

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie – fyziologie buňky



Bc. Šimon Pražák

Studium vlivu mechanické zátěže na diferenciaci kmenových buněk na hladké svalové buňky

Evaluation of influence of mechanical loading on differentiation of stem cells into smooth muscle cells

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Elena Filová, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

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

V Praze, 9.8.2019

Bc. Šimon Pražák

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Mgr. Eleně Filové, Ph.D. za vedení práce, její čas, trpělivost a důvěru, Ing. Romanu Matějkovi děkuji za pomoc při práci s technologií bioreaktorů s mechanickou zátěží. Doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. a všem pracovníkům Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR děkuji za vlídné přijetí, cenné rady a příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

Kultivace buněk v bioreaktorech s mechanickou zátěží simuluje fyziologické podmínky, kterým jsou buňky v organismu vystaveny. Tato technologie byla využita pro navození diferenciaci kmenových buněk z tukové tkáně směrem k fenotypu buněk vaskulární hladké svaloviny, které mohou dále sloužit pro tvorbu cévních náhrad. V současné době neexistuje zavedený postup kultivace kmenových buněk s mechanickou zátěží. Hlavním cílem této práce bylo proto optimalizovat strategii kultivace a stanovit ideální parametry zátěže. Diferenciaci byla hodnocena pomocí imunofluorescence specifických markerů hladkosvalových buněk, a to α -aktinu a h1-calponinu, které byly kvantifikovány pomocí Western blotu. Pomocí imunofluorescenčního barvení byla také detekována produkce extracelulární matrix. Výstupem práce je ustanovení ideálních podmínek kultivace buněk v bioreaktoru s mechanickou zátěží, při kterých dochází k jejich diferenciaci do buněk hladké svaloviny. Pro kultivaci byly použity tři typy nosičů, a sice plazmované sklo, sklo s vrstvou fibrinu a decelularizovaný perikard. Předběžné výsledky ukazují, že diferenciaci směrem k hladkému svalu se podařilo navodit u lidských a prasečích kmenových buněk z tukové tkáně, kdy buňky byly analyzovány 3. a 7. den kultivace. Vypracování strategie kultivace kmenových buněk v bioreaktoru s mechanickou zátěží může přispět k zefektivnění tvorby cévních náhrad využívaných při léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova: kmenové buňky, mechanická zátěž, tkáňové inženýrství, buněčná diferenciaci, dynamická kultivace

Abstract

Cultivation of cells in bioreactors with mechanical load simulates the physiological conditions to which cells in the body are exposed. This technology has been used to induce the differentiation of stem cells from adipose tissue towards the phenotype of vascular smooth muscle cells, which can further serve to form vascular replacements. At present, there is no established strategy for cultivating stem cells while being exposed to mechanical stress. The main aim of this work was therefore to optimize the cultivation strategy and determine the ideal load parameters. Differentiation was analyzed by immunofluorescence of specific smooth muscle cell markers, α -actin and h1-calponin, which were quantified by Western blot. Extracellular matrix production was also detected by immunofluorescence staining. The outcome of this work is the establishment of ideal conditions of cell culture in a bioreactor with mechanical load, during which they differentiate into smooth muscle cells. Three types of scaffolds were used for cultivation; plasma treated glass, fibrin-coated glass and decellularized pericardium. Preliminary results show that smooth muscle differentiation was successfully induced in human and porcine adipose tissue stem cells. Cells were analyzed after 3 and 7 days of culture. Developing a stem cell culture strategy in a bioreactor with mechanical stress can lead to a more efficient formation of vascular substitutes used in the treatment of cardiovascular diseases.

Key words: stem cells, mechanical loading, tissue engineering, cell differentiation, dynamic cultivation

Seznam použitých zkratk:

APS	peroxodisíran amonný
ASC	kmenové buňky z tukové tkáně
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BMP4	kostní morfogenetický protein 4
BMSC	kmenové buňky kostní dřene
BSA	hovězí sérový albumin
CaMKII	calmodulin dependentní proteinkináza II
DAG	1,2-diacylglycerol
E2	Prostaglandin E2
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Elk-1	ETS Like-1 protein
ePTFE	expandovaný polytetrafluorethylen
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FAK	fokální adhezní kináza
FGF2	fibroblastový růstový faktor 2
FBS	fetální bovinní sérum
HGF	hepatocytární růstový faktor
IGF-I	insulinu podobný růstový faktor 1
IL 10	interleukin 10
IL 13	interleukin 13
IL 4	interleukin 4
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
IRS	substrát insulinového receptoru
KVO	kardiovaskulární onemocnění
MHC	těžký řetězec myosinu
MLCK	kináza lehkého řetězce myosinu
MSC	mezenchymální kmenové buňky
mTOR	savčí cíl rapamycinu
NGF	nervový růstový faktor
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fyziologický roztok pufrovaný fosfáty

PDGF	růstový faktor z destiček
PET	polyethylen tereftalát
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKG-I α	cGMP dependentní protein kináza I α
PKG-I β	cGMP dependentní protein kináza I β
PVDF	polyvinyliden difluorid
RBPJ	rekombinantní vazebný protein supresor genu pro hairless
RhoA	člen A Rho genové rodiny
ROCK	protein kináza asociována s Rho proteiny
SDS	dodecylsírán sodný
SMC	hladké svalové buňky
SRF	sérový responzivní faktor
S6K1	kináza 1 ribosomálního proteinu S6
TEMED	tetrametyletylendiamin
TGF- β	transformující růstový faktor β
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VSMC	Cévní hladké svalové buňky
Y27632	inhibitor ROCK kinázy
δ EF1	δ -crystallin enhancerový faktor 1

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	Kardiovaskulární systém	3
2.1.1	Struktura a funkce cév	3
2.1.2	Kardiovaskulární onemocnění	5
2.2	Vaskulární tkáňové inženýrství	6
2.2.1	Nosiče	7
2.2.2	Kmenové buňky z tukové tkáně.....	9
2.2.3	Hladká svalovina.....	11
2.2.4	Diferenciace buněk hladké svaloviny	13
3	Cíle práce	17
4	Materiál a metody	18
4.1	Buňky.....	18
4.1.1	Pasážování	18
4.1.2	Izolace prasečích ASC	19
4.2	Statická kultivace buněk	20
4.3	Optimalizace dynamické kultivace buněk	21
4.4	Úprava nosičů	22
4.4.1	Postupná decelularizace	22
4.4.2	Úprava skla	23
4.5	Imunofluorescenční barvení	24
4.5.1	Imunofluorescenční barvení markerů diferenciace.....	24
4.5.2	Imunofluorescenční barvení kolagenu I a fibronektinu	24
4.6	Mikroskopie.....	25
4.7	Elektroforéza SDS PAGE.....	26
4.7.1	Příprava buněčného lyzátu	26

4.7.2	Příprava gelů	26
4.7.3	SDS PAGE.....	27
4.7.4	Western Blot	27
5	Výsledky	29
5.1	Optimalizace dynamické kultivace buněk	29
5.2	Postupná decelularizace perikardu	29
5.3	Detekce markerů diferenciaci	31
5.3.1	Plazmované sklo	31
5.3.2	Sklo s vrstvou fibrinu.....	36
5.3.3	Decelularizovaný perikard.....	42
5.4	Detekce produkce extracelulární matrix	45
5.4.1	Plazmované sklo	45
5.4.2	Sklo s vrstvou fibrinu.....	48
5.4.3	Decelularizovaný perikard.....	52
6	Diskuse.....	54
7	Závěr	61
8	Seznam použité literatury.....	62

1 Úvod

Tkáňové inženýrství je mladou mezioborovou disciplínou na pomezí materiálového inženýrství, buněčné a molekulární biologie, kterou v roce 1993 definovali Robert S. Langer a Joseph P. Vacanti. Za cíl si klade tvorbu plně funkčních biologicky kompatibilních náhrad poškozených nebo defektních tkání, které budou snadno dostupné a nebudou v těle pacienta vyvolávat imunitní odpověď. Tyto náhrady mohou být jak biologické, tak umělé. Tkáňové náhrady musí mít mechanické vlastnosti, které odpovídají původní tkáni, dále nesmí mutageně nebo toxicky působit na tkáň okolní. Aplikace těchto náhrad směřuje k udržování, obnovování nebo zlepšení funkcí poškozené tkáně či orgánu. V současné době se metody tkáňového inženýrství využívají například při léčbě poškození kůže, při tvorbě kostních náhrad, kloubních náhrad, nebo cévních náhrad (Langer and Vacanti 1993).

Zavedeným postupem při nahrazování nenávratně poškozené tkáně je transplantování nové tkáně. Transplantovanou tkáň můžeme podle jejího zdroje rozlišovat na autologní (od samotného pacienta), alogenní (od jiného lidského dárce), nebo xenogenní (od zvířecího dárce). Používání cizorodých buněk či tkání původem z jiné osoby nebo zvířete je problematické z hlediska přenosu patogenů, transplantace alogenní nebo xenogenní tkáně může vést k vyvolání imunitní reakce. Tyto problémy odpadají u autologních transplantací, při kterých se minimalizuje riziko odhojení transplantované tkáně. Jejich častou nevýhodou je však špatná dostupnost a nedostatek vhodné tkáně pro transplantaci. Proto se stále častěji uchylujeme k tvorbě tkáňových náhrad z autologních kmenových buněk (Howard, Buttery et al. 2008, Crupi, Costa et al. 2015).

Kmenové buňky jsou nediferenciované živočišné buňky, které mají unikátní schopnost proliferace a diferenciace na jiný buněčný typ. Kmenové buňky můžeme podle jejich vlastností rozdělit na buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Totipotentní kmenové buňky mohou diferencovat v jakýkoliv buněčný typ v těle, včetně buněk placenty. Pluripotentní buňky mají schopnost diferenciace do všech buněčných typů, kromě buněk placenty. Multipotentní buňky mohou diferencovat pouze na buňky příbuzné danému typu buňky v příslušné tkáni, unipotentní kmenové buňky mohou diferencovat pouze v jeden buněčný typ (Bacakova, Zarubova et al. 2018).

Při tvorbě vaskulárních tkáňových náhrad se nejčastěji využívají dva typy mezenchymálních kmenových buněk (MSC), konkrétně kmenových buněk z tukové tkáně (ASC) a kmenových buněk z kostní dřeně (BMSC) (Pontikoglou, Deschaseaux et al. 2011).

ASC jsou multipotentní kmenové buňky se schopností diferencovat směrem k cévním hladkým svalovým buňkám. Jedním z hlavních důvodů využívání ASC pro tvorbu cévní hladké svaloviny je fakt, že autologní cévní hladké svalové buňky z maturovaných cév jsou špatně dostupné, a navíc mají velmi omezenou životnost *in vitro*. Kromě toho podléhají cévní hladké svalové buňky již v časných fázích kultivace *in vitro* takzvané fenotypické modulaci, tedy dediferenciaci z fyziologického klidového kontraktilního fenotypu na fenotyp syntetický a proliferativní, což může vést k restenóze cévní náhrady a jejímu selhání. Toto chování hladkých svalových buněk je dále umocněno faktem, že obvykle jsou pro tvorbu cévních náhrad využívány buňky vén, které se špatně adaptují na arteriální podmínky, a tím snáze podléhají fenotypické modulaci. Proto byly v minulosti hladké svalové buňky obvykle z konstrukce cévních náhrad vylučovány, a tato konstrukce se omezovala jen na náhrady bezbuněčné či endotelizované. Moderním přístupem tkáňového inženýrství je užití kmenových buněk, které mohou být nově diferencovány v buňky hladké svalové. Klasickým přístupem pro navození diferenciaci je kultivace buněk v diferenciacním médiu, které obsahuje příslušné růstové faktory. Pokud jsou však buňky kultivovány v konvenčním statickém kultivačním systému, tato kultivace nevytváří fyziologické podmínky odpovídající živému organismu, kde jsou buňky přirozeně vystaveny dynamické zátěži. Například na buňky v cévní stěně je vyvíjena mechanická zátěž působením krevního tlaku. Cílem diplomové práce je proto popsat a ustanovit optimální strategii kultivace ASC v bioreaktorech s dynamickou zátěží, které lépe simulují prostředí těla organismu, a podporují tak jejich diferenciaci do buněk vaskulárního hladkého svalu (VSMC), které se následně mohou využívat při tvorbě cévních náhrad (Song, Rumma et al. 2018).

2 Literární přehled

2.1 Kardiovaskulární systém

Hlavní komponenty kardiovaskulárního systému jsou srdce, cévy a krev. Cévy tvoří síť, kterou je krev rozváděna od srdce k orgánům a tkáním, ze kterých se vrací zpátky do srdce. Krev je zodpovědná za transport kyslíku, živin a hormonů do tkání a orgánů. Obsahuje dvě složky, buněčnou a tekutou. Buněčná složka se skládá z erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Tekutá složka nazývaná plazma je složena z 90% z vody, 10% tvoří proteiny (klasifikované jako albuminy, globuliny nebo fibrinogeny), ionty, hormony, plyny, vitamíny a další organické látky (Basu and Kulkarni 2014).

Transport krve je zajišťován dvěma oběhovými okruhy – malým (plicním), a velkým (tělovým). Malý oběh začíná v pravé srdeční komoře, odkud je krev s nízkým obsahem kyslíku odváděna plicní tepnou do plic, kde dochází okysličování krve a vylučování oxidu uhličitého. Okysličená krev je z plic odváděna plicními žilami do levé síně srdeční a následně je transportována velkým oběhem. Velký oběh začíná v levé srdeční komoře, odkud je krev vedena přes aortu do jednotlivých částí těla. Krev je v těle rozváděna cévami, které rozdělujeme na artérie (tepny), arterioly (tepénky), vény (žilky), venuly (žilky) a kapiláry.

2.1.1 Struktura a funkce cév

Artérie jsou cévy vedoucí krev směrem od srdce. Rozdělují se do dvou kategorií; na elastické artérie a svalové artérie. Elastické artérie jsou s průměrem do 2,5 cm největší artérie v těle. Do této kategorie patří aorta, společná karotida, nebo kyčelní artérie. Jsou zodpovědné za transport velkého objemu krve do všech částí těla. Obsahují vysoké množství elastických vláken tvořených elastinem a relativně málo buněk hladké svaloviny, stěna elastických artérií je tak více pružná. Svalové artérie jsou střední nebo malé cévy s průměrem okolo 4 mm. Jsou zodpovědné za přenos krve pro vnitřní orgány a kosterní svalovinu.

Stěna artérií se skládá ze tří vrstev, které se nazývají *tunica intima*, *tunica media* a *tunica externa* (Obrázek 1). *Tunica intima* je umístěna v lumen artérie a je tvořena jednovrstevným endotelem, bazální laminou a vrstvou pojivové tkáně obsahující elastinová a kolagenová vlákna. Buňky endotelu jsou ploché, protáhlé s šířkou mezi 10 – 15 μm a délkou mezi 25 – 50 μm. Vrstva endotelu je lokalizována na rozhraní cévní stěny a krve, kde tvoří selektivní bariéru pro plazmatické lipidy a lipoproteiny a udržuje netrombogenní prostředí. V koronárních artériích se pod vrstvou endotelu vyskytuje navíc vrstva hladké svaloviny.

Endoteliální buňky jsou uchyceny na bazální lamině složené z kolagenu IV, fibronektinu, lamininu a proteoglykanů, která odděluje endotel od pojivové tkáně. Pod bazální laminou se nachází subendotelová pojivová tkáň tvořená vlákny kolagenu a elastinem, oddělující *tunica intima* od *tunica media*. Struktura *tunica media* se u elastických a svalových artérií liší. U elastických artérií je robustnější, obsahuje koncentrické vrstvy elastinových a kolagenových vláken, které jsou produkovány VSMC. Kolagenová vlákna mají zpevňující funkci, pomáhají cévní stěně odolávat systolickému tlaku. U svalových artérií je *tunica media* tenčí, bez elastinových vrstev, tvořená je převážně VSMC. Svrchní vrstva artérií se nazývá *tunica externa* nebo *tunica adventitia*. Je tvořena fibroblasty a složkami extracelulární matrix (ECM), převážně kolagenem typu I. Od *tunica media* je oddělena externí elastickou laminou, na vnější straně kotví artérie v okolní tkáni. U elastických artérií tvoří asi 10% tloušťky cévní stěny, u artérií svalových to může být až 50% (Herbert and Stainier 2011, Robertson and Watton 2013).

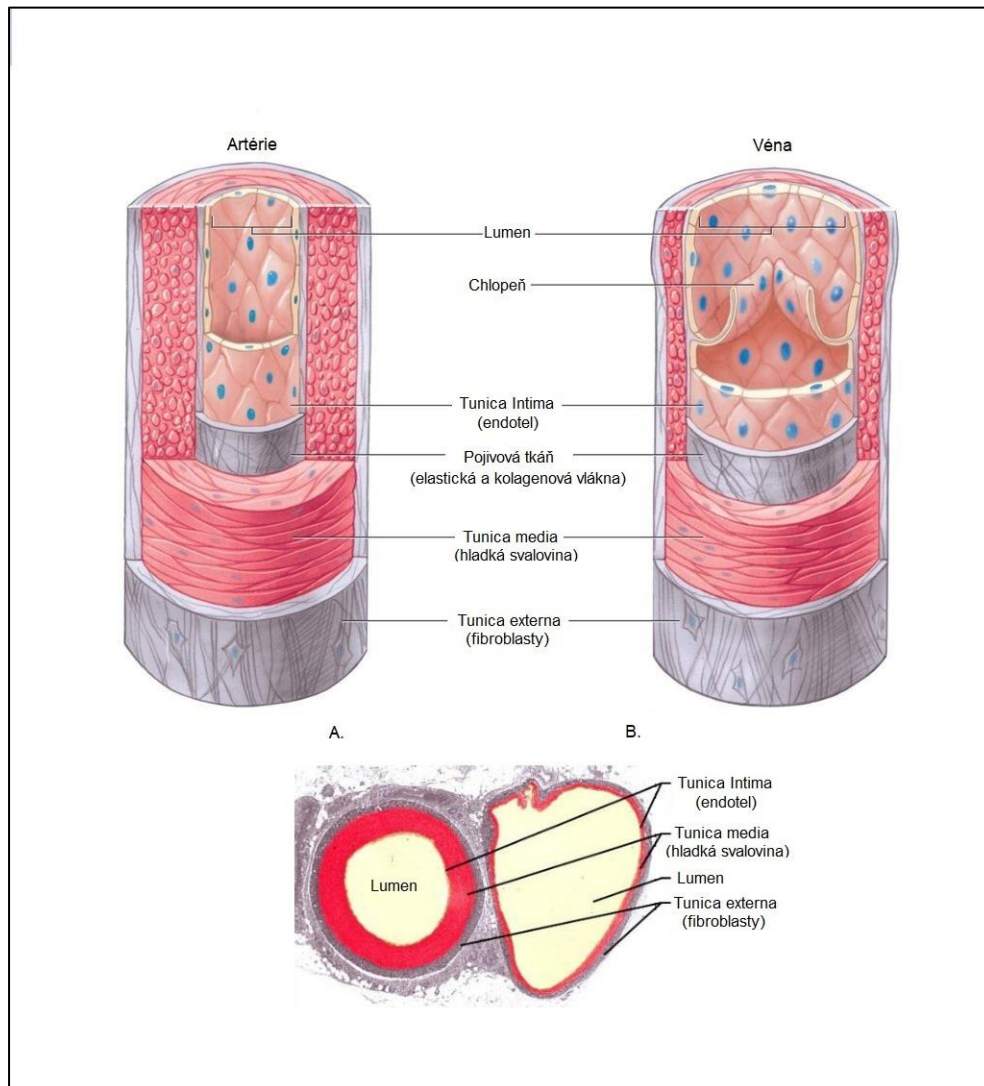
Arterioly jsou s průměrem pod 30 μm tenčí než svalové artérie. Stavba jejich stěny je stejná jako u artérií, *tunica media* je ztenčená, obsahuje pouze jednu nebo dvě vrstvy VSMC. Ztenčená je i *tunica externa* (Mulvany and Aalkjaer 1990).

Vény zodpovídají za transport krve z tkání a orgánů do srdce. Strukturně jsou organizované podobně jako artérie, jejich stěna se skládá ze tří vrstev. Průměr lumen vén je v porovnání s artériemi větší, naopak střední vrstva *tunica media* je tenká a obsahuje méně vrstev elastinových vláken a VSMC. Mnoho vén, především v končetinách, obsahuje na rozdíl od artérií v lumen chlopně. Ty brání špatnému proudění krve (Obrázek 1). Podle velikosti rozdělujeme vény velké, střední a nejmenší venuly. Velké vény mají poloměr nad 10 mm, *tunica intima* se skládá z endotelu, bazální laminy a subendotelové pojivové tkáně. *Tunica media* je redukována, nejsilnější vrstvou je vnější *tunica externa*. Vény střední velikosti jsou strukturně podobné velkým vénám, jejich průměr je pod 10 mm (Thakali, Galligan et al. 2007).

Venuly se dělí na dva typy, postkapilární a svalové. Postkapilární venuly s průměrem okolo 0,1 mm přijímají krev z kapilár a nemají dobře vyvinutou *tunica media*. Svalové venuly mají průměr okolo 1 mm, jejich *tunica media* je tvořena jednou nebo dvěma vrstvami VSMC.

Kapiláry jsou nejmenším typem cév. Nacházejí se mezi artériemi a vénami, jsou zodpovědné za výměnu živin a odpadních látek mezi krví a tkání. Jejich stěna je tvořena bazální laminou a endotelem, *tunica media* ani *tunica externa* se u kapilár nevyskytují a jsou alespoň do jisté míry suplovány pericyty, tedy podpůrnými buňkami fenotypicky podobnými

VSMC. Průměr kapilár jejich průměr je přibližně 8 μm . Kapiláry jsou organizovány do větvených sítí, které prostupují orgány (Shier, Butler et al. 2006).



Obrázek 1: Struktura cév

Rozdíl ve stavbě stěny Artérie (A.) a Vény (B.). Převzato a upraveno podle (Shier, Butler et al. 2006).

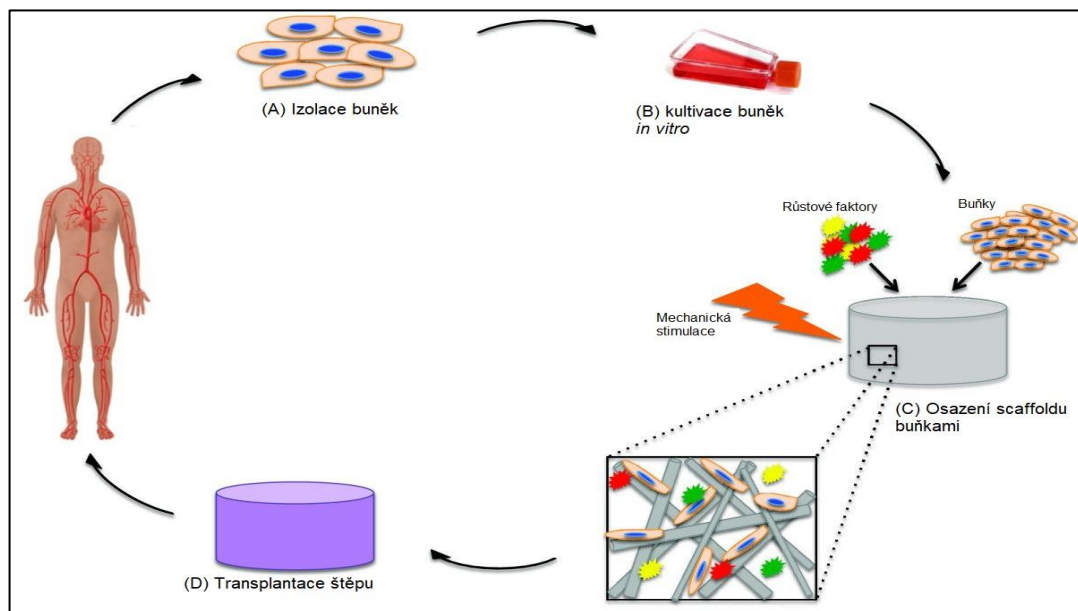
2.1.2 Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) tvoří KVO 30% všech smrtelných onemocnění; například v roce 2018 na KVO zemřelo 17,9 milionu lidí na celém světě. Vrozené srdeční vady představují nejčastější defekty u novorozenců, v 1% případů končí smrtí. Rozeznáváme několik typů KVO. Onemocnění spojená s aterosklerózou patří mezi onemocnění s nejvyšší mírou úmrtnosti a zahrnují například ischemickou chorobu srdeční a cévní mozkovou příhodu. Ateroskleróza se projevuje ztlušťováním cévní stěny v důsledku

akumulace lipidů. Dalšími typy jsou vrozené srdeční vady, kardiomyopatie, revmatická srdeční onemocnění, srdeční arytmie a onemocnění srdečních chlopní. Mezi roky 2006 a 2016 došlo k nárůstu úmrtí spojených s KVO o 14,5%. Existuje tedy silný tlak a zájem na vyvíjení nových tkáňových náhrad a léčebných postupů spojených s KVO (Mozaffarian, Benjamin et al. 2016).

2.2 Vaskulární tkáňové inženýrství

Klasickým přístupem tkáňového inženýrství při tvorbě cévních náhrad je osídlení nosiče (scaffoldu) buňkami a jeho následná transplantace do pacienta (Obrázek 2). Buňky jsou nejprve izolovány z dárce, následně kultivovány *in vitro* a po dosažení požadovaného množství nasazovány na nosiče. Zdroj buněk může být autologní, alogenní nebo xenogenní. Na nosičích jsou buňky inkubovány za přítomnosti růstových faktorů a mechanické stimulace. Tyto podmínky podporují buněčnou diferenciaci a vývoj dané tkáně. Dalším přístupem je implantace bezbuněčného nosiče, který je následně osídlen vlastními buňkami pacienta. V případě vaskulárního tkáňového inženýrství se nejčastěji jedná o vycytání endoteliálních progenitorových buněk na nosiči, které však dosud zůstává spíše jen na úrovni experimentu. (Alini, Li et al. 2003).



Obrázek 2: Základní strategie tkáňového inženýrství

Buňky izolované z dárce (A) jsou kultivovány *in vitro* (B). Následně jsou v požadovaném počtu nasazeny na nosič (scaffold), kde jsou pod vlivem růstových faktorů a mechanické zátěže (C). Nosič osazený buňkami je transplantován pacientovi. Převzato a upraveno podle (Serbo and Gerecht 2013).

2.2.1 Nosiče

Nosiče mohou být dvojrozměrné (2D) nebo trojrozměrné (3D), tvořené z přírodních proteinů ECM, decelularizovaných tkání nebo syntetických polymerů. Jejich úkolem je vytvářet vhodné prostředí pro buněčný růst a tvorbu nové tkáně. Fungují jako strukturální a mechanická podpora a určují morfologii nově vznikající tkáně. Výhodou přírodních polymerů využívaných v tkáňovém inženýrství je jejich přirozená biokompatibilita a dobré adhezivní vlastnosti, potřebné pro uchycení buněk. Nevýhodou může být jejich náchylnost k enzymatické degradaci a snížená schopnost odolávat mechanickému tlaku. Nosiče tvořené jednotlivými proteiny ECM se využívají nejčastěji ve formě gelů. Nosiče z decelularizované tkáně, která je zbavena buněčné složky, využívají kompletní složku zachovalé ECM (Thottappillil and Nair 2015).

Vaskulární ECM je produkována všemi buněčnými typy přítomnými v cévní stěně, tedy endotelovými buňkami, VSMC a fibroblasty. Hlavní funkcí ECM je podpora a udržování tvaru dané tkáně. Vytváří prostředí, ve kterém mohou buňky migrovat a adherovat, zároveň umožňuje distribuci růstových faktorů potřebných pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. Všeobecně se přesné složení ECM se liší podle tkáně, ve které se vyskytuje. Hlavní složku ECM cévní stěny tvoří proteiny – kolagen, elastin, laminin, fibronectin a rovněž glykosaminoglykany. Například sulfatované glykosaminoglykany podobné heparinu, produkováné endotelovými buňkami, udržují VSMC v klidovém neproliferativním fenotypu, který umožňuje vykonávat jejich kontraktilní funkci (Frantz, Stewart et al. 2010).

Kolagen je hlavním proteinem ECM, zároveň nejčastěji využívaným proteinem při tvorbě biologických nosičů. V současnosti rozeznáváme 29 typů kolagenu a podle jejich struktury je rozdělujeme na fibrilární a nefibrilární, které se dále dělí na další podskupiny. V cévních stěnách se vyskytují zejména fibrilární typy I, III, V a rovněž typ IV, tvořící bazální membránu. Kolagenní fibrila vzniká polymerací molekul tropokolagenu, který má strukturu pravotočivé trojšroubovice. Tropokolagen je tvořen třemi levotočivými šroubovicemi. Kolagen je snadno degradovatelný, a proto se za účelem prodloužení jeho životnosti je využívá crosslinkingu (zesítnění) fyzikálními, chemickými a enzymatickými metodami. Princip chemického zesítnění kolagenu je založen na vytvoření kovalentní vazby mezi aminovými a karboxylovými skupinami ve stejné molekule kolagenu. Fyzikálního crosslinkingu kolagenu lze dosáhnout UV zářením a dehydrotermálním zpracováním (Boccafoschi, Habermehl et al. 2005, Wu, Black et al. 2007).

Kolagenový nosič byl využit k tvorbě prvních umělých cév, a v rámci tkáňového inženýrství je pro své vhodné biologické a mechanické vlastnosti hojně využíván dodnes. Používá se i na vyplnění pórů pletených cévních protéz. Má pozitivní vliv na revaskularizaci transplantovaného štěpu, neboť kolagenová matrice přitahuje VSMC. Nevýhodou kolagenu je, že může vyvolávat zánětlivou a trombogenní odpověď. Kontakt kolagenu s krví má za následek aktivaci leukocytů a krevních destiček, která může vést k trombóze. Není tak vhodným materiálem pro rozhraní štěpu s krví. Bez doplňkové podpory není kolagenový gel schopen odolávat fyziologickému krevnímu tlaku (Ito, Ishimaru et al. 1997, Braddon, Karoyli et al. 2002).

Jako nosič je pro potřeby vaskulárního tkáňového inženýrství využíván i elastin a elastinu podobné polypeptidy vytvářené technologiemi DNA rekombinace. Primární struktura těchto polypeptidů může být upravována tak, aby výsledná molekula měla požadované vlastnosti. V cévách je elastin důležitý pro strukturní stabilitu a elasticitu, a jeho degradace vede ke vzniku aneurysmat a cévních disekcí. Elastin tvoří síťovitou strukturu, která je amorfní, zároveň ale silně zesíťovaná, což má za následek pružnou odezvu při tlakovém působení. Elastinové štěpy přitahují endoteliální buňky, při styku s krví nevyvolávají zánětlivou ani trombogenní odpověď (Chan and Leong 2008, Girotti, Fernandez-Colino et al. 2011).

Fibrin je nerozpustný vláknitý protein zodpovědný za srážení krve. Velkou výhodou fibrinu je možnost jeho získávání z vlastní krve pacienta. Vzniká štěpením fibrinogenu trombinem v závěrečné fázi srážení krve, což lze napodobit v laboratorních podmínkách. Fibrin nevyvolává zánětlivou ani trombogenní odpověď, vytváří strukturu vhodnou pro adhezi buněk. Podobně jako u kolagenu vyžadují fibrinové nosiče vyžadují podporu pro odolávání fyziologickému krevnímu tlaku (Ye, Zünd et al. 2000, Ceccarelli and Putnam 2014, Pajorova, Bacakova et al. 2018).

Jako přírodní nosič se využívají také celulósová vlákna, která vykazují nízkou trombogenicitu a jsou vhodná pro buněčnou adhezi (Novotna, Havelka et al. 2013).

Nosiče z decelularizované tkáně mohou být přímo decelularizované cévy, nebo decelularizovaný perikard. Vnější perikard se skládá ze dvou vrstev; vnitřní serózní *pericardium serosum*, přes kterou je fixován na srdce a vnější vazivovou *pericardium fibrosum*, obsahující značné množství kolagenních a elastických vláken. Výhodou těchto nosičů jsou dobré biomechanické vlastnosti a jejich dostupnost při autologních transplantacích (Straka, Schornik et al. 2018).

Metody decelularizace jsou fyzikální, chemické a enzymatické. U fyzikálních metod je lyzace buněk navozena sonikací nebo rychlým zamražením buněčného materiálu, které způsobuje tvorbu ledových krystalů a následné poškození buněčné membrány. Chemická decelularizace využívá roztoků zásad a kyselin, ionických detergentů (SDS) a neionických detergentů (Triton X-100). Enzymatické metody využívají nukleáz, kolagenáz, lipáz a trypsinu (Elder, Kim et al. 2010).

Syntetické polymery se úspěšně využívají pro tvorbu velkých cévních náhrad s průměrem nad 6 mm, méně úspěšné je však jejich využití při náhradách cév menších. Hlavním limitujícím faktorem je jejich trombogenicita a vyvolávání zánětlivé odpovědi. Při kontaktu krve se syntetickými polymery dochází k aktivaci leukocytů a krevních destiček, přičemž jako prevence tohoto jevu slouží osazení vnitřní plochy tubulárního nosiče buňkami endotelu. Syntetické nosiče mohou být degradovatelné, nebo nedegradovatelné.

Nejčastěji používaným nedegradovatelným polymerem pro tvorbu cévních náhrad je polyethylen tereftalát (PET). Povrch těchto nosičů, obvykle vyráběných pletářskou technologií, je velice drsný a vysoce hydrofobní, a proto byl v dřívějších studiích upravován nanesením proteinových polymerů, například fibrinem, který umožňuje buněčnou adhezi. Pro náhrady s menším poloměrem se využívá expandovaný polytetrafluoroethylén (ePTFE), který má podobné vlastnosti jako PET. Mezi degradovatelné syntetické nosiče řadíme kyselinu polyglykolovou (PGA), kyselinu polylactonovou (PLA). Výhodou těchto nosičů je jejich biokompatibilita a dobré mechanické vlastnosti, nevýhodou že produkty jejich degradace mohou vyvolávat nežádoucí reakce, jako je zánět (Assmann, Delfs et al. 2013, Chlupac, Filova et al. 2014, Toosi, Naderi-Meshkin et al. 2016).

2.2.2 Kmenové buňky z tukové tkáně

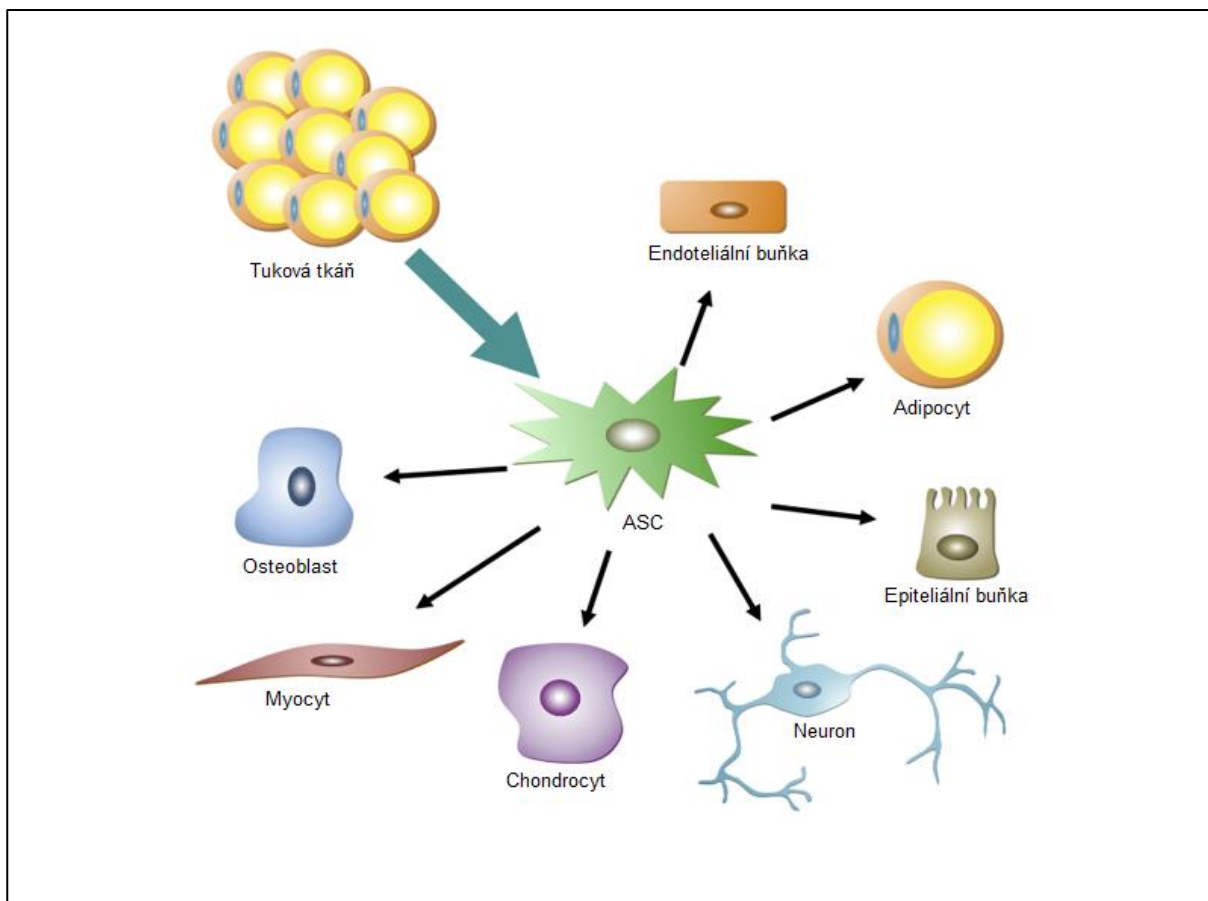
První izolace mezenchymálních kmenových buněk (MSC) proběhly v šedesátých letech minulého století. Jednalo se o BMSC, které byly schopny *in vitro* kultivace a diferenciaci v jiné buněčné typy. Další izolace MSC se úspěšně podařila z tukové tkáně, pupečnickové krve a *dermis*. Využívání MSC oproti jiným kmenovým buňkám má řadu výhod. Na rozdíl od embryonálních kmenových buněk není práce s MSC není ovlivňována etickými problémy, a jejich aplikace není tolik omezena potencionálními imunologickými problémy (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970, Orbay, Tobita et al. 2012).

Hlavní výhodou kmenových buněk z tukové tkáně (ASC) oproti ostatním typům MSC je jejich vysoká výtěžnost. V tkáni kostní dřeně je frekvence výskytu kmenových buněk odhadována na jednu kmenovou buňku na padesát tisíc buněk, u dospělých až na jednu na

milion buněk. U ASC se poměr kmenových buněk odhaduje na rozmezí jedna kmenová buňka na třicet buněk až tisíc buněk tukové tkáně. Primárním zdrojem ASC je podkožní tuková tkáň, která je dobře dostupná, a proto proces získávání ASC není tolik invazivní jako v případě BMSC. ASC také prokazují vysokou míru proliferace, čas zdvojení jejich populace se pohybuje okolo 28 hodin, zatímco u BMSC je to 39 hodin. Další výhodou ASC je jejich vysoký diferenciační potenciál. Souhrn těchto vlastností dělá z ASC ideální kandidáty pro potřeby tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny, buňky mohou být bezpečně a účinně transplantovány do autologního nebo alogenního hostitele (Muschler, Nitto et al. 2001, Mitchell, McIntosh et al. 2006).

Přesná lokalizace ASC *in vivo* je kvůli nedostatku specifických markerů předmětem dalšího zkoumání. V současné době se předpokládá, že ASC jsou lokalizovány v perivaskulární nise. V nediferencovaném stavu vykazují ASC přítomnost markerů CD29, CD44, CD73 a CD90, které mají společné s BMSC. Na rozdíl od BMSC exprimují v nízkých pasážích CD34 a CD36, a s průběhem kultivace exprese těchto markerů klesá. Jako multipotentní buňky jsou schopné diferenciovat do kostní, chrupavčité a tukové tkáně. Popsána byla také jejich diferenciaci do hladké svaloviny, endotelu, epitelové a nervové tkáně (Obrázek 3) (Shi and Gronthos 2003, Crisan, Yap et al. 2008).

ASC ovlivňují buňky ve svém okolí parakrinní signalizací. Do svého okolí uvolňují růstové faktory jako platelet derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF), fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), brain derived neurotrophic growth factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF), dále protizánětlivé interleukiny IL 4, IL 10 a IL13 a prostaglandin E2. Schopnosti parakrinní signalizace ASC se využívá při buněčné terapii, neboť jejich transplantace může urychlit hojení a regeneraci poškozené tkáně. Zároveň mohou ASC přitahovat okolní buňky a tím podpořit remodelaci tkáně (Salgado, Reis et al. 2010, Pinheiro, de Queiroz et al. 2012).



Obrázek 3: Schéma diference ASC

ASC izolované z tukové tkáně mají schopnost diference do několika buněčných linií. Hlavní z nich jsou zobrazeny na schématu. Převzato a upraveno podle (Toyserkani, Christensen et al. 2015)

2.2.3 Hladká svalovina

Hladká svalovina je jedním ze tří typů svaloviny vyskytující se v lidském těle. Jde o kontraktilní tkáň, která se nejčastěji vyskytuje ve stěnách orgánů vaskulárního, gastrointestinálního, vylučovacího, rozmnožovacího a dýchacího systému. Buňky hladké svaloviny (SMC) mají specializované funkce odpovídající tkáni, ve které se vyskytují. Rychlost kontrakce, její síla, délka a spotřeba energie se u jednotlivých orgánů liší. SMC ve stěnách dutých orgánů jsou schopné svojí kontrakcí a relaxací měnit jejich průměr, což umožňuje vytvářet tlak a pohybovat jejich obsahem. Vyskytují se také v oku, kde upravují tvar čočky a průměr zornice, nebo u vlasových folikul, které kotví do okolní tkáně (Prosser 1982).

SMC mají vřetenovitý tvar, jejich délka se liší v závislosti na tkáni, ve které se vyskytují, může se pohybovat od 20 μm do 500 μm . Buňka obsahuje protáhlé jádro a kontraktilní aparát ve formě funkční sítě strukturních a kontraktilních filamentárních proteinů

napojených na denzní tělíska. Kontraktilní složku tvoří aktinová filamenta a myosinová vlákna, strukturní je tvořena intermediálními filamenty. Kromě funkce strukturní opory jsou intermediální filamenta důležitá pro mechanotransdukcii, kdy mechanická stimulace vyvolává biologickou odpověď. Denzní tělíska jsou lokalizována buď volně v cytoplazmě nebo na membráně. Obsahují velké množství α -aktininu a mají obdobnou funkci jako Z-linie kosterní svaloviny. Membránová denzní tělíska se mohou propojit s denzními tělísky na okolních buňkách za vzniku denzního spoje. Tyto denzní spoje jsou odpovědné za přenos síly z jedné buňky na druhou, pokrývají až 50% povrchu SMC. SMC jsou dále propojeny adhezivními a vodivými spoji, které propojují cytoplazmy jednotlivých buněk a umožňují mezi nimi přenos signálu (Lehman and Morgan 2012).

Za kontrakce hladké svaloviny je zodpovědný aktino-myosinový komplex. Aktinová vlákna se skládají z globulárních aktinových monomerů. Rozeznáváme tři izoformy aktinu, a sice α -aktin, přítomný hlavně ve svalech, kde spolu s γ -aktinem tvoří kontraktilní vlákna, a β -aktin, vyskytující se především v prostoru pod buněčnou membránou, a přítomný i u nesvalových buněk. Myosiny jsou proteiny řazené mezi molekulární motory. V současné době rozeznáváme 18 tříd myosinů, které se od sebe liší velikostí globulární domény a počtem lehkých a těžkých řetězců. Myosiny jsou často regulované přítomností vápenatých iontů. Nevíce zastoupeným myosinem v hladkosvalových buňkách je myosin II. Jde o hexamer tvořený dvěma těžkými řetězci a čtyřmi lehkými řetězci. Těžké řetězce se skládají ze tří domén – head domény, která obsahuje vazebné místo pro aktin a hydrolyzu ATP, neck domény, která spojuje head doménu s tail doménou. Tail doména obsahuje coiled-coil oblast, která interaguje s dalšími myosiny (Webb 2003, Syamaladevi, Spudich et al. 2012)

Vznik kontrakce závisí na navázání příslušných agonistů na receptory SMC. Navázáním ligandu na receptor spřažený s G-proteinem se receptor aktivuje, následně dojde k výměně GDP za GTP na α podjednotce a její disociaci od β a γ podjednotek. Uvolněná α podjednotka difunduje po membráně a může aktivovat fosfolipázu C. Fosfolipáza C štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ a DAG jsou druzí poslové. IP₃ se váže na receptory sarkoplazmatického retikula a způsobuje vyjití vápenatých iontů do cytosolu. DAG spolu s vápenatými ionty aktivuje proteinkinázu C, která se podílí na fosforylaci vápenatých kanálů a zpětnou vazbou stimuluje tvorbu dalšího DAG. Vápenaté ionty se váží na calmodulin, který aktivuje MLCK kinázu, která fosforyluje lehký řetězec myosinu a stimuluje ATPázovou aktivitu myosinu. energii uvolněnou hydrolyzou ATP využívá myosin k pohybu po aktinových vláknech. Výsledkem je kontrakce svalové buňky (Stull, Tansey et al. 1993, Kim, Lee et al. 2013).

2.2.4 Diferenciace buněk hladké svaloviny

Buněčná diferenciace je proces vzniku rozdílných typů buněk (specializace buněk), který se většinou odehrává na pozadí proliferace diferencujících se buněk. Během diferenciace dochází ke změnám genové exprese. Důležitým faktorem je buněčná paměť – po odeznění signalizace pro diferenciaci zůstávají buňky diferencované, jsou schopné dále diferencovat a předávají tuto informaci na své potomstvo. Diferenciace je důležitým procesem během ontogeneze a při obnově tkání a orgánů. Proces diferenciace je regulován růstovými faktory, které jsou schopné diferenciaci navodit i zablokovat. Růstové faktory nepůsobí samostatně; pokud chceme navodit diferenciaci směrem k určitému buněčnému typu, musíme zvolit jejich vhodnou kombinaci (Xie, Zhang et al. 2007, Hill, Obrtlíkova et al. 2010).

Samotnou diferenciaci můžeme hodnotit podle markerů diferenciace – proteinů specifických pro daný buněčný typ. U SMC jsou to hladkosvalový α -aktin, SM22 α , myocardin, h1-calponin, h-caldesmon, SM myosin heavy chain (isoformy 1 a 2) a smoothelin. Podle stupně diferenciace, ve kterém se objevují, je rozlišujeme na časně, střednědobé a pozdní (Tabulka 1).

Hladkosvalový α -aktin je nejvíce zastoupená isoforma aktinu v diferencovaných SMC. Dříve se předpokládalo, že se vyskytuje pouze v hladké svalovině, dnes je známo, že se vyskytuje i v jiných buněčných typech, například v myofibroblastech. Jeho přítomnost tak není přímým důkazem výskytu SMC. H1-calponin je protein interagující s aktinovými filamenty, a jeho exprese byla pozorována pouze u SMC. SM22 α je protein strukturně podobný calponinu. Uvádí se, že hraje roli v kontrakci SMC nezávislé na vápníku, a rovněž usnadňuje seskupování aktinových filament do svazků, čímž zvyšuje kontraktilitu SMC a udržuje kontraktilní fenotyp těchto buněk. Caldesmon se vyskytuje ve dvou isoformách; 1-caldesmon a h-caldesmon. H-caldesmon je protein, který se váže na aktin a tropomyosin a je specifický pro SMC. Pozdní markery hladkosvalové diferenciace, a sice těžký řetězec myosinu a smoothelin, se vyskytují v obou případech ve dvou isoformách, tedy SM myosin heavy chain 1 a 2 a smoothelin A a B, přičemž smoothelin A je typický pro viscerální SMC, kdežto smoothelin B pro vaskulární SMC. Smoothelin je protein asociován se stresovými vlákny. Tyto markery pozorujeme u kontraktilních, plně diferencovaných SMC. Kromě plně diferencovaného kontraktilního fenotypu pozorujeme také méně vyzrálý proliferací fenotyp SMC. (Li, Miano Joseph et al. 1996, Rush, Tan et al. 2001).

Časné markery	α -aktin, SM22 α , myocardin
Střednědobé markery	h1-calponin, h-caldesmon
Pozdní markery	SM myosin heavy chain (isoformy 1 a 2), smoothelin (isoforma B)

Tabulka 1: Markery diferenciacie VSMC

Vytvořeno podle (Bacakova, Trávníčková et al. 2018)

Jako reakce na mechanické či biochemické poškození hladkosvalové tkáně může docházet k dediferenciaci z kontraktálního fenotypu na takzvaný fenotyp syntetický, který je charakterizován i vysokou migrační a proliferační aktivitou buněk. Během procesu dediferenciacie dochází k obnovení buněčného cyklu, zvýšení míry proliferace, migraci buněk a snížení exprese kontraktálních SMC markerů. SMC v proliferačním fenotypu produkují složky ECM, hlavně kolagen a elastin.

Jedním z faktorů ovlivňující diferenciaci hladkosvalových progenitorů a proliferačních SMC na kontraktální SMC je jejich kultivace spolu s endoteliálními buňkami, které jsou schopné navodit jejich diferenciaci a udržovat je v diferencovaném stavu, například pomocí produkce sulfatovaných glykosaminoglykanů podobných heparinu.

V souvislosti s diferenciací na kontraktální fenotyp SMC bylo popsáno několik molekul a signalizačních kaskád, které tuto diferenciaci podporují. Důležitou molekulou pro diferenciaci SMC je transforming growth factor β (TGF- β), který se využívá i při navozování diferenciacie z ASC. TGF- β je růstový faktor, který aktivuje TGF- β receptory, což jsou heteromerní serin/threonin kinázové receptory. TGF- β se váže na dimer TGF- β receptorů typu II, a tento komplex pak rekrutuje dimer TGF- β receptoru typu I. Receptorový komplex se následně fosforyluje a aktivuje proteiny Smad 2 a Smad 3. Ty vytvářejí komplex s proteinem Smad 4, který translokuje do jádra, kde funguje jako transkripční faktor. Interaguje s promotory SMC specifických genů a navozuje jejich expresi. U SMC byla popsána interakce Smad 3 s proteinem δ EF1; tento komplex se váže na oblast promotoru pro α -aktin a zvyšuje jeho expresi. Signalizace TGF- β vede také k aktivaci p38, čímž reguluje průchod buněčným cyklem a zastavuje proliferaci SMC. Signalizace TGF- β vede k zvýšení hladiny transkripčního faktoru serum response factor (SRF), ač přesný mechanismus tohoto procesu není znám. SRF se podílí na zvýšení exprese α -aktinu (Garat, Van Putten et al. 2000, Qiu, Ritchie Raquel et al. 2005).

K zvýšení exprese markerů diferenciacie SMC rovněž došlo zablokováním signalizační dráhy spojené s mTOR. Součástí této signalizační dráhy je kináza S6K1, která inhibičně

fosforyluje IRS-1, tedy komponentu IGF-I signální dráhy. Použití inhibitoru rapamycinu dojde k zablokování mTOR dráhy, IRS-1 není inhibován a může aktivovat PI3K, a tím proteinkinázu B, která aktivuje transkripční faktory. Pozorovaným výsledkem zablokování mTOR signalizace bylo zvýšení exprese markerů SM myosin heavy chain a h1-calponinu (Tremblay and Marette 2001).

Diferenciace SMC je ovlivňována také Notch signální dráhou. SMC nejvíce exprimují receptor Notch3, po jehož interakci s ligandem (v tomto případě transmembránovým proteinem) dojde k proteolytickému štěpení receptoru, uvolnění intracelulární domény a její translokaci do jádra, kde interaguje s regulátorem transkripce RBPJ. RBPJ se může vázat do promotorových oblastí genu pro α -aktin a zvyšovat jeho expresi (Li, Zhang et al. 2009).

Popsána byl také účinek transfekce kináz PKG-I α a PKG-I β , která vedla k navození diferenciace na kontraktilní fenotyp, kdy v buňkách došlo k zvýšení exprese molekul SM myosin heavy chain 2 (Boerth, Dey et al. 1997).

Diferenciace SMC je významně ovlivňována rovněž mechanickou zátěží buněk. Většina buněčných typů, do kterých ASC diferencují, je vysoce mechanosenzitivní. Buňky jsou schopné reagovat na mechanické síly pomocí mechanosenzitivních receptorů a přetvářet je procesem mechanotransdukce na biochemické signály. Smyslem aplikace mechanické zátěže během *in vitro* kultivace je snaha napodobit fyziologické podmínky, kterým jsou buňky v těle vystaveny. Za tímto účelem se využívá bioreaktorů (dynamických systémů), které mohou buňky mechanicky zatěžovat různými způsoby (Huang and Niklason 2014).

Pro experimentální část této práce byl využit vlastní dynamický systém, který kombinuje vlastnosti komerčně využívaných systémů. Kromě zajišťování ideální teploty, tlaku, vlhkosti a mechanické zátěže, udržuje sterilní prostředí pro kultivaci buněk. Celý proces kultivace je možné pozorovat pomocí metody live cell imaging (Obrázek 5).

Při kultivaci *in vitro* můžeme aplikovat několik druhů mechanické zátěže. Patří mezi ně tenzní zátěž, kdy je vzorek osazený buňkami natahován. V těle je takové zátěži vystavena například svalová, kostní nebo pojivová tkáň a kůže. Další možností je kompresní zátěž, kdy síla působí proti vzorku, a ten je stlačován. Kompresní zátěži je v těle vystavena například kostní dřevina. Na buňky může působit smykové napětí; způsobeno je nejčastěji pohybem tekutiny okolo povrchu buňky (Pedersen and Swartz 2005, Gurkan and Akkus 2008).

Mechanismy mechanotransdukce zahrnují mechanicky ovládané iontové kanály, receptory spojené s G-proteiny, nebo senzory jako cilie. Cilie jsou orgány tvořené

z mikrotubulů; předpokládá se, že na svém povrchu mají receptory citlivé k pohybu okolních tekutin.

Důležitou roli v procesu mechanotransdukce hrají integriny. Integriny jsou transmembránové proteiny, které spojují buněčný cytoskelet s ECM. Po vazbě na ligandy vyskytující se v ECM, například na specifické aminokyselinové sekvence v proteinech ECM, jako je RGD, se integriny sdružují do útvarů zvaných fokální adheze. Vazby integrinů na ligandy odolávají vnějším silám a umožňují přenos těchto sil z vnějšího prostředí na cytoskelet, který se tak deformuje. Jako odpověď na deformaci cytoskeletu dochází k jeho přestavbě, která vede ke změně tvaru buněk a změně jejich orientace k ose působící zátěže.

V oblastech fokálních adhezí dochází k aktivaci FAK kinázy, a tato aktivace vede ke spuštění kaskády aktivující ERK kinázy, které fosforylací aktivují Elk-1. Elk-1 může aktivovat SRF, který navozuje expresi proteinů specifických pro SMC. (Hirst, Twort et al. 2000).

Jednou z popsaných signalizačních drah aktivovaných mechanickou zátěží vedoucích k diferenciaci SMC je dráha, které se účastní malé GTPázy Rho. Při působení mechanické zátěže na buňku dochází k aktivaci RhoA, která aktivuje ROCK kinázu. Ta může fosforylovat LIM kinázu, která fosforyluje protein cofilin. Cofilin je protein, který se váže na aktin a podporuje rozpad aktinových vláken. Cofilin ve fosforylované formě ztrácí schopnost vázat se na aktin. V takovém případě jsou vlákna aktinu stabilizována a v buňce se zvyšuje míra filamentárního aktinu. Tato změna poměru globulárního a filamentárního aktinu vede k zvýšení aktivity SRF. SRF působí v jádře jako transkripční faktor a zvyšuje expresi hladkosvalového α -aktinu. Použitím ROCK kinázového inhibitoru Y27632 došlo v diferencujících ASC ke snížení produkce markerů SMC α -aktinu, SM22 α a h1-calponinu (Miralles, Posern et al. 2003).

Mnoho dalších studií potvrzuje pozitivní vliv mechanické zátěže na diferenciaci kmenových buněk do buněk hladké svaloviny. Popsán byl vliv mechanické zátěže s frekvencí 1 Hz po dobu 7 dnů v kombinaci s TGF β na zvýšení exprese α -aktinu, SM22 α a h1-calponinu. Během mechanické stimulace se měnila orientace buněk k ose stimulace až o 90°, což odpovídá *in vivo* orientaci buněk v cévách. Popsán byl také nárůst markerů α -aktinu, h1-calponinu a MHC při zátěži s frekvencí 0,1 Hz a 1 Hz. Kontrolní vzorek nebyl vystaven mechanické zátěži, produkce markerů SMC u něj nebyla pozorována (Reusch, Wagdy et al. 1996, Ghazanfari, Tafazzoli-Shadpour et al. 2009, Huang, Jia et al. 2010).

Ve většině případů nejsou mechanismy působení mechanické zátěže na buněčnou diferenciaci podrobně prozkoumány; tento fenomén je předmětem dalšího výzkumu.

3 Cíle práce

- Nalézt optimální dynamické podmínky potřebné pro diferenciaci kmenových buněk z tuku na hladké svalové buňky
- Analyzovat stupeň jejich diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám pomocí specifických markerů diferenciaci hladkých svalových buněk
- Analyzovat produkci extracelulární matrix

4 Materiál a metody

4.1 Buňky

Pro studium vlivu mechanické zátěže na diferenciaci do hladké svaloviny byly použity lidské a prasečí ASC. Lidské ASC byly získány izolací z lipoaspirátů podkožního tuku z břišní oblasti, odebraných pacientům po jejich informovaném souhlasu a souhlasu etické komise na Klinice plastické chirurgie nemocnice Na Bulovce, Praha (ve spolupráci s dr. Martinem Molitorem). Izolace ASC z lipoaspirátů byla provedena spolupracovníky na Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR modifikovanou metodikou podle autorů Estes a Diekman (Estes, Diekman et al. 2010). Používané buňky byly z několika nezávislých odběrů od pacientek ve věku kolem 40 let, nekuřáček a bez interkurentních chorob (Przekora, Vandrovceva et al. 2017).

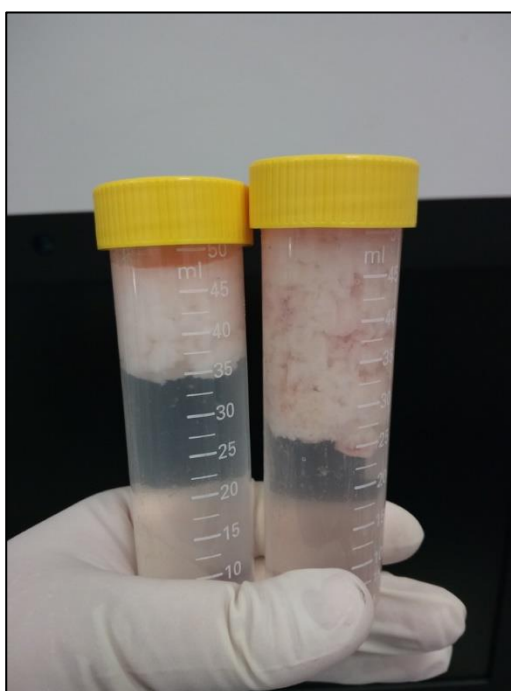
Prasečí ASC byly získány izolací z krční tukové tkáně dvou šestiměsíčních prasat, jejíž explantace byla zajištěna spolupracovníky Centra Experimentální Medicíny IKEM. Jednalo se o dva nezávislé odběry. Buňky byly kultivovány v proliferačním médiu na bázi Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) v 75 cm² plastových kultivačních lahvích (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), a v inkubátoru IncuSafe CO₂ Incubator (PHCBI, Nijverheidsweg 120, Nizozemsko) při 37°C, v atmosféře obsahující 5% CO₂. V tomto prostředí byly buňky inkubovány přibližně 48 až 72 hodin, a jakmile dosáhly 90% až 95% konfluence, byly pasážovány.

4.1.1 Pasážování

Z kultivačních lahví bylo ve sterilním laminárním boxu odsáto médium a vrstva buněk byla dvakrát opláchnuta 5 ml sterilního fyziologického roztoku pufovaného fosfáty (PBS), ohřátého na teplotu 37°C. Buňky byly následně inkubovány přibližně 60 sekund v 3 ml 0,25% trypsinu s EDTA v PBS při teplotě 37°C. Po uvolnění buněk byl trypsin inaktivován 9 ml média s obsahem 10% FBS, celý obsah kultivační lahve byl několikrát promíchán pipetou a následně přemístěn do 15 ml centrifugační zkumavky. Buňky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 1340 rpm. Tekutá frakce byla z centrifugační zkumavky odsáta a buněčná peleta resuspendována v 5 ml média. Buněčná suspenze byla následně pipetou přenesena do nových 75 cm² kultivačních lahví.

4.1.2 Izolace prasečích ASC

Explantovaná tuková tkáň se mechanicky rozvolnila rozstříháním, a následně byla přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky a zalita fyziologický roztokem (Sysmex, Praha, Česká Republika). Po promíchání se oddělila vrstva lipoaspirátu, spodní vrstva fyziologického roztoku s krví byla odsáta injekční stříkačkou s jehlou. K lipoaspirátu bylo přidáno stejné množství PBS (1:1), obsah byl protřepán a po oddělení lipoaspirátu byla odsáta spodní část PBS. Tento promývací krok byl opakován nejméně pětkrát, dokud nebyla spodní část s PBS čirá.



Obrázek 4: Izolace prasečích ASC

Svrchní vrstva lipoaspirátu a čirá spodní vrstva PBS po opakovaném promytí.

Promytý lipoaspirát byl následně přidán do roztoku PBS obsahujícího 1% BSA a 0,1 % kolagenázy I (Sigma-Aldrich) v poměru 1:1. Směs byla následně inkubována na třepačce po dobu 90 minut při 300 RPM a 37°C. Homogenní směs byla poté centrifugována 5 minut, při 300 g a 21°C, po centrifugaci promíchána opakovaným otočením a znovu centrifugována za stejných podmínek. Následně byl odsán supernatant, ponechána byla pouze stromální vaskulární frakce, která byla následně přenesena pipetou do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky obsahující připravené proliferační médium (viz 4.2 Statická kultivace buněk). V něm byla centrifugována 5 minut, při 300 g a 21°C. Následně byl odsán supernatant,

přidáno 5 ml média a směs byla přes 100 µl buněčný filtr (Sigma-Aldrich) přefiltrována do sterilní centrifugační zkušavky. Následně byla buněčná suspenze naředěna na požadovaný objem a přenesena pipetou do 75cm² kultivačních lahví.

4.2 Statická kultivace buněk

Buňky byly kultivovány za standardních podmínek v inkubátoru při 37°C a v atmosféře obsahující 5% CO₂. Použity byly tři typy nosičů – sklo upravené metodou plasma cleaning (metoda je podrobně popsána v kapitole 4.4.2), sklo s vrstvou fibrinu a volný decelularizovaný perikard. Buňky na plazmovaných sklech a sklech s vrstvou fibrinu byly kultivovány v 24-jamkových destičkách, buňky na decelularizovaném perikardu v 6-jamkových destičkách (oboje od firmy TPP). Buněčná násada na oba typy skla byla 30 tis.b./cm², u buněk na nasazených na perikard 75 tis.b./cm². Pro kultivaci byla použita dvě následující rozdílná média.

Proliferační médium obsahující:

- DMEM (Sigma-Aldrich)
- 1% penicilin (Sigma-Aldrich)
- 1% streptomycin (Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US)
- FGF2 (10 µg/µl, Sigma-Aldrich)

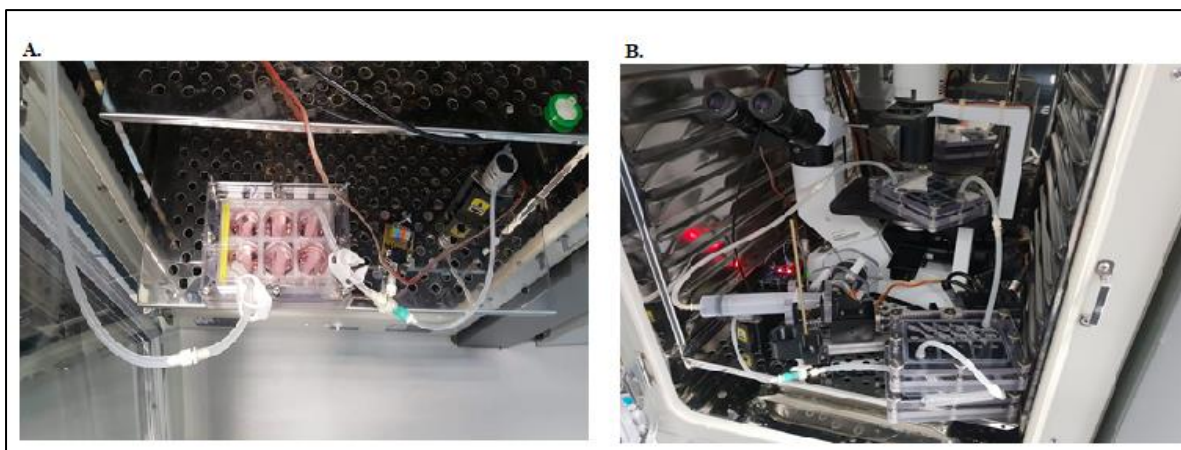
Diferenciační médium obsahující:

- DMEM (Sigma-Aldrich)
- 1% penicilin (Sigma-Aldrich)
- 1% streptomycin (Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- 10% FBS (Thermo Fisher Scientific)
- TGFβ (2.5ng/ml, Sigma-Aldrich)
- BMP4 (2.5ng/ml, Sigma-Aldrich)
- Vitamin C (50 µg/ml, Sigma-Aldrich)

4.3 Optimalizace dynamické kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v bioreaktoru v 6-jamkových a 24-jamkových destičkách v inkubátoru při 37°C, v atmosféře obsahující 5% CO₂. Použity byly tři typy nosičů – sklo upravené metodou plasma cleaning, sklo s vrstvou fibrinu a volný decelularizovaný perikard. Buňky na plazmovaných sklech a sklech s vrstvou fibrinu byly kultivovány v 24-jamkových destičkách, buňky na decelularizovaném perikardu v 6-jamkových destičkách (oboje od firmy TPP). Destičky byly umístěny do bioreaktorů zajišťujících mechanickou zátěž. Bioreaktor byl napojen na čerpadlo systémem hadic, jejich průchodnost byla ovladatelná kleštinovými ventily, které byly umístěny vně celého systému a nemohly tak toxicky ovlivňovat buněčný materiál. Bioreaktor byl vybaven vlastním těsněním, které zajišťovalo sterilní prostředí. V prvotních pokusech byla aplikována mechanická zátěž v hodnotách 130/80 mmHg, 120/70 mmHg a 110/80 mmHg, při frekvenci 1 Hz, použitá buněčná násada byla 100 tis.b./cm² a 75 tis.b./cm². Následně byla mechanická zátěž snížena na optimální hodnotu 100/80 mmHg, frekvence 1 Hz, buněčná násada pro oba typy skla byla snížena na 30 tis.b./cm². U buněk nasazených na perikard byla buněčná násada 75 tis.b./cm². Pro kultivaci bylo použito diferenciační médium obsahující:

- DMEM (Sigma-Aldrich)
- 1% penicilin (Sigma-Aldrich)
- 1% streptomycin (Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- 10% FBS (Thermo Fisher Scientific)
- TGFβ (2.5ng/ml, Sigma-Aldrich)
- BMP4 (2.5ng/ml, Sigma-Aldrich)
- Vit C (50 µg/ml, Sigma-Aldrich)



Obrázek 5: Dynamický kultivační systém

Buňky umístěné na decelularizovaný perikard byly inkubovány v 6-jamkových kultivačních destičkách (A). Buňky umístěné na plazmované sklo a sklo s fibrinem byly inkubovány v 24-jamkových kultivačních destičkách (B). Destička byla umístěna do bioreaktoru, systémem hadic napojeného na čerpadlo, které pulzováním zprostředkovává mechanickou zátěž. Ta je dále zprostředkována pohybem silikonové membrány, působícím na buňky. Stavba bioreaktoru umožňuje pozorování buněk mikroskopem v reálném čase (B) v inkubátoru během kultivace.

4.4 Úprava nosičů

4.4.1 Postupná decelularizace

Nativní prasečí perikard byl mechanicky očištěn od tukové tkáně a byl upraven na velikost o rozměrech 7 x 10 cm. Tkáň perikardu byla následně umístěna a přišita do decelularizační komory (Obrázek 6). Komora byla umístěna v inkubátoru s teplotou 37°C a s atmosférou obsahující vzduch a 5% CO₂. Tkáň byla promývána 0,5% SDS v šesti desetiminutových cyklech a proplachována destilovanou vodou (dH₂O) v pěti pětiminutových cyklech. V 60 ml pufru bylo rozpuštěno 0,5 mg DNazy I (Sigma-Aldrich). Tkáň byla následně promývána DNazovým roztokem, čas recirkulace byl dvacet minut.

DNazový pufr obsahoval:

- TRIS-HCl (100 mM, pH 7.5, Bio-Rad)
- MgCl₂ (25 mM)
- CaCl₂ (1 mM)

Finální proplach dH₂O byl ve sto dvaceti desetiminutových cyklech. Tkáň byla sterilizována v 70% etanolu po dobu jedné hodiny. Následně byla proplachována v PBS na třepačce po deset hodin. Nakonec byla přemístěna do sterilního PBS.



Obrázek 6: Decelularizační komora

Nativní perikard uchycen do decelularizační komory, ve které probíhá postupná decelularizace.

4.4.2 Úprava skla

Plazmovaná skla byla upravena metodou „plasma cleaning“ v přístroji Femto plasma cleaner (Diener electronic GmbH, Ebhausen, Německo) za následujících podmínek: 60% výkon, průtok 0,75 nl/hod, čas 20 minut.

Skla s vrstvou fibrinu byla vytvořena podle upraveného protokolu obsaženého ve studii z roku 2012 (Kolehmainen and Willerth 2012). Skla byla ponořena na 60 minut do roztoku fibrinogenu rozpuštěném v TRIS-HCl (10 μ g/ml, Sigma-Aldrich). Následně byla skla 2x opláchnuta TRIS-HCl (Sigma-Aldrich). Fibrinogen byl aktivován ponořením skla na 15 minut do roztoku trombinu rozpuštěném v TRIS-HCl (2,5 U/ml, Sigma-Aldrich). Následně byla skla 2x opláchnuta TRIS-HCl (Sigma-Aldrich). Dalším krokem bylo ponoření skla na 60 minut do roztoku fibrinogenu rozpuštěném v TRIS-HCl (400 μ g/ml, Sigma-Aldrich) a antitrombinu III (0,5U/ml, Chromogenix, Milán, Itálie) rozpuštěném v destilované vodě. Následně bylo sklo 2x opláchnuto PBS.

4.5 Imunofluorescenční barvení

4.5.1 Imunofluorescenční barvení markerů diferenciac

Imunofluorescenční barvení markerů diferenciac VSMC bylo prováděno na fixovaných buňkách nasazených na plazmované sklo, sklo s vrstvou fibrinu a decelularizovaný perikard po třech a sedmi dnech kultivace. Pro jednotlivé markery byly v každém intervalu barveny tři vzorky. Vzorky byly před barvením promyty PBS a fixovány v metanolu s teplotou -20°C po dobu 20 minut. Případná nespecifická vazba protilátek byla blokována inkubací v PBS s 1% BSA a 1% Tweenu 20 po dobu 60 minut. Vzorky byly následně promyty čistým PBS a inkubovány přes noc v primární protilátce ředěné v roztoku PBS obsahujícím 1% BSA a 0,1% Tween 20. Použita byly protilátka proti α -aktinu (myší, Thermo Fisher Scientific) ředěná v poměru 1:100, dále protilátka proti h1-calponinu (myší, Thermo Fisher Scientific) ředěná v poměru 1:200, a protilátka proti SM myosin heavy chain (myší, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) ředěná v poměru 1:100. Po inkubaci v primární protilátce byly vzorky dvakrát propláchnuty PBS a následně inkubovány v sekundární protilátce po dobu jedné hodiny. Použité sekundární protilátky proti myším protilátkám byly: protilátka izolovaná z kozy konjugovaná s Alexa Fluor 488 (zelená fluorescence, Abcam, Cambridge, UK) a protilátka izolovaná z králíka konjugovaná s Alexa Fluor 647 (červená fluorescence, Thermo Fisher Scientific). Sekundární protilátky byly ředěny v roztoku PBS obsahujícím 1% BSA v poměru 1:400. Jádra buněk byla barvena barvivem DAPI (modrá fluorescence, Thermo Fisher Scientific) ředěným v PBS v poměru 1:1000.

4.5.2 Imunofluorescenční barvení kolagenu I a fibronektinu

Imunofluorescenční barvení kolagenu I a fibronektinu bylo prováděno na fixovaných buňkách nasazených na plazmované sklo a sklo s vrstvou fibrinu po třech dnech kultivace. Imunofluorescenční barvení kolagenu I na decelularizovaném perikardu bylo provedeno po třech a sedmi dnech kultivace. V každém intervalu barveny tři vzorky. U všech nosičů bylo použito podobného postupu jako při barvení markerů diferenciac: vzorky byly před barvením promyty PBS a fixovány v etanolu s teplotou -20°C po dobu 20 minut. Nespecifická vazba byla blokována inkubací v PBS, obsahujícím 1% BSA a 1% Tween 20, po dobu 60 minut. Vzorky byly následně promyty čistým PBS a inkubovány přes noc v

primární protilátce proti kolagenu (myší protilátka, Sigma-Aldrich) nebo proti fibronektinu (králičí protilátka, Abcam). Protilátky byly ředěny v roztoku PBS obsahujícím 1% BSA a 0,1% Tween 20. Následně byly vzorky dvakrát propláchnuty PBS. Sekundární protilátka proti myší primární protilátce byla izolována z kozy a konjugována s Alexa Fluor 488 (zelená fluorescence, Abcam), sekundární protilátka proti králičí primární protilátce byla izolována z kozy a konjugována s Alexa Fluor 647 (červená fluorescence, Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly inkubovány v sekundárních protilátkách po dobu jedné hodiny, a následně 2x promyty čistým PBS. Jádra buněk byla dobarvena barvivem DAPI (modrá fluorescence, Sigma-Aldrich) ředěným v PBS v poměru 1:1000.

Protilátka	Výrobce	Katalogové číslo #	Zdroj	Typ
α -SMA	Thermo Fisher	14-9760-82	Myš	monoklonální
α -SMA	Abcam	ab5694	Králík	polyklonální
CALP	Abcam	ab46794	Králík	monoklonální
COL-1	Sigma-Aldrich	C2456	Myš	monoklonální
FN1	Abcam	ab23750	Králík	polyklonální
MYH11	Santa Cruz	sc-6956	Myš	monoklonální
anti-mouse	Abcam	ab150113	Koza	polyklonální, konjugovaná s Alexa 488
anti-rabbit	Thermo Fisher	A27040	Koza	polyklonální, konjugovaná s Alexa 647

Tabulka 2: Seznam protilátek.

4.6 Mikroskopie

Fluorescenční fotografie byly pořízeny na třech typech mikroskopů. Produkce markerů diferenciaci a kolagenu I u ASC inkubovaných na skle s fibrinem a na decelularizovaném perikardu byla snímána pomocí konfokálních mikroskopů Leica TCS SP8 WLL MP (objektiv x20, vodní imerze) a Carl Zeiss LSM 880 NLO (objektiv x20, vodní imerze a objektiv x40, olejová imerze). Produkce markerů v buňkách na plazmovaných sklech a postupná decelularizace perikardu byla snímána na fluorescenčním mikroskopu Leica DMI8 S (objektiv x10). Snímky z každé sady byly fotografovány se stejným nastavením expozice. Pro úpravu fotografií byl použit software ZEISS ZEN – Digital Imaging for Light Microscopy a Leica LAS X.

4.7 Elektroforéza SDS PAGE

4.7.1 Příprava buněčného lyzátu

Pro přípravu lyzátu z buněčných vzorků na skle s vrstvou fibrinu byl použit následující postup:

Ze vzorků bylo odsáto médium a fibrinová vrstva s buňkami byla třikrát propláchnuta v PBS. Po proplachu byl do jamky s buňkami přidán roztok RIPA pufru s blokátory proteáz a fosfatáz (Thermo Fisher Scientific) vychlazený na 4°C. Buněčný materiál byl následně seškrabán ze dna jamky a pipetou přenesen do zkumavky. Obsah zkumavky byl homogenizován promícháním pipetou. Zkumavka byla následně inkubována na ledu po dobu 30 minut. Obsah byl následně centrifugován po dobu 15 minut, při 14000 g při 4°C. Supernatant byl po centrifugaci přemístěn do nové zkumavky. Na analýzu každého intervalu bylo použito pět vzorků.

4.7.2 Příprava gelů

Pro přípravu 10% akrylamidových gelů bylo použito následujícího složení:

Stacking gel:

- dH₂O
- 40% akrylamid (Bio-Rad)
- TRIS-HCl, pH 6,8 (Bio-Rad)
- 10% SDS (Sigma-Aldrich)
- 10% APS (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Bio-Rad)

Separální gel:

- dH₂O
- 40% akrylamid (Bio-Rad)
- TRIS-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad)
- 10% SDS (Sigma-Aldrich)
- 10% APS (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Bio-Rad)

4.7.3 SDS PAGE

Vzorky v lyzačním roztoku byly naředěny na požadovanou koncentraci proteinu (100 µg/ml) smícháním s 2x Laemmliho vzorkovým pufrém (Bio-Rad) obsahujícím:

- 10% 2-mercaptotanol
- 20% glycerol
- 4% SDS
- 0.02% bromfenolová modř
- TRIS-HCl, pH 6,8

Takto připravené vzorky byly promíchány vortexem a následně vařeny po dobu 5 minut při 95°C. Následně byly aplikovány do jamek v gelu na sestavené aparatuře Criterion™ (Bio-Rad, USA). Do prázdných jamek bylo nanášeno barvivo s RIPA (poměr 1:1). Elektroforetický pufr byl nalit do vnější nádoby. Následně byl zapnut zdroj, aplikované napětí bylo 90 V prvních 10 minut, následně 120 V do konce analýzy.

Elektroforetický pufr obsahoval:

- TRIS (25 mM, Bio-Rad)
- Glycin (190 mM, Sigma-Aldrich)
- 0.1% SDS (Sigma-Aldrich)

4.7.4 Western Blot

Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána byla aktivována namočením v 100% metanolu. Následně byla omyta dH₂O a ponořena do transferového pufru (25 mM TRIS, 190 mM glycin). Pod membránou byl umístěn filtrační papír. Separační gel byl omyt v dH₂O a ponořen do transferového pufru na PVDF membránu. Na vrchní část gelu byl umístěn filtrační papír. Filtrační papíry, PVDF membrána a gel byly uzavřeny v elektroforetické aparatuře, která byla umístěna na ledu. Po zapnutí zdroje bylo aplikováno napětí 20 V přes noc. Po rozebrání aparatury byla membrána ponořena na 2 minuty do metanolu, následně byla omyta v dH₂O. Následně byla barvena 0,05% Ponceau v 5% kyselině octové po dobu 30 minut. Po barvení byla membrána promyta v dH₂O. Blokování bylo provedeno v 5% roztoku mléka po dobu jedné hodiny. Pro barvení byly použity primární protilátky (Tabulka 2) ředěné v roztoku PBS obsahujícím 1% BSA a 0,1% Tween 20. Barvení probíhalo přes noc, membrána byla následně omyta PBS. Sekundární protilátky (Tabulka 2) byly ředěny

v roztoku PBS obsahujícím 1% BSA, doba barvení byla 60 minut. Membrána byla následně omyta PBS, k analýze byl použit přístroj FUSION Solo S (VILBER, Eberhardzell, Německo).

5 Výsledky

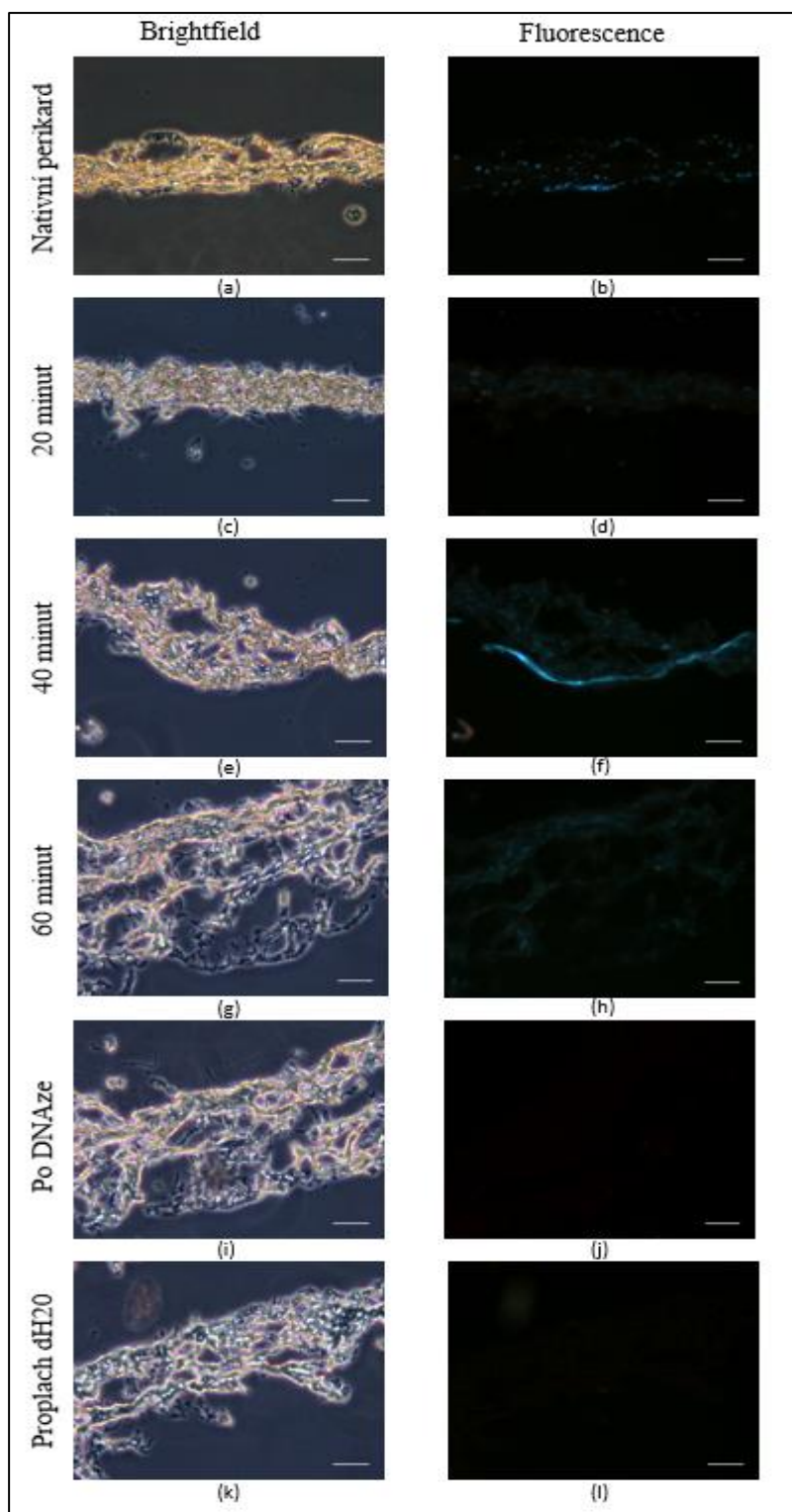
5.1 Optimalizace dynamické kultivace buněk

Během kultivace v bioreaktoru s mechanickou zátěží byla v prvotních pokusech aplikována zátěž v hodnotách 130/80 mmHg, 120/70 mmHg a 110/80 mmHg, při frekvenci 1 Hz. Aplikace této mechanické zátěže vedla u buněk kultivovaných na plazmovaném skle k odtrhávání buněčného materiálu od podkladu po jednom dni dynamické kultivace. U buněk kultivovaných na skle s vrstvou fibrinu vedla k odtrhávání buněčného materiálu mezi druhým a třetím dnem dynamické kultivace. U vzorků kultivovaných na decelularizovaném perikardu docházelo během dynamické kultivace k deformaci perikardového nosiče. Ideální mechanická zátěž, během jejíž aplikace nedocházelo k častému poškozování buněčného materiálu byla sérií experimentů stanovena na 100/80 mmHg, frekvence 1 Hz.

K odtrhávání buněk od podkladu docházelo rovněž při příliš vysokých buněčných násadách. U plazmovaného skla i skla s vrstvou fibrinu se během dynamické kultivace vrstva buněk odtrhávala od podkladu v pokusech s násadou 100 tis.b./cm² a 75 tis.b./cm². Ideální buněčná násada na oba typy skla byla stanovena na 30 tis.b./cm², u buněk nasazených na decelularizovaný perikard na 75 tis.b./cm².

5.2 Postupná decelularizace perikardu

Pro přípravu decelularizovaného perikardu byl jako zdroj použit nativní prasečí perikard. Decelularizovaný perikard byl v dalších experimentech využíván jako buněčný nosič. Proces decelularizace zahrnoval postupně promývání 0,5% SDS a roztokem DNazy. Z nativního perikardu, v intervalech 20, 40, 60 minut promývání SDS a po proplachu DNazou byl z tkáně odebrán vzorek 2x2 cm, který sloužil k analyzování tkáně v průběhu decelularizace. Nativní tkáň vykazovala přítomnost buněk (Obrázek 7; a – b); přítomnost jader byla patrná ještě po 40 minutách promývání SDS (Obrázek 7; e – f). Místa výskytu jader nebyla detekována po 60 minutách působení SDS, tkáň ale stále zůstávala pozitivní na přítomnost DNA (Obrázek 7; g – h). Po promytí DNazou nebyla DNA již detekována (Obrázek 7; i – j), a zcela decelularizovaná tkáň byla připravena po finálním proplachu (Obrázek 7; k – l). Během decelularizačního procesu docházelo k nabobtnání tkáně, po finálním proplachu se vrátila do původního stavu (Obrázek 7; g – k). Decelularizovaná tkáň vykazovala při manipulaci horší mechanické vlastnosti než tkáň nativní, byla citlivější k poškození a snadněji se trhala.



Obrázek 7: Postupná decelularizace perikardu

Tkáň perikardu byla před a během decelularizace analyzována na přítomnost buněk a DNA. Nativní perikard (a, b), interval 20 minut (c, d), 40 minut (e, f), 60 minut (g, h), po proplachu DNazou (i, j) a finálním proplachu dH₂O (k, l). Tkáň byla pozorována ve světelném poli, DNA byla barvena pomocí Hoechst 33258 (modrá fluorescence, Sigma-Aldrich). Leica DMi8 S, objektiv x10, měřítko 200 μ m.

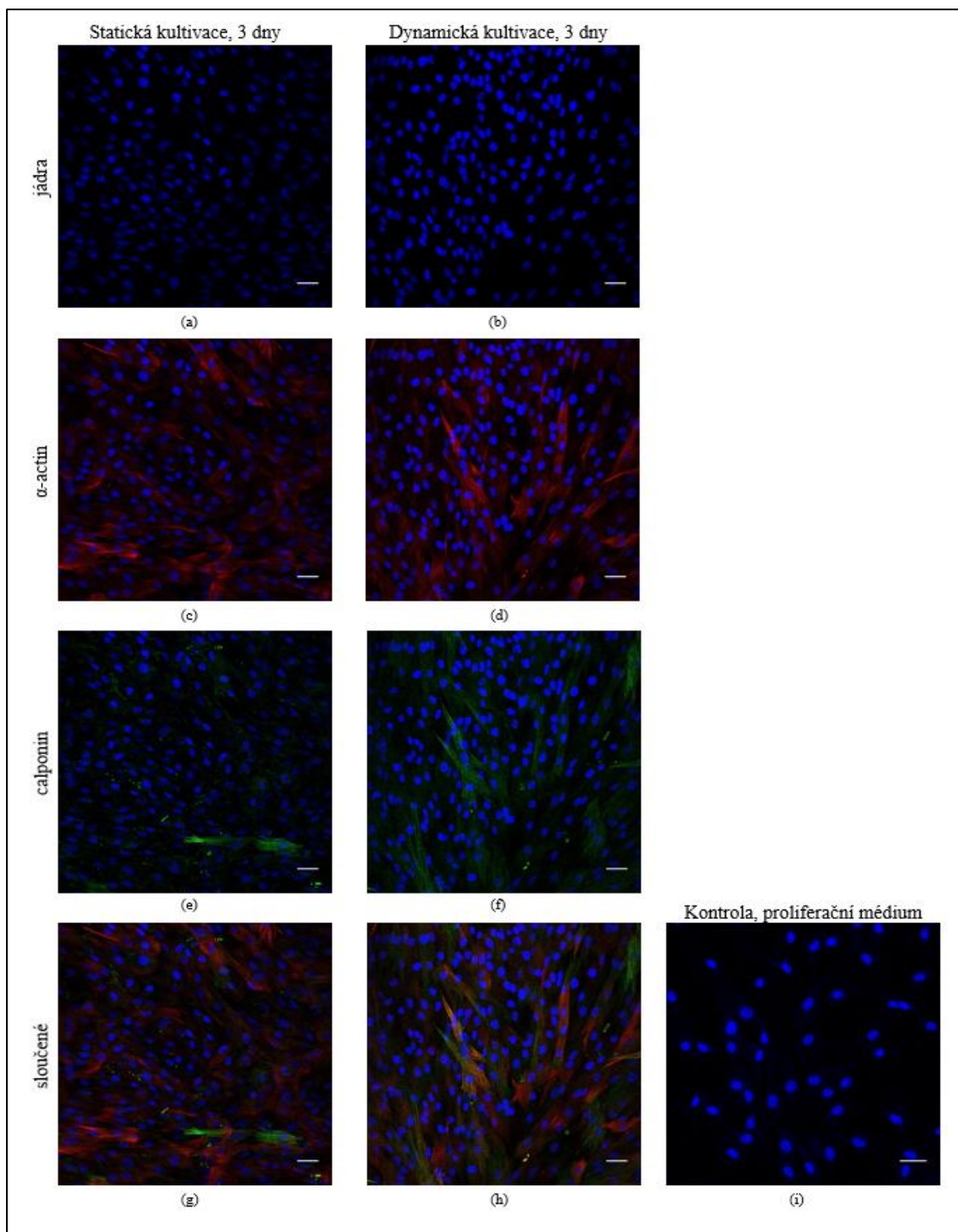
5.3 Detekce markerů diferenciace

Vliv mechanické zátěže na diferenciaci ASC do VSMC byl hodnocen pomocí imunofluorescence markerů diferenciace, a sice časného markeru SM α -aktinu a střednědobého markeru h1-calponinu. Pro analýzu byly použity lidské a prasečí ASC. Lidské ASC byly kultivovány na třech typech nosičů – plazmovaném skle, skle s vrstvou fibrinu a decelularizovaném perikardu. Prasečí ASC byly kultivovány na plazmovaných sklech a sklech s vrstvou fibrinu. Sledované intervaly byly 3 a 7 dní kultivace. Použitá mechanická zátěž byla 100/80 mmHg, frekvence 1 Hz. Buněčná násada byla 30 tis.b./cm² pro plazmované sklo a sklo s vrstvou fibrinu, pro decelularizovaný perikard 75 tis.b./cm².

5.3.1 Plazmované sklo

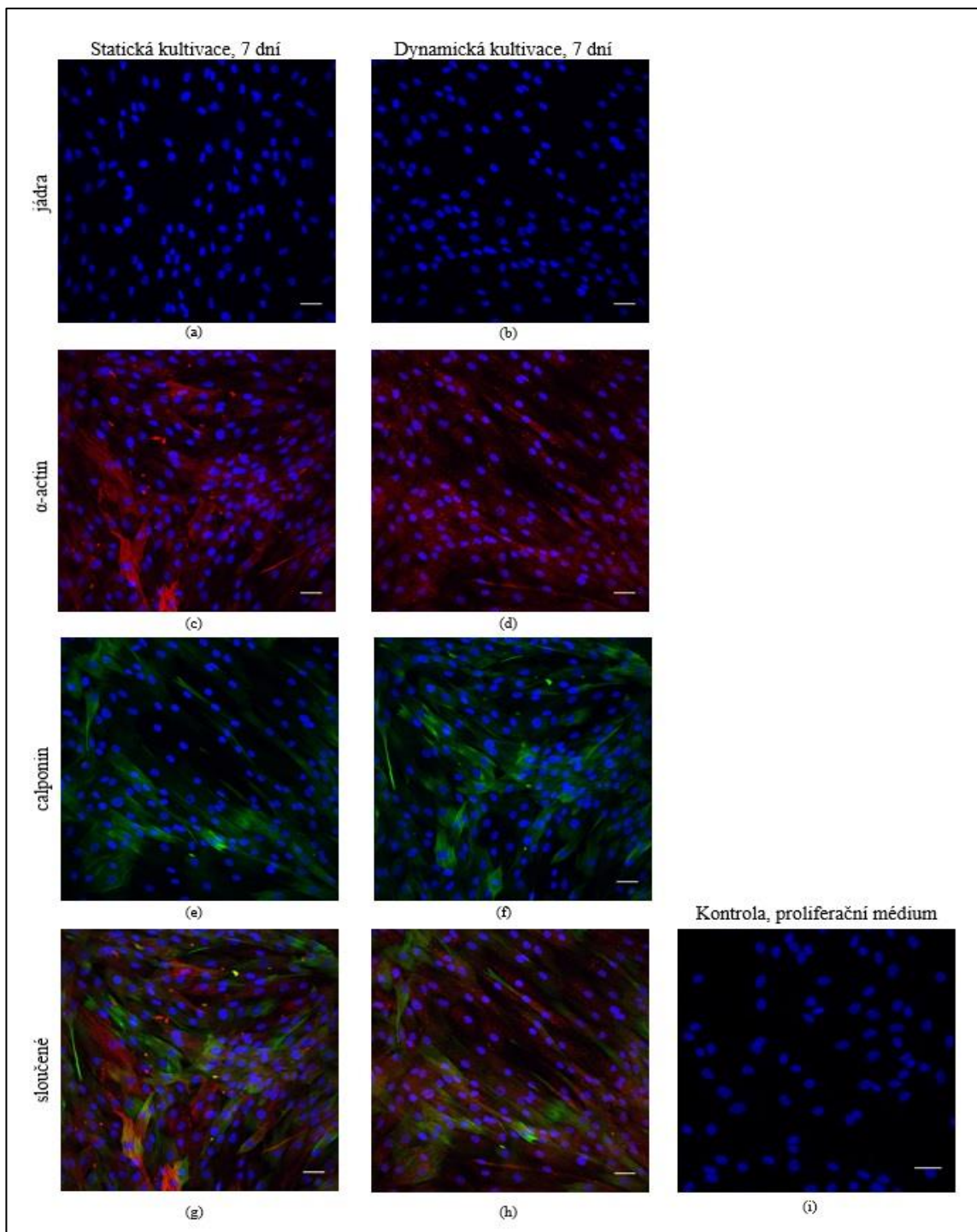
U lidských i prasečích ASC se při statické i dynamické kultivaci v diferenciálním médiu podařilo navodit diferenciaci směrem k VSMC. U všech vzorků byly detekovány markery diferenciace α -aktin i h1-calponin (Obrázek 8 – 11). Hlavní rozdíl mezi statickou a dynamickou kultivací byl pozorovatelný u lidských ASC v intervalech 3 a 7 dní. Výskyt vláken střednědobého markeru h1-calponinu byl zaznamenán u většiny dynamicky kultivovaných buněk v intervalu 3. dne, zatímco u staticky kultivovaných buněk byl spíše sporadický (Obrázek 8; f.). Sedmý den byla však vlákna h1-calponinu pozorována u obdobného počtu staticky i dynamicky kultivovaných buněk (Obrázek 9; e, f). Produkce časného markeru α -aktinu byla u lidských i prasečích ASC srovnatelná, a byla srovnatelná i u buněk kultivovaných staticky a dynamicky. Nejvyšší intenzita signálu obou markerů byla pozorovatelná u prasečích ASC 7. den statické i dynamické kultivace (Obrázek 11; g, h). U kontrolních ASC kultivovaných v proliferačním médiu ve statickém systému nebyla však exprese markerů diferenciace směrem k VSMC zaznamenána. Pozdní marker SM myosin heavy chain se nepodařilo detekovat u žádného z pozorovaných vzorků.

Povrchová úprava metodou „plasma surface cleaning“ se využívala pro zvýšení hydrofilnosti povrchu skla. Hlavním limitujícím faktorem pro využívání skla jako nosiče v bioreaktorech s dynamickou zátěží byl problém s buněčnou adhezí. Buněčná vrstva se v průběhu dynamické kultivace v bioreaktoru u většiny nasazených vzorků často odtrhávala, nejčastěji po prvním dni kultivace.



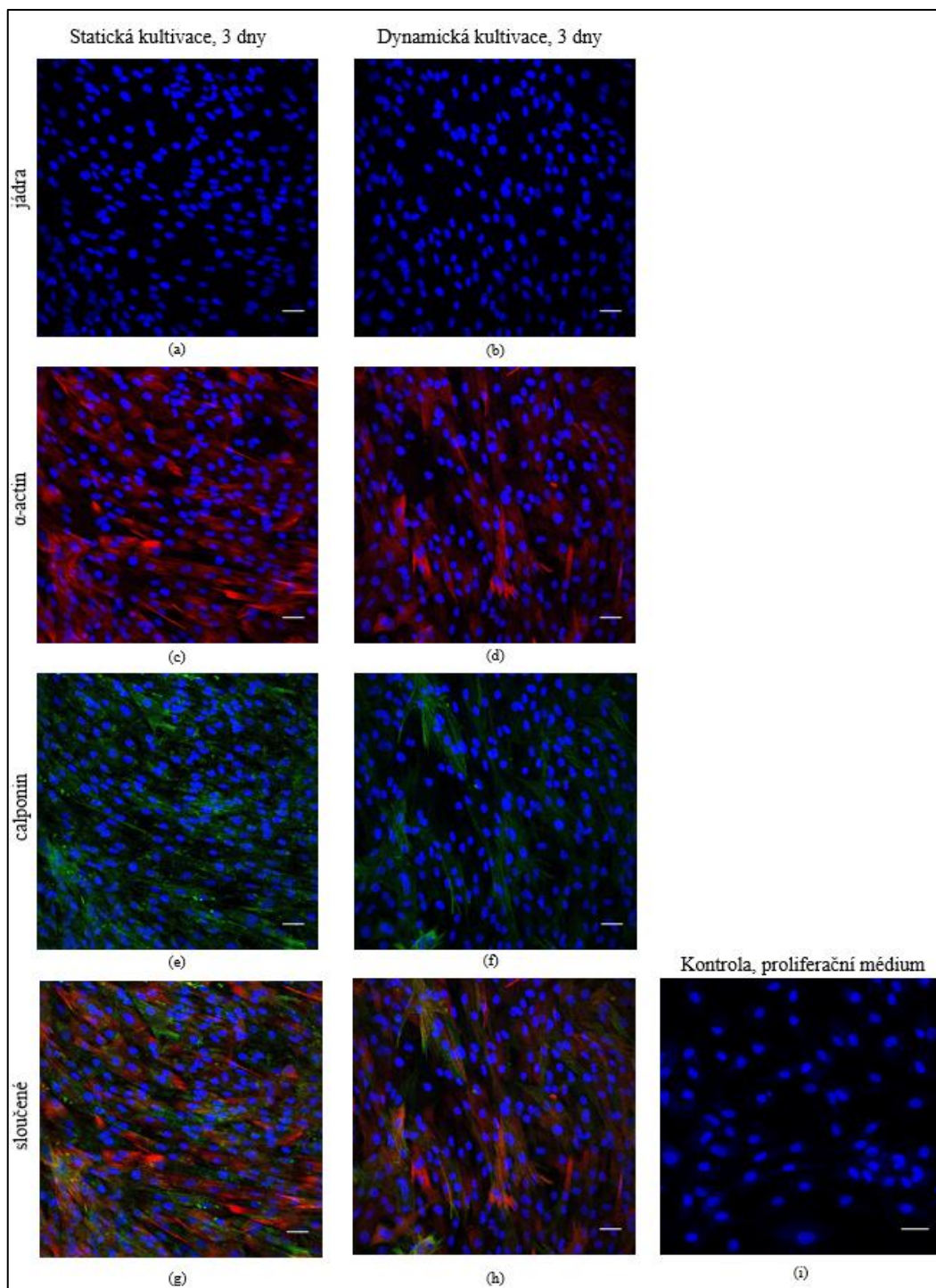
Obrázek 8: Lidské ASC, sklo, 3 den

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m.



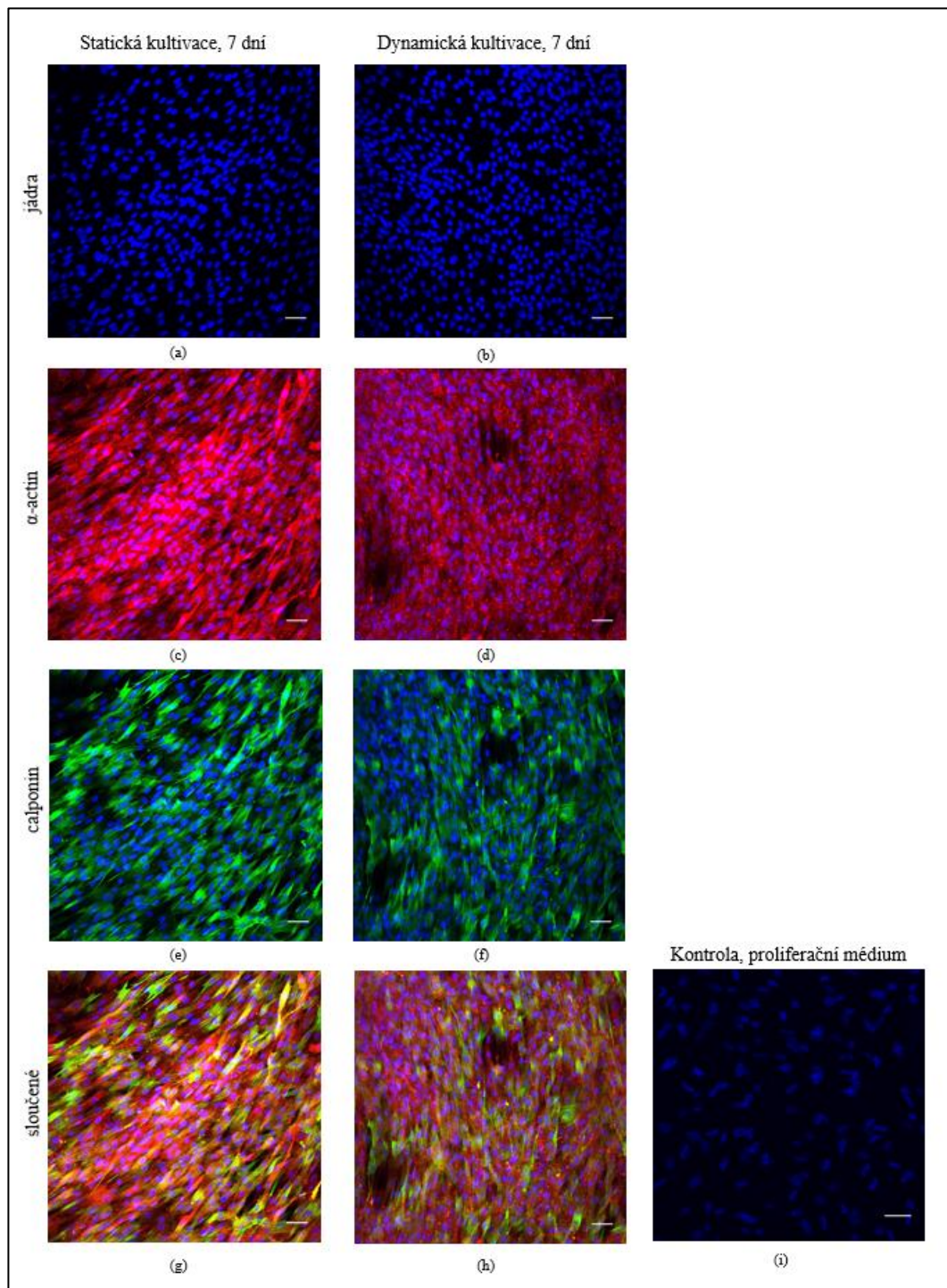
Obrázek 9: Lidské ASC, sklo, 7 dní

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 7. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferacním médium, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m.



Obrázek 10: Prasečí ASC, sklo, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace prasečích ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferacním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m.



Obrázek 11: Prasečí ASC, sklo, 7 dní

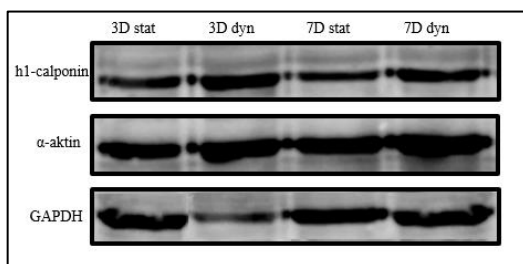
Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace prasečích ASC 7. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m

5.3.2 Sklo s vrstvou fibrinu

U lidských i prasečích ASC kultivovaných na skle s vrstvou fibrinu se podobně jako u vzorků kultivovaných na plazmovaném skle podařilo navodit diferenciaci směrem k VSMC ve statickém i dynamickém prostředí. Časný marker diferenciaci α -aktin byl detekován u všech zkoumaných vzorků (Obrázek 12), avšak v jeho obsahu a distribuci v buňkách byl mezi dynamickou a statickou kultivací pozorován signifikantní rozdíl (Obrázek 13 – 17). Jak ukázala densitometrie Western blotů, obsah α -aktinu byl statisticky významně vyšší u buněk kultivovaných v dynamickém systému, a to 3. i 7. den kultivace (Obrázek 13). Imunofluorescence však ukázala srovnatelnou tvorbu vláken α -aktinu v ASC kultivovaných staticky i dynamicky; u prasečích ASC se dokonce jevila vlákna α -aktinu jako výraznější u buněk kultivovaných staticky (Obrázky 16; c, d; 17; c, d).

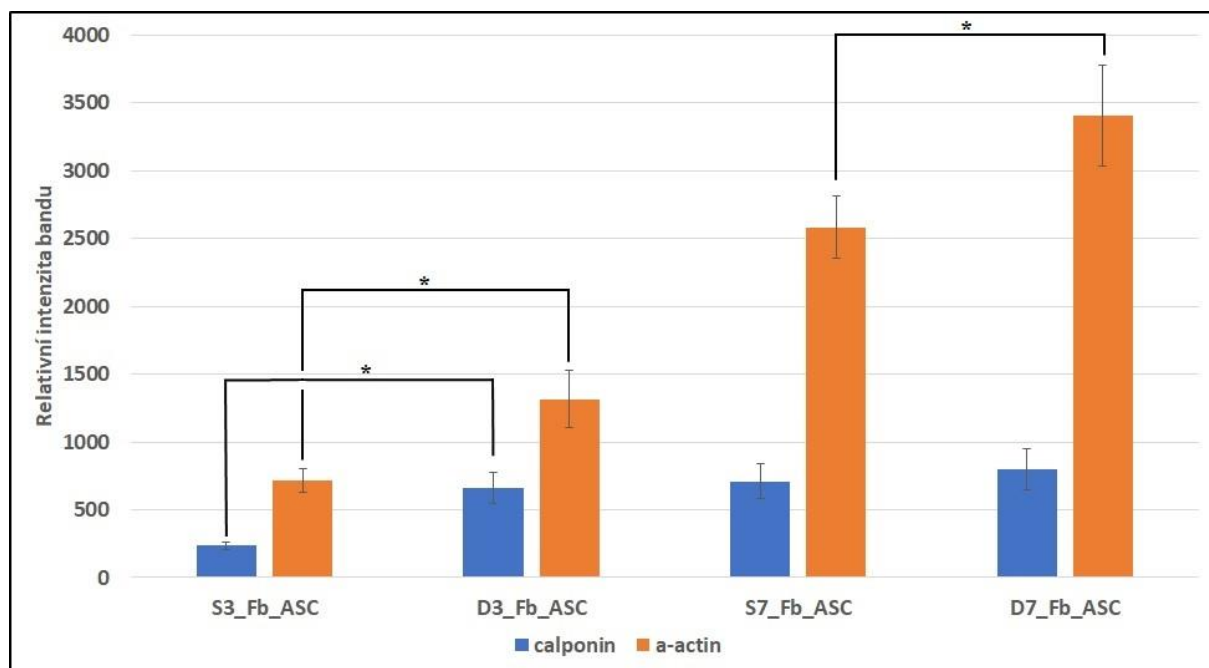
Stejně jako u vzorků kultivovaných na plazmovaném skle se rozdíl mezi statickou a dynamickou kultivací lidských ASC projevil u produkce h1-calponinu. Porovnání 3. dne statické a dynamické kultivace potvrzuje signifikantní zvýšení obsahu h1-calponinu u dynamicky kultivovaných buněk (Obrázek 13), u nichž byl navíc h1-calponin uspořádán do vláken, byť i slabě patrných (Obrázek 14; f, h), zatímco u staticky kultivovaných buněk (Obrázek 14; e, g) vlákna pozorována nebyla. Po 7 dnech kultivace jsou vlákna h1-calponinu pozorovatelná i u statické kultivace (Obrázek 15; e), intenzivnější signál vykazují vzorky kultivované dynamicky (Obrázek 15; f). U prasečích ASC byla vlákna h1-calponinu detekována u všech vzorků (Obrázek 16 – 17), avšak u buněk v dynamickém systému jejich fluorescence byla intenzivnější, zejména 3. den kultivace (Obrázek 16; e, f), kdy dokonce imunofluorescence h1-calponinu částečně maskovala imunofluorescenci α -aktinu (Obrázek 16; g). Nejvyšší intenzita signálu byla zaznamenána po 7 dnech kultivace prasečích ASC, a tato intenzita stále přetrvávala jako mírně vyšší u buněk v dynamickém systému (Obrázek 17; e, f, g, h). Pozdní marker SM myosin heavy chain nebyl detekován u žádného z pozorovaných vzorků.

Dynamicky kultivované buňky na skle s vrstvou fibrinu byly podobně jako buňky kultivované na plazmovaných sklech náchylné k uvolnění od podkladu. Po 3 dnech kultivace v bioreaktoru docházelo k částečnému, nebo i celkovému uvolnění buněčného materiálu.



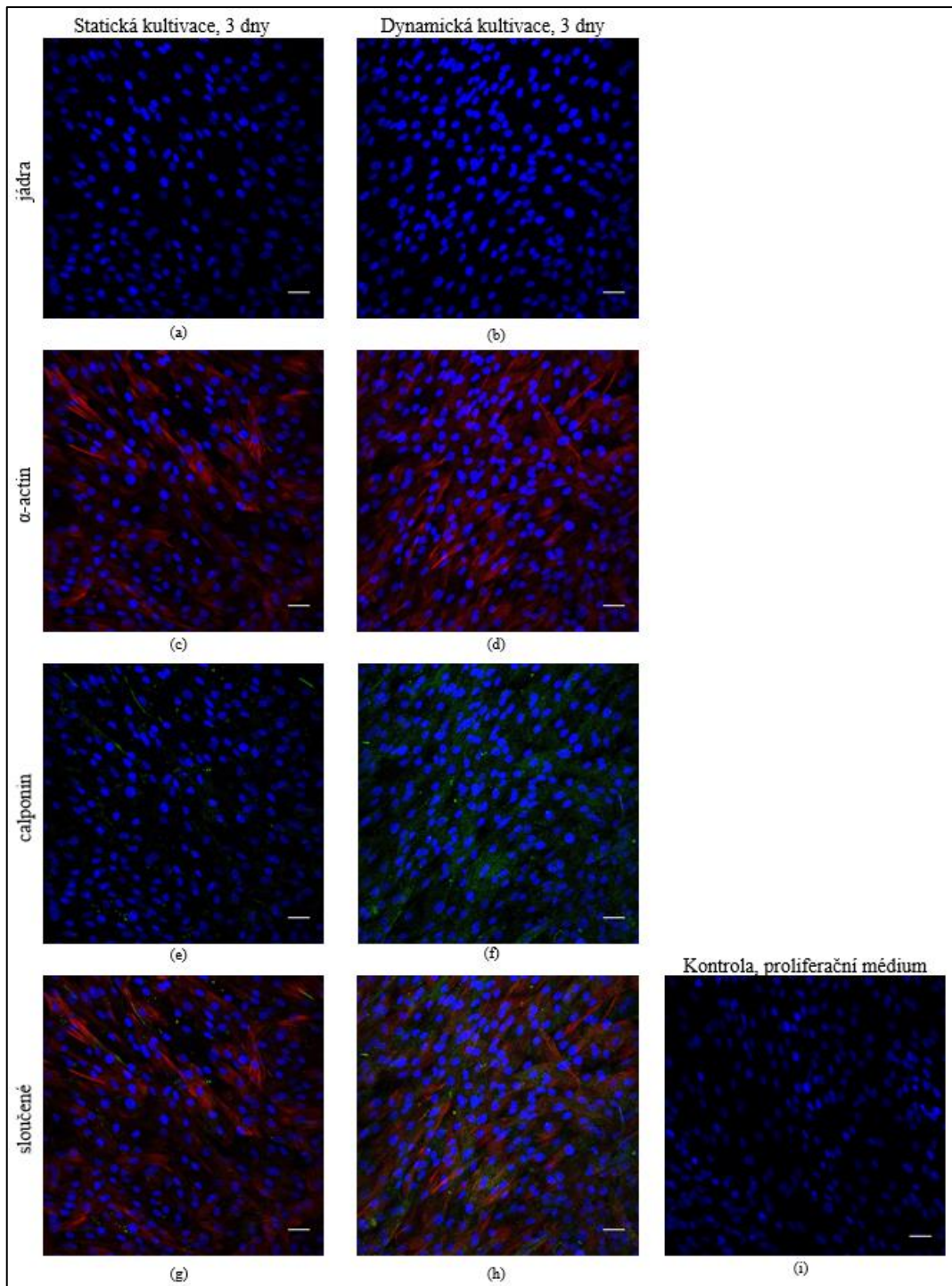
Obrázek 12: Western blot; exprese markerů diferenciace ASC na skle s vrstvou fibrinu

Porovnání exprese markerů diferenciace u lidských ASC na úrovni proteinu. Analýza potvrdila produkci α -aktinu a h1-calponinu u obou intervalů statické (3D stat, 7D stat) i dynamické kultivace (3D dyn, 7D dyn); obsah těchto markerů však byl obvykle významně vyšší v buňkách kultivovaných dynamicky s výjimkou calponinu 7. den, jehož obsah byl srovnatelný v buňkách kultivovaných staticky i dynamicky. Kontrola: GAPDH.



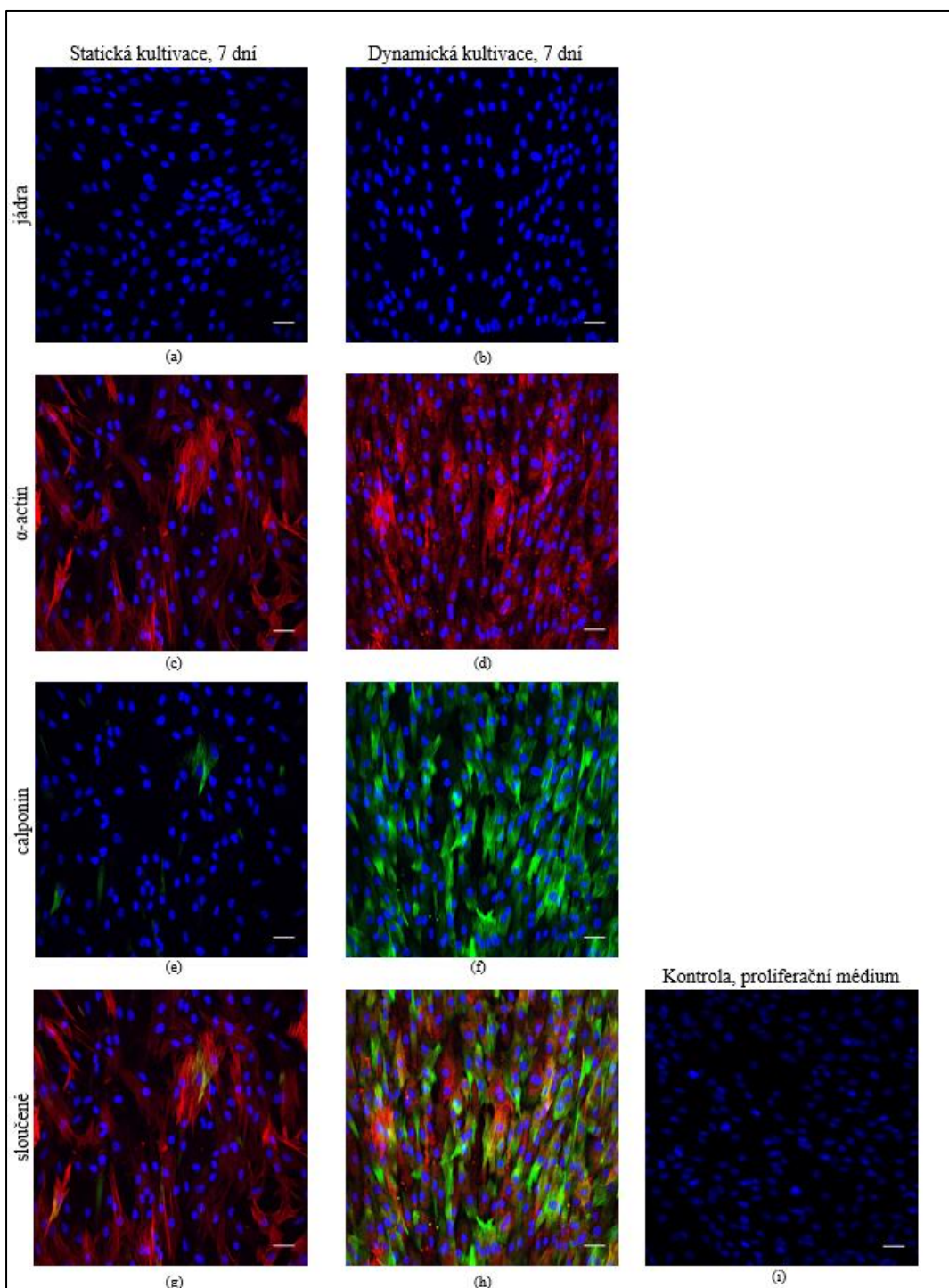
Obrázek 13: Densitometrie Western blotů pro expresi markerů diferenciace

Densitometrie proteinů z buněčných lyzátů lidských ASC kultivovaných staticky 3 a 7 dní (D3_Fb_ASC a D7_Fb_ASC) a dynamicky 3 a 7 dnů (D3_Fb_ASC a D7_Fb_ASC). Hodnocen byl α -aktin a h1-calponin. Statistická metoda ANOVA, statistická významnost $p \leq 0.05$, $n=5$ pro všechny měřené intervaly.



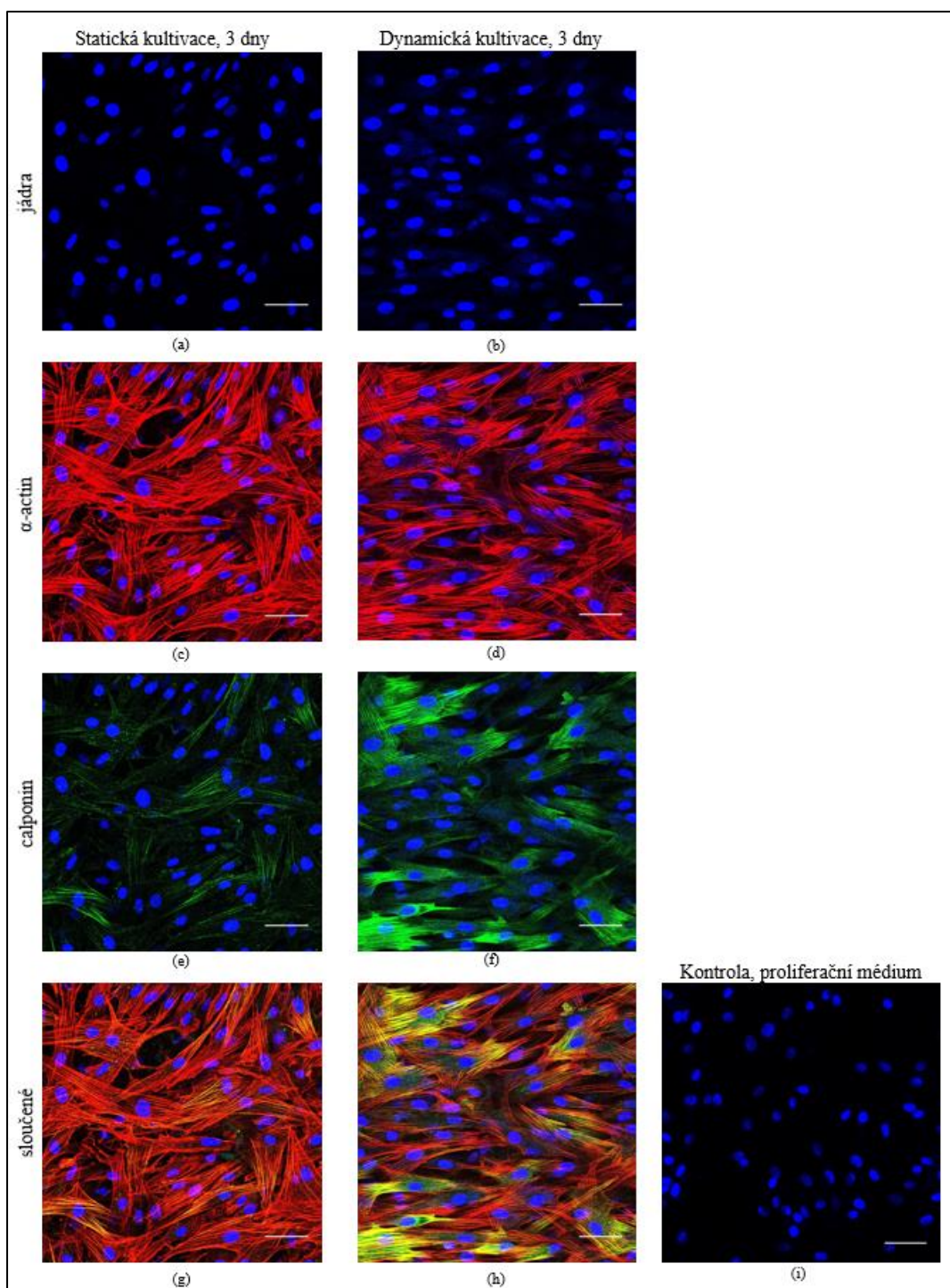
Obrázek 14: Lidské ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m.



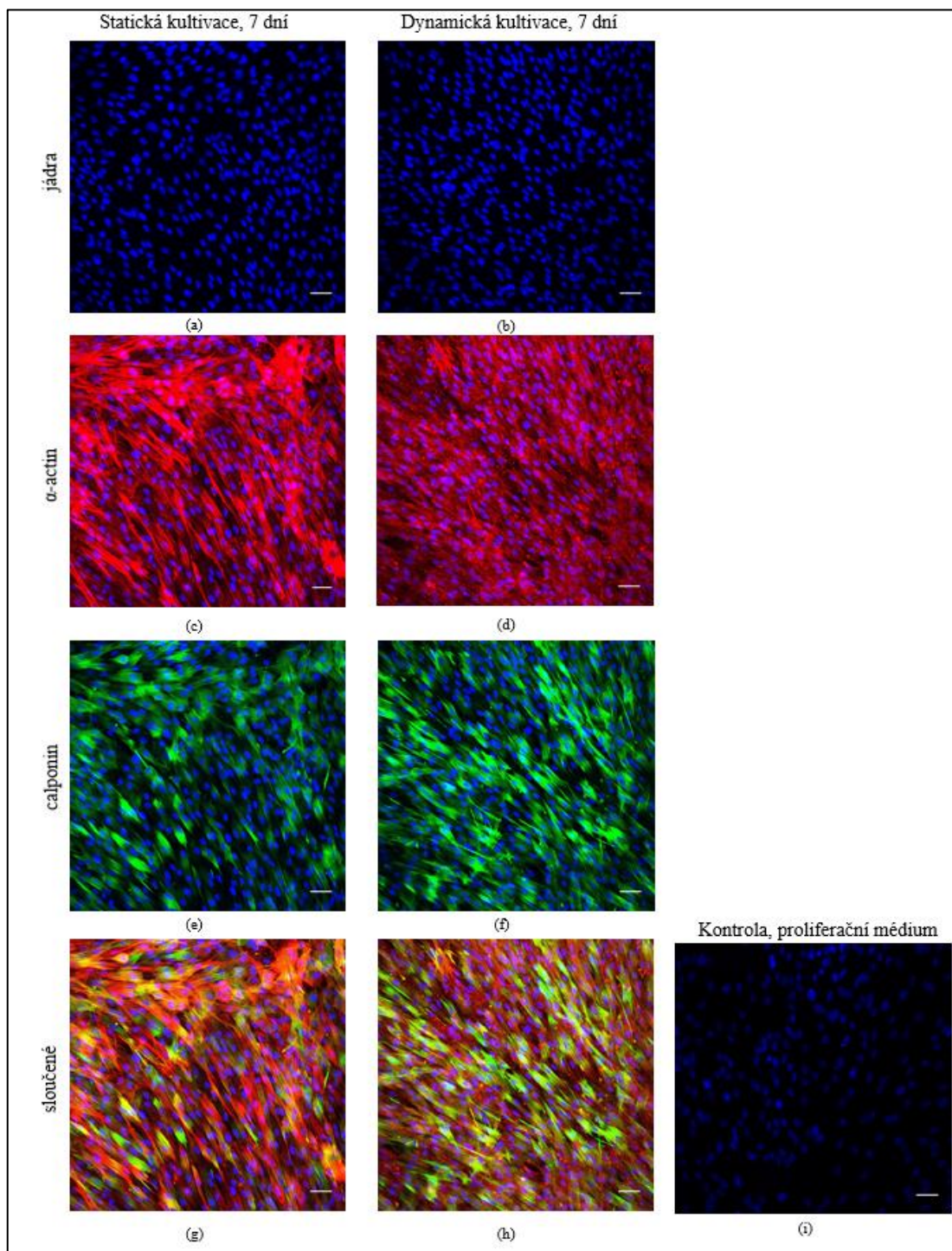
Obrázek 15: Lidské ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 7 dní

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 7. den, diferenciální médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferacím médium, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m.



Obrázek 16: Prasečí ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x40, měřítko 25 μ m.



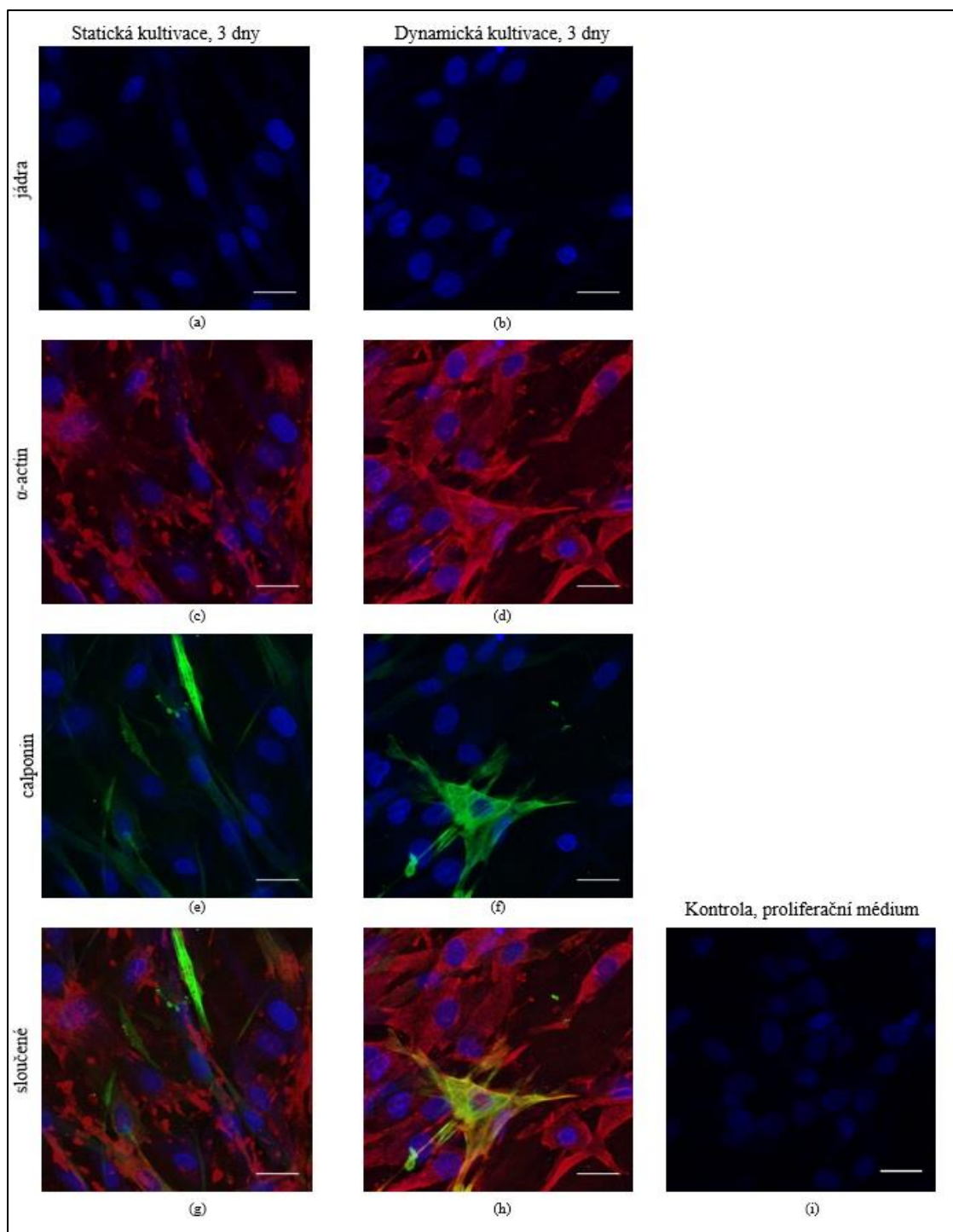
Obrázek 17: Prasečí ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 7 dní

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 7. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μ m.

5.3.3 Decelularizovaný perikard

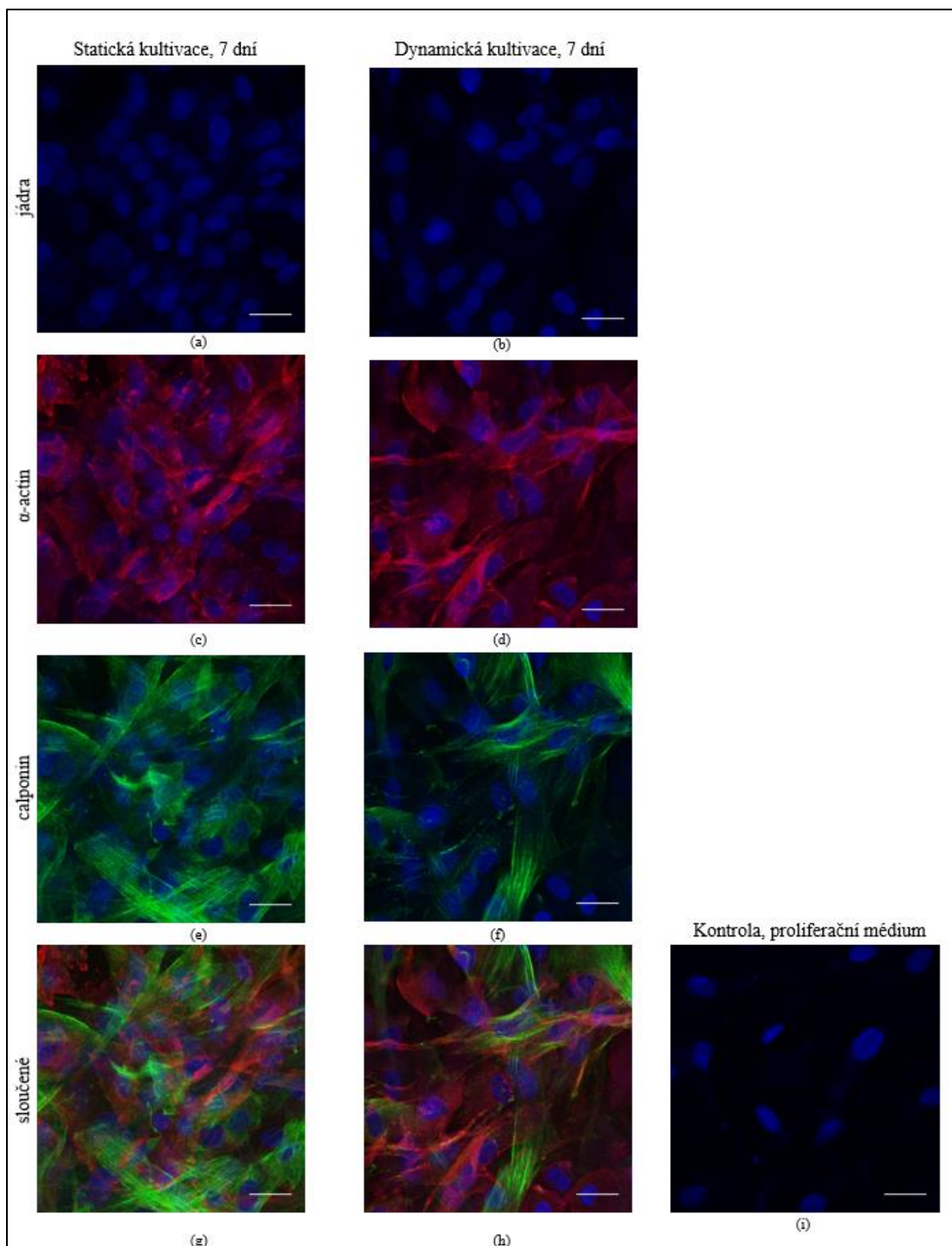
Decelularizovaný perikard byl použit jako nosič pro statickou a dynamickou kultivaci lidských ASC. Na rozdíl od plazmovaného skla a skla s vrstvou fibrinu u perikardu nedocházelo k problémům s odtrháváním buněčného materiálu. Během dynamické kultivace docházelo po pátém dni kultivace ke zkroucení perikardového nosiče, při kterém ovšem nedocházelo k fatálnímu poškození buněčného materiálu.

Hladkosvalový α -aktin byl detekován u všech pozorovaných vzorků (Obrázek 18 – 19). Přítomnost signálu h1-calponinu byla po 3 dnech statické a dynamické kultivace v porovnání s buňkami kultivovanými na obou typech skla detekována u malého počtu buněk (Obrázek 18; e, f). K jejímu zvýšení došlo s rostoucím časem kultivace, vlákna h1-calponinu byla detekována u většiny buněk intervalu 7 dne (Obrázek 19; e, f). Rozdíl mezi statickými a dynamickými vzorky byl minimální. Ve třetím dnu kultivace se imunofluorescence obou markerů jevila jako výraznější u buněk kultivovaných dynamicky, ovšem v sedmém dnu naopak u buněk kultivovaných staticky, zejména v případě h1-calponinu (Obrázek 19; e, f, g, h). Pozdní marker SM myosin heavy chain se nepodařilo detekovat u žádného z pozorovaných vzorků.



Obrázek 18: Lidské ASC, perikard, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 WLL MP, objektiv x20, měřítko 25 μ m.



Obrázek 19: Lidské ASC, perikard, 7 dní

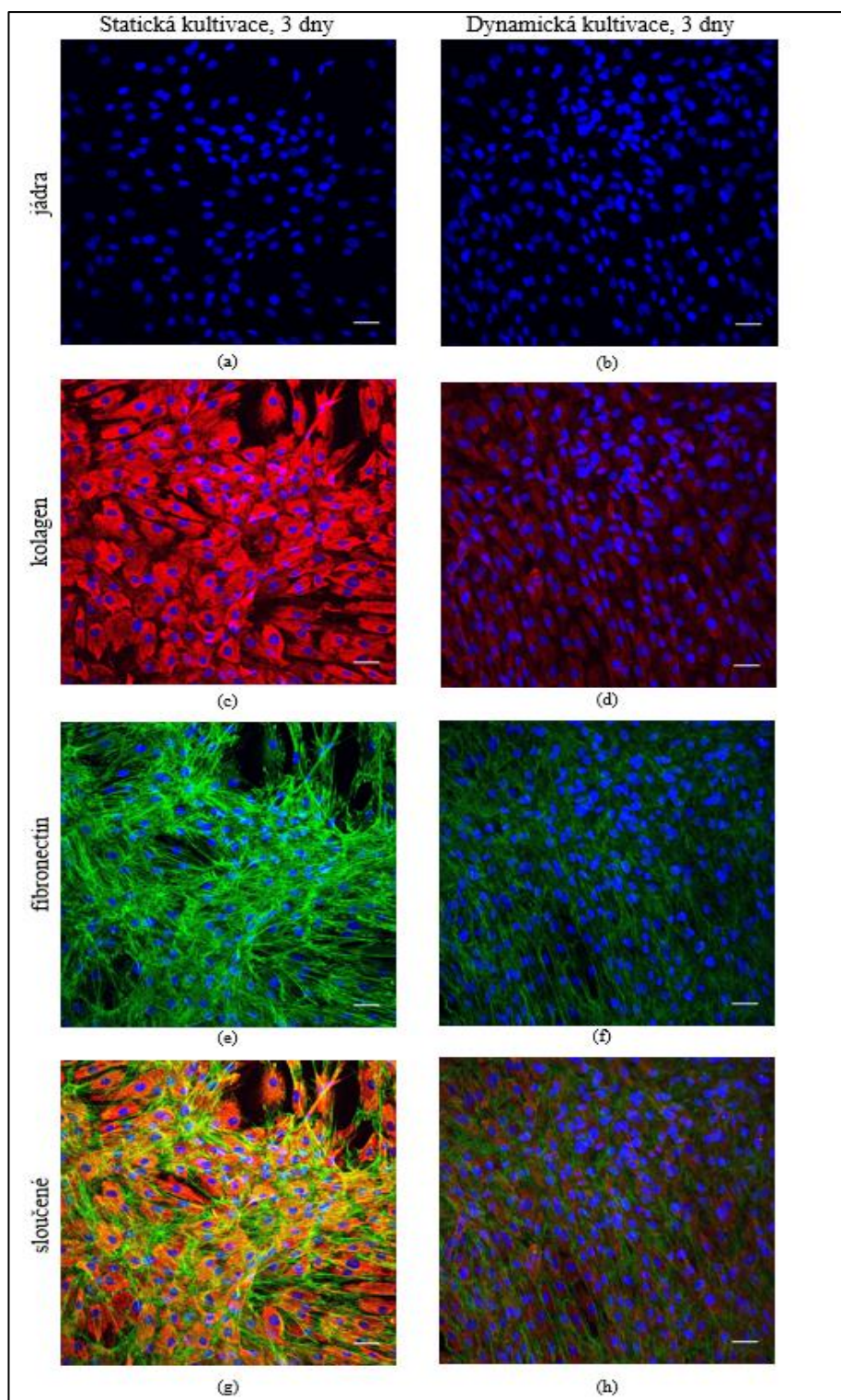
Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 7. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a markerů diferenciace VSMC; α -aktin (červená, c – d) a h1-calponin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, α -aktinu a h1-calponinu (g – h). Kontrola (i) fotografována na buňkách v proliferačním médiu, statická kultivace. Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 WLL MP, objektiv x20, měřítko 25 μ m.

5.4 Detekce produkce extracelulární matrix

Podle literatury během diferenciaci ASC do VSMC dochází k produkci extracelulární matrix. Podobně jako u hodnocení markerů diferenciaci byly pro analýzu použity lidské a prasečí ASC. Lidské ASC byly kultivovány na třech typech nosičů – plazmovaném skle, skle s vrstvou fibrinu a decelularizovaném perikardu. Prasečí ASC byly kultivovány na plazmovaných sklech a sklech s vrstvou fibrinu. Použitá mechanická zátěž byla 100/80 mmHg, frekvence 1 Hz. Buněčná násada byla 30 tis.b./cm² pro plazmované sklo a sklo s vrstvou fibrinu, pro decelularizovaný perikard 75 tis.b./cm².

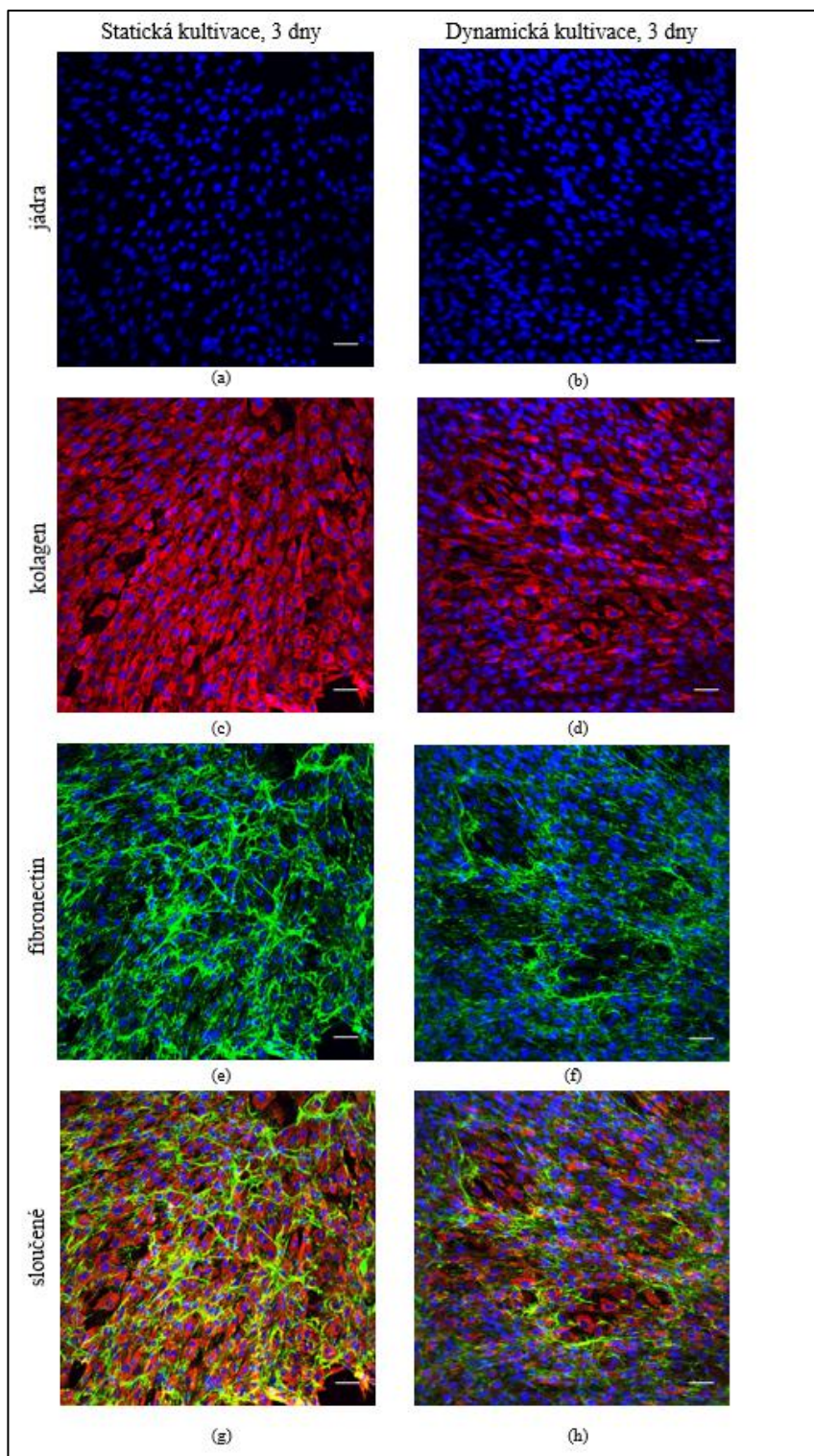
5.4.1 Plazmované sklo

Produkce kolagenu I a fibronektinu byla potvrzena u všech pozorovaných vzorků, sledovaný interval byl 3 dny. U lidských ASC se kolagen I i fibronektin výrazněji barví u buněk ve statickém systému. U prasečích ASC je rozdíl v produkci ECM u buněk ve statickém a dynamickém systému méně nápadný než u lidských ASC, ale tato produkce je výraznější i homogennější u buněk ve statickém systému. (Obrázek 20 – 21).



Obrázek 20: Lidské ASC, sklo, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a extracelulární matrix; kolagen I (červená, c – d) a fibronectin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, kolagenu I a fibronectinu (g – h). Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μm .

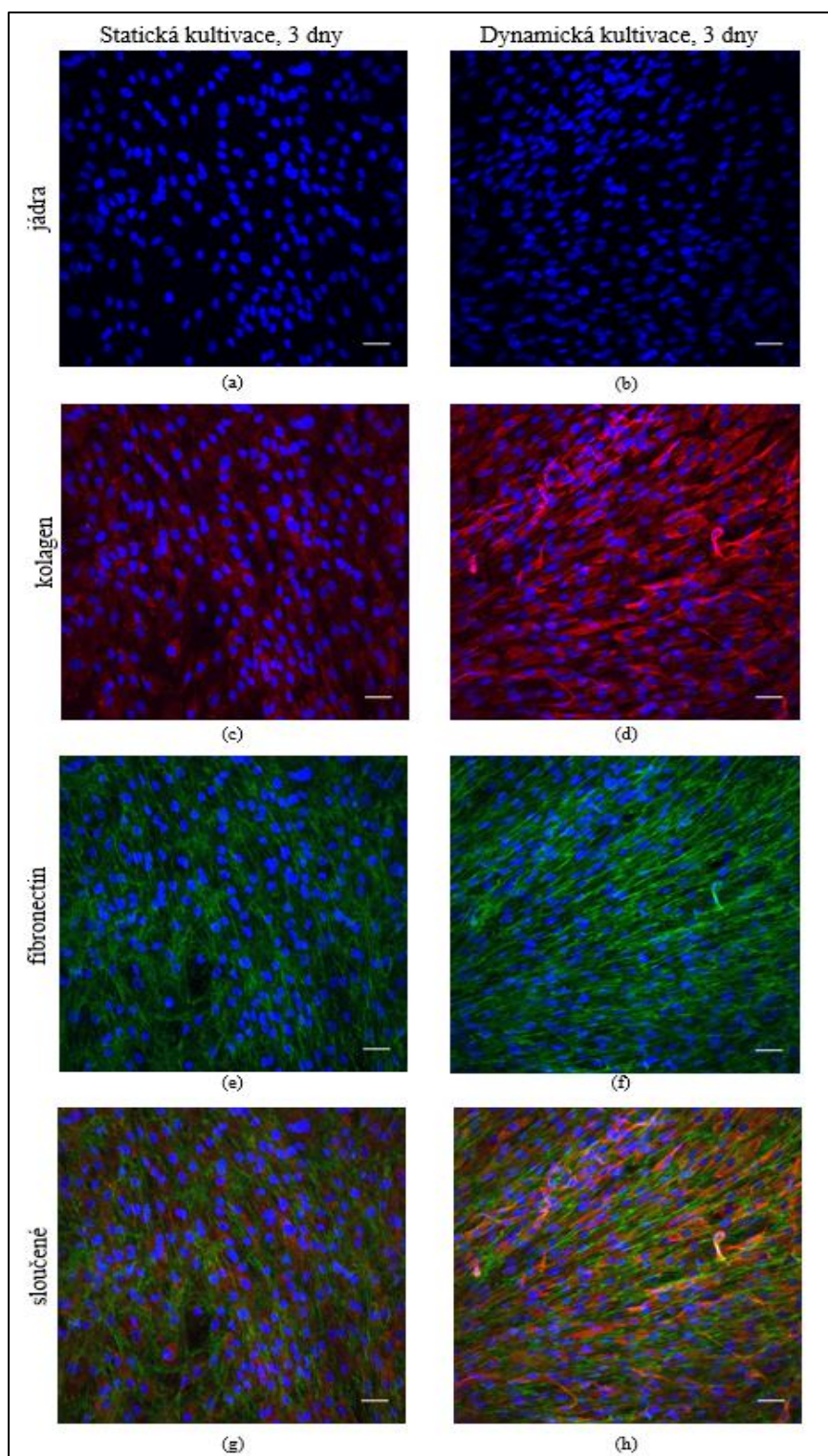


Obrázek 21: Prasečí ASC, sklo, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace prasečích ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a extracelulární matrix; kolagen I (červená, c – d) a fibronectin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, kolagenu I a fibronektinu (g – h). Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μm .

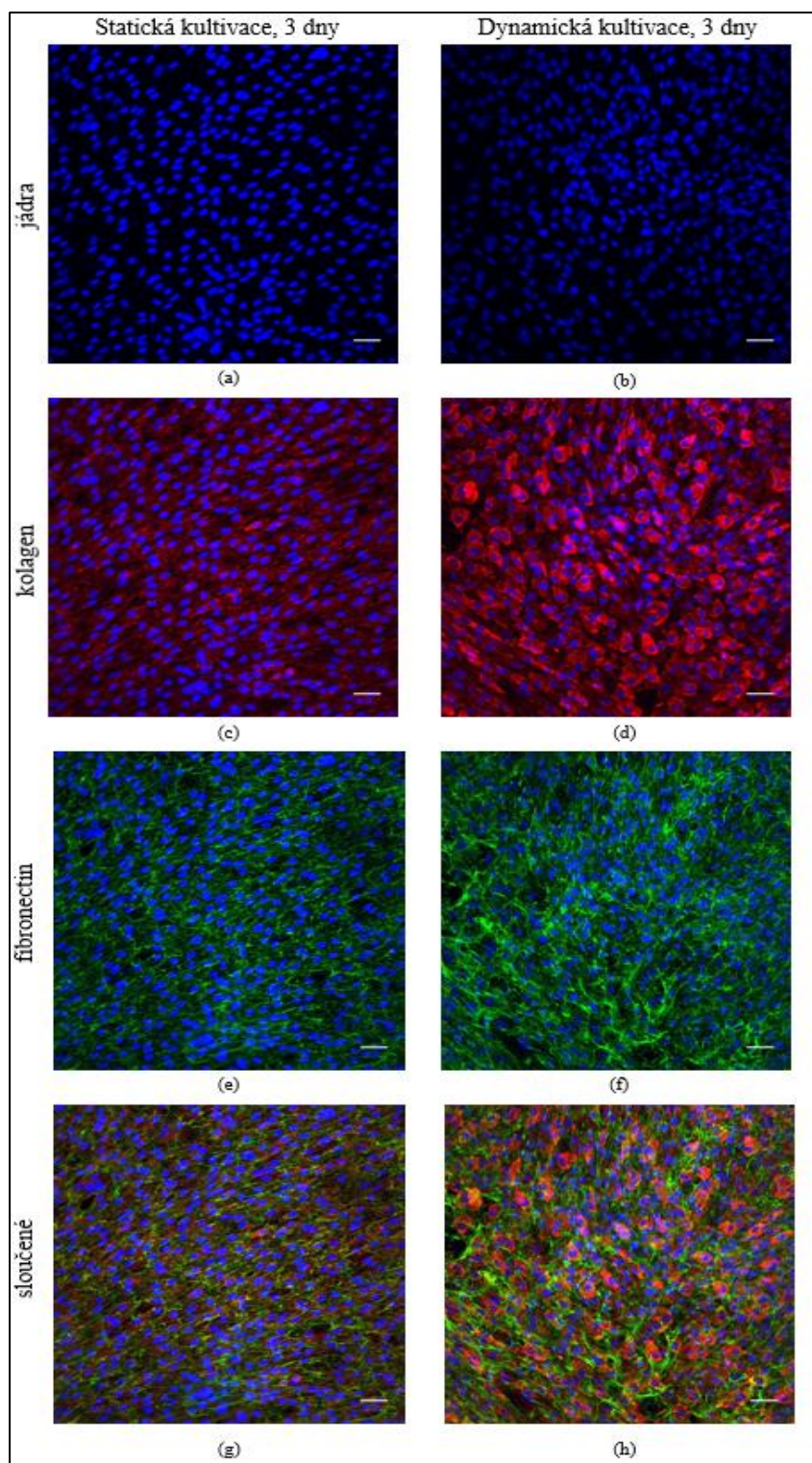
5.4.2 Sklo s vrstvou fibrinu

Podobně jako u vzorků kultivovaných na plazmovaném skle byla produkce kolagenu I a fibronektinu byla potvrzena u všech pozorovaných vzorků, sledovaný interval byl 3 dny. Při porovnání statické a dynamické kultivace nejsou pozorovány signifikantní rozdíly, intenzita signálu je u všech pozorovaných vzorků obdobná (Obrázek 22 – 23). Pouze uspořádání lidských ASC, kolagenu I i fibronektinu se liší: zatímco ve statickém systému je uspořádání spíše náhodné, v dynamickém systému mají buňky i struktury (vlákna) ECM tendenci být uspořádány paralelně (Obrázek 22; c-h). Paralelní uspořádání se neprojevuje u prasečích ASC; zde jsou buňky i ECM uspořádány náhodně, ale místy se ECM barví intenzivněji v dynamickém než ve statickém kultivačním systému (Obrázek 23; c-h). Produkce kolagenu I a fibronektinu byla detekována i u obou typů buněk kultivovaných v proliferačním médiu (Obrázek 24). Na rozdíl od lidských ASC kultivovaných v diferenciacním médiu (Obrázek 22; g, h) nebyla u buněk kultivovaných v proliferačním médiu (Obrázek 24; g) pozorována souvislá vrstva kolagenu I a fibronektinu. U prasečích ASC nebyl mezi kultivací v proliferačním (Obrázek 24; h) a diferenciacním médiu pozorovatelný rozdíl (Obrázek 23; g, h).



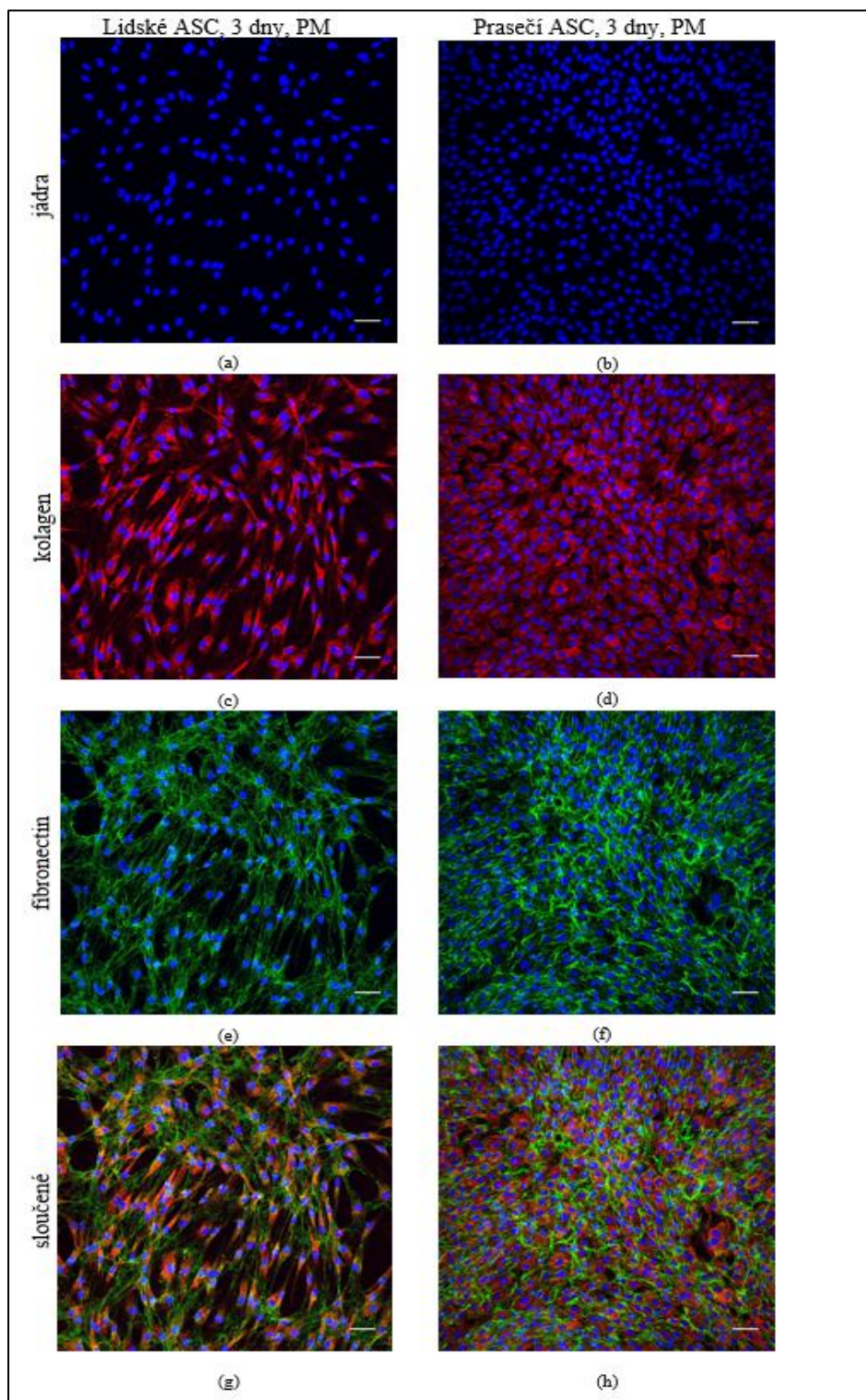
Obrázek 22: Lidské ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace lidských ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a extracelulární matrix; kolagen I (červená, c – d) a fibronectin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, kolagenu I a fibronectinu (g – h). Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μm .



Obrázek 23: Prasečí ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 3 dny

Porovnání statické (a, c, e, g) a dynamické (b, d, f, h) kultivace prasečích ASC 3. den, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a extracelulární matrix; kolagen I (červená, c – d) a fibronectin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, kolagenu I a fibronectinu (g – h). Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μm .

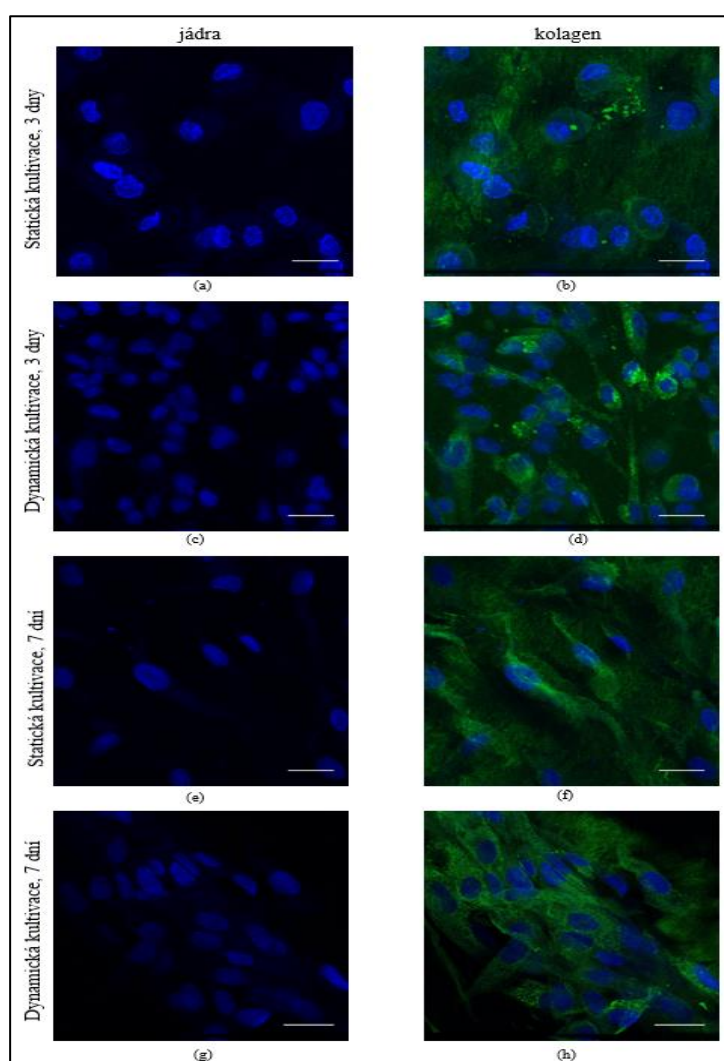


Obrázek 24: Lidské a Prasečí ASC, sklo s vrstvou fibrinu, 3 dny

Lidské ASC (a, c, e, g) a prasečí ASC (b, d, f, h), statická kultivace, 3. den, proliferační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a – b) a extracelulární matrix; kolagen I (červená, c – d) a fibronectin (zelená, e – f). Sloučené fotografie jader, kolagenu I a fibronectinu (g – h). Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO, objektiv x20, měřítko 50 μm .

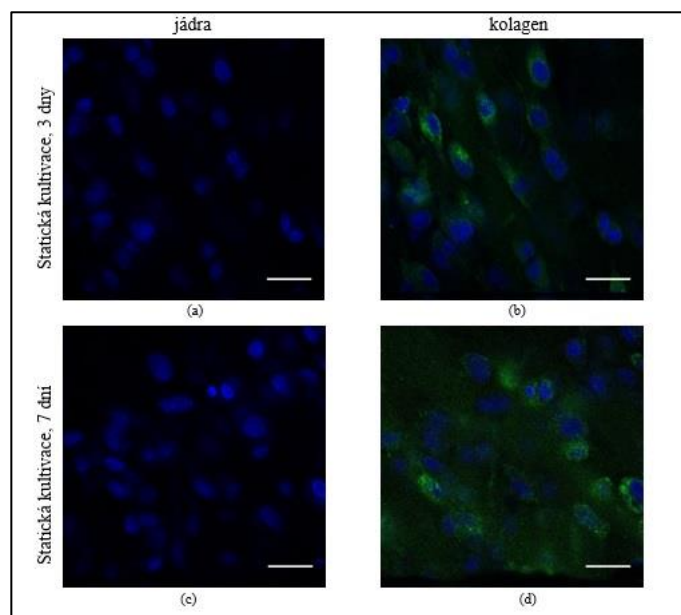
5.4.3 Decelularizovaný perikard

Analýza produkce ECM během statické a dynamické kultivace na decelularizovaném perikardu byla provedena na lidských ASC. Detekována byla produkce kolagenu I. Sledované intervaly byly 3. a 7. den. Produkce kolagenu I byla potvrzena u všech pozorovaných vzorků (Obrázek 25). Výsledky ukazují, že v produkci ECM není mezi statickou a dynamickou kultivací signifikantní rozdíl. Hladiny intenzity fluorescence jsou u všech vzorků obdobné. Pouze počet buněk je na vzorcích v podmínkách dynamické kultivace vyšší než při kultivaci statické. Produkce kolagenu I byla detekována i u vzorků kultivovaných v proliferačním médiu (Obrázek 26)



Obrázek 25: Lidské ASC, perikard, 3 a 7 dní

Porovnání statické (a, b, e, f) a dynamické (c, d, g, h) kultivace lidských ASC 3. a 7. den na decelularizovaném perikardu, diferenciační médium (a – h). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a, c, e, g) a kolagenu I (zelená, b, d, f, h). Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 WLL MP, objektiv x20, měřítko 25 μ m.



Obrázek 26: Lidské ASC, perikard, 3 a 7 dní

Lidské ASC, statická kultivace 3. a 7. den, proliferační médium (a – d). Imunofluorescenční barvení jader (modrá, a, c) a extracelulární matrix; kolagen I (zelená, b, d). Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 WLL MP, objektiv x20, měřítko 25 μm .

6 Diskuse

Cílem tkáňového inženýrství je tvorba funkčních náhrad schopných nahradit v těle pacienta chybějící nebo poškozenou tkáň. Tyto náhrady nesmí toxicky působit na organismus, naopak mají podporovat hojení a obnovování defektní tkáně a poskytovat pacientům komfort během procesu léčby. Současným trendem v tkáňovém inženýrství je využívání kmenových buněk, které jsou díky svým specifickým vlastnostem považovány za téměř ideální buněčnou složku pro tvorbu biokompatibilních náhrad. Kmenové buňky, alespoň některé jejich typy, jako jsou kmenové buňky tukové tkáně, lze ve srovnání s buňkami diferencovanými získat v autologní formě ve větším množství, expandovat je do vyšších kvantit a dále je působením vhodných faktorů diferencovat do požadovaných buněčných typů. Jedním z odvětví tkáňového inženýrství, které využívá kmenových buněk, je vaskulární tkáňové inženýrství. Vzhledem k tomu, že nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích jsou v současné době kardiovaskulární onemocnění, existuje zájem na zdokonalování a tvorbě nových strategií, které by vedly k úspěšné tvorbě vaskulárních náhrad (Nerem and Seliktar 2001). K těmto strategiím patří například vypracování a zavedení nových kultivačních metod, jako je například využívání kultivačních bioreaktorů, ve kterých je na buňky působeno mechanickou zátěží.

Buňky ve stěnách cév jsou v organismu nepřetržitě vystaveny krevnímu tlaku a dalším silám. Při cílené diferenciaci kmenových buněk do VSMC zajistí kultivace v bioreaktoru s mechanickou zátěží podmínky podobné fyziologickému prostředí v organismu, které při klasické statické kultivaci v jamkách kultivačních destiček, miskách a lahvích nejsou přítomny. In vitro můžeme na buňky působit dvěma základními typy mechanické zátěže; ekviaxiálním, při kterém působí mechanická stimulace na buňky rovnoměrně ve všech směrech a uniaxiálním, při kterém působí zátěž pouze v jednom směru. Uniaxiální namáhání lépe simuluje prostředí, kterému jsou za fyziologických podmínek buňky v těle vystaveny a podporuje diferenciaci do více buněčných typů (Haghighipour, Heidarian et al. 2012, Leong, Wu et al. 2012).

V současnosti neexistuje žádný ustálený postup pro kultivaci buněk v dynamických systémech; optimální tlakové a frekvenční parametry na diferenciaci kmenových buněk do buněk hladkého svalstva bylo proto nutné nalézt experimentálně. Navíc komerčně využívané bioreaktory mají pro dlouhodobější kultivaci buněk řadu nevýhod, především v neschopnosti udržet sterilní prostředí a možnosti inkubace velmi omezeného množství vzorků. Během dynamické kultivace dochází často k poškození buněčného materiálu, proto je výhodou

během tohoto typu kultivace možnost pozorování buněk v reálném čase, kterou většina komerčních dynamických kultivačních systémů postrádá. Znehodnocení buněčného materiálu odtržením se dá předejít nasazením buněk na vhodný nosič, který riziko oddělení buněk od podkladu může výrazně snižovat (Jeong, Kwon et al. 2005, Bilgen, Chu et al. 2013, Raveling, Theodossiou et al. 2018).

Vzhledem k těmto skutečnostem jsme při experimentech používali bioreaktor vlastní konstrukce (Obrázek 5), který splňoval většinu požadovaných podmínek; jeho stavba z transparentního materiálu umožňuje na rozdíl od systému STREX použitého ve studiích z let 2012 a 2014 snímání buněk mikroskopem v reálném čase, a oproti systému s mikroskopem STB-150 udržuje sterilní prostředí potřebné pro buněčnou kultivaci (He, Potter et al. 2012, Dhein, Schreiber et al. 2014, Kamble, Barton et al. 2016). Pro experimenty byly použity ASC, u kterých byla popsána schopnost diferenciaci do SMC (Kern, Eichler et al. 2006). Pro ustanovení optimální strategie kultivace kmenových buněk v bioreaktoru s mechanickou zátěží byly použity ASC ze dvou zdrojů; lidské a prasečí.

Mnoho studií prokázalo pozitivní vliv růstových faktorů TGF- β a BMP4 na diferenciaci kmenových buněk do SMC (Lagna, Ku et al. 2007, Wang, Yin et al. 2010, Tang, Yang et al. 2011, Mamo, Wittern et al. 2017). Studie z roku 2004 popsala vliv mechanického namáhání na diferenciaci kmenových buněk do SMC bez přítomnosti růstových faktorů; během aplikace ekvixiálního namáhání nedošlo k detekci markerů diferenciaci SMC, při aplikaci uniaxiálního namáhání byl detekován hladkosvalový α -aktin (Park, Chu et al. 2004). Další studie z roku 2004 popisuje pozitivní vliv uniaxiálního namáhání působícího 7 dní na produkci α -aktinu a h1-calponinu (Hamilton, Maul et al. 2004). Podobných výsledků bylo dosaženo v pracích z let 2009 a 2011, které dosáhly aplikací mechanické zátěže během kultivace kmenových buněk diferenciaci na buňky podobné VSMC (Ghazanfari, Tafazzoli-Shadpour et al. 2009, Jang, Lee et al. 2011). Studie z roku 2007 popisuje vliv kultivace s uniaxiálním namáháním působícím 7 dní bez a za přítomnosti TGF- β . Bez přítomnosti TGF- β došlo k inhibici proliferace, za přítomnost TGF- β docházelo k expresi markerů α -aktinu a h1-calponinu (Lee, Maul et al. 2007). Studie z roku 2008 zkoumala vliv mechanické zátěže po dobu dvou hodin. Pozorovány byly morfologické změny, markery diferenciaci se však detekovat nepodařilo. Na buňky byla aplikována zátěž s frekvencí v rozmezí 1 – 3 Hz (Ghazanfari, Tafazzoli-Shadpour et al. 2008). Wang a kolektiv ve své práci zkoumali produkci markerů diferenciaci SMC u kmenových buněk vystavených TGF- β a BMP4 po dobu 7 dní. V buňkách docházelo k expresi α -aktinu a h1-calponinu. Dále popisují, že mechanická stimulace buněk je nutná, aby nedocházelo ke ztrátě exprese příslušných markerů

a zastavení diferenciaci (Wang, Cen et al. 2010). Hamilton a kolektiv ve své studii z roku 2004 popisují, že buňky by měly být kultivované v diferenciacním médiu s mechanickou zátěží minimálně 3 dny, aby byla možná detekce markerů diferenciaci. Pro detekci pozdních markerů diferenciaci je nutná kultivace v delším časovém intervalu (Hamilton, Maul et al. 2004).

Na základě výše uvedených prací jsme se rozhodli buňky kultivovat v médiu na bázi DMEM obsahujícím TGF- β a BMP4 při aplikaci cyklického uniaxiálního mechanického zatížení a pozorovat vliv těchto faktorů na buněčnou diferenciaci. Sledované intervaly byly 3 a 7 dní.

Buňky byly nasazovány na tři typy nosičů; plazmované sklo, sklo s vrstvou fibrinu a decelularizovaný perikard. V literatuře jsou popsány systémy aplikující mechanickou zátěž v rozmezí od 60/40 mmHg do 130/80 mmHg (Opitz, Schenke-Layland et al. 2004, Engbers-Buijtenhuijs, Buttafoco et al. 2006, Zhang, Wang et al. 2009). Na základě těchto studií jsme v prvotních pokusech aplikovali mechanickou zátěž v hodnotách 130/80 mmHg, 120/70 mmHg a 110/80 mmHg, při frekvenci 1 Hz. Kultivace za těchto podmínek vedla u vzorků nasazených na plazmovaných sklech ve většině případů k odtržení buněčného materiálu. Podobných výsledků bylo dosaženo i u vzorků na skle s vrstvou fibrinu, kde byl buněčný materiál byl po třech dnech kultivace buď částečně, nebo zcela odtržen. U vzorků kultivovaných na decelularizovaném perikardu k ztrátě buněčného materiálu nedocházelo, nosič se během mechanické kultivace však deformoval. Toto pozorování odpovídá literatuře, 3D nosiče jsou vhodné pro kultivaci s vyšší mechanickou zátěží než 2D nosiče, dochází však k jejich deformaci (Xu, Ge et al. 2005). Ideální kultivační parametry jsme ustanovili na 100/80 mmHg s frekvencí 1 Hz. Za těchto podmínek jsme byli schopni kultivovat buňky do intervalu sedmi dní. Problematickým faktorem během dynamické kultivace byla výměna média. Bioreaktor musel být během výměny vypnut a odpojen, kultivační deska vyjmuta a přenesena do sterilního laminárního boxu, kde byla provedena výměna média. Během manipulace a vyjímání kultivační desky z bioreaktoru byly vzorky nechráněné a tím pádem náchylné k mikrobiální kontaminaci. V budoucnu plánujeme upravit bioreaktor tak, aby se riziko kontaminace během manipulování se vzorky minimalizovalo.

Při vypracování optimální kultivační strategie pro dynamickou kultivaci byla důležitým faktorem buněčná násada zkoumaných vzorků. V prvotních pokusech byla násada pro oba typy nosičů ze skla 100 tisíc buněk na cm^2 . Při těchto násadách docházelo, podobně jako u tlakové zátěže v rozmezí 110-130/70-80 mmHg, k odtrhávání buněčného materiálu za několik dní po nasazení. U násad s hustotou 75 tisíc buněk na cm^2 docházelo k podobnému

efektu, buněčný materiál se po několika dnech kultivace od podkladu odtrhl. Ideální násada byla stanovena na 30 tisíc buněk na cm^2 v 24-jamkových destičkách. Ideální používaná buněčná násada na decelularizovaný perikard byla stanovena na 75 tisíc buněk cm^2 v 6-jamkových kultivačních destičkách.

Za nejméně vhodný nosič pro kultivaci buněk v bioreaktoru s mechanickou zátěží můžeme po zhodnocení výše popsáných experimentů označit plazmované sklo. Tento nosič sice umožňuje analyzovat buněčný materiál po ukončení dynamické kultivace většinou molekulárně biologických metod, zároveň je velmi náchylný k odtrhávání buněčného materiálu, kterému nevytváří dostatečně silnou oporu. Jako ideální nosiče jsme po prvotních experimentech určili sklo s vrstvou fibrinu a decelularizovaný perikard. Fibrin je jako nosič v rámci tkáňového inženýrství hojně využíván při *in vivo* i *in vitro* experimentech. Popsán byl jeho vliv na zlepšení adheze a zvýšení buněčné proliferace. Buňky kultivované na skle s vrstvou fibrinu jsou méně náchylné k odtrhávání od podkladu (Mutsaers, Bishop et al. 1997, Jockenhoevel, Zund et al. 2001, Nair, Joseph et al. 2014). Posledním využívaným nosičem byl prasečí decelularizovaný perikard, který je v současnosti ve vaskulárním tkáňovém inženýrství využíván při rekonstrukcích srdečních chlopní a k tvorbě cévních náhrad (Morticelli, Thomas et al. 2013, Mallis, Michalopoulos et al. 2017) Nativní tkáň perikardu musí být kompletně zbavena buněčné složky a dobře promyta, aby mohla sloužit jako vhodný netoxický nosič nízkou imunogenní aktivitou (Obrázek 7). V současných studiích je uváděno, že decelularizací ztrácí tkáň až 90% své imunogenní aktivity, přičemž si decelularizované matrice zachovávají obdobné chemické složení, 3D strukturu i mechanické vlastnosti jako nativní tkáň (Schaner, Martin et al. 2004, Meyer, Nagendran et al. 2005, Wang, Lin et al. 2007). Proto jsou v současné době decelularizované matrice považovány za jedny z nejperspektivnějších nosičů buněk pro tkáňové inženýrství, a za výhodnější než matrice syntetické (Crapo, Gilbert et al. 2011). Decelularizované perikardy osazené kmenovými buňkami kultivované v bioreaktoru s mechanickou zátěží v naší laboratoři byly již úspěšně implantovány na poškozené cévy u potkanů a prasat ve formě záplat. Kmenové buňky perikardem mohou prorůstat, perikard je kompletně endotelizován.

Diferenciace ASC směrem k SMC se hodnotí pomocí produkce markerů diferenciace (Marra, Brayfield et al. 2011). Kultivace ASC byla prováděna v bioreaktoru s mechanickou zátěží s diferenciálním médiem. Paralelně probíhala kultivace buněk pouze v diferenciálním médiu bez mechanického zatěžování. Jako kontrola byly použity ASC kultivované v proliferačním médiu ve statických podmínkách. Navození diferenciace směrem k SMC se podařilo u všech sledovaných vzorků v diferenciálním médiu (Obrázek 8 – 19).

U lidských ASC kultivovaných na plazmovaném skle byl α -aktin pozorován ve třetí den statické i dynamické kultivace (Obrázek 8; c, d). Vláknina h1-calponinu byla detekována ve třetí den dynamické kultivace (Obrázek 8; f), u statické kultivace byl zelený signál h1-calponinu pozorovatelný jen u malého počtu buněk (Obrázek 8; e). Sedmý den kultivace byla vláknina h1-calponinu detekovatelná u obou způsobů kultivace, rozdíl mezi statickou a dynamickou kultivací byl minimální (Obrázek 9; e, f). Lze však přece jen vyvodit závěr, že dynamická kultivace urychlila tvorbu h1-calponinu v ASC.

Výsledky mikroskopie prasečích ASC se podobají lidským ASC. U prasečích ASC byl α -aktin detekován u statických i dynamických vzorků třetí i sedmý den. (Obrázek 10 a 11; c, d), vláknina h1-calponinu byla detekována 3 den dynamické kultivace (Obrázek 10; f), zelený signál h1-calponinu u statické kultivace byl dobře detekovatelný, struktura vláken ale na rozdíl od dynamické kultivace pozorována nebyla (Obrázek 10; e). Sedmý den kultivace byl vláknitý h1-calponin detekován u statické i dynamické kultivace (Obrázek 11; e, f). Vyzrálá forma h1-calponinu, který se vyskytuje až ve střední fázi diferenciaci, má podle literatury tvořit vláknina distribuovaná společně s vlákninou α -aktinu (Kashiwagi, Lindsey et al. 1997). Lze tedy shrnout, že dynamická kultivace urychlila vyzrání h1-calponinu u ASC diferencujících směrem k SMC. Jeden z faktorů ovlivňujících chování buněk byl věk prasat, ze kterých byly buňky izolovány. Buňky z šestiměsíčních prasat reagovaly lépe než lidské buňky z odběrů od dospělých pacientek ve věku kolem 40 let.

U vzorků kultivovaných na skle s vrstvou fibrinu jsme pozorovali podobný trend jako u vzorků z plazmovaného skle. Vyšší odolnost vzorků lidských ASC na skle s vrstvou fibrinu k odtržení umožnila analýzu pomocí Western blotu. U všech vzorků byl detekován α -aktin (Obrázek 12 a Obrázek 14, 15, 16, a 17; c, d), u dynamické kultivace jeho signál signifikantně silnější (Obrázek 13, Obrázek 14 – 17). Signifikantní nárůst h1-calponinu byl pozorován u lidských buněk třetího dne dynamické kultivace (Obrázek 13, Obrázek 14; f). Vláknina h1-calponinu byla pozorována u sedmého dne statické i dynamické kultivace. U prasečích buněk byla vláknina h1-calponinu dobře detekovatelná v obou intervalech statické i dynamické kultivace (Obrázek 16 a 17; e, f).

Práce původně předpokládala i stanovení těžkých řetězců myosinu, případně i smoothelinu jako pozdních markerů diferenciaci ASC směrem k SMC. Pozdní marker diferenciaci SM myosin heavy chain se však nepodařilo detekovat u buněk na obou typech skle ani na decelularizovaném perikardu, a to jak při statické, tak při dynamické kultivaci. Podle literatury byl pozdní marker smoothelin detekován po třech týdnech diferenciaci, SM myosin heavy chain byl detekován až po šesti týdnech diferenciaci (Salem, Hwie et al. 2013).

Plánem do budoucna je tedy prodloužení doby kultivace v bioreaktoru tak, aby bylo možné detekovat i pozdní markery diferenciaci. Popsán byl také pozitivní vliv overexpresie CaMK II na expresi pozdních markerů diferenciaci SMC (Aji, Maimaijiang et al. 2016).

U vzorků kultivovaných na decelularizovaném perikardu byl α -aktin detekován u všech vzorků (Obrázek 18 a 19; c, d), vlákna h1-calponinu byla se vyskytovala jen u malého počtu buněk třetího dne kultivace (Obrázek 18; e, f), dobře pozorovatelná byla u statické i dynamické kultivace sedmý den (Obrázek 19; e, f).

U žádné z kontrol kultivovaných v proliferačním médiu nebyla zaznamenána přítomnost markerů diferenciaci do SMC (Obrázek 8 – 11 a 14 – 19). Z tohoto výsledku lze vyvodit závěr, že rozhodující vliv na zahájení diferenciaci ASC směrem k SMC mělo složení kultivačního média; dynamická kultivace pak jen tento směr diferenciaci dále urychlovala. Další faktor, který by v budoucnu mohl pozitivně ovlivnit diferenciaci ASC směrem k SMC je případná kultivace společně s buňkami endotelu (Liu, Kennard et al. 2009).

Produkce extracelulární matrix byla hodnocena na všech třech typech nosičů. Studie z roku 2016 popisuje pozitivní vliv mechanické stimulace a kultivace v přítomnosti TGF- β na diferenciaci ASC do SMC, zároveň popisuje, že produkce kolagenu I byla detekována u staticky a dynamicky kultivovaných vzorků, ale i u vzorků kultivovaných v nediferenciačním médiu (Parvizi, Bolhuis-Versteeg et al. 2016). To potvrzují i naše výsledky. Produkce kolagenu I a fibronektinu byla detekována u dynamické i statické kultivace vzorků kultivovaných na plazmovaném skle i skle s vrstvou fibrinu (Obrázek 20, 21, 22 a 23). Na plazmovaném skle byla překvapivě imunofluorescence kolagenu I i fibronektinu nižší u buněk kultivovaných v dynamickém systému, ačkoli lze předpokládat, že mechanické zatížení buněk bude spíše zvyšovat produkci ECM. Například u VSMC v cévách při hypertenzi byla pozorována zvýšená syntéza kolagenu a fibronektinu, což vedlo ke zvyšování tuhosti cévní stěny (Bacakova, Trávníčková et al. 2018). Na druhé straně však dynamická kultivace mohla bránit depozici kolagenu a fibronektinu na plazmovaná skla, nebo byly molekuly ECM náchylné k odtržení a uvolnění do média, podobně jako buňky. Situace se zlepšila po nanesení fibrinu na skla. V tomto případě se rozdíl v depozici ECM buňkami při statické a dynamické zmírnil, ba dokonce se v některých případech stala depozice ECM na skla s fibrinem výraznější u buněk v dynamickém systému. O fibrinu je známo, že má vazebná místa pro fibronektin a další proteiny (Bacakova, Musilkova et al. 2016), což se mohlo pozitivně uplatnit i v naší studii pro zvýšení depozice sledovaných molekul ECM na sklech s fibrinem v dynamickém kultivačním systému. Rovněž u buněk kultivovaných v proliferačním médiu byl detekován kolagen I i fibronektin (Obrázek 24). Produkce kolagenu I byla potvrzena i u buněk

kultivovaných na decelularizovaném perikardu (Obrázek 25) i při kultivaci v proliferačním médiu, které diferenciaci ASC směrem k SMC nepodporuje (Obrázek 26).

Výsledky dohromady ukazují, že kultivace s mechanickou zátěží za přítomnosti TGF- β má pozitivní vliv na diferenciaci ASC směrem k SMC. Hlavní rozdíly mezi statickou a dynamickou kultivací se projevují třetí den kultivace, kdy dynamicky kultivované buňky exprimují více hladkosvalového α -aktinu a jsou u nich pozorovatelná vyžralá vlákna h1-calponinu. U kontrol v proliferačním médiu nebyly markery SMC detekované.

7 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo vypracovat funkční strategii pro kultivaci kmenových buněk v bioreaktoru s mechanickou zátěží podporující diferenciaci do buněk hladké svaloviny. Optimální podmínky pro kultivaci kmenových buněk se sérií experimentů podařilo stanovit, buňky byly kultivovány v médiu na bázi DMEM obsahujícím růstové faktory TGF- β a BMP4, aplikovaná mechanická zátěž byla 100/80 mmHg, frekvence 1 Hz. Buněčná násada pro lidské i prasečí ASC kultivované na plazmovaném skle a skle s vrstvou fibrinu byla 30 tis.b./cm², u buněk nasazených na decelularizovaný perikard perikard 75 tis.b./cm².

V další části práce se podařilo navodit diferenciaci směrem k SMC u všech pozorovaných vzorků. Diferenciace se hodnotila pomocí detekce markerů diferenciace imunofluorescenčním barvením, vlákna časného markeru α -aktinu byla detekována u všech vzorků. Vlákna středního markeru h1-calponinu byla detekována u všech vzorků 7 den statické i dynamické kultivace, u vzorků inkubovaných 3 dny byla detekována u buněk vystavených mechanické zátěži. U žádného ze vzorků nebyl detekován pozdní marker SM myosin heavy chain potvrzující přítomnost maturovaných hladkosvalových buněk. Z dosažených výsledků můžeme usuzovat, že pozorovaný trend je správný, ale pro dosažení plně diferenciovaných SMC je potřebná delší doba kultivace.

Produkce extracelulární matrix byla rovněž detekována u všech pozorovaných vzorků, kolagen I byl buňkami produkován i při kultivaci v médiu které nepodporovalo diferenciaci.

V rámci analýzy markerů diferenciace a produkce extracelulární matrix je v budoucnu potřeba provést další experimenty pro detailní objasnění rozdílů mezi statickou a dynamickou kultivací.

8 Seznam použité literatury

Aji, K., et al. (2016). "Differentiation of Human Adipose Derived Stem Cells into Smooth Muscle Cells Is Modulated by CaMKII γ ." Stem cells international **2016**: 1267480-1267480.

Alini, M., et al. (2003). "The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix." Spine (Phila Pa 1976) **28**(5): 446-454; discussion 453.

Assmann, A., et al. (2013). "Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating." Biomaterials **34**(25): 6015-6026.

Bacakova, L., et al. (2018). The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. K. Sakuma. London, United Kingdom
IntechOpen: 229-256.

Bacakova, L., et al. (2018). "Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review." Biotechnol Adv **36**(4): 1111-1126.

Bacakova, M., et al. (2016). "The potential applications of fibrin-coated electrospun polylactide nanofibers in skin tissue engineering." Int J Nanomedicine **11**: 771-789.

Basu, D. and R. Kulkarni (2014). "Overview of blood components and their preparation." Indian journal of anaesthesia **58**(5): 529-537.

Bilgen, B., et al. (2013). "Design of a biaxial mechanical loading bioreactor for tissue engineering." Journal of visualized experiments : JoVE(74): e50387-e50387.

Boccafroschi, F., et al. (2005). "Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering." Biomaterials **26**(35): 7410-7417.

Boerth, N. J., et al. (1997). "Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype." Journal of Vascular Research **34**(4): 245-259.

Braddon, L. G., et al. (2002). "Maintenance of a functional endothelial cell monolayer on a fibroblast/polymer substrate under physiologically relevant shear stress conditions." Tissue Eng **8**(4): 695-708.

Ceccarelli, J. and A. J. Putnam (2014). "Sculpting the blank slate: how fibrin's support of vascularization can inspire biomaterial design." Acta Biomater **10**(4): 1515-1523.

Crapo, P. M., et al. (2011). "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." Biomaterials **32**(12): 3233-3243.

Crisan, M., et al. (2008). "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs." Cell Stem Cell **3**(3): 301-313.

Crupi, A., et al. (2015). "Inflammation in tissue engineering: The Janus between engraftment and rejection." Eur J Immunol **45**(12): 3222-3236.

Dhein, S., et al. (2014). "Mechanical control of cell biology. Effects of cyclic mechanical stretch on cardiomyocyte cellular organization." Progress in Biophysics and Molecular Biology **115**(2): 93-102.

- Elder, B. D., et al. (2010). "Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement." Neurosurgery **66**(4): 722-727; discussion 727.
- Engbers-Buijtenhuijs, P., et al. (2006). "Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor." Biomaterials **27**(11): 2390-2397.
- Estes, B. T., et al. (2010). "Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype." Nat Protoc **5**(7): 1294-1311.
- Frantz, C., et al. (2010). "The extracellular matrix at a glance." Journal of cell science **123**(Pt 24): 4195-4200.
- Friedenstein, A. J., et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Garat, C., et al. (2000). "Induction of smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells by arginine vasopressin is mediated by c-Jun amino-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **275**(29): 22537-22543.
- Ghazanfari, S., et al. (2009). "Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **388**(3): 601-605.
- Ghazanfari, S., et al. (2008). Morphological Changes of Mesenchymal Stem Cells by Cyclic Stretch. 2008 International Conference on BioMedical Engineering and Informatics.
- Girotti, A., et al. (2011). "Elastin-like recombinamers: biosynthetic strategies and biotechnological applications." Biotechnol J **6**(10): 1174-1186.
- Gurkan, U. A. and O. Akkus (2008). "The mechanical environment of bone marrow: a review." Ann Biomed Eng **36**(12): 1978-1991.
- Haghighipour, N., et al. (2012). "Differential effects of cyclic uniaxial stretch on human mesenchymal stem cell into skeletal muscle cell." Cell Biol Int **36**(7): 669-675.
- Hamilton, D. W., et al. (2004). "Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: implications for vascular tissue-engineering applications." Tissue Eng **10**(3-4): 361-369.
- He, Z., et al. (2012). "Stretch of human mesothelial cells increases cytokine expression." Adv Perit Dial **28**: 2-9.
- Herbert, S. P. and D. Y. R. Stainier (2011). "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis." Nature reviews. Molecular cell biology **12**(9): 551-564.
- Hill, K. L., et al. (2010). "Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function." Exp Hematol **38**(3): 246-257.e241.
- Hirst, S. J., et al. (2000). "Differential Effects of Extracellular Matrix Proteins on Human Airway Smooth Muscle Cell Proliferation and Phenotype." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **23**(3): 335-344.
- Howard, D., et al. (2008). "Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds." Journal of anatomy **213**(1): 66-72.

- Huang, A. H. and L. E. Niklason (2014). "Engineering of arteries in vitro." Cell Mol Life Sci **71**(11): 2103-2118.
- Huang, Y., et al. (2010). "Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells." Arch Med Res **41**(7): 497-505.
- Chan, B. P. and K. W. Leong (2008). "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations." European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society **17 Suppl 4**(Suppl 4): 467-479.
- Chlupac, J., et al. (2014). "Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress." Physiol Res **63**(2): 167-177.
- Ito, S., et al. (1997). "Inhibitory effect of type 1 collagen gel containing alpha-elastin on proliferation and migration of vascular smooth muscle and endothelial cells." Cardiovasc Surg **5**(2): 176-183.
- Jang, J. Y., et al. (2011). "Combined effects of surface morphology and mechanical straining magnitudes on the differentiation of mesenchymal stem cells without using biochemical reagents." J Biomed Biotechnol **2011**: 860652.
- Jeong, S. I., et al. (2005). "Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds." Biomaterials **26**(12): 1405-1411.
- Jockenhoevel, S., et al. (2001). "Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering." Eur J Cardiothorac Surg **19**(4): 424-430.
- Kamble, H., et al. (2016). "Cell stretching devices as research tools: Engineering and biological considerations." Lab Chip **16**.
- Kashiwagi, K., et al. (1997). "Calponin distribution in human ciliary muscle and other anterior segment tissues." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(2): 349-356.
- Kern, S., et al. (2006). "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue." STEM CELLS **24**(5): 1294-1301.
- Kim, J.-H., et al. (2013). "A Review of Signal Transduction in Mechanisms of Smooth Muscle Contraction and Its Relevance for Specialized Physical Therapy." Journal of Physical Therapy Science **25**(1): 129-141.
- Kolehmainen, K. and S. M. Willerth (2012). "Preparation of 3D fibrin scaffolds for stem cell culture applications." Journal of visualized experiments : JoVE(61): e3641-e3641.
- Lagna, G., et al. (2007). "Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors." J Biol Chem **282**(51): 37244-37255.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Lee, W. C., et al. (2007). "Effects of uniaxial cyclic strain on adipose-derived stem cell morphology, proliferation, and differentiation." Biomech Model Mechanobiol **6**(4): 265-273.

- Lehman, W. and K. G. Morgan (2012). "Structure and dynamics of the actin-based smooth muscle contractile and cytoskeletal apparatus." Journal of muscle research and cell motility **33**(6): 461-469.
- Leong, W. S., et al. (2012). "Cyclic tensile loading regulates human mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like phenotype." J Tissue Eng Regen Med **6 Suppl 3**: s68-79.
- Li, L., et al. (1996). "SM22 α , a Marker of Adult Smooth Muscle, Is Expressed in Multiple Myogenic Lineages During Embryogenesis." Circulation Research **78**(2): 188-195.
- Li, X., et al. (2009). "Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension." Nature Medicine **15**: 1289.
- Liu, H., et al. (2009). "NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1." Circ Res **104**(4): 466-475.
- Mallis, P., et al. (2017). "Histological and biomechanical characterization of decellularized porcine pericardium as a potential scaffold for tissue engineering applications." Biomed Mater Eng **28**(5): 477-488.
- Mamo, T. M., et al. (2017). "BMP4 uses several different effector pathways to regulate proliferation and differentiation in the epithelial and mesenchymal tissue compartments of the developing mouse ureter." Hum Mol Genet **26**(18): 3553-3563.
- Marra, K. G., et al. (2011). "Adipose stem cell differentiation into smooth muscle cells." Methods Mol Biol **702**: 261-268.
- Meyer, S. R., et al. (2005). "Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(2): 469-476.
- Miralles, F., et al. (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." Cell **113**(3): 329-342.
- Mitchell, J. B., et al. (2006). "Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers." STEM CELLS **24**(2): 376-385.
- Morticelli, L., et al. (2013). "Investigation of the suitability of decellularized porcine pericardium in mitral valve reconstruction." J Heart Valve Dis **22**(3): 340-353.
- Mozaffarian, D., et al. (2016). "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **133**(4): 447-454.
- Mulvany, M. J. and C. Aalkjaer (1990). "Structure and function of small arteries." Physiol Rev **70**(4): 921-961.
- Muschler, G. F., et al. (2001). "Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors." J Orthop Res **19**(1): 117-125.
- Mutsaers, S. E., et al. (1997). "Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis." Int J Biochem Cell Biol **29**(1): 5-17.
- Nair, R. P., et al. (2014). "Contribution of fibroblasts to the mechanical stability of in vitro engineered dermal-like tissue through extracellular matrix deposition." Biores Open Access **3**(5): 217-225.
- Nerem, R. M. and D. Seliktar (2001). "Vascular tissue engineering." Annu Rev Biomed Eng **3**: 225-243.

- Novotna, K., et al. (2013). "Cellulose-based materials as scaffolds for tissue engineering." Cellulose **20**(5): 2263-2278.
- Opitz, F., et al. (2004). "Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells." Ann Biomed Eng **32**(2): 212-222.
- Orbay, H., et al. (2012). "Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications." Stem cells international **2012**: 461718-461718.
- Pajorova, J., et al. (2018). "Morphology of a fibrin nanocoating influences dermal fibroblast behavior." Int J Nanomedicine **13**: 3367-3380.
- Park, J. S., et al. (2004). "Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells." Biotechnol Bioeng **88**(3): 359-368.
- Parvizi, M., et al. (2016). "Efficient generation of smooth muscle cells from adipose-derived stromal cells by 3D mechanical stimulation can substitute the use of growth factors in vascular tissue engineering." Biotechnol J **11**(7): 932-944.
- Pedersen, J. A. and M. A. Swartz (2005). "Mechanobiology in the third dimension." Ann Biomed Eng **33**(11): 1469-1490.
- Pinheiro, C. H., et al. (2012). "Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle." Stem Cell Rev **8**(2): 363-374.
- Pontikoglou, C., et al. (2011). "Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation." Stem Cell Rev **7**(3): 569-589.
- Prosser, C. L. (1982). "Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge: edited by Edith Bülbring, Alison F. Brading, Allan W. Jones and Tadao Tomita, Edward Arnold, 1981.£45 (xii + 563 pages) ISBN 0 7131 4348 7." Trends in Neurosciences **5**: 254.
- Przekora, A., et al. (2017). "Evaluation of the potential of chitosan/beta-1,3-glucan/hydroxyapatite material as a scaffold for living bone graft production in vitro by comparison of ADSC and BMDSC behaviour on its surface." Biomed Mater **12**(1): 015030.
- Qiu, P., et al. (2005). "Myocardin Enhances Smad3-Mediated Transforming Growth Factor- β 1 Signaling in a CArG Box-Independent Manner." Circulation Research **97**(10): 983-991.
- Raveling, A. R., et al. (2018). "A 3D printed mechanical bioreactor for investigating mechanobiology and soft tissue mechanics." MethodsX **5**: 924-932.
- Reusch, P., et al. (1996). "Mechanical Strain Increases Smooth Muscle and Decreases Nonmuscle Myosin Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells." Circulation Research **79**(5): 1046-1053.
- Robertson, A. and P. Watton (2013). Chapter 8: Mechanobiology of the Arterial Wall: 275-347 (273 pages).
- Rush, D. S., et al. (2001). "h-Caldesmon, a novel smooth muscle-specific antibody, distinguishes between cellular leiomyoma and endometrial stromal sarcoma." Am J Surg Pathol **25**(2): 253-258.

- Salem, S. A., et al. (2013). "Human adipose tissue derived stem cells as a source of smooth muscle cells in the regeneration of muscular layer of urinary bladder wall." The Malaysian journal of medical sciences : MJMS **20**(4): 80-87.
- Salgado, A. J., et al. (2010). "Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine." Curr Stem Cell Res Ther **5**(2): 103-110.
- Serbo, J. V. and S. Gerecht (2013). "Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis." Stem Cell Research & Therapy **4**(1): 8.
- Shi, S. and S. Gronthos (2003). "Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp." Journal of Bone and Mineral Research **18**(4): 696-704.
- Shier, D., et al. (2006). Hole's Human Anatomy & Physiology, McGraw-Hill College.
- Schaner, P. J., et al. (2004). "Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering." J Vasc Surg **40**(1): 146-153.
- Song, H. H. G., et al. (2018). "Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise." Cell Stem Cell **22**(3): 340-354.
- Straka, F., et al. (2018). "A human pericardium biopolymeric scaffold for autologous heart valve tissue engineering: cellular and extracellular matrix structure and biomechanical properties in comparison with a normal aortic heart valve." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **29**(6): 599-634.
- Stull, J. T., et al. (1993). "Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca²⁺ desensitization." Mol Cell Biochem **127-128**: 229-237.
- Syamaladevi, D. P., et al. (2012). "Structural and functional insights on the Myosin superfamily." Bioinformatics and biology insights **6**: 11-21.
- Tang, Y., et al. (2011). "Mechanisms of TGF- β -Induced Differentiation in Human Vascular Smooth Muscle Cells." Journal of Vascular Research **48**(6): 485-494.
- Thakali, K. M., et al. (2007). Chapter 19 - Arterial and Venous Function in Hypertension. Comprehensive Hypertension. G. Y. H. Lip and J. E. Hall. Philadelphia, Mosby: 205-212.
- Thottappillil, N. and P. D. Nair (2015). "Scaffolds in vascular regeneration: current status." Vascular health and risk management **11**: 79-91.
- Toosi, S., et al. (2016). "PGA-incorporated collagen: Toward a biodegradable composite scaffold for bone-tissue engineering." Journal of Biomedical Materials Research Part A **104**(8): 2020-2028.
- Toyserkani, N. M., et al. (2015). "Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing?" Ann Plast Surg **75**(1): 117-123.
- Tremblay, F. and A. Marette (2001). "Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells." J Biol Chem **276**(41): 38052-38060.
- Wang, C., et al. (2010). "A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells." Biomaterials **31**(4): 621-630.

- Wang, C., et al. (2010). "Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4." Tissue Eng Part A **16**(4): 1201-1213.
- Wang, X., et al. (2007). "Development of small-diameter vascular grafts." World J Surg **31**(4): 682-689.
- Webb, R. C. (2003). "Smooth muscle contraction and relaxation." Adv Physiol Educ **27**(1-4): 201-206.
- Wu, X., et al. (2007). "Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering." Journal of Biomedical Materials Research Part A **81A**(1): 59-65.
- Xie, C. Q., et al. (2007). "A highly efficient method to differentiate smooth muscle cells from human embryonic stem cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): e311-312.
- Xu, J., et al. (2005). "Tissue-engineered vessel strengthens quickly under physiological deformation: application of a new perfusion bioreactor with machine vision." J Vasc Res **42**(6): 503-508.
- Ye, Q., et al. (2000). "Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering." European Journal of Cardio-Thoracic Surgery **17**(5): 587-591.
- Zhang, X., et al. (2009). "Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts." Biomaterials **30**(19): 3213-3223.