor for vascular endothelial growth factor 3</i> )

vWF

Von Willebrandův faktor



# Obsah

1	Úvod.....	14
2	Literární přehled.....	16
2.1	Složky krve.....	16
2.1.1	Krevní plazma.....	16
2.1.2	Erytrocyty.....	17
2.1.3	Leukocyty.....	17
2.1.3.1	Granulocyty.....	17
2.1.3.2	Agranulocyty.....	18
2.1.4	Trombocyty.....	18
2.1.4.1	Původ a vývoj trombocytů.....	19
2.1.4.2	Struktura trombocytů.....	19
2.1.4.2.1	Periferní zóna.....	20
2.1.4.2.2	Oblast solubilního gelu.....	22
2.1.4.2.3	Organelová zóna.....	22
2.1.4.2.4	Denzní tubulární systém.....	23
2.1.4.3	Funkce trombocytů.....	24
2.1.4.3.1	Adheze trombocytů.....	24
2.1.4.3.2	Aktivace trombocytů.....	25
2.1.4.3.3	Agregace trombocytů.....	25
2.2	Růstové faktory a signální molekuly přítomné v trombocytech a jejich význam v regenerativní medicíně.....	26
2.2.1	PDGF.....	26
2.2.2	VEGF.....	27
2.2.3	Růstové faktory podobné inzulinu.....	28
2.2.4	Transformující růstový faktor beta.....	28
2.2.5	Růstové faktory fibroblastů.....	29
2.2.6	RANTES.....	29
2.3	Krevní deriváty.....	30
2.3.1	Plazma bohatá na trombocyty.....	30

2.3.2	Chokrounův fibrin bohatý na trombocyty .....	31
2.3.3	Trombocytární lyzát .....	31
2.3.4	Použití krevních derivátů pro buněčnou kultivaci.....	32
2.3.5	Použití krevních derivátů pro regeneraci měkkých tkání.....	34
2.3.5.1	Hojení kožních defektů.....	34
2.3.5.2	Hojení pohybového aparátu.....	35
2.3.5.3	Použití krevních derivátů pro regeneraci kosti .....	37
2.4	Nanovláknenné nosiče pro regenerativní medicínu .....	39
2.4.1	Elektrostatické zvlákňování .....	39
2.4.2	Odstředivé zvlákňování.....	41
2.4.3	Polymery používané pro přípravu ultrajemných vláken .....	42
2.4.3.1	Syntetické polymery .....	43
2.4.3.1.1	Poly-ε-kaprolakton.....	43
2.4.3.1.2	Polyvinylalkohol .....	44
2.4.3.2	Přírodní polymery.....	45
2.4.4	Funkcionalizace nanovláknenných nosičů .....	45
2.4.4.1	Metody funkcionalizace během přípravy nosičů.....	46
2.4.4.1.1	Zvlákňování ze směsi.....	46
2.4.4.1.2	Koaxiální zvlákňování .....	47
2.4.4.1.3	Emulzní zvlákňování .....	48
2.4.4.2	Metody dodatečné funkcionalizace připravených nosičů.....	48
3	Cíle práce.....	50
4	Experimentální část .....	51
5	Obecné metody.....	52
5.1	Stanovení celkového proteinu v trombocytárním lyzátu.....	52
5.2	Příprava buněčných kultur .....	52
5.3	Kvantifikace fibrinogenu a albuminu v trombocytárním lyzátu .....	53
5.4	Kvantifikace IGF-I .....	53
5.5	Kvantifikace vybraných růstových faktorů v trombocytárním lyzátu a jeho složkách a stanovení uvolňovací kinetiky EGF z nosiče .....	54

5.6	Kvantifikace vybraných bioaktivních molekul metodou Bioplex.....	54
5.7	Stanovení metabolické aktivity buněk .....	55
5.8	Stanovení proliferace buněk.....	56
5.9	Vizualizace buněk pomocí skenovací elektronové mikroskopie .....	56
5.10	Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie .....	57
5.11	Charakterizace nosiče a příprava vzorků.....	57
5.12	Statistická analýza .....	57
6	Specifické metody .....	59
6.1	Experiment 1 .....	59
6.1.1	Příprava trombocytárních lyzátů .....	59
6.1.2	Příprava nanovláknenných nosičů elektrostatickým zvlákňováním .....	59
6.1.3	Nasazení a kultivace buněk na nosičích .....	59
6.2	Experiment 2 .....	60
6.2.1	Příprava nosiče .....	60
6.2.2	Příprava kompozitního nosiče .....	60
6.2.3	Nasazování buněk na nosiče .....	60
6.2.4	Stanovení obsahu melaninu.....	60
6.3	Experiment 3 .....	61
6.3.1	Příprava vláknenného nosiče pomocí odstředivého zvlákňování.....	61
6.3.2	Adheze trombocytů na vláknenné nosiče.....	61
6.3.3	Nasazování buněk na nosič a adheze trombocytů .....	61
6.3.4	Detekce aktivity alkalické fosfatázy (ALP) .....	62
6.3.5	Detekce osteogenních markerů nepřímým imunofluorescenčním barvením .....	62
6.4	Experiment 4 .....	63
6.4.1	Příprava jednotlivých složek trombocytárního lyzátu.....	63
6.4.2	Nasazování buněk na kultivační plast .....	63
7	Výsledky.....	64
7.1	Trombocytární lyzát jako náhrada séra pro kožní buňky kultivované na biomimetických PCL nanovláknenných nosičích .....	64
7.1.1	Výsledky.....	64

7.1.1.1	Trombocyty obsahují rozmanité bioaktivní proteiny .....	64
7.1.1.2	Charakterizace PCL nanovláken .....	66
7.1.1.3	Efekt hPL na fibroblasty .....	67
7.1.1.4	Efekt hPL na keratinocyty .....	69
7.1.1.5	Efekt hPL na melanocyty .....	71
7.1.2	Diskuze .....	74
7.1.3	Závěr .....	78
7.2	Nanovláčenné nosiče z polykaprolaktonu s adherovanými trombocyty stimulují proliferaci dermálních buněk .....	80
7.2.1	Výsledky .....	80
7.2.1.1	Charakterizace nosičů .....	80
7.2.1.2	Keratinocyty .....	81
7.2.1.3	Fibroblasty .....	85
7.2.1.4	Melanocyty .....	89
7.2.2	Diskuze .....	92
7.2.3	Závěr .....	96
7.3	Trombocyty funkcionalizovaný 3D vláčenný nosič z poly- $\epsilon$ -kaprolaktonu připravený odstředivým zvláčňováním pro dodávání růstových faktorů .....	97
7.3.1	Výsledky .....	97
7.3.1.1	Charakterizace připravených nosičů .....	97
7.3.1.2	Množství růstových faktorů v trombocytech a jejich uvolňování .....	98
7.3.1.3	Metabolická aktivita a proliferace buněk na nosičích .....	101
7.3.1.4	Osteogenní aktivita buněk MG-63 .....	103
7.3.1.5	Morfologie buněk hodnocení konfokální mikroskopii .....	104
7.3.2	Diskuze .....	107
7.3.3	Závěr .....	114
7.4	Porovnání jednotlivých složek trombocytárního koncentrátu a sledování jejich vlivu na buňky in vitro .....	115
7.4.1	Výsledky .....	115
7.4.1.1	Koncentrace celkového proteinu a vybraných bioaktivních molekul .....	115

7.4.1.2	Metabolická aktivita a proliferace buněk .....	118
7.4.1.3	Koncentrace vybraných růstových faktorů.....	124
7.4.2	Diskuze.....	126
7.4.3	Závěr.....	132
8	Závěr.....	134
9	Souhrn .....	136
10	Summary .....	137
11	Reference.....	138
12	Poděkování .....	167
13	Publikace, které jsou podkladem disertace .....	168
14	Ostatní publikace autorky.....	169

# 1 Úvod

Regenerativní medicína je v současné době jednou z nejrychleji se rozvíjejících multidisciplinárních oblastí založených na nápravě poškozených tkání. Tento termín, často používaný zaměnitelně s tkáňovým inženýrstvím, spojuje oblasti biologie a inženýrství a usiluje o zajištění regenerace těla konkrétním stimulováním biologického prostředí. Zjednodušeně se v regenerativní medicíně usiluje o vytvoření nosiče, který napodobuje přirozené mikroprostředí stávající tkáně a slouží jako fyzická opora pro adhezi buněk. Ty následně přispějí k degradaci nosiče a na jeho místě vytvoří mezibuněčnou hmotu, ve které budou dále proliferovat a kooperovat. Nosič může být obohacen o bioaktivní molekuly, které ovlivňují buněčné pochody. Existují dva přístupy pro přípravu nosičů. První spočívá v možnosti použití autologních buněk. Tento přístup zahrnuje odběr buněk příjemce, které jsou nakombinovány s vhodným nosičem a umístěny do místa poranění. Buňky také mohou být nejprve *in vitro* kultivovány za přesně definovaných podmínek pro jejich pomnožení nebo indukci diferenciací a až následně kombinovány s vhodným nosičem. Tento způsob se potýká s problémem klinického schvalování. Preferovanějším přístupem je používání funkcionalizovaných bezbuněčných nosičů. Klíč je v kombinaci vhodného biokompatibilního nosiče a bioaktivních molekul, které jsou schopné ovlivnit buňky v místě zájmu požadovaným způsobem. Lidské tělo se chová jako "živý bioreaktor", kde v důsledku řízeného uvolňování bioaktivních molekul z nosiče migrují vlastní buňky z okolních tkání do místa defektu a zahajují proces hojení.

Krevní deriváty, zejména trombocytární koncentráty a jejich modifikace, jsou pro svou snadnou dostupnost a široké spektrum obsažených růstových faktorů v popředí zájmu pro jejich využití v regenerativní medicíně. Některé přípravky jsou již v klinických aplikacích, další jsou předmětem výzkumu. Významné zastoupení mají přípravky s obsahem trombocytů jakožto zdrojem přírodních bioaktivních molekul. Bioaktivní molekuly v nich obsažené hrají důležitou roli v procesu

hojení ran a regenerace tkání. Trombocyty mohou být použity autologním nebo alogenním způsobem, samotné nebo v kombinaci s vhodným nosičem. Dále je možné připravit z trombocytů různé typy produktů, jako například na trombocyty bohatou plazmu (PRP) nebo na trombocyty bohatý fibrin (PRF), které vylepšují jejich vlastnosti pro dané aplikace a prodlužují dobu jejich použitelnosti.

V mé práci jsem se zabývala přípravou trombocytárních přípravků pro *in vitro* aplikace, jejich charakterizací pomocí molekulárně biologických metod a jejich testování samostatně nebo v kombinaci s nanovláčnými nosiči.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Složky krve

Krev je vysoce specializovaná tělní tekutina s mnoha složkami různých vlastností a funkcí, které udržují stálost vnitřního prostředí v organismu. V zásadě může být rozdělena do dvou hlavních částí, krevní plazmy a krevních elementů. Do celého těla je krev rozváděna uzavřeným systémem cév. Mezi hlavní funkce krve patří transport dýchacích plynů, živin a odpadních látek, obrana organismu proti patogenům, zástava krvácení v případě zranění, udržování stálé tělesné teploty, stálého pH a stálého osmotického a onkotického tlaku.

#### 2.1.1 Krevní plazma

Krevní plazma je slabě zásaditý, nažloutlý, vodný roztok. Voda je v ní zastoupena z 92 %, zbytek připadá na rozpuštěné látky, kterými jsou organické látky (bílkoviny, hormony) a anorganické soli. Z anorganických látek jsou přítomny elektrolyty jako je sodík, draslík, chlor, hořčík a vápník. Dále se zde vyskytují ve stopovém množství aminokyseliny, vitamíny, organické kyseliny, pigmenty a enzymy. Hormony, jako například inzulin, tyroxin a kortikosteroidy jsou uvolňovány do krve endokrinním systémem<sup>1</sup>.

Bílkoviny jsou v plazmě zastoupeny zhruba v 7 %. Mezi nejznámější z nich patří skupina albuminů, globulinů a fibrinogen. Sérový albumin, syntetizovaný v játrech, je nejhojněji zastoupeným proteinem a tvoří až 60 % všech plazmatických proteinů. Je důležitým nosičovým proteinem pro řadu látek včetně hormonů a jeho význam spočívá také v udržování onkotického tlaku v cévách.  $\alpha$ - a  $\beta$ -globuliny vznikají také v játrech, transportují železo, měď, cukr, cholesterol a steroidní hormony a dále inhibují trombin a některé proteinázy.  $\Gamma$ -globuliny jsou sekretovány B-lymfocyty při obraně organismu proti infekci. Mezi globuliny patří i protrombin, který se účastní srážení krve<sup>1</sup>. Fibrinogen, 340 kDa velký glykoprotein, je syntetizován v játrech, odkud je sekretován



do krve. Účastní se procesu hemokoagulace, což je složitý řetězec dějů, na jehož konci se fibrinogen, prostřednictvím serinové proteázy trombinu, mění na vláknitý nerozpustný fibrin. Dále se fibrinogen podílí na procesech hojení ran, angiogenezi a zánětu<sup>2</sup>. Dalšími bílkovinami obsaženými v plazmě jsou cytokiny a složky komplementu, které jsou součástí vrozené nebo specifické imunity.

### **2.1.2 Erytrocyty**

Erytrocyty jsou bezjaderné buňky obsahující červené krevní barvivo hemoglobin. Vznikají v červené kostní dřeni dlouhých a plochých kostí. Mají tvar bikonkávního disku s průměrem okolo 8  $\mu\text{m}$  a tloušťkou okolo 2,5  $\mu\text{m}$ . Bikonkávní tvar umožňuje deformaci erytrocytu při průchodu kapilárami. Jejich hlavní úlohou je transport kyslíku z plic do tkání. Oxid uhličitý je zčásti také transportován erytrocyty, kde je navázán na hemoglobin. Díky vysokému obsahu enzymu karboanhydrázy v erytrocytech dochází k reverzibilní přeměně oxidu uhličitého a vody na kyselinu uhličitou. Ta z velké části disociuje na bikarbonát, který difunduje z erytrocytů do plazmy, výměnou za chloridové ionty. Hemoglobin působí také jako pufrovací systém pro udržování acidobazické rovnováhy v krvi<sup>3</sup>.

### **2.1.3 Leukocyty**

Leukocyty jsou jaderné buňky, jejichž typickou vlastností je diapedéza, neboli schopnost pronikat z krevního řečiště do tkání například při zánětu. Vznikají v kostní dřeni a lymfatické tkáni a podílí se na obranných reakcích těla. Z morfologického hlediska se dělí na granulocyty, které mají jádro členěno na segmenty a mají barvitelná granula v cytoplazmě, a agranulocyty, které nemají v cytoplazmě sekreční granula<sup>4</sup>.

#### **2.1.3.1 Granulocyty**

Granulocyty (neutrofil, bazofil, eozinofil) jsou charakteristické svými granuly, která po stimulaci uvolňují svůj obsah do mezibuněčného prostoru. Neutrofil fagocytuje bakterie a viry a tvoří tak první linii obrany v boji proti mikroorganismům. Větší a složitější patogeny jsou napadány

mediátory granulocytů uvolňovaných z granulí. Mezi mediátory patří proteolytické enzymy, cytotoxiny, antimikrobiální peptidy a imunoregulační cytokiny. Bazofily se uplatňují při likvidaci parazitů a zároveň, díky produkci histaminu, způsobují alergické reakce. Eosinofily hrají důležitou roli v obraně proti parazitárním onemocněním a alergiím<sup>2</sup>.

### 2.1.3.2 Agranulocyty

Agranulocyty jsou charakteristické absencí cytoplazmatických granul a nečleněným jádrem. Dělí se na lymfocyty a monocyty. Lymfocyty jsou heterogenní skupina buněk, které se liší svou morfologií a velikostí. Podle jejich funkce rozpoznáváme T-lymfocyty a B-lymfocyty. T-lymfocyty dozrávají v thymu, zahajují specifické imunitní reakce a účastní se buněčné imunity. Podle jejich funkce a diferenciacích znaků (CD znaků) jsou rozdělovány na další podskupiny (pomocné lymfocyty, cytotoxické lymfocyty, supresorové lymfocyty a NK buňky (přirození zabíječi). B-lymfocyty vznikají v kostní dřeni a pro jejich aktivaci je nezbytné setkání s antigeny, které probíhá v sekundárních lymfatických orgánech. Po této maturaci vznikají z části paměťové buňky, které jsou součástí imunitní paměti, a z části plazmatické buňky produkující protilátky<sup>4</sup>.

Monocyty jsou neaktivní buňky vznikající v kostní dřeni, odkud jsou uvolňovány do krve. Mají chemokinové a adhezivní receptory, které zprostředkovávají jejich přesun z krve do tkání, kde monocyty diferencují v zánětlivé dendritické buňky nebo makrofágy. Migrace do tkání a jejich diferenciace je pravděpodobně řízena zánětlivým prostředím a receptory pro rozpoznání vzorů (*Pattern recognition receptor*; PRR). Zatímco dendritické buňky zpracovávají antigen a prezentují ho na svém povrchu, makrofágy produkují zánětlivé cytokiny a fagocytují buňky nebo toxické molekuly<sup>5</sup>.

### 2.1.4 Trombocyty

Trombocyty jsou malé (o průměru 2–3  $\mu\text{m}$  a tloušťce 0,5  $\mu\text{m}$ ) bezjaderné buněčné fragmenty vznikající odštěpením z megakaryocytů. Trombocyty jsou metabolicky aktivní, i přes nepřítomnost

jádra. Obsahují endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie<sup>6</sup>. Navíc obsahují veškeré náležitosti, jako jsou translační faktory a regulátory, k udržení translace mRNA do proteinů<sup>7</sup>. Průměrná životnost trombocytů se ve zdravém organismu pohybuje v rozmezí 9–12 dní. Pak jsou trombocyty absorbovány endotelem cév nebo jsou fagocytózou odstraněny ve slezině a játrech.

#### **2.1.4.1 Původ a vývoj trombocytů**

Trombocyty vznikají v kostní dřeni při procesu trombopoézy štěpením z cytoplazmy megakaryocytů. V dospělosti megakaryocyty přetrvávají zejména v kostní dřeni. Během raného vývoje jsou přítomny i v játrech, slezině nebo ve žloutkovém vaku. Megakaryocyty jsou tvořeny z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk, které se vyvíjejí z multipotentních hemangioblastů. Následně se vyvíjí přes megakaryoblasty a promegakaryocyty ve zralé megakaryocyty. Poté podstupují endomitózu s opakovanými cykly DNA replikace, která není následovaná buněčným dělením, takže se megakaryocyty stávají polyploidní. Většina megakaryocytů podstupuje tři endomitotické cykly pro dosažení 16násobného množství DNA diploidních chromosomů. Po ukončení endomitotické fáze následuje fáze zrání, ve které megakaryocyt získává své typické ultrastrukturní rysy, jako je vytvoření demarkačního membránového systému, denzního tubulárního systému a granulí<sup>8</sup>. Zralé megakaryocyty prodlužují své pseudopodiální výběžky cytoplazmatických membrán do sinusoid kostní dřeně, kde jsou tyto výběžky uvolňovány a vstupují do krevního řečiště. Jednotlivé krevní destičky jsou následně pomocí proudu krve odštěpovány z těchto výběžků. Hlavním regulátorem trombopoézy je trombopoetin, který je zároveň jediným cytokinem zodpovědným za udržení konstantního počtu uvolňovaných trombocytů<sup>9,10</sup>.

#### **2.1.4.2 Struktura trombocytů**

Struktura trombocytů může být rozdělena do čtyř samostatných částí. Periferní zóna je zodpovědná za adhezi, aktivaci a agregaci trombocytů, sol-gel zóna je zodpovědná za tvar a kontrakci destiček, organelová zóna obsahuje příslušné orgány s bioaktivními látkami a membránová zóna

obsahuje denzní tubulární systém pro ukládání  $\text{Ca}^{2+}$  a enzymatický systém podílející se na syntéze prostaglandinů<sup>11</sup>.

#### **2.1.4.2.1 Periferní zóna**

Periferní zóna vytváří fyzickou bariéru, která odděluje cytoplazmatické organely od okolního prostředí. Zároveň slouží jako velmi dynamická struktura pro snímání změn v cévním prostoru vyžadující hemostatickou odpověď trombocytů. Je tvořena extra- a intracelulární povrchovou membránou pokrytou glykokalyxem, otevřeným kanálkovým systémem (OCS) a submembránovou oblastí<sup>11,12</sup>. Glykokalyx je tlustý asi 10–20 nm a je pokryt širokou škálou glykoproteinových receptorů, které jsou nezbytné pro adhezi trombocytů v místě poranění, jejich aktivaci, agregaci a také interakci s dalšími typy buněk. Nejvýznamnější receptory, jejich ligandy a funkce jsou uvedeny v tabulce 1. Receptory jsou trvale exprimovány na povrchu krevních destiček a při jejich aktivaci mění konformaci pro zajištění své funkce<sup>8</sup>.

Tabulka 1 Hlavní trombocytární membránové receptory, jejich ligandy a funkce; převzato a upraveno dle<sup>13</sup>

Receptor	Struktura	Funkce
Gp Ia/IIa	Integrin $\alpha 2\beta 1$	Receptor pro kolagen
Gp IIb/IIIa	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	Receptor pro fibrinogen, vWF, fibronektin, vitronektin a trombospondin
Gp VI	Receptor ze superrodiny imunoglobulinů	Receptor pro kolagen
Gp Ib/IX/V	Receptor s repeticí bohatou na leucin	Receptor pro nerozpustný vWF

Povrchová membrána se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy, která hraje rozhodující roli při plazmatické koagulaci. Fosfolipidy také slouží jako inciální substrát pro trombocytární enzymy produkující tromboxan A2. Tromboxan A2 je lipidový mediátor, silný agonista trombocytů, stimulující aktivaci nových trombocytů a zvyšující jejich agregaci v místě poranění<sup>14</sup>. Další složkou obsaženou v povrchové membráně je cholesterol, který je odpovědný za fluiditu membrány, ovlivňuje transport látek membránou a její propustnost. Membrána tvoří četné invaginace do nitra trombocytu v podobě OCS. Tyto vychlípeniny jsou náhodně rozprostřeny po celém povrchu krevní destičky. Hlavní úloha OCS spočívá v uvolňování trombocytárních produktů po jejich aktivaci a přijímání extracelulárních produktů do buňky. Uvolňování bioaktivních molekul tak probíhá bez narušení integrity buněčné membrány. OCS zároveň slouží jako zdroj povrchové membrány pro buněčné rozprostření<sup>8</sup>. Submembránová zóna se nachází hned pod povrchovou membránou trombocytu. Její součástí jsou mikrofilamenta aktinu a myosinu, která zajišťují změnu tvaru trombocytů při jejich aktivaci<sup>15</sup>.

Periferní zóna je také zodpovědná za imunologickou specifitu. Trombocyty jsou nositeli antigenů HLA třídy I a dále specifických destičkových antigenů jako je Zw, Ko, P1, DUZO, LEK a další<sup>16</sup>.

#### 2.1.4.2.2 Oblast solubilního gelu

Oblast solubilního gelu se nachází pod periferní zónou a sestává z několika vláknitých struktur v odlišném stavu polymerizace. Ty zajišťují diskoidní tvar destiček v klidovém stavu a poskytují kontraktilní systém, který se podílí na změně tvaru, tvorbě pseudopodií, vnitřní kontrakci a sekreci granulí<sup>12</sup>. Podle morfologie a typu proteinů se zde nachází zejména dvě komponenty. První z nich jsou mikrotubuly složené z proteinu tubulinu. Úzce spojené mikrotubuly nacházející se v těsné blízkosti destičkové membrány zajišťují tvar destiček v klidovém stavu. Druhým typem jsou aktinová filamenta, která jsou v klidové destičce přítomna asi ze 30–40 %, zbytek aktinu je přítomen jako monomer a po aktivaci destičky polymeruje<sup>17</sup>.

#### 2.1.4.2.3 Organelová zóna

Organelová zóna se skládá z organel jako jsou  $\alpha$  granule, denzní granule, lysozomy, peroxizomy a glykogenové granule. Hlavní komponenty trombocytárních granul jsou uvedené v tabulce 2. Dalšími buněčnými kompartmenty jsou mitochondrie, ribozomy a Golgiho aparát.

$\alpha$  granule jsou nejpočetnější organely v trombocytech. Jejich množství se pohybuje v rozmezí 40–80  $\alpha$ -granulí na destičku a dosahují velikosti mezi 200–500 nm.  $\alpha$ -granule obsahují adhezivní proteiny, integrální membránové proteiny, růstové faktory, chemokiny a pro- a antiangiogenní faktory<sup>18</sup>.

Denzní granula jsou hustá, menší zásobní granula jejichž množství se pohybuje v rozmezí 3–8 granulí na destičku. Obsahují vápník, serotonin, histamin, adenosindifosfát (ADP), adenosintrifosfát (ATP), anorganický fosfát a hořčík. Hrají rozhodující úlohu v hemostáze a tvorbě sraženiny<sup>19</sup>. Mezi další granula patří lysozomy obsahující směs degradačních hydrolytických enzymů a peroxizomy obsahující enzym katalázu<sup>20</sup>.

Tabulka 2 Granula a jejich obsah; převzato a upraveno dle<sup>19</sup>

	<b>α-granula</b>	<b>Denzní granula</b>	<b>Lysozomy a peroxizomy</b>
<b>Průměr</b>	200–500 nm	150 nm	150–300 nm
<b>Počet</b>	50–80/trombocyt	3–8/trombocyt	asi 10 000/trombocyt
<b>Obsah</b>	<p>Integrální membránové proteiny (např. P-selektin, GPIbα)</p> <p>Koagulanty/antikoagulanty a fibrinolytické proteiny (např. faktor V, faktor IX, plasminogen)</p> <p>Adhezivní proteiny (např. fibrinogen, vWF)</p> <p>Chemokiny (např. CXCL4, CXCL12)</p> <p>Růstové faktory (např. EGF, IGF)</p> <p>Angiogení faktory/inhibitory (např. VEGF, PDGF, angiostatiny)</p>	<p>Kationty (např. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)</p> <p>Polyfosfáty</p> <p>Bioaktivní aminy (např. serotonin, histamin)</p> <p>Nukleotidy (ADP, ATP)</p>	<p>Strukturní proteiny</p> <p>Vazoregulátory (např. katecholaminy, vazostatiny, renin-angiotenzin)</p> <p>Parakrinní signální faktory (např. guanylin, neurotenzin, chromogranin B)</p> <p>Imunitní mediátory (např. enkelytin, ubikvitin)</p> <p>Opioidy (např. enkefaliny, endorfiny)</p> <p>Nukleotidy (např. AMP, GDP, UTP)</p>

#### 2.1.4.2.4 Denzní tubulární systém

Denzní tubulární systém je odvozen z hladkého endoplazmatického retikula megakaryocytu a je náhodně rozptýlený v cytoplazmě destičky. V některých místech je spojený s OCS. Nachází se v těsné blízkosti membrány a mikrotubulů. Tento endomembránový systém skladuje až 30 % celkového obsahu vápníku a také adenylátcyklázu, takže se významně podílí na regulaci aktivace trombocytu. Navíc je hlavním místem biosyntézy prostanoidů. Je organelou skladující

cyklooxygenázu a tromboxan syntázu, které katabolyzují kyselinu arachinodovou na tromboxan, který je silným destičkovým agonistou a pomáhá při jejich agregaci<sup>21</sup>.

### **2.1.4.3 Funkce trombocytů**

Funkce trombocytů spočívá v tvorbě primární hemostatické zátky při poranění nebo poškození cévní stěny, čímž zamezuje ztrátám krve a udržuje integritu cév. Trombocyty jsou v oběhu v klidovém stavu a aktivují se v místě cévního poranění po jejich vystavení imobilizovaným adhezivním proteinům nebo rozpustným trombocytárním agonistům<sup>22</sup>. Při poruše kontinuity cévní stěny trombocyty podstupují procesy adheze, změny tvaru, aktivace a sekrece bioaktivních molekul a agregace, které vedou k tvorbě hemostatické zátky.

#### **2.1.4.3.1 Adheze trombocytů**

Adheze trombocytů k poškozenému subendotelovému pojivu je prvním krokem při tvorbě hemostatické zátky. Proces adheze zahrnuje prvotní interakci, transdukcii a aktivační reakce uvnitř trombocytu a změnu tvaru trombocytu<sup>23</sup>.

V závislosti na hloubce poranění přichází trombocyty do kontaktu s různými složkami mezibuněčné hmoty, které mohou být asociovány s molekulami uvolněnými lokálně v odpovědi na poranění nebo odvozeny z plazmy jako v případě navázání cirkulující molekuly von Willebrandova faktoru (vWf) k povrchu kolagenu. Vwf má vazebná místa jednak pro glykoproteiny trombocytů GP Ib, GP IIb/IIIa ale také pro kolagen typu I, II a VI. Vwf se naváže na kolagenová vlákna obnaženého endotelu a následně dojde k jeho vyvázání na GPIb v komplexu GP Ib/V/IX<sup>24</sup>. Trombocyty mohou interagovat přímo s kolagenem prostřednictvím GP Ia/IIa a GP VI exprimovanými na jejich povrchu. Tato interakce je velice rychlá, nicméně má nízkou aviditu, takže jsou trombocyty schopné pomalu se pohybovat po povrchu kolagenu. Takto zpomalené trombocyty dále interagují s kolagenem



prostřednictvím glykoproteinu GP Ia/IIa a GP VI. Vazba receptoru GP Ia/IIa a kolagenu má vysokou afinitu, tudíž dokáže zastavit pohyb trombocytů po povrchu kolagenu<sup>23</sup>.

#### **2.1.4.3.2 Aktivace trombocytů**

Aktivace trombocytů začíná navázáním adhezivních ligandů a agonistů na analogické receptory na membráně trombocytů a je přenášena pomocí intracelulární signalizace, která zahrnuje enzymy, substráty a kofaktory. Hlavními induktory trombocytární aktivace je kolagen, vWf,  $\alpha$ -trombin tvořený na membráně stimulovaných trombocytů, ADP uvolňované z buněk cévního endotelu, epinefrin cirkulující v odpovědi na stres a lipid tromboxan A<sub>2</sub> syntetizovaný stimulovanými trombocyty<sup>25</sup>.

Typická manifestace aktivovaných trombocytů zahrnuje polymerizaci aktinu spojenou s reorganizací cytoskeletu a sekrecí bioaktivních látek z granulí. Sekrece vede k uvolňování granulárních komponent do cytoplazmy (Ca<sup>2+</sup>) a mezibuněčného prostoru (vWf, růstové faktory a nukleotidy) a k přemístění membránových proteinů k buněčnému povrchu (P-selektin)<sup>25</sup>. Při aktivaci dochází k deformaci destiček a extruzi pseudopodia, čímž se zvětšuje plocha, na níž se uskutečňuje interakce faktorů koagulační kaskády<sup>24</sup>. Dalším důsledkem aktivace je povrchové vystavení fosfatidylserinu z vnitřní části fosfolipidové dvojvrstvy (flip-flop efekt). Ten je pak využíván jako podkladová matrix pro shromažďování enzymů a kofaktorů pro tvorbu koagulačně aktivních komplexů<sup>25</sup>.

#### **2.1.4.3.3 Agregace trombocytů**

Agregace je další krok, který vede k akumulaci trombocytů do hemostatické zátky. Agregace je zprostředkována adhezivními substráty navázanými na membránu aktivovaných trombocytů. Základním principem je změna konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa. Aktivovaný GP

IIb/IIIa přispívá k trvalé adhezi a zprostředkovává imobilizaci rozpustných adhezivních proteinů, jako například vWf, fibrinogenu a fibronektinu na povrch adherovaných trombocytů<sup>25</sup>.

Při agregaci dochází nejprve ke spojování trombocytů prostřednictvím receptorů na jejich pseudopodiích. Při této primární agregaci dochází jen k částečnému spojování trombocytů menším počtem GP IIb/IIIa. Při sekundární agregaci se obnaží větší počet GP IIb/IIIa, trombocyty k sobě přilnou těsněji a následně se rozprostírají, rozplývají a splývají navzájem při tzv. viskózní metamorfóze. Fyziologickými induktory agregace trombocytů je ADP a tromboxan A<sub>2</sub><sup>24</sup>.

## **2.2 Růstové faktory a signální molekuly přítomné v trombocytech a jejich význam v regenerativní medicíně**

Růstové faktory jsou látky nejčastěji bílkovinné povahy, které jsou důležité pro celou řadu buněčných procesů v organismu. Růstové faktory stimulují proliferaci, regulují proteosyntézu a diferenciaci buněk. Uplatňují se při reparaci a regeneraci poškozených tkání jak v ontogenezi, tak v dospělosti. Při hojení ran se podílí na chemotaxi buněk do místa defektu, angiogenezi a syntéze mezibuněčné hmoty<sup>26</sup>. Působí autokrinně, parakrinně i endokrinně<sup>27</sup>. Dělí se do podskupin dle podobnosti v chemické struktuře, funkci a v interagujících receptorech. Jsou produkovány různými typy buněk, například trombocyty, granulocyty, makrofágy a lymfocyty a mohou působit pleiotropně, redundantně nebo antagonisticky<sup>28</sup>. Jejich účinek je závislý na jejich koncentraci, ale může být také ovlivněn snižováním nebo zvyšováním počtu receptorů na povrchu cílových buněk.

### **2.2.1 PDGF**

Růstový faktor odvozený z trombocytů (*Platelet-derived growth factor*; PDGF) je dimerický glykoprotein tvořený dvěma odlišnými polypeptidovými řetězci A a B. Podle toho, jakou kombinaci řetězců PDGF obsahují, existují buď homodimery PDGF-AA, PDGF-BB nebo heterodimer PDGF-AB. Navíc existují ještě homodimery PDGF-CC a PDGF-DD, které tvoří samostatnou skupinu<sup>29</sup>.

PDGF je syntetizován celou řadou buněčných typů jako jsou například trombocyty, fibroblasty, keratinocyty, astrocyty, neurony a makrofágy<sup>30</sup>. PDGF působí jako mitogen pro buňky mesenchymálního a neuroektodermálního původu<sup>31</sup>. Hraje významnou roli při embryonálním vývoji. Myši s umlčeným genem pro PDGF-BB nebo jeho receptor vykazovaly úplnou nepřítomnost vývoje mesangiálních buněk, což vedlo k nízké filtraci v glomerulech<sup>32,33</sup>. Další důležitou funkci plní při rozvoji cév, plic a centrální nervové soustavy. Významná je i role PDGF při formování pojivové tkáně při hojení ran<sup>30</sup>. Raghavendran a kol. zjistili synergistické působení PDGF-BB s kompozitními nosiči, tvořenými kyselinou polymléčnou (PLA), hydroxyapatitem a kolagenem, na zvýšení osteogenního diferenciačního potenciálu stromálních buněk *in vitro*<sup>34</sup>. Jin a kol. sledovali řízené uvolňování PDGF-BB z poly-laktid-ko-glykolidových mikrosfér uchycených na nanovláčkových nosičích a jeho vliv na měkké tkáně. Zjistili, že řízené uvolňování PDGF-BB spojené s nanovláčkovým nosičem zlepšilo buněčnou migraci a angiogenezi u modelu reparace měkkých tkání na hřbetu potkanů *in vivo*<sup>35</sup>.

### 2.2.2 VEGF

Vaskulární endotelové růstové faktory (*Vascular endothelial growth factor*; VEGF) jsou signální molekuly patřící mezi cytokiny. U savců je známo pět izoform, VEGF-A až E, a placentální růstový faktor (*Placental growth factor*; PLGF). Biologický efekt je zprostředkován přes tři receptorové tyrosinkinázy (VEGFR-1 až 3) exprimované na povrchu buněčných membrán. VEGF jsou exprimovány řadou buněk, mezi něž patří hlavně endotelové buňky, ale i makrofágy, trombocyty, keratinocyty a nádorové buňky. VEGF jsou hlavními regulátory tvorby oběhového systému během embryonálního vývoje (vaskulogeneze) a novotvorby cév (angiogeneze). Podporují vazodilataci, angiogenezi a jsou významnými spouštěči zvyšování propustnosti cév<sup>36</sup>. VEGF indukují migraci buněk, lymfogenezi a inhibují apoptózu<sup>37,38</sup>. Nekontrolovaná exprese VEGF může mít závažný vliv na fyziologické odpovědi v normální svalové tkáni<sup>39</sup> a může přispívat k tvorbě nádorů<sup>40</sup>.

Nejpodrobněji byla charakterizována role VEGF-A a jeho receptorů, VEGFR-1 a VEGFR-2. VEGF-A a VEGFR-2 jsou naprosto nezbytné pro nejčasnější stadia vaskulogeneze *in vivo*. Krevní ostrůvky, endotelové buňky a hlavní cévy se nevyvíjejí v dostatečném množství v embryích s umlčeným VEGF-A nebo VEGFR-2. Dokonce inaktivace pouze jedné VEGF-A alely mělo za následek časnou letalitu myších embryí v důsledku nedostatečného vývoje endotelových buněk a nedostatku cév<sup>41,42</sup>. Xia a kol. 2018 adherovali a enkapsulovali rekombinantní VEGF a nervový růstový faktor na nanovlákněný nosič z kyseliny mléčné. Tento nosič byl implantován do nadkriticky velkého defektu kritické sedacího nervu u potkanů. Bylo prokázáno významné zlepšení neovaskularizace a hojení nervů po 3 měsících od operace<sup>43</sup>. Stone a kol. potahovali povrch cévních štěpů pomocí VEGF navázaného na albumin za účelem zlepšení migrace a proliferace endotelových buněk, a tím vylepšení připojení štěpu<sup>44</sup>. Oliveira a kol. zjistili funkční obnovu myokardu a zlepšení komorových funkcí u prasat s indukovaným infarktem myokardu po genové terapii pomocí VEGF a angiopoetinu<sup>45</sup>.

### 2.2.3 Růstové faktory podobné inzulinu

Růstové faktory podobné inzulinu (*Insulin-like growth factor*; IGF) jsou syntetizovány skoro všemi tkáněmi a jsou důležitými mediátory buněčného růstu, diferenciací, migrace a transformace. Zahrnují dva ligandy: IGF-I a IGF-II. Tyto růstové faktory jsou intenzivně studovány z důvodu jejich důležité role jak ve zdravém organismu, tak při některých patologických stavech jako je rakovina, diabetes nebo malnutrice<sup>46</sup>. IGF-I podporuje reepitelizaci a produkci granulační tkáně. Přítomnost IGF-I v místě vaskulárního poškození je nezbytná pro hojení ran. IGF-I zvyšuje produkci proteoglykanů a kolagenu typu II<sup>47</sup>. IGF-I je také zodpovědný za interakci kostní syntézy a resorpce<sup>48</sup>.

### 2.2.4 Transformující růstový faktor beta

Transformující růstový faktor beta (*Transforming growth factor* beta; TGF- $\beta$ ) je multifunkční cytokin zahrnující tři izoformy (TGF- $\beta$ 1 až 3), které jsou homologní ze 60–80 %<sup>49</sup>. Je produkován hlavně krevními destičkami a buňkami bílé krevní řady. Podporuje syntézu a uchování mezibuněčné

hmoty<sup>50</sup>, reguluje růst, diferenciaci, adhezi a migraci různých buněčných typů<sup>51</sup>. TGF- $\beta$  hraje hlavní roli při vývoji chrupavky, indukuje chondrogenezi v embryonálních a adultních mezenchymálních kmenových buňkách a zvyšuje proliferaci chondrocytů<sup>52</sup>. Vyvolává počáteční chondrogení diferenciaci a zvyšuje syntézu agrekanu a kolagenu typu II<sup>53</sup>. Členové TGF- $\beta$  rodiny hrají regulační úlohu při hojení ran a tvorbě jizev. Jsou zapojeny do řady procesů včetně zánětu, stimulace angiogeneze, proliferace fibroblastů, syntézy kolagenu a tvorby nové mezibuněčné hmoty<sup>49</sup>. V oblasti tvorby kostí a jejich hojení TGF- $\beta$  zvyšuje chemotaxi a mitogenezi prekurzorů osteoblastů a stimuluje ukládání osteoblastů na kostní matrix<sup>54</sup>.

### 2.2.5 Růstové faktory fibroblastů

Růstové faktory fibroblastů (*Fibroblast growth factor*; FGF) představují velkou rodinu mitogenních polypeptidů, které společně sdílí určité strukturní charakteristiky. Tato rodina zahrnuje 20 členů a mnoho z nich obsahuje signální peptidy, které jsou uvolňovány do okolního mikroprostředí, kde se váží na heparanu podobné glykosaminoglykany přítomné v mezibuněčné hmotě a jsou uvolňovány lokálně po poškození nebo tkáňové remodelaci<sup>55</sup>. FGF-1 a FGF-2 jsou produkovány zánětlivými buňkami, trombocyty, keratinocyty, fibroblasty a buňkami cévního endotelu. Hrají roli v reepitelizaci, angiogenezi a tvorbě granulózní tkáně. FGF-2 napomáhá v syntéze mezibuněčné hmoty a její remodelaci<sup>56</sup>. FGF indukuje angiogenní, mitogenní a chemotaktickou aktivitu u buněk neuroektodermálního a mezodermálního původu<sup>57</sup>.

### 2.2.6 RANTES

RANTES neboli CCL5 patří do skupiny chemokinů, které jsou klasifikovány podle umístění nebo přítomnosti čtyř cysteinových zbytků v konzervovaných oblastech<sup>58</sup>. Tento nízkomolekulární chemokin je sekretován mnoha buněčnými typy, jako jsou například trombocyty, buňky hladkého svalstva, aktivované T-lymfocyty, makrofágy a buňky endotelu. Exprese RANTES je asociována s chronickým zánětem a hojením ran díky schopnosti indukovat přísun a aktivaci leukocytů v místě

poranění<sup>58</sup>. Kroeze a kol. sledovali chemokiny řízenou migraci stromálních kožních buněk a kmenových buněk z tukové tkáně. Zjistili, že RANTES byl neúčinnějším induktorem migrace buněk v *in vitro* modelu hojení ran<sup>59</sup>.

Trombocyty také obsahují proteiny zapojené v buněčné adhezi (vWF, fibrinogen, fibronektin), angiogenezi (IL-8, eotaxin), migraci epitelových buněk (*Stromal cell-derived factor 1*; SDF-1), zánětu (CXCL-4, CXCL-7, IL-17) a tvorbě granulační tkáně (*hepatocyte growth factor*; HGF)<sup>18,60-62</sup>

## 2.3 Krevní deriváty

Pro jasnou klasifikaci trombocytárních koncentrátů jsou nezbytné tři hlavní skupiny parametrů. První skupina parametrů se týká použitých přípravných sestav a centrifug. Patří sem velikost centrifug, cena použitých přístrojů a souprav, délka přípravy a složitost postupu. Tato skupina definuje praktické charakteristiky každého postupu. Druhá skupina se týká obsahu přípravku. Patří sem výsledný objem přípravku, efektivita odběru trombocytů a leukocytů a jejich uchování během přípravy produktu. Poslední skupina se týká tvorby fibrinové sítě. Patří sem koncentrace fibrinogenu během přípravy produktu, která zajišťuje hustotu fibrinové sítě. Dále je potřeba vyhodnotit proces polymerizace fibrinu s přihlédnutím k poměru mezi koncentracemi fibrinogenu a trombinu a k biomechanickým vlastnostem vytvořené fibrinové sítě. Pomocí těchto skupin parametrů mohou být získané tyto produkty: čistá plazma bohatá na trombocyty (*Pure platelet-rich plasma*; P-PRP), plazma bohatá na trombocyty a leukocyty (*Leukocyte- and platelet-rich plasma*; L-PRP), čistý fibrin bohatý na trombocyty (*Pure platelet-rich fibrin*; P-PRF) a nakonec fibrin bohatý na trombocyty a leukocyty (*Leukocyte- and platelet-rich fibrin*; L-PRF)<sup>63</sup>.

### 2.3.1 Plazma bohatá na trombocyty

Plazma bohatá na trombocyty (PRP) je definována jako autologní koncentrát trombocytů resuspendovaných v malém objemu krevní plazmy. Koncentrace růstových faktorů je 3 až 5krát vyšší než v plné krvi. PRP může být vytvořena pouze z antikoagulované krve, protože trombocyty jsou součástí krevní sraženiny. Příprava PRP sestává z přidání citrátu k plné krvi, protože citrát naváže ionizovaný vápník a inhibuje koagulační kaskádu. Tento krok je následován dvěma centrifugačními kroky. První centrifugace separuje trombocyty a leukocyty od plazmy a trombocytů. Následující centrifugace zakoncentruje trombocyty v plazmě a oddělí plazmu chudou na trombocyty<sup>64</sup>. PRP může být následně smíšena s trombinem a chloridem vápenatým způsobujícím aktivaci trombocytů.

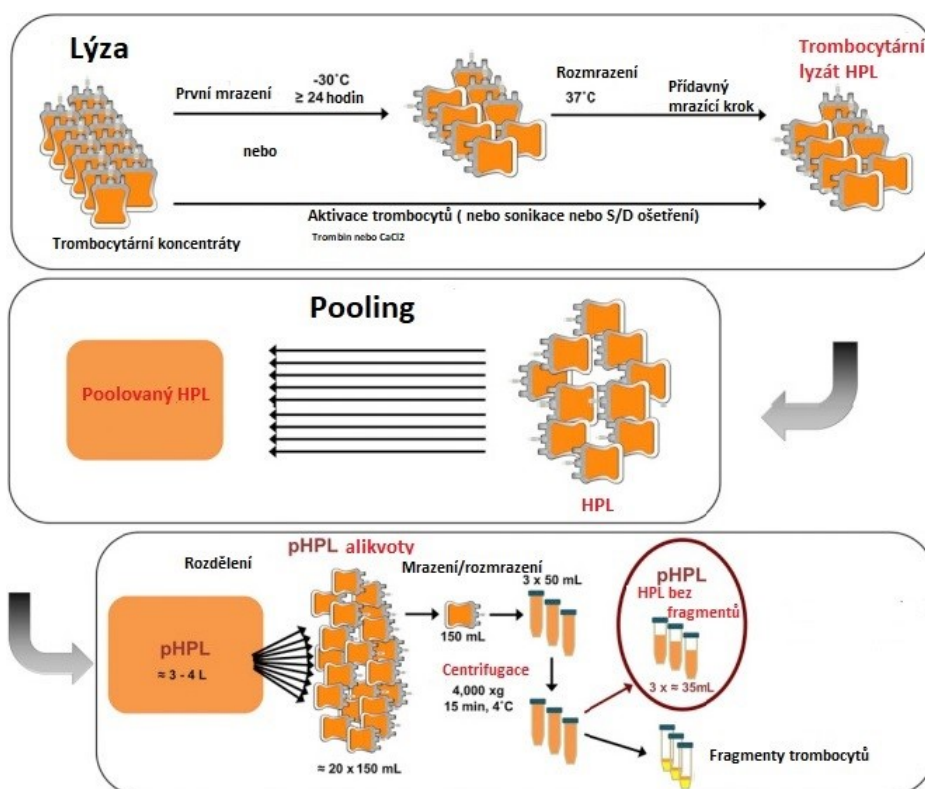
### **2.3.2 Chokrounův fibrin bohatý na trombocyty**

Chokrounův fibrin bohatý na trombocyty (PRF) je dalším přípravkem v této kategorii. Je definován jako autologní přípravek fibrinu bohatého na trombocyty a leukocyty. Krev je odebrána do zkumavky bez přísadků antikoagulantů a je okamžitě stočena. Díky přirozené koagulaci jsou po stočení ve zkumavce tři oddělené fáze. Masa erytrocytů vespod, bezbuněčná plazma nahoře a PRF uprostřed<sup>65</sup>. Jedním z hlavních rozdílů mezi přípravou PRF a PRP je to, že výrobní proces PRF je zcela přirozený, bez použití antikoagulantů při odběru krve ani s následným použitím trombinu nebo chloridu vápenatého pro aktivaci trombocytů a polymerizaci fibrinu<sup>66</sup>.

### **2.3.3 Trombocytární lyzát**

Dalším produktem používaným zejména pro expanzi buněčných kultur *in vitro* je trombocytární lyzát (*Platelet lysate*; PL). Stejně jako u PRP stále neexistuje jednotný protokol pro výchozí materiál a postup přípravy trombocytárního lyzátu. Jako výchozí materiál může sloužit trombocytární koncentrát připravený z buffy coatů (BC) nebo aferetický trombocytární koncentrát. Trombocytární koncentráty od více dárců jsou před lýzou smíšeny pro odstranění interindividuálních variabilit (obrázek 1). Koncentráty pro přípravu lyzátu mohou být čerstvé nebo expirované. Trombocyty mohou být ošetřeny ozářením gama zářením nebo patogenní inaktivací pomocí

fotodynamických metod nebo modifikací bází nukleových kyselin. Mohou být uchovávány v plazmě, náhradním roztoku, fosfátovém pufru nebo solném roztoku. Následná příprava vlastního trombocytárního lyzátu může být provedena pomocí několika cyklů mrazení a rozmrazování nebo sonikací<sup>67</sup>.



Obrázek 1 Příprava trombocytárního lyzátu (Human platelet lysate; HPL); převzato a upraveno dle<sup>67</sup>

### 2.3.4 Použití krevních derivátů pro buněčnou kultivaci

Metody kultivace buněčných kultur jsou založeny na udržování buněk v roztoku média obsahující soli a ionty a doplňku, který dodává esenciální růstové faktory, proteiny, hormony a enzymy. Fetální bovinní sérum (FBS) je nejčastěji používaným doplňkem, nicméně kvůli jeho xenogennímu původu existuje riziko imunogenity xenogenních proteinů v kulturách lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSC)<sup>68,69</sup>. Dalším problémem při použití FBS pro kultivaci buněk je jeho nedostatečná charakterizace a velká kvalitativní a kvantitativní variabilita složek



(sezónní a geografická variabilita mezi dávkami). FBS může také obsahovat nežádoucí působky a riziko bakteriální, virové nebo prionové kontaminace. Vznikají zde i etické problémy při získávání FBS z plodů skotu<sup>70</sup>. Jedna z nejslibnějších náhrad séra je použití krevních derivátů. PRP se pro expanzi buněk *in vitro* používá zřídka. Vogel a kol. použili alogenní směšnou PRP od pěti dárců pro expanzi a diferenciaci hMSC. Jako kontrolu použili FBS. PRP zlepšila expanzi hMSC v porovnání s FBS a zachovala jejich diferenciací kapacitu a schopnost tvorby kosti *in vivo*<sup>71</sup>. Mishra a kol. použili inaktivované a pufrované PRP pro kultivaci hMSC a sledovali proliferaci a expresi chondrogenních markerů. Výsledky prokázaly, zvýšení buněčné proliferace a chondrogenní diferenciace při použití PRP<sup>72</sup>.

Sérum je obvykle připraveno srážením plné krve po krevním odběru do zkumavky bez přítomnosti antikoagulantů. Po stočení a filtraci může být zmrazeno a uchováno do použití<sup>73</sup>. Bieback a kol. testovali sérum a trombinem aktivovanou PRP a hPL jako náhradu k FBS pro expanzi hMSC izolovaných z kostní dřene. Zjistili, že všechny tři krevní deriváty podporují expanzi hMSC. Jako neoptimálnější se jevil trombocytární lyzát, který zajišťoval rychlou, ale i dlouhodobou expanzi buněk při zachování jejich fenotypu a imunomodulačních a diferenciací schopností<sup>74</sup>.

HPL připravené různými technikami jsou v buněčných kulturách nejčastěji využívanou náhradou FBS. Použití autologních i alogenních hPL pro stimulaci proliferace a zachování diferenciací vlastností hMSC je dokumentováno v řadě studií<sup>75-79</sup>. Tarte a kol. porovnávali genomovou stabilitu hMSC kultivovaných v FBS nebo hPL, které byly použity při transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Data odhalila chromozomální změny, které nebyly závislé na kultivačním doplňku, ale pouze na konkrétním dárci<sup>80</sup>. Chromozomální stabilita byla sledována i Crespo-Díazem a kol., kteří kultivovali hMSC odvozené z kostní dřene a tukové tkáně v médiu obsahujícím buď hPL nebo FBS. Zjistili, že kultivace v hPL akceleruje proliferaci hMSC bez chromozomálních aberací, které byly pozorovány při kultivaci s FBS<sup>81</sup>. Bylo prokázáno, že hPL je

vhodným doplňkem nejen pro kmenové buňky, ale i pro expanzi jiných buněčných typů. HPL podporuje *in vitro* proliferaci chondrocytů<sup>82,83</sup>, lidských gingiválních fibroblastů<sup>84,85</sup>, tenocytů<sup>86-88</sup>, endotelových buněk<sup>89,90</sup> a osteoblastů<sup>91,92</sup>. HPL byl také použit jako doplněk pro proliferaci lidských a zvířecích imortalizovaných buněčných linií<sup>93,94</sup>.

### **2.3.5 Použití krevních derivátů pro regeneraci měkkých tkání**

Krevní deriváty našly široké použití pro hojení měkkých tkání ať už se to týká kožních defektů jako jsou ulcerace nebo proleženiny, ale i na ostatní měkké tkáně jako jsou šlachy, vazy nebo nervová tkáň.

#### **2.3.5.1 Hojení kožních defektů**

Proces hojení ran je obecně rozdělen do čtyř fází (hemostáza, zánětlivá fáze, proliferace remodelace). Trombocyty a jejich bioaktivní molekuly jsou stěžejními prvky každého z těchto procesů, a jsou proto využívány pro lokální urychlení a zkvalitnění hojení ran. Kožní ulcerace jsou častými komplikacemi při vaskulopatiích a diabetu. Tyto komplikace zvyšují morbiditu a snižují mobilitu pacienta, proto je nezbytná jejich účinná léčba. Roubelakis a kol. použili PRP pro léčbu pacientů s kožními ulceracemi různé etiologie. Ve všech případech použití PRP došlo k urychlení hojení se zvýšenou novotvorbou cév v oblasti vředu. Většina pacientů byla zcela vyléčena během jednoho až šesti ošetření a navíc u většiny z nich došlo ke snížení bolesti v místě defektu<sup>95</sup>. Pietramaggiore a kol. použili PRP a alogenní mikronizovanou acelulární dermální matrici samostatně nebo v jejich kombinaci pro regulaci hojení ran u myši s indukovaným diabetem. Zjistili, že dermální matrice stimuluje novotvorbu tkáně a v kombinaci s PRP poskytuje další příznivé bioaktivní molekuly pro léčbu chronických nebo diabetických ran<sup>96</sup>. Suzuki a kol. ukázali, že PRF indukovalo formování granulační tkáně, angiogenezi a neovaskularizaci v modelu defektu kůže u krysy<sup>97</sup>. O'Connell a kol. testovali autologní matricovou membránu z PRF v léčbě chronických vředů dolních končetin. Celkem 29 pacientů s chronickými vředy bylo léčeno pomocí matricové fibrinové

membrány spolu s vhodnou standartní léčbou. Zjistili, že matricová membrána představuje bezpečnou, vhodnou a snadno použitelnou terapii, která vykazuje vysoký potenciál pro uzavření chronických vředů dolních končetin<sup>98</sup>. V jiné studii byla použita PRP pro léčbu proleženin. Léčba pomocí PRP shodně vedla k tvorbě granulační tkáně a ke zlepšení vaskularity, přičemž se zmenšila celková plocha a objem proleženin<sup>99</sup>.

### **2.3.5.2 Hojení pohybového aparátu**

Poranění pohybového ústrojí způsobují podle Světové zdravotnické organizace dlouhodobé bolesti a tělesné postižení milionů lidí po celém světě<sup>100</sup>. PRP je běžně používaná v ortopedické praxi pro řešení poranění kosterních svalů, šlach a vazů. Až 55 % všech sportovních úrazů představuje poranění kosterního svalstva. Zhmožděny a natažení jsou nejčastějšími zraněními. Svalová zranění se zotavují velmi pomalu a často s neúplným funkčním uzdravením. Navíc dochází ke zjizvení a fibrózám, které brání úplnému uzdravení svalu. Z toho důvodu je regulace fibróz jedním z cílů léčby krevními deriváty při léčbě svalových lézí<sup>101</sup>. Zdá se, že odstranění fibrotických účinků TGF- $\beta$ 1 umožňuje plné zotavení svalových funkcí. Terada a kol. kombinovali PRP společně s losartanem, inhibítorem signální dráhy pro TGF- $\beta$ 1. Tato kombinovaná terapie zlepšila celkové hojení zvýšením angiogeneze a exprese folistatinu a snížením exprese fosforylovaných transkripčních faktorů SMAD a vývoje fibrózy<sup>102</sup>. Cílem studie Dimaura a kol. bylo ověřit, zda lokální použití PRP moduluje molekulární procesy zapojené v raných stádiích regenerace svalu. Ve studii použili myši, kterým bylo mechanicky indukováno zranění na musculus flexor sublimis. Jedna skupina myší byla ošetřena PRP, druhá skupina byla bez ošetření. Po usmrcení byly odebrány vzorky a byla sledována exprese zájmových genů a proteinů. Bylo zjištěno, že PRP významně zvýšila hladinu mRNA prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TGF- $\beta$ 1. Tento efekt vyvolal zvýšenou expresi myogenních faktorů MyoD1, Myf5 a Pax7 a svalové formy IGF-1Eb na úrovni mRNA nebo proteinu. Zároveň aplikace PRP modulovala expresi miR-133a společně s jeho cílovým faktorem odpovídajícím na sérum.

Výsledky studie naznačují, že účinek PRP při poškození kosterního svalstva spočívá v modulaci zánětlivých a myogenních molekulárních mediátorů a také v kontrole signálních drah zastoupené proteiny teplotního šoku a svalově specifickými miRNA, které přispívají k účinné regeneraci svalové tkáně<sup>103</sup>.

Zranění šlach jsou velmi častá u sportovců a zahrnují akutní nebo chronickou degeneraci stejně jako částečné nebo úplné přetržení. Úplné zotavení vyžaduje dlouhodobý léčebný proces obzvlášť v případech ruptury nebo retrakce šlachy. Uzdravená šlacha se částečně skládá z jizvy, jejíž mechanické vlastnosti jsou horší než u zdravé šlachy a je spojená s vyšším rizikem dalších poranění<sup>104</sup>. V *in vitro* studii de Mosové a kol. kultivovali lidské tenocyty v médiu s přidavkem různých koncentrací bioaktivních látek uvolněných ze sraženiny vytvořené z plasmy bohaté na trombocyty (PRP). Zjistili, že 10% PRP v kombinaci s 2% FBS stimuluje buněčnou proliferaci a produkci kolagenu<sup>105</sup>. Anitua a kol. uvedli, že 20% PRP zvyšuje proliferaci lidských tenocytů a koncentraci VEGF a HGF uvolněných tenocytů<sup>106</sup>. U modelu zranění Achillovy šlachy u krys vykazala léčba pomocí trombocytárního koncentrátu 30% nárůst pevnosti v tahu a tuhosti v porovnání s kontrolními zvířaty<sup>107</sup>. Moshiri a kol. použili kolagenový nosič s polydioxanonem funkcionalizovaný bovinním trombocytárním gelem pro regeneraci šlach. Bioaktivní štěpy byly implantovány do modelu velkých defektů šlach králíků. Bylo zjištěno, že nosič zvyšuje kvalitu a rychlost fibroplazie a vytváří remodelovanou šlachu, která má vyšší zastoupení kolagenu a kvalitnější kolagenová vlákna ve srovnání s kontrolami. Navíc tato léčba snižuje přilnavost okolí šlachy, svalovou fibrózu a atrofii<sup>108</sup>.

Trombocytární preparáty jsou testovány i v použití pro léčbu zranění vazů, která patří mezi nejčastější ortopedická zranění. Autologní krevní deriváty včetně PRP a růstových faktorů byly použity pro léčbu poranění vazů s cílem urychlit hojení a dřívějšímu návratu jejich pohyblivosti<sup>109</sup>. Důvod pro použití krevních derivátů tkví hlavně ve zvýšení průtoku krve a dodávání zánětlivých mediátorů do místa poranění<sup>110,111</sup>. PRP vyvolávají hromadění zánětlivých buněk v místě defektu

díky uvolňování angiogenních, chemotaktických a mitogenních faktorů uvolňovaných z aktivovaných trombocytů<sup>112</sup>. Při poranění vnitřního postranního vazy PRP figuruje v počáteční fázi hojení, kdy pomáhá při náboru prozánětlivých buněk jako jsou makrofágy. Během proliferační a remodelační fáze hojení se makrofágy hromadí v místě defektu a exprimují buď prozánětlivý nebo protizánětlivý fenotyp. M1 makrofágy fagocytují buněčné zbytky a podílí se na náboru dalších buněk zahrnutých v reparačním procesu, jako jsou například myofibroblasty. M2 makrofágy podporují angiogenezi, remodelování mezibuněčné hmoty a pomáhají při tvorbě jizvy prostřednictvím uvolňování protizánětlivých cytokinů<sup>113,114</sup>. Murray a kol. použili kompozitní kolagenový-PRP hydrogel pro léčbu defektu předního křížového vazy u prasat. Tato léčba významně zvýšila biomechanické vlastnosti jako je lineární tuhost, maximální zatížení a mez pružnosti<sup>115</sup>. Vogrin a kol. provedli klinickou studii při které použili trombocytární gel pro přihojení štěpů použitých při rekonstrukci předního křížového vazy. V období 4–6 týdnů po operaci vykazovala skupina léčená trombocytárním gelem signifikantně vyšší stupeň vaskularizace na rozhraní mezi kostí a vazem<sup>116</sup>.

Pozitivní vliv krevních derivátů byl, díky jeho hemostatickým vlastnostem, dále dokumentován také v plastické chirurgii při liftingu obličeje<sup>117,118</sup>. Dále byl jejich pozitivní vliv sledován v postoperačním zlepšení hojení kožních sensorických nervů v důsledku zvýšeného vrůstání kapilár a kolagenní syntézy podporující regeneraci nervů<sup>117</sup> a ve zlepšení hojení periodontální tkáně<sup>119,120</sup>.

### **2.3.5.3 Použití krevních derivátů pro regeneraci kosti**

Mnoho faktorů zahrnujících nekrózy, pokročilé osteoartritidy, kostní nádory a další patologická onemocnění mohou být prvotními příčinami kostních defektů<sup>121,122</sup>. Hojení kosti, její tvorba a přestavba je regulována řadou hormonů a lokálních mediátorů. Mezi hlavní faktory patří kostní morfogenetický protein (BMP; *bone morphogenic protein*), VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF, FGF a IGF, které jsou exprimovány během procesu hojení. Prozánětlivé cytokiny uvolněné

z trombocytárních přípravků jsou zapojeny v zánětlivé fázi hojení kosti. Navíc trombocyty regulují buněčnou migraci, proliferaci a diferenciaci stejně jako produkci a přestavbu mezibuněčné hmoty, a tím pozitivně ovlivňují další hojení kosti<sup>123</sup>. Trombocyty pro hojení kostních defektů mohou být použity v různých formách zahrnujících PRP, PRF nebo hydrogely, mohou být použity samostatně nebo v kombinaci s autografty, alografty nebo syntetickými implantáty<sup>123</sup>. Kim a kol. hodnotili efekt PRP, PRF a koncentrovaných růstových faktorů (experimentální skupiny) na hojení kostních defektů vytvořených v lebce králíků. Na základě mikro-CT analýzy zjistili, že hustota mineralizace kosti a její objem byl statisticky významně vyšší u experimentálních než u kontrolních skupin. Mezi experimentálními skupinami nebyly žádné statisticky významné rozdíly. Navíc histomorfometrické měření potvrdilo vyšší novotvorbu kosti u experimentálních skupin. Byl prokázán srovnatelný efekt PRP, PRF a koncentrovaných růstových faktorů<sup>124</sup>. Kanthan a kol. testovali použití PRP spolu s umělými kostními štěpy na defekty holenních kostí u králíků. Na základě histologických, radiologických a makroskopických hodnocení vykazovala skupina obsahující PRP a osteoinduktivní materiál významné zlepšení hojení kosti. Použití PRP bez kostního štěpu však neposkytuje dostatečnou náhradu tkáně a proto má jen malý přínos pro zlepšení hojení kosti<sup>125</sup>. Wiltfang a kol. testovali autologní štěpy a xenogenní kostní náhrady v kombinaci s PRP pro hojení kostních defektů lebky u prasat. Bylo zjištěno, že PRP neměla pozitivní vliv na hojení, pokud byla kombinována s xenogenními náhradami, nicméně statisticky významný efekt na kostní regeneraci byl pozorován u autologních štěpů v kombinaci s PRP<sup>126</sup>. Dallari a kol. sledovali hojení holenní kosti u pacientů podstoupivších osteotomii. První skupině pacientů byl implantován kostní štěp s trombocytárním gelem, druhé skupině byl implantován kostní štěp s trombocytárním gelem a hMSC, poslední skupina pacientů dostala pouze kostní štěpy. Histomorfometrie prokázala, že přidání trombocytárního gelu nebo gelu v kombinaci s hMSC zvyšuje přítomnost osteoblastů a osteoidů a kostní apozici na štěpech. Ve skupině kombinující trombocytární gel a hMSC byla statisticky významně vyšší revaskularizace než v kontrolních skupinách. Radiografie navíc odhalila statisticky významně vyšší míru

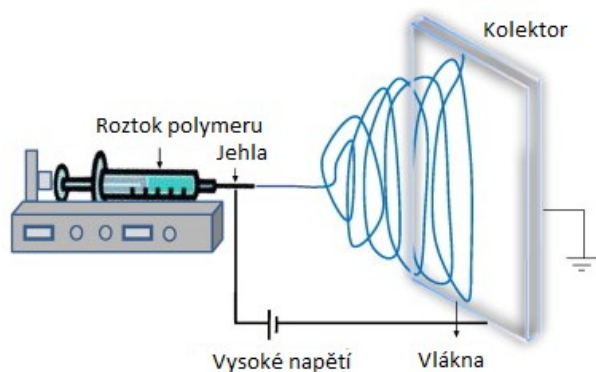
oseointegrace ve skupinách s trombocyty<sup>127</sup>. Použití trombocytárních preparátů má nepochybně pozitivní vliv na hojení kosti, záleží však na metodách přípravy trombocytů, jejich původu, místě implantace, použitých náhradách a chirurgických přístupech fixace kosti.

## **2.4 Nanovláknenné nosiče pro regenerativní medicínu**

Zájem o oblast polymerních nanovláken, která napodobují strukturu a biologickou funkci mezibuněčné hmoty, v posledních letech významně vzrostl. Jsou využívány různé techniky pro výrobu nanovláken, například fázová separace, elektrostatické zvlákňování, odstředivé zvlákňování, metoda tažení a samouspořádání. Nanovláknena nabízí nesporné výhody, mezi které patří biokompatibilita, biodegradabilita a mnohostranné chemické a mechanické vlastnosti. Vyznačují se velkým specifickým povrchem, vysokou porozitou a průměrem vláken blízkým vláknům mezibuněčné hmoty. Mohou být funkcionalizovány bioaktivními látkami, přičemž takto připravené nosiče poskytují buňkám nejen fyzickou oporu, ale cíleně ovlivňují i jejich biologickou odpověď a interakci.

### **2.4.1 Elektrostatické zvlákňování**

Elektrostatické zvlákňování je časově relativně nenáročný a levný způsob přípravy nanovláknenných nosičů. Je nejčastěji používanou metodou pro produkci nanovláken v tkáňovém inženýrství. Tato metoda je principiálně založená na aplikaci silných elektrických polí na polymerní roztok, z kterého se vlivem elektrostatického odpuzování a vlivem přitažlivých sil mezi opačně nabitou jehlou a kolektorem tvoří vlákna<sup>128</sup>. Základní sestava pro přípravu nanovláken sestává ze stříkačky naplněné roztokem polymeru, jehly, zdroje vysokého napětí a kolektoru pro sběr vytvořených vláken (obrázek 2).



Obrázek 2 Příprava nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování; převzato a upraveno dle<sup>129</sup>

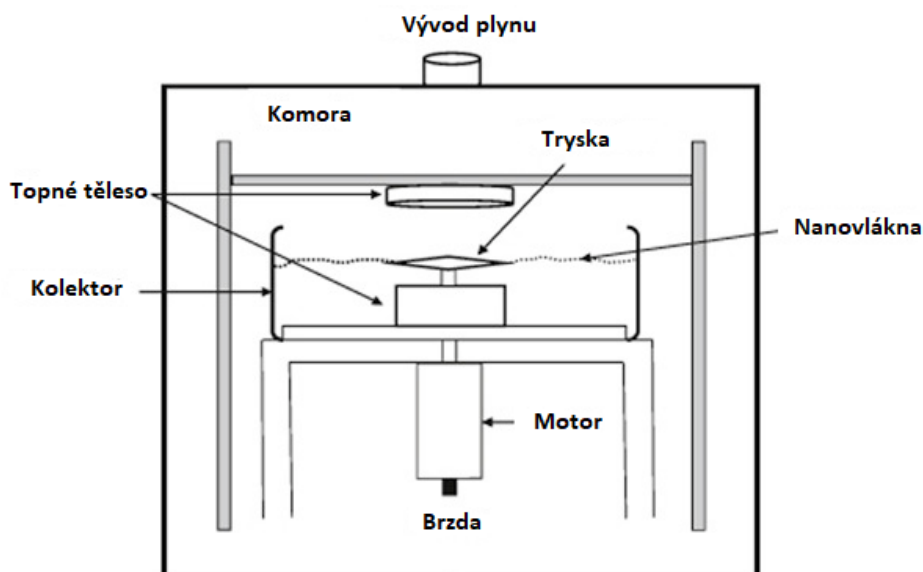
Elektrostatické zvlákňování je prováděno za pokojové teploty při atmosférickém tlaku. Polymery jsou před zvlákňováním rozpuštěny v rozpouštědlech, se kterými tvoří polymerní roztok. Tento roztok je poté natáhnut do stříkačky. Při samotném zvlákňování je roztok polymeru, který je na konci zvlákňovací jehly držen svým povrchovým napětím, vystaven silnému elektrickému poli, v jehož důsledku je na povrchu kapaliny vytvořen elektrický náboj. Když aplikované elektrické pole dosáhne kritické hodnoty, odpuzující elektrické síly překonají síly povrchové napětí a po zhroucení Taylorova kužele je z hrotu vypuzena nabitá kapalinová tryska. Během fáze letu kapalinové trysky v prostoru mezi jehlou a kolektorem, kdy se polymerní proud enormně napíná, dochází k odpařování rozpouštědla a tvorbě ultrajemných vláken<sup>129</sup>. Takto popsaná metoda se nazývá kapilární zvlákňování. Její velkou nevýhodou je nízká výtěžnost a nízká homogenita vytvořené vrstvy. Zvlákňování z více paralelních kapilár bylo vytvořeno pro zvýšení produktivity a možnosti přípravy směsných vláken z různých polymerů<sup>130</sup>. Theron a kol. sledovali experimentálně i pomocí simulací elektrostatické zvlákňování pomocí více kapilár. Zjistili, že vzájemné interakce Coulombických sil ovlivňují dráhy jednotlivých trysek. Další významná nevýhoda je spojena s deformací elektrického pole. Tyto nevýhody vedou ke snížení homogenity vláken a výrobní kapacity<sup>131</sup>. Pro komerční účely je mnohem vhodnější metoda zvlákňování z volné hladiny. Tato metoda je založena na schopnosti



samo-organizace trysek i na volné hladině kapaliny. Yarin a Zussman zkombinovali elektrické a magnetické pole, kterým působili na dvouvrstvý systém. Nanovlákná byla zvlákňována z mnoha kuželů umístěných na volné hladině vrchní vrstvy tvořené roztokem polymeru. Dolní vrstva byla tvořena magnetickou tekutinou<sup>132</sup>. Na výslednou morfologii a vlastnosti vláken vzniklých při elektrostatickém zvlákňování má vliv několik parametrů, mezi které patří vlastnosti polymerního roztoku, parametry procesu a parametry prostředí.

#### **2.4.2 Odstředivé zvlákňování**

Odstředivé zvlákňování je technologie využívající odstředivou sílu k produkci ultratenkých vláken z roztoků a tavenin široké škály materiálů. Polymer s dostatečnou viskozitou se během procesu napínání protáhne jako řetěz a po vysušení se přemění na polymerní vlákno, které je uchyceno na sběrném zařízení. Viskozita roztoku vychází z třecích sil mezi řetězci v roztoku, které se zvětšují s rostoucí hodnotou odstředivé síly. Díky použití vyšší rychlosti mohou být zvlákňovány i polymery nižších koncentrací<sup>133</sup>. Zařízení pro odstředivé zvlákňování se skládá z těchto hlavních komponent: trysky, tepelného systému, sběrného zařízení (kolektoru), vnitřní komory, řídicího systému, motoru a brzdy (obrázek 3).



Obrázek 3 Příprava nanovláken pomocí odstředivého zvlákňování; převzato a upraveno dle<sup>134</sup>

Mezi parametry, které ovlivňují průměr vlákna, patří výběr zvlákňovacích trysek a jejich uspořádání, reologické vlastnosti zvlákňovaného materiálu, rychlost otáčení, teplota, průměr kolektoru a parametry prostředí<sup>135</sup>. Metoda odstředivého zvlákňování překonává problém klasického elektrostatického zvlákňování, při kterém vytvořená nanovláknenná síť vykazuje malou velikost pórů. Tento efekt může mít negativní vliv na buněčnou infiltraci při některých biologických aplikacích. Rampichová a kol. sledovali penetraci mezenchymálních kmenových buněk do vláknenných nosičů vyrobených metodou odstředivého zvlákňování z poly- $\epsilon$ -kaprolaktonu (PCL). Bylo použito různé nastavení zařízení a vyrobeny vysoce porézní mikro- a nanovláknenné vrstvy o značné tloušťce, což bylo výhodné pro buněčnou migraci a komunikaci. Změnami v nastavení otvoru a vnějším prostředí bylo možno připravit vláknenné nosiče s různou morfologií<sup>136</sup>.

### 2.4.3 Polymery používané pro přípravu ultrajemných vláken

Výběr vhodného polymeru pro zvlákňování je nejdůležitější úlohou pro pozitivní výsledný efekt, ať již se jedná o jakoukoliv medicínskou aplikaci. Polymery musí být biokompatibilní bez rizika imunologických reakcí a ve většině případů i biodegradabilní, přičemž rychlost jejich rozpadu

by měla být uzpůsobena potřebě dané tkáně. Pro přípravu nanovláknenných nosičů v biologických aplikacích jsou využívány polymery jak syntetické, tak přírodní.

### **2.4.3.1 Syntetické polymery**

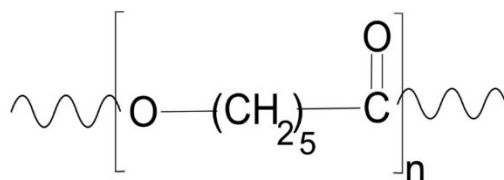
Pro přípravu biologicky odbouratelných nebo naopak nerozložitelných nosičů se používá mnoho syntetických polymerů. Použití biologicky odbouratelného nosiče je výhodné, jelikož není třeba další chirurgický zákrok pro vyjmutí implantovaného nosiče. Mechanické vlastnosti a rychlost rozpadu může být u nosičů uzpůsobena s ohledem na použití. Výroba syntetických polymerů je reprodukovatelná a jejich cena je obvykle nižší než cena přírodních polymerů. Syntetické polymerní nosiče mohou být připraveny do různých tvarů s požadovanými morfologickými charakteristikami pórů napomáhajícím vrůstání tkáně<sup>137</sup>. Široká škála syntetických polymerů je používána v různých medicínských aplikacích. Mezi nejvýznamnější patří PCL, polyvinylalkohol (PVA), pluronic (PEO-PPO-PEO), polyetylen glykol (PEG), polyuretan (PU), PLA a kyselina polyglykolová (PGA)<sup>137-139</sup>.

#### **2.4.3.1.1 Poly- $\epsilon$ -kaprolakton**

PCL je semikrystalický lineární alifatický polyester složený z opakujících se hexanoátových jednotek (obrázek 4). Je biokompatibilní, slučitelný s celou řadou syntetických i přírodních polymerů a bioresorbovatelný. Jeho degradace probíhá v řádech měsíců až roků v závislosti na jeho molekulové váze, stupni krystalinity a podmínkách degradace. Degradace probíhá ve dvou stupních. Nejprve proběhne neenzymatické hydrolytické štěpení esterových skupin a následně, když je polymer více krystalinní, dochází k intracelulární degradaci ve fagozomech makrofágů a fibroblastů<sup>140,141</sup>. Vytvořené produkty se v organismu metabolizují v Krebsově cyklu nebo se eliminují přímou renální sekrecí<sup>142</sup>.

Díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, nízkému bodu tání a výjimečné směsné kompatibilitě je PCL široce používaným materiálem pro přípravu nosičů v tkáňovém inženýrství

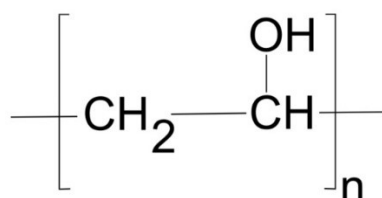
kosti<sup>143,144</sup>, chrupavky<sup>145,146</sup>, srdce a cév<sup>147–149</sup> i nervů<sup>150</sup>. Byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (*Food and Drug Administration; FDA*) jako šicí materiál a materiál pro řízené dodávání některých léčiv<sup>151</sup>.



Obrázek 4 Chemická struktura poly-ε-kaprolaktonu

#### 2.4.3.1.2 Polyvinylalkohol

PVA (obrázek 5) je semikrystalický, lineární, vysoce hydrofilní, biokompatibilní, netoxický a ve vodě rozpustný polymer, který je produkován přes částečnou nebo úplnou hydrolyzu polyvinylacetátu pro odstranění acetátových skupin. Stupeň hydrolyzace určuje fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti PVA<sup>152</sup>. PVA připravený metodou elektrostatického zvláknování je díky svým vlastnostem hojně využíván, například jako nosič v tkáňovém inženýrství, k řízenému dodávání léčiv a nebo jako materiál pro membrány a filtry<sup>153</sup>. Rozpustnost ve vodě a přílišná hydrofilita limitují jeho použití v tkáňovém inženýrství, proto jsou používány techniky fyzikálního a chemického síťování nebo následných úprav (gamma záření, plazmatická modifikace), které tento problém překonávají<sup>138,154,155</sup>.



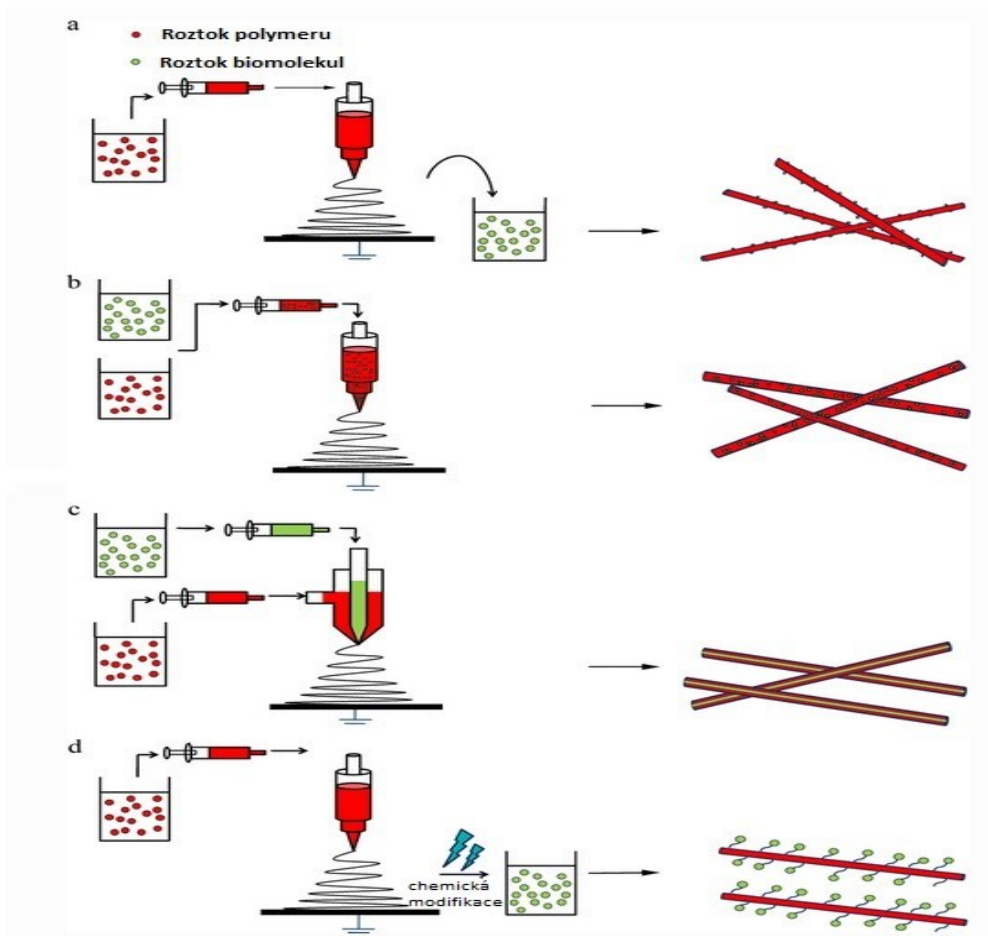
Obrázek 5 Chemická struktura polyvinylalkoholu

### 2.4.3.2 Přírodní polymery

Díky svým vlastnostem mají přírodní polymery dobrou biokompatibilitu a poskytují mnoho podnětů, které jsou vyžadovány pro buněčnou adhezi, proliferaci a funkci buněk. Oproti syntetickým polymerům mohou obsahovat patogenní nečistoty. Jejich nevýhodou je horší zpracovatelnost, variabilita mezi šaržemi a menší možnost kontroly jejich mechanických vlastností, jako je například pevnost a poločas rozpadu<sup>139</sup>. Tři velké třídy přírodních polymerů mohou být zvlákněny: proteiny (kolagen, gelatin, želatina, hedvábí, fibrinogen, elastin, myozin, aktin), polysacharidy (celulóza, amyulóza, dextran, chitin a glykosaminoglykany) a polynukleotidy (DNA, RNA)<sup>156,157</sup>. Přírodní polymery mohou být kombinovány se syntetickými polymerem pro zlepšení jejich mechanických vlastností a degradační stability<sup>158</sup>. He a kol. připravili směsný nanovlákněný nosiče z kolagenu a kopolymeru kyseliny mléčné s PCL a sledovali fenotypovou stabilitu, viabilitu, morfogenezi a adhezi lidských endotelových buněk. Zjistili, že připravený nosič zvyšoval viabilitu a adhezi buněk a navíc udržuje fenotypovou stálost<sup>159</sup>. Sharifi-Aghdam a kol. připravili směsné nosiče na bázi kolagenu, polyuretanu a hedvábí pro hojení šlach. Zjistili, že pletené hedvábí pokryté směsí zvlákněného kolagenu a polyuretanu má vhodnou mechanickou pevnost i porozitu pro léčbu defektů šlach. Buněčné testy prokázaly významnou proliferaci fibroblastů na nosičích s vyšším obsahem kolagenu<sup>160</sup>.

### 2.4.4 Funkcionalizace nanovlákněných nosičů

Pro zlepšení biologických funkcí nosiče a navození specifické buněčné odpovědi, jako je zlepšení proliferace, buněčné adheze, diferenciaci a zvýšení migrace cílových buněk do místa poškození, bývají nosiče funkcionalizovány. Nosiče mohou být funkcionalizovány bioaktivními látkami již během jejich přípravy nebo jsou tyto látky přidávány již k hotovému nosiči (obrázek 6)



Obrázek 6 Funkcionalizace nosiče a) fyzikální adsorpce, b) emulzní zvlákňování c) koaxiální zvlákňování d) chemická modifikace; převzato a upraveno dle<sup>161</sup>

#### 2.4.4.1 Metody funkcionalizace během přípravy nosičů

Léky, růstové faktory, proteiny, DNA, RNA i celé buňky mohou být zainkorporovány do nanovláken během jejich přípravy. Velká plnicí kapacita, velká efektivita zapouzdřování, současné dodávání různých látek, snadná příprava a hospodárnost jsou hlavními výhodami použití elektrostatického zvlákňování pro řízené dodávání bioaktivních látek<sup>162</sup>.

##### 2.4.4.1.1 Zvlákňování ze směsi

Zvlákňování ze směsi je nejjednodušší a nejpoužívanější metoda inkorporace bioaktivních látek. Ty jsou rozpuštěny nebo rozptýleny do polymerního roztoku a následně je tato směs zvlákňována. Pro získání požadovaných výsledků by měly být splněny některé požadavky. To se týká například

volby použitého polymeru, protože uvolňovací kinetika je značně závislá na distribuci látky v nanovlákněch, stejně jako na morfologii vláken, jejich porézności a složení. Proto musí být brána do úvahy hydrofobita/hydrofilita použitých polymerů a bioaktivních látek. Tyto fyzikálně-chemické vlastnosti významně ovlivňují efektivitu enkapsulace, distribuci látek ve vlákněch a kinetiku uvolňování<sup>163</sup>. Zeng a kol. sledovali uvolňovací kinetiku paklitaxelu, doxorubicinu hydrochloridu a doxorubicinové báze z nanovláken tvořených polylaktidem. Zjistili, že během zvlákňování některých lékových disperzí mohou molekuly léčiva migrovat na nebo do blízkosti povrchu nanovláken a způsobit jejich explozivní uvolnění<sup>164</sup>. Zamani a kol. sledovali uvolňování metronidazolu z PCL nanovláken. Připravili roztok PCL a metronidazolu ve směsi dichlorometanu a N,N-dimetylformamidu v různých poměrech. Výsledky prokázaly, že snížení dimetylformamidu ve směsi rozpouštědel vedlo ke snížení vodivosti roztoku a zvýšení viskozity stejně jako průměru nanovláken. Také zvýšení koncentrace metronidazolu v roztoku mělo efekt na viskozitu, vodivost a průměr nanovláken. Rychlost uvolňování léčiva byla ovlivněna jak poměrem rozpouštědel, tak koncentrací léčiva<sup>165</sup>.

#### **2.4.4.1.2 Koaxiální zvlákňování**

Koaxiální zvlákňování je metoda elektrostatického zvlákňování, která umožňuje vytvořit nanovlákná s morfologií jádro/plášť. Je založená na použití trysky se dvěma koaxiálně umístěnými kapilárami pro současné zvlákňování dvou různých roztoků. Polymerní kapaliny z vnější a vnitřní trysky mohou být jak mísitelné tak nemísitelné, protože krátká doba tuhnutí vláken významně zabraňuje směšování kapalin<sup>166</sup>. Plášť nanovlákná je většinou běžně používaný polymer, zatímco jádro může být tvořeno buď polymerem nebo nepolymerní newtonovskou kapalinou nebo dokonce práškem, který vyplní vnitřek jádra<sup>167</sup>. Z technologického hlediska musí být plášť vytvořen ze zvláknitelné kapaliny, zatímco kapalina pro jádro nanovlákná může, ale nemusí být zvláknitelná, protože fyzika zvlákňování je řízena hlavně povrchem trysky<sup>168</sup>. Toto zjištění umožnilo vytvářet

kompozitní vlákna, která mohou fungovat jako nosiče pro citlivé bioaktivní substance. Do jádra mohou být uzavřeny například růstové faktory, proteiny, protirakovinné a protizánětlivé látky, geny a antibiotika. Takto připravené nosiče jsou výhodné pro řízené uvolňování látek díky široké škále použitelných materiálů, velké plnicí kapacitě a ochraně uzavřených látek před vnějším prostředím<sup>169</sup>. Nicméně pro přípravu koaxiálních vláken je potřeba speciálně upravená zvlákňovací sestava a pečlivý výběr provozních parametrů pro dosažení požadovaných výsledků<sup>170</sup>.

#### **2.4.4.1.3 Emulzní zvlákňování**

Na rozdíl od koaxiálního zvlákňování je možné touto metodou připravovat vlákna typu jádro/plášť bez speciálně upravené jehly. Emulze je směs dvou kapalin, které se vzájemně nemísí a obvykle mívají různou hustotu a polaritu. Je tvořena disperzním prostředím, ve kterém je rozptýlena druhá kapalina. Pro zvlákňování se nejčastěji používají emulze typu voda v oleji. Ty obsahují olejovou fázi získanou rozpuštěním polymerů v organickém rozpouštědle a vodní fázi ve které jsou rozpuštěná léčiva nebo proteiny. Působením elektrické síly se emulze obsahující olejovou fázi polymerního roztoku a vodní fázi mikronových a submikronových částic prodlužuje a mění ve vlákna typu jádro/plášť<sup>171</sup>. Tian a kol. enkapsulovali VEGF do nanovláken tvořených kopolymerem PLA a PCL pro dlouhodobější uvolňování. Zjistili, že takto připravené nosiče mohou zachovat biologickou aktivitu proteinu a zajistit odpovídající uvolňovací profil<sup>172</sup>.

#### **2.4.4.2 Metody dodatečné funkcionalizace připravených nosičů**

Nanovláknenné nosiče mohou být také funkcionalizovány bioaktivními látkami až po jejich přípravě. Nejjednodušším způsobem funkcionalizace je ponoření nosiče do vodné fáze obsahující biomolekuly. Biomolekuly mohou být ve formě čistého roztoku nebo emulze a prostřednictvím elektrostatických sil, vodíkových můstků, hydrofobních interakcí a Van der Waalsových sil se navážou na nosič<sup>173</sup>. V porovnání s vlákny o rozměrech v řádu mikrometrů vykazují nanovlákna vyšší míru adsorpce proteinů<sup>128</sup>. Okamžité uvolňování látek z povrchu nanovláken umožňuje



jednoduché lokální podání některých terapeutických léčiv jako jsou například antibiotika pro prevenci bakteriálních infekcí po operaci<sup>174</sup>. Plencner a kol. použili polypropylenovou síť funkcionalizovanou PCL nanovláknem s adherovanými růstovými faktory pro prevenci tvorby incizionální kýly. Pomocí biomechanických a histologických analýz prokázali, že přítomnost růstových faktorů adherovaných na povrch PCL nanovláken akcelerovala regeneraci fascie<sup>175</sup>. Další metodou funkcionalizace je imobilizace bioaktivních molekul pomocí chemických vazeb. Povrch zvlákněného nosiče musí být chemicky modifikován pro vytvoření reaktivních funkčních skupin. Kvůli chemické modifikaci se však může objevit i částečná inaktivace imobilizovaných molekul. Pro imobilizaci jsou používány hlavně aminové a karboxylové, méně často i hydroxylové skupiny<sup>173</sup>.

### 3 Cíle práce

1. Příprava trombocytárních preparátů a jejich složek.
2. Charakterizace trombocytárních preparátů a jejich složek.
3. Funkcionalizace nanovlákných nosičů trombocytárními preparáty.
4. Testování funkcionalizovaných nosičů *in vitro*.
5. Testování jednotlivých složek trombocytárních preparátů *in vitro*.

## 4 Experimentální část

Experimentální část práce je rozdělena do 4 samostatných částí. V první části byl připraven a ocharakterizován trombocytární lyzát, který byl v různých koncentracích přidáván k dermálním buňkám kultivovaným na nanovlákných nosičích. Ve druhé části byly připraveny trombocyty, které byly v různých koncentracích adherovány na nanovlákné nosiče a byl sledován jejich vliv na dermální buňky. Ve třetí části byly ocharakterizovány trombocyty, které byly následně adherovány na nanovlákné nosiče a byl sledován jejich vliv na buňky MG-63. Ve čtvrté části byly ocharakterizovány a porovnávány jednotlivé složky trombocytárního koncentrátu a byl sledován jejich vliv na hMSC a fibroblasty.

## 5 Obecné metody

### 5.1 Stanovení celkového proteinu v trombocytárním lyzátu

Celkový protein obsažený v hPL byl kvantifikován pomocí fluorescenčního kitu (Quant-iT™ Protein Assay Kit, Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Z každého vzorku bylo odebráno 10 µl a doplněno 200 µl pracovního roztoku proteinového kitu. Vzorky byly nanášeny do černé 96jamkové destičky (Corning 3603, NY, USA), aby bylo zabráněno prostupu fluorescence mezi sousedícími jamkami. Fluorescence jednotlivých vzorků byla měřena pomocí readeru Tecan (Tecan group Ltd., Švýcarsko) při hodnotách excitace 470 nm, emise 570 nm. Pro sestavení kalibrační křivky byly v dubletech nanášeny standardy (součástí kitu, obsah proteinu 0–500 ng/µl) a na základě kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace celkového proteinu v jednotlivých vzorcích.

### 5.2 Příprava buněčných kultur

Linie myších 3T3-A31 fibroblastů byla zakoupena od Sigma-Aldrich (MO, USA), XB2 linie myších keratinocytů a melan-a (pigmentované melanocyty) myší linie byly zakoupeny z Welcome Trust Functional Genomics Cell Bank z St. George univerzity v Londýně, lidská osteosarkomová linie MG-63 byla zakoupena z firmy Cell Lines Service GmbH (Eppenheim, Německo) a primární lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně byly zakoupeny z firmy ScienCell™ (CA, USA). Linie 3T3, XB2 a MG-63 byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, MO, USA) suplementovaném 10% FBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) a ošetřeny směsí penicilin/streptomycin (100 IU/ml, 100 µg/ml, Gibco, MA, USA). Linie myších melanocytů byla kultivována v RPMI-1640 médiu (Roswell Park Memorial Institute, Sigma-Aldrich, MO, USA) doplněném 10% FBS, penicilin/streptomycinem (100 IU/ml, 100 µg/ml, Gibco, MA, USA), 2mM L-glutaminem a 200 nM TPA (12- O-Tetradecanoylforbol-13-acetát). MSC byly

kultivovány v MEM alpha médiu (Minimum Essential Medium, Gibco, MA, USA) suplementovaném 10% FBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) a ošetřeny penicilin/streptomycinem (100 IU/ml, 100 µg/ml, Gibco, MA, USA). Všechna média byla měněna každé 3–4 dny.

### **5.3 Kvantifikace fibrinogenu a albuminu v trombocytárním lyzátu**

Kvantifikace fibrinogenu a albuminu v trombocytárním lyzátu byla provedena v diagnostické laboratoři Synlab Czech (Česká Republika) dle protokolu výrobců. K měření koncentrace albuminu bylo použito barvivo bromokresolová zeleň. Absorbance komplexu bromokresolové zeleně a albuminu byla detekována použitím přístroje AU5800 (Beckman Coulter, CA, USA). Celková koncentrace fibrinogenu byla detekována modifikovanou Clausovou metodou s použitím automatického koagulometru Sysmex CA 1500 (Siemens, Německo).

### **5.4 Kvantifikace IGF-I**

Kvantifikace IGF-1 byla provedena pomocí imunoradiometrické metody v laboratoři Imalab (Česká Republika). Byly použity myší monoklonální protilátky namířené proti dvěma různým epitopům IGF-I, které tudíž nejsou konkurenční. Pro uvolnění IGF-I z vazby proteinů, je nutný předchozí disociační krok. Vzorky a kalibrátory byly inkubovány ve zkumavkách potažených první monoklonální protilátkou v přítomnosti druhé monoklonální protilátky značené jodem-125. Po inkubaci byl obsah zkumavek odstraněn a byla měřena navázaná radioaktivita. Neznámé hodnoty byly určeny stanovením interpolací ze standardní křivky. Vázaná radioaktivita je přímo úměrná koncentrace IGF-I ve vzorku.

## **5.5 Kvantifikace vybraných růstových faktorů v trombocytárním lyzátu a jeho složkách a stanovení uvolňovací kinetiky EGF z nosiče**

Koncentrace růstových faktorů (HGF, EGF, VEGF, P-selektin, KGF, TGF- $\beta$ ) v trombocytárním lyzátu a jeho jednotlivých složkách byly stanoveny pomocí ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) metody protilátkovým systémem Duo Set (R&D Systems, Minneapolis, USA). Kultivační médium pro stanovení uvolňovací kinetiky (exp. 2) bylo odsáto a zamraženo (-80 °C). Koncentrace EGF uvolněného z trombocytů a/nebo syntetizovaného buňkami byly kvantifikovány také použitím ELISA eseje. Povrch 96jamkové destičky byl nejprve inkubován s primární protilátkou po dobu 12 hodin při pokojové teplotě, poté blokován fosfátovým pufrům (PBS) s 1% hovězím sérovým albuminem (BSA). Při pokojové teplotě byla primární protilátka inkubována po dobu 2 hodin se vzorky a standardy. Detekce proběhla inkubací s biotinylovanou sekundární protilátkou (2 hodiny, pokojová teplota) a konjugátem streptavidin-HRP (avidin-peroxidáza) (20 minut, pokojová teplota). Mezi jednotlivými kroky byly jamky v destičce promývány PBS s 0,05% Tween-20®. Aktivita navázané HRP byla stanovena kolorimetry přidáním TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Life Technologies) substrátu a měřením absorbance při 450 nm na spektrofotometru Biotek Synergy H1 ELISA reader (Biotek, VT, USA) po 20 minutách reakce při pokojové teplotě. Na základě kalibračních křivek byly stanoveny koncentrace růstových faktorů.

## **5.6 Kvantifikace vybraných bioaktivních molekul metodou Bioplex**

Pro detekci vybraných bioaktivních látek obsažených v hPL byl použit BioPlex system (BioRad Laboratories, CA, USA). Tato metoda umožňuje stanovení většího množství analytů naráz v jednom vzorku. Vzorky byly naředěny 1:4 v ředícím roztoku. Standard byl rekonstituován a naředěn čtyřnásobným ředěním. Byly připraveny magnetické kuličky pokryté protilátkou, které byly umístěny do testovací destičky. Roztok s magnetickými kuličkami byl před každým přidáním do

destičky pečlivě promíchán na vortexu. Destička byla promyta na automatické promývače. Po promytí byly do jamek ke kuličkám přidány standardy a vzorky. Destička byla inkubována na třepače a po inkubaci a promytí byla přidána detekční protilátka. Destička byla znovu inkubována na třepače a po dalším promývacím kroku byl přidán streptavidin-fykoerytin. Po posledním inkubačním kroku byla destička umístěna do přístroje a analyzována. Výsledky byly analyzovány použitím Bio-Plex Manager™ softwaru. Absolutní koncentrace vzorku byly vyhodnoceny sestavením kalibrační křivky daného analytu. Hodnoceny byly následující bioaktivní látky: interleukin-1b (IL-1b), interleukin-1ra (IL-1ra), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-7 (IL-7), interleukin-8 (IL-8), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12), interleukin-13 (IL-13), interleukin-15 (IL-15), interleukin-17 (IL-17), faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), CXCL10 chemokin (IP-10), MIP-1a, MIP 1b (CCL-4), RANTES, eotaxin (CCL-11), růstový faktor odvozený z trombocytů (PDGF), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF).

## 5.7 Stanovení metabolické aktivity buněk

MTS test (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega , WI, USA) je kolorimetrická metoda, která umožňuje sledování změny metabolické aktivity nasazených buněk. V reagenčním roztoku se nachází tetrazoliová sůl, která je pomocí NADPH nebo NADH metabolizujících buněk redukována na barevný formazan. V určené experimentální dny byly nosiče přeneseny do nové kultivační destičky a ke každému nosiči bylo přidáno 20  $\mu$ l reagenčního roztoku (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) a 100  $\mu$ l kultivačního média. Dle typu buněk byly buňky kultivovány v inkubátoru po dobu 2–3 hodin. Do nové destičky bylo odsáto 100  $\mu$ l výsledného barevného produktu a byla měřena absorbance na

spektrofotometru (Infinite®M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 490 nm a 690 nm pro odečtení pozadí. Hodnoty absorbance vzorků byly vypočteny odečtením hodnoty použitého média bez buněk.

## **5.8 Stanovení proliferace buněk**

Obsah DNA byl stanoven pomocí citlivé fluorescenční barvy (Quant-iT™ High Sensitivity dsDNA Assay Kit, Invitrogen). Tato metoda je založená na vazbě ultrasenzitivního fluorescenčního barviva do dvoušroubovicové DNA. Slouží k její detekci a kvantifikaci v roztoku. Celá metoda i příprava pufru je prováděna sterilně v laminárním boxu s materiály, které nemohou obsahovat volné nukleové kyseliny. Příprava pracovního roztoku Quant-iT™ dsDNA Assay Reagent a manipulace s ním musí být prováděna bez přítomnosti přímého osvětlení. Jednotlivé nosiče byly přemístěny do mikrozkušavek s 200  $\mu$ l lyzačního pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2% v/v Triton X-100). Vzorky byly 3x zmrazeny (20 °C) a rozmrazeny (pokojová teplota) a při každém rozmrazení důkladně promíchány na vortexu. Z každého vzorku bylo do černé 96jamkové destičky odebráno 10  $\mu$ l roztoku, které byly doplněny do 200  $\mu$ l pracovním roztokem kitu. Fluorescence jednotlivých vzorků byla měřena pomocí spektrofotometru (Infinite® M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při hodnotách excitace 485 nm a emise 528 nm. Pro sestavení kalibrační křivky byly v dubletech nanášeny standardy (součástí kitu, obsah DNA 0–10 ng/ $\mu$ l) a na základě kalibrační křivky byl vypočítán obsah DNA v jednotlivých vzorcích.

## **5.9 Vizualizace buněk pomocí skenovací elektronové mikroskopie**

Vzorky byly fixovány pomocí 2,5% glutaraldehydu (Sigma-Aldrich, MO, USA) při teplotě 4 °C. Po dvou hodinách fixace byly vzorky dehydrovány pomocí ethanolové řady (35%, 48%, 70%, 96% a 100% ethanol). Několik kapek hexametyldisilazanu (Sigma-Aldrich, MO, USA) bylo použito pro odstranění zbytkové vody a rovnoměrnému vysušení vzorků. Vzorky byly pokryty vrstvou zlata



(přibližně 30 nm) na přístroji Quorum Q150R (Quorum Technologies, Spojené Království) a vizualizovány s použitím skenovacího elektronového mikroskopu Vega 3 SBU (Tescan, Česká Republika).

### **5.10 Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie**

Pro měření buněčné adheze bylo použito barvení pomocí barviva DiOC6, které barví membránové struktury buňky. Propidium jodid (PI) se váže na buněčnou DNA a barví tak jádra buněk a slabě i cytoplasmu. Vzorky byly nejprve fixovány metanolem o teplotě -20 °C, následně byly promyty PBS a obarveny pomocí barviva DiOC6 (1 µg/ml v PBS; 30 minut při pokojové teplotě). Vzorky byly následně obarveny pomocí propidium jodidu (5 µl/ml v PBS; 10 minut při pokojové teplotě). Vzorky byly mezi jednotlivými kroky omývány PBS. Vzorky byly sledovány pomocí konfokálního mikroskopu LSM 510 DUO (Zeiss, Německo) při vlnových délkách  $\lambda_{ex} = 561$  nm a  $\lambda_{em} = 630-700$  nm pro PI a  $\lambda_{ex} = 488$  nm a  $\lambda_{em} = 505-550$  nm pro DiOC6.

### **5.11 Charakterizace nosiče a příprava vzorků**

Morfologie elektrospínovaných nanovláken byla hodnocena pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) na přístroji Vega 3 SBU Tescan (Tescan, Česká Republika). Vzorek PCL byl pokryt vrstvou zlata (přibližně 30 nm) na přístroji Quorum Q150R (Quorum Technologies, Spojené Království). Průměr vláken a velikost pórů byly měřeny z libovolně vybraných oblastí na pěti SEM obrazech. Průměrný průměr vlákna byl vypočítán z 280 nezávislých měření v ImageJ softwaru a velikost pórů byla odhadnuta z 840 nezávislých měření. PCL nanovláčenné vzorky (průměr 0,6 cm) byly sterilizovány v 70% ethanolu po dobu 30 minut.

### **5.12 Statistická analýza**

Data byla hodnocena softwarem SigmaStat 3.5 (Systat, San Jose, CA, USA). Nejprve byl proveden Kolmogorovův-Smirnovův pro zjištění normality dat. Statisticky signifikantní rozdíly mezi

skupinami s normálním rozložením byly hodnoceny metodou ANOVA a Tukeyho test byl použit pro post hoc analýzu. Data s nenormálním rozložením byla testována Kruskal-Wallisovým testem a metodou Dunnové pro post hoc analýzu. Statistická významnost byla přijata na 5% hladině.

## 6 Specifické metody

### 6.1 Experiment 1

#### 6.1.1 Příprava trombocytárních lyzátů

Trombokonzentrát připravený z buffy coatu byl zakoupen z transfúzní stanice (Šumperk, Česká Republika). Trombokonzentrát byl připraven z krve 16 dárců k minimalizování interindividuálních variabilit. Trombocytární lyzát byl připraven pomocí metody opětovného mrazení a rozmrazování<sup>67</sup>. Celý vak byl třikrát zmrazen (-80 °C) a rozmrazen (37 °C) z důvodu rozrušení trombocytárních membrán. Následně byl roztok rozaliquotován do 50ml zkumavek a stočen (4 100 g/15 min) pro odstranění buněčného odpadu. hPL byly do použití skladovány při teplotě -80 °C.

#### 6.1.2 Příprava nanovlákných nosičů elektrostatickým zvlákňováním

Nanovláknina byla připravena z polykaprolaktonu (PCL) pomocí hladinového elektrostatického zvlákňování. Elektrostatické zvlákňování bylo provedeno za použití 24% (w/v) roztoku PCL (45 000 Da, Sigma Aldrich, MO, USA) rozpuštěného v chloroform:ethanolu v poměru 9:1 (v/v) na Nanospideru NS500 (Elmarco, Česká Republika) s použitím bezjehlové elektrody. Rozmezí elektrického napětí bylo mezi 80–100 kV. Teplota byla  $24 \pm 2$  °C a relativní vlhkost  $55 \pm 10$  %. Vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem byla 20 cm.

#### 6.1.3 Nasazení a kultivace buněk na nosičích

Nanovláknenné nosiče byly osazeny buňkami v hustotě 14 200 buněk/cm<sup>2</sup> v případě keratinocytů a fibroblastů a 17 700 buněk/cm<sup>2</sup> v případě melanocytů. Vzorky byly kultivovány v různých typech média. Koncentrace suplementů je obsažena v názvu vzorku (XFYL). X reprezentuje koncentraci FBS (v/v), Y koncentraci hPL (v/v). Média obsahující pouze 5% nebo 10%

koncentraci FBS sloužila jako kontrola. Do médií obsahujících hPL byl přidán heparin (2 IU/ml) pro zabránění formování fibrinové sítě.

## **6.2 Experiment 2**

### **6.2.1 Příprava nosiče**

Nanovlákná byla připravena z PCL pomocí hladinového elektrostatického zvlákňování. Elektrostatické zvlákňování bylo provedeno za použití 24% (w/v) roztoku PCL (40 000 Da, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Německo) rozpuštěného v chloroform:ethanolu v poměru 9:1 (v/v) na přístroji Nanospider NS500 (Elmarco, Česká Republika) s použitím bezjehlové elektrody. Rozmezí elektrického napětí bylo mezi 80–100 kV. Teplota byla  $23 \pm 2$  °C a relativní vlhkost  $60 \pm 15$  %. Vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem byla 20 cm.

### **6.2.2 Příprava kompozitního nosiče**

Pomocí punče byla připraveny nosiče o velikosti 6mm. Nosiče byly sterilizovány použitím 70% ethanolu po dobu 30 minut a následně byly promyty PBS. Trombocyty směsné deleukotizované v náhradním roztoku byly zakoupeny v transfúzní stanici (Šumperk, Česká Republika). Byly připraveny tři koncentrace C1 ( $1,03 \times 10^{12}$  trombocytů/l, maximální koncentrace), C2 ( $5,15 \times 10^{11}$  trombocytů/l, poloviční koncentrace) a C3 ( $2,575 \times 10^{11}$  trombocytů/l, třetinová koncentrace) a 50  $\mu$ l roztoku bylo přidáno k sterilním nosičům. Náhradní roztok SSP+ (Macopharma, Tourcoing, Francie) byl použit ke zředění trombocytárního koncentrátu. Vzorčky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 22 °C, poté byly opláchnuty PBS a přeneseny do nové destičky.

### **6.2.3 Nasazování buněk na nosiče**

Nanovláknenné nosiče byly osazeny buňkami v hustotě 7 800 buněk/cm<sup>2</sup> v případě keratinocytů a fibroblastů a 12 500 buněk/cm<sup>2</sup> v případě melanocytů.

### **6.2.4 Stanovení obsahu melaninu**

Obsah melaninu na nosičích byl stanoven dle metody Busca a kol.<sup>176</sup>. Vzorčky byly přeneseny do 300  $\mu$ l 1 mol l<sup>-1</sup> NaOH a inkubovány 2 hodiny při teplotě 80 °C. Poté byly vzorčky zvortexovány pro usnadnění rozpouštění melaninu a stočeny (10 000 g, 1 minuta, MiniSpin; Eppendorf, Hamburk, Německo) z důvodu usazení PCL debris. Absorbance supernatantu byla detekována při 405 nm. Obsah melaninu na nosičích byl stanoven pomocí kalibrační křivky syntetického melaninu (syntetický melanin; Sigma-Aldrich).

### **6.3 Experiment 3**

#### **6.3.1 Příprava vlákněného nosiče pomocí odstředivého zvlákňování**

Vlákněná vrstva byla připravena pomocí přístroje pro odstředivé zvlákňování (Cyclone 1000 L/M Forcespinning® device; FibeRio, McAllen, TX, USA). PCL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) byl rozpuštěn ve směsi chloroformu a ethanolu v objemovém poměru 9:1 pro získání 40% směsi. Pro získání vlákněné vrstvy byl použit otvor G30 při otáčkách 6 000 g. Vlákněna byla nanášena na netkanou textili pomocí vakuové depozice.

#### **6.3.2 Adheze trombocytů na vlákněné nosiče**

Trombocyty směsné de leukotizované v náhradním roztoku byly zakoupeny z transfúzní stanice (Šumperk, Česká Republika). Vak obsahoval trombocyty od 4 dárců. Trombocyty byly stočeny při 120 g po dobu 7 minut z důvodu jejich sedimentace a odstranění zbytkových erytrocytů. Následně byl supernatant přenesen do nové zkumavky a stočen (2 200 g; 10 min) pro obdržení pelety trombocytů, která byla resuspendována v náhradním roztoku SSP+ (Macopharma, Tourcoing, France). Trombocyty byly poté naředěny na odpovídající koncentrace v SSP+ roztoku: 3 000×10<sup>9</sup> trombocytů/l (odpovídá 10× koncentrované fyziologické koncentraci (FK); P1), 900×10<sup>9</sup> trombocytů/l (odpovídá 3× koncentrované FK; P2), 300×10<sup>9</sup> trombocytů/l (odpovídá FK; P3), 100×10<sup>9</sup> trombocytů/L (3× ředěná FK; P4) a 30×10<sup>9</sup> trombocytů/l (10× ředěná FK; P5).

#### **6.3.3 Nasazování buněk na nosič a adheze trombocytů**

Před nasazením buněk na nosiče byla PCL nanovláknina vyražena na kolečka o průměru 6 mm a sterilizována pomocí ethylenoxidu. Vzorky byly osazeny linií osteosarkomových buněk MG-63 (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany) v hustotě 30 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Buňky adherovaly na nosič po dobu 2 hodin v 30 µl kultivačního média DMEM, které bylo supplementováno 2% fetálním bovinním sérem a penicilinem/streptomycinem. Následně bylo přidáno 20 µl trombocytární suspenze v různých koncentracích (P1–P5). Tyto suspenze adherovaly na nosiče po dobu 1 hodiny. Poté bylo přidáno 250 µl média. Kultivační médium nebylo v průběhu experimentu měněno. Bylo připraveno šest různých skupin – 5 skupin s různou koncentrací trombocytů adherovaných na PCL nosiče (PCL/P1–P5) a vláknenný nosič bez trombocytů, který sloužil jako kontrola (PCL). Pro kontrolu interakce trombocytů s použitými metodami byly použity nosiče s adherovanými trombocyty v daných koncentracích (P1–P5) bez buněk. Hodnoty naměřené na těchto vzorcích byly odečteny z hodnot naměřených u vzorků s buňkami.

#### **6.3.4 Detekce aktivity alkalické fosfatázy (ALP)**

Aktivita ALP byla měřena použitím kitu 1-Step™ PNPP kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). V experimentální den bylo 100 µl p-nitrofenyl fosfátu (PNPP) přidáno do každé jamky a inkubováno po dobu 30 minut. Následně byla reakce zastavena pomocí 2N NaOH. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 405 nm (Synergy HT, Biotek, VT, USA).

#### **6.3.5 Detekce osteogenních markerů nepřímým imunofluorescenčním barvením**

Přítomnost osteokalcinu (OCN) jakožto markeru typického pro osteogenní diferenciaci byla hodnocena použitím nepřímého imunofluorescenčního barvení 1., 7. a 14. den. Vzorky byly fixovány 4% formaldehydem po dobu 10 min, promyty PBS a inkubovány s 3% FBS v PBS/0,1% Triton po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Nejprve byla přidána primární monoklonální protilátka proti OCN (OCG3; Abcam, Cambridge, UK; ředění 1:20) a vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 2–8 °C. Po třech promytích PBS/0,05% Tweenem-20 byly vzorky inkubovány s Alexa Fluor 488-

konjugovanou myší sekundární protilátkou po dobu 45 min. Následně byl přidán roztok PI na 10 min (5 µg/ml v PBS) pro vizualizaci buněčných jader. Nakonec byly vzorky 3x promyty PBS/0,05% Tweenem-20. Pro detekci přítomnosti OCN byl použit konfokální mikroskop (ZEISS LSM 5 DUO, Německo) (Alexa Fluor 488:  $\lambda_{ex}=488$  nm,  $\lambda_{em}=505-550$  nm a PI:  $\lambda_{ex}=561$  nm,  $\lambda_{em}=630-700$  nm).

## **6.4 Experiment 4**

### **6.4.1 Příprava jednotlivých složek trombocytárního lyzátu**

Trombokonzentrát připravený z buffy coatu byl zakoupen z transfúzní stanice (ÚHK, Česká republika). Trombokonzentrát byl připraven z krve 16 dárců k minimalizování interindividuálních variabilit. Trombokonzentrát byl rozdělen do tří částí. První část byla zpracována na trombocytární lyzát (skupina hPL). Druhá část trombokonzentrátu byla stočena (360 g/10 min). Následně byl supernatant nahrazen destilovanou vodou a tento trombokonzentrát byl také zlyzován (skupina hPL dH<sub>2</sub>O). Poslední část byla stočena (360 g/15 min) a vzniklý supernatant byl použit pro experiment (skupina hPL PPP). Skupiny s trombocyty (hPL a hPL dH<sub>2</sub>O) byly zlyzovány opakovaným zmražením (-80 °C) a rozmražením (37 °C) a následně byly stočeny (4 100 g/15 min) pro odstranění buněčného odpadu. Všechny složky byly do použití skladovány při teplotě -80 °C.

### **6.4.2 Nasazování buněk na kultivační plast**

Buňky byly nasazovány v hustotě 10 000 buněk/cm<sup>2</sup> v případě fibroblastů i hMSC. Buňky byly kultivovány v přítomnosti 8% složek trombocytárního lyzátu. Jako kontrola sloužilo médium s 10% FBS. Média obsahující trombocytární složky byla ošetřena heparinem (2 IU/ml) z důvodu prevence formování fibrinové sítě.

## **7 Výsledky**

### **7.1 Trombocytární lyzát jako náhrada séra pro kožní buňky kultivované na biomimetických PCL nanovláčkových nosičích**

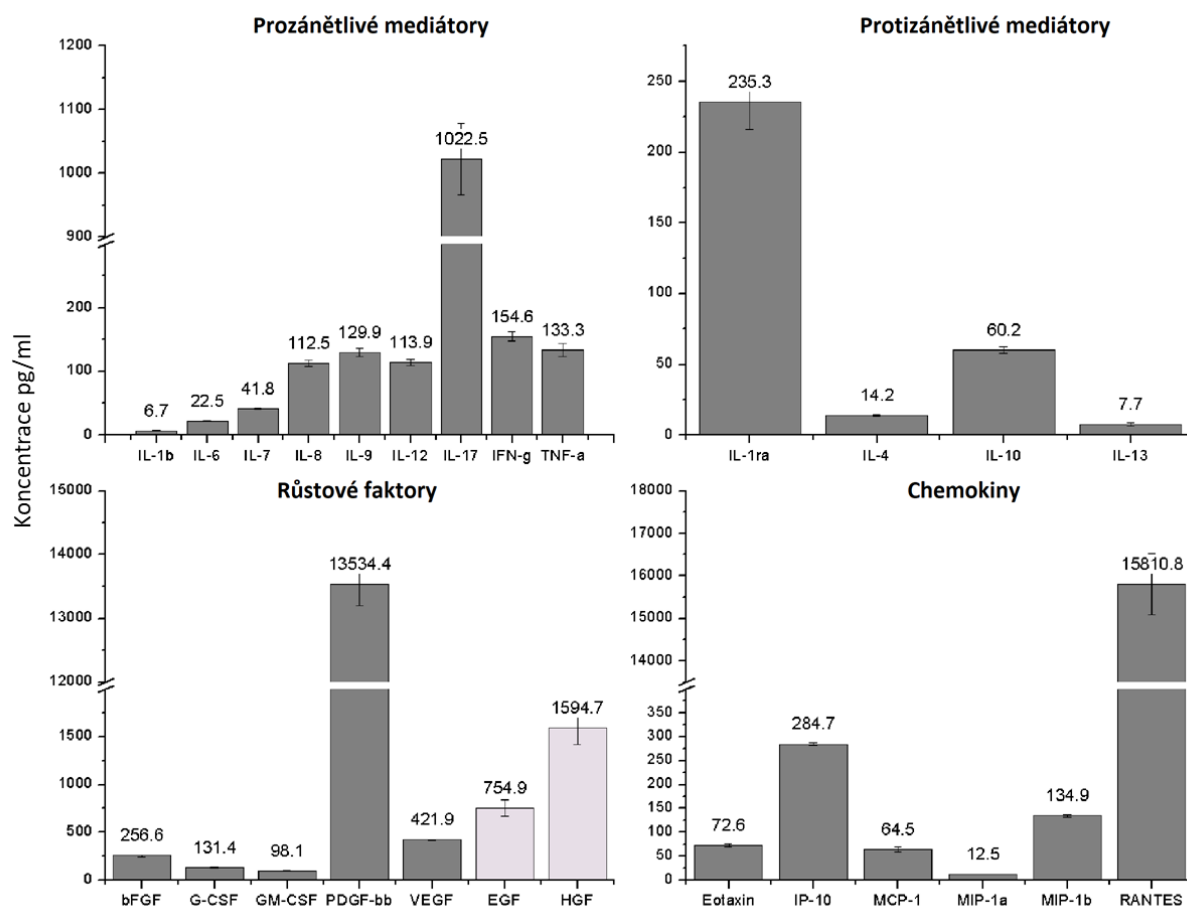
Cílem experimentu bylo vyvinout a optimalizovat pokročilý systém kultivace buněk s použitím trombocytárního lyzátu v kombinaci s nanovláčkovými nosiči. 3D podobná struktura připomíná mikroprostředí tkáně lépe než kompaktní povrch kultivační destičky, a navíc velký povrch nanovláček usnadňuje vyšší adsorpci proteinů z kultivačního média. V této práci bylo zacíleno na kultivační podmínky fibroblastů, keratinocytů a melanocytů ve 3D podmínkách a porovnání hPL a FBS jako doplňků.

#### **7.1.1 Výsledky**

##### **7.1.1.1 Trombocyty obsahují rozmanité bioaktivní proteiny**

Bylo změřeno celkové množství proteinu v hPL a FBS. Navíc byla změřena koncentrace fibrinogenu a albuminu v hPL. ELISA a multiplexový proteinový kit byl proveden pro detekci koncentrace specifických mediátorů (obrázek 7).



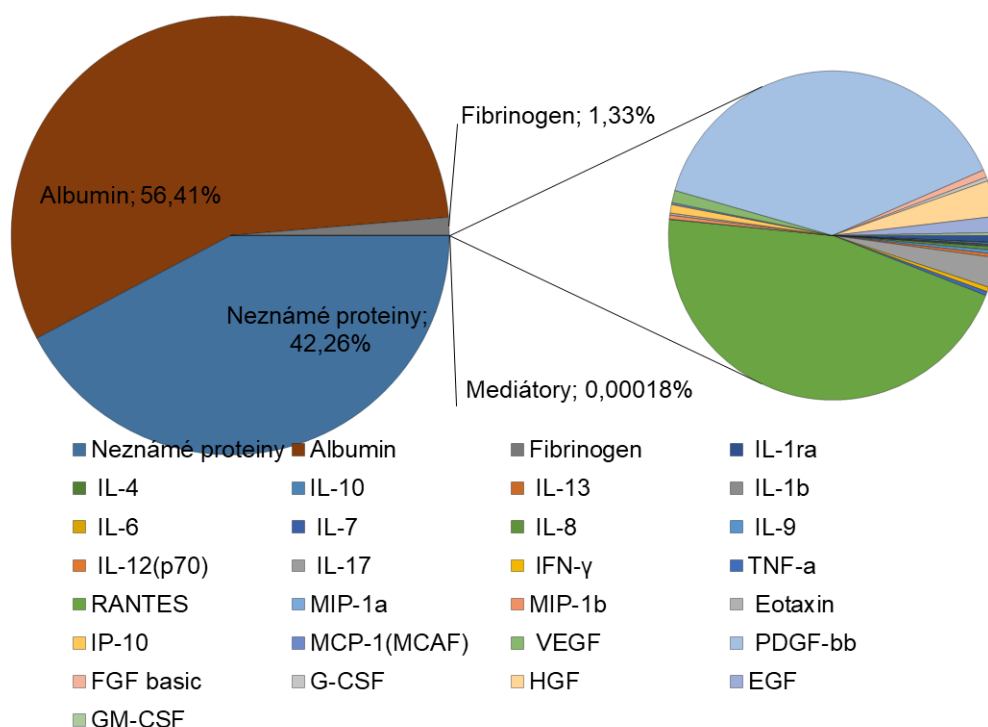


Obrázek 7 Koncentrace růstových faktorů a dalších bioaktivních molekul v hPL. Mediátory detekované pomocí BioPlex analýzy jsou zobrazeny tmavě šedou, mediátory detekované pomocí ELISA testu jsou zobrazeny světle šedou.

Analýza ukázala, že hPL obsahuje různé protizánětlivé a prozánětlivé mediátory. Ve skupině protizánětlivých mediátorů je nejvíce zastoupeným proteinem IL-1ra ( $235,9 \pm 4,8$  pg/ml). IL-1ra je znám svou schopností modulovat různé imunitní a zánětlivé odpovědi spojené s interleukinem-1. Další protizánětlivé interleukiny jako je IL-4, IL-10 a IL-13 byly nalezeny ve výrazně nižších koncentracích. Prozánětlivé cytokiny jako IL-8, IL-9, IL-12, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  byly detekovány v podobných koncentracích (100–200 pg/ml). V nejvyšší koncentraci byl naměřen interleukin 17 ( $1\ 022,5 \pm 56,4$  pg/ml), nicméně další prozánětlivé cytokiny (IL-1b, IL-6, IL-2, IL-5, IL-15), protizánětlivé cytokiny (IL-4 and IL-13) a MIP1a byly naměřeny ve velmi nízkých koncentracích. RANTES byl nejhojněji zastoupeným cytokinem v asi 10 000krát vyšší koncentraci než ostatní

cytokiny a chemokiny. Dále byly v hPL determinovány růstové faktory, z nichž v nejvyšší koncentraci byl PDGF-BB. EGF a HGF byly přítomny v koncentraci vyšší než 500 pg/ml. Analýza ukázala, že koncentrace GM-CSF a G-CSF byla stejně nízká jako koncentrace ostatních růstových faktorů. Naměřená data ukázala, že koncentrace sledovaných bioaktivních molekul byla zanedbatelná v porovnání s celkovým proteinem detekovaným v hPL (obrázek 8). Nicméně většina monitorovaných analytů je v koncentracích, které jsou dostatečné pro plnění jejich fyziologických funkcí.

## Celkový protein a sledované bioaktivní molekuly v hPL



Obrázek 8 Grafická ilustrace detekovaných proteinů a cytokinů v trombocytárním lyzátu.

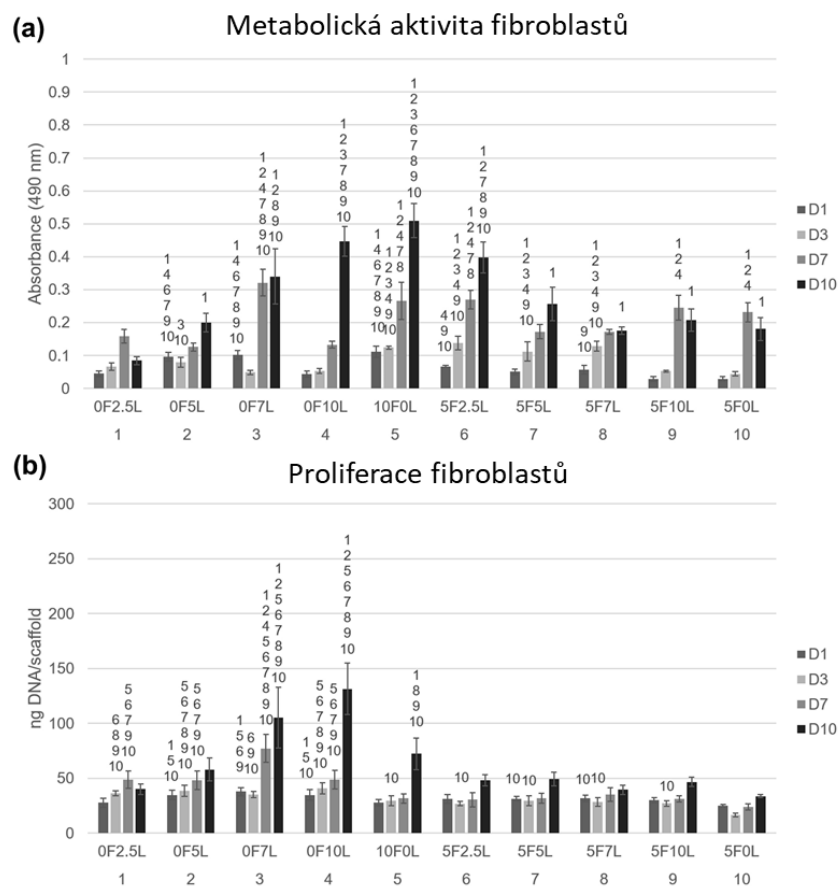
### 7.1.1.2 Charakterizace PCL nanovláken

Stereologické měření nanovláknenných vrstev identifikovalo populace nano a mikro vláken s minimem nevláknenných defektů. Střední průměr nejtenčí nanovláknenné frakce byl  $229 \pm 79$  nm a

nejtlustší nanovláknenné frakce  $579 \pm 133$  nm. Kromě toho byla detekována méně zastoupená frakce mikrovláken se středním průměrem  $2\,442 \pm 925$  nm. Porozita nanovláknenného nosiče byla  $38 \pm 3$  %.

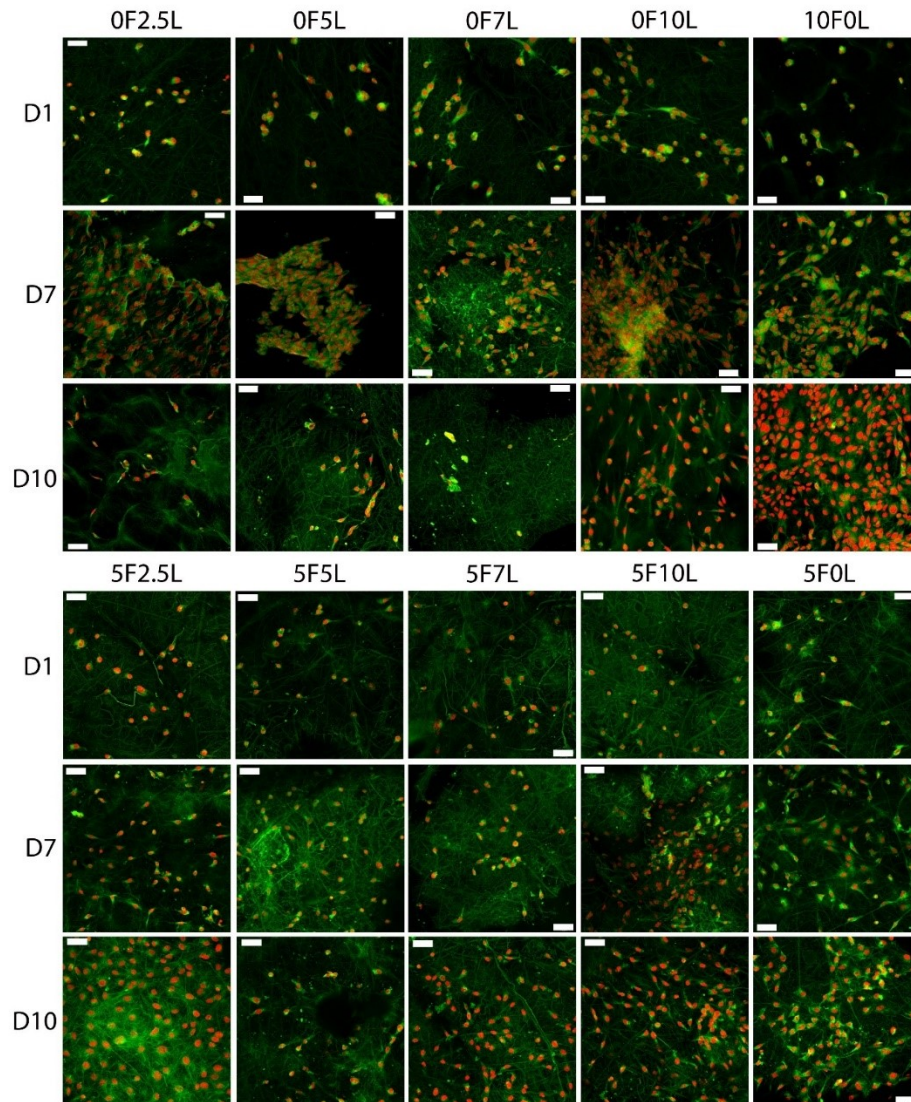
### 7.1.1.3 Efekt hPL na fibroblasty

K ověření efektu použitých suplementů na metabolickou aktivitu fibroblastů byl použit MTS test. Obrázek 9a ukazuje metabolickou aktivitu fibroblastů během kultivace. Metabolická aktivita plynule rostla ve skupinách 0F10L, 10F0L, 5F2.5L, 5F5L a 5F7L. Viabilita ve skupinách 0F2.5L, 5F10L a 5F0L rostla do 7. dne a poté se již nezvyšovala, nebo klesala. Výsledky naznačují, že koncentrace hPL vyšší než 7% je dostatečná pro nahrazení FBS. Kontrolní skupina 10F0L nevykazovala statistické rozdíly v porovnání se skupinou 0F10L. Ve skupinách, kde byl kombinován hPL a FBS, bylo zjištěno, že nižší koncentrace hPL (do 7 %) zajišťovala lepší viabilitu buněk až do 3. dne, zatímco ve skupině s vyšší koncentrací hPL (5F10L) metabolická aktivita rapidně vzrostla 7. den. Nízká koncentrace (2,5%) hPL v kombinaci s 5% FBS (5F2.5L) měla lepší efekt na metabolickou aktivitu fibroblastů v porovnání se skupinami obsahující vyšší množství hPL s přidavkem FBS. Předpokládáme, že vyšší koncentrace hPL kombinovaná s FBS má na fibroblasty spíše inhibiční efekt. Proliferace fibroblastů kultivovaných na PCL nosičích byla testována pomocí fluorescenčního kitu (obrázek 9b). Největší proliferační rychlost 3T3 fibroblastů byla pozorována ve skupinách 0F7L, 0F10L a 10F0L. Skupiny, kde bylo kombinováno FBS a hPL nebo které obsahovaly 5% FBS samotné, vykazovaly nižší proliferační aktivitu v průběhu celého experimentu. Výsledky jsou ve shodě s výsledky z MTS testu a ukazují, že 7% a 10% hPL stimuluje proliferaci fibroblastů ve statisticky vyšší míře než 5% FBS.



Obrázek 9 Metabolická aktivita a proliferace fibroblastů. (a)- Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu, (b)- proliferace fibroblastů byla měřena pomocí fluorescenčního kitu. Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v), Y pro koncentraci hPL (v/v). Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

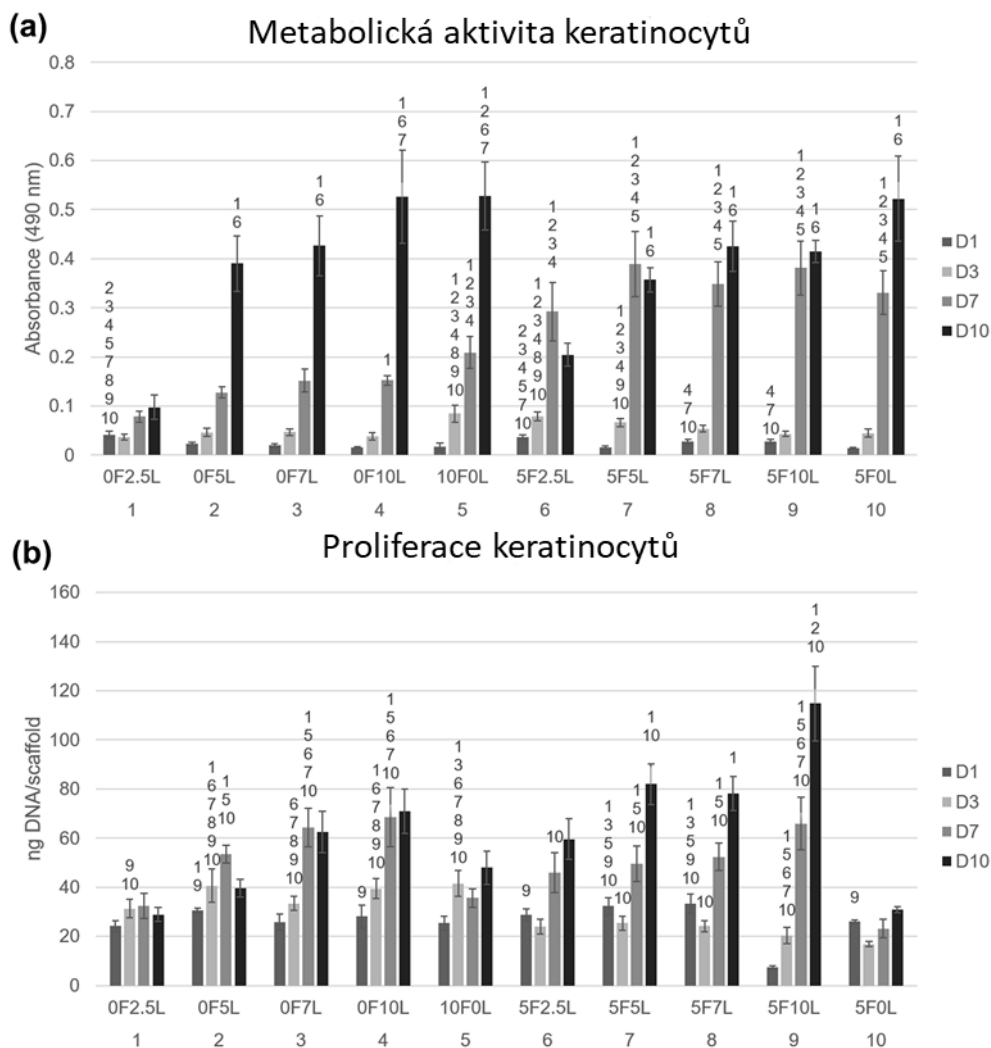
Konfokální mikroskopie ukázala dobře rozprostřené buňky na nosiči vykazující morfologii typickou pro fibroblasty (obrázek 10). Snímky ukázaly plynulou proliferaci buněk od 1. do 10. dne. V případě skupin neobsahujících FBS se buňky kultivované v médiu obsahujícím nižší koncentrace hPL (0F2.5L, 0F5L) shlukovaly do agregátů, což ukazuje na nevhodné kultivační podmínky.



Obrázek 10 Snímky z konfokální mikroskopie fibroblastů adherovaných na PCL nosiče 1., 7. a 10. den. Zelená barva charakterizuje buněčné membrány (barvení DiOC-6), červená barva značí jádra (barvení propidium jodid). Zvětšení 200x, měřítko 50  $\mu\text{m}$ . Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v), Y pro koncentraci hPL (v/v).

#### 7.1.1.4 Efekt hPL na keratinocyty

Velký nárůst v metabolické aktivitě byl detekován u skupin suplementovaných FBS i hPL od 3. do 7. dne (obrázek 11a). Nicméně, nebyl pozorován další nárůst v metabolické aktivitě 10. den. Skupiny suplementované pouze hPL vykazovaly na dávce závislé zvýšení metabolické aktivity a velké zvýšení od 7. do 10. dne. Buňky reagovaly dobře na kultivační podmínky a 7% koncentrace hPL (0F7L) se ukázala jako dostačující pro náhradu FBS.

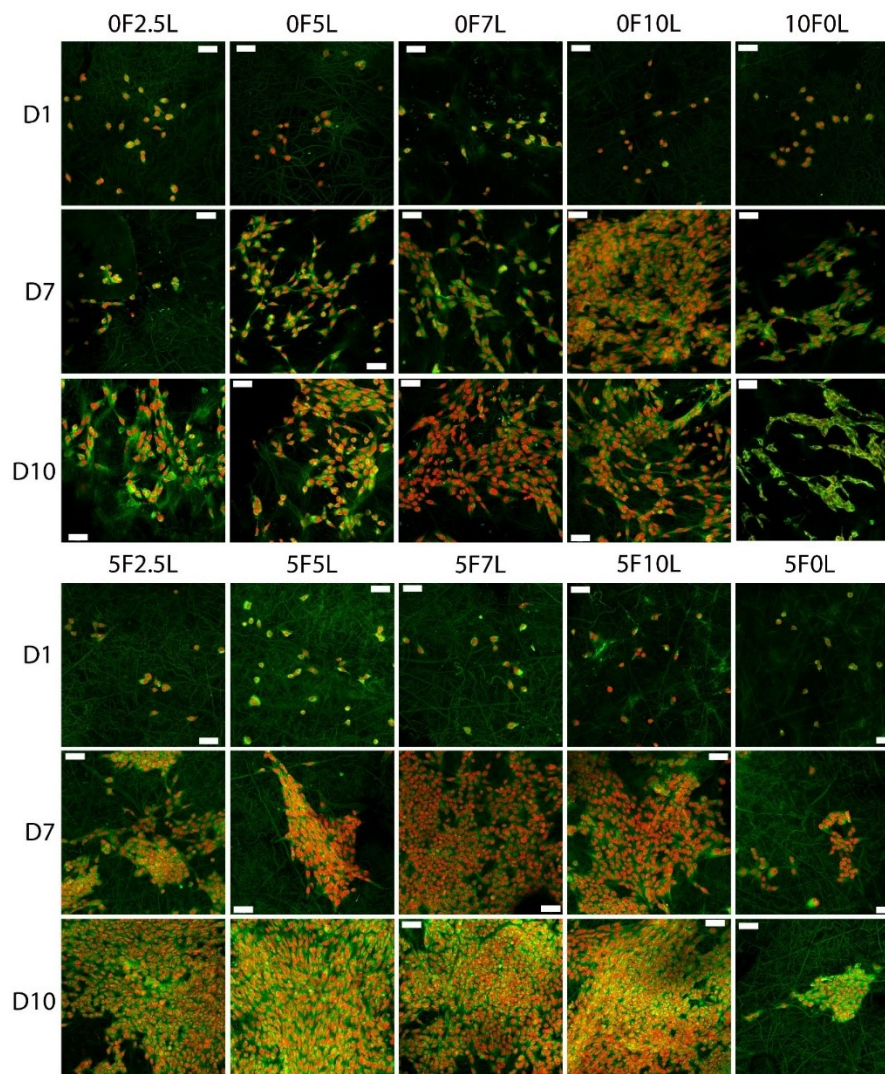


Obrázek 11 Metabolická aktivita a proliferace keratinocytů. (a)- Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu, (b)- proliferace fibroblastů byla měřena pomocí fluorescenčního kitu. Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v), Y pro koncentraci hPL (v/v). Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Množství DNA kontinuálně rostlo v průběhu experimentu (obrázek 11b). Nejvyšší obsah DNA byl dosažen ve skupině suplementované FBS a nejvyšší koncentrací hPL (5F10L). Navíc byly se zvýšením hPL ve skupinách 5F5L, 5F7L, 5F10L pozorovány statisticky významné rozdíly 7. den experimentu nejen oproti skupině suplementované 5% FBS, ale dokonce i ve skupině suplementované 10% FBS.

Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie ukázala téměř konfluentní vrstvy buněk ve skupinách obsahujících jak hPL, tak FBS (obrázek 12).





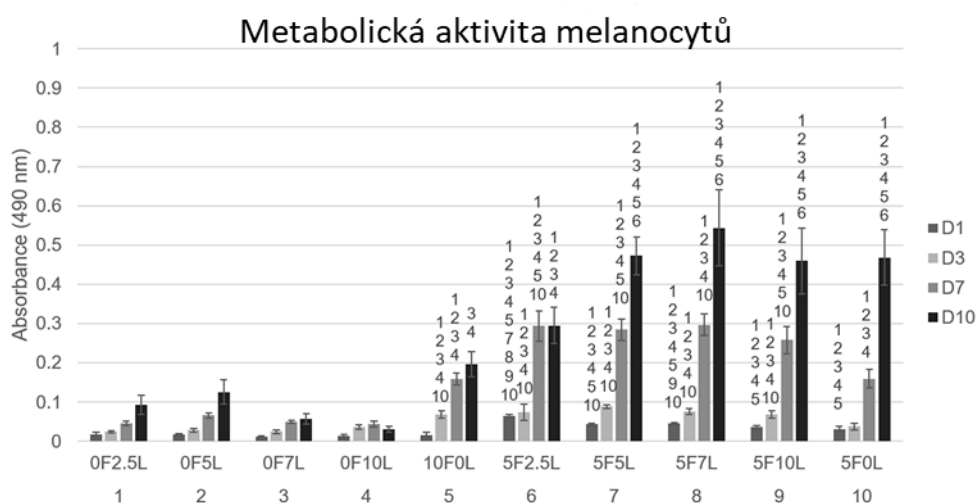
Obrázek 12 Snímky z konfokální mikroskopie fibroblastů adherovaných na PCL nosiče 1., 7. a 10. den. Zelená barva charakterizuje buněčné membrány (barvení DiOC-6), červená barva značí jádra (barvení propidium jodid). Zvětšení 200x, měřítko 50  $\mu\text{m}$ . Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v), Y pro koncentraci hPL (v/v).

Počet buněk kultivovaných v hPL se zvyšoval se zvyšující se koncentrací hPL. Přítomnost FBS stimulovala spojení buněk a buňky vytvářely velké shluky naznačující spíše stimulační efekt ve směsi suplementů.

#### 7.1.1.5 Efekt hPL na melanocyty

Metabolická aktivita melanocytů (obrázek 13) vykazovala nárůst od 1. do 10. dne experimentu, kromě skupiny suplementované pouze hPL (0F7L a 0F10L). Ve skupinách s hPL i FBS byla pozorována lepší iniciační adheze buněk. Navíc tyto skupiny měly v průběhu experimentu

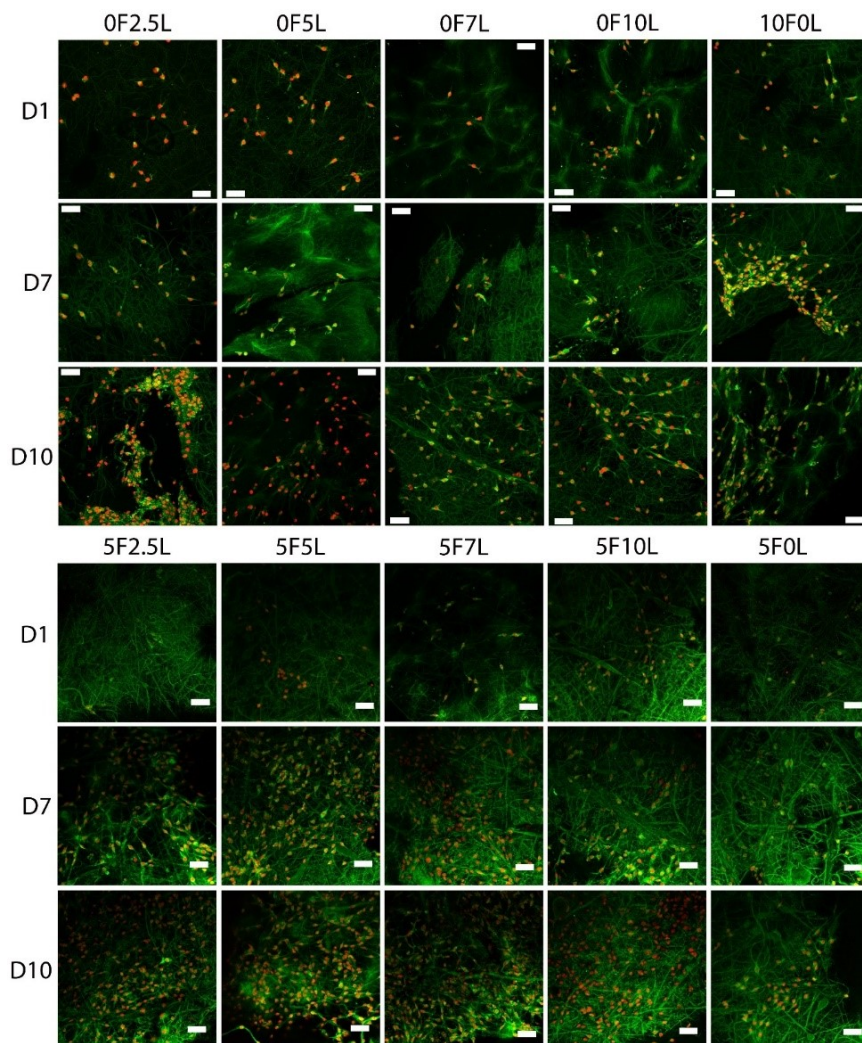
statisticky významně vyšší metabolickou aktivitu. Výsledky naznačují, že použití hPL samostatně bylo nedostatečné pro podporu adheze a viability melanocytů. Zajímavé bylo, že buňky kultivované v médiu se směsí suplementů měly vyšší metabolickou aktivitu než buňky v kontrolních skupinách (v průběhu celého experimentu než 5% FBS (5F0L) skupina, a 1., 3. a 7. den než 10% FBS (10F0L) skupina). Výsledky naznačují synergický efekt suplementů při kultivaci melanocytů.



Obrázek 13 Metabolická aktivita melanocytů. Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu. Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v); Y pro koncentraci hPL (v/v). Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

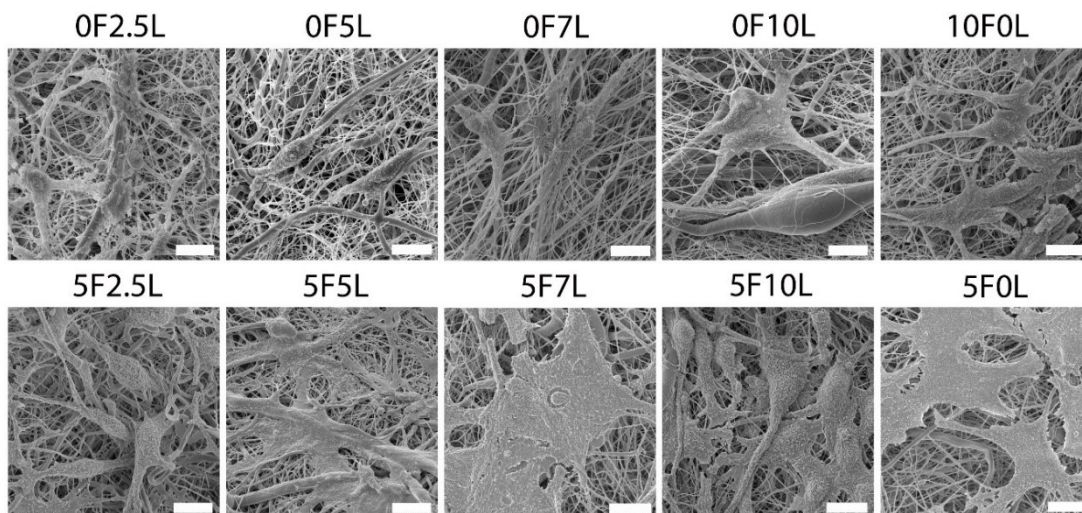
Konfokální mikroskopie byla použita pro zhodnocení morfologie a proliferace melanocytů, protože syntetizovaný melanin interferuje s fluorescenční sondou používanou pro stanovení proliferace. Melanocyty ve skupinách suplementovaných jak FBS tak hPL byly dobře rozprostřeny na nosičích (obrázek 14). V případě skupin suplementovaných pouze hPL se počet buněk během kultivace příliš nezvyšoval. Zvýšení nebylo závislé na dávce, a dokonce i nejnižší koncentrace (5F2.5L) vykazovala 7. a 10. den kultivace významně zvýšené počty buněk.





Obrázek 14 Snímky z konfokální mikroskopie fibroblastů adherovaných na PCL nosiče 1., 7. a 10. den. Zelená barva charakterizuje buněčné membrány (barvení DiOC-6), červená barva značí jádra (barvení propidium jodid). Zvětšení 200x, měřítko 50  $\mu\text{m}$ . Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v), Y pro koncentraci hPL (v/v).

Vizualizace melanocytů kultivovaných v hPL pomocí SEM vykazovala rozdílnou morfologii v porovnání s buňkami kultivovanými v FBS (obrázek 15). Bylo zajímavé, že buňky v médiích obsahujících pouze hPL byly spíše bipolární s delšími dendrity, zatímco melanocyty kultivované ve FBS vykazovaly klasickou morfologii. Melanocyty kultivované v hPL udržovaly svůj bipolární tvar bez ohledu na koncentraci hPL.



Obrázek 15 Vizualizace morfologie melanocytů pomocí SEM. Vzorky s nasazenými buňkami byly fixovány a dehydrovány 7. den experimentu. Zvětšení 5 000x, měřítko 10  $\mu\text{m}$ . Názvy skupin (XFYL) kódují koncentrace suplementů v médiu; X pro koncentraci FBS (v/v), Y pro koncentraci hPL (v/v).

### 7.1.2 Diskuze

Nové přístupy ke kultivaci buněk in vitro se zaměřením na napodobování přirozených in vivo podmínek jsou potřebné napříč biomedicínskými obory. Používání FBS je dobře přijímanou rutinní praxí v buněčných a tkáňových kulturách, zejména kvůli vysokému obsahu růstových stimulantů a nízké hladině inhibitorů<sup>177,178</sup>. Existuje mnoho důvodů, proč je použití FBS jako suplementu pro buněčnou kulturu pro terapeutické účely omezené, a proto jsou potřeba kultivační systémy bez xenogenních přísad.

Trombocytární lyzát patří k nejslibnějším náhradám FBS. Byl již použit jako alternativa k FBS pro MSC<sup>74,179</sup>, stejně jako u myofibroblastové kultury odvozené ze skryté žíly (safény)<sup>180</sup> a fibroblastů<sup>181</sup>. Byly detekovány vyšší úrovně proteinů, které se podílely na opravě tkáně a remodelaci kolagenu<sup>180</sup>. V posledním desetiletí byl hPL stále častěji užíván v klinických studiích založených na použití MSC<sup>67</sup>. Jeho příprava překonává krátkou životnost PRP. Rauch a kol. zvolili EGF jako ukazatel dlouhodobé stability. Výsledky ukázaly, že hPL je stabilní nejméně pět měsíců při teplotě - 20 °C<sup>178</sup>. Horn a kol. porovnávali vliv jednotlivých hPL na proliferaci MSC. Pozorovali významné

rozdíly v proliferaci MSC u hPL od jednotlivých pacientů<sup>182</sup>. Abychom snížili dárcovskou variabilitu, připravili jsme dávku destičkového lyzátu ze 16 dárců. Přípravné protokoly se však v jednotlivých laboratořích stále liší.

V této studii byl hPL připraven cykly zmrazení/rozmrazení a potom byl přidán do kultivačního média s FBS nebo bez FBS v různých koncentracích. K nalezení optimálního složení kultivačních suplementů byly koncentrace destičkových lyzátů testovány na kožních buňkách (keratinocyty, fibroblasty a melanocyty) kultivovaných na PCL nanovláčkách.

Koncentrace bioaktivních molekul obsažených v hPL byly stanoveny s použitím systému Bio-Plex. Mussano a kol. využíval flexibilní systém Bio-Plex pro analýzu více bioaktivních faktorů v PRP<sup>183</sup>.

Rovnováha mezi pro- a protizánětlivými cytokiny, chemokiny a růstovými faktory je zásadní pro přesnou regulaci fyziologického hojení a správnou funkci buněk. Analýza ukázala, že ve skupině analyzovaných protizánětlivých cytokinů byl IL-1ra přítomen v nejvyšší koncentraci. Nedostatek IL-1ra vede k prodlouženému zánětu a zpomaluje proces hojení ran<sup>184</sup>. Prozánětlivé proteiny IL-1b a IL-6 byly v nízké koncentraci v hPL. IL-17 zprostředkovává prozánětlivé reakce, což přispívá k náboru neutrofilů a monocytů. IL-17 byl nalezen v relativně vysoké koncentraci v našem vzorku. Nedávné studie předpokládají, že IL-17, odvozený od vrozených a adaptivních zdrojů, může působit proti různým patogenům v různých fázích a místech infekce, což poukazuje na složitost imunitní odpovědi<sup>185</sup>. Bylo zjištěno, že IL-17 a TNF modulují expresi melanocytových mitogenů (CXCL1, IL-8, IL-6, CXCL2, CXCL3 nebo z mozku odvozený neutrofický faktor (BDNF)), které mohou podporovat proliferaci a růst melanocytů<sup>186</sup>.

Po vyhodnocení výsledků se objevily úvahy spojené se získanou vysokou koncentrací RANTES. RANTES je chemokin, který chemotakticky působí na mnoho různých typů buněk<sup>187</sup> a

hraje zásadní roli při zrychlení regeneračních procesů. RANTES hraje aktivní roli při náboru T-buněk, eozinofilů, bazofilů a při aktivaci NK buněk v místě zánětu. Nicméně vysoká koncentrace RANTES byla měřena nejen v našem hPL, ale také v PRP<sup>183,188</sup>.

Růstové faktory nezbytné pro stimulaci proliferace kožních buněk a produkci mezibuněčné hmoty (ECM) byly v hPL přítomny ve vysokých koncentracích. PDGF-bb, který hraje důležitou roli při hojení ran, reepitelizaci a remodelaci tkáně<sup>54</sup>, byl nalezen v našem vzorku v nejvyšší koncentraci. EGF (koncentrace vyšší než 500 pg/ml) je silným mitogenem pro keratinocyty a zvyšuje jejich migraci v akutních ranách<sup>189</sup>. Během angiogeneze mohou endoteliální buňky proliferovat, což je stimulováno vaskulárním endotelovým růstovým faktorem (VEGF), IL-8 a eotaxinem<sup>190,191</sup>. Další detekované proteiny, které se podílely na regulaci angiogeneze, reepitelizaci a tvorby granulační tkáně, byly HGF a bFGF<sup>192</sup>.

Různé složení FBS a PL je odpovědné za různou biologickou reakci během buněčné kultivace. Interakce proteinů s biomateriály hraje rozhodující roli při adsorpci bílkovin. Bylo například prokázáno, že BSA se přednostně váže na kationtové povrchy<sup>193</sup>. Následná interakce s proteiny ECM buněk může regulovat biologickou odpověď a tím i osud buněk na různých substrátech<sup>194</sup>. Rozdíl v složení bílkovin může také ovlivňovat buněčné chování pomocí signalizačních molekul. Lyzát trombocytů je směs více signálních molekul ve vysoké koncentraci. Proteomická analýza FBS ukázala, že obsahuje převážně sérový albumin a další molekuly, jako je plazminogen a alfa-1 antitrypsin. Kromě toho jsou jiné proteiny přítomny při mnohem nižších koncentracích<sup>177</sup>.

Účinek různých suplementů byl pozorován v kultuře fibroblastů. Výsledky naší studie naznačují, že koncentrace hPL nad 7% (v/v) zlepšila životaschopnost a proliferaci buněk a byla dostatečná k nahrazení FBS. Na druhé straně se zdá, že PL v kombinaci s FBS má spíše inhibiční účinek na kultivované fibroblasty. Witzeneder a kol. zkoumali účinek různých koncentrací hPL v

bezsérovém médiu ve srovnání s médiem doplněným o FBS na expanzi fibroblastů<sup>195</sup>. Potvrdili, že přisednutí buněk na kultivační plast bylo u FBS rychlejší, ale doba zdvojnásobení populace byla delší než v médiu doplněném PL. Ranzato a kol. přidávali hPL v různých koncentracích do média obsahujícího FBS a média bez FBS. Necytotoxický a metabolický účinek hPL byl potvrzen na dávce závislým způsobem a kromě toho stimulační vliv na mitochondriální aktivitu byl ještě výraznější v médiu bez FBS<sup>196</sup>. Naše údaje potvrzují dávkově závislý efekt hPL v obou typech média na proliferaci fibroblastů. Pozitivní účinek hPL v bezsérovém médiu vzrostl se stoupajícími koncentracemi až na 10% (v/v), zatímco zvýšené dávky lidského hPL v médiu obsahujícím FBS způsobily pokles metabolické aktivity buněk.

Studie vlivu na kulturu keratinocytů naznačuje, že bioaktivní látky uvolněné z hPL pozitivně ovlivnily proliferaci a viabilitu buněk. Pozitivní, na dávce závislý účinek hPL na buněčnou proliferaci byl pozorován u obou typů médií, nicméně všechny koncentrace od 5% do 10% (v/v) hPL média bez séra byly schopné nahradit FBS v kultuře keratinocytů. Stimulační účinek byl závislý na dávce, což bylo v souladu se zjištěními Stessuka a kol., kteří kultivovali primární lidské keratinocyty s různými koncentracemi PRP. Nejlepší míra proliferace byla dosažena použitím 10% PRP<sup>197</sup>. Na rozdíl od růstu fibroblastů jsme zaznamenali pozitivní korelaci závislou na dávce v médiu s kombinací obou doplňků.

V současné době je málo známo o vlivu krevních destiček na melanocyty. V současné studii hPL stimuloval růst melanocytů v kombinaci s FBS na dávce závislým způsobem, zatímco samotný hPL významně nepodporoval proliferaci. Melanocyty kultivované na PCL nosičích syntetizovaly melanin, který absorboval excitační vlnovou délku (485 nm) fluorescenčního kitu pro stanovení proliferace, a tak ovlivňoval měření obsahu DNA. Proto byla pro stanovení proliferace melanocytů použita konfokální mikroskopie. Zajímavé je, že v hPL-obohaceném médiu byla pozorována odlišná morfologie melanocytů. V přítomnosti hPL byly buňky bipolární a s delšími dendrity v porovnání s

kontrolní skupinou obsahující pouze FBS. Bylo zjištěno, že PDGF-bb stimuluje melanogenezi, dendritogenezi a diferenciaci lidských melanocytů, zatímco inhibuje jejich proliferaci v koncentracích vyšších než 0,01 ng/ml<sup>198</sup>. Bioplexová analýza hPL ukázala vysokou koncentraci PDGF-bb. V FBS však nebyla koncentrace PDGF-bb dosud určena, a proto tento fenomén potřebuje další zkoumání.

Vývoj nanovláknenných nosičů, které napodobují ECM z hlediska chemické a fyzikální struktury, zvýšil možnost konstrukce nosiče, který by mohl nahradit kultivaci buněk na 2D kultivačním plastu. Dále by mohly být nanovláknenné nosiče funkcionalizovány buňkami a/nebo bioaktivními molekulami, aby indukovaly, urychlily a/nebo zlepšovaly tvorbu tkání<sup>199</sup>. Jako optimální substrát pro kultivaci fibroblastů, keratinocytů a melanocytů byla vybrána PCL nanovláknna připravená elektrostatickým zvlákněním. PCL je znám jako netoxický, biokompatibilní materiál pro podporu růstu, proliferace a diferenciaci různých typů buněk včetně fibroblastů, MSC a keratinocytů<sup>150,200–203</sup>.

Rozšířili jsme výsledky našich předchozích experimentů, kde byly úspěšně použity nano-/mikrovláknenné PCL nosiče jako nosiče pro fibroblasty<sup>175,199</sup>, melanocyty<sup>199</sup>, keratinocyty<sup>199</sup>, chondrocyty<sup>204</sup> a MSC<sup>205,206</sup>. V předchozích studiích jsme se zaměřili na funkcionalizaci vláken pomocí trombocytů. Současná studie rozšiřuje zjištění ze všech uvedených studií na oblast buněčné kultivace *in vitro*. Vyvinuli jsme systém založený na kombinaci PCL nanovláken jako nosiče a destičkových lyzátů jako náhrady za FBS, který může napodobit přirozené buněčné mikroprostředí.

### 7.1.3 Závěr

Trombocyty jsou oblíbeným zdrojem růstových faktorů pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Cílem studie bylo ověřit použití trombocytárního lyzátu jako náhrady FBS pro kultivaci dermálních buněk. Obsah bioaktivních mediátorů v trombocytárním lyzátu byl sledován použitím systému Bio-Plex. Buňky (fibroblasty, melanocyty, keratinocyty) byly kultivovány na nanovláknenných PCL

nosičích, které napodobovaly jejich přirozené mikroprostředí. Trombocytární lyzát byl přidáván do media samostatně nebo v kombinaci s FBS. Výsledky ukázaly, že 7% (v/v) trombocytární lyzát byl dostačující pro nahrazení 10% (v/v) FBS v kultuře fibroblastů a keratinocytů. Kombinace hPL a FBS měla na fibroblasty spíše inhibiční efekt n rozdíl od keratinocytů, kde byl efekt synergický. Trombocytární lyzát dostatečně nepodporoval proliferaci melanocytů, nicméně kombinace FBS a hPL poskytla lepší výsledky a vedla k bipolární morfologii kultivovaných melanocytů. Data naznačují, že hPL zlepšuje buněčnou proliferaci a metabolickou aktivitu a může být použit jako aditivum do kultivačního media.

## **7.2 Nanovláknenné nosiče z polykaprolaktonu s adherovanými trombocyty stimulují proliferaci dermálních buněk**

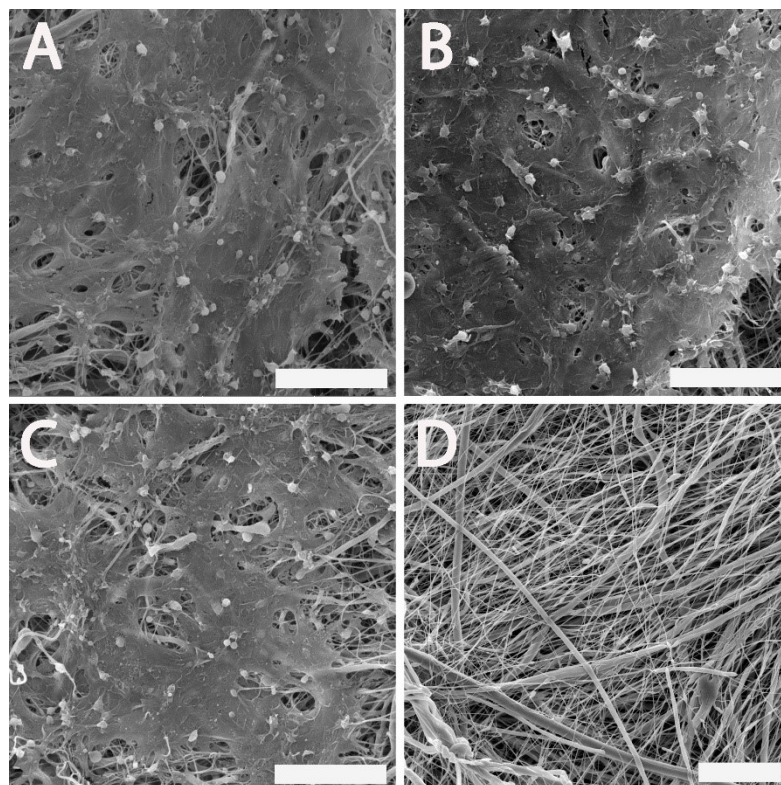
Cílem studie bylo vyvinout systém řízeného dodávání látek, který by sloužil jako krytí pro hojení ran. PCL nanovláknena byla vybrána jako nosič. Nosič byl funkcionalizován třemi koncentracemi imobilizovaných trombocytů (C1-C3). Jejich efektivita byla testována *in vitro* s použitím fibroblastů, keratinocytů a melanocytů.

### **7.2.1 Výsledky**

#### **7.2.1.1 Charakterizace nosičů**

Architektura připravených nosičů byla hodnocena pomocí SEM (obrázek 16). Vzorky vykazovaly strukturu typickou pro PCL nanovláknena. Analýza ukázala nano-/mikroarchitekturu s minimem nevláknenných defektů. Střední průměr tenké vláknenné frakce byl  $241,6 \pm 90,6$  nm, silnější vlákna měla střední průměr  $748 \pm 147,4$  nm. Méně zastoupená mikrovláknenná frakce měla střední průměr  $1\,486,8 \pm 419,1$  nm. Střední velikost pórů byla  $10,28 \pm 12,1$   $\mu\text{m}^2$ . Na nosičích funkcionalizovaných trombocyty byly trombocyty kontaktem s nanotopografií povrchu nosiče aktivovány, čímž změnilly svoji morfologii. Navíc byla na těchto nosičích pozorována silná fibrinová vrstva.

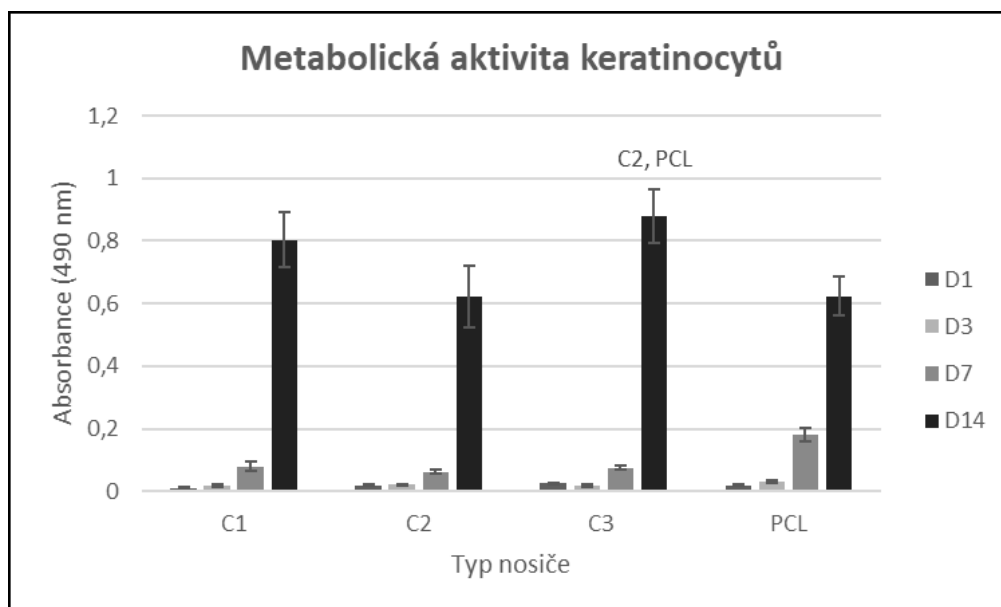




Obrázek 16 SEM snímky nanovláknenných nosičů. (a) C1 nosič (PCL nosič funkcionalizovaný maximální koncentrací trombocytů, měřítko 20  $\mu\text{m}$ , zvětšení 4000x). (b) C2 nosič (PCL s polovinou maximální koncentrace trombocytů, měřítko 20  $\mu\text{m}$ , zvětšení 4000x). (c) C3 nosič (PCL se čtvrtinou maximální koncentrace trombocytů, měřítko 20  $\mu\text{m}$ , zvětšení 4000x). (d) PCL kontrolní nosič (měřítko 20  $\mu\text{m}$ , zvětšení 4000x).

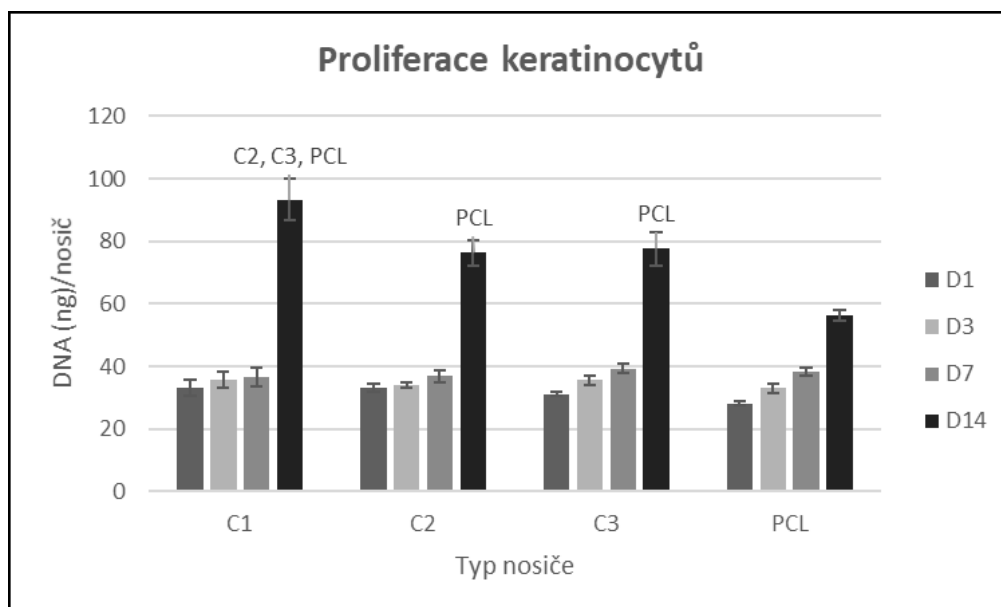
### 7.2.1.2 Keratinocyty

Pro testování biokompatibility nosičů byla sledována metabolická aktivita buněk nasazených na funkcionalizované nosiče. Obrázek 17 ukazuje metabolickou aktivitu keratinocytů. Během experimentu nebyl vidět jasný trend v naměřených datech. 14. den experimentu byla metabolická aktivita keratinocytů statisticky významně vyšší na vzorcích C3 v porovnání s PCL kontrolou ( $p < 0,05$ ).



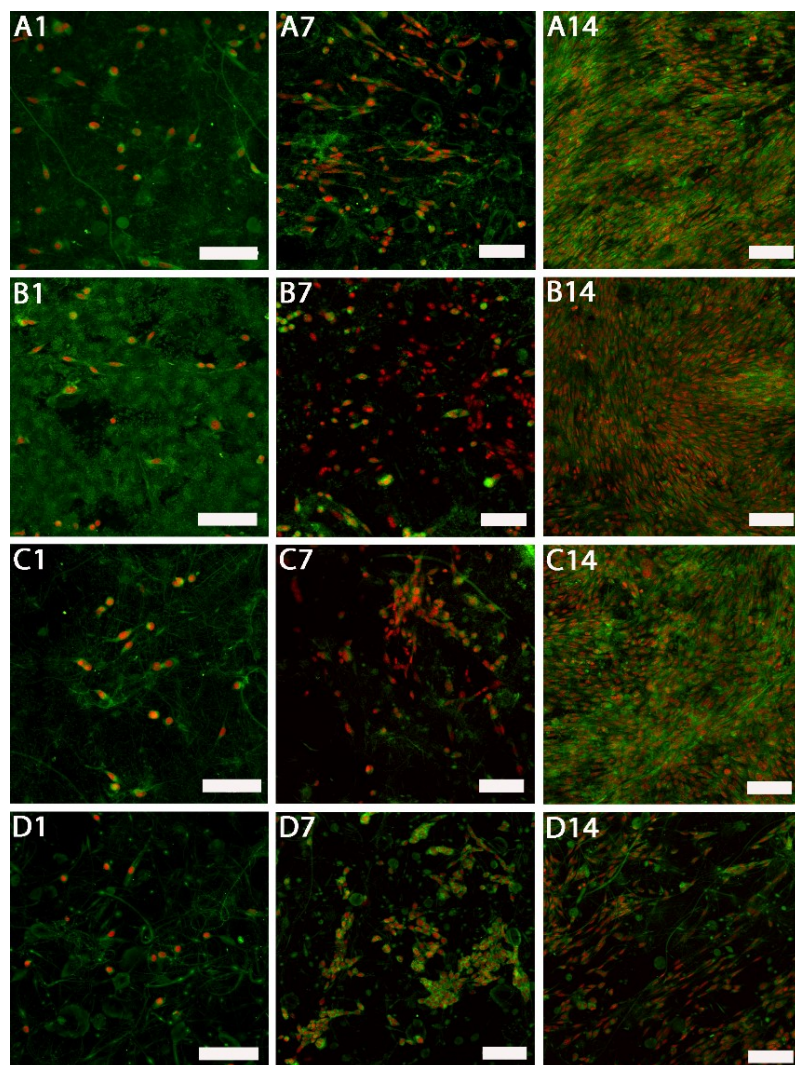
Obrázek 17 Metabolická aktivita keratinocytů měřená pomocí MTS testu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

Proliferace keratinocytů je ukázána na obrázku 18. Do 14. dne experimentu nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi vzorky. 14. den vykazovaly vzorky obsahující trombocyty významný nárůst v buněčné proliferaci v porovnání se vzorky PCL. Mezi vzorky s adhezaními trombocyty byly statisticky významné rozdíly. Na vzorku C1 bylo množství syntetizované DNA signifikantně větší v porovnání se vzorky C2 a C3.



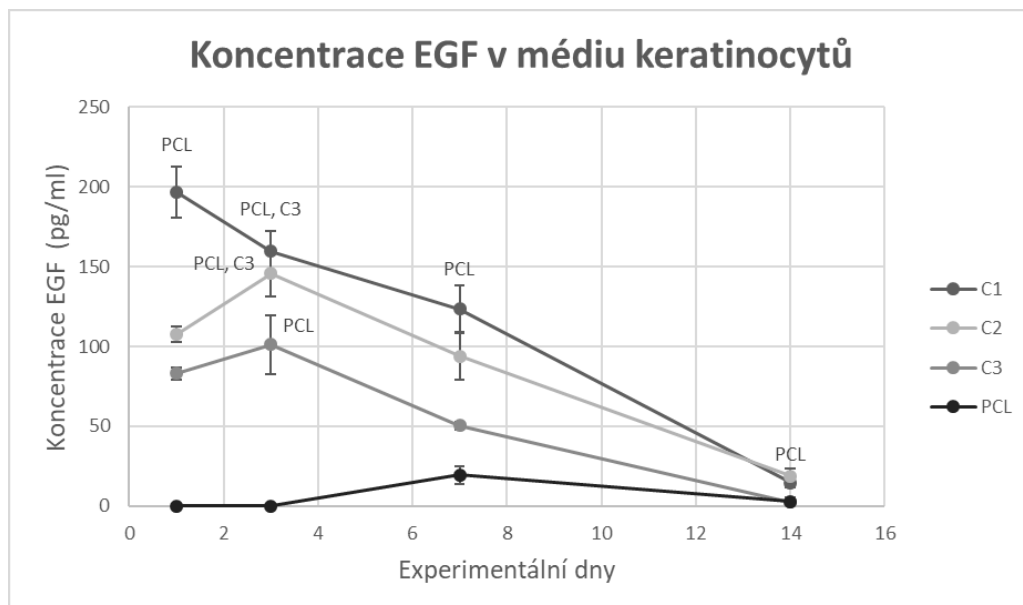
Obrázek 18 Proliferace keratinocytů byla měřena pomocí fluorescenčního kitu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

Keratinocyty nasazené na nosič byly vizualizovány pomocí konfokální mikroskopie ve dnech 1,7 a 14 (obrázek 19). 14. den byly keratinocyty konfluentní na všech vzorcích obsahujících trombocyty, naopak u vzorků PCL nebyl pozorován dramatický nárůst mezi 7. a 14. dnem experimentu.



Obrázek 19 Snímky z konfokálního mikroskopu keratinocytů kultivovaných na nosičích funkcionalizovaných trombocyty a PCL kontrolách. Buněčné membrány byly barveny DiOC-6 (zelená barva), buněčná jádra byla barvena propidium jodidem (červená barva). A1-keratinocyty kultivované na C1 nosičích 1. den. A7-keratinocyty kultivované na C1 nosičích 7. den. A14-keratinocyty kultivované na C1 nosičích 14. den. B1-keratinocyty kultivované na C2 nosičích 1.den. B7-keratinocyty kultivované na C2 nosičích 7. den. B14-keratinocyty kultivované na C2 nosičích 14.den. C1-keratinocyty kultivované na C3 nosičích 1.den. C7-keratinocyty kultivované na C3 nosičích 7. den. C14-keratinocyty kultivované na C3 nosičích 14.den. D1-keratinocyty kultivované na PCL nosičích 1. den. D7-keratinocyty kultivované na PCL nosičích 7. den. D14-keratinocyty kultivované na PCL nosičích 14. den. A1, B1, C1, D1 – měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x. A7, A14, B7, B14, C7, C14, D7, D14 – měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 150x.

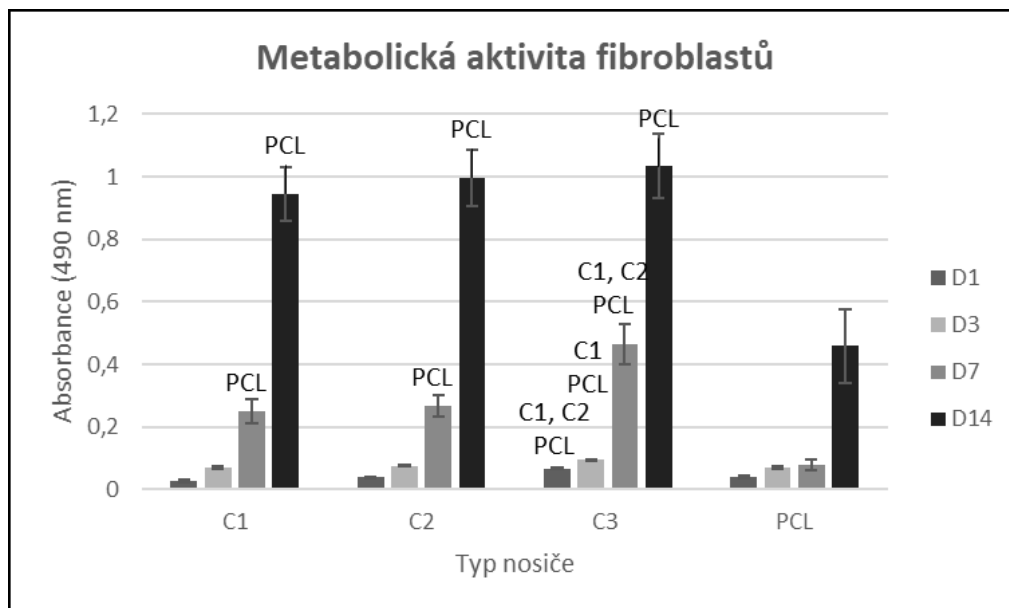
Koncentrace uvolněného EGF byla hodnocena pomocí ELISA testu z odebíraného media (obrázek 20). Na počátku experiment byla nejvyšší koncentrace EGF ve vzorku C1. Koncentrace EGF byla odpovídajícím způsobem nižší ve vzorcích C2 a C3. Během experimentu koncentrace EGF postupně vzrůstala. Na PCL kontrolním vzorku byla syntéza EGF keratinocyty zjištěna 7. den experimentu.



Obrázek 20 Koncentrace EGF v médiu keratinocytů hodnoceno pomocí ELISA testu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

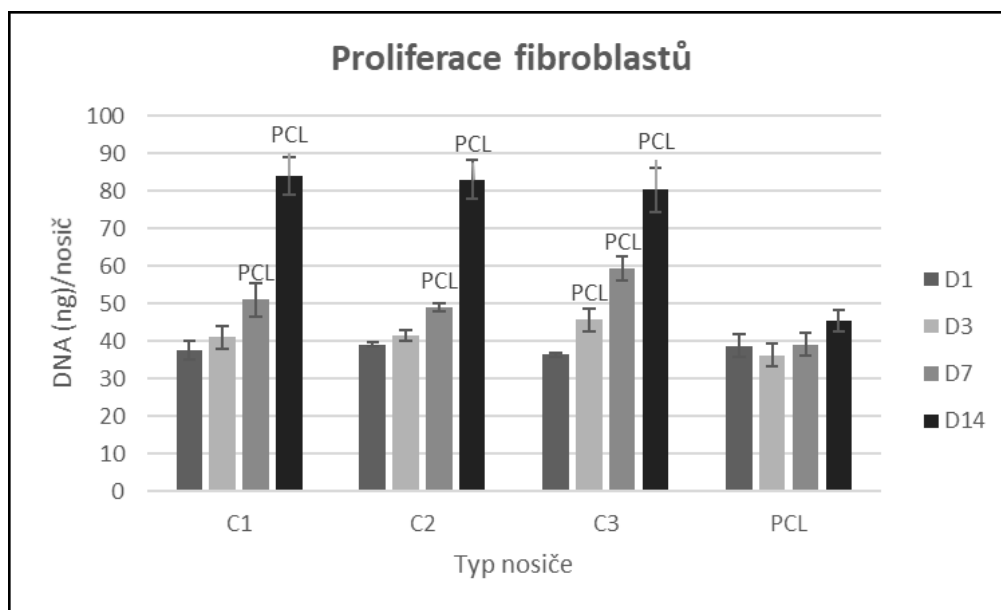
### 7.2.1.3 Fibroblasty

Metabolická aktivita fibroblastů nasazených na trombocyty-funkcionalizovaných nosičích je ukázána na obrázku 21. Během celého experimentu byla metabolická aktivita fibroblastů na vzorku C3 signifikantně vyšší v porovnání s PCL vzorky. Navíc, 1., 3. a 7. den byla metabolická aktivita fibroblastů na vzorku C3 statisticky významně vyšší než metabolická aktivita na nosičích C1 a C2. Od 7. dne se metabolická aktivita buněk na vzorcích C1-3 významně zvýšila ve srovnání s kontrolou PCL. 14. den nebyly statisticky významné rozdíly v metabolické aktivitě buněk na nosičích funkcionalizovaných trombocyty.



Obrázek 21 Metabolická aktivita fibroblastů měřená pomocí MTS testu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

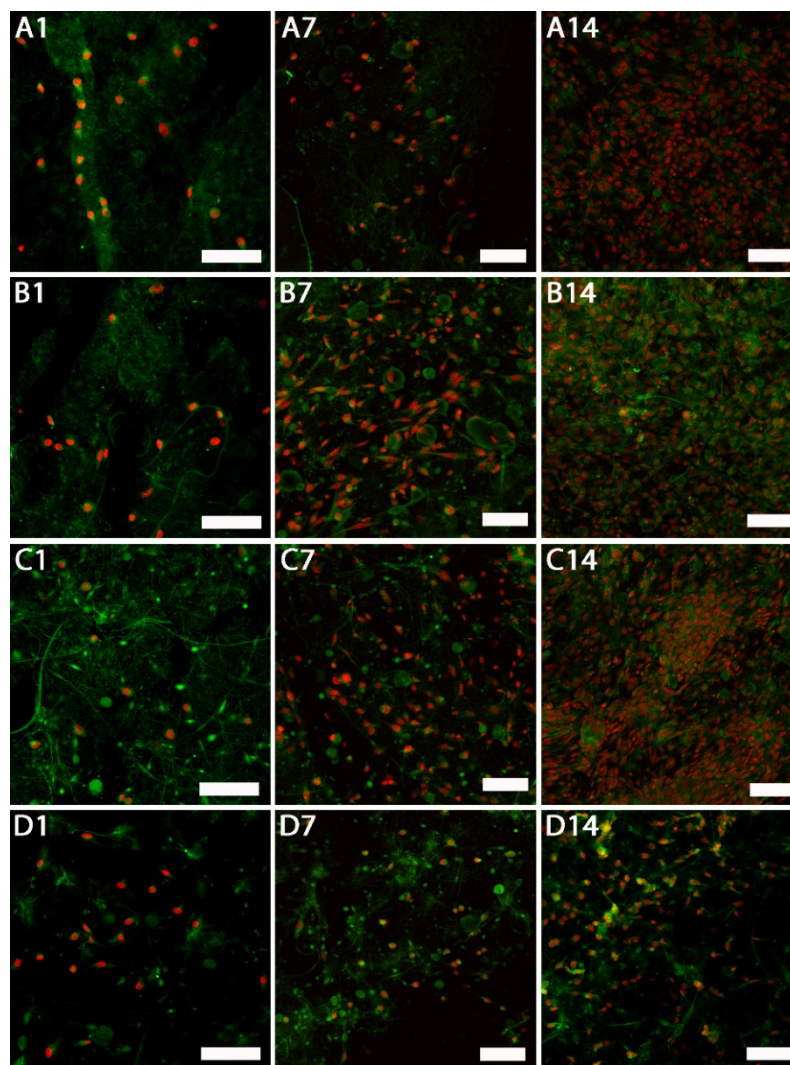
Proliferace fibroblastů (obrázek 22) byla hodnocena 1., 3., 7. a 14. den experimentu. Do 7. dne nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v množství syntetizované DNA mezi vzorky s trombocyty a kontrolou. 7. a 14. den bylo pozorováno statisticky významně větší množství DNA na nosičích s trombocyty v porovnání s kontrolním vzorkem. Mezi skupinami s trombocyty nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.



Obrázek 22 Proliferace fibroblastů byla měřena pomocí fluorescenčního kitu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

Vizualizace fibroblastů je zobrazena na obrázku 23. 14. den byla vrstva fibroblastů na vzorcích s imobilizovanými trombocyty konfluentní na rozdíl od kontrolních vzorků. Nebyly viditelné významné rozdíly mezi vzorky s trombocyty.

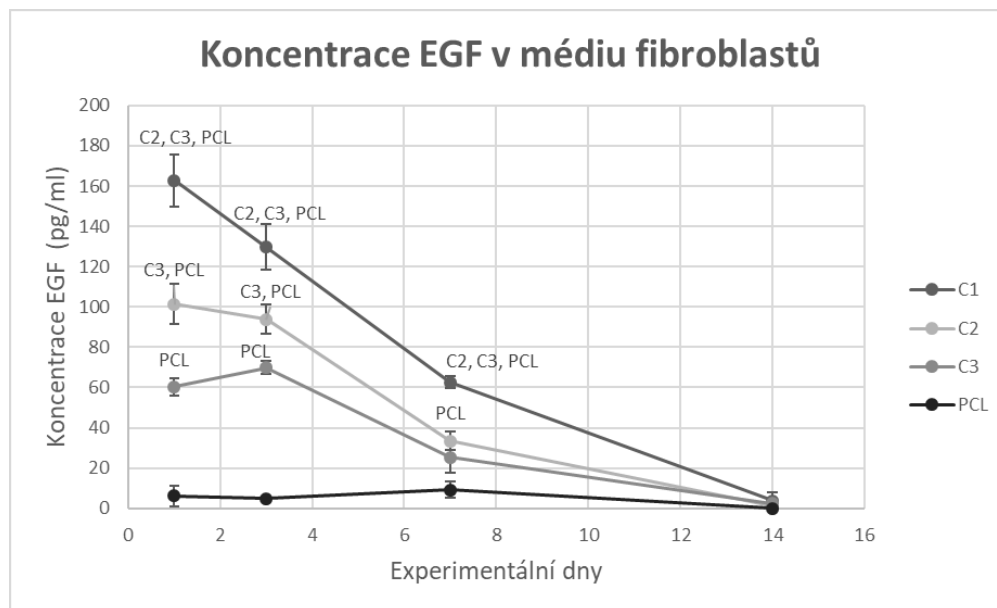




Obrázek 23 Snímky z konfokálního mikroskopu fibroblastů kultivovaných na nosičích funkcionalizovaných trombocyty a PCL kontrolách. Buněčné membrány byly barveny DiOC-6(3) (zelená barva), buněčná jádra byla barvena propidium jodidem (červená barva). A1-fibroblasty kultivované na C1 nosičích 1. den. A7-fibroblasty kultivované na C1 nosičích 7. den. A14-fibroblasty kultivované na C1 nosičích 14. den. B1-fibroblasty kultivované na C2 nosičích 1. den. B7-fibroblasty kultivované na C2 nosičích 7.den. B14-fibroblasty kultivované na C2 nosičích 14.den. C1-fibroblasty kultivované na C3 nosičích 1.den. C7-fibroblasty kultivované na C3 nosičích 7. den. C14-fibroblasty kultivované na C3 nosičích 14. den. D1-fibroblasty kultivované na PCL nosičích 1 .den. D7-fibroblasty kultivované na PCL nosičích 7.den. D14-fibroblasty kultivované na PCL nosičích 14. den. A1, B1, C1, D1 – měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x. A7, A14, B7, B14, C7, C14, D7, D14 – měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 150x.

Množství EGF uvolněného do kultivačního média fibroblastů bylo hodnoceno v experimentálních dnech použitím ELISA testu (obrázek 24). Mezi vzorky s trombocyty byly statisticky významné rozdíly korespondující s koncentrací trombocytů. V průběhu experimentu koncentrace EGF v médiu postupně klesala. Na kontrolních vzorcích byla pozorována syntéza EGF fibroblasty, nicméně množství detekované v kontrolních vzorcích bylo signifikantně nižší než množství EGF uvolněného z trombocytů na funkcionalizovaných nosičích.

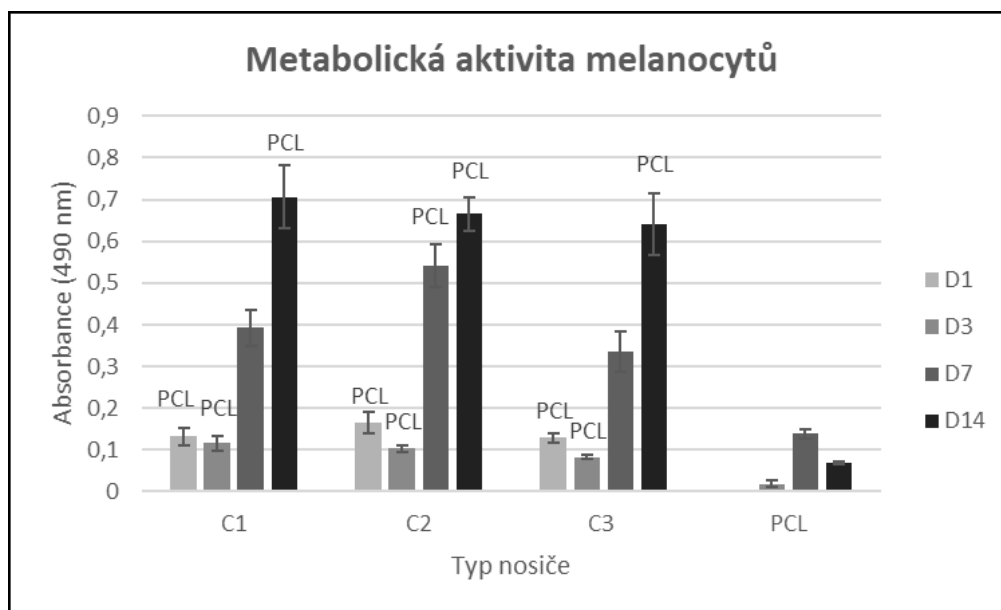




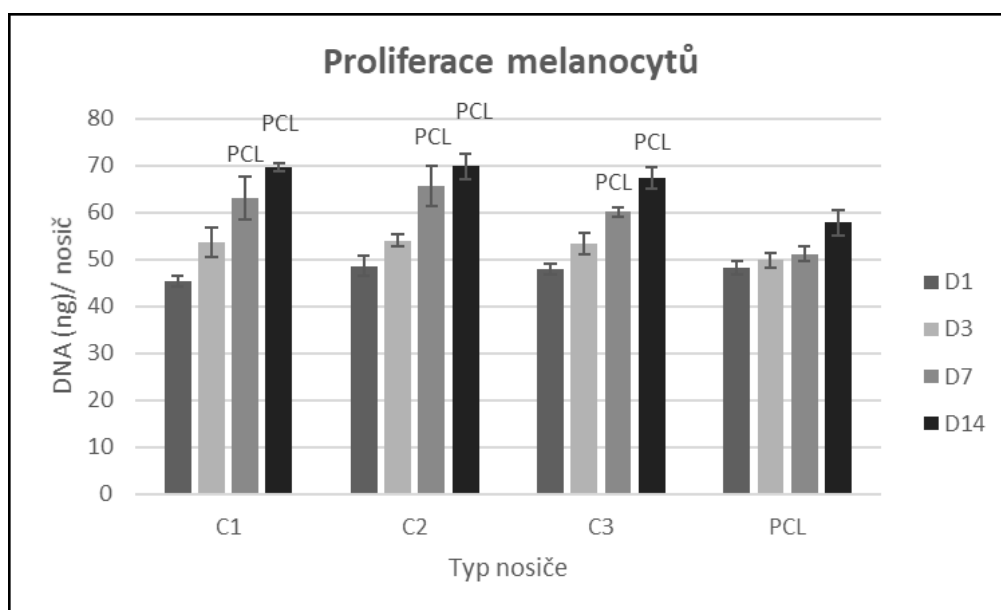
Obrázek 24 Koncentrace EGF v médiu fibroblastů hodnoceno pomocí ELISA testu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

#### 7.2.1.4 Melanocyty

Metabolická aktivita melanocytů je ukázána na obrázku 25. Během celého experimentu byla metabolická aktivita na funkcionalizovaných nosičích signifikantně vyšší v porovnání s kontrolními PCL nosiči. Mezi funkcionalizovanými nosiči nebyly statisticky významné rozdíly. Množství DNA syntetizované melanocyty je ukázáno na obrázku 26. Data ukázala, že proliferace melanocytů stoupala během celého experimentu. Trombocyty významně podporovaly proliferaci melanocytů na trombocyty-funcionalizovaných nosičích ode dne 7 v porovnání s PCL kontrolou. Mezi funkcionalizovanými nosiči nebyly pozorovány významné rozdíly.

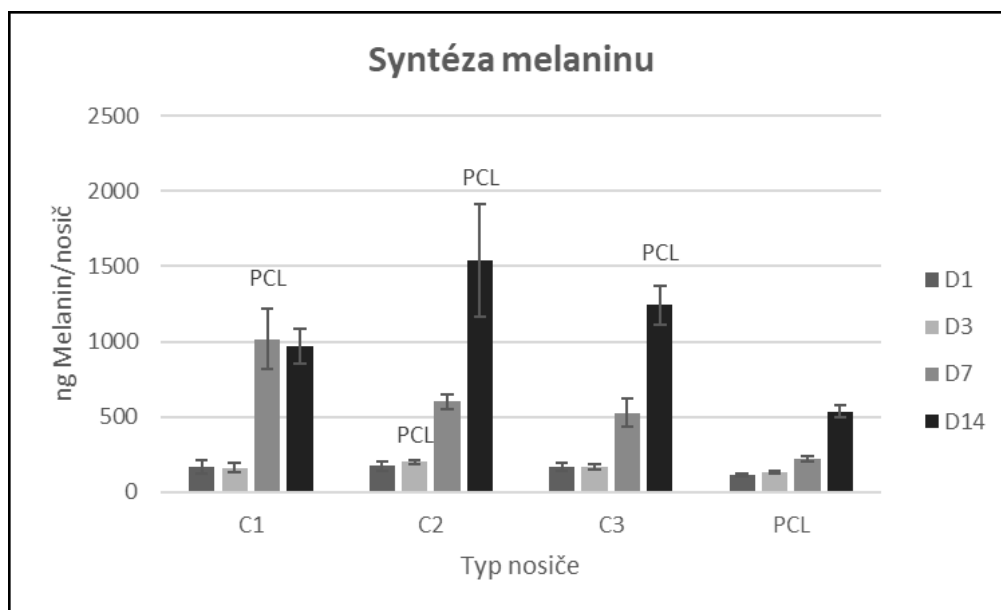


Obrázek 25 Metabolická aktivita melanocytů měřená pomocí MTS testu (statistická analýza  $p < 0,05$ )



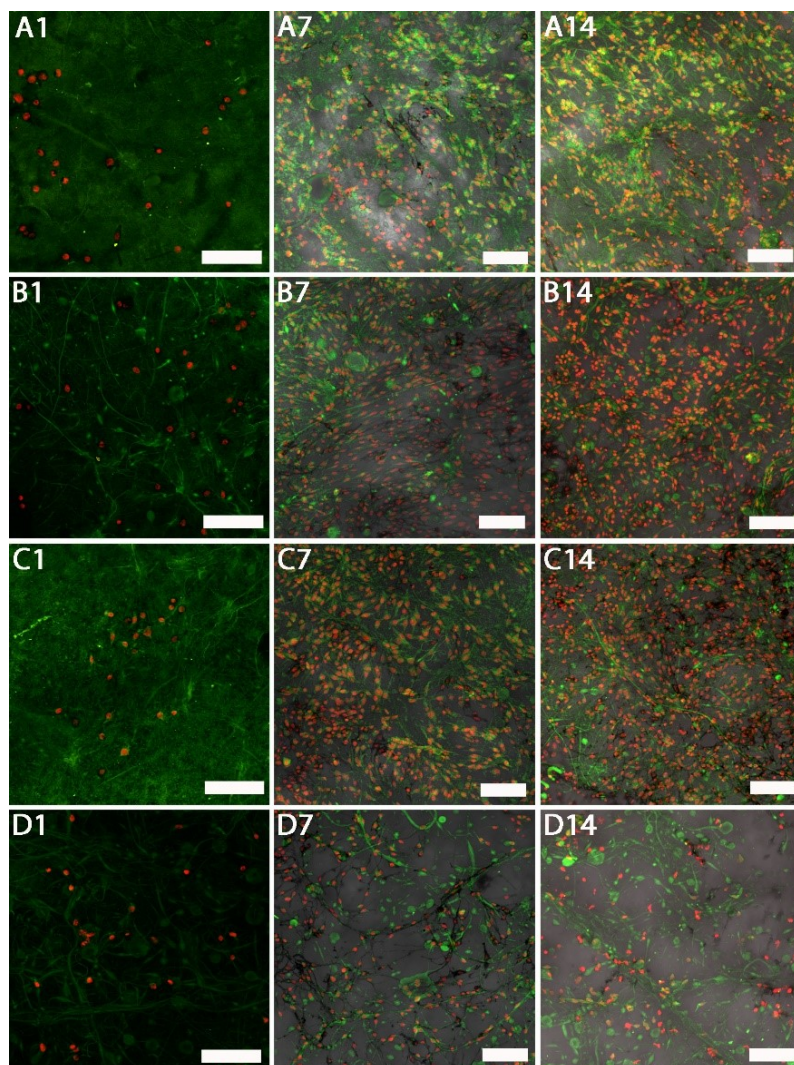
Obrázek 26 Proliferace melanocytů byla měřena pomocí fluorescenčního kitu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

Množství melaninu syntetizovaného melanocyty na nanovlákněných nosičích vzrůstalo během celého experimentu. 7.den bylo množství melaninu signifikantně vyšší na vzorku C1 v porovnání s PCL kontrolou. 14. den bylo množství syntetizovaného melaninu signifikantně vyšší na vzorcích C2 a C3 v porovnání s PCL kontrolou.



Obrázek 27 Syntéza melaninu na nosičích detekována pomocí NaOH testu (statistická analýza  $p < 0,05$ ).

Obrázek 26 ukazuje proliferaci melanocytů během experimentu. Počet melanocytů se na nosičích s trombocyty zvyšovala mezi dny 1 a 7. 7. den byla vrstva melanocytů téměř konfluentní a 14. den nejsou pozorovány statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Kontrolní skupina vykazovala stejný trend, ale celkový počet buněk byl signifikantně nižší než na funkcionalizovaných nosičích a buněčná vrstva nebyla konfluentní dokonce ani 14. den experimentu. Na nosičích byl pozorován syntetizovaný melanin (obrázek 27). Melanin je znázorněn černou barvou v konfokálních snímcích sloučených se snímky v procházejícím viditelném světle (obrázek 28).



Obrázek 28 Snímky z konfokálního mikroskopu melanocytů kultivovaných na nosičích funkcionalizovaných trombocyty a PCL kontrolách. Buněčné membrány byly barveny DiOC-6(3) (zelená barva), buněčná jádra byla barvena propidium jodidem (červená barva). A1-melanocyty kultivované na C1 nosičích 1. den. A7-melanocyty kultivované na C1 nosičích 7. den. A14-melanocyty kultivované na C1 nosičích 14. den. B1-melanocyty kultivované na C2 nosičích 1. den. B7-melanocyty kultivované na C2 nosičích 7. den. B14-melanocyty kultivované na C2 nosičích 14. den. C1-melanocyty kultivované na C3 nosičích 1. den. C7-melanocyty kultivované na C3 nosičích 7. den. C14-melanocyty kultivované na C3 nosičích 14. den. D1-melanocyty kultivované na PCL nosičích 1. den. D7-melanocyty kultivované na PCL nosičích 7. den. D14-melanocyty kultivované na PCL nosičích 14. den. A1, B1, C1, D1 – měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 200x. A7, A14, B7, B14, C7, C14, D7, D14 – měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 150x.

## 7.2.2 Diskuze

Hojení ran je řízeno souhrou rozmanitých stimulů<sup>207</sup>. Růstové faktory jsou mezi nejdůležitějšími regulačními působky. Dokonce i malé odchylky v koordinaci buněčných procesů a odpovídajících hodnot GF mohou mít za následek neschopnost uzavření rány<sup>189</sup>.

Cílem studie bylo vyvinout nanovláknenné krytí ran obohacené o růstové faktory. Trombocyty byly vybrány jako zdroj rozmanitých růstových faktorů zapojených v hojení ran (EGF, PDGF, TGF- $\beta$ )<sup>208</sup>. PDGF působí jako silný mitogen pro fibroblasty a hraje důležitou roli ve všech stádiích hojení ran zahrnující angiogenezi a reepitelizaci. TGF- $\beta$  podporuje proliferaci fibroblastů i keratinocytů<sup>209</sup>. Bylo popsáno, že další růstové faktory obsažené v trombocytech, jako je bFGF a HGF, jsou důležité pro správný růst melanocytů<sup>210</sup>. Byly testovány tři různé koncentrace trombocytů pro sledování vlivu růstových faktorů na dermální buňky.

Kompozitní nosiče byly připraveny adhezí trombocytů na PCL nanovláknena. Nanovláknena vykazují architekturu typickou pro PCL. Vzorčky obsahují směs nano- a mikrovláken. Podobná architektura byla pozorována Plencnerem a kol.<sup>200</sup> a Knotkem a kol.<sup>211</sup>. Nano/mikro struktura kombinuje větší velikost pórů mezi mikrovláknem s vysokou adhezivní kapacitou nanovláken<sup>212</sup>. V naší studii bylo zjištěno, že trombocyty byly efektivně adsorbovány na povrch nanovláken.

Skenovací elektronová mikroskopie ukázala, že trombocyty byly po adhezi na povrch nosiče aktivovány a vytvořily silnou fibrinovou vrstvu. Toto zjištění je ve shodě s Wan a Xu<sup>213</sup>. Ti demonstrovali, že trombocyty podstupují aktivaci po adhezi na nanovláknena díky jejich specifické povrchové topografii<sup>213</sup>. Přirozený charakter fibrinu byl široce využit v různých aplikacích tkáňového inženýrství. Fibrinová síť podporuje buněčnou adhezi přes integrinové a neintegrinové receptory<sup>214</sup>. Takové biomimetické motivy jsou klíčové pro zvýšení buněčné adheze a proliferace na spíše hydrofobní povrch PCL nosičů. Některé další přírodní polymery jako je kolagen<sup>215</sup> a chitosan<sup>216</sup> byly použity pro zvýšení biokompatibility nosiče. Podobný systém, který kombinoval trombocyty a nanovláknenné nosiče byl testován Jakubovou a kol.<sup>204</sup> a Plencnerem a kol.<sup>200</sup>. Jakubová a kol. testovali vliv trombocytů adherovaných na PCL nanovláknena na proliferaci chondrocytů<sup>204</sup>. Plencner a kol. použili tento systém v regeneraci kýly<sup>200</sup>. Obě dvě studie prokázaly signifikantní zlepšení metabolické aktivity a proliferace buněk díky bioaktivním molekulám uvolněným z trombocytů.

Připravený systém byl použit pro kultivaci keratinocytů. Výsledky naznačují, že uvolněné růstové faktory stimulují metabolickou aktivitu a proliferaci na trombocyt-funkcionalizovaných nosičích v porovnání s PCL kontrolou. Stimulační efekt se nicméně zdál nezávislý na počáteční koncentraci trombocytů. Konfokální mikroskopie morfologie keratinocytů ukázala konfluentní vrstvu výrazně stratifikovaných a diferencovaných buněk na všech vzorcích obsahujících trombocyty. Bylo popsáno, že dostatečně vysoké koncentrace EGF mají za následek proliferaci a diferenciaci keratinocytů a podporují hojení ran u diabetických myši<sup>217</sup>.

Kompozitní systém byl použit na kultivaci fibroblastů. Stimulace proliferace fibroblastů a produkce ECM v přítomnosti trombocytů byla popsána Liu a kol.<sup>218</sup>. Naše studie ukázala, že adherentní trombocyty stimulují metabolickou aktivitu a proliferaci buněk od 1. experimentálního dne. Byly testovány tři různé koncentrace trombocytů a bylo prokázáno, že v první polovině experimentu nejlépe stimuluje proliferaci a metabolickou aktivitu fibroblastů nejnižší koncentrace trombocytů (skupina C3). Nicméně rozdíly mezi funkcionalizovanými skupinami byly na konci experimentu vyrovnány.

Ukázali jsme, že bioaktivní substance uvolněné z trombocytů stimulují jak fibroblasty, tak keratinocyty. Interakce mezi keratinocyty a fibroblasty postupně přesouvá proces hojení od zánětu k syntéze granulační tkáně<sup>219</sup>. Oba buněčné typy jsou nezbytné pro snížení objemu rány a její řádné uzavření. V současné době existuje jen velmi málo léčiv stimulujících oba buněčné typy současně a vývoj takového systému pro hojení hlubokých ran by byl velice přínosný<sup>220</sup>.

Melanocyty jsou buňky zodpovědné za pigmentaci kůže. Nejběžnější depigmentační onemocnění kůže je vitiligo, charakterizované bílými ostrůvky vzniklými ztrátou funkce melanocytů<sup>221</sup>. Nedávno byl navržen koncept buněčné náplasti pro léčbu vitiliga<sup>216</sup>. Ta sestává z vhodného biomateriálu dovolujícího *in vitro* expanzi zdravých buněk a poskytujícího mechanickou

oporu po transplantaci do místa léze. Jako tento materiál bylo studováno mnoho polymerů ve formě filmu (kyselina polymléčná<sup>222</sup>, polyvinylchlorid a silikon<sup>223</sup> nebo chitosanem potažený polystyren<sup>216</sup>). Něteré materiály jako například kyselina polymléčná<sup>224</sup> nebo lidská amniotická membrána<sup>225</sup> byly použity v klinické praxi. Ukázali jsme, že PCL nanovlákná jsou vhodný materiál pro kultivaci melanocytů. Funkcionalizovaná nanovlákná navíc vedou k signifikantnímu zvýšení buněčné proliferace, metabolické aktivity a syntézy melaninu. Podle snímků z konfokální mikroskopie kolonizace nosičů melanocyty byla extrémně efektivní. Efektivita kolonizace nosičů nebyla podpořena daty z proliferačního testu, kde nedošlo k dramatickému nárůstu v počtu melanocytů na trombocyty-funkcionalizovaných nosičích. Tento rozpor může být způsoben tím, že melanin absorbuje excitační vlnovou délku (485nm) fluorescenčního kitu.

Výsledky studie ukázaly, že systém je schopen stimulovat fibroblasty, keratinocyty a melanocyty a může sloužit jako schůdný systém pro tkáňové inženýrství. Tento systém kombinuje mechanickou stabilitu PCL nanovláken s bioaktivní úlohou trombocytů. Kožní regenerace, hlavně u popálenin 3. stupně a diabetických ulcerací, zůstává důležitou vědeckou oblastí. Námí navrhovaný systém může sloužit jako bezbuněčný nosič, který podporuje proliferaci fibroblastů a keratinocytů, migraci<sup>226</sup> a angiogenezi prostřednictvím VEGF uvolňovaných z adherovaných trombocytů<sup>214</sup>. Stimulace růstu keratinocytů a fibroblastů na nosičích by mohla podporovat proces hojení a mohla by snižovat dobu hojení, což je zásadní komplikace u chronických ran. Navíc, pokud by před transplantací byly na nosič nasazeny melanocyty, tak by systém mohl sloužit pro léčbu vitiliga. Melanocyty vykazovaly dobrou viabilitu na nosičích a planární povaha funkcionalizovaných nosičů umožňuje aplikaci melanocytů pomocí sprejování (např. ReCELL technologií<sup>227</sup>).

Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi nosiči s různými koncentracemi trombocytů. Dokonce i nejnižší koncentrace byla schopná stimulovat kožní buňky. Jednoduchá metoda adheze navíc umožňuje rychlou a pohodlnou přípravu na místě potřeby a rychlý přenos do

klinické praxe. PCL je biokompatibilní materiál schválený FDA<sup>228</sup>. PCL je biodegradabilní polymer. Jeho degradační čas (okolo 1 roku) limituje jeho použití v tkáňovém inženýrství kůže z důvodu potřeby častého měnění kožních krytů. Nicméně bylo popsáno, že PCL je náchylný k enzymatickému rozpadu a chronické rány jsou charakterizovány právě nadměrnou proteolytickou aktivitou, takže by tento fenomén mohl hrát roli v degradaci polymeru při hojení ran<sup>229</sup>.

Carter a kol. a jejich meta-analýza na dostupných datech týkajících se použití krevní plazmy bohaté na destičky v klinické praxi ukázala, že PRP terapie má nejen pozitivní vliv na proces hojení ran, ale je spojena se snížením bolesti, infekcí a dalších nežádoucích účinků<sup>230</sup>. Náš systém kombinuje oba přístupy a měl by tak efektivněji usnadnit hojení.

### **7.2.3 Závěr**

Chronické rány jsou obecně charakterizovány sníženou dostupností růstových faktorů. Jsou vyvíjeny nové strategie pro efektivnější dodávání růstových faktorů. V tomto experimentu byla připravená PCL nanovlákna, která byla funkcionalizována adhezaními trombocyty jako zdrojem růstových faktorů. Tři koncentrace trombocytů byly jednoduchou adhezí imobilizovány na nanovlákenné nosiče a byl sledován jejich vliv na adhezi, proliferaci a metabolickou aktivitu dermálních buněk (fibroblasty, melanocyty, keratinocyty). Získaná data naznačují, že přítomnost trombocytů podporuje proliferaci a metabolickou aktivitu u všech typů testovaných buněk. Mezi testovanými koncentracemi trombocytů nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly, takže i nejnižší koncentrace dostatečně podporuje proliferaci kultivovaných buněk.



### **7.3 Trombocyty funkcionalizovaný 3D vlákenný nosič z poly-ε-kaprolaktonu připravený odstředivým zvlákňováním pro dodávání růstových faktorů.**

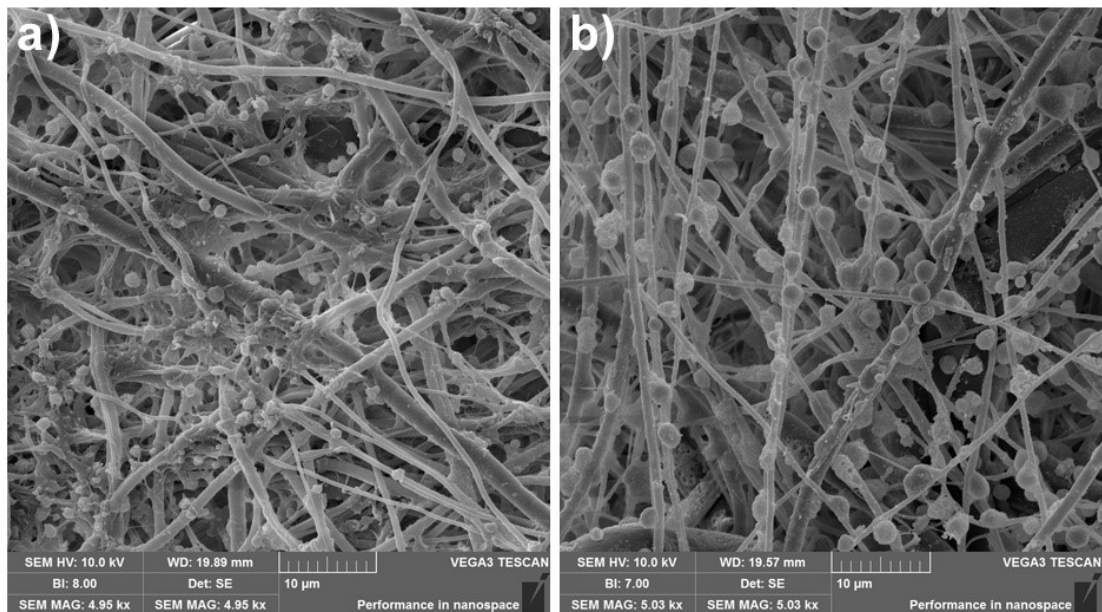
Cílem studie bylo připravit jednoduchý kompozitní nosič založený na adhezi trombocytů na PCL nanovlákna. Trombocyty byly použity jako zdroj přírodních růstových faktorů a cytokinů zapojených v procesu hojení tkání.

#### **7.3.1 Výsledky**

##### **7.3.1.1 Charakterizace připravených nosičů**

Bylo připraveno 6 různých typů nosičů. Vlákenné vrstvy byly kombinovány s 5 odlišnými koncentracemi trombocytů ( $3\ 000 \times 10^9$  trombocytů/l; PCL/P1), 3x ředěná koncentrace trombocytů (PCL/P2), 10x ředěná koncentrace trombocytů (PCL/P3), 30x ředěná koncentrace trombocytů (PCL/P4) a 100x ředěná koncentrace trombocytů (PCL/P5). Samotná PCL vlákna byla použita jako kontrola.

PCL vlákna byla úspěšně připravena a vykazovala nano-/mikrovlákennou morfologii. Střední průměr mikrovláken byl  $1\ 380 \pm 427$  nm. Střední průměr převládající nanovlákenné frakce byl  $504 \pm 148$  nm. Průměr velikosti pórů byl  $7,11 \pm 11,9$   $\mu\text{m}^2$  a 20 % pórů bylo větších než  $10$   $\mu\text{m}^2$ . Ze SEM snímku je zřejmé, že trombocyty úspěšně adherovaly na PCL vzorky (obr. 29). Trombocyty byly částečně aktivovány a na nosičích tvořily fibrinovou síť. Trombocyty byly na nosičích viditelné dokonce až do 14. dne experimentu (obrázek 29). Střední průměr trombocytů 1. den byl  $1\ 080 \pm 178$  nm a 14. den  $2\ 465 \pm 370$  nm.



Obrázek 29 Vizualizace adheze trombocytů na PCL vlákna pomocí SEM. Trombocyty byly částečně aktivovány a formovaly fibrinovou síť 24 h po adhezi (a). Trombocyty byly viditelně adherovány na vlákna dokonce po 14 dnech experimentu (b).

### 7.3.1.2 Množství růstových faktorů v trombocytech a jejich uvolňování

Trombocyty použité v experimentu byly analyzovány pomocí multiplexové proteinové analýzy X-MAP assay; BioPlex, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a bylo vyhodnoceno množství cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (tabulka 3). Analýza ukázala přítomnost velkého množství prozánětlivých cytokinů v porovnání s protizánětlivými jako je IL-1ra ( $340 \pm 4$  pg/ml) a IL-10 ( $109 \pm 7$  pg/ml). IL-4 a IL-13 byly detekovány v koncentraci nižší než 50 pg/mL. Prozánětlivé cytokiny byly přítomny ve vyšších koncentracích: IL-17 ( $1\,774 \pm 10$  pg/ml), IL-8 ( $133 \pm 30$  pg/ml), IL-9 ( $139 \pm 12$  pg/ml), IL-15 ( $108 \pm 6$  pg/ml), INF- $\gamma$  ( $299 \pm 11$  pg/ml) a TNF- $\alpha$  ( $204 \pm 9$  pg/ml). Koncentrace IL-1b, IL-2, IL-5, IL-6 a IL-7 byly nižší než 50 pg/ml. RANTES byl převládajícím chemokinem přítomným v trombocytech v koncentraci  $14\,721 \pm 239$  pg/ml. MIP-1b ( $176 \pm 68$  pg/ml), eotaxin ( $122 \pm 8$  pg/ml), IP-10 ( $383 \pm 22$  pg/ml) a MCP-1 ( $113 \pm 7$  pg/ml) byly přítomny v koncentracích okolo 100 pg/ml. Z pohledu tkáňového inženýrství mají růstové faktory velkou důležitost pro stimulaci buněčné proliferace a diferenciaci. PDGF-bb byl nejhojněji zastoupeným růstovým faktorem ( $9\,218 \pm 313$  pg/ml). VEGF ( $750 \pm 24$  pg/ml) a bFGF ( $379 \pm 10$  pg/ml) byly

přítomny ve vyšších koncentracích. G-CSF and GM-CSF byly také přítomny v koncentracích vyšších než 100 pg/ml. ELISA byla provedena pro kvantifikaci dalších růstových faktorů. TGF- $\beta$  ( $76\,817 \pm 6\,384$  pg/ml), EGF ( $403 \pm 32$  pg/ml) a HGF ( $530 \pm 16$  pg/ml) byly přítomny v nejvyšších koncentracích. ELISA test potvrdil vysokou koncentraci trombospodinu jakožto antiangiogenního faktoru ( $94\,200 \pm 10\,575$  pg/ml) a P-selektinu ( $4\,667 \pm 80$  pg/ml) jako markeru uvolňování  $\alpha$ -granul.

*Tabulka 3 Obsah vybraných mediátorů v trombocytech měřených pomocí multiplexové eseje a ELISA testu.*

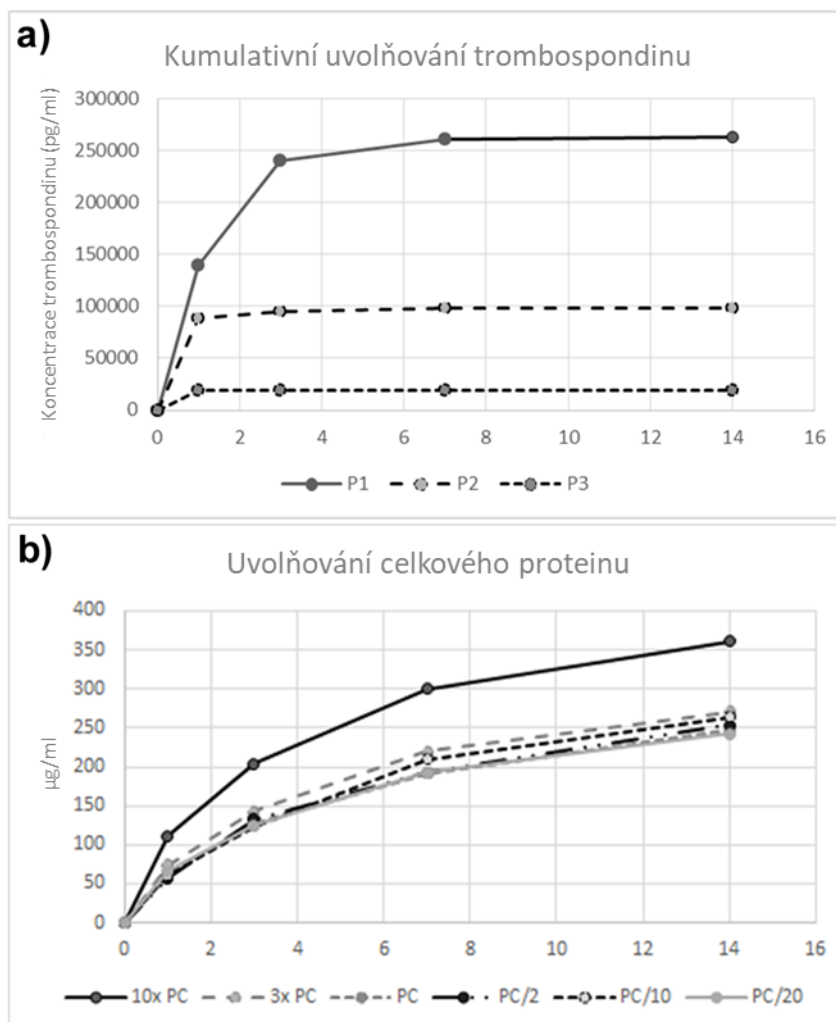
<u>Mediátor</u>	<u>Koncentrace (pg/ml)</u>	<u>SD (pg/ml)</u>
<b>Protizánětlivé cytokiny</b>		
IL-1 ra	340	4
IL-4	168	15
IL-10	109	7
IL-13	13	4
<b>Prozánětlivé cytokiny</b>		
IL-1b	12	6
IL-2	33	5
IL-5	29	6
IL-6	31	9
IL-7	53	6
IL-8	134	30
IL-9	139	12
IL-12	229	4
IL-15	108	6
IL-17	1 774	10
IFN- $\gamma$	299	11
TNF- $\alpha$	204	9
<b>Chemokiny</b>		
RANTES	14 722	239
MIP-1a	25	4
MIP-1b	177	68
Eotaxin	122	8
IP-10	383	22
MCP-1 (MCAF)	114	7
<b>Růstové faktory</b>		
VEGF	750	24
PDGF-bb	9 218	313
FGF	379	10
G-CSF	219	1
GM-CSF	164	6
<b>Růstové faktory měřené Elisa testem</b>		

KGF	128	11
EGF	403	32
HGF	530	16
IGF-I	283	20
TGF- $\beta$ 1	76 817	6 384
SDF-1 $\alpha$	67	27
Trombospondin-1	94 200	10 575
P-Selektin	4 667	80

Pro vizualizaci uvolňovací kinetiky z adherovaných trombocytů byl použit trombospondin jako modelový protein. Trombospondin je inhibitor neovaskularizace, který je přítomný v trombocytech ve vysoké koncentraci. Koncentrace uvolněného trombospondinu byla detekována ve vzorcích ve vybraný čas a bylo vyhodnoceno jeho kumulativní uvolňování. Koncentrace trombospondinu uvolněného z PCL/P4 (30× ředěná maximální koncentrace trombocytů) a PCL/P5 (100×ředěná maximální koncentrace trombocytů) byla pod detekčním limitem ELISA kitu, proto jediná získaná data (obrázek 30a) byla z PCL/P1 (maximální koncentrace trombocytů), PCL/P2 (3x ředěná maximální koncentrace trombocytů) a PCL/P3 (10x ředěná maximální koncentrace trombocytů). Z PCL/P1 vzorku byl trombospondin uvolněn během prvních 7 dnů experimentu. Se snižující se koncentrací trombocytů bylo plateau fáze dosaženo dříve (3 dny pro PCL/P2 vzorky a 1 den pro PCL/P3 vzorky).

Kromě uvolňování trombospondinu byl pomocí citlivé fluorescenční sondy měřen i celkový protein. Celkové uvolňování proteinů překračuje detekční limit ELISA testu, jelikož všechny proteiny uvolněné z krevních destiček jsou měřeny v jediné reakci. Kromě toho je limit detekce fluorometrického stanovení lepší než u kolorimetrického stanovení. Proto byl uvolněný protein měřitelný ve všech vzorcích. Výsledky jsou ve shodě s výsledky ELISA testu. Množství uvolněného proteinů vykazuje na dávce závislé uvolňování u nejvyšších koncentrací (PCL/P1-P3). V těchto případech je uvolňovací čas prodloužen v porovnání s nižšími koncentracemi. Na druhé straně u

méně koncentrovaných vzorků byly výsledky ovlivněny proteiny z plazmy, které byly porovnatelné ve všech vzorcích. Koncentrace plazmatických proteinů byly mnohonásobně vyšší než koncentrace proteinů z trombocytů, jejichž rozdíly ve vzorcích byly minimální.



Obrázek 30 Uvolňovací kinetika proteinů z trombocytů. Trombospondin byl použit jako modelový protein pro detekci uvolňovací kinetiky z trombocytů (a). Uvolňování trombospondinu bylo na dávce závislé a bylo detekovatelné pouze pro vyšší koncentrace trombocytů (P1-P3). Vzorky s nižší koncentrací trombocytů byly pod detekčním limitem ELISA testu (P4 a P5). Uvolňování celkového proteinu bylo měřeno pomocí fluorescenčních průběhů (obrázek 30b). Závislost na koncentraci trombocytů byla prokázána pouze pro nejvyšší koncentraci (10x PC = P1). Při nižších koncentracích byly výsledky ovlivněny přítomností plazmatických proteinů.

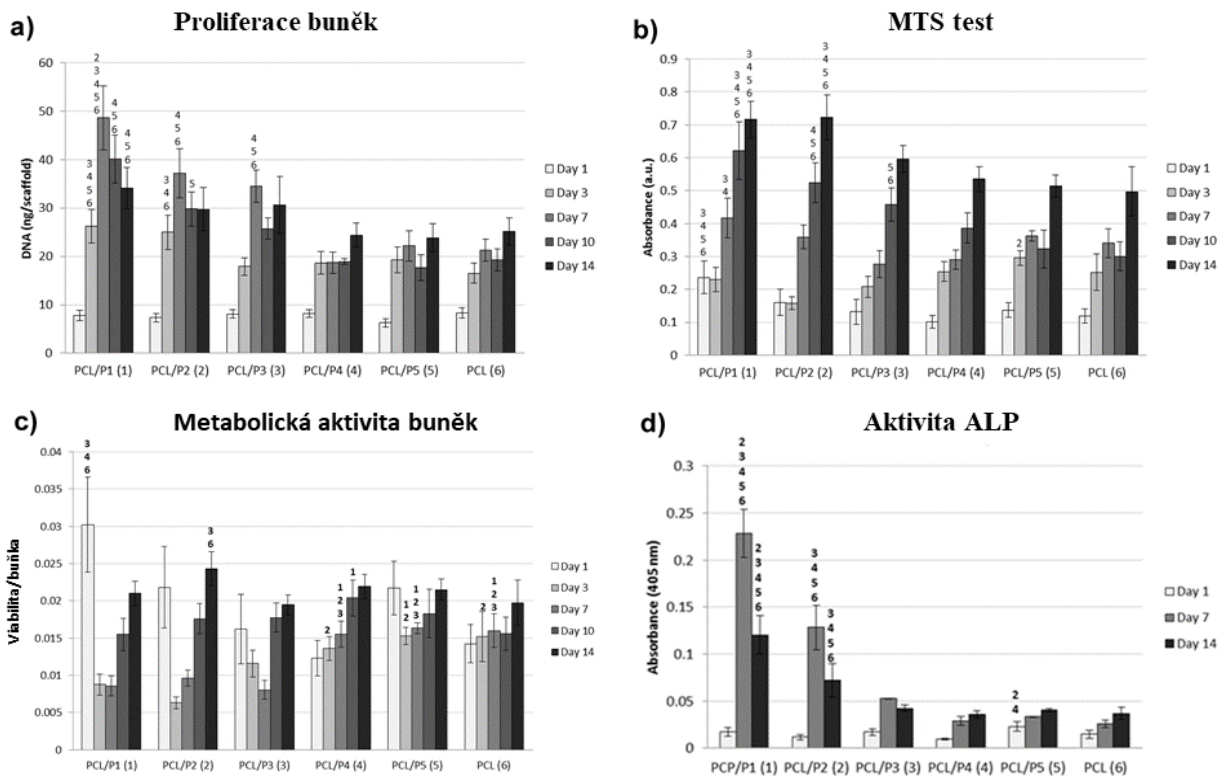
### 7.3.1.3 Metabolická aktivita a proliferace buněk na nosičích

Metabolická aktivita a proliferace buněk na nosičích byla hodnocena MTS testem a analýzou množství DNA 1., 3., 7., 10. a 14. den experimentu (obrázek 31a). 24 hodin po nasazení buněk byla

buněčná adheze podobná na všech nosičích. Buňky začaly proliferovat rychleji na vzorcích s vyšší koncentrací trombocytů. Nejviditelnější proliferace byla na nosičích s nejvyšším množstvím trombocytů (PCL/P1 a PCL/P2) 3. den. Buňky kontinuálně proliferovaly až do 7. dne, kdy byl největší počet buněk detekován ve skupině PCL/P1. Nižší proliferace byla pozorována ve skupinách PCL/P2 a PCL/P3 a nejnižší ve skupinách PCL/P4, PCL/P5 a PCL. Ačkoliv se počet buněk začal od 7. dne snižovat ve skupinách PCL/P1, PCL/P2 a PCL/P3, vyšší počet buněk byl 10. a 14. den stále detekován ve skupině PCL/P1. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Metabolická aktivita buněk byla nejvyšší ve skupině s nejkonzentrovanejšími trombocyty (PCL/P1) již první den po nasazení (obrázek 31b). Metabolická aktivita plynule narůstala a byla nejvyšší ve skupinách PCL/P1 a PCL/P2 10. a 14. den. Na druhé straně poměr metabolické aktivity s obsahem DNA nabízí jiný pohled (obrázek 31c). Nejvyšší metabolická aktivita byla pozorována ve skupině PCL/P1 24 h po nasazení. Ačkoliv se metabolická aktivita signifikantně snižovala ve vzorcích s nejkonzentrovanejšími trombocyty (PCL/P1-P3) ve dnech 3 a 7, následně se začala znovu zvyšovat. Nejvyšší metabolická aktivita byla pozorována ve skupině PCL/P2 14. den. Skupiny s nižším počtem trombocytů a kontrolní skupina vykazovala stabilní nebo slabě se zvyšující metabolickou aktivitu během celého experimentu.

Buňky ve skupinách s vyšší koncentrací trombocytů (PCL/P1-P3) začaly znatelně proliferovat od 3. do 7. dne. Rychlé zvýšení počtu buněk vedlo ke snížení metabolické aktivity buněk, pokud bylo spojeno s obsahem DNA. Růst buněk začal zpomalovat v těchto vzorcích v den 10, což odpovídalo zvýšení metabolické aktivity. Pokles buněčné proliferace byl pravděpodobně způsoben deplecí živin, protože kultivační médium nebylo během experimentu měněno. Rychle rostoucí buňky na nosičích s vyššími koncentracemi trombocytů (PCL / P1-P3) vyčerpaly živiny rychleji než buňky na nosičích s nižšími koncentracemi trombocytů nebo bez trombocytů (PCL/P4, PCL/P5 a PCL).

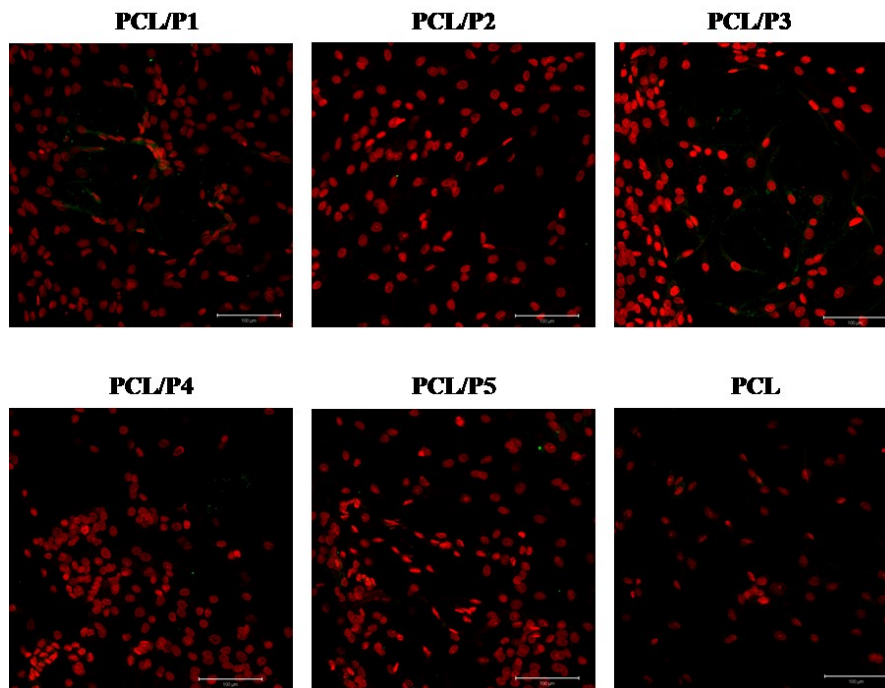


Obrázek 31 Proliferace (a), viabilita (b), metabolická aktivita (c) a aktivita ALP (d) buněčné linie MG-63. Buněčná proliferace byla měřena pomocí kvantifikace DNA (obrázek 31a). Metabolická aktivita buněk byla hodnocena pomocí MTS testu (obrázek 31b). Proliferace buněk i metabolická aktivita byly nejvyšší ve vzorcích s nejvyšší koncentrací trombocytů (PCL/P1 a PCL/P2). Metabolická aktivita byla následně vztahována k množství DNA (obrázek 31c). ALP aktivita byla nejvyšší ve vzorcích s nejvyšší koncentrací trombocytů (PCL/P1 a PCL/P2; obrázek 31d). Čísla nad sloupci v grafech reprezentují čísla vzorků a ukazují statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

### 7.3.1.4 Osteogenní aktivita buněk MG-63

Aktivita ALP a imunodetekce OCN byly použity pro hodnocení stimulace osteogenní diferenciaci pomocí trombocytů. Obrázek 31d ukazuje, že vyšší koncentrace trombocytů zvýšila aktivitu ALP. Skupina PCL/P1 měla nejvyšší ALP aktivitu ve srovnání s ostatními skupinami 7. a 14. den. Nižší ALP aktivita byla pozorována ve skupině PCL/P2, ačkoliv byla vyšší než ve všech skupinách s nižší koncentrací trombocytů a v kontrolní skupině (PCL/P3–P4, PCL).

Vizualizace OCN pomocí konfokální mikroskopie nepotvrdila osteogenní stimulaci trombocytů. Byly pozorovatelné pouze malé, ojedinělé ostrůvky OCN. Největší množství OCN bylo viditelné ve skupinách PCL/P1 a PCL/P2 14. den (obrázek 32).

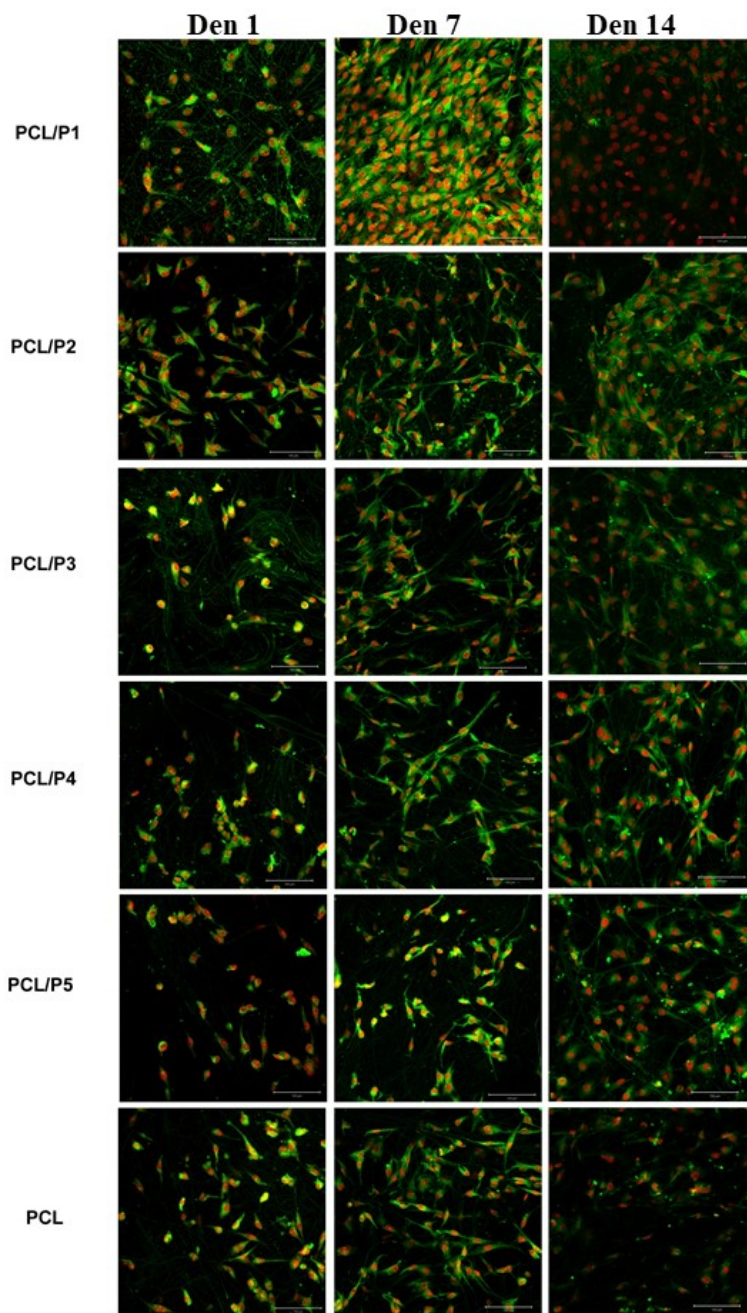


Obrázek 32 Vizualizace OCN pomocí konfokálního mikroskopu den 14. Červeně jsou značena buněčná jádra propidium jodidem, OCN byl obarven protilátkou konjugovanou Alexa Fluor 488 (zelená). Zvětšení 200x. Použité měřítko 100µm.

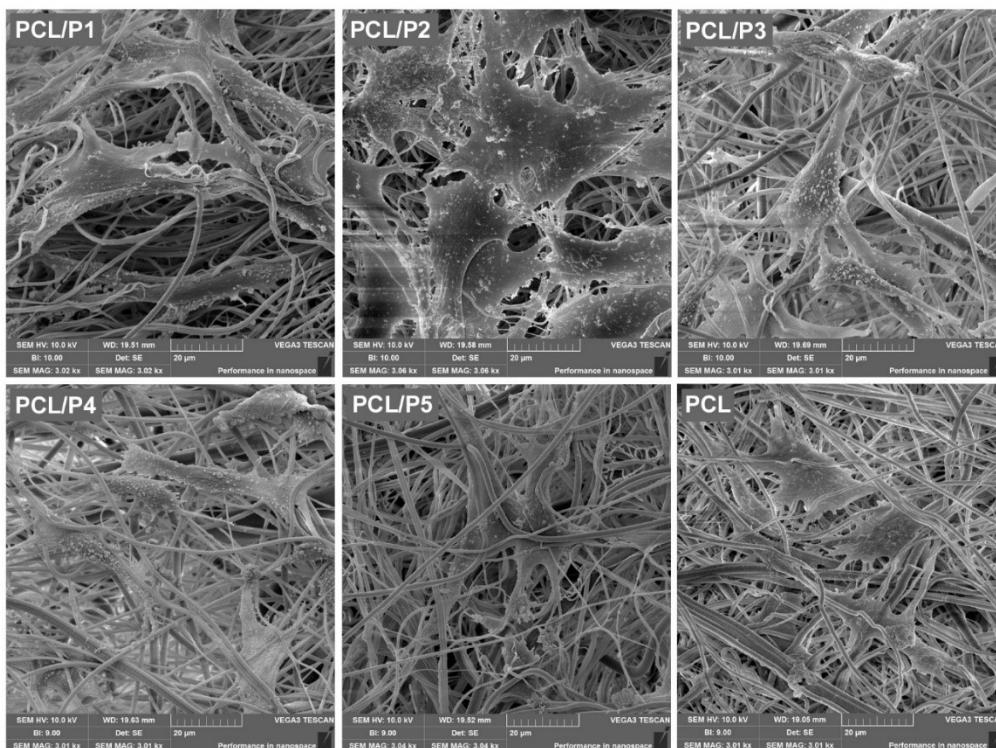
### 7.3.1.5 Morfologie buněk hodnocení konfokální mikroskopii

Morfologie a rozprostření buněk na nosičích bylo vizualizováno pomocí konfokální mikroskopie (obrázek 33) a SEM (obrázek 34). Buňky na nosičích byly vizualizovány použitím DiOC6 (buněčné membrány, zelená barva) a PI (buněčná jádra, červená barva). Konfokální mikroskopie ukázala dobrou adhezi buněk na PCL vlákna. Buňky adherovaly podobně na všechny testované PCL nosiče. Mimoto byly 1. den pozorovatelné i trombocyty. Buňky byly na nosičích dobře rozprostřené a během kultivace se jejich počet zvyšoval. Mikroskop potvrdil trend sledovaný pomocí MTS a stanovení proliferace, kde buňky vykazovaly vyšší proliferaci se zvyšující se koncentrací trombocytů. Nejvyšší počet buněk byl detekován ve skupině PCL/P1 a nejnižší ve skupinách PCL/P5 a PCL. 14. den se počet buněk snižoval. Výsledky dobře korelují s výsledky z DNA analýzy. Výsledky ze SEM analýzy potvrdily, že buňky byly adherovány na vlákna a byly dobře rozprostřené.



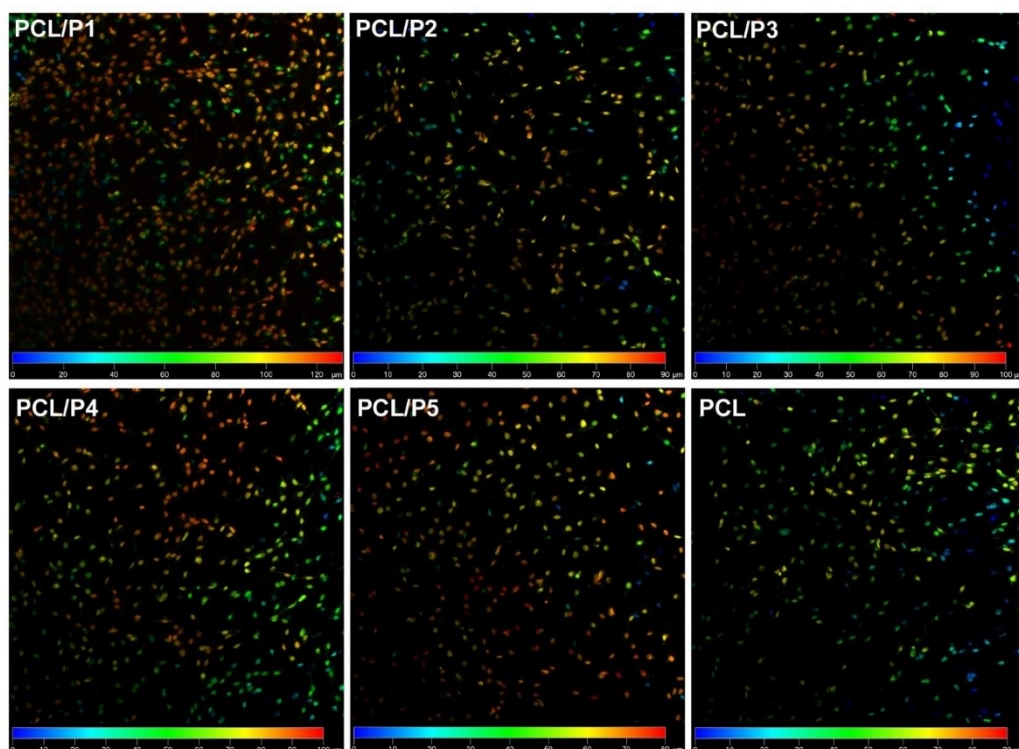


Obrázek 33 Vizualizace buněk MG-63 na nosičích připravených odstředivým zvlákněním. Buňky byly barveny DiOC6 (vnitřní buněčné membrány, zelená barva) a propidium jodidem (buněčná jádra, červená barva) a vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu. Zvětšení 200x. Použité měřítko 100 $\mu$ m. Buňky byly adherovány podobně na všech testovaných nosičích. Nejvyšší počet buněk byl viditelný na PCL/P1 7. den. 14. den počet buněk poklesl. Počet buněk na nosičích s nízkou koncentrací trombocytů (PCL/P3, PCL/P4) a kontrolních nosičích (PCL) byl po dobu experimentu konstantní. Výsledky dobře korespondují s daty z analýzy DNA.



Obrázek 34 Vizualizace adheovaných buněk pomocí SEM. Buňky byly rovnoměrně distribuovány a rozprostřeny na nosičích. Podobný obrázek byl pozorován na všech vzorcích. Den 7; zvětšení 3 000x.

Díky velkým velikostem pórů v porovnání s nosiči zvláknovanými elektrostaticky<sup>136</sup>, buňky penetrovaly do nosiče. Ve všech skupinách byla hloubka penetrace ~80–90  $\mu\text{m}$  a pouze ve skupině PCL/P1 byla hloubka penetrace větší (120  $\mu\text{m}$ ; obrázek 35).



*Obrázek 35 Buněčná infiltrace do nosičů. Buněčná jádra vizualizovaná pomocí konfokálního mikroskopu byla značena na základě jejich pozice uvnitř vlákněných nosičů. Barevná škála ukazuje buňky v různých hloubkách nosiče. Buněčná infiltrace byla podobná na všech nosičích (80-90 µm), kromě PCL/P1, kde buňky penetrovaly do hloubky 120 µm; zvětšení 100x.*

### 7.3.2 Diskuze

Defekty kosti a chrupavky patří celosvětově mezi nejrozšířenější důvody pro invaliditu populace. Vzhledem k 3D povaze kosti a chrupavky by nosiče měly podporovat růst buněk ve všech třech dimenzích. V tkáňovém inženýrství jsou 3D nosičové systémy vysoce žádané. Pro řešení této výzvy je nezbytný systém s vysokou porozitou a otevřenými póry. Pro účely tkáňového inženýrství byly použity různé strategie pro přípravu vlákněných nosičů. Nejpopulárnější metodou je elektrostatické zvlákňování. Tyto vrstvy mají velkou poréznost a velký poměr plochy k objemu, s vynikající adhezivní schopností. Nevýhodou vrstev vytvořených elektrostatickým zvlákňováním je 2D struktura s malými póry. Mnoho aplikací vyžaduje 3D strukturované nosiče s otevřenými póry schopnými buněčné infiltrace. Pro zvýšení velikosti pórů a tloušťky nanovlákněné vrstvy byly použity různé strategie, jako jsou speciální kolektory<sup>206</sup> a vyluhování krystalů soli<sup>231</sup>. Nyní jsou pro přípravu mikro- a nanovláken možné alternativní metody jako je melt-blown a odstředivé

zvlákňování. V naší předchozí studii bylo ukázáno, že PCL nanovlákná připravená odstředivým zvlákňováním vykazují morfologii podporující buněčnou penetraci na rozdíl od nosičů připravených elektrostatickým zvlákňováním<sup>136</sup>. Výsledky nynější studie potvrzují, že buňky jsou schopny penetrovat až do hloubky 120  $\mu\text{m}$  v případě skupiny PCL/P1.

Stimulace buněčné migrace do nosiče a jejich diferenciaci do žádaného buněčného typu je nezbytná pro úspěšnou regeneraci tkáně. Pouze správně diferencované buňky mohou produkovat ECM se správným složením a poměrem pro danou tkáň. Buněčná diferenciaci je regulována početnými stimuly včetně mechanických vlastností obklopující tkáně, signalizačních molekul s malou molekulovou hmotností a morfogenů na bázi proteinů (tj. růstových faktorů). Diferenciační proces je rozehrán těmito stimuly. V tkáňovém inženýrství kosti byla studována široká škála stimulačních molekul.

Hojení kosti po zranění je komplexní proces zahrnující množství cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Raná fáze regenerace kosti je spojená s hemostázou a zánětem v místě defektu. Trombocyty hrají hlavní úlohu v rané fázi hojení. IL-1<sup>232</sup> a IL-6<sup>233</sup> jsou prozánětlivé cytokiny hrající roli v aktivaci makrofágů. IL-17 je jedním z klíčových regulátorů v rané fázi hojení prostřednictvím maturace osteoblastů<sup>234,235</sup>. IL-17 byl v trombocytech detekován v nejvyšším množství. IL-1, TNF- $\alpha$ , SDF-1 a G-CSF stimulují aktivaci progenitorů mezenchymálních kmenových buněk<sup>236</sup>. Multiplexová analýza potvrdila, že TNF- $\alpha$ , IL-1ra a G-CSF byly přítomny v trombocytech adherovaných na nosič. Doručování těchto stimulů může pomoci započít regenerační proces. V pozdějších fázích hrají růstové faktory hlavní roli v regulaci tkáňové regenerace. Mezi nejvýznamnější růstové faktory účinné v časných fázích hojení kostí patří SDF-1a rekrutující progenitorové buňky do místa poškození, bFGF podporující proliferaci progenitorových buněk, IGF-I působící jako antiapoptotický a pro-osteogenní faktor a TGF-beta stimulující osteogenní diferenciaci. Ve středních a pozdních fázích zastávají nejdominantnější roli kostní morfogenetický

protein 2 (*bone morphogenetic protein 2*; BMP-2), kostní morfogenetický protein 7 (BMP-7) a IGF- $I^{236}$ . Bylo také pozorováno, že přítomnost PDGF má pozitivní vliv na hojení kostí<sup>237</sup>. Neovaskularizace kostí je regulována VEGF, který je také nezbytný pro obnovu integrity kostní tkáně. Aby byl vyvinut úspěšný nosič, měl by systém dodávat tyto růstové faktory. Multiplexová analýza identifikovala přítomnost PDGF-bb, VEGF, bFGF a dalších růstových faktorů. ELISA test potvrdil přítomnost TGF- $\beta$ , IGF-I a EGF. Nicméně další aktivní molekuly identifikované multiplexním testem mají také význam pro tkáňové inženýrství kostní tkáně. RANTES byl identifikován ve vysoké koncentraci a bylo prokázáno, že hraje roli při osteogenní diferenciaci MSC<sup>238</sup>.

Kromě stimulační role mohou uvolňované molekuly také inhibovat proces hojení kosti. Při výzkumu biomateriálů jsou TNF- $\alpha$  a IL-1 nejznámějšími mediátory reakce na cizí těleso. Lang a kol. sledovali pozitivní efekt IL-1 $\beta$  na proliferaci osteoblastů a negativní efekt na proliferaci a diferenciaci MSC<sup>232</sup>. Podobně TNF- $\alpha$  inhibuje vývoj v hojení kosti prostřednictvím indukce apoptózy osteoblastů a chondrocytů<sup>239,240</sup>. Některé experimenty však ukazují, že určitá úroveň signalizace TNF- $\alpha$  je nezbytná pro resorpci kostní hmoty během procesu hojení<sup>241</sup>. Trombospondin je jeden z nejhojnějších proteinů v trombocytech. Trombospondin je také inhibitor vaskularizace a několik studií ukázalo jeho negativní vliv na hojení kosti. Hsu a kol. zjistili, že trombospondin negativně ovlivňuje proliferaci různých buněčných typů (periodontální vazivové buňky, osteoblasty a endotelové buňky) v koncentracích 2,5  $\mu\text{g/ml}^{242}$ . Průměrná hladina trombospondinu v našich vzorcích byla  $\sim 94$  ng/ml a jeho inhibiční účinek proto může být nižší<sup>242</sup>.

V této studii byla použita multiplexová imunoesej a ELISA test, které mají omezenou kapacitu a senzitivitu, proto mohlo být identifikováno pouze část proteinů přítomných v trombocytech. Komplexní proteomická analýza ukázala více než 500 proteinů v trombocytárním proteomu<sup>243</sup>. Studie založená na trombinem indukovaném uvolňování odhalila více než 90 proteinů v

trombocytárním releasátu<sup>244</sup>. Obsah trombocytárních proteinů navíc hodně kolísá v závislosti na pohlaví, věku a fyziologickém stavu dárce<sup>243</sup>. Mussano a kol. provedli X-MAP multiplexovou analýzu s trombocyty od mužských a ženských dárců<sup>183</sup>. Výsledky byly rozdílné od výsledků v této studii. V našem případě byly koncentrace IL-17, VEGF a PDGF-bb vyšší a INF- $\gamma$  nižší v porovnání s popisovanou studií. Kromě toho byla multiplexová analýza mnohem citlivější než ELISA test. Například bFGF v našem vzorku nebyl měřitelný pomocí standartního ELISA protokolu.

Trombocyty jsou pro jejich regenerativní potenciál často používané v regenerativní medicíně<sup>245</sup>. Klíčové strategie pro přípravu trombocytů zahrnují metodu buffy coatů a aferézy<sup>246,247</sup>. Metoda přípravy z buffy coatů, která je použita v této studii, je založena na centrifugaci plné krve, která je tímto rozdělena na trombocyty, leukocyty, erytrocyty a plazmu. Přebytné erytrocyty a leukocyty se odstraní specifickou filtrací. Klíčovou výhodou metody buffy coat je možnost připravit velké dávky krevních destiček od několika dárců. Na druhé straně, aferéza je založena na oddělení trombocytů z krve jediného dárce. Přestože koncentrace trombocytů jsou méně kontaminovány leukocyty a erytrocyty, metoda je časově náročná a vyžaduje komplexní přístroje. V klinické praxi mohou být trombocyty pro chirurgickou aplikaci izolovány na místě specifickými koncentrátory. Systémy jsou založeny na různých modifikacích metody buffy coat a jsou komerčně dostupné pod obchodními názvy jako Plateltex, SmartPReP, PCCS a Magellan<sup>63,246</sup>. Z aplikačního hlediska komerční metody umožňují izolaci autologních trombocytů. Klíčovými výhodami autologních trombocytů jsou eliminace přenosu onemocnění a možné imunitní reakce a vysoká kompatibilita s pacientem. Na druhé straně alogenní trombocytární přípravky umožňují rychlé dárceství i u pacientů v život ohrožujících stavech. Všechny alogenní přípravky na bázi buffy coatu také umožňují eliminaci interindividuálních variabilit přípravou smíšených izolátů trombocytů od různých dárců. Význam tohoto problému zdůraznil Lohmann a kol., který pozoroval vztah mezi věkem pacienta a proliferací MSC<sup>248</sup>.

Izolované trombocytární přípravky se ve svých vlastnostech velmi liší. Podle Dohan Ehrenfest a kol., mohou být trombocytární produkty rozděleny na čisté PRP (P-PRP), leukocyty a PRP (L-PRP), čistý fibrin bohatý na trombocyty (P-PRF) a fibrin bohatý na leukocyty a trombocyty (L-PRF)<sup>63,246</sup>. Rozdíl je v přítomnosti leukocytů a aktivačním stavu trombocytů. V této studii jsme použili P-PRP pro adhezi k vláknům. Na druhé straně aktivované krevní destičky poskytují zajímavé vlastnosti pro aplikace tkáňového inženýrství.

Pokud jsou trombocyty aktivovány, vytvářejí fibrinovou síť a uvolňují růstové faktory a cytokiny. Fibrinová síť je používána jako nosičový materiál. Dosud vykazovaly trombocyty slibný přínos zejména v oblasti rekonstrukce obličejových kostí. Fibrinové gely připravené z trombocytů vykazují vysokou adhezi buněk a jejich proliferaci<sup>65</sup> a zlepšují kostní obnovu<sup>249,250</sup>. Nicméně fibrinové gely připravené aktivací trombocytů jsou stabilní pouze několik dní. Rychlá degradace fibrinu byla popsána v několika studiích<sup>251–253</sup>. Bardsley a kol. zjistili vysokou počáteční *in vitro* degradaci fibrinového gelu mezi 0. až 5. dnem<sup>252</sup>. Bylo ukázáno, že degradační rychlost byla zpomalena, pokud byl gel kombinován s kyselinou hyaluronovou a lamininem<sup>251</sup> nebo PEG<sup>254</sup>. Zatímco samotný fibrinový gel degraduje během 14 dnů kultivace, PEGylovaný fibrin zůstal neporušen. Kromě toho je velikost pórů fibrinového gelu nižší vzhledem k morfologii fibrinových vláken<sup>255</sup>, a proto je penetrace buněk spojena s degradací fibrinového gelu<sup>252</sup>. Na druhou stranu je PCL biokompatibilním a biologicky odbouratelným polymerem, který degraduje během několika měsíců<sup>256</sup>. Materiál navržený v této studii ukazuje delší stabilitu a je vhodnější pro rekonstrukci kritických defektů, které vyžadují prodlouženou stabilizaci nosičů. Pomalá degradace umožňuje buňkám syntetizovat ECM a postupně vytvářet novou tkáň. Zvláště kostní regenerace v kritických kostních defektech (tj. dlouhé kosti a velké extrakce) trvá několik měsíců. U takových indikací fibrinový gel nemůže vykazovat dostatečnou stabilitu. Materiál v této studii ukázal, že adherované trombocyty byly schopné tvořit fibrinovou síť na vláknech a vykazovaly lepší počáteční buněčnou

adhezi ve srovnání s čistým PCL nosičem. Kromě toho technologie odstředivého zvlákňování umožňuje vytvoření velkých nadýchaných nosičů s propojenými póry, umožňujících penetraci buněk. Z hlediska uvolňování bioaktivních látek je přidání trombocytů klíčem k dodání aktivních molekul. Dodávání růstových faktorů zlepšilo kolonizaci nosičů jak *in vitro*<sup>257</sup>, tak *in vivo*<sup>258</sup>.

Význam adheze trombocytů k povrchu vláken je především v jejich imobilizaci. Výsledky SEM a uvolňovacích testů ukázaly, že trombocyty dodávaly aktivní molekuly po dobu několika dní. Aktivní molekuly identifikované v trombocytech mohou proto zlepšit regeneraci tkání. Pro srovnání s fibrinovým gelem, studie Dohan Ehrenfest a kol. ukázala, že trombocytový fibrinový gel uvolňoval růstové faktory až 7 dní<sup>259</sup>. Předkládaná studie ukázala, že trombocyty přichycené k vláknům uvolňují růstové faktory i po 7. dni. Věříme, že tento jev byl pozorován z důvodu degradace čistého fibrinu při kolonizaci hlubší vrstvy nosiče a uvolnění napojených růstových faktorů. Mechanismus uvolnění v tomto systému může být spojen se dvěma jevy. Neporušené trombocyty byly na nosičích i po 14 dnech inkubace, což naznačuje, že jsou životaschopné a schopné vylučovat svůj obsah. Druhý mechanismus pro prodloužené uvolňování je spojen s degradací fibrinové sítě. Fibrinová síť váže růstové faktory a prostřednictvím degradace jsou tyto proteiny uvolněny. Po 14 dnech byl pozorován jak snížený počet neporušených trombocytů na nosičích, tak degradovaná fibrinová síť. Proto bylo uvolňování oběma mechanismy oslabeno. Funkcionalizace vláknenných nosičů může být provedena zapouzdřením nebo povrchovou vazbou trombocytárních derivátů. Pouze v omezeném množství studií bylo zaznamenáno použití nosičů připravených odstředivým zvlákňováním pro řízené dodávání látek. Ve studii Mary a kol. byla použita směsná vlákna z PCL/polyvinylpyrolidonu (PVP) obohacená o tetracyklin pro řízené dodávání léčiv. Připravená vlákna vykazovala rychlé uvolňování léčiva, následované trvalým uvolňováním a dobrou antimikrobiální aktivitou proti bakteriím, které se běžně vyskytují při dermálních infekcích<sup>260</sup>. V současné studii jsme se zaměřili na dodávku látek podporujících regeneraci. Trombocyty byly adherovány k povrchu vláken a poskytly bioaktivní



molekuly. Výsledky testů metabolické aktivity a proliferace ukázaly, že faktory stimulovaly proliferaci buněk MG-63. Proliferace buněk závisí na dávce a se zvýšením koncentrace trombocytů vykazovaly buňky vyšší míru proliferace a zvýšenou metabolickou aktivitu.

MG-63 je buněčná linie odvozená od lidského osteosarkomu. Tyto buňky se často používají ve studiích tkáňového inženýrství ke studiu biokompatibility a tvorby kostní tkáně<sup>261–265</sup>. Na druhou stranu byly publikovány rozdíly mezi liniemi osteosarkomu a primárními osteoblasty<sup>266,267</sup>. Hlavní rozdíly byly zjištěny v kinetice proliferace, buněčné morfologii a syntéze proteinů ECM. Z tohoto důvodu budou nutné další experimenty s použitím primárních osteoblastů nebo MSC pro potvrzení pozitivního účinku systému vláknenného nosiče s trombocyty na specifickou buněčnou infiltraci a osteogenní diferenciaci.

Výsledky jsou podobné jako u Diaz-Gomez a kol.<sup>268</sup>, kteří zjistili, že adheze PRP k PCL nanovlákenům podporuje proliferaci MSC. Podobně, Buzgo a kol. zjistili, že alfa granule byly schopné stimulovat chondrogenní diferenciaci MSC<sup>269</sup>. Stimulační úloha trombocytů v kostní regeneraci byla dale potvrzena ve studiích Anjana a kol.<sup>270</sup>, Getgood a kol.<sup>271</sup> a Prosecká a kol.<sup>258</sup>.

Další výhodou povrchové funkcionalizace trombocyty ve srovnání s jejich zapouzdřením je mnohem jednodušší příprava nosičů. Systém umožňuje přípravu v ambulanci a řeší problémy spojené s dlouhodobým skladováním nosičů. Navíc použité trombocytů mohou být autologní, čímž se minimalizují rizika spojená s použitím alogenních trombocytů, jako je přenos nemocí a imunitní reakce. V této studii byla hodnocena efektivita systému v modelu osteoblastů MG-63. Vzorky funkcionalizované trombocyty vykazovaly zlepšenou proliferaci, metabolickou aktivitu a aktivitu ALP. Penetrace buněk je u konstruktů pro kostní tkáň nezbytná. Prosecká a kol. vyrobili kolagen/hydroxyapatitové pěnové nosiče připravené lyofilizací. Pěnový nosič však vykazoval problémy s propojením pórů<sup>258</sup>. V případě vláknenných nosičů vyrobených odstředivým zvlákněním

jsou póry vysoce propojeny a umožňují účinnou migraci buněk. Konfokální mikroskopie ukázala, že díky 3D struktuře vlákných nosičů buňky mohly proniknout hluboko do nosičů. Biologické vlastnosti systému popsané v této práci jsou proto jednoduchým a klinicky použitelným systémem protkáňové inženýrství kostí.

### **7.3.3 Závěr**

Kost je tkáň s 3D strukturou, proto je pro její regeneraci potřeba 3D nosič, který by podporoval buněčnou infiltraci a proliferaci. Nosiče by pro naplnění těchto požadavků měly mít velké, otevřené póry. Odstředivé zvláknování je jednoduchá metoda pro přípravu 3D vlákných nosičů s velkými propojenými póry. Proces regenerace kosti je nicméně komplexní a vyžaduje navíc stimulaci bioaktivními látkami. V tomto experimentu byl použit jednoduchý kompozitní nosič založený na adhezi trombocytů na 3D nosič připravený z PCL. Trombocyty byly použity jako přirozený zdroj růstových faktorů a cytokinů zapojených v procesu regenerace tkání. Imobilizací na vlákný nosič byla prodloužena jejich biologická dostupnost. Biologická účinnost navrženého systému byla testována s použitím buněčné linie MG-63. Buňky vykazovaly zvýšenou metabolickou aktivitu, proliferaci a aktivitu alkalické fosfatázy v porovnání s vlákným nosičem, který nebyl funkcionalizován. Buněčná odpověď byla navíc na dávce závislá. Se zvýšenou koncentrací trombocytů se zlepšovala biokompatibilita. Výsledky ukázaly, že tento systém je vhodný pro kostní tkáň.

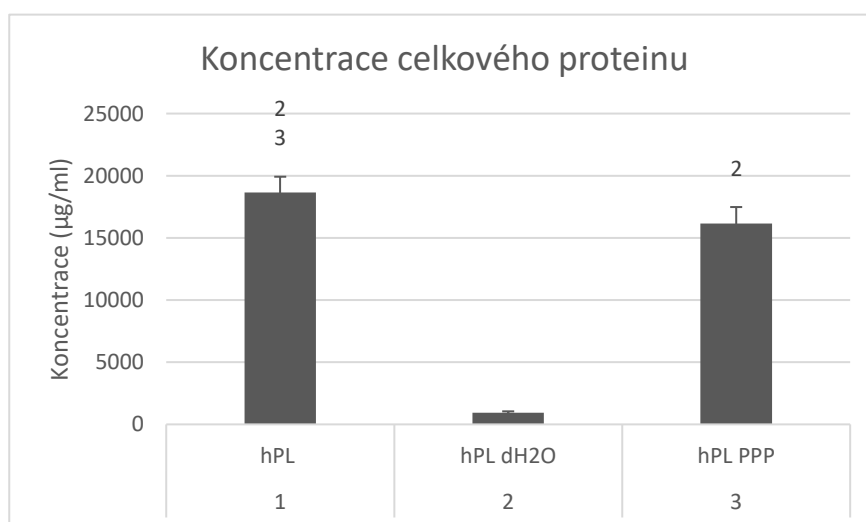
## 7.4 Porovnání jednotlivých složek trombocytárního koncentrátu a sledování jejich vlivu na buňky in vitro

Cílem studie byla příprava a charakterizace jednotlivých složek trombocytárního koncentrátu a jejich testování na proliferaci a metabolickou aktivitu MSC a fibroblastů.

### 7.4.1 Výsledky

#### 7.4.1.1 Koncentrace celkového proteinu a vybraných bioaktivních molekul

Byly připraveny 3 složky trombocytárního koncentrátu. Skupina hPL obsahovala trombocytární proteiny uchované v plazmě a náhradním roztoku, skupina hPL dH<sub>2</sub>O obsahovala trombocytární proteiny uchované v destilované vodě a skupina hPL PPP obsahovala plazmu s náhradním roztokem bez obsahu trombocytárních proteinů.



Obrázek 36 Koncentrace celkového proteinu. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Koncentrace celkového proteinu (obrázek 36) byla ve skupinách s obsahem plazmy (hPL, hPL PPP) statisticky významně vyšší než ve skupině obsahující pouze trombocyty (hPL dH<sub>2</sub>O).

Tabulka 4 Koncentrace fibrinogenu, albuminu a IGF-1 v jednotlivých složkách trombocytárního lyzátu

Vzorek	Koncentrace fibrinogenu (g/l)	Koncentrace albuminu (g/l)	Koncentrace IGF-1 (ng/ml)
1 hPL	0,50	8,47	32,43
2 hPL dH <sub>2</sub> O	< 0,50	< 2,00	< 11,15
3 hPL PPP	0,64	8,31	33,79

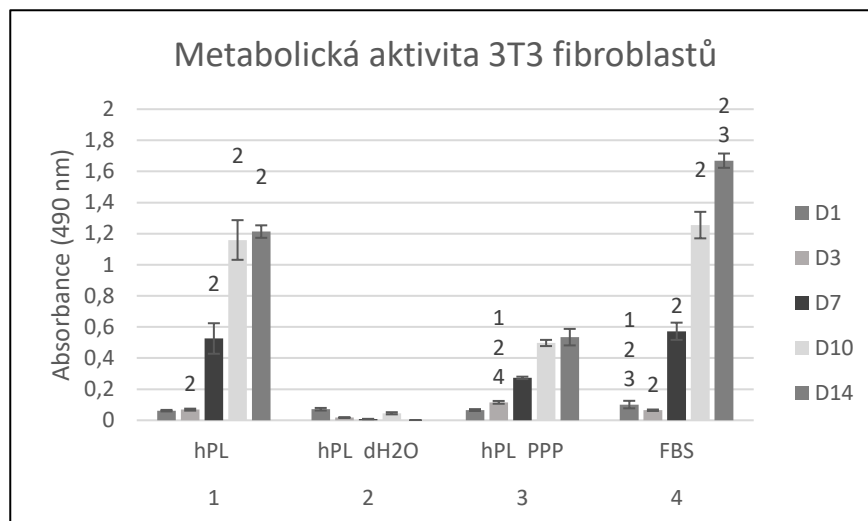
Byly měřeny koncentrace fibrinogenu, albuminu a IGF-1 (tabulka 4). Skupina obsahující pouze trombocyty měla všechny sledované markery pod detekčním limitem, ostatní skupiny vykazovaly téměř shodné koncentrace vybraných markerů.

Tabulka 5 Přehled naměřených bioaktivních látek v jednotlivých složkách trombocytárního lyzátu, statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) jsou značeny  $x > y$ ; číslo 1 značí skupinu hPL, číslo 2 značí skupinu hPL dH<sub>2</sub>O a číslo 3 značí skupinu hPL PPP. OOR < značí hodnoty pod detekčním limitem.

Cytokiny	1 hPL		2 hPL dH <sub>2</sub> O		3 hPL PPP		Statistika
	Koncentrace pg/ml	SD	Koncentrace pg/ml	SD	Koncentrace pg/ml	SD	
IL-1b	1,7	0,3	11,7	0,6	1,1	0,2	2>,1,3
IL-1ra	214,7	13,1	195,6	23,0	130,3	17,0	1>3; 2>3
IL-2	7,7	0,5	6,8	1,0	OOR <		
IL-4	1,2	0,1	3,1	0,4	OOR <		2>1
IL-5	39,4	5,3	65,1	4,3	OOR <		2>1
IL-6	15,6	4,0	5,4	0,6	3,2	0	1>3
IL-7	14,8	1,1	57,9	1,7	OOR <		2>,1
IL-8	19,2	1,2	21,4	1,9	10,7	1,6	1>3; 2>3
IL-9	95,4	3,1	138,8	7,7	85,5	3,3	2>,1,3
IL-15	222,5	37,7	415,9	48,1	OOR <		2>1
IL-17	17,7	1,1	56,4	5,6	12,3	1,7	2>3
IFN-g	9,7	1,2	66,1	0,4	5,3	0,5	2>,1,3; 1>3
TNF-a	57,2	3,5	83,3	6,4	39,4	1,0	2>3
<b>Růstové faktory</b>							
bFGF	67,6	4,7	82,9	5,1	42,5	7,0	1>3; 2>1,3
G-CSF	73,5	12,5	443,4	42,0	OOR <		2>1
GM-CSF	6,0	1,0	17,8	1,0	OOR <		2>1
PDGF-bb	1125,8	55,6	1340,6	12,6	295,1	3,8	2>3
<b>Chemokiny</b>							
Eotaxin	23,3	0,8	7,6	0,8	6,7	0,5	1>2,3
IP-10	225,0	5,4	38,13	0,5	31,1	1,8	1>2,3; 2>3
MCP-1	12,4	1,2	24,4675	1,5	4,8	0,5	2>1,3; 1>3
MIP-1a	1,3	0,07	1,445	0,1	1,1	0,1	2>3; 1>3
MIP-1b	1427,1	105,2	1496,05	33,2	1174,5	57,9	2>3
RANTES	16082,4	1729,8	33412,1	1431,1	9548,2	346,4	2>1,3; 1>3

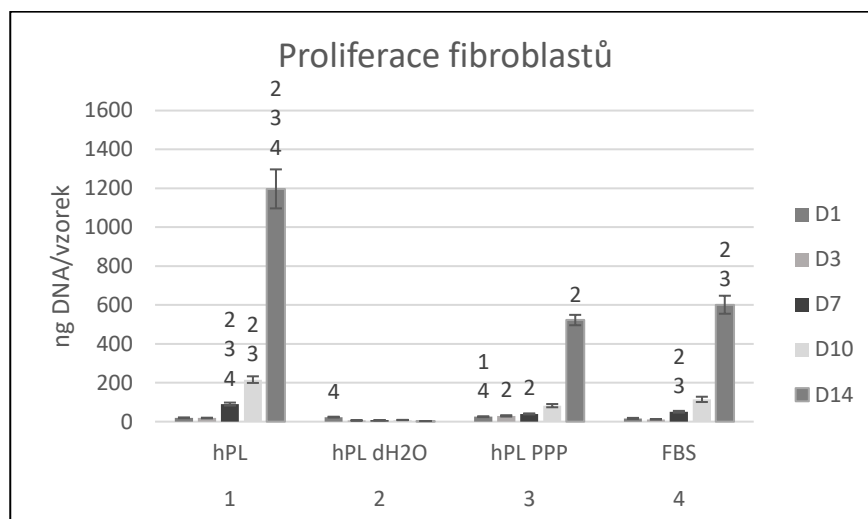
Pomocí analýzy Bio-plex byly měřeny koncentrace jednotlivých analytů (tabulka 5). Bylo zjištěno, že IL-1b, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, INF- $\gamma$ , bFGF, GM-CSF, G-CSF, VEGF, MCP-1 a RANTES byly ve skupině hPL dH<sub>2</sub>O významně vyšší než ve skupině hPL. IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-15, G-CSF, GM-CSF a VEGF byly ve skupině hPL PPP pod detekční limitem. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u chemotaktického faktoru RANTES ve všech sledovaných skupinách.

### 7.4.1.2 Metabolická aktivita a proliferace buněk



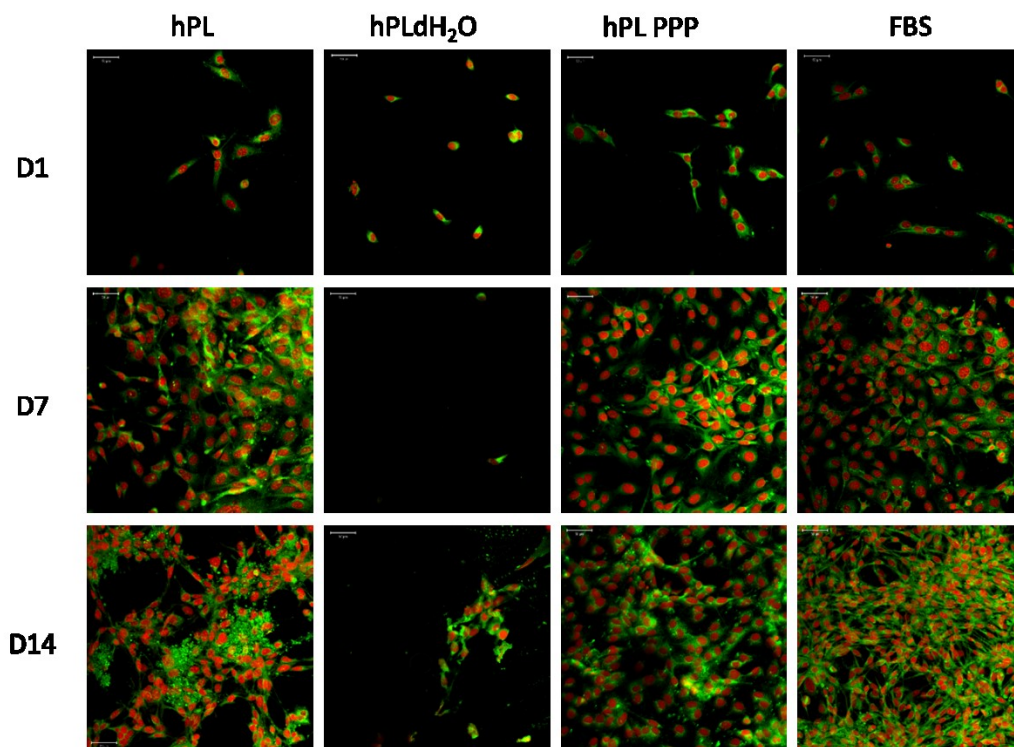
Obrázek 37 Metabolická aktivita fibroblastů. Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu. Čísla nad sloupcem v rámci experimentálního dne indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu (obrázek 37). Buňky významně lépe adherovaly na nosič suplementovaný FBS (1. den experimentu). U všech skupin s výjimkou hPL dH2O se viabilita zvyšovala postupně a u skupin hPL a FBS byla významně vyšší od 3. dne než ve skupině hPL dH2O. Metabolická aktivita buněk ve skupině hPL dH2O klesala a byla po celou dobu experimentu nižší než po nasazení.



Obrázek 38 Proliferace fibroblastů. Proliferace fibroblastů byla měřena pomocí fluorescenčního kitu. Čísla nad sloupcem v rámci experimentálního dne indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

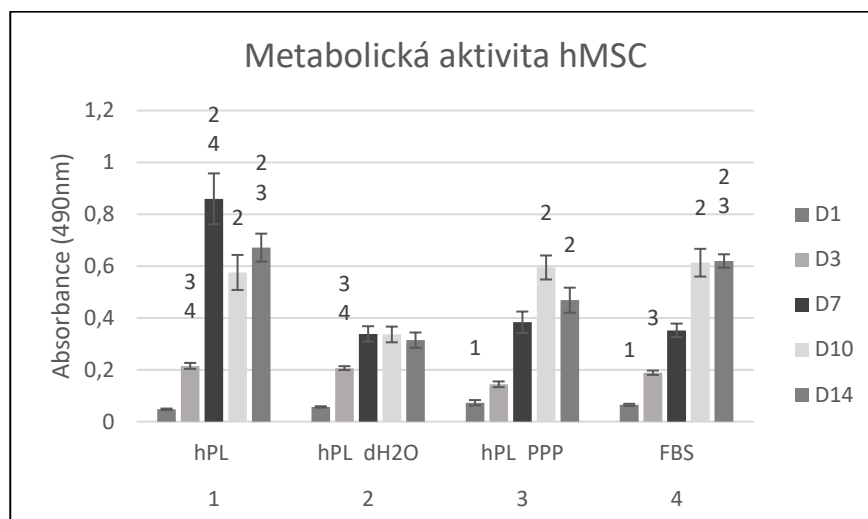
Proliferace fibroblastů byla hodnocena pomocí fluorescenčního kitu 1,3,7,10 a 14. den experimentu (obrázek 38). Všechny skupiny s výjimkou skupiny hPL dH2O vykazovaly postupný nárůst proliferace. Ve skupině hPL byla proliferace významně vyšší 7. a 14. den experimentu oproti všem ostatním skupinám. Všechny skupiny vykazovaly významně vyšší proliferaci 14. den experimentu než skupina suplementovaná pouze trombocyty. Samotné trombocyty neměly dostačující účinek pro podporu buněčné proliferace, která během experimentu nevykazovala žádný nárůst.



Obrázek 39 Snímky z konfokální mikroskopie fibroblastů 1., 7. a 14. den. Zelená barva charakterizuje buněčné membrány (barvení DiOC-6), červená barva značí jádra (barvení propidium jodid). Zvětšení 200x, měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

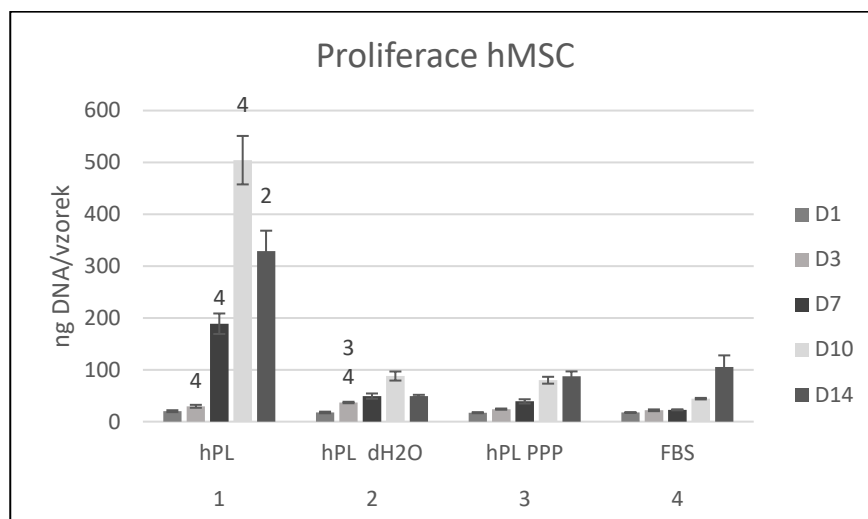
Snímky z konfokální mikroskopie (obrázek 39) ukazují, že ve všech skupinách s výjimkou skupiny hPL dH<sub>2</sub>O byly buňky dobře rozprostřeny a vykazovaly morfologii typickou pro fibroblasty. Ve skupině hPL dH<sub>2</sub>O byly buňky ve shlucích, což značí nepříznivé podmínky. Snímky z konfokální mikroskopie jsou ve shodě s výsledky s výsledky z MTS testu a stanovení obsahu DNA.





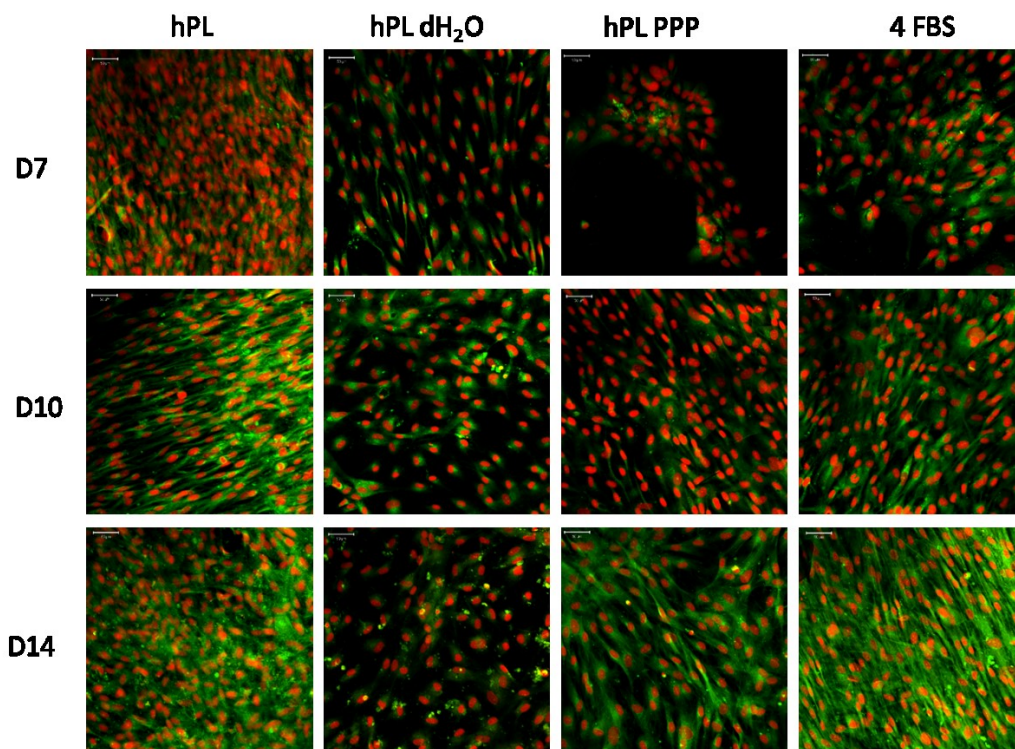
Obrázek 40 Metabolická aktivita hMSC. Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu. Čísla nad sloupcem v rámci experimentálního dne indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Metabolická aktivita hMSC byla měřena pomocí MTS testu (obrázek 40). Adheze buněk první den experimentu byla významně vyšší ve skupinách suplementovaných pouze plazmou (hPL PPP) a FBS oproti skupině s úplným lyzátem (hPL). Metabolická aktivita hMSC narůstala v průběhu celého experimentu u skupiny suplementované FBS. Skupina suplementovaná úplným trombocytárním lyzátem (hPL) vykazovala výrazný nárůst metabolické aktivity mezi 3. a 7. dnem a poté mírně klesla. Byla však významně vyšší než ve skupině suplementované pouze trombocyty (hPL dH<sub>2</sub>O). Viabilita ve skupině suplementované pouze trombocyty (hPL dH<sub>2</sub>O) mírně stoupala až do 7. dne a poté stagnovala. Skupina suplementovaná pouze plazmou (hPL PPP) a kontrolní skupina s FBS vykazovala od 10. dne experimentu významně vyšší viabilitu v porovnání se skupinou hPL dH<sub>2</sub>O.



Obrázek 41 Proliferace hMSC. Proliferace hMSC byla měřena pomocí fluorescenčního kitu. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

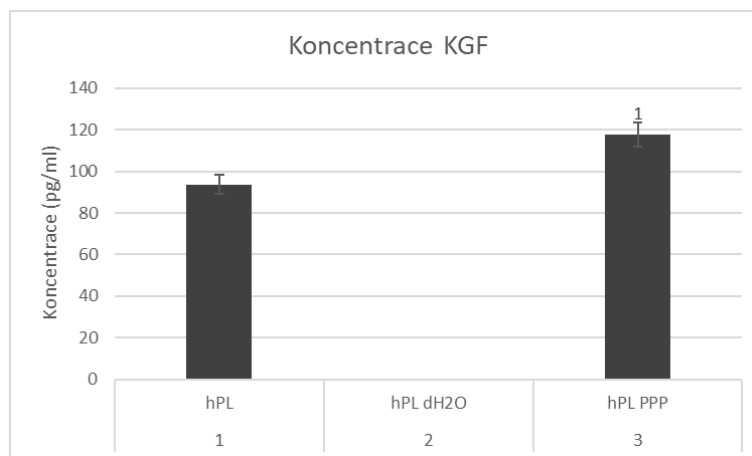
Proliferace hMSC byla hodnocena pomocí fluorescenčního kitu (obrázek 41). Proliferace hMSC postupně narůstala u všech sledovaných skupin s výjimkou skupiny hPL, kde byl viditelný růstový spurt mezi 7. a 10. dnem a poté proliferace klesala. 7. a 10. den experimentu byla proliferace ve skupině hPL významně vyšší než v kontrolní skupině FBS, poslední den experimentu byla významně vyšší než ve skupině hPL dH<sub>2</sub>O. Výsledky jsou ve shodě s výsledky z MTS testu.



Obrázek 42 Snímky z konfokální mikroskopie hMSC 7., 10. a 14. den. Zelená barva charakterizuje buněčné membrány (barvení DiOC-6), červená barva značí jádra (barvení propidium jodid). Zvětšení 200x, měřítko 50  $\mu$ m.

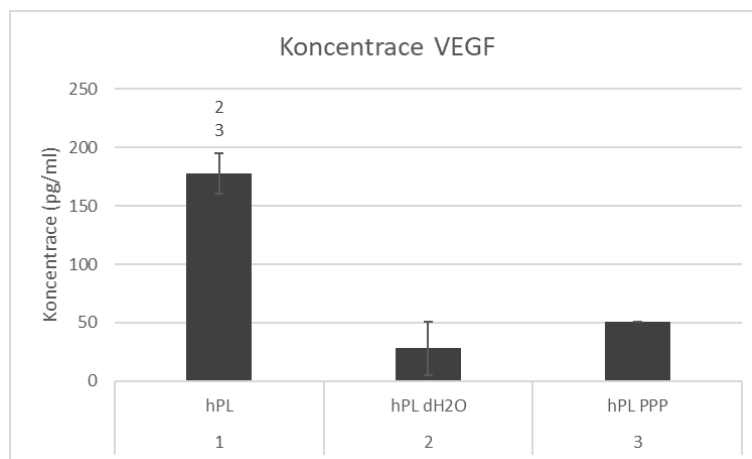
Snímky z konfokální mikroskopie (obrázek 42) ukazují, že buňky dobře proliferovaly ve všech skupinách kromě skupiny suplementované pouze trombocyty, kde byly buňky sice dobře rozprostřené, ale bylo jich výrazně méně než v ostatních skupinách. Buňky ve skupině hPL byly téměř konfluentní již 10. den experimentu.

### 7.4.1.3 Koncentrace vybraných růstových faktorů



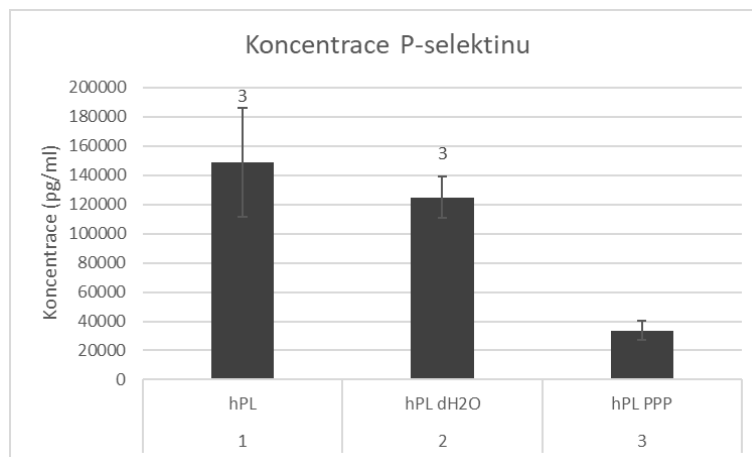
Obrázek 43 Koncentrace KGF měřené pomocí ELISA testu v jednotlivých experimentálních skupinách. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Byla měřena koncentrace KGF pomocí ELISA testu (obrázek 43). Bylo zjištěno, že koncentrace ve skupině hPL dH<sub>2</sub>O byla pod detekčním limitem. Ve skupině hPL PPP byla koncentrace KGF významně vyšší než ve skupině hPL.



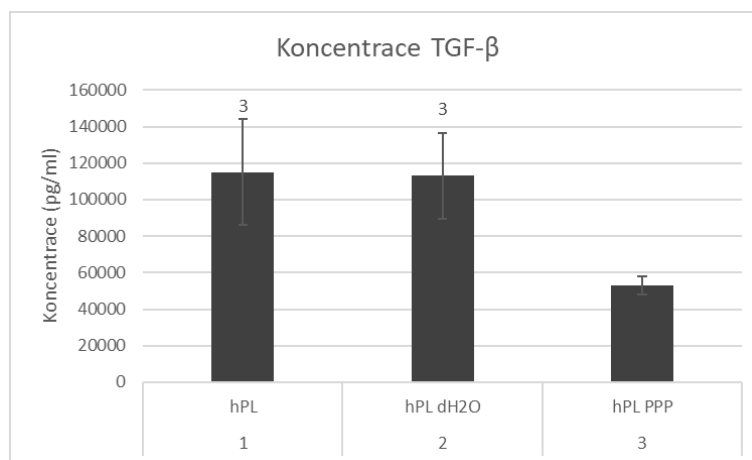
Obrázek 44 Koncentrace VEGF měřené pomocí ELISA testu v jednotlivých experimentálních skupinách. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Koncentrace VEGF byla stanovena pomocí ELISA testu (obrázek 44). Ve vzorku hPL byla statisticky významně vyšší než ve skupinách hPL dH<sub>2</sub>O a hPL PPP.



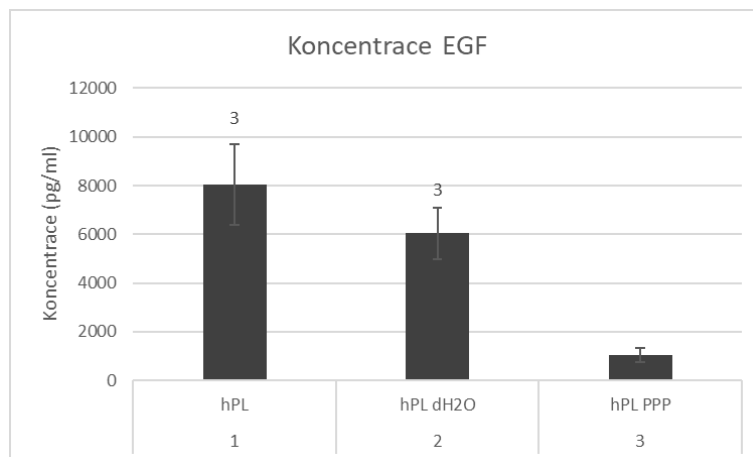
Obrázek 45 Koncentrace P-selektinu měřené pomocí ELISA testu v jednotlivých experimentálních skupinách. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Koncentrace P-selektinu jako marker aktivace trombocytů byla ve vzorcích obsahujících trombocyty (hPL, hPL dH<sub>2</sub>O) statisticky významně vyšší než ve skupině obsahující pouze plazmu (hPL PPP) (obrázek 45).



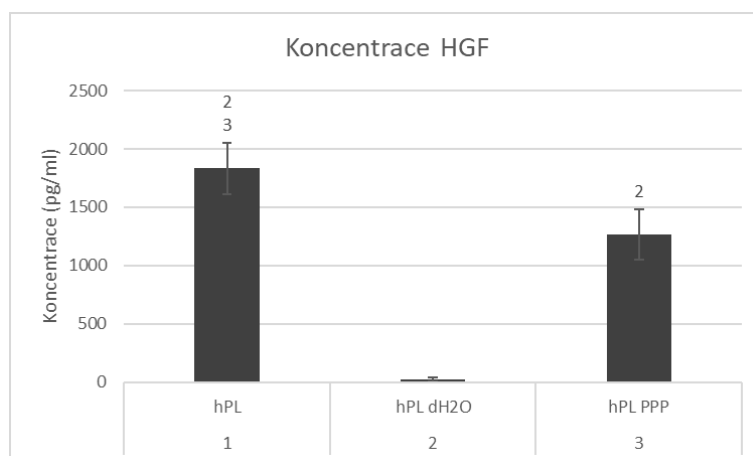
Obrázek 46 Koncentrace TGF- $\beta$  měřené pomocí ELISA testu v jednotlivých experimentálních skupinách. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Koncentrace TGF- $\beta$  byla statisticky významně vyšší ve skupinách s obsahem trombocytů (hPL, hPL dH<sub>2</sub>O) oproti skupině obsahující pouze plazmu (hPL PPP) (obrázek 46).



Obrázek 47 Koncentrace EGF měřené pomocí ELISA testu v jednotlivých expeperimentálních skupinách. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Koncentrace EGF byla významně vyšší ve skupinách hPL a hPL dH<sub>2</sub>O než ve skupině hPL PPP (obrázek 47).



Obrázek 48 Koncentrace HGF měřené pomocí ELISA testu v jednotlivých expeperimentálních skupinách. Čísla nad sloupcem indikují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

Koncentrace HGF byla statisticky významně vyšší ve skupinách s obsahem plazmy (hPL, hPL PPP) než ve skupině se samotnými trombocyty (hPL dH<sub>2</sub>O) (obrázek 48).

## 7.4.2 Diskuze

Příprava trombocytárního lyzátu směřuje ke snížení obsahu plazmy ve formulaci. Plazma obsahuje četné imunoglobuliny, které mohou interferovat s imunitním systémem při alogenním podání. Z tohoto důvodu jsme přistoupili k ověření koncentrace faktorů mezi lyzátem připraveným

v plazmě (hPL) a plazmě nahrazené destilovanou vodou (hPL dH<sub>2</sub>O). Jako kontrolní skupina byla použita plazma bez trombocytů.

Výsledky z multiplexové eseje (Bioplex) ukázaly signifikantně vyšší koncentraci IL-1b, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, IFN- $\gamma$ , bFGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 a RANTES ve vzorku hPL dH<sub>2</sub>O oproti vzorkům hPL a hPL PPP. Vybrané bioaktivní molekuly byly dále kvantifikovány pomocí metody ELISA. Výhodou vůči multiplexové eseji jsou inkubační podmínky, které jsou optimalizovány pro vazbu konkrétního proteinu. Výsledky ukázaly vyšší koncentraci TGF-beta, P-selektinu a EGF ve formulacích s trombocyty (hPL a hPL H<sub>2</sub>O) vůči hPL PPP. Uchování trombocytárních proteinů v dH<sub>2</sub>O (hPL dH<sub>2</sub>O) vedlo k signifikantně nižšímu uvolnění KGF, VEGF a HGF ve srovnání se skupinami s přítomností plazmy (hPL, hPL PPP). Překvapivě, v případě KGF a částečně HGF, jsme pozorovali jejich vysokou akumulaci v plazmě chudé na trombocyty (hPL PPP).

Rozdíly v koncentraci faktorů v plazmě bohaté na trombocyty (hPL) a plazmě chudé na trombocyty (hPL PPP) může souviset s teorií existence většího počtu frakcí  $\alpha$ -granul. V zásadě existují dvě protichůdné teorie zabývající se otázkou uložení bioaktivních látek v  $\alpha$ -granulích. První teorie předpokládá distribuci bioaktivních molekul náhodně mezi granulemi, ne ve specifických subpopulacích. Jonnalagadda a kol. stimulovali trombocyty pomocí různých agonistů a sledovali uvolňování bioaktivních molekul z  $\alpha$ -granul. Výsledky ukázaly, že uvolňování bioaktivních látek z  $\alpha$ -granul je stochastický proces kontrolovaný několika faktory, jako je například rozpustnost bioaktivních molekul, tvar granul a cesta fúze granulí a plazmatické membrány<sup>272</sup>. Kamykowski a kol. použili kvantitativní imunofluorescenci pro měření korelace 15 angiogenních proteinů obsažených v  $\alpha$ -granulích. Autoři vyslovili hypotézu, že bioaktivní molekuly jsou rozčleněny spíše v rámci granul než mezi granulemi<sup>273</sup>. Druhá teorie předpokládá, že  $\alpha$ -granule jsou rozděleny do jednotlivých subpopulací obsahujících různé bioaktivní molekuly. Tato teorie je podporovaná

studiemi, ve kterých bylo sledováno uvolňování bioaktivních molekul v reakci na různé agonisty. Chatterjee a kol. prokázali, že různé stimuly vyvolávají odlišnou sekreci a povrchovou expresi pro- a anti-angiogenních faktorů. Stimulace pomocí PAR1 nebo ADP vyvolala masivní uvolnění SDF-1 $\alpha$  a VEGF, ale slabé uvolnění PF4 a endostatinu. Stimulace pomocí PAR4 naopak vedla k uvolnění PF4 a endostatinu, ale slabému uvolnění SDF-1 $\alpha$  a VEGF. Tento efekt může být vysvětlen odlišným obsahem bioaktivních látek v různých subpopulacích  $\alpha$ -granul. Ve studii Batinelli a kol. aktivovali trombocyty pomocí ADP a tromboxanu A<sub>2</sub>. Aktivace pomocí ADP stimulovala uvolňování VEGF, ale ne endostatinu, zatímco aktivace pomocí tromboxanu A<sub>2</sub> měla opačný efekt<sup>274</sup>. Heterogenita  $\alpha$ -granul může být také hodnocena pomocí lokalizace membránových proteinů<sup>275</sup> nebo jejich morfologie<sup>276</sup>. Výsledky napovídají, že KGF a HGF jsou sekretovány z trombocytů v průběhu skladování a jsou tedy akumulovány v plazmě. Částečná sekrece je podložena i částečným uvolněním solubilního P-sektinu jako markerové molekuly uvolnění alfa-granulí ve vzorku hPL PPP. Uvolněné množství je nižší než u lyzovaných vzorků s trombocyty, a tedy značná část alfa-granul nebyla před lyzací sekretována.

Rozdíly v uvolnění mezi formulací vzorků v plazmě (hPL, hPL PPP) a destilované vodě (hPL dH<sub>2</sub>O) může souviset s vazbou na nosičové proteiny, jako jsou fibrinogen, albumin a další komponenty krevní plazmy. Jelikož formulace hPL dH<sub>2</sub>O obsahovala výrazně nižší koncentraci proteinu, nedocházelo u nich k sekvestraci a možnému snížení vazebného účinku při imunodetekčních metodách nebo ke snížení funkce molekul. Cannon a kol. stanovovali IL-1b v lidské plazmě nebo séru. Zjistili, že IL-1b může být navázán na větší nosičové proteiny, a proto může být v plazmě hůře detekován<sup>277</sup>. V našem případě jsme pozorovali nižší koncentraci IL-1b ve vzorku s plazmou než ve vzorku s dH<sub>2</sub>O. Biologicky však sekvestrace proteinu může být důležitá pro vazbu receptorů a koreceptorů u cílových buněk. Sahni a kol. sledovali vazbu IL-1beta k fibrinogenu. Dospěli k tomu, že IL-1 $\beta$  se na rozdíl od IL-1 $\alpha$  váže s vysokou afinitou k fibrinogenu a v této vázané



formě se zvyšuje jeho aktivita<sup>278</sup>. Vazba na plazmatické proteiny je důležitá pro další signální molekuly. Martino a kol. sledovali vazbu růstových faktorů k fibrinogenu přes heparinovou vazebnou doménu. Zjistili, že růstové faktory z rodiny PDGF/VEGF, FGF a TGF- $\beta$ , stejně jako růstové faktory z rodiny neurotrofinů se váží k fibrinogenu. Růstové faktory, které se nevázaly k fibrinogenu, byly rychle uvolňovány z fibrinové matrice, zatímco růstové faktory, které se ukázaly vázané, byly v matrici zachovány. PDGF-BB sice vykazoval silnou vazbu k fibrinogenu, ale byl z matrice uvolňován velmi rychle<sup>279</sup>. V našem experimentu se koncentrace PDGF-BB ukázala podobná ve vzorcích hPL a hPL dH<sub>2</sub>O. Mělo by být zmíněno, že vzorky s obsahem heparinizované plazmy mohou po opakovaném mrazení a rozmrazování obsahovat precipitované proteiny, a proto může být jejich identifikace ztížena<sup>280,281</sup>. Uchování vzorků s buněčnými komponenty po čas delší než dvě hodiny také významně mění koncentraci některých cytokinů, které jsou buď degradovány, absorbovány nebo naopak produkovány buňkami<sup>282</sup>. Výše zmíněné efekty mohou působit i na ostatní typy mediátorů, u kterých zatím nebyly posuzovány.

Fibroblasty jsou základními buňkami vazivové tkáně tvořené diferenciací buněk mezenchymálního původu s významem zejména při regeneraci pojivových tkání, kůže a vnitřních ran. Fibroblasty adherovaly při aplikaci různých lyzátů na povrch kultivačních jamek podobně ve všech skupinách. Nicméně jejich metabolická aktivita i proliferace byly u skupiny hPL dH<sub>2</sub>O nízké po celou dobu experimentu. Jedným z důvodů může být TNF- $\alpha$ , který byl u skupiny obsahující pouze trombocyty naměřen 1,5x vyšší než u skupiny obsahující plazmu i trombocyty. Jedná se o pleiotropní cytokin, který má rozličné funkce včetně indukce apoptózy, kterou způsobuje u mnoha typů buněk včetně fibroblastů<sup>283</sup>. Frankel a kol. sledovali vliv TNF- $\alpha$  na normální a fibrotické plicní fibroblasty. Zjistili, že bazální rezistence fibroblastů k Fas- indukované apoptóze je překonána senzibilizací TNF- $\alpha$ <sup>284</sup>. Graves a kol. provedli experiment, při kterém inokulovali myším divokého typu a myším bez TNF receptoru *Porphyromonas gingivalis*. Inokulace touto bakterií stimulovala produkci TNF a

apoptózu fibroblastů, která byla ale výrazně redukována u myší TNFR<sup>-/-</sup>. To naznačuje, že tato bakterie stimuluje produkci TNF a ten způsobuje programovanou buněčnou smrt fibroblastů<sup>285</sup>.

Dalším důvodem může být vyšší koncentrace IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  ovlivňuje řadu buněčných funkcí, jako je modulace imunitní odpovědi, indukce buněčné diferenciaci ale i inhibice buněčného růstu<sup>286,287</sup>. Nejčastěji blokuje buněčný cyklus v G1/S fázi. IFN- $\gamma$  transkripčně indukuje p21 a p27 inhibitory cyklin-dependentních kináz, které inhibují aktivitu komplexů cyklin E:CDK2 a cyklin D:CDK4, čímž blokuje buněčný cyklus na úrovni G1/S<sup>288</sup>. Ve vzorku hPL dH2O byly naměřeny významně vyšší koncentrace oproti ostatním vzorkům. Tento rozdíl může mít výrazný inhibiční efekt na proliferaci a viabilitu fibroblastů ve vzorku hPL dH2O. Ve studii Wang a kol. sledovali apoptózu fibroblastů rezistentních k mitomycinu. Bylo zjištěno, že kombinace IFN- $\gamma$  činí tyto fibroblasty citlivé na apoptózu zprostředkovanou Fas. IFN- $\gamma$  a INF- $\alpha$  má na senzibilizaci synergický efekt<sup>289</sup>.

Dalším důvodem může být absence stimulačních faktorů. Jedná se o absenci plazmatických proteinů, zejména fibrinogenu a albuminu. Albumin je jeden z nejhojněji zastoupených plazmatických proteinů. Studie Torada a kol. ukázala pozitivní vliv na proliferaci fibroblastů přidáním sérového albuminu do média<sup>290</sup>. Albumin byl ve vzorku bez obsahu plazmy pod detekčním limitem, což mohlo také ovlivnit životaschopnost fibroblastů. Dále pak je nižší koncentrace spektra růstových faktorů. Jedná se například o IGF-I, který byl ve vzorku naměřen v nejnižším množství. IGF-I je významný trofický faktor syntetizovaný v játrech a cirkulující v plazmě, ale nachází se i v  $\alpha$ -granulích trombocytů<sup>291</sup>. IGF-I stimuluje DNA syntézu fibroblastů<sup>292</sup> a vede ke zvýšení syntézy extracelulární matrix, hlavně kolagenů a proteoglykanů<sup>293</sup>. V našem experimentu byla koncentrace téměř shodná u obou vzorků obsahujících plazmu, zatímco ve vzorku bez plazmy byl IGF-I pod detekčním limitem. Koncentrace IGF-I tedy mohla ovlivnit chování fibroblastů. Dále byla naměřena nižší koncentrace EGF, HGF a KGF. Cytokiny jako PDGF, bFGF, TGF-beta a EGF však byly naměřeny v obdobných koncentracích jako vzorek s plazmou.

Inhibiční efekt byl tedy způsobený zejména pravděpodobně kombinací výše zmíněných vlivů. Jako klíčové se jeví vyšší efekt absence albuminu, chybějící trofický IGF-I a vysoké zastoupení TNF-alfa a INF- $\gamma$ .

Proliferace a metabolická aktivita byla nižší také u skupiny inkubované s plazmou chudou na trombocyty. U skupiny byla naměřena nízká koncentrace inhibičních cytokinů, jako je TNF-alfa, INF- $\gamma$  a IL-1b. Koncentrace plazmatických proteinů byla srovnatelná se skupinou hPL. Nižší však byla také koncentrace stimulačních růstových faktorů jako je bFGF, VEGF, PDGF-bb, G-SCF, GM-SCF, TGF-beta a EGF. Nižší míra proliferace a metabolické aktivity je tedy způsobena zejména nižší koncentrací těchto faktorů.

Celkově je tedy znatelný význam plazmatických proteinů a IGF-I, které v případě absence inhibují růst fibroblastů. Synergicky výhodnou je pak kombinace s růstovými faktory z trombocytů, které stimulují růst fibroblastů. Jako nejlepší se jeví hPL, ve kterém fibroblasty dosahovaly statisticky obdobných hodnot metabolické aktivity a lepších hodnot proliferační kapacity v porovnání s FBS. HPL se tedy jeví jako vhodná alternativa FBS. Eliminace plazmy a její výměna za dH<sub>2</sub>O není možná bez další optimalizace. Jako nejvhodnější se jeví suplementace pomocí albuminu, fibrinogenu a IGF-I. Otázkou zůstává úspěšnost z důvodu vyšších koncentrací inhibičních cytokinů (TNF-alfa, INF- $\gamma$ ), které mohou efekt suplementace snížit.

Adheze MSC byla první den experimentu podobná ve všech sledovaných vzorcích. Jejich viabilita a proliferace se nicméně v průběhu experimentu lišila. Vzorky bez obsahu plazmy nezajišťovaly buňkám dostatečnou výživu, takže buňky proliferovaly velice pomalu. Nicméně trend postupného nárůstu obsahu DNA a viability byl viditelný i u této skupiny. Zásadní je zejména zvýšená proliferace u hPL, která byla výrazně vyšší než u dalších skupin (včetně skupiny obsahující FBS).

Z pohledu efektu rozdílných cytokinů je u MSC obdobná inhibice pomocí TNF-alfa<sup>294</sup> a INF- $\gamma$ <sup>295</sup>. Wang et al. ukázali poškození samoobnovy a diferenciaci MSC pomocí NFkB signalizační kaskády<sup>295</sup>. Tudíž při inkubaci MSC s těmito růstovými faktory dochází k inhibici jako v případě fibroblastů. Efekt Il-1b a Il-6 na MSC je však jiný než na fibroblasty a stimuluje jejich kmenovost a imunomodulační funkce<sup>296–298</sup>. Působení těchto interleukinů zvyšuje jejich parakrinní signalizaci a vede k proliferaci buněk. Naopak, deficiencie IGF-I je pro MSC kritická. IGF-I signalizace má proliferativní účinek, anti-apoptický účinek a je důležitá pro správnou bFGF signalizaci<sup>299</sup>. U skupiny s dH<sub>2</sub>O (hPL dH<sub>2</sub>O) tudíž dochází k absenci IGF-I signalizace, a tím snížení proliferace u MSC. Kumulativní efekt absence IGF-I a vysoké koncentrace TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  tedy pravděpodobně způsobuje nízkou metabolickou aktivitu a proliferaci ve skupině hPL dH<sub>2</sub>O.

Vyšší proliferace MSC u skupiny hPL je způsobena, obdobně jako v případě fibroblastů, přítomností pro-proliferčních růstových faktorů jako je IGF-I<sup>299</sup>, bFGF<sup>300</sup>, TGF- $\beta$ <sup>301</sup>, PDGF-bb, EGF<sup>302</sup>, G-SCF<sup>303</sup> a GM-SCF<sup>304</sup>.

Pozitivní efekt těchto faktorů je patrný také ve srovnání se skupinou obsahující FBS. U MSC dochází působením trombocytárních faktorů ke zvýšení proliferace. Výsledky jsou konzistentní se studiemi Mishra a kol.<sup>72</sup> a Vogel a kol.<sup>71</sup>, kde PRP zlepšovala expanzi MSC.

### 7.4.3 Závěr

Trombokonzentrát a jeho deriváty jsou široce využívány pro kultivace buněk *in vitro*, ale i pro použití v regenerativní medicíně z důvodu zlepšení procesu hojení ran. Jednotlivé složky trombokonzentrátu však obsahují různé typy bioaktivních látek, které mohou mít na osud buněk jak pozitivní, tak negativní dopady. Plazma, jedna ze složek trombokonzentrátu, může při alogenním podání způsobit imunologické reakce na součásti plazmy, a proto je žádoucí ji pro určité aplikace nahradit. V tomto experimentu byly připraveny a ocharakterizovány jednotlivé složky trombocytárního koncentrátu na koncentrace vybraných bioaktivních látek a zároveň byly tyto složky

přidány do média a byl sledován jejich vliv na buněčné kultury *in vitro*. Bylo zjištěno, že trombocytární lyzát v destilované vodě ani samotná plazma nezajišťují dostatečnou proliferaci a viabilitu buněk. Ta je zajištěna až synergickým působením obou těchto složek.

## 8 Závěr

Trombocyty jsou v současné době v popředí zájmu v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně díky širokému zastoupení celé řady bioaktivních molekul příznivě ovlivňujících buněčný růst. Existuje celá řada trombocytárních preparátů s rozdílnými účinky na cílové buňky. Charakterizace těchto preparátů je nezbytná pro pochopení jejich působení.

V prvním experimentu byly optimalizovány podmínky kultivace dermálních buněk v přítomnosti trombocytárního lyzátu. Kultivace buněk pro využití v regenerativní medicíně vyžaduje náhradu FBS, které by mohlo vyvolávat xenogenní imunizaci. Trombocytární lyzát byl nejprve charakterizován, přičemž bylo zjištěno, že nejhojněji zastoupenými mediátory je chemokin RANTES a růstový faktor PDGF. Při testování s buněčnými kulturami bylo zjištěno, že již 7% lyzát je schopen nahradit 10% FBS v kultivačním médiu keratinocytů a fibroblastů. Zajímavostí bylo, že jednotlivé buněčné typy reagovaly na snížení nebo zvýšení bioaktivních látek v médiu různě. Zatímco vyšší koncentrace hPL v kombinaci s FBS měla na fibroblasty inhibiční efekt, v případě keratinocytů byl zaznamenán pozitivní efekt kombinace obou doplňků. Samostatný lyzát nepodporoval proliferaci melanocytů, naopak v kombinaci s FBS měl pozitivní efekt a to na dávce závislým způsobem. Tato zjištění ukazují na důležitost optimalizace kultivačních podmínek pro klinické aplikace.

V dalších částech byly vyvinuty kompozitní nosiče s trombocyty. Planární, elektrostatickým zvlákněním připravený nosič obohacený o trombocyty byl optimalizován pro použití jako kryt na hojení ran. Naopak 3D nanovláknenný nosič připravený centrifugačním zvlákněním obohacený o trombocyty byl vyvinut s cílem hojení kostních defektů. Výhoda těchto nosičů spočívá zejména v jednoduchosti jejich přípravy, kdy jsou trombocyty na nanovláknena pasivně adherovány. Tento proces může probíhat například na operačním sále s použitím autologních trombocytů od pacienta. Takto připravený systém představuje jednoduché řešení, které je snadno použitelné pro klinickou praxi.

Trombocytární koncentrát se skládá z několika složek, přičemž každá může mít odlišný vliv na růst buněk. Plazma, jedna ze složek koncentrátu, obsahuje četné imunoglobuliny, které mohou interferovat s imunitním systémem při alogenním podání. Proto je vhodné její koncentraci v trombocytárním lyzátu snižovat. Jednotlivé složky trombocytárního lyzátu byly v další části práce ocharakterizovány a použity jako doplněk pro kultivaci buněk. Bylo zjištěno, že samotné trombocyty neobsahují dostatečné koncentrace bioaktivních látek, které by stimulovaly buněčný růst. Navíc, zastoupení jednotlivých faktorů se značně liší mezi jednotlivými složkami. Pro kultivaci vybraných buněk se jako nejvhodnější jevil trombocytární lyzát, který v 8% koncentraci mohl nahradit FBS. Samostatné trombocyty nebo plazma nebyly pro kultivaci buněk dostačující. Je tedy zřejmé, že pouze synergický efekt plazmy a trombocytů dostatečně zajišťuje růst buněk, přičemž tento efekt musí být při kultivaci buněk zohledňován.

## 9 Souhrn

Cílem této práce bylo připravit různé typy krevních derivátů, jejich charakterizace a *in vitro* testování. Krevní deriváty byly testovány jak samostatně, tak v kombinaci s nanovláknými nosiči připravenými elektrostatickým a centrifugačním zvlákněním.

V prvním experimentu byl připraven a ocharakterizován trombocytární lyzát, který byl v různých koncentracích přidáván do média samostatně nebo v kombinaci s FBS ke kulturám dermálních buněk. Bylo zjištěno, že již 7% destičkovým lyzátem je možné nahradit 10% FBS v kulturách fibroblastů a keratinocytů. V dalším experimentu byly připraveny a ocharakterizovány trombocyty, které byly v různých koncentracích adherovány na nanovlákné nosiče a byly sledovány uvolňovací charakteristiky růstových faktorů a vliv takto funkcionalizovaných nosičů na dermální buňky. Trombocyty vytvořily po kontaktu s povrchem nanovlákných nosičů fibrinovou síť, ve které byly imobilizovány růstové faktory, díky čemuž došlo k jejich prodlouženému uvolňování z nosiče. Takto připravené nosiče měly pozitivní vliv na proliferaci a metabolickou aktivitu dermálních buněk. Ve třetím experimentu byly připravené trombocyty ocharakterizovány a jejich jednoduchou adhezí byl připraven PCL kompozitní nosič. Tento systém byl testován s pomocí buněčné linie MG-63. Bylo prokázáno zlepšení proliferace, metabolické aktivity a aktivity alkalické fosfatázy na nosičích s trombocyty oproti kontrolním nosičům. V posledním experimentu byly připraveny jednotlivé složky trombocytárního koncentrátu, které byly ocharakterizovány a byl sledován jejich vliv na MSC a fibroblasty. Nejvhodnějším suplementem se ukázal být trombocytární lyzát.

Z výsledků je zřejmé, že trombocyty obsahují celou řadu bioaktivních molekul příznivě ovlivňujících chování buněk, takže mohou, jako zdroj růstových faktorů, sloužit v celé řadě aplikací, zvláště pokud jsou kombinovány s vhodnými nosiči.



## 10 Summary

The aim of this study was preparation of blood derivatives and its *in vitro* testing. Blood derivatives were tested alone or in combination with nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning or centrifugal spinning.

In the first experiment, a platelet lysate was prepared and characterized. Subsequently, it was added in different concentrations to the media alone or in combination with FBS. Its effect on dermal cells was observed. It was found that 7% platelet lysate was sufficient to replace FBS in fibroblast and keratinocyte culture. In the following experiment, platelets were prepared and characterized. Consequently, they were adhered in different concentrations onto nanofibrous scaffolds and release kinetic of growth factors and their effect on dermal cells were tested. Platelets, after contact with the nanofibers, created fibrin network where the growth factors were immobilized. Thus, a prolonged release of growth factors was obtained. These composite scaffolds positively influenced metabolic activity and proliferation of dermal cells. In the third experiment, characterized platelets were passively adhered to PCL scaffolds. This system was tested using MG-63 cell line. The enhancement of proliferation, metabolic activity and alkaline phosphatase activity in comparison with control scaffolds was observed. In the last experiment, individual components of platelet concentrate were prepared and characterized and the effect on MSCs and fibroblasts was observed. The most promising supplement was platelet lysate.

The results indicate that platelets contain a range of the bioactive molecules positively influencing the cell behavior. They can serve as a source of growth factors in broad spectrum of applications, especially if combined with suitable scaffolds.

## 11 Reference

1. Trojan, S. *Lékařská fyziologie*. (Grada, 2003).
2. Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S. & Simon, H.-U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* **34**, 398–409 (2013).
3. Hall, J. E. (John E. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. (2016).
4. Ganong, W. F. *Review of medical physiology*. (McGraw Hill, 2001).
5. Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T. M. & Pamer, E. G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 421–52 (2008).
6. Mancuso, M. E. & Santagostino, E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. *Br. J. Haematol.* **178**, 209–219 (2017).
7. Caparrós-Pérez, E. *et al.* Comprehensive comparison of neonate and adult human platelet transcriptomes. *PLoS One* **12**, e0183042 (2017).
8. Michelson, A. D. *Platelets*. (Academic Press/Elsevier, 2007).
9. Patel, S. R., Hartwig, J. H. & Italiano, J. E. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.* **115**, 3348–54 (2005).
10. Thon, J. N. & Italiano, J. E. Platelet Formation. *Semin. Hematol.* **47**, 220–226 (2010).
11. Geraldo, R. B. *et al.* Platelets: still a therapeutical target for haemostatic disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 17901–19 (2014).
12. White, J. G. Current concepts of platelet structure. *Am. J. Clin. Pathol.* **71**, 363–78 (1979).
13. Quinn, M. & Fitzgerald, D. *Platelet function : assessment, diagnosis, and treatment*. (Humana Press, 2005).
14. Shapiro, A. D. Platelet function disorders. *Haemophilia* **6 Suppl 1**, 120–7 (2000).

15. Cimmino, G. & Golino, P. Platelet Biology and Receptor Pathways. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **6**, 299–309 (2013).
16. Kieffer, N., Boizard, B., Didry, D., Wautier, J. & Nurden, A. Immunochemical characterization of the platelet-specific alloantigen Leka: a comparative study with the PLA1 alloantigen. *Blood* **64**, (1984).
17. Bhatt, D. L. *Platelets in cardiovascular disease*. (Imperial College Press, 2008).
18. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* **23**, 177–89 (2009).
19. Fitch-Tewfik, J. L. & Flaumenhaft, R. Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 77 (2013).
20. Kamath, S., Blann, A. D. & Lip, G. Y. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur. Heart J.* **22**, 1561–71 (2001).
21. Rendu, F. & Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **12**, 261–73 (2001).
22. Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A. & Du, X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2341–9 (2010).
23. Moroi, M. & Jung, S. M. Integrin-mediated platelet adhesion. *Front. Biosci.* **3**, d719-28 (1998).
24. Pecka, M. & Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu. [2. díl], Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. (FINIDR, 2006).
25. Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis. *Nat. Med.* **8**, 1227–1234 (2002).
26. Traversa, B. & Sussman, G. *The Role of Growth Factors, Cytokines and Proteases in Wound Management*. (Cambridge Pub, 2008).
27. Frei, R., Biosca, F. E., Handl, M. & Trc, T. [The role of growth factors in the human organism and their use in medicine, especially in orthopedics and traumatology]. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* **75**, 247–52 (2008).

28. Ozaki, K. & Leonard, W. J. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol. Chem.* **277**, 29355–8 (2002).
29. Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **22**, 1276–312 (2008).
30. Heldin, C.-H. & Westermark, B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol. Rev.* **79**, 1283–1316 (1999).
31. Sporn, M. B. & Roberts, A. B. *Peptide Growth Factors and Their Receptors I.* (Springer Berlin Heidelberg, 1990).
32. Levéen, P. *et al.* Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* **8**, 1875–87 (1994).
33. Soriano, P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* **8**, 1888–96 (1994).
34. Raghavendran, H. R. B. *et al.* Synergistic interaction of platelet derived growth factor (PDGF) with the surface of PLLA/Col/HA and PLLA/HA scaffolds produces rapid osteogenic differentiation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **139**, 68–78 (2016).
35. Jin, Q. *et al.* Nanofibrous scaffolds incorporating PDGF-BB microspheres induce chemokine expression and tissue neogenesis in vivo. *PLoS One* **3**, e1729 (2008).
36. Bates, D. O., Lodwick, D. & Williams, B. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation* **6**, 83–96 (1999).
37. Bernatchez, P. N., Soker, S. & Sirois, M. G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J. Biol. Chem.* **274**, 31047–54 (1999).
38. Yang, Z. *et al.* Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose. *Apoptosis* **13**, 1331–1343 (2008).
39. Springer, M. L., Chen, A. S., Kraft, P. E., Bednarski, M. & Blau, H. M. VEGF gene delivery

- to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol. Cell* **2**, 549–58 (1998).
40. Lee, R. J. *et al.* VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* **102**, 898–901 (2000).
  41. Carmeliet, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435–9 (1996).
  42. Ferrara, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439–442 (1996).
  43. Xia, B. & Lv, Y. Dual-delivery of VEGF and NGF by emulsion electrospun nanofibrous scaffold for peripheral nerve regeneration. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **82**, 253–264 (2018).
  44. Stone, D., Phaneuf, M., Sivamurthy, N., LoGerfo, F. W. & Quist, W. C. A biologically active VEGF construct in vitro: implications for bioengineering-improved prosthetic vascular grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* **59**, 160–5 (2002).
  45. Oliveira, A. L. de A. *et al.* Vascular endothelial growth factor association with angiopoietin 1 promotes improvement in ventricular function after ischemic cardiomyopathy induced in mini pigs. *Acta Cir. Bras.* **33**, 386–395 (2018).
  46. Roith, D. Le. The Insulin-Like Growth Factor System. *Exp. Diabesity Res.* **4**, 205–212 (2003).
  47. Gooch, K. J. *et al.* IGF-I and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 909–15 (2001).
  48. Zhang, N. *et al.* Research progress in the mechanism of effect of PRP in bone deficiency healing. *ScientificWorldJournal.* **2013**, 134582 (2013).
  49. Penn, J. W., Grobbelaar, A. O. & Rolfe, K. J. The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int. J. Burns Trauma* **2**, 18–28 (2012).
  50. Luttenberger, T. *et al.* Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis.

- Lab. Invest.* **80**, 47–55 (2000).
51. Sporn, M. B. & Roberts, A. B. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul.* **1**, 875–82 (1990).
  52. Chung, C. & Burdick, J. A. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 243–262 (2008).
  53. Tuli, R. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$ -mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-cadherin and Mitogen-activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-talk. *J. Biol. Chem.* **278**, 41227–41236 (2003).
  54. Burnouf, T. *et al.* Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* **27**, 77–89 (2013).
  55. Powers, C. J., McLeskey, S. W. & Wellstein, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* **7**, 165–97 (2000).
  56. Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R. & Herman, I. M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv. Skin Wound Care* **25**, 349–70 (2012).
  57. Basilico, C. & Moscatelli, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* **59**, 115–65 (1992).
  58. Suffee, N. *et al.* Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1649–53 (2011).
  59. Kroeze, K. L. *et al.* Chemokine-mediated migration of skin-derived stem cells: predominant role for CCL5/RANTES. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1569–81 (2009).
  60. Sovkova, V. *et al.* Platelet lysate as a serum replacement for skin cell culture on biomimetic PCL nanofibers. *Platelets* **29**, 395–405 (2018).
  61. Italiano, J. E. *et al.* Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic

- proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* **111**, 1227–33 (2008).
62. von Hundelshausen, P. & Weber, C. Platelets as Immune Cells: Bridging Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **100**, 27–40 (2007).
  63. Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L. & Albrektsson, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* **27**, 158–167 (2009).
  64. Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B. & Rodeo, S. A. Platelet-Rich Plasma. *Am. J. Sports Med.* **37**, 2259–2272 (2009).
  65. Dohan Ehrenfest, D. M., Doglioli, P., de Peppo, G. M., Del Corso, M. & Charrier, J.-B. Choukroun’s platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch. Oral Biol.* **55**, 185–194 (2010).
  66. Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J. & Charrier, J.-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun’s Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J. Periodontol.* **81**, 546–555 (2010).
  67. Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C. & Schallmoser, K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* **76**, 371–387 (2016).
  68. Shahdadfar, A., Frønsdal, K., Haug, T., Reinholt, F. P. & Brinchmann, J. E. In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem Cells* **23**, 1357–1366 (2005).
  69. Allen, A. B., Butts, E. B., Copland, I. B., Stevens, H. Y. & Guldberg, R. E. Human platelet lysate supplementation of mesenchymal stromal cell delivery: issues of xenogenicity and species variability. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 2876–2884 (2017).
  70. Gstraunthaler, G., Lindl, T. & van der Valk, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum

in cell culture media. *Cytotechnology* **65**, 791–3 (2013).

71. Vogel, J. P. *et al.* Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets* **17**, 462–9 (2006).
72. Mishra, A. *et al.* Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng. Part C. Methods* **15**, 431–5 (2009).
73. Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H. & Bieback, K. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells* **25**, 1270–1278 (2007).
74. Bieback, K. *et al.* Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. *Stem Cells* **27**, 2331–2341 (2009).
75. Gottipamula, S., Sharma, A., Krishnamurthy, S., Majumdar, A. Sen & Seetharam, R. N. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1367–1374 (2012).
76. Jonsdottir-Buch, S. M., Lieder, R. & Sigurjonsson, O. E. Platelet Lysates Produced from Expired Platelet Concentrates Support Growth and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One* **8**, e68984 (2013).
77. Carrancio, S. *et al.* Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp. Hematol.* **36**, 1014–1021 (2008).
78. Doucet, C. *et al.* Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* **205**, 228–36 (2005).
79. Mojica-Henshaw, M. P. *et al.* Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy* **15**, 1458–1468 (2013).
80. Tarte, K. *et al.* Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* **115**, 1549–53 (2010).



81. Crespo-Diaz, R. *et al.* Platelet Lysate Consisting of a Natural Repair Proteome Supports Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chromosomal Stability. *Cell Transplant.* **20**, 797–812 (2011).
82. Kaps, C. *et al.* Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. *Med. Biol. Eng. Comput.* **40**, 485–490 (2002).
83. Pereira, R. C. *et al.* Dual Effect of Platelet Lysate on Human Articular Cartilage: A Maintenance of Chondrogenic Potential and a Transient Proinflammatory Activity Followed by an Inflammation Resolution. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1476–1488 (2013).
84. Naveau, A. *et al.* Phenotypic study of human gingival fibroblasts in a medium enriched with platelet lysate. *J. Periodontol.* **82**, 632–41 (2011).
85. Creeper, F. & Ivanovski, S. Effect of autologous and allogenic platelet-rich plasma on human gingival fibroblast function. *Oral Dis.* **18**, 494–500 (2012).
86. Tohidnezhad, M. *et al.* Platelet-released growth factors can accelerate tenocyte proliferation and activate the anti-oxidant response element. *Histochem. Cell Biol.* **135**, 453–60 (2011).
87. Mazzocca, A. D. *et al.* The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am. J. Sports Med.* **40**, 1742–9 (2012).
88. Wang, X. *et al.* Proliferation and differentiation of human tenocytes in response to platelet rich plasma: an in vitro and in vivo study. *J. Orthop. Res.* **30**, 982–90 (2012).
89. Reinisch, A. *et al.* Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* **113**, 6716–25 (2009).
90. Mooren, R. E. C. M. *et al.* The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Eng. Part A* **16**, 3159–72 (2010).
91. Ruggiu, A., Ulivi, V., Sanguineti, F., Cancedda, R. & Descalzi, F. The effect of Platelet Lysate on osteoblast proliferation associated with a transient increase of the inflammatory response in bone regeneration. *Biomaterials* **34**, 9318–9330 (2013).

92. Wahlström, O., Linder, C., Kalén, A. & Magnusson, P. Variation of pH in lysed platelet concentrates influence proliferation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-like cells. *Platelets* **18**, 113–8 (2007).
93. Fazzina, R. *et al.* Culture of human cell lines by a pathogen-inactivated human platelet lysate. *Cytotechnology* **68**, 1185–95 (2016).
94. Burnouf, T. *et al.* Human blood-derived fibrin releasates: composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. *Biologicals* **40**, 21–30 (2012).
95. Roubelakis, M. G. *et al.* Platelet-Rich Plasma (PRP) Promotes Fetal Mesenchymal Stem/Stromal Cell Migration and Wound Healing Process. *Stem Cell Rev. Reports* **10**, 417–428 (2014).
96. Pietramaggiori, G. *et al.* Healing modulation induced by freeze-dried platelet-rich plasma and micronized allogenic dermis in a diabetic wound model. *Wound Repair Regen.* **16**, 218–25 (2008).
97. Suzuki, S., Morimoto, N. & Ikada, Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J. Biomater. Appl.* **28**, 595–606 (2013).
98. O’Connell, S. M. *et al.* Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair Regen.* **16**, 749–756 (2008).
99. Sell, S. A. *et al.* A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers. *J. Spinal Cord Med.* **34**, 122–7 (2011).
100. Woolf, A. D. & Pflieger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* **81**, 646–56 (2003).
101. Middleton, K. K., Barro, V., Muller, B., Terada, S. & Fu, F. H. Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *Iowa Orthop. J.* **32**, 150–63 (2012).
102. Terada, S. *et al.* Use of an Antifibrotic Agent Improves the Effect of Platelet-Rich Plasma on Muscle Healing After Injury. *J. Bone Jt. Surg.* **95**, 980–988 (2013).

103. Dimauro, I. *et al.* Platelet-Rich Plasma and Skeletal Muscle Healing: A Molecular Analysis of the Early Phases of the Regeneration Process in an Experimental Animal Model. *PLoS One* **9**, e102993 (2014).
104. Molloy, T., Wang, Y. & Murrell, G. A. C. The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. *Sport. Med.* **33**, 381–394 (2003).
105. de Mos, M. *et al.* Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am. J. Sports Med.* **36**, 1171–8 (2008).
106. Anitua, E. *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop. Res.* **23**, 281–6 (2005).
107. Aspenberg, P. & Virchenko, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop. Scand.* **75**, 93–99 (2004).
108. Moshiri, A., Oryan, A. & Meimandi-Parizi, A. Synthesis, development, characterization and effectiveness of bovine pure platelet gel-collagen-polydioxanone bioactive graft on tendon healing. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 1308–32 (2015).
109. Nguyen, R. T., Borg-Stein, J. & McInnis, K. Applications of platelet-rich plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. *PM R* **3**, 226–50 (2011).
110. Bray, R. C., Fisher, A. W. & Frank, C. B. Fine vascular anatomy of adult rabbit knee ligaments. *J. Anat.* **172**, 69–79 (1990).
111. Bray, R. C., Leonard, C. A. & Salo, P. T. Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J. Orthop. Res.* **21**, 1118–23 (2003).
112. Arnoczky, S. P., Tarvin, G. B. & Marshall, J. L. Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J. Bone Joint Surg. Am.* **64**, 217–24 (1982).
113. Chamberlain, C. S., Crowley, E. & Vanderby, R. The spatio-temporal dynamics of ligament

- healing. *Wound Repair Regen.* **17**, 206–15 (2009).
114. Chamberlain, C. S. *et al.* The influence of macrophage depletion on ligament healing. *Connect. Tissue Res.* **52**, 203–11 (2011).
  115. Murray, M. M. *et al.* Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J. Orthop. Res.* **25**, 81–91 (2007).
  116. Vogrin, M. *et al.* Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized, double-blind, clinical trial. *Eur. Surg. Res.* **45**, 77–85 (2010).
  117. Marx, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **62**, 489–96 (2004).
  118. Bhanot, S. & Alex, J. C. Current Applications of Platelet Gels in Facial Plastic Surgery. *Facial Plast. Surg.* **18**, 027–034 (2002).
  119. Graziani, F. *et al.* In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results. *Minerva Stomatol.* **54**, 15–22
  120. Okuda, K. *et al.* Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J. Periodontol.* **74**, 849–57 (2003).
  121. Bigham-Sadegh, A. *et al.* Effects of Adipose Tissue Stem Cell Concurrent with Greater Omentum on Experimental Long-Bone Healing in Dog. *Connect. Tissue Res.* **53**, 334–342 (2012).
  122. Oryan, A., Moshiri, A. & Raayat, A. R. Novel Application of Theranekron® Enhanced the Structural and Functional Performance of the Tenotomized Tendon in Rabbits. *Cells Tissues Organs* **196**, 442–455 (2012).
  123. Oryan, A., Alidadi, S. & Moshiri, A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* **16**, 213–232 (2016).

124. Kim, T.-H., Kim, S.-H., Sándor, G. K. & Kim, Y.-D. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch. Oral Biol.* **59**, 550–8 (2014).
125. Kanthan, S. R., Kavitha, G., Addi, S., Choon, D. S. K. & Kamarul, T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury* **42**, 782–9 (2011).
126. Wiltfang, J. *et al.* Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin. Oral Implants Res.* **15**, 187–93 (2004).
127. Dallari, D. *et al.* Enhanced Tibial Osteotomy Healing with Use of Bone Grafts Supplemented with Platelet Gel or Platelet Gel and Bone Marrow Stromal Cells. *J. Bone Jt. Surg.* **89**, 2413 (2007).
128. Dahlin, R. L., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. Polymeric nanofibers in tissue engineering. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **17**, 349–64 (2011).
129. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* **28**, 325–47 (2010).
130. Ding, B., Kimura, E., Sato, T., Fujita, S. & Shiratori, S. Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning. *Polymer (Guildf).* **45**, 1895–1902 (2004).
131. Theron, S. A., Yarin, A. L., Zussman, E. & Kroll, E. Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer (Guildf).* **46**, 2889–2899 (2005).
132. Yarin, A. L. & Zussman, E. Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers. *Polymer (Guildf).* **45**, 2977–2980 (2004).
133. Dabirian, F., Hosseini Ravandi, S. A., Pishavar, A. R. & Abuzade, R. A. A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. *J. Electrostat.* **69**, 540–546 (2011).

134. Dotto, G. L. *et al.* Chitosan/polyamide nanofibers prepared by Forcespinning® technology: A new adsorbent to remove anionic dyes from aqueous solutions. *J. Clean. Prod.* **144**, 120–129 (2017).
135. Sarkar, K. *et al.* Electrospinning to Forcespinning™. *Mater. Today* **13**, 12–14 (2010).
136. Rampichová, M. *et al.* Cell penetration to nanofibrous scaffolds. *Cell Adh. Migr.* **8**, 36–41 (2014).
137. Gunatillake, P. A. & Adhikari, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* **5**, 1–16; discussion 16 (2003).
138. Park, J.-C. *et al.* Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability. *Polym. J.* **42**, 273–276 (2010).
139. Liu, X. & Ma, P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 477–486 (2004).
140. Labet, M. & Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3484 (2009).
141. Woodward, S. C., Brewer, P. S., Moatamed, F., Schindler, A. & Pitt, C. G. The intracellular degradation of poly(ε-caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 437–444 (1985).
142. Kweon, H. *et al.* A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 801–808 (2003).
143. Zhang, X. *et al.* Three dimensionally printed pearl powder/poly-caprolactone composite scaffolds for bone regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1–26 (2018). doi:10.1080/09205063.2018.1475096
144. Shahrezaee, M. *et al.* In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone defects. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2018). doi:10.1016/j.nano.2018.06.007
145. Fu, N. *et al.* PCL-PEG-PCL film promotes cartilage regeneration in vivo. *Cell Prolif.* **49**, 729–

- 739 (2016).
146. Jiang, T. *et al.* Mechanically cartilage-mimicking poly(PCL-PTHF urethane)/collagen nanofibers induce chondrogenesis by blocking NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Biomaterials* **178**, 281–292 (2018).
  147. Bertram, U. *et al.* Vascular Tissue Engineering: Effects of Integrating Collagen into a PCL Based Nanofiber Material. *Biomed Res. Int.* **2017**, 1–11 (2017).
  148. Tallawi, M. *et al.* Novel PGS/PCL electrospun fiber mats with patterned topographical features for cardiac patch applications. *Mater. Sci. Eng. C* **69**, 569–576 (2016).
  149. Hasan, A. *et al.* Fabrication and In Vitro Characterization of a Tissue Engineered PCL-PLLA Heart Valve. *Sci. Rep.* **8**, 8187 (2018).
  150. Carrier-Ruiz, A., Evaristo-Mendonça, F., Mendez-Otero, R. & Ribeiro-Resende, V. T. Biological behavior of mesenchymal stem cells on poly- $\epsilon$ -caprolactone filaments and a strategy for tissue engineering of segments of the peripheral nerves. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 128 (2015).
  151. Malikmammadov, E., Tanir, T. E., Kiziltay, A., Hasirci, V. & Hasirci, N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **29**, 863–893 (2018).
  152. Tubbs, R. K. Sequence distribution of partially hydrolyzed poly(vinyl acetate). *J. Polym. Sci. Part A-1 Polym. Chem.* **4**, 623–629 (1966).
  153. Peresin, M. S. *et al.* Effect of Moisture on Electrospun Nanofiber Composites of Poly(vinyl alcohol) and Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules* **11**, 2471–2477 (2010).
  154. Santos, C. *et al.* Preparation and characterization of polysaccharides/PVA blend nanofibrous membranes by electrospinning method. *Carbohydr. Polym.* **99**, 584–592 (2014).
  155. Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J. & Leprince, P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **61**, 2–30 (2006).
  156. Liang, D., Hsiao, B. S. & Chu, B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical

- applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1392–1412 (2007).
157. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, D. S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, 1–19 (2011).
158. Giusti, P., Lazzeri, L., De Petris, S., Palla, M. & Cascone, M. G. Collagen-based new bioartificial polymeric materials. *Biomaterials* **15**, 1229–1233 (1994).
159. He, W., Yong, T., Teo, W. E., Ma, Z. & Ramakrishna, S. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng.* **11**, 1574–88 (2005).
160. Sharifi-Aghdam, M., Faridi-Majidi, R., Derakhshan, M. A., Chegeni, A. & Azami, M. Preparation of collagen/polyurethane/knitted silk as a composite scaffold for tendon tissue engineering. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **231**, 652–662 (2017).
161. Ji, W. *et al.* Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications. *Pharm. Res.* **28**, 1259–1272 (2011).
162. Hu, X. *et al.* Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *J. Control. Release* **185**, 12–21 (2014).
163. Zamani, M., Prabhakaran, M. P. & Ramakrishna, S. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 2997–3017 (2013).
164. Zeng, J. *et al.* Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *J. Control. Release* **105**, 43–51 (2005).
165. Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J. & Jannesari, M. Controlled release of metronidazole benzoate from poly  $\epsilon$ -caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**, 179–185 (2010).
166. Vysloužilová, L. *et al.* Needleless coaxial electrospinning: A novel approach to mass production of coaxial nanofibers. *Int. J. Pharm.* **516**, 293–300 (2017).
167. Bazilevsky, A. V, Yarin, A. L. & Megaridis, C. M. Co-electrospinning of core-shell fibers



- using a single-nozzle technique. *Langmuir* **23**, 2311–4 (2007).
168. Lukáš, D. *et al.* Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Text. Prog.* **41**, 59–140 (2009).
169. Nasehi, F., Karshenas, M., Nadri, S., Barati, G. & Salim, A. Core-shell fibrous scaffold as a vehicle for sustained release of retinal pigmented epithelium-derived factor (PEDF) for photoreceptor differentiation of conjunctiva mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **105**, 3514–3519 (2017).
170. Qi, H., Hu, P., Xu, J. & Wang, A. Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules* **7**, 2327–30 (2006).
171. Li, X. *et al.* Encapsulation of proteins in poly(l-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **75**, 418–424 (2010).
172. Tian, L., Prabhakaran, M. P., Ding, X., Kai, D. & Ramakrishna, S. Emulsion electrospun vascular endothelial growth factor encapsulated poly(l-lactic acid-co- $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers for sustained release in cardiac tissue engineering. *J. Mater. Sci.* **47**, 3272–3281 (2012).
173. Yoo, H. S. & Kim, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1033–1042 (2009).
174. Bölgen, N., Vargel, İ., Korkusuz, P., Menciloğlu, Y. Z. & Pişkin, E. In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **81B**, 530–543 (2007).
175. Plencner, M. *et al.* Abdominal closure reinforcement by using polypropylene mesh functionalized with poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers and growth factors for prevention of incisional hernia formation. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3263–77 (2014).
176. Buscà, R., Bertolotto, C., Ortonne, J. P. & Ballotti, R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31824–30 (1996).

177. Zheng, X. *et al.* Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1294–300 (2008).
178. Rauch, C. *et al.* Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX* **28**, 305–16 (2011).
179. Mohammadi, S. *et al.* Human Platelet Lysate as a Xeno Free Alternative of Fetal Bovine Serum for the In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int. J. Hematol. stem cell Res.* **10**, 161–71 (2016).
180. Riem Vis, P. W. *et al.* Platelet-lysate as an autologous alternative for fetal bovine serum in cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1317–27 (2010).
181. Carducci, A. *et al.* GMP-grade platelet lysate enhances proliferation and migration of tenon fibroblasts. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **8**, 84–99 (2016).
182. Horn, P. *et al.* Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **12**, 888–898 (2010).
183. Mussano, F. *et al.* Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets* **27**, 467–471 (2016).
184. Ishida, Y., Kondo, T., Kimura, A., Matsushima, K. & Mukaida, N. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kappaB activation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway. *J. Immunol.* **176**, 5598–606 (2006).
185. Jin, W. & Dong, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg. Microbes Infect.* **2**, e60 (2013).
186. Wang, C. Q. F. *et al.* IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: potential relevance to psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2741–2752 (2013).
187. Crawford, A., Angelosanto, J. M., Nadwodny, K. L., Blackburn, S. D. & Wherry, E. J. A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection.

- PLoS Pathog.* **7**, e1002098 (2011).
188. El-Sharkawy, H. *et al.* Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J. Periodontol.* **78**, 661–9 (2007).
  189. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
  190. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
  191. Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J. & Beauséjour, C. M. Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. *J. Biol. Chem.* **281**, 29568–29574 (2006).
  192. Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M. & Schreml, S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **26**, 812–20 (2012).
  193. Chonn, A., Semple, S. C. & Cullis, P. R. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *J. Biol. Chem.* **267**, 18759–65 (1992).
  194. Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T. & Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol. Adv.* **29**, 739–67 (2011).
  195. Witzeneder, K. *et al.* Human-Derived Alternatives to Fetal Bovine Serum in Cell Culture. *Transfus. Med. Hemotherapy* **40**, 417–423 (2013).
  196. Ranzato, E., Mazzucco, L., Patrone, M. & Burlando, B. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 2030–8 (2009).
  197. Stessuk, T. *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* **308**, 511–20 (2016).

198. Hirobe, T., Shibata, T., Fujiwara, R. & Sato, K. Platelet-derived growth factor regulates the proliferation and differentiation of human melanocytes in a differentiation-stage-specific manner. *J. Dermatol. Sci.* **83**, 200–9 (2016).
199. Vocetkova, K. *et al.* Nanofibrous polycaprolactone scaffolds with adhered platelets stimulate proliferation of skin cells. *Cell Prolif.* **49**, (2016).
200. Plencner, M. *et al.* Significant improvement of biocompatibility of polypropylene mesh for incisional hernia repair by using poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers functionalized with thrombocyte-rich solution. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 2635–46 (2015).
201. Augustine, R. *et al.* Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based skin substitutes: In vivo evaluation of wound healing and the mechanism of cell proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **103**, 1445–54 (2015).
202. Li, D. *et al.* Three-dimensional polycaprolactone scaffold via needleless electrospinning promotes cell proliferation and infiltration. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **121**, 432–43 (2014).
203. McMillan, J. R. *et al.* Small-diameter porous poly (epsilon-caprolactone) films enhance adhesion and growth of human cultured epidermal keratinocyte and dermal fibroblast cells. *Tissue Eng.* **13**, 789–98 (2007).
204. Jakubova, R. *et al.* Immobilization of thrombocytes on PCL nanofibres enhances chondrocyte proliferation in vitro. *Cell Prolif.* **44**, 183–91 (2011).
205. Mickova, A. *et al.* Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules* **13**, 952–62 (2012).
206. Rampichová, M. *et al.* Elastic three-dimensional poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* **46**, 23–37 (2013).
207. Moore, W. S. *Vascular and endovascular surgery: a comprehensive review.* (Elsevier/Saunders, 2013).
208. Boswell, S. G., Cole, B. J., Sundman, E. A., Karas, V. & Fortier, L. A. Platelet-Rich Plasma:

- A Milieu of Bioactive Factors. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **28**, 429–439 (2012).
209. Eppley, B. L., Woodell, J. E. & Higgins, J. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 1502–1508 (2004). doi:10.1097/01.PRS.0000138251.07040.51
  210. Giehl, K. A., Nägele, U., Volkenandt, M. & Berking, C. Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma. *J. Cutan. Pathol.* **34**, 7–14 (2007).
  211. Knotek, P. *et al.* Cryogenic grinding of electrospun poly- $\epsilon$ -caprolactone mesh submerged in liquid media. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 1366–1374 (2012).
  212. Tian, F. *et al.* Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **84A**, 291–299 (2008).
  213. Wan, L.-S. & Xu, Z.-K. Polymer surfaces structured with random or aligned electrospun nanofibers to promote the adhesion of blood platelets. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **89A**, 168–175 (2008).
  214. LAURENS, N., KOOLWIJK, P. & DE MAAT, M. P. M. Fibrin structure and wound healing. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 932–939 (2006).
  215. Kiran, S., Nune, K. C. & Misra, R. D. K. The significance of grafting collagen on polycaprolactone composite scaffolds: Processing-structure-functional property relationship. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **103**, 2919–2931 (2015).
  216. Lin, S.-J., Jee, S.-H., Hsaio, W.-C., Lee, S.-J. & Young, T.-H. Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface. *Biomaterials* **26**, 1413–1422 (2005).
  217. Choi, J. S., Leong, K. W. & Yoo, H. S. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* **29**, 587–596 (2008).
  218. Liu, Y., Kalen, A., Risto, O. & Wahlstrom, O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* **10**, 336–340 (2002).

219. Werner, S., Krieg, T. & Smola, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 998–1008 (2007).
220. Shrivastava, R. Clinical evidence to demonstrate that simultaneous growth of epithelial and fibroblast cells is essential for deep wound healing. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **92**, 92–99 (2011).
221. Alikhan, A., Felsten, L. M., Daly, M. & Petronic-Rosic, V. Vitiligo: A comprehensive overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* **65**, 473–491 (2011).
222. Ghosh, D., Shenoy, S. & Kuchroo, P. Cultured Melanocytes: From Skin Biopsy to Transplantation. *Cell Transplant.* **17**, 351–360 (2008).
223. Eves, P. C. *et al.* Simplifying the Delivery of Melanocytes and Keratinocytes for the Treatment of Vitiligo Using a Chemically Defined Carrier Dressing. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1554–1564 (2008).
224. Ghosh, D. *et al.* Efficacy and Safety of Autologous Cultured Melanocytes Delivered on Poly (DL-Lactic Acid) Film: A Prospective, Open-Label, Randomized, Multicenter Study. *Dermatologic Surg.* **38**, 1981–1990 (2012).
225. Redondo, P. *et al.* Amniotic Membrane as a Scaffold for Melanocyte Transplantation in Patients with Stable Vitiligo. *Dermatol. Res. Pract.* **2011**, 1–6 (2011).
226. Mansbridge, J. Skin tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **19**, 955–968 (2008).
227. Gravante, G. *et al.* A randomized trial comparing ReCell® system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. *Burns* **33**, 966–972 (2007).
228. Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D. & Hutmacher, D. W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *J. Mater. Chem.* **21**, 9419 (2011).
229. Dai, N.-T., Williamson, M. R., Khammo, N., Adams, E. F. & Coombes, A. G. A. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin.

- Biomaterials* **25**, 4263–4271 (2004).
230. Carter, M. J., Fylling, C. P. & Parnell, L. K. S. Use of Platelet Rich Plasma Gel on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eplasty* **11**, (2011).
231. Rnjak-Kovacina, J. & Weiss, A. S. Increasing the pore size of electrospun scaffolds. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **17**, 365–72 (2011).
232. Lange, J. *et al.* Action of IL-1beta during fracture healing. *J. Orthop. Res.* **28**, 778–84 (2010).
233. Yang, X. *et al.* Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* **41**, 928–36 (2007).
234. Nam, D. *et al.* T-lymphocytes enable osteoblast maturation via IL-17F during the early phase of fracture repair. *PLoS One* **7**, e40044 (2012).
235. Ono, T. *et al.* IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells enhance bone regeneration. *Nat. Commun.* **7**, 10928 (2016).
236. Mehta, M., Schmidt-Bleek, K., Duda, G. N. & Mooney, D. J. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1257–76 (2012).
237. Santo, V. E. *et al.* Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules* **10**, 1392–401 (2009).
238. Liu, Y.-C. *et al.* CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone. *Biosci. Trends* **8**, 138–43 (2014).
239. Zhou, F. H., Foster, B. K., Zhou, X.-F., Cowin, A. J. & Xian, C. J. TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1075–88 (2006).
240. Sun, M. *et al.* TNF- $\alpha$  is upregulated in T2DM patients with fracture and promotes the apoptosis of osteoblast cells in vitro in the presence of high glucose. *Cytokine* **80**, 35–42 (2016).
241. Gerstenfeld, L. C. *et al.* Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the

- absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells. Tissues. Organs* **169**, 285–94 (2001).
242. Hsu, C.-W., Yuan, K. & Tseng, C.-C. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **107**, 185–92 (2009).
243. Dzieciatkowska, M. *et al.* Proteomics of apheresis platelet supernatants during routine storage: Gender-related differences. *J. Proteomics* **112**, 190–209 (2015).
244. van Holten, T. C. *et al.* Quantitative proteomics analysis reveals similar release profiles following specific PAR-1 or PAR-4 stimulation of platelets. *Cardiovasc. Res.* **103**, 140–146 (2014).
245. Kon, E., Filardo, G., Di Martino, A. & Marcacci, M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **19**, 516–527 (2011).
246. Dohan Ehrenfest, D. M. *et al.* Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles. Ligaments Tendons J.* **4**, 3–9 (2014).
247. Böck, M., Rahrig, S., Kunz, D., Lutze, G. & Heim, M. U. Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis: biochemical and functional differences. *Transfus. Med.* **12**, 317–24 (2002).
248. Lohmann, M. *et al.* Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* **7**, e37839 (2012).
249. Durmuşlar, M. C. *et al.* Evaluation of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in diabetic rabbits. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **44**, 126–33 (2016).
250. Wang, Z. *et al.* Sheet of osteoblastic cells combined with platelet-rich fibrin improves the formation of bone in critical-size calvarial defects in rabbits. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **54**, 316–21 (2016).



251. Arulmoli, J. *et al.* Combination scaffolds of salmon fibrin, hyaluronic acid, and laminin for human neural stem cell and vascular tissue engineering. *Acta Biomater.* **43**, 122–138 (2016).
252. Bardsley, K. *et al.* Defining a turnover index for the correlation of biomaterial degradation and cell based extracellular matrix synthesis using fluorescent tagging techniques. *Acta Biomater.* **45**, 133–142 (2016).
253. Zhang, Y., Heher, P., Hilborn, J., Redl, H. & Ossipov, D. A. Hyaluronic acid-fibrin interpenetrating double network hydrogel prepared in situ by orthogonal disulfide cross-linking reaction for biomedical applications. *Acta Biomater.* **38**, 23–32 (2016).
254. Benavides, O. M. *et al.* Capillary-Like Network Formation by Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Within Fibrin/Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. *Tissue Eng. Part A* **21**, 1185–1194 (2015).
255. Sadeghi-Ataabadi, M. *et al.* Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **71**, 372–380 (2017).
256. Lam, C. X. F., Hutmacher, D. W., Schantz, J.-T., Woodruff, M. A. & Teoh, S. H. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **90A**, 906–919 (2009).
257. Santo, V. E. *et al.* Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming. *J. Control. Release* **162**, 19–27 (2012).
258. Prosecká, E. *et al.* Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res. A* **103**, 671–82 (2015).
259. Dohan Ehrenfest, D. M., de Peppo, G. M., Doglioli, P. & Sammartino, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* **27**, 63–9 (2009).
260. Amalorpava Mary, L. *et al.* Centrifugal spun ultrafine fibrous web as a potential drug delivery

- vehicle. *Express Polym. Lett.* **7**, 238–248 (2013).
261. Cai, Y., Yu, J., Kundu, S. C. & Yao, J. Multifunctional nano-hydroxyapatite and alginate/gelatin based sticky gel composites for potential bone regeneration. *Mater. Chem. Phys.* **181**, 227–233 (2016).
262. Hu, J.-X. *et al.* Carboxylated Agarose (CA)-Silk Fibroin (SF) Dual Confluent Matrices Containing Oriented Hydroxyapatite (HA) Crystals: Biomimetic Organic/Inorganic Composites for Tibia Repair. *Biomacromolecules* **17**, 2437–47 (2016).
263. Chu, S.-F. *et al.* Enhanced biocompatible and hemocompatible nano/micro porous surface as a biological scaffold for functionalization and biointegrated implants. *J. Alloys Compd.* **684**, 726–732 (2016).
264. Stevenson, G. *et al.* Combining 3D human in vitro methods for a 3Rs evaluation of novel titanium surfaces in orthopaedic applications. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 1586–99 (2016).
265. Hejazi, F. & Mirzadeh, H. Novel 3D scaffold with enhanced physical and cell response properties for bone tissue regeneration, fabricated by patterned electrospinning/electrospraying. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 143 (2016).
266. Pautke, C. *et al.* Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res.* **24**, 3743–8
267. Bilbe, G., Roberts, E., Birch, M. & Evans, D. B. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* **19**, 437–45 (1996).
268. Diaz-Gomez, L. *et al.* Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **40**, 180–8 (2014).
269. Buzgo, M. *et al.* Time-regulated drug delivery system based on coaxially incorporated platelet  $\alpha$ -granules for biomedical use. *Nanomedicine (Lond)*. **8**, 1137–54 (2013).
270. J, A., Kuttappan, S., Keyan, K. S. & Nair, M. B. Evaluation of osteoinductive and endothelial differentiation potential of Platelet-Rich Plasma incorporated Gelatin-Nanohydroxyapatite

- Fibrous Matrix. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **104**, 771–81 (2016).
271. Getgood, A., Henson, F., Brooks, R., Fortier, L. A. & Rushton, N. Platelet-rich plasma activation in combination with biphasic osteochondral scaffolds-conditions for maximal growth factor production. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **19**, 1942–7 (2011).
272. Jonnalagadda, D., Izu, L. T. & Whiteheart, S. W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood* **120**, 5209–16 (2012).
273. Kamykowski, J., Carlton, P., Sehgal, S. & Storrie, B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet  $\alpha$ -granules. *Blood* **118**, 1370–3 (2011).
274. Battinelli, E. M., Markens, B. A. & Italiano, J. E. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* **118**, 1359–1369 (2011).
275. Peters, C. G., Michelson, A. D. & Flaumenhaft, R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of  $\alpha$ -granules expressing VAMP-7. *Blood* **120**, 199–206 (2012).
276. van Nispen tot Pannerden, H. *et al.* The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* **116**, 1147–56 (2010).
277. Cannon, J. G. *et al.* Interleukin-1 beta in human plasma: optimization of blood collection, plasma extraction, and radioimmunoassay methods. *Lymphokine Res.* **7**, 457–67 (1988).
278. Sahni, A. *et al.* Interleukin-1beta but not IL-1alpha binds to fibrinogen and fibrin and has enhanced activity in the bound form. *Blood* **104**, 409–14 (2004).
279. Martino, M. M., Briquez, P. S., Ranga, A., Lutolf, M. P. & Hubbell, J. A. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 4563–4568
280. Thavasu, P. W., Longhurst, S., Joel, S. P., Slevin, M. L. & Balkwill, F. R. Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *J. Immunol.*

- Methods* **153**, 115–24 (1992).
281. de Jager, W., Bourcier, K., Rijkers, G. T., Prakken, B. J. & Seyfert-Margolis, V. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol.* **10**, 52 (2009).
  282. Duvigneau, J. C., Hartl, R. T., Teinfalt, M. & Gemeiner, M. Delay in processing porcine whole blood affects cytokine expression. *J. Immunol. Methods* **272**, 11–21 (2003).
  283. Laster, S. M., Wood, J. G. & Gooding, L. R. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* **141**, 2629–34 (1988).
  284. Frankel, S. K. *et al.* TNF-alpha sensitizes normal and fibrotic human lung fibroblasts to Fas-induced apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 293–304 (2006).
  285. Graves, D. T. *et al.* Tumor Necrosis Factor Modulates Fibroblast Apoptosis, PMN Recruitment, and Osteoclast Formation in Response to *P. gingivalis* Infection. *J. Dent. Res.* **80**, 1875–1879 (2001).
  286. Plataniias, L. C. Interferons: laboratory to clinic investigations. *Curr. Opin. Oncol.* **7**, 560–5 (1995).
  287. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**, 237–249 (2003).
  288. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163–189 (2004).
  289. Wang, X. Y., Crowston, J. G., White, A. J., Zoellner, H. & Healey, P. R. Interferon-alpha and interferon-gamma modulate Fas-mediated apoptosis in mitomycin-C-resistant human Tenon's fibroblasts. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **42**, 529–538 (2014).
  290. Todaro, G. J. & Green, H. Serum Albumin Supplemented Medium for Long Term Cultivation of Mammalian Fibroblast Strains. *Exp. Biol. Med.* **116**, 688–692 (1964).
  291. Hers, I. Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS/PI3Kalpha

- pathway. *Blood* **110**, 4243–52 (2007).
292. Phillips, P. D., Pignolo, R. J. & Cristofalo, V. J. Insulin-like growth factor-I: specific binding to high and low affinity sites and mitogenic action throughout the life span of WI-38 cells. *J. Cell. Physiol.* **133**, 135–43 (1987).
  293. JONES, J. I. & CLEMMONS, D. R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions\*. *Endocr. Rev.* **16**, 3–34 (1995).
  294. Liu, Z. *et al.* TNF- $\alpha$  Induced the Enhanced Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis by Overexpressing TRAIL-R2. *Stem Cells Int.* **2017**, 1–14 (2017).
  295. Wang, L. *et al.* IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF $\kappa$ B signaling. *Stem Cells* **31**, 1383–95 (2013).
  296. Chen, H. *et al.* Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Sci. Rep.* **5**, 8718 (2015).
  297. Redondo-Castro, E. *et al.* Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 79 (2017).
  298. Pricola, K. L., Kuhn, N. Z., Haleem-Smith, H., Song, Y. & Tuan, R. S. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J. Cell. Biochem.* **108**, 577–88 (2009).
  299. Youssef, A., Aboalola, D. & Han, V. K. M. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int.* **2017**, 9453108 (2017).
  300. Nawrocka, D., Kornicka, K., Szydlarska, J. & Marycz, K. Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Patients with Type 2 Diabetes by Reducing Cellular Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–22 (2017).
  301. Zhang, F., Ren, T., Wu, J. & Niu, J. Small concentrations of TGF- $\beta$ 1 promote proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Indian J. Exp. Biol.* **53**, 508–13 (2015).

302. Gharibi, B. & Hughes, F. J. Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and In Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 771–782 (2012).
303. Tang, F.-P. *et al.* Effects of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on the biological behaviours of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci. Eng.* **02**, 200–207 (2009).
304. Truong, M.-D., Choi, B. H., Kim, Y. J., Kim, M. S. & Min, B.-H. Granulocyte macrophage – colony stimulating factor (GM-CSF) significantly enhances articular cartilage repair potential by microfracture. *Osteoarthr. Cartil.* **25**, 1345–1352 (2017).

## 12 Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Evženu Amlerovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky po celou dobu mého studia. Dále bych chtěla poděkovat mým kolegům z oddělení tkáňového inženýrství a v neposlední řadě mé rodině za podporu a trpělivost.

Tato práce byla podpořena projekty grantové agentury České Republiky (grant č. 15-15697S, a 16-14758S), agenturou pro zdravotnický výzkum České Republiky (granty č. 16-28637A, 16-29680A, a 17-32285A), grantovou agenturou UK (Granty č. 270513, 1246314, 1228214, 545313, 512216, a 44218), MŠMT národními programy udržitelnosti (Granty č. LO 1605, LO1508, a LO1309) a operačním programem– Praha konkurenceschopnost (granty č. CZ.2.16/3.1.00/21528 a CZ.2.16/3.1.00/24006).

## 13 Publikace, které jsou podkladem disertace

- Sovkova V, Vocetkova K, Rampichova M, Mickova A, Buzgo M, Lukasova V, Dankova J, Filova E, Necas A, Amler E. Platelet lysate as a serum replacement for skin cell culture on biomimetic PCL nanofibers. *Platelets* 29, 395-405, (2018). IF = 2.356.
- Rampichova M, Buzgo M, Mickova A, Vocetkova K, Sovkova V, Lukasová V, Filova E, Rustichelli F, Amler E. Platelet-functionalized three-dimensional poly-ε-caprolactone fibrous scaffold prepared using centrifugal spinning for delivery of growth factors. *Int J Nanomedicine*; 12: 347–361, (2017). IF= 4.383.
- Vocetkova K, Buzgo M, Sovkova V, Bezdekova D, Kneppo P, Amler E. Nanofibrous polycaprolactone scaffolds with adhered platelets stimulate proliferation of skin cells. *Cell Prolif.* 49, 568-578, (2016). IF = 4.936.



## 14 Ostatní publikace autorky

- Rampichova M, Chvojka J, Jencova V, Kubikova T, Tonar Z, Erben J, Buzgo M, Dankova J, Litvinec A, Vocetkova K, Plencner M, Prosecka E, Sovkova V, Lukasova V, Kralickova M, Lukas D, Amler E. The combination of nanofibrous and microfibrous materials for enhancement of cell infiltration and in vivo bone tissue formation. *Biomed. Mat.* 13, (2018). IF = 2.897.
- Lukasova V, Buzgo M, Vocetkova K, Kubikova T, Tonar Z, Doupanik M, Blahnova V, Litvinec A, Sovkova V, Voltrova B, Staffa A, Svora P, Kralickova M, Amler E, Filova E, Rustichelli F, Rampichova M. Osteoinductive 3D scaffolds prepared by blend centrifugal spinning for long-term delivery of osteogenic supplements. *RSC Advances*. 8, 21889-21904, (2018). IF = 2.936.
- East B, Plencner M, Kralovic M, Rampichova M, Sovkova V, Vocetkova K, Otahal M, Tonar Z, Kolinko Y, Amler E, Hoch J. A polypropylene mesh with poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers in hernia repair: large animal experiment. In. *J. Nanomed.* 13, (2018). IF = 4.86.
- Buzgo M, Rampichova M, Vocetkova K, Sovkova V, Lukasova V, Doupanik M, Mickova A, Rustichelli F, Amler E. Emulsion centrifugal spinning for production of 3D drug releasing nanofibres with core/shell structure. *RSC Adv.* 7, (2017). IF = 2.936.
- Lukasova V, Buzgo M, Sovkova V, Dankova J, Rampichova M, Amler E. Osteogenic differentiation of 3D cultured mesenchymal stem cells induced by bioactive peptides. *Cell Prolif.* Aug;50(4). doi: 10.1111/cpr.12357, (2017) IF = 4.112
- Buzgo M, Rampichova M, Vocetkova K, Sovkova V, Lukasova V, Doupanik M, Mickova A, Rustichelli F, Amler E. Emulsion centrifugal spinning for production of 3D drug releasing nanofibres with core/shell structure. *RSC ADVANCES* Volume: 7 Issue: 3 Pages: 1215-1228, (2017). IF = 3.108

- Vocetkova K, Buzgo M, Sovkova V, Rampichova M, Staffa A, Filova E, Lukasova V, Doupnik M, Fiori F, Amler E. A comparison of high throughput core-shell 2D electrospinning and 3D centrifugal spinning techniques to produce platelet lyophilisate-loaded fibrous scaffolds and their effects on skin cells. RSC Adv. 7, (2017). IF = 2.936.
- Daňková J, Buzgo M, Vejpravová J, Kubíčková S, Sovková V, Vysloužilová L, Mantlíková A, Nečas A, Amler E. Highly efficient mesenchymal stem cell proliferation on poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers with embedded magnetic nanoparticles. Int J Nanomedicine. (2015). IF = 4.383