

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lenka Sloupová

Kokultivace buněk *in vitro* pro kostní regeneraci
Coculture of cells *in vitro* for bone regeneration

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Eva Filová, Ph.D.

Praha, 2022

Poděkování

Děkuji své školitelce Mgr. Evě Filové, Ph.D. za odborné vedení této práce. Dále také děkuji za podporu své rodině, včetně Alberta.

Prohlášení

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

V Praze 30. 10. 2022

Lenka Sloupová

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Seznam zkratek	5
Úvod	6
1. Osteoblasty a osteoprogenitory	8
1.1 Proliferace.....	8
1.2 Osteogeneze	10
1.3 Angiogeneze.....	12
2. BMSC	15
2.1 Proliferace.....	16
2.2 Osteogeneze	17
2.3 Angiogeneze.....	20
3. ADSC	23
3.1 Proliferace.....	23
3.2 Osteogeneze	24
3.3 Angiogeneze.....	26
4. Interakce v kokultuře	29
4.1 Buněčné spoje	29
4.2 Vliv parakrinních faktorů a extracelulárních váčků	32
Závěr	35
Seznam literatury	37

Abstrakt

Kokultivace dvou (či více) buněčných typů *in vitro* vedoucí k vytvoření funkční kostní tkáně vložitelné do místa poškození by mohla být řešením pro pacienty u nichž jsou aktuálně používané metody (jakými jsou například transplantace lidských kostních štěpů) nedostatečné. V kokultuře má jeden buněčný typ osteogenní funkci a další angiogenní funkci, protože limit difuze O₂ a nutných živin je pouze 200 μm, což znamená, že založení cévní sítě *in vitro* by mělo předejít odumření vytvořené kostní tkáně po vložení do pacienta. Vytvoření a pochopení fungující kokultury *in vitro* je nutné pro získání kokultury úspěšné *in vivo*.

V této práci jsou shrnuty a srovnány poznatky o vlivu *in vitro* kokultivace na proliferaci, osteogenezi a angiogenezi v kokultuře při použití osteoblastů (či osteoprogenitorů), mesenchymálních stromálních buněk odvozených z kostní dřeně (BMSC), nebo mesenchymálních stromálních buněk odvozených z tukové tkáně (ADSC) v roli osteogenního buněčného typu v kombinaci s různými typy endoteliálních buněk. Z důvodu pochopení vlivu kokultivace na tyto procesy je také zařazena kapitola shrnující interakce mezi kokultivovanými buněčnými typy.

Klíčová slova

kokultura, osteogeneze, angiogeneze, *in vitro*, osteoblasty, BMSC, ADSC

Abstract

Cocultivation of two (or more) cell types *in vitro* leading to the formation of functioning bone tissue, later inserted into the damaged area, could be a solution for patients for whom the current methods (e.g. use of human bone grafts) are insufficient. In coculture, one cell type is used to accomplish osteogenesis, while the other is used for angiogenesis, because the limit of diffusion of O₂ and essential nutrients is only 200 µm, which means that establishing a vascular network *in vitro* should prevent the new bone tissue from dying after implantation. Creation and understanding of a functioning coculture *in vitro* are crucial for developing a coculture successful *in vivo*.

This work summarises and compares information about the influence of *in vitro* cocultivation on proliferation, osteogenesis and angiogenesis in coculture which uses osteoblasts (or osteoprogenitors), bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) or adipose derived mesenchymal stem cells (ADSC) as it's osteogenic cell type combined with various endothelial cell types. In order to understand the impact of cocultivation on these processes, one chapter deals with interactions between cocultured cell types.

Keywords

coculture, osteogenesis, angiogenesis, *in vitro*, osteoblasts, BMSC, ADSC

Seznam zkratek

ADSC	mesenchymální stromální buňky odvozené z tukové tkáně
ALP	alkalická fosfatáza
BAD	BCL2 asociovaný agonista buněčné smrti
BMP-2	kostní morfogenní protein 2
BMSC	mesenchymální stromální buňky odvozené z kostní dřevě
CD	diferenciační skupina
ECFC	endoteliální buňky tvořící kolonie (= podtyp EPC)
EPC	endoteliální progenitorové buňky
FBS	fetální bovinní sérum
FGF-2	fibroblastový růstový faktor 2
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
HMEC	lidské mikrovaskulární endoteliální buňky
HOP	lidské osteoprogenitorové buňky
HUVEC	lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly
PDGF	růstový faktor odvozený z krevních destiček
RUNX2	transkripční faktor 2 spojený s Runt
TGF β	transformační růstový faktor beta
VEC	vaskulární endoteliální buňky
VE-kadherin	vaskulární endoteliální kadherin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR2	receptor 2 pro vaskulární endoteliální růstový faktor
vWF	von Willebrandův faktor

Úvod

Co si představíte když se řekne hojení kosti? První asociací možná bude člověk s nohou nebo rukou v sádře, u kterého právě regenerace poškozené kosti probíhá a výsledkem bude znovu funkční tkáň. Někteří pacienti však trpí kostními defekty, které jejich organismus není schopen opravit. Důvodem mohou být závažná zranění, infekce, nádory či poškození způsobená ischemií v dané oblasti (Simunovic a Finkenzeller 2021).

Zřejmě nejpoužívanějším řešením je transplantace lidských kostních štěpů, které mohou mít rozdílný původ. V případě autologního štěpu dochází k přenosu vlastní pacientovi tkáně (obvyklým místem odběru je hřeben kosti kyčelní) do místa poškození. Tato metoda je výhodná zejména proto, že nedochází k odmítnutí štěpu z důvodu imunologické nekompatibility. Nevýhodou je však vytvoření dvou míst, kde dochází k chirurgickému zákroku. K možným problémům spojených s opravou původního defektu (jako je bolest nebo tvorba hematomů) se tak přidá ještě šance na komplikace v oblasti, ze které byl štěp odebrán. V neposlední řadě také někdy není autologní štěp vůbec realizovatelný, protože třeba děti nemusí mít dostatek vhodné kostní tkáně k odběru. V tomto případě může být zvolen alogenní štěp. Ten pochází buď z živého dárce, který například podstoupil operační výměnu kloubu, nebo z vhodného zemřelého. Největší nevýhodou je tu možné odmítnutí štěpu díky příjemcově imunitní reakci (Vidal et al. 2020).

Stále tedy existuje prostor ke zlepšení a hledání jiných odpovědí na tento problém. Jednou z možností je využití buněčných kokultur. Tato technika je založena na společné kultivaci dvou či více různých buněčných typů *in vitro* s cílem vytvořit tkáň, která bude moci být vložena do poškozeného místa v pacientovi, kde dojde k integraci s jeho vlastní tkání a bude tak zajištěna regenerace. K čemu je potřeba více různých buněčných typů? Limitní vzdálenost difuze kyslíku a potřebných živin je 200 μm (Dellaquila et al. 2021), což znamená, že štěp tvořený jen z kostních buněk může odumřít, protože k němu pacientovi cévy nestihnou dorůst a prostá difuze nestačí. Z tohoto důvodu by bylo výhodné umožnit vytvoření cévní sítě *in vitro*, která by se napojila na již existující oběh pacienta.

Při vývoji kosti osifikace probíhá dvěma základními mechanismy, buď jako tzv. desmogenní (= intramembránová), nebo chondrogenní. Desmogenní osifikace je založena na přímé diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk do osteoblastů a je typická pro vznik plochých kostí obličejové nebo klíčnicí kosti. Naopak při chondrogenní osifikaci dochází k diferenciaci na chondrocyty tvořící chrupavčitou tkáň, která je až poté nahrazena tkání kostní. Mesenchymální kmenová buňka se diferenciuje přes osteoprogenitorovou buňku, ze které se díky expresi transkripčního faktoru 2 spojeného s Runt (RUNX2) stává preosteoblast. Preosteoblast poté začíná exprimovat osterix a zralý osteoblast je typický expresí RUNX2 i osterix zároveň (Salhotra et al. 2020). Osteoblast produkuje

extracelulární matrix, kterou se postupně obklopí a vzniká osteocyt, který už se nedělí a je zabudován do tzv. osteoidu (Huang et al. 2007).

Součástí mikroprostředí kosti jsou i endoteliální buňky, které udržují osteoprogenitory v nediferencovaném stavu, ale v případě poškození tkáně se signalizací podílí na nastartování diferenciaci do osteoblastů, aby došlo k opravě defektu (Salhotra et al. 2020). Endoteliální buňky jsou obecně identifikovány díky expresi molekul z diferenciací skupiny 31 (CD31) (Dellaquila et al. 2021). Při angiogenezi dochází díky působení angiogenních faktorů (například vaskulárního endoteliálního růstového faktoru- VEGF) k dělení endoteliálních buněk, jejich migraci, formování cév a nakonec jejich spojení do sítě, která je stabilizována díky pericytům a buňkám hladkého svalstva (Mollentze et al. 2021).

Endoteliální buňky různého původu (například z mikrovaskulatury a makrovaskulatury) se liší svým angiogenním potenciálem. Nejpoužívanějšími jsou lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly (HUVEC) díky jednoduchosti jejich odběru a kultivace, ale nejedná se o mikrovaskulární buňky typické pro kost. Lidské mikrovaskulární endoteliální buňky (HMEC) zejména z dermis jsou používány méně často. Nadějnou možností jsou také lidské endoteliální progenitorové buňky (EPC) díky vyšší míře proliferace ve srovnání s endoteliálními buňkami (Simunovic and Finkenzeller 2021).

Míra osteogeneze, kterou zajišťují osteogenní buněčné typy v kokultuře, je hodnocena pomocí raných a pozdních markerů osteogeneze a množství vytvořených vápenatých usazenin. Mezi markery rané osteogeneze je řazen RUNX2, který reguluje geny pro další rané i pozdní markery (Mollentze et al. 2021). Těmi ranými jsou alkalická fosfatáza (ALP) umožňující kalcifikaci extracelulární matrix a kolagen typu I (Huang et al. 2007), pozdními potom nejhojnější nekolagenní protein kosti osteopontin (Mollentze et al. 2021) a osteokalcin, který mění konformaci po vazbě Ca^{2+} iontů (Hauschka a Carr 1982).

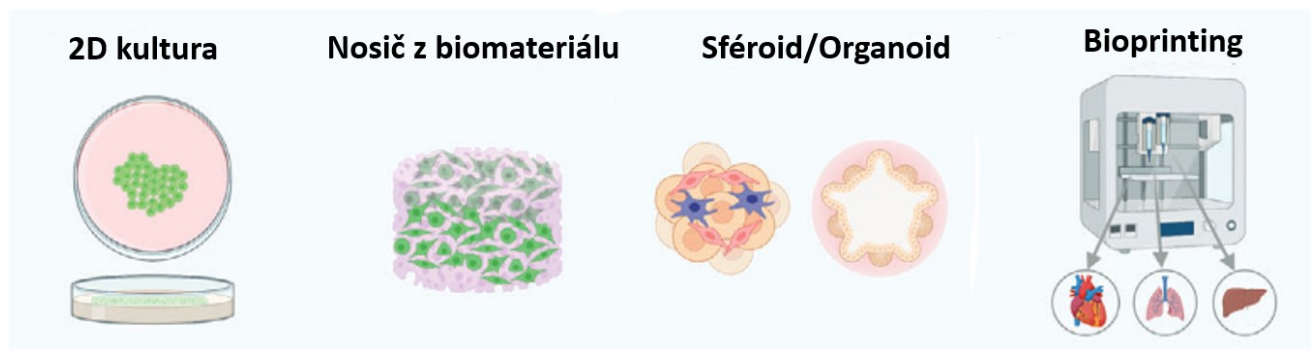
Při hodnocení angiogeneze mohou být také využity markery (častým je již zmíněný VEGF). Důležitým kritériem je schopnost tvorby struktur podobných tubulům a tvorba sítě. V té je hodnocen počet struktur, jejich délka, počet spojů mezi strukturami a případně jsou zaznamenány znaky pokročile vytvořené sítě jako jsou třeba buňky exprimující typické molekuly pro pericyty.

Pro získání kokultury úspěšné *in vivo* je třeba poznat její chování *in vitro*. Proto cíly této práce bude shrnout a srovnat poznatky o vlivu kokultur využívajících jako osteogenní buněčný typ osteoblasty (či osteoprogenitory), mesenchymální stromální buňky odvozené z kostní dřene a mesenchymální stromální buňky odvozené z tukové tkáně s různými typy endoteliálních buněk na proliferaci, osteogenezi a angiogenezi v kokultuře *in vitro*.

1. Osteoblasty a osteoprogenitory

Prvními osteogenními buněčnými typy používanými v kokulturách, kterými se zabývá tato práce, jsou osteoblasty a lidské osteoblastové progenitorové buňky (HOP). Z mesenchymálních kmenových buněk dochází diferenciací ke vzniku osteoprogenitorových buněk, které mohou být dále indukovány k diferenciaci do osteoblastů. Zralé osteoblasty lze identifikovat podle exprese osteogenních markerů jako je ALP, kolagen I, osteopontin a osteokalcin (Salhotra et al. 2020). Hlavní nevýhodou oproti ostatním osteogenním buněčným typům zmíněným v této práci je jejich limitovaná schopnost proliferace (Simunovic and Finkenzeller 2021).

Kokultury mohou být kultivovány buď ve 2D uspořádání (kokultury zmíněné v této práci, pokud není zmíněno jinak, byly kultivovány ve 2D), což znamená kultivace buněk adhezaných k ploše, nebo ve 3D uspořádání (na nosiči nebo bez; vizte Obr. 1), které by mělo umožnit přiblížit se situaci *in vivo* (Dellaquila et al. 2021). V kokulturách obsahujících osteogenní buněčný typ lidského původu, které jsou zmíněny v této kapitole byly jako angiogenní buněčný typ nejčastěji použity HUVEC (Inomata a Honda 2019; Leszczynska et al. 2013; Shahabipour et al. 2020; Stahl et al. 2004; 2005; Steiner et al. 2012; Thébaud et al. 2012; Wenger et al. 2004). Dále také EPC z periferní krve (Dohle et al. 2010) a HMEC (Unger et al. 2007). U kokultur zvířecího původu byly použity myši mikrovaskulární endoteliální buňky (Barron et al. 2012) a potkaní EPC z kostní dřeně (Giles et al. 2017).



Obr. 1 Kultivace ve 2D, nebo 3D uspořádání. 3D uspořádání může spočívat v použití nosiče z biomateriálu, vytvoření sféroиду/organoidu, nebo využití bioprintingu. Upraveno (Dellaquila et al. 2021).

1.1 Proliferace

Kokultivace osteogenního a angiogenního buněčného typu vede k ovlivnění proliferace buněk. U kokultury primárních lidských osteoblastů s HUVEC byla zjištěna statisticky významně vyšší míra proliferace ve srovnání s monokulturou osteoblastů (Leszczynska et al. 2013; Steiner et al. 2012). Při srovnání kultivace osteoblastů : HUVEC v různých poměrech (1 : 1, 1 : 4 či 4 : 1) vykazovala nejvyšší

míru proliferace kultivace v poměru 4 : 1, konkrétně 7. den kultivace více jak 7x větší počet osteoblastů než byl pozorován v monokultuře osteoblastů (Leszczynska et al. 2013). Ovlivnění proliferace je ale zřejmě v tomto typu kokultury jednosměrné (Leszczynska et al. 2013; Steiner et al. 2012). V kokultuře v poměru 1 : 1 byl 5. den kultivace pozorován 1,5x vyšší nárůst množství osteoblastů oproti monokultuře osteoblastů a 7. den více jak 2x vyšší nárůst množství osteoblastů oproti monokultuře osteoblastů. Naopak u HUVEC v této kokultuře byl 5. den kultivace zachycen nižší nárůst množství buněk než v monokultuře HUVEC a 7. den nebyl z hlediska přírůstku množství HUVEC mezi kokulturovou a monokulturovou významný rozdíl. Autoři této studie toto zjištění označili za překvapivé, protože očekávali, že osteoblasty produkující VEGF podpoří proliferaci HUVEC (Steiner et al. 2012). Lze tedy shrnout, že kokultivace osteoblastů s HUVEC ve zmíněných studiích vedla ke zvýšení míry proliferace, ale pouze u osteoblastů.

Jedním z faktorů ovlivňujících míru proliferace v kokultuře lidských osteoblastů s HUVEC se ukázalo být uspořádání kokultury. Pokud při kokultivaci lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 1:1 byla použita varianta kultivace v nepřímém kontaktu, tak bylo množství nových osteoblastů v kokultuře srovnatelné s monokulturovou osteoblastů, nebo dokonce mírně nižší. Naopak u kokultivace v přímém kontaktu byl nárůst počtu osteoblastů vyšší oproti monokultuře osteoblastů (Steiner et al. 2012). Kokultivace v přímém kontaktu umožňuje komunikovat mezi buněčnými typy skrze buněčné spoje, což by mohlo být jedním z vysvětlení proč byl pozorován vyšší nárůst počtu osteoblastů při kultivaci v přímém kontaktu ve srovnání s kultivací v nepřímém kontaktu, kde tento typ komunikace není k dispozici.

Dalším zkoumaným faktorem byla koncentrace fetálního bovinního séra (FBS) použitá v kultivačním médiu kokultury lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 1 : 1. U kokultivovaných osteoblastů se osvědčilo použití 10% FBS, protože 1% FBS sice významně podpořilo proliferaci osteoblastů (v 7. dni více jak 5x vyšší množství nových buněk oproti monokultuře osteoblastů), ale způsobilo pokles množství přibývajících HUVEC každý sledovaný den oproti 1. dni. Navíc kokultivované HUVEC vykazovaly menší nárůsty počtu buněk oproti monokultuře HUVEC (Steiner et al. 2012). Z hlediska proliferace lidských osteoblastů kokultivovaných s HUVEC v poměru 1 : 1 je tedy zřejmě vhodnou volbou kokultivace v přímém kontaktu v médiu obsahujícím 10% FBS.

Kultivace lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 1 : 1 v 1% FBS byla také použita ke studiu vlivu kokultury na apoptózu buněk obou buněčných typů. Znovu zde byl pozorován pouze jednosměrný efekt. Kokultivované osteoblasty vykazovaly po 2 dnech kultivace (v přímém i nepřímém kontaktu) statisticky významně nižší míru apoptózy než monokultura osteoblastů, zatímco kokultivované HUVEC se svojí mírou apoptózy nijak nelišily od monokultury HUVEC. U kokultury v přímém kontaktu byla zjištěna významně vyšší míra fosforylace proapoptotického proteinu BCL2

asociovaného agonisty buněčné smrti (BAD) oproti monokultuře osteoblastů, zatímco v nepřímém kontaktu nebyla míra fosforylace BAD významně odlišná od monokultury osteoblastů (Steiner et al. 2012). V kokultuře tohoto typu tedy dochází ke snížení míry apoptózy indukované kultivací v 1% FBS, ale navrhovaný mechanismus využívající zvýšení fosforylace BAD není zřejmě jediný, protože ke snížení míry apoptózy došlo i při kokultivaci v nepřímém kontaktu.

1.2 Osteogeneze

Zřejmě nejpoužívanějším markerem rané osteogeneze je ALP. V kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 4 : 1 byla v průběhu 7 dní pozorována vzrůstající míra exprese ALP. Statisticky významně vyšší míra exprese ALP oproti monokultuře osteoblastů byla v kokultuře zaznamenána 4. a 7. den kultivace (Leszczynska et al. 2013). V kokultuře primárních lidských osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 bylo demonstrováno, že přidání 5 µg/ml rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média vedlo k více jak 2x vyšší míře exprese ALP po 24 hodinách kultivace oproti kokultuře bez přidání Sonic hedgehog. Po 14 dnech kultivace došlo k poklesu exprese ALP a přidání Sonic hedgehog už nevykazovalo významný vliv (Dohle et al. 2010). Zvýšená míra exprese ALP v kokultuře oproti monokultuře byla pozorována i při kultivaci ve 3D uspořádání. U sféroidů tvořených lidskými osteoblasty a HUVEC v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči byla po 48 hodinách kultivace zaznamenána 14x vyšší míra exprese ALP oproti monokultuře osteoblastů (Stahl et al. 2004). Pokud byly myší buňky podobné osteoblastům kokultivovány s myšími mikrovaskulárními endoteliálními buňkami v poměru 98 : 2 na kalciumfosfátovém nosiči v dynamické 3D kokultuře, tak exprese ALP dosahovala po 7 dnech 143 % exprese ALP statické kokultury (Barron et al. 2012). Kokultivace osteoblastů s angiogenním buněčným typem tedy vede ke zvýšení míry exprese ALP ve 2D i 3D uspořádání. Expresi ALP v kokultuře je možné dále zvýšit, konkrétně byla použita aktivace signální dráhy Hedgehog a dynamická kultivace.

Kromě exprese ALP je v kokulturách měřena i enzymatická aktivita ALP. V kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC v poměrech 1 : 1, 1 : 4 i 4 : 1 byla u HUVEC zjištěna zanedbatelná aktivita ALP oproti ALP aktivitě osteoblastů. U kokultur tohoto typu v přímém kontaktu byla po 7 dnech kultivace zjištěna významně vyšší aktivita ALP oproti monokultuře osteoblastů ve všech studovaných poměrech. Naopak při kultivaci v nepřímém kontaktu nebyl 7. den kultivace pozorován statisticky významný rozdíl v aktivitě ALP u žádné z těchto kokultur ve srovnání s monokulturou osteoblastů (Leszczynska et al. 2013). Významně vyšší aktivita ALP ve srovnání s monokulturou osteogenního buněčného typu byla naměřena také v kokultuře HOP a HUVEC v poměru 1 : 2 v přímém kontaktu po 72 hodinách kultivace (Thébaud et al. 2012). Přidání 5 µg/ml

rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média kokultury lidských primárních osteoblastů a lidských EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 vedlo po 14 dnech k významně vyšší aktivitě ALP ve srovnání s kokulturou nestimulovanou pomocí Sonic hedgehog (Dohle et al. 2010).

Enzymatická aktivita ALP byla sledována i ve 3D kokulturách. Ve 3D kokultuře lidských osteoblastů tvořících sféroidy s HUVEC v poměru 1 : 1 byla po 48 hodinách pozorována statisticky významně vyšší aktivita ALP (konkrétně 6,3x) oproti monokultuře osteoblastů (Stahl et al. 2004). Ve 3D kokultuře lidských osteoblastů linie MG-63 s HUVEC v poměru 1 : 4 na mikrovlákněném nosiči byla aktivita ALP 5. den více jak 5x vyšší než v monokultuře osteoblastů. 7. a 14. den byl oproti 5. dni pozorován pokles aktivity ALP, ale stále byla zaznamenána významně vyšší aktivita než v monokultuře osteoblastů (Inomata a Honda 2019). Z výše uvedeného vyplývá, že kokultivace vede ke zvýšení aktivity ALP ve 2D i 3D uspořádání. Pro významné zvýšení aktivity ALP ve 2D kokulturách byl důležitý přímý kontakt a byl zjištěn vliv dráhy Hedgehog také na aktivitu ALP.

Dalšími sledovanými markery osteogeneze jsou časné markery kolagen I, RUNX2 a marker pozdní osteogeneze osteokalcin. V kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC byla po dobu 7 dní sledována vzrůstající exprese kolagenu I, která byla 4. den kultivace statisticky významně vyšší u kokultur v poměru 1 : 1 a 1 : 4 oproti monokultuře osteoblastů. 7. den kultivace byla statisticky významně vyšší míra exprese kolagenu I detekována u všech testovaných poměrů (1 : 1, 1 : 4 i 4 : 1) (Leszczynska et al. 2013). V dynamické 3D kokultuře myších buněk podobných osteoblastům s myšími mikrovaskulárními endoteliálními buňkami na kalciumfosfátovém nosiči v poměru 98 : 2 bylo po 14 dnech kultivace detekováno jen 55 % exprese RUNX2 naměřené ve statické kokultuře tohoto typu, což autoři označili za překvapivé (Barron et al. 2012). V kokultuře lidských primárních osteoblastů a lidských EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 nemělo přidání 5 µg/ml rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média žádný významný vliv na expresi osteokalcinu (Dohle et al. 2010). Naopak v dynamické 3D kokultuře myších buněk podobných osteoblastům s myšími mikrovaskulárními endoteliálními buňkami na kalciumfosfátovém nosiči v poměru 98 : 2 bylo po 14denní kultivaci pozorováno 1072 % exprese osteokalcinu statické kokultury (Barron et al. 2012). Také ve 3D kokultuře lidských osteoblastů linie MG-63 s HUVEC v poměru 1 : 1 na nanokompozitním hydrogelu byla pozorována významně vyšší exprese osteokalcinu ve srovnání s monokulturou osteoblastů. 14. dne dosáhla exprese osteokalcinu maxima (asi 3x větší míra exprese v kokultuře než v monokultuře), 21. den kultivace byl poté zaznamenán pokles (Shahabipour et al. 2020).

Posledním hodnotícím kritériem osteogeneze v kokultuře je míra mineralizace. U kokultury HOP a HUVEC v poměru 1 : 2 v přímém kontaktu byl detekován pozitivní vliv kokultivace na míru mineralizace, protože kokultura 21. den kultivace vytvořila větší množství vápenatých usazenin ve srovnání s monokulturou HOP (Thébaud et al. 2012). Míru mineralizace kokultury dále lze ovlivnit

pomocí Sonic hedgehog. Přidáním 5 µg/ml rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média kokultury lidských primárních osteoblastů a lidských EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 se podařilo navodit významně vyšší míru mineralizace oproti kokultuře bez přidání Sonic hedgehog (Dohle et al. 2010).

1.3 Angiogeneze

Také při hodnocení úspěšnosti angiogeneze v kokultuře lze využít markery. Nejčastěji používaným markerem je VEGF. V kokultuře lidských primárních osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 bylo zjištěno, že primární osteoblasty vykazují po 24 hodinách i 14 dnech kultivace více jak 4x vyšší míru exprese VEGF ve srovnání s lidskými EPC z periferní krve (Dohle et al. 2010). Exprese VEGF v kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 4 : 1 po dobu 7 dní stoupala, ale při žádném měření nebyla detekována významně vyšší míra exprese VEGF kokulturou oproti monokultuře osteoblastů. V monokultuře osteoblastů byla pozorována také nejvyšší koncentrace VEGF ve formě proteinu, ale kokultury ve všech sledovaných poměrech (1 : 1, 1 : 4 i 4 : 1 osteoblasty : HUVEC) vykazovaly 4. i 7. den kultivace statisticky významně vyšší koncentraci VEGF proteinu ve srovnání s monokulturou HUVEC (Leszczynska et al. 2013). V kokultuře primárních potkaních periostálních osteoblastů s potkaními EPC z kostní dřeně bylo zaznamenáno, že kokultura obsahující časně EPC (izolované ze 7-10denní kultury) produkuje po 24 hodinách kultivace významně více VEGF proteinu ve srovnání s kokulturou používající pozdní EPC (izolované ze 4týdenní kultury) (Giles et al. 2017). Míru exprese VEGF i množství VEGF proteinu se v kokultuře lidských primárních osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 podařilo ovlivnit přidáním 5 µg/ml rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média. Po 24 hodinách byla detekována významně míra exprese VEGF i množství VEGF proteinu ve srovnání s kokulturou bez Sonic hedgehog (Dohle et al. 2010).

Ve 3D kokultuře lidských osteoblastů a HUVEC tvořících sféroidy v poměru 1 : 1 v přímém kontaktu na kolagenovém nosiči byla pozorována více jak 3x vyšší míra exprese receptoru 2 pro VEGF (VEGFR2) oproti monokultuře HUVEC. V kokultuře ale byla detekována 3,6x nižší míra exprese VEGF než v monokultuře osteoblastů (Stahl et al. 2004). Ve 3D kokultuře lidských osteoblastů linie MG-63 s HUVEC v poměru 1 : 4 na mikrovlákněném nosiči bylo 5., 7., i 14. den kultivace detekováno významně nižší množství VEGF ve formě proteinu ve srovnání s monokulturou osteoblastů. Autoři předpokládají, že k tomu došlo díky tomu, že HUVEC VEGF proteiny absorbovaly (Inomata a Honda 2019). Toto vysvětlení bylo představeno již dříve, konkrétně bylo navrženo, že HUVEC vytvořené proteiny v kokultuře hned po produkci využijí k nastartování intracelulárních signálních kaskád

(Grellier et al. 2009a), což by odpovídalo mechanismu tyrosinkinázových receptorů (mezi něž patří i VEGF receptory), které jsou po aktivaci endocytovány do buňky.

Dalšími markery angiogeneze jsou angiogenní faktory angiopoetin 1 a angiopoetin 2. V kokultuře lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 1 : 1 byl demonstrován vliv typu kokultivace na expresi a množství receptoru pro angiopoetin 1 ve formě proteinu. 3D kokultura využívající kolagenový nosič vykazovala po 48 hodinách 6,5x vyšší míru exprese i 3x vyšší množství tohoto receptoru ve formě proteinu než 2D kokultura (Stahl et al. 2004). I u těchto markerů byl pozorován vliv přidání Sonic hedgehog. Kokultura lidských primárních osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 po přidání 5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média vykazovala po 24 hodinách kultivace významně vyšší míru exprese angiopoetinu 1 i angiopoetinu 2 než kokultura bez přidání Sonic hedgehog. U angiopoetinu 1 bylo statisticky významně vyšší množství detekováno po 24 hodinách i ve formě proteinu (Dohle et al. 2010).

Důležitou podmínkou pro úspěšnou angiogenezi v kokultuře *in vitro* je schopnost tvorby struktur podobných tubulům a jejich organizace do sítí. U kokultur používajících primární lidské osteoblasty s HMEC v poměru 4 : 26 i u osteoblastů linie MG-63 s HMEC v poměru 4 : 26 v přímém kontaktu byla 18. den kultivace pozorována tvorba struktur podobných tubulům. Překvapivě při přidání 10 ng/ml VEGF a 50 ng/ml fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF-2) nebyla 18. den pozorována žádná tvorba těchto struktur. Při kultivaci v nepřímém kontaktu, nebo při přidání sekretu jednoho buněčného typu k monokultuře druhého buněčného typu také nebyla žádná tvorba pozorována (Unger et al. 2007). V kokultuře HOP a HUVEC v poměru 1 : 2 v přímém kontaktu byl pozorován pohyb HUVEC podél HOP. V monokulturách k žádnému srovnatelnému pohybu nedocházelo. Po 48 hodinách kultivace byla v kokultuře zaznamenána vytvořená síť ze struktur podobných tubulům (Thébaud et al. 2012). V kokultuře primárních lidských osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 byla také pozorována tvorba struktur podobných tubulům. Pokud ale byl do média kokultury přidán inhibitor Sonic hedgehog signalizace cyclopamin (v koncentraci 5, 10 nebo 20 $\mu\text{mol/l}$), byla tvorba těchto struktur inhibována a při nejvyšší koncentraci inhibitoru se struktury podobné tubulům již téměř netvořily. Naopak při přidání 5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média kokultury byla po 24 hodinách i 14 dnech kultivace zaznamenána významně vyšší celková délka i plocha struktur podobných tubulům oproti kokultuře bez Sonic hedgehog v médiu (Dohle et al. 2010). V kokultuře primárních potkaních periostálních osteoblastů a potkaních EPC z kostní dřeně bylo ukázáno, že typ použitých EPC ovlivňuje i tvorbu struktur podobných tubulům. Pokud bylo kokultivováno 5000 osteoblastů s 2×10^5 časných EPC, tak kokultura tvořila větší počet struktur podobných tubulům s celkovou vyšší délkou oproti monokultuře časných EPC. Naopak kokultura 5000 osteoblastů s 2×10^5 pozdních EPC tvořila nižší počet struktur podobných tubulům (i

s nižší celkovou délkou) než monokultura pozdních EPC i kokultura využívající časně EPC (Giles et al. 2017).

Tvorba struktur podobných tubulům byla zaznamenána i ve 3D kokulturách. Ve 3D kokultuře lidských osteoblastů s HUVEC v poměru 1 : 1 v přímém kontaktu na kolagenovém nosiči obohacené o 25 ng/ml VEGF a 25 ng/ml FGF-2 byly zaznamenány struktury podobné tubulům, ale byly významně užší a méně organizované než podobné struktury zaznamenané u monokultury HUVEC. Navíc obsahovaly i méně oblastí pozitivních na marker endoteliálních buněk diferenciační faktor 31 (CD31) (Wenger et al. 2004). Sféroidy HUVEC na kolagenovém gelu vykazovaly minimální tvorbu struktur podobných tubulům, která ale byla výrazně zvýšena po přidání 25 ng/ml VEGF a 25 ng/ml FGF-2 do kultivačního média. Ve 3D kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC ve formě sféroidů v přímém kontaktu na kolagenovém nosiči (15000 osteoblastů + 30 sféroidů každý o 500 buňkách na 0,7 ml kolagenového gelu) ale byla tvorba těchto struktur téměř zcela inhibována i v případě přidání angiogenních faktorů. Pokud však byla kokultivace provedena v nepřímém kontaktu, nebo byl k HUVEC sféroidům přidán sekretom osteoblastů, tak žádná významná inhibice tvorby struktur podobných tubulům ve srovnání s HUVEC sféroidy nebyla pozorována. Větší tvorbu struktur podobných tubulům než sféroidy HUVEC vykazovaly sféroidy lidských EPC z pupečnickové krve (při přidání VEGF a FGF-2 byla míra tvorby struktur ještě dále zvýšena). V případě kokultivace v přímém kontaktu zde ale navíc na rozdíl od kokultury využívající HUVEC nebyla pozorována významná inhibice tvorby struktur podobných tubulům ve srovnání se sféroidy EPC (Stahl et al. 2005). Tvorba struktur podobných tubulům byla pozorována i u 3D kokultur primárních lidských osteoblastů s HMEC nebo osteoblastů linie MG-63 s HMEC v poměru 1 : 6,5 na síti z fibroinu či v poměru 15 : 85 na jiných typech nosičů (hydroxapatitu, NiTi a trikalciumfosfátu) (Unger et al. 2007). Ve 3D kokultuře lidských osteoblastů linie MG-63 s HUVEC v poměru 1 : 4 na mikrovlákněném nosiči byla 7. den kultivace pozorována tvorba struktur podobných tubulům, které 14. den kultivace vytvořily síť (Inomata a Honda 2019). I 3D kokultura lidských osteoblastů linie MG-63 s HUVEC v poměru 1 : 1 na nanokompozitním hydrogelu vykazovala 3. a 9. den kultivace tvorbu struktur podobných tubulům, zatímco monokultura HUVEC v tomto uspořádání žádné struktury podobné tubulům netvořila (Shahabipour et al. 2020). Lze tedy shrnout, že tvorba struktur podobných tubulům byla pozorována ve 2D i 3D uspořádání v různých typech kokultur používajících jako osteogenní buněčný typ osteoblasty nebo osteoprogenitory, ale tvorba sítí byla zaznamenána jen ve dvou výše zmíněných kokulturách.

2. BMSC

Mesenchymální stromální buňky odvozené z kostní dřeně (BMSC) jsou druhým osteogenním typem v této práci a prvním patřícím mezi MSC. S ve zkratce BMSC může znamenat jak stromální, tak i kmenové (stem) buňky a obě označení byla dříve používána zaměnitelně, což dnes není doporučeno (Viswanathan et al. 2019). MSC ve smyslu mesenchymálních stromálních buněk jsou definovány podle 3 základních kritérií: 1) jsou schopny adherovat k plastovému povrchu, 2) exprimují povrchové markery CD73, CD90, CD105 nebo CD13, ale neexprimují CD14, CD19, CD31, CD45 a HLA-DR (lidský leukocytární antigen třídy DR) a 3) jsou schopny *in vitro* diferenciaci do adipocytů, osteoblastů a chondrocytů. Dalšími povrchovými markery pro MSC pocházející z kostní dřeně jsou například také CD29, CD44 a CD271 (Mollentze et al. 2021). Navíc byla navržena možnost odlišení BMSC podle molekulární identity získané analýzou diferenciální genové exprese. Tato analýza odhalila, že BMSC získané ze dvou různých pacientů ze stejné lokace (například z hřebene kosti kyčelní) jsou si genovou expresí podobnější než BMSC ze dvou různých lokací u stejného pacienta (Zou et al. 2022). Nevýhodou BMSC oproti mesenchymálním stromálním buňkám odvozeným z tukové tkáně (ADSC) je větší pravděpodobnost vzniku komplikací po odběru (Rautiainen et al. 2021).

Kokultury obsahující BMSC jsou studovány jak ve 2D uspořádání, tak i ve 3D. Nejčastěji používaným poměrem v kokulturách zmíněných v této kapitole je 1 : 1 BMSC : angiogenní buněčný typ, což platí jak pro kokultury obsahující pouze lidské buňky (Jinling et al. 2014; Liang et al. 2017; Nguyen et al. 2020; Piard et al. 2019; Steiner et al. 2012), tak i pro ty, které používají buňky zvířecího původu (Ge et al. 2018; Hou et al. 2017; Peng et al. 2019; Steiner et al. 2017; Xu et al. 2020; Zhang et al. 2019). Angiogenním buněčným typem ve vybraných kokulturách s BMSC lidského původu jsou HUVEC (Chen et al. 2018; Jinling et al. 2014; Li et al. 2010; Nguyen et al. 2020; Piard et al. 2019; Steiner et al. 2012; Thébaud et al. 2012; Tsigkou et al. 2010), lidské EPC z kostní dřeně (Liang et al. 2017), lidské aortální endoteliální buňky (Tsai et al. 2015), lidské MSC odvozené z amnionu (Bian et al. 2019) a lidské endoteliální buňky tvořící kolonie (ECFC) (Gawlitta et al. 2011). U BMSC zvířecího původu byly také použity HUVEC (Mohammadi et al. 2015; Shen et al. 2019; Zhang et al. 2019), nebo EPC z různých zdrojů, konkrétně myši EPC z kostní dřeně (Ge et al. 2018; Hou et al. 2017), myši embryonální EPC linie T17b (Steiner et al. 2017), králičí karotidální EPC (Peng et al. 2019) a potkaní EPC z kostní dřeně (Xu et al. 2020).

2.1 Proliferace

Kokultivace ovlivňuje míru proliferace lidských BMSC. Při kokultivaci lidských BMSC s lidskými aortálními endoteliálními buňkami v poměru 1 : 2 (Tsai et al. 2015), s lidskými EPC z kostní dřene v poměru 1 : 1 (Liang et al. 2017), nebo s lidskými MSC odvozenými z amnionu v poměru 1 : 3 (Bian et al. 2019) byla zjištěna statisticky významně vyšší míra proliferace ve srovnání s monokulturou lidských BMSC. Pozitivní vliv kokultivace na míru proliferace byl ve srovnání s příslušnými monokulturami ukázán i při využití trikultury lidských BMSC, HUVEC a lidských buněk hladkého svalstva pupečnickové žíly v poměru 2 : 1 : 1, stejně jako u tetrakultury (1 : 1 : 1 : 1), kde čtvrtým buněčným typem k předchozím zmíněným byly lidské dermální fibroblasty (Wang et al. 2020). Jakým způsobem bude míra proliferace ovlivněna záleží i na uspořádání kokultury. Ve 2D kokultuře lidských BMSC a lidských MSC odvozených z amnionu v poměru 1 : 3 byl nalezen významně vyšší podíl BMSC v S fázi oproti monokultuře BMSC při využití kokultivace v nepřímém kontaktu, zatímco při využití kokultury v přímém kontaktu byl podíl významně nižší ve srovnání s monokulturou (Bian et al. 2019). Zároveň bylo upozorněno i na odlišné chování kokultury ve 2D a 3D uspořádání. 2D kokultura lidských BMSC a lidských EPC z kostní dřene v poměru 1 : 1 6. den kultivace nevykazovala žádný rozdíl v proliferaci oproti příslušné monokultuře, zatímco stejná kokultura ve 3D uspořádání 6. den vykazovala statisticky významně vyšší množství BMSC při počítání buněk v šesti náhodně vybraných políčkách oproti monokultuře BMSC (Liang et al. 2017).

V kokulturách s buňkami zvířecího původu byl také popsán vliv na proliferaci. Při 3D kokultivaci potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči byla zjištěna významně vyšší míra proliferace BMSC ve srovnání s monokulturou BMSC (Zhang et al. 2019). Tento efekt byl pozorován i při přidání sekretu angiogenního buněčného typu. U monokultury potkaních BMSC byla po přidání sekretu myších embryonálních EPC linie T17b pozorována významně vyšší míra proliferace oproti samotné monokultuře BMSC (Steiner et al. 2017). Z hlediska proliferace angiogenního buněčného typu byla popsána odlišná situace při kokultivaci a přidání sekretu z BMSC k monokultuře. V kokultuře myších BMSC a myších EPC z kostní dřene v poměru 1 : 1 byl pozorován významně vyšší počet EPC v kokultuře na 1 mm² ve srovnání s monokulturou EPC (Hou et al. 2017). Naopak při přidání sekretu potkaních BMSC k myším embryonálním buňkám linie T17b nebyl pozorován žádný významný rozdíl v proliferaci ve srovnání s monokulturou (Steiner et al. 2017).

Míra proliferace v kokultuře závisí i na kultivačních podmínkách. Stejně jako v případě lidských osteoblastů kokultivovaných s HUVEC i lidské BMSC kokultivované s HUVEC v poměru 1 : 1 při použití 1% FBS v médiu vykazovaly významně vyšší míru proliferace BMSC oproti monokultuře BMSC. Zároveň se v tomto uspořádání oproti prvnímu dni ve všech sledovaných úsecích

snížovalo množství přibývajících HUVEC. Od kokultury HUVEC s osteoblasty se však kokultura používající BMSC liší při použití 10% séra, protože zde není významný rozdíl v proliferaci ve srovnání s monokulturou BMSC (Steiner et al. 2012). Díky tomuto zjištění by bylo vhodné zvážit použití nižší koncentrace séra pro tento typ kokultury, ale zároveň je nutné vyvážit pozitivní účinky na proliferaci BMSC s minimalizací negativního vlivu na množství HUVEC. Z hlediska vlivu koncentrace kyslíku na proliferaci v kokultuře byly hodnoceny jako úspěšnější kokultury lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 v normoxických podmínkách, ale i v hypoxických byl pozorován téměř konstatní růst po dobu šesti dní. Pro navození hypoxických podmínek se jako vhodná jeví aplikace dimethyloxalyglycinu, protože při využití CoCl_2 byla pozorována nekrotizace BMSC (Nguyen et al. 2020). Z výše uvedeného lze tedy vyvodit, že kokultivace BMSC s angiogenním buněčným typem vede ke zvýšení míry proliferace ve srovnání s monokulturou BMSC, ale je nutné optimalizovat podmínky pro konkrétní kokulturu.

Angiogenní a osteogenní buněčný typ se ovlivňují i z hlediska míry apoptózy. Kokultura lidských BMSC kokultivovaných s HUVEC v poměru 1 : 1 kopírovala zjištění z kokultury lidských osteoblastů s HUVEC. Byla pozorována významně nižší míra apoptózy kokultivovaných BMSC v přímém i nepřímém kontaktu oproti monokultuře BMSC. Autoři popsali, že u kokultury v přímém kontaktu byla detekována významně vyšší míra fosforylace BAD oproti monokultuře BMSC, zatímco u kokultury v nepřímém kontaktu se míra fosforylace BAD v kokultuře významně nelišila od monokultury BMSC (Steiner et al. 2012). U kokultury potkaních BMSC a myších embryonálních EPC linie T17b v poměru 3 : 1 bylo zjištěno, že kokultivované EPC vykazovaly významně nižší míru apoptózy než monokultura EPC. Naopak u BMSC v této kokultuře nebyl pozorován žádný významný vliv na proliferaci ve srovnání s monokulturou BMSC (Steiner et al. 2017).

2.2 Osteogeneze

BMSC mohou být v kokulturách používány v roli osteogenního buněčného typu. Stejně jako u kokultur využívajících osteoblasty i u kokultur s BMSC je důležitým raným markerem osteogeneze ALP. U kokultury potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 byla pozorována zvyšující se exprese ALP 3. den oproti 1. dni, přičemž maxima dosáhla 7. den. 14. den už byl zaznamenán pokles na hodnotu nižší než která byla naměřena 1. den. Ve všech sledovaných časech byla exprese ALP v kokultuře statisticky významně vyšší než v monokultuře BMSC (Shen et al. 2019). Při 3D kokultivaci potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči byl při sledování exprese ALP 5., 15. a 25. den také pozorován pokles, s minimální expresí 25. den kultivace. Na rozdíl od předchozí zmíněné kokultury tu však nebyla v žádném měřeném úseku detekována významně odlišná exprese ALP v kokultuře ve srovnání s monokulturou BMSC (Zhang et al. 2019). Při

porovnávání koncentrace ALP proteinu v kokulturách králičích BMSC a králičích karotidálních EPC byla podle očekávání detekována významně vyšší koncentrace ALP ve formě proteinu u kokultur s vyšším/stejným poměrem BMSC : EPC (3 : 1, 2 : 1 a 1 : 1) oproti kokulturám s vyšším poměrem EPC (BMSC : EPC 1 : 2 nebo 1 : 3) (Peng et al. 2019).

Kromě kvantifikace množství ALP ve formě mRNA nebo proteinu je v kokulturách obsahujících BMSC měřena i aktivita ALP. Významně vyšší aktivita ALP ve srovnání s monokulturou lidských BMSC byla naměřena 7. a 14. den v kokultuře lidských BMSC s lidskými MSC odvozenými z amnionu v poměru 1 : 3, ale pouze pokud byly kultivovány v nepřímém kontaktu, v přímém kontaktu žádný významný rozdíl detekován nebyl (Bian et al. 2019). Naopak v kokultuře lidských BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 v přímém kontaktu byla statisticky významně vyšší aktivita ALP oproti monokultuře HUVEC v šesti měřeních ze sedmi v rámci 7 dní (Thébaud et al. 2012). V kokultuře potkaních BMSC a potkaních EPC z kostní dřene v poměru 1 : 1 byla 7. i 14. den detekována významně vyšší aktivita ALP oproti monokultuře BMSC (Xu et al. 2020). U kokultury potkaních BMSC a myších embryonálních EPC linie T17b v poměru 1 : 1 v přímém kontaktu byla po 48 hodinách kultivace zaznamenána statisticky významně nižší aktivita ALP ve srovnání s monokulturou BMSC (Steiner et al. 2017). U 3D kokultury potkaních BMSC a HUVEC v přímém kontaktu v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči byla 5. a 15. den také změřena významně nižší aktivita ALP než v monokultuře potkaních BMSC (Zhang et al. 2019). Vyšší aktivita ALP byla tedy pozorována u obou kokultur používajících čistě lidské buňky, ale pro osvětlení potenciálního vlivu kultivace v přímém, nebo nepřímém kontaktu by bylo třeba srovnat jednotlivé kokultury při stejných kultivačních podmínkách a z důvodu výsledků ze zvířecích kokultur nejlépe při využití 2D i 3D uspořádání.

V kokulturách s BMSC jsou sledovány i další časné markery, v níže zmíněných jde o RUNX2 a kolagen typu I. U kokultury lidských BMSC a lidských MSC odvozených z amnionu v poměru 1 : 3 v nepřímém kontaktu byla 7. i 14. den detekována významně vyšší míra exprese RUNX2 ve srovnání s monokulturou, zatímco při kultivaci v přímém kontaktu žádný rozdíl pozorován nebyl (Bian et al. 2019). Při kokultivaci potkaních BMSC a potkaních EPC z kostní dřene v poměru 1 : 1 byla 14. den kultivace zaznamenána o více jak 42 % vyšší exprese RUNX2 ve srovnání s monokulturou potkaních BMSC (Xu et al. 2020). Pokud byly potkaní BMSC a HUVEC v poměru 1 : 2 kokultivovány v osteogenním médiu, tak exprese RUNX2 byla významně vyšší 3., 7. i 14. den kultivace ve srovnání s monokulturou BMSC. Maximální exprese byla detekována 7. den, konkrétně byla více jak 2x vyšší ve srovnání s expresí RUNX2 v monokultuře. Exprese kolagenu I byla významně vyšší 1. den (kdy byla maximální a více jak 3x vyšší ve srovnání s monokulturou) a 3. den kultivace při porovnání s monokulturou BMSC, naopak 7. a 14. den už byla významně nižší. Při použití kokultury v růstovém médiu byla exprese kolagenu I 1. den významně nižší než monokultury, všechny ostatní sledované dny

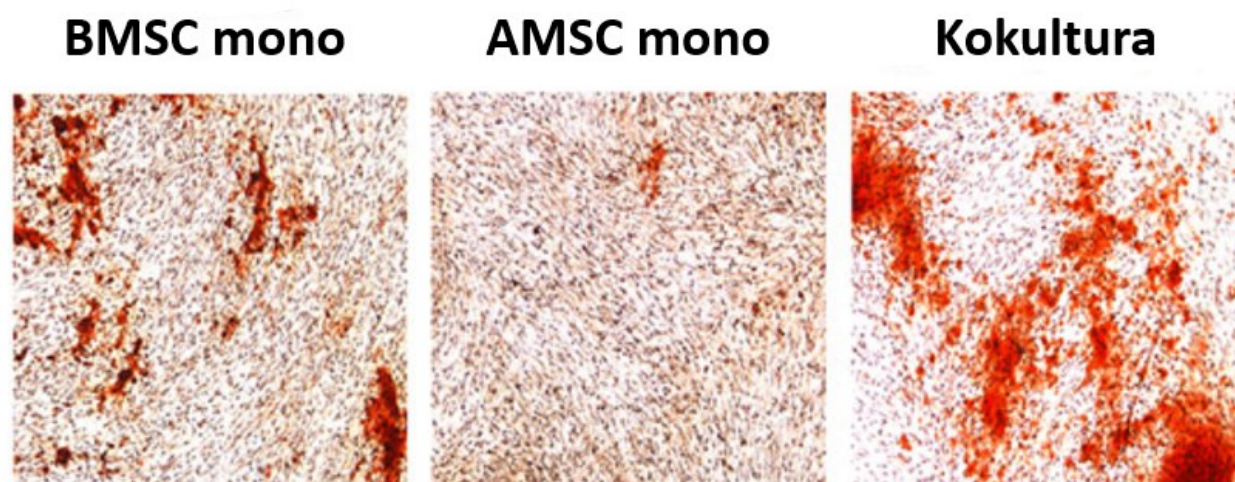
se exprese kolagenu I ani RUNX2 nelišila od monokultury BMSC (Shen et al. 2019). Ve 3D kokultuře potkaních BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči nebyla 5., 15. ani 25. den zaznamenána významně odlišná exprese RUNX2 ani kolagenu I při srovnání s monokulturou potkaních BMSC (Zhang et al. 2019).

Mezi sledované pozdní markery osteogeneze jsou u kokultur s BMSC zařazeny osteokalcin a osteopontin. V kokultuře lidských BMSC a lidských mesenchymálních buněk odvozených z amnionu v poměru 1 : 3 byla 14. den zjištěna více jak 3x vyšší míra exprese osteokalcinu při kokultivaci v nepřímém kontaktu ve srovnání s monokulturou BMSC. Při kokultivaci v přímém kontaktu žádný rozdíl nebyl pozorován (Bian et al. 2019). Ve 3D kokultuře potkaních BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči byla také zjištěna významně vyšší exprese osteokalcinu v porovnání s monokulturou BMSC, konkrétně 25. den více jak 5x vyšší exprese ve srovnání s monokulturou (Zhang et al. 2019). Exprese osteopontinu byla v kokultuře potkaních BMSC a potkaních EPC z kostní dřevě v poměru 1 : 1 o více než 34 % vyšší než v monokultuře potkaních BMSC (Xu et al. 2020).

Úspěšnost osteogeneze kokultury je také možné ohodnotit díky srovnání tvorby vápenatých usazenin s odpovídající monokulturou. Při kokultivaci lidských BMSC s lidskými MSC z amnionu v poměru 1 : 3 v nepřímém kontaktu bylo po 14 dnech detekováno obarvením více vápenatých usazenin než v monokultuře lidských BMSC (vizte Obr. 2 na další straně) (Bian et al. 2019). U potkaních BMSC kokultivovaných s HUVEC v poměru 1 : 2 bylo také po 14 dnech detekováno více vápenatých usazenin než v monokultuře potkaních BMSC (Shen et al. 2019). 3D kokultura potkaních BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči sice vykazovala mezi 5. a 25. dnem sledování pomalejší mineralizaci než monokultura potkaních BMSC obohacená o 40 ng/μl kostního morfogenního proteinu 2 (BMP-2), ale 25. den byla v kokultuře pozorována vyšší míra mineralizace než v monokultuře BMSC i monokultuře BMSC s přidaným BMP-2 (Zhang et al. 2019). Je tedy možné shrnout, že použití kokultur obsahujících BMSC je z hlediska tvorby vápenatých struktur úspěšnější než samotné monokultury.

Na osteogenezi má vliv koncentrace kyslíku použitá při kultivaci. V kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 bylo demonstrováno, že hypoxické podmínky navozené chemicky mají negativní vliv na osteogenní diferenciaci lidských BMSC v osteogenním médiu, protože za těchto podmínek ve srovnání s normoxií nevzniká barvitelná vápenatá usazenina ani po 9 dnech kultivace na rozdíl od kokultivace pouze v osteogenním médiu. Také exprese ALP i kolagenu typu I byla významně vyšší v podmínkách s normální koncentrací kyslíku. Z tohoto důvodu bylo navrženo, že by kokultura měla být zpočátku v normoxickém prostředí, aby došlo k navození osteogeneze a teprve poté může být krátce použito hypoxické prostředí kvůli podpoře angiogeneze (Nguyen et al. 2020). Naopak v kokultuře lidských BMSC s lidskými ECFC v poměru 4 : 1 došlo k dřívější tvorbě vápenatých

usazenin v hypoxických podmínkách než u kokultury v normoxii. Je však nutné zmínit, že v tomto experimentu byla použita výrazně delší doba sledování, konkrétně 22 dní (Gawlitta et al. 2011).



Obr. 2 Srovnání množství obarvených vápenatých usazenin v monokulturách a kokultuře. V kokultuře lidských BMSC s lidskými MSC z amnionu v poměru 1 : 3 v nepřímém kontaktu (Kokultura) bylo po 14 dnech pozorováno více vápenatých usazenin než v monokultuře BMSC (BMSC mono) nebo monokultuře MSC z amnionu (AMSC mono). Upraveno (Bian et al. 2019).

2.3 Angiogeneze

Významným markerem využívaným pro hodnocení angiogeneze je VEGF. V kokultuře lidských BMSC s lidskými MSC odvozenými z amnionu v poměru 1 : 3 v nepřímém kontaktu byla 14. den zjištěna více jak 2x vyšší míra exprese VEGF i více jak 2x větší množství VEGF proteinu ve srovnání s monokulturou BMSC. Pokud ale byla kokultivace provedena v přímém kontaktu, tak nebyl pozorován žádný rozdíl v expresi ani množství VEGF proteinu v kokultuře ve srovnání s monokulturou BMSC (Bian et al. 2019). Při použití kultivace v přímém kontaktu v kokultuře lidských BMSC a lidských EPC z kostní dřeně v poměru 1 : 1 nebyl pozorován žádný rozdíl v koncentraci VEGF receptoru VEGFR2 ve srovnání s monokulturou EPC (Liang et al. 2017). Sekretom kokultury myších BMSC a myších EPC z kostní dřeně v poměru 1 : 1 v nepřímém kontaktu vykazoval významně vyšší množství VEGF proteinu než sekretom monokultury myších BMSC (Ge et al. 2018). U kokultury potkaních BMSC a myších embryonálních EPC linie T17b v poměru 3 : 1 v přímém kontaktu také nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v množství VEGF ve formě proteinu oproti monokultuře BMSC (Steiner et al. 2017). Ve 2D kokulturách obsahujících BMSC se zdá, že dochází ke zvýšené produkci VEGF jen při kultivaci v nepřímém kontaktu a v přímém tedy

dochází k ovlivnění angiogeneze jiným způsobem. Ve 3D kokultuře potkaních BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 v přímém kontaktu ale byla po 24, 16 i 48 hodinách zaznamenána významně vyšší koncentrace proteinu VEGFR2 ve srovnání s monokulturou HUVEC (Mohammadi et al. 2015), což by mohlo ukazovat na roli VEGF i v přímém kontaktu. Bylo by třeba udělat více studií s různými buněčnými typy ve 3D uspořádání a porovnat s těmi ve 2D, aby bylo možné zjistit, jestli jde o fenomén specifický pro 2D uspořádání.

Kromě VEGF jsou v kokulturách sledovány i další markery ukazující na pozitivní vliv kokultivace na angiogenezi. V kokultuře lidských BMSC a lidských EPC z kostní dřeně v poměru 1 : 1 bylo zjištěno statisticky významně větší množství receptoru pro růstový faktor odvozený z krevních destiček (PDGF) ve formě proteinu ve srovnání s oběma příslušnými monokulturami (Liang et al. 2017). V kokultuře lidských BMSC a lidských mesenchymálních buněk odvozených z amnionu v poměru 1 : 3 byla 14. den sledována významně vyšší míra exprese angiogeninu ve srovnání s monokulturou BMSC (Bian et al. 2019). Při kokultivaci myších BMSC a myších EPC z kostní dřeně v poměru 1 : 1 v nepřímém kontaktu bylo v kokultuře detekováno významně více CD31 a von Willebrandova faktoru (vWF) ve formě mRNA i proteinu než v monokultuře EPC. Pokud ale byl k monokultuře EPC přidán sekretom BMSC a anti-VEGF protilátka, došlo k výraznému snížení množství mRNA i proteinu CD31 i vWF oproti monokultuře EPC se sekretomem BMSC kam protilátka přidána nebyla, což ukazuje na provázanost s drahou VEGF (Ge et al. 2018).

Dalším krokem po zjištění produkce angiogenních markerů je zhodnocení schopnosti kokultury tvořit struktury podobné tubulům a sítě. Kokultivace lidských BMSC s HUVEC umožňuje tvorbu sítí tvořených strukturami připomínajícími tubuly (Chen et al. 2018; Jinling et al. 2014; Thébaud et al. 2012; Tsigkou et al. 2010; Xiao et al. 2018), které monokultura HUVEC tvořit nedokáže (Jinling et al. 2014; Li et al. 2011; Xiao et al. 2018). Sítě jsou tvořeny ve 2D i 3D uspořádání kokultury (Jinling et al. 2014). Ve 3D kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 na fibrinovém nosiči byly zejména v oblastech spojů sítě detekovány buňky pozitivní na neurální gliový antigen 2, který ukazuje na diferenciaci v pericyty, které jsou spojovány s vysokou kvalitou sítě. V odpovídajících monokulturách žádné buňky pozitivní na neurální gliový antigen 2 nalezeny nebyly (Pill et al. 2018). Ve srovnání s kokulturami HOP a HUVEC (Thébaud et al. 2012) i ADSC a HUVEC (Jinling et al. 2014) ale byly sítě hodnoceny jako méně organizované. Naopak při porovnání s HUVEC kokultivovanými s lidskými MSC z pupeční šňůry, lidskými indukovanými pluripotentními kmenovými buňkami, nebo lidskými embryonálními kmenovými buňkami nebyl mezi sítěmi žádný rozdíl (Chen et al. 2018). Lidské BMSC jsou schopny v kokultuře s HUVEC úspěšně tvořit sítě ze struktur připomínajících tubuly, ale při rozhodování mezi nimi a ADSC jsou v tomto ohledu ADSC zřejmě lepší volbou.

Tubulární struktury dokážou tvořit i kokultury obsahující buňky zvířecího původu. Příkladem mohou být králičí BMSC kokultivované s králičími karotidálními EPC v poměru 1 : 1, 1 : 2 či 1 : 3 (Peng et al. 2019) nebo 3D kokultura potkaních BMSC a HUVEC v poměru 1 : 4 (Mohammadi et al. 2015).

Ke zlepšení angiogeneze v kokultuře bylo navrženo použití hypoxických podmínek. V kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 byl pozorován kladný efekt hypoxických podmínek navozených přidáním 0,5 mmol/l dimethyloxalylglycinu. Ten se projevil významně vyšší expresí endoteliálního markeru vWF ve srovnání s jinými hypoxickými podmínkami i samotnou kultivací v osteogenním médiu, což souviselo i s výraznějším zbarvením oproti ostatním podmínkám při detekce v rámci imunohistochemické analýzy vWF (Nguyen et al. 2020). Při kokultivaci lidských BMSC s lidskými ECFC v poměru 4 : 1 ale nebyla při zavedení hypoxie (2-5 % O₂) pozorována tvorba prevaskulárních struktur, zatímco v normoxii ano (Gawlitta et al. 2011). Myslím, že by bylo vhodné zjistit jestli by se neúspěšnost organizace buněk opakovala i v kokultuře s HUVEC.

3. ADSC

Mesenchymální stromální buňky odvozené z tukové tkáně (ADSC) jsou třetím uváděným osteogenním typem v této práci. Pro jejich definici jsou používána stejná pravidla jako u BMSC, jejich další povrchové markery identifikovatelné průtokovou cytometrií jsou například CD10, CD29 či CD44 (Mollentze et al. 2021). Významnou výhodou lidských ADSC je možnost jejich získání liposukcí, která poskytuje dostatečné množství buněk a vykazuje nižší riziko komplikací po odběru než například odběr lidských BMSC (Rautiainen et al. 2021). Ve dvou níže zmíněných studiích používajících lidské buňky byly použity ADSC odebrané z prsní tkáně (Mutschall et al. 2020; Steiner et al. 2012), dvě přesný původ buněk nezmiňují (Pill et al. 2018; Genova et al. 2019) a ostatní využily ADSC pocházející z abdominální oblasti (Jinling et al., 2014; Kook et al., 2018; Mokhtari-Jafari et al., 2021; Rohringer et al., 2014). Lidské ADSC odebrané z gluteální oblasti vykazovaly významně úspěšnější osteogenní diferenciaci než lidské abdominální ADSC (Iwen et al. 2014), ale v kokultuře nebyly použity v žádné ze zmiňovaných studií.

Stejně jako u předchozích typů i zde mohou být kokultury typu 2D a 3D. Byla zde testována i 3D kultivace v perfuzním bioreaktoru (Mokhtari-Jafari et al. 2021). Z hlediska poměrů buněk se zdá optimálním poměr 1 : 1 ADSC : angiogenní typ (Zhao et al. 2012; Mutschall et al. 2020). Ve zmíněných kokulturách obsahujících lidské buňky jsou nejčastěji používaným angiogenním buněčným typem HUVEC (Jinling et al. 2014; Kook et al. 2018; Pill et al. 2018; Mutschall et al. 2020; Mokhtari-Jafari et al. 2021; Steiner et al. 2021), potom jsou také používány lidské ECFC (Rohringer et al. 2014) a HMEC (Genova et al. 2019). Ve vybraných zvířecích kokulturách byly použity buď endoteliální buňky z mikrovaskulatury mozku neonatálních myší (Cun et al. 2015; Xie et al. 2016), nebo potkaní vaskulární endoteliální buňky (VEC) z pupečnickové krve (Zhao et al. 2012).

3.1 Proliferace

Stejně jako v jiných typech kokultur i v kokulturách používajících ADSC je nutné řešit proliferaci. U 2D kokultur používajících jen lidské buněčné typy byla zjištěna statisticky významně vyšší míra proliferace než v odpovídajících monokulturách (Genova et al. 2019; Mutschall et al. 2020). V prvním případě šlo o významně vyšší míru proliferace v kokultuře lidských ADSC s HMEC v poměru 1 : 1 oproti monokultuře HMEC po 24 hodinách kultivace (Genova et al. 2019). V druhém případě poté šlo o významně vyšší proliferaci kokultury lidských ADSC s HUVEC po 7 dnech kultivace v poměru 3 : 1 oproti monokulturám HUVEC i ADSC, nebo v poměru 1 : 3 ve srovnání s monokulturou ADSC. Po 14 dnech kultivace vykazovaly vyšší míru proliferace oproti monokultuře ADSC i HUVEC všechny poměry ADSC : BMSC (3 : 1, 1 : 1 a 1 : 3) (Mutschall et al. 2020). Naopak

ve 3D kokultuře lidských ADSC s HUVEC v poměru 1 : 3 na nanovlákněném nosiči ze směsi polykaprolaktonu a želatiny nebyl 7. den kultivace nalezen žádný významný rozdíl v proliferaci mezi kokultúrou a monokultúrou ADSC (Kook et al. 2018). Bylo by tedy vhodné se vlivem kokultivace při použití ADSC zabývat ve 3D kokultúrách používajících jiné nosiče a jiné angiogenní buněčné typy.

Je možné proliferaci v kokultuře ovlivnit? U 3D kokultury lidských ADSC a HUVEC v poměru 2,5 : 1 nebyl nalezen žádný rozdíl v proliferaci mezi dynamickou a statickou kokultúrou (Mokhtari-Jafari et al. 2021). Kultivace lidských ADSC s HMEC v poměru 1 : 1 v růstovém médiu ve srovnání s osteogenním médiem také nevykazovala významný rozdíl (Genova et al. 2019). Přidání 60 µg/ml BMP-2 nemělo vliv na proliferaci ADSC ani HUVEC v kokultuře lidských ADSC a HUVEC v poměru 1 : 1, ale snižovalo míru apoptózy HUVEC oproti kokultuře bez přidání BMP-2 (Steiner et al. 2021). Významný pozitivní vliv na proliferaci mělo pouze přidání 100 ng/ml VEGF v kokultuře lidských ADSC a HUVEC v poměru 1 : 1, konkrétně na množství ADSC ve srovnání s kokultúrou bez přidání BMP-2 (Steiner et al. 2021). Z těchto zjištění tedy vyplývá, že pozitivní ovlivnění proliferace bylo zjištěno jen při přidání VEGF.

3.2 Osteogeneze

ADSC jsou nadějným osteogenním buněčným typem. Toto tvrzení lze ilustrovat zjištěním, že po 30denní kokultivaci lidských ADSC a HMEC v poměru 1 : 1 byl detekován více jak 2x vyšší celkový součet délky mineralizované tkáně ve srovnání s odpovídající monokultúrou (Genova et al. 2019).

Vliv kokultivace na osteogenezi je i v kokultúrách s ADSC sledován pomocí měření raného markeru osteogeneze ALP. V kokultuře obsahující lidské ADSC a HUVEC v poměru 1 : 1 byla po 3 dnech kultivace zjištěna významně vyšší míra exprese ALP ve srovnání s monokultúrou ADSC (Steiner et al. 2021). Při kokultivaci lidských ADSC s HUVEC v poměru 1 : 1 byla navíc pozorována i nejvyšší míra exprese ALP ze sledovaných poměrů (1 : 3, 1 : 1 a 3 : 1) (Mutschall et al. 2020). Významně vyšší množství ALP bylo detekováno i ve formě proteinu 4., 7. a 14. den kultivace v kokultuře potkaních ADSC s potkaními VEC v poměru 1 : 1 oproti monokultuře ADSC i kokultúram v poměru 1 : 3 a 3 : 1 (Zhao et al. 2012). Aktivita ALP v kokultuře lidských ADSC s HUVEC po dobu 7 dní stoupala a 7. den byla její hodnota vyšší než v monokultuře ADSC u všech zkoumaných poměrů ADSC : HUVEC (3 : 1, 1 : 1 i 1 : 3) (Mutschall et al. 2020). Z hlediska vlivu na ALP se ukázala být vhodná dynamická kultivace v perfuzním bioreaktoru, která více jak 7x zvýšila aktivitu ALP ve 3D kokultuře lidských ADSC a HUVEC v poměru 2,5 : 1 ve srovnání se statickou kokultúrou. Pozitivně působila i třicetiminutová předkultivace ADSC s 10 nmol/l 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃. Po 14 dnech kultivace kokultúra složená z takto předkultivovaných ADSC s HUVEC vykazovala více jak

43x větší míru exprese ALP než kokultura s ADSC bez předkultivace (Mokhtari-Jafari et al. 2021). Naopak přidání BMP-2 (60 µg/ml) ani VEGF (100 ng/ml) do média žádný vliv na expresi ALP v kokultuře ADSC a HUVEC v poměru 1 : 1 nemělo (Steiner et al. 2021). Je tedy možné shrnout, že kokultivace zvyšuje množství i aktivitu ALP, které je dále možné zvýšit například dynamickou kokultivací nebo přidáním 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃.

Dalšími sledovanými markery rané osteogeneze jsou BMP a RUNX2. U kokultury lidských ADSC a HMEC v poměru 1 : 1 byl potvrzen předpoklad, že v osteogenním médiu dochází k významně vyšší expresi BMP-2 než u kokultury v růstovém médiu (Genova et al. 2019). Ve 3D kokultuře myších ADSC a endoteliálních buněk z mikrovaskulatury mozku neonatálních myší v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči byl po 7 dnech kultivace v hypoxii pozorován nárůst exprese BMP-2 ve srovnání s monokulturou v normoxii (Xie et al. 2016). RUNX2 se kromě regulace osteogeneze zapojuje také do inhibice adipogeneze (Mollentze et al. 2021) a ve 3D kokultuře lidských ADSC s HUVEC na nosiči ze směsi kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, β -trikalciumfosfátu a polykaprolaktonu v poměru 2,5 : 1 dochází po 14 dnech ke 12x vyšší expresi tohoto markeru ve srovnání s monokulturou ADSC. Naopak k významnému snížení exprese RUNX2 došlo, pokud byly lidské ADSC a HUVEC kultivovány v dynamické kokultuře místo statické (Mokhtari-Jafari et al. 2021).

Osteokalcin, osteopontin a osteonektin jsou sledovanými markery pozdní fáze osteogeneze. U kokultury potkaních ADSC a potkaních VEC v poměru 1 : 3, 1 : 1 i 3 : 1 byl osteokalcin kvalitativně detekovatelný po 14 dnech kultivace, zatímco v příslušných monokulturách žádný detekován nebyl (Zhao et al. 2012). Expresе všech tří markerů byla významně vyšší ve 3D kokultuře lidských ADSC a HUVEC v poměru 2,5 : 1 na nosiči ze směsi kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, β -trikalciumfosfátu a polykaprolaktonu oproti monokultuře ADSC. Osteokalcin i osteopontin vykazovali po 14 dnech kultivace více jak 2,8x vyšší míru exprese oproti monokultuře. Osteonektin byl v této kokultuře exprimován dokonce 4,2x více jak v monokultuře (Mokhtari-Jafari et al. 2021). U kokultury potkaních ADSC a potkaních VEC v poměru 1 : 3 bylo po 14 dnech kultivace zjištěno statisticky významně vyšší množství osteokalcinu ve formě proteinu ve srovnání s monokulturou ADSC (Zhao et al. 2012).

Expresе osteopontinu a osteonektinu může být ovlivněna kultivačními podmínkami. Při dynamické kultivaci 3D kokultura lidských ADSC a HUVEC v poměru 2,5 : 1 exprimovala 2,1x více osteopontinu než statická 3D kokultura (Mokhtari-Jafari et al. 2021). Stejně jako u výše zmiňovaného BMP-2 došlo i u osteopontinu k významnému zvýšení míry exprese při kokultivaci lidských ADSC a HMEC v poměru 1 : 1 v osteogenním médiu ve srovnání s kokultivací v růstovém médiu (Genova et al. 2019). Na expresi osteopontinu a osteonektinu měla ve 3D kokultuře vliv také 30 minutová předkultivace ADSC s 10 nmol/l 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D₃. Po 14 dnech kokultivace těchto ADSC

s HUVEC v poměru 2,5 : 1 došlo k detekci 2,8x vyšší míry exprese osteopontinu a 2,6x vyšší míry exprese osteonektinu ve srovnání s kontrolou bez předkultivace (Mokhtari-Jafari et al. 2021).

3.3 Angiogeneze

V rámci hodnocení angiogeneze je sledován angiogenní faktor VEGF, který je exprimován jak v monokultuře lidských ADSC, tak i v monokultuře lidských ECFC, ale u ADSC je jeho exprese více jak 8x vyšší (Rohringer et al. 2014). Exprese VEGF je také významně vyšší v případě kokultur ve srovnání s monokulturami a to jak v kokulturách obsahujících jen lidské buňky (Genova et al. 2019; Mokhtari-Jafari et al. 2021), tak i v kokulturách myších buněk (Cun et al. 2015; Xie et al. 2016). 3D kokultury lidských ADSC a HUVEC v poměru 1 : 1 na fibrinovém nosiči vykazují oproti kokulturám lidských BMSC a HUVEC ve stejném poměru a stejných podmínkách 14. a 21. den statisticky významně vyšší expresi VEGF (Pill et al. 2018). Expresi VEGF lze ovlivnit i způsobem kultivace. Při dynamické 3D kultivaci lidských ADSC s HUVEC v poměru 2,5 : 1 byla pozorována 1,2x vyšší míra exprese VEGF než při kultivaci statické (Mokhtari-Jafari et al. 2021). Více jak 2x větší míra exprese byla detekována při kultivaci lidských ADSC s HMEC (1 : 1) v osteogenním médiu oproti růstovému médiu (Genova et al. 2019) a také při 3D kultivaci myších ADSC s endoteliálními buňkami mikrovaskulatury mozku neonatálních myší (1 : 1) v 2% koncentraci kyslíku na kolagenovém nosiči oproti příslušné monokultuře endoteliálních buněk v normoxii (Xie et al. 2016). V kokulturách využívajících ADSC tedy dochází ke zvýšení exprese VEGF oproti monokulturám. Podpořit expresi zřejmě můžeme dynamickou kultivací, kultivací v osteogenním médiu nebo kultivací v hypoxických podmínkách.

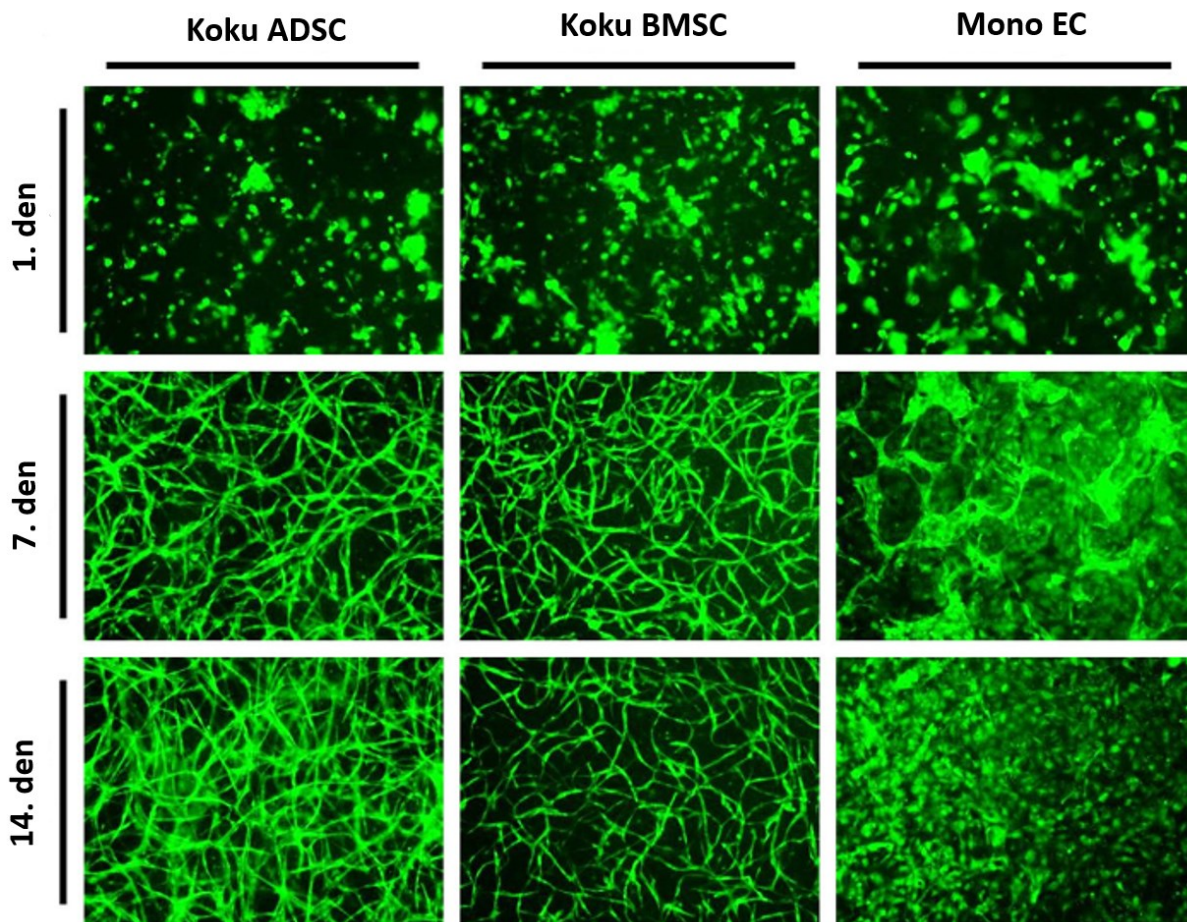
CD31, VEGFR2 a vaskulární endoteliální kadherin (VE-kadherin) jsou řazeny do skupiny markerů angiogeneze, které značí diferenciaci do endoteliálního buněčného typu (Pill et al. 2018; Rautiainen et al. 2021). Při srovnání 3D kokultur na fibrinovém nosiči byla u kokultury lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 1 detekována významně vyšší míra exprese VEGFR2 než u kokultury 1 : 1 lidských ADSC a HUVEC. Naopak míra exprese CD31 a VE-kadherinu byla u těchto kokultur srovnatelná (Pill et al. 2018). U 3D kokultury myších ADSC s myšími endoteliálními buňkami mikrovaskulatury mozku neonatálních myší (1 : 1) na kolagenovém nosiči byla exprese VE-kadherinu významně vyšší při kultivaci ve 2 % kyslíku oproti normoxii (Xie et al. 2016).

Jedním z dalších faktorů ovlivňujících angiogenezi je FGF-2, který je významně více exprimován ve 3D kokultuře myších ADSC s endoteliálními buňkami z mikrovaskulatury mozku neonatálních myší v poměru 1 : 1 na kolagenovém nosiči ve srovnání s příslušnou monokulturou (Cun et al. 2015). To samé platí i pro PDGF a transformační růstový faktor β (TGF β) v 1 : 1 kokultuře lidských ADSC a HMEC. Pokud navíc byla kultivace provedena v osteogenním médiu, tak došlo k

detekci více jak 2x vyšší míry exprese PDGF a více jak 3x vyšší míry exprese FGF-2 ve srovnání s kokulturou v růstovém médiu (Genova et al. 2019). U 3D kokultury myších ADSC s myšími endoteliálními buňkami mikrovaskulatury mozku neonatálních myší (1 : 1) na kolagenovém nosiči byla exprese PDGF i TGF β významně vyšší při kultivaci v hypoxickém prostředí ve srovnání s normoxií (Xie et al. 2016).

Důležitým kritériem pro zhodnocení úspěšnosti angiogeneze v kokultuře je schopnost tvorby struktur podobných tubulům a jejich uspořádání do sítí. 3D kokultura lidských ADSC a HUVEC i monokultura HUVEC s přidaným sekretomem lidských ADSC na fibrinových nosičích jsou po 4 týdnech schopny tvořit struktury podobné tubulům. Stabilní síť se z nich však tvoří jen v kokultuře, což autoři zdůvodňují potřebou přímého kontaktu mezi buněčnými typy (Rohringer et al. 2014). Z hlediska tvorby sítí v kokulturách lidských buněk bylo zjištěno, že se buď tvoří síť jen v kokulturách a monokultury endoteliálního typu žádné sítě netvoří (Rohringer et al. 2014; Kook et al. 2018; Pill et al. 2018), nebo kokultura tvoří kvalitnější sítě (z pohledu celkové délky a počtu spojů mezi strukturami podobnými tubulům) než monokultura (Genova et al. 2019). U 3D kokultury myších ADSC s endoteliálními buňkami z mikrovaskulatury mozku neonatálních myší v poměru 1:1 byla také tvořena kvalitnější síť než v monokultuře (Cun et al. 2015).

Při srovnání kokultur lidských ADSC a HUVEC s lidskými BMSC a HUVEC můžeme vidět potenciální výhodu použití ADSC. Obě kokultury v poměru 1 : 1 ve 3D uspořádání na fibrinovém nosiči dokážou tvořit sítě, které zůstanou stabilní po dobu 3 týdnů sledování (Pill et al. 2018), ale síť vytvořená ve 3D uspořádání na kolagenovém nosiči kokulturou ADSC a HUVEC byla hodnocena jako více organizovaná než ta, kterou tvořila kokultura obsahující BMSC (obě také v poměru 1 : 1) (Jinling et al. 2014). Kokultury s ADSC na fibrinovém nosiči (vizte Obr. 3 na další straně) byly popsány jako jasně lepší i z hlediska celkové délky sítě, počtu jednotlivých struktur podobajících se tubulům a spojů mezi nimi (Pill et al. 2018). Oba typy kokultur v poměru 1 : 1 ve 3D uspořádání na fibrinových nosičích po 3 týdnech v oblasti spojů struktur podobných tubulům obsahují srovnatelný počet buněk exprimujících neurální gliový faktor, jehož exprese ukazuje na diferenciaci do pericytů, které jsou znakem pokročile uspořádané sítě (Rohringer et al. 2014; Pill et al. 2018). V monokulturách tyto buňky nejsou detekovatelné vůbec (Pill et al. 2018). V kokultuře lidských ADSC a HUVEC zřejmě dochází k indukci tvorby kvalitnější sítě než v kokultuře obsahující BMSC, ale domnívám se, že by bylo vhodné tyto dva buněčné typy srovnat ještě při kokultivaci s jinými buňkami než jsou HUVEC.



Obr. 3 Srovnání tvorby sítí kokulturami a monokulturou HUVEC. Kokultura ADSC s HUVEC (Koku ADSC) tvoří 14. den kultivace hustější a organizovanější síť než kokultura BMSC s HUVEC (Koku BMSC). Monokultura HUVEC (Mono EC) organizovanou síť netvoří ani 14. den kultivace. Upraveno (Pill et al. 2018).

Při zkoumání vlivu podmínek kultivace na tvorbu sítí byly identifikovány 3 faktory, kterými je možné ji ovlivnit. Prvním byla v kokultuře lidských ADSC s HMEC (1 : 1) kultivace v osteogenním médiu. Kokultura v tomto uspořádání vykazovala větší celkovou délku sítě a vyšší počet spojů struktur podobných tubulům ve srovnání s kokulturou v růstovém médiu (Genova et al. 2019). Druhým faktorem je zavedení hypoxického prostředí. Ve 3D kokultuře myších ADSC s endoteliálními buňkami mikrovaskulatury mozku neonatálních myší (1 : 1) na kolagenovém nosiči byly při použití 2% kyslíku detekovány 4x delší a 2x širší struktury podobné tubulům ve srovnání s kokulturou v normoxii (Xie et al. 2016). Třetím faktorem je přidání VEGF do 3D kokultury. Přidání 50 ng/ml VEGF do 3D kokultury lidských ADSC a HUVEC (1 : 3) na nanovláčném nosiči ze směsi polykaprolaktonu a želatiny vedlo k tvorbě hustější sítě než když k přidání VEGF nedošlo (Kook et al. 2018). Pokud však kultivace byla prováděna ve 2D uspořádání (v poměru 1 : 3 i 1 : 1), tak přidání 50 ng/ml ani 100 ng/ml VEGF (a ani 60 μ g/ml BMP-2) nemělo na tvorbu sítí v tomto typu kokultury žádný vliv (Kook et al. 2018; Steiner et al. 2021).

4. Interakce v kokultuře

V předchozích kapitolách byl popsán vliv kokultivace na proliferaci, osteogenezi a angiogenezi v různých typech kokultur v přímém i nepřímém kontaktu. Co ale umožňuje aby tyto procesy byly ovlivněny? Zdá se, že odpovědí je obousměrná interakce mezi buněčnými typy, do které jsou zapojeny buněčné spoje, parakrinní faktory a extracelulární váčky.

4.1 Buněčné spoje

Prvním typem buněčných spojů spojených s osteogenezí a angiogenezí v kokultuře jsou adhezní spoje složené z proteinů kadherinů. V kokultuře lidských BMSC a HUVEC bylo zjištěno, že po 48 hodinách kokultivace BMSC i HUVEC vykazují významně vyšší expresi neurálního kadherinu a obsahují významně více neurálního kadherinu ve formě proteinu než odpovídající monokultury. Blokáce neurálního kadherinu protilátkou (10 µg/ml) vedla ke statisticky významnému snížení míry exprese ALP i kolagenu I ve srovnání s kontrolní kokulturou bez protilátky (Li et al. 2010). V kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 3 bylo demonstrováno, že VE-kadherin je exprimován pouze u endoteliálního buněčného typu, monokultura BMSC ani BMSC v kokultuře ho neexprimují. Při kokultivaci bylo detekováno mezi 6. a 14. hodinou kultivace jen velmi málo VE-kadherinu v oblasti buněčných spojů a množství začalo narůstat až po 18. hodině. Naopak u monokultury HUVEC byl VE-kadherin v oblasti spojů detekován po celou dobu kultivace. Autoři tento fenomén vysvětlují tím, že ztráta VE-kadherinu z oblasti spojů zřejmě umožní buňkám pohyb nutný k vytvoření endoteliální sítě, ve které poté zase dojde k návratu VE-kadherinu do oblasti spojů, aby byla vytvořena síť stabilní (Li et al. 2011). Tato hypotéza je založena na zjištění, že fosforylace VE-kadherinu zajištěná skrze VEGF signální dráhu je jedním z mechanismů (Adam et al. 2010) umožňujících rozpad komplexu obsahujícího VE-kadherin v oblasti spojů (Weis et al. 2004). Ve 3D kokultuře lidských MSC (autoři nespecifikují přesně jakého typu) a HUVEC (1 : 1) na fibrinových vláknech byla detekována vyšší míra exprese VE-kadherinu při kokultivaci MSC a HUVEC ve vzdálenosti 200 µm než 400 µm (Piard et al. 2019), což by mohlo potvrzovat, že adheze pomocí VE-kadherinu je důležitá právě pro udržení již vytvořené sítě. Přesun VE-kadherinu ale zřejmě není jediným důležitým faktorem, protože při aplikaci neutralizačních protilátek namířených proti němu nedošlo k inhibici pohybu kokultivovaných HUVEC, zatímco jejich aplikace proti VEGF zabránila tvorbě sítě (Li et al. 2011).

Dalším typem spojů v kokultuře v přímém kontaktu jsou vodivé spoje. Konexin 43, jeden z proteinů tvořících vodivé spoje, produkují lidské BMSC (Villars et al. 2002), primární lidské osteoblasty (Hager et al. 2009; Herzog et al. 2014) i HUVEC (Hager et al. 2009; Villars et al. 2002).

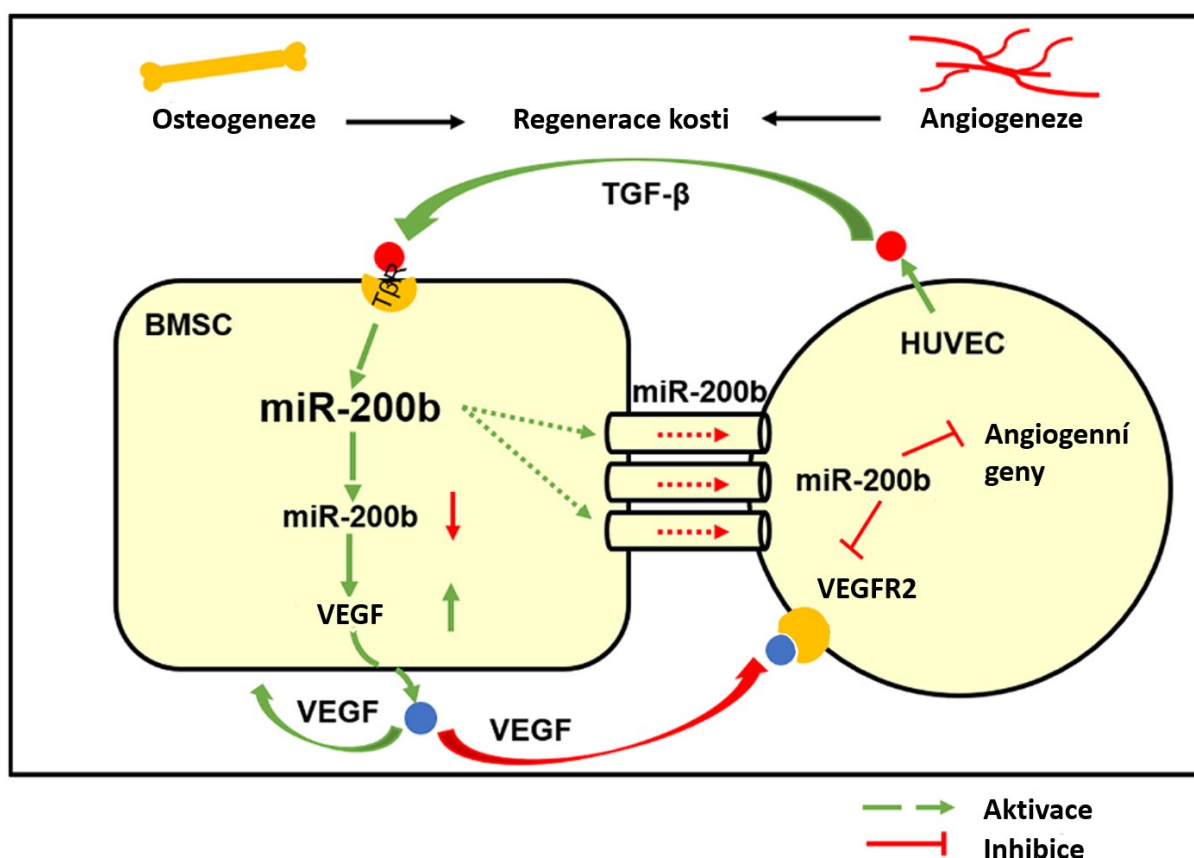
V kokultuře potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 byla po 24 hodinách v kokultuře zaznamenána významně vyšší míra exprese konexinu 43 než v obou odpovídajících monokulturách (Fan et al. 2018). V kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 2 byl konexin 43 ve formě proteinu detekován v oblasti spojů buněk pozitivních na vWF s buňkami negativními na vWF, tedy zřejmě mezi HUVEC a BMSC (Villars et al. 2002). Také v kokultuře potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 byl konexin 43 pozorován v oblasti kontaktu BMSC a HUVEC a byla zde prokázána možnost tvorby funkčních vodivých spojů (Fan et al. 2018). V kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC byla detekována exprese konexinu 43 na rozhraní mezi buňkami obou buněčných typů (Leszczynska et al. 2013). Při kokultivaci primárních lidských osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve v poměru 3 : 2 byl pozorován zvyšující se počet konexinů 43 v perinukleárních oblastech po 4 týdnech kokultivace (v době formování struktur podobných tubulům) oproti počtu po 1 týdnu kokultivace. V oblastech, kde se struktury podobné tubulům zapojovaly do tvorby sítí byly pozorovány okolo jader konexinové konglomeráty (Herzog et al. 2014).

Význam vodivých spojů pro osteogenezi v kokultuře je možné osvětlit díky funkční inhibici vodivých spojů pomocí 18 α -glycyrrhetinové kyseliny (100 μ mol/l). V kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC (1 : 1) byla pozorována částečná inhibice exprese ALP, konkrétně se jednalo o $4,6 \pm 10,9\%$ inhibici ALP exprese (vyjádřeno jako procento z přírůstku ALP exprese v kokultuře oproti monokultuře osteoblastů) (Hager et al. 2009). Kokultura HOP a HUVEC v poměru 1 : 2 vykazovala po 48 hodinách až 30% pokles exprese ALP oproti kokultuře bez inhibitoru. Na expresi RUNX2 však nebyl nalezen žádný vliv (Guillotín et al. 2008). Absence vlivu inhibice vodivých spojů na RUNX2 byla pozorována i v kokultuře potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2, zároveň zde nebyl pozorován žádný vliv inhibice ani na expresi osteokalcinu (Fan et al. 2018). V kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 2 s inhibitorem byla 3. i 6. den kultivace zaznamenána statisticky významně nižší aktivita ALP než v kokultuře bez inhibitoru (Villars et al. 2002). Také v kokultuře potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 byla detekována významně nižší ALP aktivita (1. – 14. den) než v kokultuře bez inhibitoru. Navíc v tomto typu kokultury byla po aplikaci inhibitoru pozorována 7. a 14. den kultivace i významně nižší míra tvorby vápenatých usazenin než v kokultuře (Fan et al. 2018).

Z hlediska vlivu na angiogenezi bylo v kokultuře potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 zjištěno, že po 24 hodinách kultivace s siRNA proti mRNA konexinu 43 kokultura vykazovala významně nižší míru exprese VEGF i nižší množství VEGF proteinu oproti kontrole bez siRNA. Při inhibici mRNA pro konexin 43 pomocí siRNA bylo zjištěno, že se míra exprese VEGF nemění přímo se snižujícím se množstvím konexinu 43, proto bylo navrženo, že VEGF není transportován skrze vodivé spoje, ale jeho exprese je regulována pomocí jiných transportovaných molekul. Jednou z těchto

molekul se ukázala být miRNA-200b, protože struktury podobné tubulům se ale tvořily po 24 hodinách kultivace pouze v kokultuře, kde byl aplikován antisense oligoribonukleotid sloužící jako inhibitor miRNA200b, v kokultuře bez inhibitoru ne (Fan et al. 2018).

V kokultuře potkaních BMSC s HUVEC v poměru 1 : 2 byl navržen mechanismus využívající miRNA-200b (vizte Obr. 4). V tomto případě je prvním důležitým faktorem TGFβ, který je sekretován HUVEC. TGFβ aktivují receptory na BMSC, čímž je spuštěna dráha vedoucí k transportu miRNA-200b přes vodivé spoje do HUVEC. V BMSC dojde ke snížení koncentrace miRNA200b, což umožňuje zvýšení exprese VEGF vedoucí k podpoře osteogenní diferenciaci. V HUVEC přijaté miRNA-200b inhibují expresi genů spojených s migrací a tvorbou sítě ze struktur podobných tubulům. Jedním z nich je gen kódující VEGF receptor VEGFR2, což by mělo znamenat, že HUVEC nebudou významně ovlivněny VEGF produkovaným BMSC (Fan et al. 2018).



Obr. 4 Navržený mechanismus působení miRNA-200b. HUVEC produkují TGFβ, které aktivují přesun miRNA-200b z BMSC přes vodivé spoje, což vede k podpoře osteogenní diferenciaci BMSC a inhibici angiogenních genů HUVEC. Upraveno (Fan et al. 2018).

4.2 Vliv parakrinních faktorů a extracelulárních váčků

Produkce parakrinních faktorů je jedním z typů buněčné komunikace a proto byla navržena jako další možný mechanismus vlivu kokultivace. V kokultuře lidských BMSC s lidskými EPC z kostní dřeně v poměru 1 : 1 byl sledován vliv PDGF. Při předkultivaci po dobu 6 dní s PDGF-BB (2 ng/ml) vykazovala kokultura 3. den významně vyšší míru proliferace než kokultura bez předkultivace a při blokování PDGF receptorů neutralizační protilátkou (20 ng/ml) byla míra proliferace statisticky významně snížena oproti kontrolní kokultuře bez neutralizační protilátky. Působení PDGF by mohlo být potenciálně spojeno s Notch signalizační drahou, protože při blokaci Notch dráhy bylo v kokultuře ve 2D i 3D uspořádání detekováno významně méně receptorů pro PDGF (ve formě proteinu) oproti kontrole. Při předkultivaci s PDGF-BB se v kokultuře ve 2D uspořádání navíc významně zvedlo množství proteinů zapojených do Notch signalizace ve srovnání s kokulturou bez předkultivace (Liang et al. 2017). Druhým zkoumaným faktorem z hlediska proliferace byl IGF-1 v kokultuře myších BMSC s myšími EPC z kostní dřeně v poměru 1 : 1. IGF-1 v kokultuře produkují oba buněčné typy, ale BMSC produkovaly více jak 8x větší množství IGF-1 proteinu než EPC. Přidání 100 ng/ml IGF-1 významně zvýšilo množství buněk v monokultuře EPC oproti kontrole, což vedlo k hypotéze, že zvýšení míry proliferace v kokultuře by mohlo být spojeno právě s IGF-1. Při transfekci siRNA proti IGF-1 do BMSC byla v kokultuře pozorována významně nižší míra proliferace EPC oproti kontrolní kokultuře. Stejný výsledek byl pozorován i při transfekci siRNA proti IGF-1 receptoru do EPC určených ke kokultivaci či při použití neutralizační protilátky proti IGF-1 (1 µg/ml). Působení IGF-1 zde bylo spojeno s PI3K/AKT kaskádou (PI3K je zkratkou fosfatidylinositol-3-kinázy a AKT je označením pro proteinkinázu B) (Hou et al. 2017).

Vliv faktorů byl sledován i z hlediska osteogeneze v kokultuře. Kokultura lidských BMSC a lidských aortálních endoteliálních buněk v poměru 1 : 2 ukázala vliv endothelinu 1, který v této kokultuře produkují pouze endoteliální buňky. U BMSC dvou ze tří dárců předkultivace s 0,01 µmol/l endothelinu po dobu 2 pasáží znamenala významně zvýšenou expresi ALP a osteokalcinu oproti kontrole, u všech tří potom byla sledována významně vyšší tvorba vápenatých usazenin než u BMSC bez předkultivace. Působení endothelinu 1 bylo spojeno s AKT drahou (Tsai et al. 2015).

V kokultuře primárních lidských osteoblastů s HUVEC (1 : 1) byla jako nejdůležitější dráha ovlivňující expresi ALP definována p38 MAPK (odvozeno z mitogenem aktivovaná proteinkináza) dráha. Kokultivace s HUVEC neměla vliv na aktivitu ALP promotoru, ale v kokultuře se po 48 hodinách kultivace prodloužil poločas mRNA na 19,9 hodin oproti 6 hodinám v monokultuře osteoblastů. Autoři tedy předpokládají, že při kokultivaci dochází k posttranskripční stabilizaci ALP mRNA spojené s p38 MAPK drahou (Hager et al. 2009). V kokultuře potkaních BMSC s potkaními EPC v poměru 1 : 1 bylo zjištěno, že v kokultuře je významně vyšší míra fosforylace p38 oproti

monokultuře BMSC a při inhibici p38 dochází v kokultuře k významně nižší tvorbě vápenatých usazenin ve srovnání s kontrolní kokulturou (Xu et al. 2020). V kokultuře lidských ADSC s lidskými MSC odvozenými z amnionu (1 : 1, 1 : 2, nebo 1 : 3) se při použití vyššího poměru MSC odvozených z amnionu zvyšovalo množství fosforylovaných ERK1/2 (zkratka pro kinázy regulované extracelulárním signálem) MAPK, ale ne p38. Při inhibici ERK1/2 MAPK dráhy došlo k významnému snížení exprese ALP, RUNX2, osteokalcinu i adiponektinu (asociovaného s osteogenní diferenciací ADSC) oproti kontrole (Wang et al. 2018). Později byl v tomto typu kokultury identifikován vliv adaptorového proteinu s motivem leucinového zipu, který ale může plnit svou funkci pouze při funkční ERK1/2 MAPK dráze (Wang et al. 2020b). Jako potenciální kandidát na ovlivnění osteogeneze byl dále vybrán protein BMP-2 produkovaný HMEC i HUVEC. Při inhibici BMP-2 pomocí siRNA v kokultuře lidských BMSC s HMEC (1 : 1) byla detekována významně nižší ALP aktivita než v kontrolní kokultuře (Kaigler et al. 2005).

Kokultura HOP a HUVEC (1 : 2) tvoří po 48 hodinách kultivace síť ze struktur podobných tubulům. Podobná síť je vytvořena i při kultivaci HUVEC se sekretomem z kokultury, ale ne při kultivaci HUVEC se sekretomem monokultury HOP či u samotné monokultury HUVEC. Autoři tedy usuzují, že v kokultuře dochází k uvolňování solubilních faktorů důležitých pro tvorbu sítě. V tomto typu kokultury je významná produkce VEGF pouze u HOP, ale HUVEC v kokultuře produkují významně více VEGF receptoru VEGFR2 oproti monokultuře. Blokace VEGFR2 (0,5 µg/ml neutralizační protilátky) v kokultuře nevedla k inhibici tvorby sítě a naopak přidání exogenního VEGF (20 ng/ml) do monokultury HUVEC nevedlo k indukci tvorby sítě. Blokace VEGFR2 však vedla k významnému poklesu exprese ALP i kolagenu I oproti neinhibované kokultuře (Grellier et al. 2009b). V kokultuře lidských BMSC a HUVEC v poměru 1 : 3 ale použití neutralizační protilátky proti VEGF (20 µg/ml) stačilo k inhibici tvorby sítě ze struktur podobných tubulům (Li et al. 2011).

Faktory zmíněné díky svému vlivu na proliferaci v kokultuře jsou také zapojeny do angiogeneze. Kokultura lidských BMSC s lidskými EPC z kostní dřeně při předkultivaci po dobu 6 dnů s PDGF-BB (2 ng/ml) vykazovala významně vyšší množství vytvořených struktur podobných tubulům oproti kontrole. Při blokování PDGF receptorů neutralizační protilátkou (20 ng/ml) byl naopak jejich počet významně nižší oproti neinhibované kokultuře (Liang et al. 2017). Ve 3D kokultuře myších ADSC s mikrovaskulárními endoteliálními buňkami z mozků neonatálních myší (1 : 1) na kolagenovém nosiči byl pozorován významný nárůst v délce i množství struktur podobných tubulů po přidání IGF-1 (50 ng/ml) oproti kontrole. V kokultuře s přidaným IGF-1 byla detekována významně vyšší exprese PDGF-BB a FGF-2 (oproti kokultuře bez IGF-1), u kterých si autoři myslí, že jsou použity k atrakci ADSC ke strukturám podobným tubulům a indukci diferenciaci ADSC do pericytů (Lin et al. 2017).

Posledním navrženým mechanismem komunikace buněk v kokultuře je použití extracelulárních váčků. Při fluorescenčním označení potkaních BMSC a HUVEC (4 : 1) byly v oblasti struktur podobných tubulům pozorovány oblasti duální fluorescence, které autoři považují za oblasti, kde dochází ke komunikaci díky extracelulárním váčkům (Mohammadi et al. 2015). Při 3D kultivaci MSC na fibrinových vláknech ve vzdálenosti 400 μm od HUVEC (1 : 1) byly izolovány váčky s vyšším obsahem proteinů ve srovnání s kultivací ve vzdálenosti 200 μm . Autoři předpokládají, že na vyšší vzdálenost mezi buňkami je preferovaným typem komunikace právě tvorba extracelulárních váčků (Piard et al. 2019). Monokultura myších BMSC je schopna přijímat extracelulární váčky (5 $\mu\text{g/ml}$) z monokultury myších EPC z kostní dřeně. 7. a 14. den kultivace s váčky byla zjištěna významně nižší tvorba vápenatých usazenin než u kontrolní kultury, ale po 14 dnech kultivace byl po přidání váčků pozorován významný pozitivní vliv na proliferaci BMSC oproti BMSC bez přidání extracelulárních váčků (Qin a Zhang 2017). Není však jasné, jestli by myší EPC tyto váčky produkovaly i při kokultivaci.

Závěr

Kokultivace buněk *in vitro* by mohla být jedním z přístupů umožňujících studovat kostní regeneraci *in vitro* a stimulovat regeneraci kostní tkáně v případech, kde ji pacientův organismus není schopen v dostatečné míře sám zajistit. Cílem této práce bylo shrnout dostupné poznatky a srovnat vliv kokultivace na proliferaci, osteogenezi a angiogenezi v kokulturách *in vitro* používajících jako osteogenní buněčný typ osteoblasty (či osteoprogenitory), BMSC, nebo ADSC. V kapitole Interakce v kokultuře byly zmíněny interakce, které by mohly vliv kokultivace vysvětlit.

Pozitivní vliv na míru proliferace osteogenního buněčného typu v kokultuře ve srovnání s monokulturou byl zaznamenán v kokulturách používajících osteoblasty, BMSC i ADSC. V kokultuře osteoblastů s HUVEC byl pozorován pouze v přímém kontaktu, zatímco u kokultur obsahujících BMSC byla významně vyšší míra proliferace oproti monokultuře popsána v přímém i nepřímém kontaktu (při kultivaci lidských BMSC s MSC odvozenými z amnionu v poměru 1 : 3 dokonce pouze v nepřímém kontaktu). Byl také popsán vliv dalších faktorů na proliferaci kromě kokultivace v jednotlivých kokulturách, např. koncentrace FBS (10% FBS vhodné pro kokulturu s lidskými osteoblasty, zatímco pro kokulturu BMSC potenciálně lepší použití 1% FBS), přidání BMP-2 a VEGF.

Z hlediska hodnocení osteogeneze v kokultuře byla pozorována zvýšená míra exprese časného markeru osteogeneze ALP v kokultuře oproti monokultuře osteogenního buněčného typu v kokulturách obsahujících osteoblasty, BMSC i ADSC. Výjimkou byla 3D kokultura potkaních BMSC s HUVEC (1 : 1 na kolagenovém nosiči), kde nebyl zaznamenán žádný rozdíl. Zvýšená aktivita ALP oproti monokultuře osteogenního buněčného typu byla zjištěna v kokulturách používajících osteoblasty i BMSC. U kokultur s BMSC v přímém kontaktu byly dvě výjimky využívající BMSC zvířecího původu, proto si myslím, že by zde bylo vhodné srovnat kokultury při využití stejných kultivačních podmínek. Zvýšená exprese pozdního markeru osteogeneze osteokalcinu byla pozorována v kokulturách využívajících jako osteogenní buněčný typ osteoblasty, BMSC i ADSC. Dále byl zmíněn vliv kokultivace na expresi dalších markerů (např. RUNX2, kolagenu typu I nebo osteopontinu) a další vlivy kromě samotné kokultivace (dynamická kokultivace, kultivace v osteogenním médiu, předkultivace s různými faktory). Vyšší míra mineralizace v kokultuře oproti monokultuře osteogenního buněčného typu byla popsána v kokulturách využívajících osteoblasty, HOP, BMSC i ADSC. Byl zmíněn pozitivní vliv přidání 5 µg/ml rekombinantního lidského Sonic hedgehog na tvorbu vápenatých usazenin do kokultury lidských osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve (3 : 2) a dva opačné pohledy na prospěšnost použití hypoxie při kokultivaci využívající lidské BMSC.

Angiogeneze v kokultuře byla popsána nejdříve pomocí změn v expresi proangiogenních faktorů. Vyšší míra exprese VEGF oproti monokulturám byla popsána v kokulturách s BMSC i v kokulturách s ADSC. V kokulturách využívajících BMSC byla vyšší míra exprese VEGF i vyšší množství VEGF popsáno pouze při kokultivaci v nepřímém kontaktu, ale ve 3D kokultuře potkaních BMSC s HUVEC (1 : 1) bylo zaznamenáno významně více receptoru VEGFR2 oproti monokultuře HUVEC, proto si myslím, že by bylo vhodné se zaměřit na více kokultur ve 3D uspořádání, aby bylo možné zjistit, jestli jde pouze o fenomén typický pro 2D kultivaci. U kokultur využívajících osteoblasty byla představena hypotéza endocytózy přijatých HUVEC i s receptory, která by měla vysvětlovat nižší koncentraci VEGF v kokultuře oproti monokultuře osteoblastů. Dále byl zmíněn vliv kokultivace i na další angiogenní faktory.

Tvorba struktur podobných tubulům i jejich organizace do sítí byla popsána u kokultur obsahujících osteoblasty, osteoprogenitory, BMSC i ADSC. V kokulturách využívajících BMSC, nebo ADSC byly detekovány buňky exprimující neurální gliový antigen 2 (typický pro diferenciaci do pericytů) ukazující na vyšší kvalitu sítě. Sítě tvořené kokulturou BMSC s HUVEC však byly hodnocené jako méně organizované než sítě tvořené kokulturami HOP s HUVEC, nebo ADSC s HUVEC. Myslím, že by však bylo vhodné srovnat tvorbu sítí i v kokulturách využívajících jiný angiogenní buněčný typ než HUVEC. Také byl popsán pozitivní vliv dalších faktorů na tvorbu struktur podobných tubulům kromě samotné kokultivace, například přidání 5 µg/ml rekombinantního lidského Sonic hedgehog do média kokultury lidských osteoblastů s lidskými EPC z periferní krve (3 : 2) a pozitivní vliv přidání 50 ng/ml VEGF na zvýšení hustoty sítě při 3D kokultivaci lidských ADSC s HUVEC (1 : 3).

Na závěr byly v kapitole Interakce v kokultuře představeny příklady, které by se mohly podílet na odlišnostech pozorovaných při kokultivaci. Byla to předpokládaná funkce ztráty VE-kadherinu z oblasti buněčných spojů v pohybu endoteliálních buněk a navržený mechanismus podpory osteogenní diferenciaci BMSC díky transportu miRNA-200b přes vodivé spoje. Z hlediska vlivu parakrinních faktorů byl představen kladný vliv předkultivace s PDGF-BB spojený s Notch drahou a IGF-1 (spojované s PI3K/AKT drahou) na proliferaci i angiogenezi v kokultuře. U osteogeneze byl zmíněn kladný vliv předkultivace s endothelinem a význam MAPK drah (například posttranskripční stabilizace ALP mRNA jako důsledek aktivace p38 MAPK dráhy). Poslední zmínka patřila předpokládanému využití extracelulárních váčků, které by mohly být preferovaným způsobem komunikace na větší vzdálenosti.

Seznam literatury

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou *.

ADAM, Alejandro P., Amy L. SHARENKO, Kevin PUMIGLIA a Peter A. VINCENT, 2010. Src-induced Tyrosine Phosphorylation of VE-cadherin Is Not Sufficient to Decrease Barrier Function of Endothelial Monolayers. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **285**(10), 7045-7055 [Cit. 2021-11-02]. Dostupné z: doi:10.1074/JBC.M109.079277

BARRON, Matthew J., Jeremy GOLDMAN, Chung Jui TSAI a Seth W. DONAHUE, 2012. Perfusion Flow Enhances Osteogenic Gene Expression and the Infiltration of Osteoblasts and Endothelial Cells into Three-Dimensional Calcium Phosphate Scaffolds. *International Journal of Biomaterials* [online]. **2012** [Cit. 2022-02-19]. ISSN 16878787. Dostupné z: doi:10.1155/2012/915620

BIAN, Yifeng, Yifei DU, Ruixia WANG, Ning CHEN, Xin DU, Yuli WANG a Hua YUAN, 2019. A comparative study of HAMSCs/HBMSCs transwell and mixed coculture systems. *IUBMB Life* [online]. **71**(7), 1048–1055 [Cit. 2021-11-09]. ISSN 1521-6551. Dostupné z: doi:10.1002/IUB.2074

CUN, Xiangzhu, Jing XIE, Shiyu LIN, Na FU, Shuwen DENG, Qiang XIE, Juan ZHONG a Yunfeng LIN, 2015. Gene profile of soluble growth factors involved in angiogenesis, in an adipose-derived stromal cell/endothelial cell co-culture, 3D gel model. *Cell Proliferation* [online]. **48**(4), 405-412 [Cit. 2021-12-08]. ISSN 13652184. Dostupné z: doi:10.1111/CPR.12193

* DELLAQUILA, Alessandra, Chau LE BAO, Didier LETOURNEUR a Teresa SIMON-YARZA, 2021. *In Vitro* Strategies to Vascularize 3D Physiologically Relevant Models. *Advanced Science* [online]. **8**(19) [Cit. 2022-03-06]. ISSN 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/ADVS.202100798

DOHLE, Eva, Sabine FUCHS, Marlen KOLBE, Alexander HOFMANN, Harald SCHMIDT a Charles James KIRKPATRICK, 2010. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells. *Tissue Engineering - Part A* [online]. **16**(4), 1235–1237 [Cit. 2021-11-20]. ISSN 1937335X. Dostupné z: doi:10.1089/TEN.TEA.2009.0493

FAN, Xiaoting, Yi TENG, Zhaoyang YE, Yan ZHOU a Wen-Song TAN, 2018. The effect of gap junction-mediated transfer of miR-200b on osteogenesis and angiogenesis in a co-culture of MSCs and HUVECs. *Journal of cell science* [online]. **131**(13) [Cit. 2021-09-24]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/JCS.216135

GAWLITTA, Debby, Joost O. FLEDDERUS, Mattie H.P. VAN RIJEN, Inge DOKTER, Jacqueline ALBLAS, Marianne C. VERHAAR a Wouter J.A. DHERT, 2011. Hypoxia Impedes Vasculogenesis of *In Vitro* Engineered Bone. *Tissue Engineering - Part A* [online]. **18**(1–2), 208–218 [Cit. 2021-11-08]. ISSN 1937335X. Dostupné z: doi:10.1089/TEN.TEA.2010.0731

GE, Quanhu, Hongwei ZHANG, Jixue HOU, Longfei WAN, Wenzhe CHENG, Xiaoyi WANG, Dan DONG, Congzhe CHEN, Jie XIA, Jun GUO, Xueling CHEN a Xiangwei WU, 2018. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Molecular medicine reports* [online]. **17**(1), 1667–1675 [Cit. 2021-10-15]. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/MMR.2017.8059

- GENOVA, Tullio, Sara PETRILLO, Elisa ZICOLA, Ilaria ROATO, Riccardo FERRACINI, Emanuela TOLOSANO, Fiorella ALTRUDA, Stefano CAROSSA, Federico MUSSANO a Luca MUNARON, 2019. The Crosstalk Between Osteodifferentiating Stem Cells and Endothelial Cells Promotes Angiogenesis and Bone Formation. *Frontiers in physiology* [online]. **10** [Cit. 2021-09-24]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/FPHYS.2019.01291
- GILES, Erica M., Charles GODBOUT, Wendy CHI, Michael A. GLICK, Tony LIN, Ru LI, Emil H. SCHEMITSCH a Aaron NAUTH, 2017. Subtypes of endothelial progenitor cells affect healing of segmental bone defects differently. *International orthopaedics* [online]. **41**(11), 2337–2343 [Cit. 2021-09-27]. ISSN 1432-5195. Dostupné z: doi:10.1007/S00264-017-3613-0
- GRELLIER, Maritie, Nancy FERREIRA-TOJAIS, Chantal BOURGET, Reine BAREILLE, Fabien GUILLEMOT a Joëlle AMÉDÉE, 2009a. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. **106**(3), 390–398 [Cit. 2021-11-02]. ISSN 1097-4644. Dostupné z: doi:10.1002/JCB.22018
- GRELLIER, Maritie, Nancy FERREIRA-TOJAIS, Chantal BOURGET, Reine BAREILLE, Fabien GUILLEMOT a Joëlle AMÉDÉE, 2009b. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. **106**(3), 390–398 [Cit. 2022-03-20]. ISSN 1097-4644. Dostupné z: doi:10.1002/JCB.22018
- GUILLOTIN, Bertrand, Reine BAREILLE, Chantal BOURGET, Laurence BORDENAVE a Joëlle AMÉDÉE, 2008. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone* [online]. **42**(6), 1080–1091 [Cit. 2021-09-24]. ISSN 8756-3282. Dostupné z: doi:10.1016/J.BONE.2008.01.025
- HAGER, Sven, Florian M. LAMPERT, Hideo ORIMO, G. Björn STARK a Günter FINKENZELLER, 2009. Up-Regulation of Alkaline Phosphatase Expression in Human Primary Osteoblasts by Cocultivation with Primary Endothelial Cells is Mediated by p38 Mitogen–Activated Protein Kinase–Dependent mRNA Stabilization. *Tissue Engineering - Part A* [online]. **15**(11), 3437–3447 [Cit. 2022-02-19]. ISSN 1937335X. Dostupné z: doi:10.1089/TEN.TEA.2009.0133
- HAUSCHKA, Peter V. a Steven A. CARR, 1982. Calcium-Dependent-Helical Structure in Osteocalcin. *Biochemistry* [online]. **21**(10), 2538–2547 [Cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi00539a038>
- HERZOG, David Paul Eric, Eva DOHLE, Iris BISCHOFF a Charles James KIRKPATRICK, 2014. Cell Communication in a Coculture System Consisting of Outgrowth Endothelial Cells and Primary Osteoblasts. *BioMed Research International* [online]. **2014** [Cit. 2022-02-19]. ISSN 23146141. Dostupné z: doi:10.1155/2014/320123
- HOU, Jixue, Xinyu PENG, Jing WANG, Hongwei ZHANG, Jie XIA, Quanhu GE, Xiaoyi WANG, Xueling CHEN a Xiangwei WU, 2017. Mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell proliferation by secreting insulin-like growth factor-1. *Molecular medicine reports* [online]. **16**(2), 1502–1508 [Cit. 2021-10-15]. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/MMR.2017.6741

- * HUANG, Wei, Shuying YANG, Jianzhong SHAO a Yi Ping LI, 2007. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* [online]. **12**(8), 3068-3092 [Cit. 2022-04-05]. ISSN 27686698. Dostupné z: doi:10.2741/2296
- CHEN, Wenchuan, Xian LIU, Qianmin CHEN, Chongyun BAO, Liang ZHAO, Zhimin ZHU a Hockin H.K. XU, 2018. Angiogenic and osteogenic regeneration in rats via calcium phosphate scaffold and endothelial cell co-culture with human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), human umbilical cord MSCs, human induced pluripotent stem cell-derived MSCs and human embryonic stem cell-derived MSCs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. **12**(1), 191–203. ISSN 19326254. Dostupné z: doi:10.1002/term.2395
- INOMATA, Kouki a Michiyo HONDA, 2019. Co-Culture of Osteoblasts and Endothelial Cells on a Microfiber Scaffold to Construct Bone-Like Tissue with Vascular Networks. *Materials (Basel)* [online]. **12**(18) [Cit. 2022-03-13]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/MA12182869
- IWEN, Karl Alexander, Anna Christin PRIEWE, Marc WINNEFELD, Christian ROSE, Frank SIEMERS, Jürgen ROHWEDEL, Figen CAKIROGLU, Hendrik LEHNERT, Andreas SCHEPKY, Johannes KLEIN a Jan KRAMER, 2014. Gluteal and abdominal subcutaneous adipose tissue depots as stroma cell source: Gluteal cells display increased adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Experimental Dermatology* [online]. **23**(6), 395–400 [Cit. 2022-02-08]. ISSN 16000625. Dostupné z: doi:10.1111/EXD.12406
- JINLING, Ma, Fang YANG, Sanne K. BOTH, Henk Jan PRINS, Marco N. HELDER, Juli PAN, Fu Zhai CUI, John A. JANSEN a Jeroen Jjp VAN DEN BEUCKEN, 2014. *In vitro* and *in vivo* angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures. *Biofabrication* [online]. **6**(1) [Cit. 2021-11-09]. ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5082/6/1/015005
- KAIGLER, Darnell, Paul H. KREBSBACH, Erin R. WEST, Kim HORGGER, Yen-Chen HUANG a David J. MOONEY, 2005. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *The FASEB Journal* [online]. **19**(6), 665–667 [Cit. 2022-03-20]. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/FJ.04-2529FJE
- KOOK, Yun Min, Hyerim KIM, Sujin KIM, Chan Yeong HEO, Min Hee PARK, Kangwon LEE a Won Gun KOH, 2018. Promotion of Vascular Morphogenesis of Endothelial Cells Co-Cultured with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffolds. *Nanomaterials (Basel)*. [online]. **8**(2) [Cit. 2021-12-21]. ISSN 20794991. Dostupné z: doi:10.3390/NANO8020117
- LESZCZYNSKA, Joanna, Barbara ZYZYNSKA-GRANICA, Katarzyna KOZIAK, Slawomir RUMINSKI a Malgorzata LEWANDOWSKA-SZUMIEL, 2013. Contribution of endothelial cells to human bone-derived cells expansion in coculture. *Tissue engineering. Part A* [online]. **19**(3–4), 393–402 [Cit. 2021-09-24]. ISSN 1937-335X. Dostupné z: doi:10.1089/TEN.TEA.2011.0710
- LI, Haiyan, Richard DACULSI, Maritie GRELLIER, Reine BAREILLE, Chantal BOURGET a Joëlle AMÉDÉE, 2010. Role of neural-cadherin in early osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells cocultured with human umbilical vein endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [online]. **299**(2), 422–430 [Cit. 2021-11-06]. Dostupné z: doi:10.1152/AJPCELL.00562.2009
- LI, Hayan, Richard DACULSI, Maritie GRELLIER, Reine BAREILLE, Chantal BOURGET, Murielle REMY and Joëlle AMÉDÉE, 2011. The role of vascular actors in two dimensional dialogue

of human bone marrow stromal cell and endothelial cell for inducing self-assembled network. *PloS one* [online]. **6**(2) [Cit. 2021-11-02]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0016767

LIANG, Tangzhao, Lei ZHU, Wenling GAO, Ming GONG, Jianhus REN, Hui YAO, Kun WANG a Dehai SHI, 2017. Coculture of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells enhanced their proliferation and angiogenesis through PDGF and Notch signaling. *FEBS open bio* [online]. **7**(11), 1722–1736 [Cit. 2021-09-24]. ISSN 2211-5463. Dostupné z: doi:10.1002/2211-5463.12317

LIN, Shiyu, Qi ZHANG, Xiaoru SHAO, Tao ZHANG, Changyu XUE, Sirong SHI, Dan ZHAO a Yunfeng LIN, 2017. IGF-1 promotes angiogenesis in endothelial cells/adipose-derived stem cells co-culture system with activation of PI3K/Akt signal pathway. *Cell proliferation* [online]. **50**(6) [Cit. 2021-09-27]. ISSN 1365-2184. Dostupné z: doi:10.1111/CPR.12390

MOHAMMADI, Elham, Seyed Mahdi NASSIRI, Reza RAHBARGHAZI, Vahid SIAVASHI a Atefeh ARAGHI, 2015. Endothelial juxtaposition of distinct adult stem cells activates angiogenesis signaling molecules in endothelial cells. *Cell and Tissue Research* [online]. **362**(3), 597–609 [Cit. 2021-11-09]. ISSN 14320878. Dostupné z: doi:10.1007/S00441-015-2228-2/FIGURES/7

MOKHTARI-JAFARI, Fatemeh, Ghasem AMOABEDINY, Mohammad Mehdi DEHGHAN, Sonia Abbasi RAVASJANI, Massoumeh Jabbari FAKHR a Yasaman ZAMANI, 2021. Osteogenic and Angiogenic Synergy of Human Adipose Stem Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells Cocultured in a Modified Perfusion Bioreactor. *Organogenesis* [online]. **17**(3-4), 56-71 [Cit. 2021-10-14]. Dostupné z: doi:10.1080/15476278.2021.1954769

* MOLLENTZE, Jamie, Chrisna DURANDT a Michael S. PEPPER, 2021. An *in Vitro* and *in Vivo* Comparison of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Stem Cells International* [online]. **2021** [Cit. 2021-12-29]. ISSN 16879678. Dostupné z: doi:10.1155/2021/9919361

MUTSCHALL, Hilkea, Sophie WINKLER, Volker WEISBACH, Andreas ARKUDAS, Raymund E. HORCH a Dominik STEINER, 2020. Bone tissue engineering using adipose-derived stem cells and endothelial cells: Effects of the cell ratio. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. **24**(12), 7034–7043 [Cit. 2021-09-22]. Dostupné z: doi:10.1111/JCMM.15374

NGUYEN, Van Thi, Barbara CANCIANI, Federica CIRILLO, Luigi ANASTASIA, Guiseppe M. PERETTI a Laura MANGIAVINI, 2020. Effect of Chemically Induced Hypoxia on Osteogenic and Angiogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Direct Coculture. *Cells* [online]. **9**(3) [Cit. 2021-09-23]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/CELLS9030757

PENG, Jing, Long CHEN, Kun PENG, Xuewen CHEN, Jun WU, Zhiyu HE a Zhou XIANG, 2019. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Co-Culture Enhances Large Segment Bone Defect Repair. *Journal of biomedical nanotechnology* [online]. **15**(4), 742–755 [Cit. 2021-09-23]. ISSN 1550-7033. Dostupné z: doi:10.1166/JBN.2019.2735

PIARD, Charlotte, Anjana JEYARAM, Yi LIU, John CACCAMESE, Steven M. JAY, Yu CHEN a John FISHER, 2019. 3D printed HUVECs/MSCs cocultures impact cellular interactions and angiogenesis depending on cell-cell distance. *Biomaterials* [online]. **222** [Cit. 2021-11-06]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119423

PILL, Karoline, Johanna MELKE, Severin MÜHLEDER, Marianne PULTAR, Sabrina ROHRINGER, Eleni PRIGLINGER, Heinz R. REDL, Sandra HOFMANN a Wolfgang HOLNTHONER, 2018. Microvascular networks from endothelial cells and mesenchymal stromal cells from adipose tissue and bone marrow: A comparison. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **6** [Cit. 2021-12-21]. ISSN 22964185. Dostupné z: doi:10.3389/FBIOE.2018.00156/FULL

QIN, Yunhao a Changqing ZHANG, 2017. Endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicle-mediated cell-to-cell communication regulates the proliferation and osteoblastic differentiation of bone mesenchymal stromal cells. *Molecular medicine reports* [online]. **16**(5), 7018–7024 [Cit. 2021-09-28]. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/MMR.2017.7403

* RAUTIAINEN, Swarna, Timo LAAKSONEN a Raili KOIVUNIEMI, 2021. Angiogenic Effects and Crosstalk of Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles with Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(19) [Cit. 2021-12-08]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS221910890

ROHRINGER, Sabrina, Pablo HOFBAUER, Karl H. SCHNEIDER, Anna Maria HUSA, Georg FEICHTINGER, Anja PETERBAUER-SCHERB, Heinz REDL a Wolfgang HOLNTHONER, 2014. Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells. *Angiogenesis* [online]. **17**(4), 921–933 [Cit. 2021-12-23]. ISSN 15737209. Dostupné z: doi:10.1007/S10456-014-9439-0/FIGURES/7

* SALHOTRA, Ankit, Harsh N. SHAH, Benjamin LEVI a Michael T. LONGAKER, 2020. Mechanisms of bone development and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **21**(11), 696–711 [Cit. 2022-04-05]. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-020-00279-w

SHAHABIPOUR, Fahimeh, Reza K. OSKUEE, Hesam DEHGHANI, Mohammad A. SHOKRGOZAR, George E. ANINWENE a Shahin BONAKDAR, 2020. Cell–cell interaction in a coculture system consisting of CRISPR/Cas9 mediated GFP knock-in HUVECs and MG-63 cells in alginate-GelMA based nanocomposites hydrogel as a 3D scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. **108**(8), 1596–1606 [Cit. 2022-03-13]. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/JBM.A.36928

SHEN, Qihua, Xiaoting FAN, Mingli JIANG, Ye ZHAOYANG, Yan ZHOU a Wen-Song TAN, 2019. Inhibiting expression of Cxcl9 promotes angiogenesis in MSCs-HUVECs co-culture. *Archives of biochemistry and biophysics* [online]. **675** [Cit. 2021-09-24]. ISSN 1096-0384. Dostupné z: doi:10.1016/J.ABB.2019.108108

* SIMUNOVIC, Filip a Günter FINKENZELLER, 2021. Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. *Cells* [online]. **10**(7) [Cit. 2021-09-23]. Dostupné z: doi:10.3390/CELLS10071749

STAHL, Andreas, Andreas WENGER, Holger WEBER, G. Björn STARK, Hellmut G. AUGUSTIN a Günter FINKENZELLER, 2004. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **322**(2), 684–692 [Cit. 2022-02-19]. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BBRC.2004.07.175

STAHL, Andreas, Xiao WU, Andreas WENGER, Michael KLAGSBRUN a Peter KURSCHAT, 2005. Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts:

A model for bone replacement grafts. *FEBS Letters* [online]. **579**(24), 5338–5342 [Cit. 2021-11-20]. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/J.FEBSLET.2005.09.005

STEINER, Dominik, Katrin KÖHN, Justus P. BEIER, Michael STÜRZL, Raymund HORCH a Andreas ARKUDAS, 2017. Cocultivation of Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Reveals Antiapoptotic and Proangiogenic Effects. *Cells, tissues, organs* [online]. **204**(5–6), 218–227 [Cit. 2021-10-17]. ISSN 1422-6421. Dostupné z: doi:10.1159/000478654

STEINER, Dominik, Florian LAMPERT, Björn STARK a Günter FINKENZELLER, 2012. Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* [online]. **30**(10), 1682–1689 [Cit. 2021-09-23]. ISSN 1554-527X. Dostupné z: doi:10.1002/JOR.22130

STEINER, Dominik, Hilkea MUTSCHALL, Sophie WINKLER, Raymund E. HORCH a Andreas ARKUDAS, 2021. The Adipose-Derived Stem Cell and Endothelial Cell Coculture System—Role of Growth Factors? *Cells* [online]. **10**(8) [Cit. 2021-09-22]. Dostupné z: doi:10.3390/CELLS10082074

THÉBAUD, NB., R. SIADOUS, R. BAREILLE, M. REMY, R. DACULSI, J. AMÉDÉE a L. BORDENAVE, 2012. Whatever their differentiation status, human progenitor derived - or mature - endothelial cells induce osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* [online]. **6**(10), e51-e60 [Cit. 2021-09-23]. ISSN 1932-7005. Dostupné z: doi:10.1002/TERM.1539

TSAI, Tsung-Lin, Bowen WANG, Matthew W SQUIRE, Lian-Wang GUO a Wan-Ju LI, 2015. Endothelial cells direct human mesenchymal stem cells for osteo- and chondro-lineage differentiation through endothelin-1 and AKT signaling. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. **6**(1) [Cit. 2021-09-24]. Dostupné z: doi:10.1186/S13287-015-0065-6

TSIGKOU, Olga, Irina POMERANTSEVA, Joel A. SPENCER, Patricia A. REDONDO, Alison R. HART, Elisabeth O'DOHERTY, Yunfeng LIN, Claudia C. FRIEDRICH, Laurence DAHERON, Charles P. LIN, Cathryn A. SUNDBACK, Joseph P. VACANTI a Craig NEVILLE, 2010. Engineered vascularized bone grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **107**(8), 3311-3316 [Cit. 2022-02-10]. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/PNAS.0905445107

UNGER, Ronald E., Anne SARTORIS, Kirsten PETERS, Antonella MOTTA, Claudio MIGLIARESI, Martin KUNKEL, Ulrike BULNHEIM, Joachim RYCHLY a C. JAMES KIRKPATRICK, 2007. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* [online]. **28**(27), 3965–3976 [Cit. 2022-02-19]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.05.032

* VIDAL, Luciano, Carina KAMPLEITNER, Meadhbh Á. BRENNAN, Alain HOORNAERT a Pierre LAYROLLE, 2020. Reconstruction of Large Skeletal Defects: Current Clinical Therapeutic Strategies and Future Directions Using 3D Printing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **8** [Cit. 2021-10-05]. Dostupné z: doi:10.3389/FBIOE.2020.00061

VILLARS, F., B. GUILLOTIN, T. AMÉDÉE, S. DUTOYA, L. BORDENAVE, R. BAREILLE a J. AMÉDÉE, 2002. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic

gap junction communication. *American journal of physiology. Cell physiology* [online]. **282**(4), 775-785 [Cit. 2022-03-13]. ISSN 0363-6143. Dostupné z: doi:10.1152/AJPCELL.00310.2001

* VISWANATHAN, S., Y. SHI, J. GALIPEAU, M. KRAMPERA, K. LEBLANC, I. MARTIN, J. NOLTA, D. G. PHINNEY a L. SENSEBE, 2019. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* [online]. **21**(10), 1019–1024 [Cit. 2022-03-31]. ISSN 1465-3249. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCYT.2019.08.002

WANG, Xiaoya, Meng ZHANG, Jingge MA, Mengchi XU, Jiang CHANG, Michael GELINSKY a Chengtie WU, 2020a. 3D Printing of Cell-Container-Like Scaffolds for Multicell Tissue Engineering. *Engineering* [online]. **6**(11), 1276–1284 [Cit. 2022-02-10]. ISSN 2095-8099. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENG.2020.08.001

WANG, Yuli, Yifei DU, Hua YUAN, Yongchu PAN, Jun WU, Xin DU, Shushu HAO, Zixin YAN, Xuan LI, Keyue LIU a Fan XU, 2020b. Human amnion-derived mesenchymal stem cells enhance the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by promoting adiponectin excretion via the APPL1-ERK1/2 signaling pathway. *IUBMB Life* [online]. **72**(2), 296–304 [Cit. 2022-03-24]. ISSN 1521-6551. Dostupné z: doi:10.1002/IUB.2165

WANG, Yuli, Xichen CHEN, Ying YIN a Song LI, 2018. Human amnion-derived mesenchymal stem cells induced osteogenesis and angiogenesis in human adipose-derived stem cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway. *BMB Reports* [online]. **51**(4), 194-199 [Cit. 2022-03-20]. ISSN 1976670X. Dostupné z: doi:10.5483/BMBREP.2018.51.4.005

WEIS, Sara, Satoshi SHINTANI, Alberto WEBER, Rudolf KIRCHMAIR, Malcolm WOOD, Adrianna CRAVENS, Heather MCSHARRY, Atsushi IWAKURA, Young-sup YOON, Nathan HIMES, Deborah BURSTEIN, John DOUKAS, Richard SOLL, Douglas LOSORDO a David CHERESH, 2004. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **113**(6), 885-894 [Cit. 2022-03-29]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI20702

WENGER, A., A. STAHL, H. WEBER, G. FINKENZELLER, H. G. AUGUSTIN, G. B. STARK a U. KNESER, 2004. Modulation of *in vitro* angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. <https://home.liebertpub.com/ten> [online]. **10**(9–10), 1536–1547 [Cit. 2022-02-19]. ISSN 10763279. Dostupné z: doi:10.1089/TEN.2004.10.1536

XIAO, Fei, Chuandong WANG, Chenglong WANG, Yuan GAO, Xiaoling ZHANG a Xiaodong CHEN, 2018. BMPER Enhances Bone Formation by Promoting the Osteogenesis-Angiogenesis Coupling Process in Mesenchymal Stem Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* [online]. **45**(5), 1927–1939 [Cit. 2021-09-27]. ISSN 1421-9778. Dostupné z: doi:10.1159/000487969

XIE, Qiang, Jing XIE, Juan ZHONG, Xiangzhu CUN, Shiyu LIN, Yunfeng LIN a Xiaoxiao CAI, 2016. Hypoxia enhances angiogenesis in an adipose-derived stromal cell/endothelial cell co-culture 3D gel model. *Cell Proliferation* [online]. **49**(2), 236-245 [Cit. 2021-12-08]. ISSN 13652184. Dostupné z: doi:10.1111/CPR.12244

XU, Chu, Haijie LIU, Yuanjia HE, Yuanqing LI a Xiaoning HE, 2020. Endothelial progenitor cells promote osteogenic differentiation in co-cultured with mesenchymal stem cells via the MAPK-

dependent pathway. *Stem cell research & therapy* [online]. **11**(1) [Cit. 2021-09-24]. ISSN 1757-6512. Dostupné z: doi:10.1186/S13287-020-02056-0

ZHANG, Yang, Wanxun YANG, Amar DEVIT a Jeroen J. J. P. VAN DEN BEUCKEN, 2019. Efficiency of coculture with angiogenic cells or physiological BMP-2 administration on improving osteogenic differentiation and bone formation of MSCs. *Journal of biomedical materials research. Part A* [online]. **107**(3), 643–653 [Cit. 2021-09-27]. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/JBM.A.36581

ZHAO, Xian, Liu LIU, Fu Ke WANG, De Pin ZHAO, Xiao Ming DAI a Xue Song HAN, 2012. Coculture of vascular endothelial cells and adipose-derived stem cells as a source for bone engineering. *Annals of Plastic Surgery* [online]. **69**(1), 91–98 [Cit. 2021-11-09]. ISSN 01487043. Dostupné z: doi:10.1097/SAP.0B013E3182583EB9

ZOU, Douhong, Marina VIGEN, Andrew J. PUTNAM, Chen CAO, Susan A. TARLÉ, Tyler GUINN a Darnell KAIGLER, 2022. Phenotypic, trophic, and regenerative properties of mesenchymal stem cells from different osseous tissues. *Cell and Tissue Research* [online]. **388**(1), 1–14 [Cit. 2022-02-13]. ISSN 14320878. Dostupné z: doi:10.1007/S00441-021-03563-Z/TABLES/3