

UNIVERZITA KARLOVA



a

HASSELT UNIVERSITY / tUL



Maastricht University

Disertační práce

Kolagenní struktury od buněčných kultur k šlaše

ABSTRAKT

Autor: Daniel Hadraba

Vedoucí: Assoc. Prof. Karel Jelen | Charles University
Prof. Marcel Ameloot | Hasselt University

Konzultant: Dr. Frantisek Lopot | Charles University
Prof. Virginie Bito | Hasselt University

Anotace

Autor:	Ing. Mgr. Daniel Hadraba
Název práce:	Kolagenní struktury od buněčných kultur k šlaše
Rok:	2010 – 2017
Studijní program:	Doktor Biomechanika Univerzita Karlova Doktor Biomedicínských věd Hasselt University / transnational University Limburg
Ústav:	Anatomie a Biomechaniky Fakulta tělesné výchovy a sportu Univerzita Karlova Biofyzika Hasselt University
Vedoucí::	Assoc. Prof. Karel Jelen Anatomie a Biomechaniky Fakulta tělesné výchovy a sportu Univerzita Karlova Prof. Marcel Ameloot Hasselt University / transnational University Limburg
Konzultanti:	Dr. Frantisek Lopot Anatomie a Biomechaniky Fakulta tělesné výchovy a sportu Univerzita Karlova Prof. Virginie Bito Hasselt University / transnational University Limburg
Bibliografické údaje:	Strany 102 Obrázky 30 Tabulky 2 Rovnice 17
Klíčová slova:	šlacha, kolagen, vlnky, orientace, stárnutí, label-free mikroskopie, generování druhé harmonické, mikroskopie délky života fluoroforu, biomechanika

Abstrakt

Kolagen I. typu může sloužit jako silný identifikátor stavu kvality mezibuněčné a buněčné hmoty. Z tohoto důvodu byl sestrojen *in vitro* model, založený na buňkách srdeční chlopně (VIC). Tento model byl kultivován za specifických podmínek, které ovlivňují vlastnosti kolagenu, tj. s vitamínem C a bez vitamínu C. Model s vitamínem C a bez vitamínu C byl hodnocen pomocí úrovně syntézy kolagenu, exprese genu kolagenu, obsahu DNA pro vyjádření buněčného růstu, fluorescenční, konfokální, a nelineární mikroskopie. Z výsledků vyplývá, že model s vitamínem C dosáhl vyšší úrovně růstu buněk a deponovaného kolagenu. Na druhou stranu úroveň exprese genu kolagenu byla pro oba modely stejná. Stejně tak byla vlákna kolagenu detekována v obou modelech za použití imunofluorescenční mikroskopie. Při vizualizaci pouze extracelulárního kolagenu u modelu s vitamínem C bylo dosaženo vyššího koeficientu korelace mezi daty získanými imunofluorescenčním barvením a mikroskopie druhé harmonické (SHG) (na rozdíl od barvení extracelulárního a buněčného). V neposlední řadě bylo prokázáno, že hydroxyproline silně přispívá k susceptibilitě tenzoru druhého řádu molekuly kolagenu, a tak je znemožněno generování druhé harmonické v modelu bez vitamínu C.

Následně byly fluorescenční a polarizované SHG metody využity pro znázornění vláken kolagenu na řezech šlach z králíka ve věku 31 měsíců. Obrázky založené na fluorescenčním barvení řezů vypadaly rozmazaně, bez detailů vláken, a to i při změně polarizace excitačního světla. Na druhou stranu obrázky získané pomocí polarizované SHG mikroskopie obsahovaly individuální vlákna s informací o jejich lokální orientaci. Díky tomuto zjištění je možné zpracování vzorku omezit pouze na krájení, chceme-li zobrazit struktury kolagenu za pomoci SHG mikroskopie. Pro úplnou představu o vlivu krájení byly nasnímány vzorky řezů králíčích šlach z jedinců ve věku od 7 dnů do 38 měsíců. Výsledná orientace vláken v obrázku byla porovnána pomocí navrženého algoritmu a vynesena do korelogramu. Z korelogramů bylo zřejmé, že u mladých jedinců dochází k porušení pravidelnosti uspořádání kolagenních vláken. U starších jedinců uspořádání kolagenních vláken bylo pravidelné a kopírovalo osu zatížení šlachy. Tyto výsledky na řezech šlach byly následně porovnány s výsledky z nekrájených intaktních šlach.

U všech intaktních šlach bez věkového rozdílu existovala jasná směrovost uspořádání kolagenních vláken. Tato směrovost odpovídala ose zatížení Achillovy šlachy, což potvrzuje, že porušení pravidelnosti uspořádání kolagenních vláken, je u mladých jedinců následkem

krájení. Kromě tohoto výsledku bylo zjištěno, že šlachy v závislosti na věku disponují různým profilem vlnitosti, tzv. „crimp pattern“. Tento fenomén se dá popsat jako sinusové vlnění vláken ve směru působení síly. U mladých jedinců toto vlnění začíná na relativně nízkých hodnotách amplitudy (A), respektive vlnové délky ($A = 2.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $\Lambda = 19 \pm 4 \mu\text{m}$). Oba tyto parametry postupně vzrůstají s věkem až do období sexuální zralosti jedince. V plné dospělosti dochází k opětovnému snižování amplitudy vlnění a zvětšování vlnové délky tak, že hlavně u starých jedinců je obtížné tento parametr identifikovat.

Věk byl také vybrán jako nezávislá proměnná při zkoumání mikro-prostředí šlachy, změny úhlu stoupání šroubovice molekuly kolagenu a mechanických vlastností šlachy. Bylo prokázáno, že změna mikro-prostředí šlachy je promítnuta do změny času životnosti autofluorescenčního signálu šlach, tj. s rostoucím věkem se významně zvyšuje hodnota komponenty τ_2 . V případě měření úhlu stoupání šroubovice molekuly kolagenu pomocí polarizované SHG mikroskopie nebylo možné zamítnout nulovou hypotézu, tj. nebyl nalezen žádný rozdíl mezi mladými a starými jedinci. Stejného výsledku bylo dosaženo při simultánním měření úhlu stoupání šroubovice molekuly kolagenu a tahové zkoušky. Toto měření ale odhalilo, že dochází k vymizení vlnek kolagenu při napětích nižších, než je rozlišitelnost použitého silového čidla. Závěrem byly provedeny klasické jednoosé tahové zkoušky s využitím CCD kamery. Naměřená data měla vysoký rozptyl, a tak nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi šlachami z králíka ve věku 4 a 38 měsíců.