

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**

Studijní program: biologie

Studijní obor: buněčná a vývojová biologie



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Využití kmenových buněk v inženýrství kostní tkáně  
Application of the stem cells in bone tissue engineering**

Bc. Nikola Kročilová

Školitelka: Doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

**Praha 2016**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Doc. MUDr. Lucie Bačákové, CSc. a s pomocí citované literatury. Tato práce, ani jakákoliv její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praze dne 28. 4. 2016

Bc. Nikola Kročilová .....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za odborné vedení, cenné rady při vypracovávání mé diplomové práce a stejně tak za její kladný přístup a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat mým spolupracovníkům z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR a to zejména Věře Lisé, prom. biol., Ivaně Zajanové, RNDr. Martinu Pařízkovi, Ph.D., Ing. Janě Zárubové, Ph.D. a RNDr. Martě Vandrovcové, Ph.D., za jejich pomoc při práci v laboratoři a při interpretaci výsledků. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za velkou podporu jak při psaní mé diplomové práce, tak během celého studia.

Projekt byl podporován Ministerstvem Zdravotnictví (grant č. 15-33018A), Grantovou Agenturou (grant č. P108/12/G108) a Technologickou Agenturou (grant č. TA04011214) České Republiky.

## Abstrakt

Problémy spojené s pohybovým aparátem, ať už se jedná o vrozené vady, fraktury, opotřebení věkem či poškození kostní tkáně vlivem zánětlivých a nádorových onemocnění, v ortopedii neustále přibývají. Ne vždy je kostní tkáň schopna dostatečné regenerace pro udržení její fyziologické funkce v organismu. Z tohoto důvodu je použití kostních náhrad nezbytné a v dnešní době již zcela běžné. I navzdory intenzivnímu výzkumu a testování celé řady potenciálních biomateriálů a jejich kombinací, je používání kovových materiálů pro výrobu kostních implantátů dnes zlatým standardem. Ke komerčně používaným kovovým materiálům patří slitina titanu Ti-6Al-4V, která je známá svou vysokou mechanickou a chemickou odolností a dobrou biokompatibilitou. Pro dobré přijetí kostního implantátu organismem pacienta je klíčová jeho schopnost osteointegrace do okolní kostní tkáně. Tato schopnost, je zejména v případě kovů, velmi dobře ovlivnitelná povrchovou strukturou materiálu. Jak známo z předchozích studií, povrchová topografie materiálu je důležitým faktorem ovlivňujícím adhezi a proliferaci kostních buněk, a tyto buňky jsou schopné velmi dobře rozlišovat mezi různými stupni drsnosti materiálu. Z tohoto důvodu jsme se i my zaměřili na studium vlivu povrchových úprav kovových materiálů (tj. drsnosti, smáčivosti a polarity) k nalezení co nejlepší schopnosti osteointegrace, mechanické a chemické odolnosti budoucího kostního implantátu a stejně tak i podpory regenerace kostní tkáně buňkami vlastními.

Může se zdát, že problémy s narůstající obezitou v lidské populaci a léčba defektů kostní tkáně nemají nic společného, avšak odběrem nadbytečné tukové tkáně lze pomoci nejen obéznímu pacientovi, ale i člověku s poruchami pohybového aparátu. Řešení je ukryto v mezenchymálních kmenových buňkách, které jsou přítomny v tukové tkáni neboli ASCs (adipose-derived stem cells). Tyto dospělé kmenové buňky mají značný potenciál vzhledem k jejich schopnosti diferencovat to řady buněčných typů, imunomodulačním účinkům a sekreci řady důležitých látek pozitivně ovlivňujících hojení. ASCs jsou dnes díky těmto vlastnostem středem zájmu. Díky recyklaci jinak odpadní tukové tkáně lze použít tukové kmenové buňky i pro účely kostního tkáňového inženýrství, kde mohou být po jejich osteogenní diferenciaci aplikovány na kostní implantáty. Implantáty obohacené o diferencované kmenové buňky pak mohou v těle pacienta podpořit přirozenou osteogenezi a kvalitnější osteointegraci. V rámci této diplomové práce jsme zjistili, že výše negativního tlaku použitého během liposukce, má velký vliv na vlastnosti získaných kmenových buněk. Buňky izolované při nižším negativním tlaku (-200 mmHg), měly nižší proliferativní aktivitu, ale vyšší schopnost osteogenní diferenciaci. Na druhou stranu kmenové buňky izolované při vyšším negativním tlaku (-700 mmHg), proliferovaly mnohem rychleji, ale byly horší v případě diferenciaci směrem k osteoblastům.

**Klíčová slova:** ASCs, slitina Ti-6Al-4V, buněčná adheze, osteogenní diferenciaci, FGF-2

## **Abstract**

Problems with musculoskeletal system, such as of developmental disorders, fractures or damage of the bone by age, inflammatory or tumor diseases, are still increasing in orthopaedics. Sometimes the bone tissue is not capable to completely regenerate to exert its physiological function in the organism. For this reason, using the bone replacements is necessary and common nowadays. Despite of an intensive research and testing of a wide range of the potential biomaterials and their combinations, the usage of metal materials for construction of the bone implants, still remains to be the gold standard. Ti-6Al-4V alloy is one of the commercially used metal materials, which is known for the high mechanical and chemical resistance and a good biocompatibility. For a good biological response of the patient's organism for the bone implant, is an ability of osteointegration into the surrounding bone tissue, the key. This ability can be influenced in the case of the metals, by their surface structure. As it is known from earlier studies, the surface topography of the material is very important for the adhesion and proliferation of the bone cells, which are able to discriminate, very sensitively, between various stages of the material surface roughness. For this reason we have focused on studying of an influence of the surface modifications of the metal materials (like roughness, wettability and polarity) for the best osteointegration, mechanical and chemical endurance of the prospective bone implant and the support of the bone tissue regeneration by its own cells.

It seems that the problems with an increasing obesity in the human population and the treatment of the bone defects have nothing in common, but by the consumption of an abundant fat tissue we can help not only the obese patient, but also to the person with musculoskeletal system disorders. The solution is hidden in the mesenchymal stem cells, which are present in a fat tissue, called ASCs (adipose-derived stem cells). These adult stem cells have a big potential thanks to their ability to differentiate into many different cell types, immunomodulatory effects and the secretion of an important chemicals which are influencing the healing in the body in a positive way. ASCs are nowadays thanks to these properties in the centre of an interest. Thanks to the recycling of consumed fat tissue, which is normally going to waste, we can use the adipose-derived stem cells also for bone tissue engineering, where can be these cells applied on the bone implants after their osteogenic differentiation. After that, the implants, which are colonized by the differentiated stem cells, can support natural osteogenesis and better osteointegration of the implant. In this diploma thesis we have found out that the amount of the negative pressure used during the liposuction, have a big influence on the properties of the isolated stem cells. The cells which were obtained under lower negative pressure (-200 mmHg), had lower proliferation activity, but higher ability of osteogenic differentiation. On the other hand stem cells isolated under higher negative pressure (-700 mmHg), have been proliferating much faster, but they have been worse in case of the differentiation into the osteoblasts.

**Key words:** ASCs, Ti-6Al-4V alloy, cell adhesion, osteogenic differentiation, FGF-2

## Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Seznam použitých zkratk</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>2. Cíle práce</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>3. Teoretický úvod</b> .....   | <b>11</b> |
| 3. 1 Tkáňové inženýrství kosti z historického hlediska .....  | 11        |
| 3. 2 Materiály používané pro kostní tkáňové inženýrství.....  | 13        |
| 3. 2. 1 Polymery .....  | 13        |
| 3. 2. 2 Keramika.....   | 16        |
| 3. 2. 3 Kovy.....   | 18        |
| 3. 2. 4 Kompozity.....  | 20        |
| 3. 2. 5 Komunikace mezi buňkou a materiálem.....  | 23        |
| 3. 2. 6 Mezenchymální kmenové buňky .....   | 24        |
| <b>4. Experimentální část</b> .....   | <b>27</b> |
| 4. 1 Materiál a metody .....  | 27        |
| 4. 1. 1 Materiál .....  | 27        |
| 4. 1. 2 Použité typy buněk a kultivační podmínky.....   | 31        |
| 4. 1. 3 Izolace kmenových buněk tukové tkáně .....  | 33        |
| 4. 1. 4 Fenotypizace ASCs pomocí metody průtokové cytometrie.....   | 34        |
| 4. 1. 5 Stanovení adheze a růstu kmenových buněk tukové tkáně na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami .....                               | 35        |
| 4. 1. 6 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciaci ASCs.....  | 36        |
| 4. 1. 7 Stanovení mineralizace extracelulární matrix během osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí histologického barvení Alizarin Red S .....    | 39        |
| 4. 1. 8 Stanovení genové exprese markerů osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR.....                          | 40        |
| 4. 1. 9 Ověření vlivu fibroblastového růstového faktoru FGF-2 na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR ..... | 43        |
| 4. 1. 10 Statistická analýza.....   | 43        |
| <b>5. Výsledky</b> .....  | <b>44</b> |
| 5. 1 Rozdíly v proliferaci kmenových buněk tukové tkáně získaných liposukcí při nízkém a vysokém negativním tlaku (ASCs-N a ASCs-V) .....                             | 44        |
| 5. 2 Charakterizace ASCs- N a ASCs-V pomocí průtokové cytometrie .....  | 47        |
| 5. 3 Srovnání adheze a růstu kmenových buněk tukové (ASCs-L, ASCs-V) na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami.....                         | 50        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5. 4 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně na mikroskopických krycích sklech .....   | 56        |
| 5. 5 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně N a V na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými modifikacemi ..... | 59        |
| 5. 6 Stanovení mineralizace extracelulární matrix během osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí histologického barvení Alizarin Red S .....                    | 62        |
| 5. 7 Stanovení genové exprese markerů osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR .....   | 66        |
| 5. 8 Ověření vlivu fibroblastového růstového faktoru FGF-2 na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR .....                 | 68        |
| <b>6. Diskuze.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>7. Závěr .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>8. Seznam použité literatury.....</b>   | <b>76</b> |

## 1. Seznam použitých zkratk

AFM – mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)

ALP – alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)

APC – alofykocyanin (allophycocyanin)

ASCs – kmenové buňky tukové tkáně (adipose-derived stem cells)

BMP – kostní morfogenetický protein (bone morphogenic protein)

BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)

CD – diferenciační skupina (cluster of differentiation)

cDNA – komplementární DNA (complementary DNA)

CFU – esej pro jednotky tvořící kolonie (colony forming unit assay)

Ct – prahový cyklus (cycle treshold)

DD – destilovaná deionizovaná voda (distilled, deionized water)

DMEM – Eaglovo minimální esenciální médium modifikované Dulbeccem (Dublecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium)

DMSO – dimetylsulfoxid

ECM – extracelulární matrix (extracellular matrix)

FBS – fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)

FITC – fluorescenční isothiokyanatát (fluorescein isothiocyanate)

GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

HA – hydroxyapatit (hydroxyapatite)

KOL I – kolagen I

MG-63 – buňky linie lidských osteoblastů (Human osteoblast-like MG-63 cells)

M-MuLV – virus Moloneyho myši leukemie (Moloney Murine Leukemia Virus)

MSCs – mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)

OS – osteogenní

OST – osteokalcin (osteocalcein)

PBS – roztok pufrovaný fosfáty, fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)



PE – fykoerytrin (phycoerythrin)

PECAM – endoteliální adhezní molekula odvozená z krevních destiček (platelet-endothelial cell adhesion molecule)

PGA – kyselina polyglykolová (polyglycolic acid)

PLA – kyselina polylaktidová (polylactic acid)

RunX - transkripční faktor příbuzný Runt genu (Runt-related transcription factor)

S.E.M. – střední chyba průměru (Standart Error of Mean)

Saos-2 – buňky linie lidského osteosarkomu (Human Osteogenic Sarcoma cells), tato zkratka je uvedena v katalogu buněčných linií ATCC

SEM – skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)

SVF – stromální vaskulární frakce (stromal vascular fraction)

## 2. Cíle práce

- Otestovat biokompatibilitu slitiny titanu Ti-6Al-4V (standardně používaná pro kostní implantáty) s novými povrchovými úpravami z hlediska adheze, viability a proliferační aktivity mezenchymálních kmenových buněk tukové tkáně ve srovnání s komerčně dostupnými buněčnými liniemi lidských osteoblastů MG-63 a Saos-2.
- Posoudit vliv parametrů metody liposukce, konkrétně velikosti použitého negativního tlaku, na vlastnosti získaných kmenových buněk tukové tkáně. Byla porovnána výtěžnost, proliferační aktivita, diferenciací potenciál a fenotypické vyžrávání kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém a vysokém negativním tlaku.
- Pokusit se diferencovat kmenové buňky tukové tkáně pomocí složení kultivačního média směrem k osteoblastům a kvantifikovat vybrané markery osteogenní diferenciaci, jako je aktivita a množství alkalické fosfatázy, kolagenu I a osteokalcinu. Navíc stanovit i míru mineralizace extracelulární matrix buněk prostřednictvím vizualizace a kvantifikace vápníkových depozitů.

### 3. Teoretický úvod

#### 3.1 Tkáňové inženýrství kosti z historického hlediska

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární vědní obor na pomezí biologie, medicíny, chemie a fyziky, zabývající se náhradou poškozené části těla, tj. tkáně či orgánu. Ač je toto vědní odvětví pokládáno v současnosti za nové, dle archeologických nálezů tomu tak není. Především v oblasti tkáňového inženýrství kosti, bylo nalezeno mnoho důkazů o tom, že se již naši předci touto tematikou zabývali.

Nejvíce důkazů o snaze nahradit poškozenou kost a zlepšit tak zdravotní stav nemocného bylo nalezeno na lebce (tzv. kranioplastika), čemuž předcházela trepanace, jakožto jeden z nejstarších operačních úkonů vůbec. Trepanace spočívala ve vytvoření otvoru v lebeční kosti. Tato metoda se používala v dřívějších dobách, zejména pro odstranění bolestí hlavy, která mohla být způsobena vysokým nitrolebečním tlakem, dále pro léčbu zlomených kostí či pro odstranění některých psychických poruch. Počátky trepanace jsou odhadovány až do prehistorických neolitických dob před 10 000 – 7 000 lety. Důkazy byly nalezeny zejména na lebkách Keltů z doby kamenné ve Francii a Inků z Peru. Tyto kultury si však metodu musely dobře osvojit, jelikož přežívalo poměrně vysoké procento takto ošetřených jedinců. Trepanace byly prováděny tak, aby nedošlo k poškození mozku a usmrcení léčeného. Jak již bylo dříve řečeno, právě tato metoda předcházela léčbě defektů v lebeční kosti pomocí různých materiálů. Používanými materiály byly zejména kovy, jako zlato a stříbro v případě Inků. Dále pak kosti zvířat, tzv. xenografty, či dokonce části cizích lidských lebečních kostí, tzv. alografty u Keltů. Tyto náhrady odpovídaly tvarem i velikostí léčenému defektu, což dokládá snahu lidí o co nejlepší náhradu kosti, a rovněž schopnost organismu přijmout původně cizí předmět (Prolo, Oklund, 1991).

Lékař Petronius je pokládán za prvního, který v roce 1565 popsal regeneraci kosti po aplikaci implantátu ve formě zlaté destičky. První úspěšný kostní implantát byl proveden až v roce 1670 van Meekrenem, kdy byla do lidské lebky vložena část psí kosti. V období 19. století se lidé pokoušeli detailněji pochopit, jak probíhá regenerace kostní tkáně po vložení graftu neboli kostního štěpu, což vyústilo v roce 1821 k první lidské autogenní kostní náhradě. Macewen v roce 1873 reimplantoval úlomky lebeční kosti, které byly předem ošetřeny chloridem rtuťnatým, čímž byla projevena snaha o určitou modifikaci implantovaného materiálu. V roce 1878 dále provedl první transplantaci lidského alogenního implantátu do infikované části kosti pažní. V následujících letech se lékaři pokoušeli poškozenou kost regenerovat různými typy lidských kostních graftů z lopatky, žeber, holenní kosti, hrudní kosti aj. Na počátku 20. Axhausen objasnil, jakým způsobem dokáže transplantovaný periost neboli okostice na povrchu implantovaného graftu přežít a zbytek štěpu se v kosti neujme. Také vysvětlil i to, co se dále s takovýmto implantátem děje, a sice že dochází k jeho neovaskularizaci, k tvorbě pojivové tkáně, a nakonec k dynamické přestavbě kostní tkáně, kdy osteoklasty degradují starou kostní tkáň a osteoblasty naopak vytvářejí kost novou (Prolo, Oklund, 1991).

V následujících letech se lékaři snažili nahradit lebeční či ostatní kosti lidského těla jiným materiálem, pro vytvoření kostního implantátu. Důvodem mohlo být to, že ne vždy lze použít pacientův vlastní štěp kosti pro implantaci, např. vzhledem k typu poškození, infekci, křehkosti či nedostatku kostního materiálu od dárců. Pro své mechanické vlastnosti a odolnost se staly středem zájmu především syntetické polymery a kovy. Z kovů bylo užíváno zejména zlato, slitiny chromu a kobaltu, nerezová ocel a titan, který se stal nejpoužívanějším kovem v ortopedii pro tvorbu kostních náhrad (Prolo, Oklund, 1991).

Pro další vývoj vhodného materiálu pro kostní náhrady, bylo nutné určit tzv. biokompatibilitu materiálu, tedy zda není pro lidský organismus toxický či nevyvolává imunitní reakci. Tato snaha vyústila v šedesátých a sedmdesátých letech 20. století ve vytvoření první generace materiálů, jejichž úkolem bylo co nejlépe nahradit poškozenou část kosti a nevyvolávat v těle toxicitu. Důležitou vlastností těchto materiálů byla hlavně bio-inertnost, tedy že daný materiál je sice tolerován okolními i vzdálenými tkáněmi organismu, ale svou povrchovou strukturou a dalšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi nepodporuje adhezi a růst kostních buněk. V 80. letech byly kostní implantáty vyráběny z více než čtyřiceti různých druhů materiálů, a asi 2 až 3 milióny náhrad, bylo ročně implantováno jen pacientům ve Spojených Státech. Nedostatkem těchto materiálů však bylo, že kromě fyzického nahrazení kosti v místě defektu nevykazovaly žádné další prospěšné vlastnosti pro regeneraci kostní tkáně (Hench, Polak, 2002).

S nástupem druhé generace materiálů pro kostní tkáňové inženýrství přišla i nová idea o tom, jakými vlastnosti by měl materiál oplývat. Na rozdíl od první generace měly nové materiály zcela jiné vlastnosti a funkce v organismu. Dvěma hlavními úkoly těchto bioaktivních materiálů byla osteointegrace – stimulace proliferace osteoblastů (tj. buněk vytvářejících kostní tkáň) a biodegradace použitých materiálů po vytvoření nové regenerované kostní tkáně. Využívaly se zejména bioaktivní skla, keramika a různé kompozitní materiály. Bioaktivní sklo se také stalo poměrně častou složkou povrchových modifikací kostních implantátů. Výhodou takovýchto vrstev byla jejich schopnost zvýšit osteointegraci náhrady do okolní kostní tkáně a tím co nejlépe napodobit původní kost. Principem fungování takovýchto vrstev bylo uvolňování a výměna iontů z jejich povrchu, dále polykondenzační reakce povrchových silanolů za vzniku silikagelu, který se stal substrátem pro krystalizaci a tvorby vrstvy bioreaktivního hydroxykarbonát apatitu – podobá se anorganické části kosti, která slouží jako extracelulární matrix pro adhezi a růst buněk. Od těchto aplikací se odvíjí i použití syntetického hydroxyapatitu (minerálu běžně obsaženého v kosti) ve formě implantátů, prášků a povrchových vrstev. Druhou významnou skupinou materiálů druhé generace byly již zmíněné biodegradabilní materiály, schopné cíleného nezávadného rozložení a resorpce v lidském těle. Nejčastěji se jednalo o polymery sestávající z kyseliny polylaktidové (PLA) a polyglykolové (PGA). Tyto látky se pak v těle dokázaly hydrolyticky rozložit na oxid uhličitý a vodu. Avšak problémem druhé generace materiálů byla jejich krátká životnost po implantaci – třetina až polovina implantátů nevydržela v těle pacienta déle než 25 let a byla nutná revize dané kosti. Navíc měly uvedené materiály nepříliš vhodné mechanické vlastnosti pro náhradu kostní tkáně – většina polymerů je příliš měkká a elastická, a keramické materiály jsou křehké. Společným problémem všech syntetických materiálů používaných pro tvorbu implantátů je, že na rozdíl od pravých tkání nedokážou

adekvátně reagovat na rychle se měnící podmínky v organismu a adaptovat se na ně. Z tohoto důvodu bylo nutné, aby se regenerativní medicína svými metodami pokusila o tvorbu pravé kosti namísto hledání kompromisů a krátkodobého řešení poruch pohybového aparátu (Hench, Polak, 2002).

Nakonec byl zahájen již očekávaný vývoj třetí generace biomateriálů, probíhající až do současnosti. Tato generace se zcela liší od předchozích dvou. Je zacílena na stimulaci adheze a růstu buněk již na úrovni genů, a tak stimuluje regenerační potenciál kostní tkáně. Tyto biomateriály lze použít dvěma hlavními způsoby: ve tkáňovém inženýrství a pro regeneraci tkáně *in situ* (tj. přímo na daném místě uvnitř těla). V tkáňovém inženýrství lze využít resorbovatelné materiály (např. polymery), které poslouží pouze jako dočasný „scaffold“ neboli lešení pro růst buněk a obnovu původní tkáně. Obvykle jsou použity mezenchymální kmenové buňky pacienta, které jsou v laboratorních podmínkách pěstovány a diferencovány na materiál, který bude následně implantován do těla pacienta. V době kdy se z takto implantovaných buněk začne vytvářet plnohodnotná kost, by mělo dojít k rozpadu použitého nosiče. V případě *in situ* regenerace jsou často používány bioaktivní materiály, které samy (například pomocí růstových faktorů či bioaktivních iontů v nich obsažených) dokážou aktivovat proliferaci a diferenciaci v okolních buňkách, a tím zahájit obnovu v místě chybějící či poškozené kostní tkáně. Materiály lze tedy různě modifikovat, ať už v rámci jejich struktury či vazbou různých chemických molekul. Tímto způsobem lze materiál obohatit např. o proteiny extracelulární matrix (ECM, např. fibronectin a kolagen), čímž se usnadní přichycení buněk k této umělé matrix. Lze s jistotou říci, že pokrok ve výzkumu materiálů pro kostní tkáňové inženýrství se posouvá velmi rychle vpřed a že díky těmto novým materiálům se blížíme k nahrazení poškozené kosti pacienta jeho vlastní tkání (Hench, Polak, 2002).

### **3. 2 Materiály používané pro kostní tkáňové inženýrství**

Materiál využívaný ve tkáňovém inženýrství musí splňovat určitá kritéria, jako jsou např. biokompatibilita, schopnost osteointegrace, tvárnost, povrchová struktura, porozita, mechanické vlastnosti (odolnost a pevnost), možnost sterilizace před implantací pacientovi a v neposlední řadě také dostupnost a nízká cena (Harris *et al.*, 2014; Hutmacher, 2000). Hlavními materiály jsou polymery, keramika, kovy a kompozitní materiály.

#### **3. 2. 1 Polymery**

Biodegradabilita a biokompatibilita, dvě základní vlastnosti vystihující skupinu materiálů nazývaných polymery. U těchto materiálů lze na základě jejich chemického složení ovlivnit kdy a za jakých podmínek budou v těle degradovat. Struktura polymerů umožňuje také poměrně snadnou odbouratelnost vzniklých metabolitů a jejich nezávadnost pro

organismus. Polymery lze rozdělit podle původu jejich vzniku na přírodní a syntetické (Bose *et al.*, 2012).

Mezi přírodní polymery se řadí polysacharidy jako třeba chitin, deriváty kyseliny hyaluronové, alginát a škrob. Dále sem patří také proteiny a to například kolagen, fibrin a hedvábí (Rezwan *et al.*, 2006). Díky svému přírodnímu původu jsou tyto polymery schopny velmi dobře podpořit adhezi a růst buněk (např. kolagen jako přirozená složka ECM většiny buněk, a fibrin jako provisionální ECM zúčastněná v regeneraci). Bohužel nelze přehlédnout mnoho důvodů, proč je právě tohoto druhu polymeru, na první pohled nejvhodnějšího, tak málo využíváno. Prvním nedostatkem přírodních polymerů je právě jejich biologický původ, který často po implantaci vyvolává imunitní reakci a zároveň zde hrozí riziko zanesení i různých patogenů do lidského těla, které se v těchto materiálech mohou přirozeně vyskytovat. Co se týká jejich funkce v organismu, tak je to hlavně nižší mechanická odolnost ve srovnání se syntetickými polymery a také fakt, že zde není možné cíleně řídit načasování a průběh biodegradace materiálu, což je klíčové pro použití polymerů v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství. A v neposlední řadě, v přírodě obvykle není dostatečné množství polymerů tohoto typu pro terapeutické účely a jejich cena je daleko vyšší ve srovnání s náklady na výrobu syntetických polymerů (Liu *et al.*, 2004).

Syntetické polymery se v současnosti těší tak velké oblibě a neustálému vylepšování, díky možnosti jejich výroby přesně na míru, tedy podle námi vybraných parametrů, jako např. chemické složení, velikost pórů, modul elasticity, míra a způsob biodegradace aj (Rezwan *et al.*, 2006). Na základě molekulového složení lze syntetické polymery rozdělit na polymery degradované prostřednictvím hydrolýzy chemických vazeb působením fyziologického prostředí či na polymery, k jejichž rozpadu dochází až vlivem proliferační aktivity buněk či enzymů (Liu *et al.*, 2004).

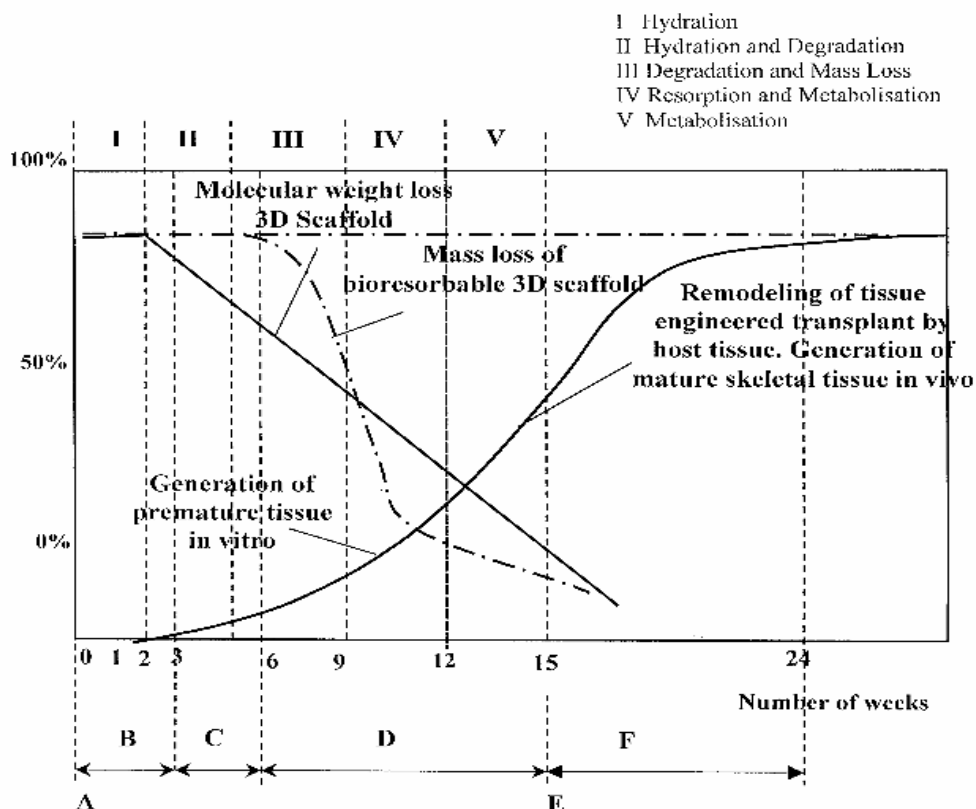
Mezi základní polymery patří saturované alifatické polyestery, jako např. deriváty kyseliny polylaktidové (polylactic acid, PLA), deriváty kyseliny polyglykolové (polyglycolic acid, PGA) a jejich kopolymery (PLGA). Ve fyziologickém vodném prostředí v organismu pak dochází k degradaci těchto polymerů v důsledku hydrolytického narušení esterových vazeb. To, jak bude degradace konkrétního polymeru v organismu probíhat, může být ovlivněno řadou faktorů, jako např. způsob syntézy polymeru, chemické složení a 3D struktura, molekulová hmotnost, morfologie a orientace vláken, velikost pórů a v neposlední řadě také stav okolního prostředí, jemuž je polymer vystaven (Liu *et al.*, 2004; Rezwan *et al.*, 2006).

Polymer implantovaný do organismu by měl být schopen po určitou dobu fungovat jako podpůrné lešení pro růst buněk a obnovu poškozené tkáně. Materiál musí být tedy zkonstruován tak, aby byl dostatečně odolný vůči destruktivním vlivům okolního prostředí až do doby, než započne remodelace transplantátu přirozenou kostní tkání (viz obr. 1). Degradace je obvykle nastartována až po úplném rozvolnění molekulárních řetězců a jejich uvolnění ze struktury polymeru. Doba degradace se může mezi polymery značně lišit. Na základě všeobecných požadavků by si měl syntetický polymer zachovat své mechanické a strukturní vlastnosti minimálně po dobu 6 měsíců a nejpozději po 12 až 18 měsících by mělo dojít k úplné degradaci a metabolizaci rozkladných produktů polymeru (Hutmacher, 2000).

Pro inženýrství kostní tkáně se dále používají polymery jako polyanhydridy, polykarbonáty, polyfumaráty, polyhydroxyalkanoáty aj. (Liu *et al.*, 2004; Rezwan *et al.*, 2006). Výhody použití syntetických polymerů pro účely regenerativní medicíny je možné shrnout takto: výroba polymeru přesně podle našich požadavků, možnost přidavku různých aditiv (jiný druh polymeru či materiálu, růstové faktory, proteiny...atd.), biodegradabilita, biokompatibilita a nezávadnost rozkladných produktů a snadnější cenová dostupnost oproti přírodním polymerům. Ač jsou polymery považovány za netoxické a neimunogenní, mohou jejich rozkladné produkty vyvolat v těle řadu nežádoucích účinků. Většina používaných polymerů degraduje až na oxid uhličitý, který přirozeně snižuje pH okolního fyziologického prostředí a okyseluje ho. Tkáň v oblasti implantovaného polymeru pak často není schopna zcela odstranit tyto odpadní produkty a vlivem zvýšeného osmotického tlaku dochází k nahromadění tekutin v místě implantátu. Výsledkem je poškození buněk, záněty, lokální otoky a bolestivost (Liu *et al.*, 2004; Hutmacher, 2000).

Za nedostatek syntetických polymerů lze považovat i jejich rozdílné chování v podmínkách *in vitro* (mimo organismus, v experimentálních podmínkách) a v podmínkách *in vivo* (uvnitř organismu), a poměrně vysokou heterogenitu mezi jednotlivými druhy polymerů (např. PGA degraduje rychleji, než PLA). Lze logicky předpokládat, že vzhledem k agresivnějšímu prostředí uvnitř těla se chemické složení, struktura a celková stabilita biopolymeru bude měnit daleko rychleji, než při simulovaných podmínkách v laboratoři, kterým je navíc polymer vystaven kratší dobu. Odlišnosti v rámci rychlosti rozpadu různých polymerů pak mohou být způsobeny neutralizací povrchových karboxylových skupin okolním vodným prostředím či snadnějším oddělením oligomerů lokalizovaných na povrchu polymeru, než uvnitř jeho struktury (Rezwan *et al.*, 2006).

Vývoj polymerních materiálů se stále více zaměřuje na vylepšení jejich vlastností pomocí různých additiv, ať už biologického či nebiologického původu – vznik kompozitních materiálů, které jsou považovány za jedny z nejslibnějších materiálů vůbec pro léčbu pomocí tkáňového inženýrství. Pro tvorbu nových materiálů je nezbytný pokrok i v oblasti samotné výroby, kdy stále více narůstá využití tzv. 3D tiskáren pro tvorbu trojrozměrných nosičů buněk, kde právě polymery hrají významnou roli. Biopolymer jako takový navíc přestává být chápán pouze jako podpůrný templát pro adhezi a růst buněk, ale i jako prostředek k dopravení buněk na místo určení, např. ve formě injekčně aplikovatelných hydrogelů (Liu *et al.*, 2004).



**Obr. 1:** Schéma vzájemné závislosti poklesu molekulové hmotnosti a degradace polymeru vztažené k časovému úseku při tvorbě chrupavky/kosti a její transplantaci. A) výroba biodegradabilního nosiče; B) nasazení chondroblastů/osteoblastů na polymer ve statických kultivačních podmínkách; C) kultivace buněk v dynamickém systému za vzniku chrupavčité/kostní tkáně; D) růst a vyzrání tkáně v bioreaktoru; E) transplantace implantátu do těla pacienta; F) integrace graftu a okolní tkáně po implantaci a jeho remodelace v případě kosti (upraveno podle Hutmacher, 2000).

### 3. 2. 2 Keramika

K biomateriálům, rutinně používaným v rekonstrukci kostních defektů, se řadí i keramika. Ať už se jedná o přírodní keramické materiály, jako jsou třeba exoskelety korálů tvořené zejména hydroxylapatitem, tak syntetické keramické materiály ve formě hydroxyapatitu (HA), trifosfát-vápenaté keramiky či bioskla. Keramika může být ve tkáňovém inženýrství použita v různých formách – implantáty, prášky, nanočástice, výplňové materiály (kostní cementy) či povrchové vrstvy nanosené na jiné druhy materiálů. Společnou vlastností většiny těchto keramických materiálů je jejich schopnost vytvářet na svém povrchu pod vlivem fyziologického vodního prostředí organismu, vrstvu hydroxykarbonát apatitu (jedna z hlavních komponent anorganické složky kosti), která umožňuje adhezi materiálu ke kostní tkáni a zároveň podporuje tvorbu kosti nové. Keramické materiály jsou tedy jak osteokonduktivní, tak osteoinduktivní (Salgado *et al.*, 2004; Rezwan *et al.*, 2006).



Jak už bylo zmíněno výše, za keramický materiál přírodního původu, jsou nejčastěji označovány korály - bezobratlé mořské organismy patřící do třídy korálnatců (velké množství druhů), z nichž nejpočetnější je rod *madrepora*. Korálnatci žijí v koloniích ve formě mikroskopických polypů, přičemž kolem sebe vytvářejí schránky. Tyto exoskelety vznikají přeměnou kyseliny uhličitě a vápenatých iontů na uhličitan vápenatý – 97 až 99% složení korálu. Zbytek tvoří důležité prvky jako hořčík, sodík, draslík, fluor, fosfát aj. Svým chemickým složením a strukturou se korály poměrně hodně podobají kostní tkáni, avšak existuje i řada rozdílů a to v množství a typu přítomných prvků a sloučenin (u kosti převažuje hydroxyapatit a fosfát vápenatý), obsahu biologické složky (až 1/3 kosti je tvořena organickou složkou, např. proteiny ECM), uspořádání struktury či velikosti pórů (Demers *et al.*, 2002).

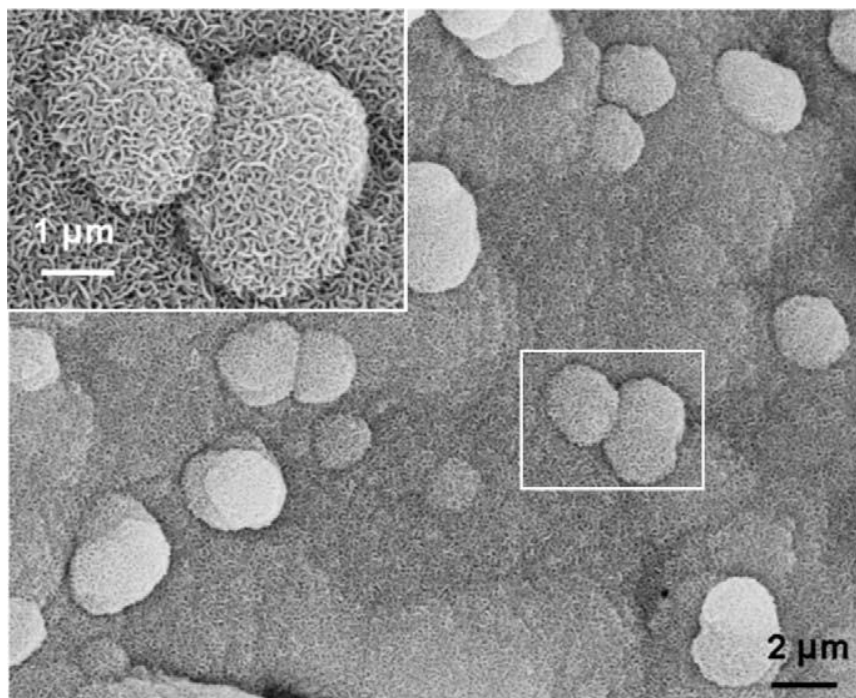
Mechanické vlastnosti korálu jsou stejně jako u kosti ovlivněny způsobem jeho utváření (směr růstu polypů) a porozitou. Mechanická odolnost korálů je srovnatelná se spongiózním typem kosti. Biokompatibilita korálů je zajištěna jejich chemickým složením, povrchovou strukturou, porozitou, vzájemným propojením pórů a v neposlední řadě biodegradabilitou. Nebyla však prokázána schopnost korálů iniciovat osteogenezi, obvykle jsou používány jako nosiče pro implantované buňky. Resorpce korálů v organismu je způsobena vlivem fyziologického prostředí a aktivitou osteoklastů - kostní buňky podílející se na přirozené remodelaci kosti, kdy výsledkem je uvolnění oxidu uhličitého, řady iontů a tvorba fosforečnanu vápenatého na povrchu implantátu, což také přispívá k jeho osteointegraci. Můžeme říci, že korály, jako přírodní keramické materiály, jsou výhodné zejména pro jejich podobné vlastnosti s kostní tkání a biokompatibilitu. Značným nedostatkem může být náročnost pěstování korálových porostů, důkladná sterilizace pro odstranění zbylých polypů a organismů, ovlivnění množství a velikosti pórů a nakonec křehkost, stejně jako u syntetické keramiky (Demers *et al.*, 2002).

V rámci syntetických keramických materiálů se tedy nejčastěji používají hydroxyapatit (HA), trifosfát-vápenatá keramika, dvoufázový bifosfát vápenatý (kombinace HA a trifosfátu vápenatého) či biosklo. Stejně jako korály, je i syntetická keramika pro organismus biokompatibilní díky biologicky aktivním povrchovým vrstvám, ze kterých se v důsledku přirozené degradace materiálu uvolňují ionty a dochází nejčastěji ke vzniku HA (viz obr. 2), který se jako přirozená složka kosti k ní také pevně váže. Avšak na rozdíl od korálů byly prokázány kromě osteokondukčních vlastností i vlastnosti osteoindukční – schopnost indukce osteogenní diferenciacie implantovaných buněk na keramickém nosiči či zvýšená adheze a diferenciacie vlastních buněk organismu a novotvorba kosti (Denry *et al.*, 2016).

U syntetické keramiky je pro obnovu kosti a neovaskularizaci nejdůležitější chemické složení, povrchové napětí a porozita (velikost, množství a propojení pórů). Díky uvolňování iontů a pórovitosti materiálu může být aktivována či zvýšena exprese některých genů v buňkách, důležitých pro osteogenní diferenciaci. Ve srovnání s keramikou má biosklo daleko lepší výsledky v rámci proliferace a diferenciacie buněk, a nejvíce používaným druhem je 45S5 Bioglass:  $\text{SiO}_2$  -  $\text{CaO}$  -  $\text{Na}_2\text{O}$  -  $\text{P}_2\text{O}_5$  (Denry *et al.*, 2016; Hench *et al.*, 2015).

Výhody syntetické keramiky můžeme shrnout pod pojmy biokompatibilita, biodegradabilita, osteoindukční a osteokondukční vlastnosti, a podobné složení a mechanická odolnost jako u kosti (Burg *et al.*, 2000). Značným omezením u těchto materiálů je však jejich

křehkost, která se navíc zvyšuje s mírou porozity a kterou nelze tak jednoduše ovlivnit (Ramay *et al.*, 2004). Často také není možné zcela přesně určit poločas degradace materiálu v organismu, a v neposlední řadě může vlivem lokálně zvýšené koncentrace uvolněných povrchových iontů, zejména Ca a P, dojít k buněčné smrti a poškození okolních tkání (Salgado *et al.*, 2004).



**Obr. 2:** Fotografie pořízená pomocí skenovací elektronové mikroskopie zobrazující krystalický hydroxyapatit, který vytváří charakteristické shluky, připomínající svým tvarem kvěťák. Hydroxyapatit se vytvořil po 28 dnech na povrchu pěny (na bázi bioskla 45S5) v systému napodobňující fyziologické prostředí organismu. Zvětšení vybraného úseku znázorňuje jehlicovitý tvar krystalů hydroxyapatitu (upraveno podle Rezwan *et al.*, 2006).

### 3. 2. 3 Kovy

Jak už bylo zmíněno na základě historických důkazů v úvodu, kovy byly pro náhrady kostní tkáně využívány již od raných počátků. Tyto materiály nebyly překonány ani v dnešní době a jsou stále zlatým standardem pro náhrady kostí v ortopedii. Důvodem jejich značné obliby jsou vysoká mechanická odolnost v tahu a tlaku (nezbytné pro náhradu vysoce zatěžovaných dlouhých kostí), dobrá tvárnost a povrchová opracovatelnost či vysoká chemická odolnost a biokompatibilita. Pro zvýšení osteointegrace kovových implantátů lze aplikovat i různé povrchové úpravy, ať už aditivní (nanášení vrstev) či neaditivní (povrchové opracování), ovlivňující drsnost materiálu, smáčivost, volnou povrchovou energii a porozitu. Kovové materiály jsou nejčastěji používány pro dentální implantáty, náhrady kloubů (kyčelní, kolenní, ramenní, loketní), náhrady dlouhých kostí (stehenní, holenní, pažní) či pro kraniofaciální náhrady kostí (kosti lebeční, kosti čelistní).

Mezi nejvíce využívané typy kovů v současnosti patří nerezová chirurgická ocel, slitiny kobaltu a titan a jeho slitiny (Alvarez *et al.*, 2009). Rutinní používání nerezové oceli v regenerativní medicíně tkví v její nízké ceně, dostupnosti a dobré opracovatelnosti. Použití takovýchto implantátů je však omezeno na kratší dobu díky jejich menší chemické a mechanické odolnosti ve srovnání s jinými materiály (Navarro *et al.*, 2008). U kobaltu se nejčastěji používá slitina Co–Cr–Mo, která oplývá dobrými antikorozivními a zátěžovými vlastnostmi, ale problémem může být toxicita chromu pro organismus (Long *et al.*, 1998). Ti-6Al-4V a Ti-Ni (nitinol) jsou nejčastěji používané slitiny titanu. Značnou výhodou používání titanových materiálů je jejich přirozené pokrývání oxidem titaničitým – TiO<sub>2</sub> ve vodném prostředí organismu, čímž se značně zvyšuje jejich odolnost. Mezi největší přednosti Ti-6Al-4V patří její vysoká biokompatibilita oproti oceli a jiným slitinám a lepší mechanická odolnost ve srovnání s čistým titanem. Nitinol se jako jedna z mála slitin vyznačuje vysokou plasticitou a schopností udržet si svůj původní tvar. Společným problémem těchto dvou titanových slitin je opět biotoxicita některých příměsí jako jsou například vanad a nikl (Alvarez *et al.*, 2009; Long *et al.*, 1998).

Bohužel tak jako většina biomateriálů používaných ke konstrukci kostních náhrad, tak i kovy mají řadu nedostatků. Patří sem bioinertnost (materiály nepodporují osídlování svého povrchu buňkami), špatná osteointegrace (implantát není dostatečně fixován v místě jeho aplikace), únava materiálu vlivem mechanické zátěže (příliš vysoká tuhost a hustota materiálu ve srovnání s přirozenou kostí), uvolňování kovových iontů z materiálu a jeho koroze. Takto uvolněné kovové ionty mohou být pro organismus toxické a mohou způsobovat záněty a alergické reakce, které často končí odumíráním okolní tkáně, neujmutím implantátu, bolestí a otoky (Salgado *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2009).

### **3. 2. 3. 1 Slitina titanu Ti-6Al-4V**

Tato slitina byla původně vyrobena pro letecký průmysl a astronautiku, což naznačuje její vysokou odolnost po všech stránkách. Slitina Ti-6Al-4V je v ortopedii považována za zlatý standard (používány zejména pro náhrady kloubů) a jejími největšími přednostmi jsou vysoká biokompatibilita, dobrá schopnost osteointegrace (vhodná pro dlouhodobější aplikace), mechanická odolnost, antikorozivnost (povrchová vrstva TiO<sub>2</sub>), relativně nízký modul pružnosti (je nutné, aby se co nejvíce podobal modulu pružnosti kosti), neferomagnetičnost (nepůsobí potíže pacientům při vyšetření pomocí magnetické rezonance) a relativně nízká denzita (Long *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2009). Příměsí hliníku a vanadu ve slitině mají stabilizační funkci (Navarro *et al.*, 2008). Zmíněná dobrá biokompatibilita a odolnost Ti-6Al-4V vůči korozi, je z velké části podpořena povrchovou vrstvou TiO<sub>2</sub>, která se navíc spontánně obnovuje po jakémkoliv jejím poškození, a tak neustále chrání povrch materiálu (Alvarez *et al.*, 2009). Pro lepší ukotvení náhrady a její biokompatibilitu je možné provést mechanické úpravy (tryskání, leštění, omílání), tepelné a chemické úpravy (nanášení vrstev oxidů a nekovových materiálů) či biologické úpravy (navázání proteinů ECM, růstových faktorů či aplikace buněk). Limitujícím pro slitinu Ti-6Al-4V může být její nižší teplotní odolnost, paradoxně zvýšená náchylnost k prasklinám a frakturám po mechanickém

opracování a toxicita uvolňujících se iontů vanadu a hliníku. Problém s toxicitou se v současnosti řeší nahrazením hliníku a vanadu ve slitině jinými prvky, jako např. Nb, Ta či Zr (Long *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2009).

### 3. 2. 4 Kompozity

Jak už název napovídá, kompozitem je materiál, který se skládá z více než jedné složky, což umožňuje spojení vlastností dvou či více typů materiálu. Cílem kompozitů je odstranit nedostatky předchozích skupin materiálů a přiblížit se co nejvíce k pravé struktuře kosti, která je sama o sobě přírodním kompozitem. Mohou vznikat kombinace jako kov-keramika, tak i polymer-keramika, která je nejpoužívanější (Wang *et al.*, 2003). V případě kombinace polymer-keramika získává kompozit odolnost a vyšší schopnost osteoindukce vlivem keramické složky a biodegradabilitu a flexibilitu vlivem složky polymerní. Takovéto materiály vznikají buď přimícháním keramických částic k polymeru či je keramický nosič potažen vrstvou polymeru (Biano *et al.*, 2015). Jak keramika, tak polymer mohou být syntetického či přírodního původu, přičemž záleží na očekávaných vlastnostech vzniklého materiálu a jeho použití. Kombinace jako kolagen I + fosforečnan vápenatý, biosklo + poly(3-hydroxybutyrát), kolagen I + hydroxyapatit či hydrogel + částice fosforečnanu vápenatého (injekční cement) jsou dnes již poměrně běžné. Tento druh kompozitního materiálu má obvykle použití jen pro mírně zatěžované úseky kosti, a to v podobě výplně a biodegradabilních nosičů podporující náhradu defektu vlastní novou kostní tkání. Hlavním problémem je mísení hydrofilních keramických částic s hydrofobními polymery, což může způsobit špatné mechanické vlastnosti kompozitu (Basha *et al.*, 2015).

Kompozity složené z kovů a keramiky většinou vznikají nanášením vrstev keramických materiálů na povrch oceli, titanu či různých slitin. Je samozřejmé, že oproti první skupině kompozitů budou mechanicky daleko odolnější, s lepší osteointegrací a vhodnější pro zátěžové aplikace. I zde můžeme najít řadu problémů s využitím těchto kompozitů, jako je např. toxicita kovových iontů (Baino *et al.*, 2015). I přes veškerou snahu vytvořit biomateriál s vlastnostmi co nejvíce podobnými kosti se bohužel i kompozity potýkají s řadou nedostatků.

#### 3. 2. 4. 1 Kost jako biokompozit

Kost je vysoce organizovanou dynamickou strukturou tvořenou organickou a anorganickou částí, která pohotově reaguje na všechny změny prostřednictvím její remodelace – úbytek a tvorba nové kostní tkáně. Kostní tkáň má v těle řadu funkcí, jako jsou například opora těla, zajištění úponu svalů, a tím celkového pohybu organismu, ochrana vnitřních orgánů, rezervoár vápníku, fosforu a dalších důležitých minerálů, udržování celkové vnitřní rovnováhy systému či zajištění krvetvorby prostřednictvím kostní dřeně. Kostní tkáň má navíc i endokrinní funkci – produkci osteokalcinu prostřednictvím osteoblastů ovlivňuje funkci

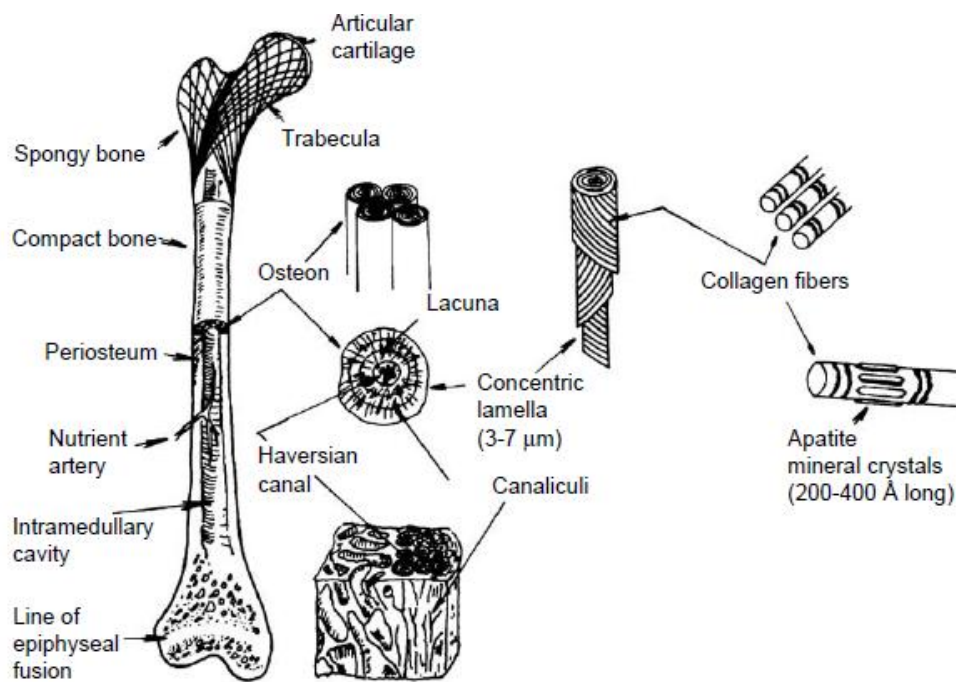
slinivky (sekrece inzulínu), varlat (plodnost), tukové tkáně či nervového systému (schopnost učení). Dále pomocí růstového faktoru FGF 23 (fibroblastový růstový faktor neboli fibroblast growth factor) řídí v ledvinách a příštítných tělískách snižování koncentrace fosfátových iontů (Clarke, 2008; Silva *et al.*, 2015).

Lidská kostra se skládá z více jak 200 kostí různého typu a funkce – dlouhé, krátké, ploché a tvarově nesouměrné. Na základě strukturního uspořádání lze kosti rozdělit na kortikální a trabekulární, kdy převažuje zastoupení kosti kortikální (až 80 %). Kortikální typ kosti je kompaktnější, hutnější s minimální porozitou a obklopuje kostní dřeň, kdežto trabekulární typ kosti má převážně spongiózní strukturu a je uspořádán do tzv. trabekul (tj. útvarů ve formě různých trámečků a výstupků). Distribuce těchto dvou typů kostní tkáně se v kostech liší na základě jejich funkce (Salgado *et al.*, 2004). Kortikální i trabekulární kost jsou pak dále organizovány do osteonů, které jsou u kortikální kosti tvořeny Haversovými kanálky a u trabekulární kosti lakunami. Haversovy kanálky i lakuny vytvářejí mikrostrukturu koncentrických lamel, které sestávají ze střídavě orientovaných vláken kolagenu (vytvářených osteoblasty), které jsou osázena mikrokrystalky hydroxyapatitu (viz obr. 3). Zde můžeme vidět, že kost je opravdovým kompozitem, a to již na úrovni mikrostruktury (Clarke, 2008).

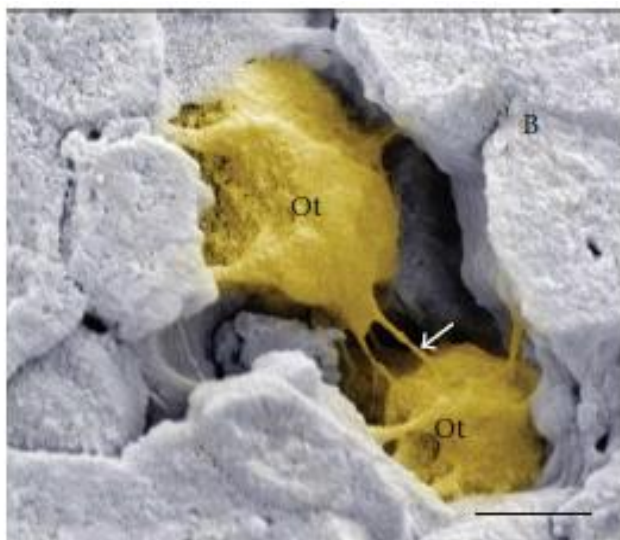
Kostní tkáň sestává ze čtyř hlavních typů buněk – osteoblasty, osteoklasty, osteocyty a ochranné buňky lemující kost. Osteoblasty jsou kostní buňky odvozené z mezenchymálních kmenových buněk (mesenchymal stem cells, MSCs) kostní dřene či jiných zdrojů v těle obsahujících tento typ kmenových buněk. Charakteristickými rysy osteoblastů jsou velké jádro, rozsáhlý Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum. Důležitost osteoblastů spočívá v jejich schopnosti vytvářet ECM (viz obr. 4), a tedy novou kostní tkáň na základě mechanického poškození, působením cytokinů, hormonů aj. Tyto buňky produkují kolagen a další proteiny ECM, a rovněž uvolňují vezikuly obsahující vápenaté a fosfátové ionty, vytvářející krystalky hydroxyapatitu. Po splnění své funkce dojde k apoptóze osteoblastů či k jejich maturaci v osteocyty, které v kosti převažují nad ostatními buněčnými typy (Silva *et al.*, 2015; Clarke, 2008).

Osteoklasty jsou buňky vznikající z prekurzorové linie monocytů a makrofágů, jejichž hlavní funkcí je resorpce staré a poškozené kostní tkáně před tvorbou nové. Degradace kostní tkáně probíhá na principu působení vodíkových iontů a enzymu katepsinu K, které jsou vylučovány osteoklasty. Vodíkové ionty okyselují prostředí a umožňují rozložení anorganické složky matrix a katepsin K pak působí na rozklad organické části, tj. kolagenu I a dalších proteinů. Osteoklasty se k cílové kostní matrix váží přes integrinové receptory, které interagují s kolagenem, fibronektinem, lamininem a dalšími proteiny ECM. Osteoblasty i osteoklasty jsou tedy nezbytné pro remodelaci kosti, která je důležitá pro její regeneraci a správnou funkci. Nesmíme opomenout také rovnováhu mezi aktivitou obou typů buněk, důležitou k zamezení vzniku nemocí a poruch kosterního aparátu. Posledním buněčným typem tvořící kostní tkáň jsou zploštělé lemující buňky, které podobně jako osteocyty přecházejí do klidového stádia. Tyto buňky jsou lokalizovány na povrchu kosti a jejich hlavní funkcí je fyzická separace osteoklastů od kostní matrix v případě, že není jejich aktivace potřebná (Silva *et al.*, 2015).

Extracelulární matrix kosti je tvořena anorganickou složkou (asi 70 %) a organickou složkou. Anorganická část je tvořena převážně hydroxyapatitem, dalšími fosfáty vápníku a malými příměsími jiných prvků, kdy propůjčuje kosti pevnost a odolnost. Organická složka zvyšuje ohebnost kosti, v rámci složení je daleko rozmanitější a je tvořena kolagenem a dalšími druhy proteinů, které zahrnují proteoglykany, karboxylované proteiny, sialoproteiny, glykosylované proteiny aj. V případě kolagenních proteinů má v kosti největší zastoupení kolagen I, který funguje jako nosič kostních minerálů. Mezi známé nekolagenní proteiny patří např. osteokalcin - marker remodelace kosti a alkalická fosfatáza – enzym zúčastněný v mineralizaci kostní tkáně a ukazatel její maturace (Salgado *et al.*, 2004; Clarke, 2008).



**Obr. 3:** Stavba dlouhé lidské kosti (upraveno podle Wang *et al.*, 2004).



**Obr. 4:** Snímek pořízený pomocí skenovací elektronové mikroskopie zobrazující osteoblasty – Ot, obklopené vytvořenou extracelulární matrix kosti - B (upraveno podle Silva *et al.*, 2015).

### 3. 2. 5 Komunikace mezi buňkou a materiálem

Pro růst a přežití buněk je naprosto nezbytné, aby se buňka přichytila k ECM dané tkáni. V případě, že buňka není schopna adheze, nastává buněčná smrt označovaná jako tzv. anoikis. Výjimkou jsou pouze buňky rostoucí v suspenzi, jako např. krevní buňky či nádorové buňky, které tuto schopnost získaly druhotně díky mutaci. I materiály používané jako pouhé kostní implantáty či aplikované spolu s buňkami musí umožňovat dobrou buněčnou adhezi. Povrchové vlastnosti vybraného materiálu tedy mohou ovlivnit chování buněk a vlastnosti nově vytvořené tkáně.

Než dojde k samotné adhezi buněk k povrchu materiálu, musí nejprve dojít k navázání specifických vazebných proteinů a molekul z okolního prostředí v organismu, jako např. proteinů ECM, fibronektinu a kolagenu. Na tyto proteiny se poté váží buňky prostřednictvím svých integrinových receptorů, které zprostředkovávají tuto interakci pomocí proteinů talinu a vinkulinu až na úroveň aktinového cytoskeletu. Způsob adheze buňky k materiálu může odstartovat kaskádu událostí v buňce, jako třeba změnu jejího tvaru, aktivace určité signální dráhy a genové exprese za vzniku specifických proteinů. Například pro diferenciaci a proliferaci kostních buněk jsou klíčovými vlastnostmi povrchová drsnost a složení materiálu (Boyan *et al.*, 1996). Proteiny ECM interagující s receptory buňky vytvářejí tzv. fokální adheze, které se shlukují do tzv. fokálních adhezních plaků viditelných ve světelném mikroskopu.

K nejdůležitějším parametrům biomateriálu ovlivňujícím buněčnou odpověď patří povrchová drsnost, topografie (povrchová struktura), chemické složení, volná povrchová energie a s ní spojená smáčivost materiálu. Míra drsnosti materiálu může zcela změnit budoucí chování buňky na materiálu a každý buněčný typ může preferovat jinou povrchovou drsnost. Například osteoblasty většinou lépe proliferují na materiálech s vyšší drsností (důležitá mechanická stimulace buněk) a naopak chondrocyty vykazují lepší výsledky na materiálech s nižší drsností. Stejně tak přítomnost funkčních skupin, iontů a různých proteinů navázaných na povrchu materiálů mohou ovlivnit výsledný fenotyp buněk. Materiál musí mít také vhodnou smáčivost (Boyan *et al.*, 1996). Při nízké smáčivosti (hydrofobicitě) materiálu se proteiny zprostředkující adhezi buněk adsorbují v denaturované a rigidní geometrické konformaci, a jejich specifické aminokyselinové sekvence (např. RGD) jsou pak hůře rozpoznávány a vázány adhezními receptory buněk. Pro adhezi buněk jsou považovány za optimální střední hodnoty smáčivosti, kdy jsou proteiny zprostředkující adhezi buněk adsorbovány v téměř fyziologické geometrické konformaci, a jejich bioaktivní aminokyselinové sekvence jsou dobře vázány adhezními receptory buněk. Naopak při vysoké hydrofilicitě materiálu se proteiny zprostředkující adhezi buněk buď vůbec neadsorbují či velmi slabě a nestabilně, což vede k uvolnění buněk z materiálu a jejich apoptóze, zejména po

delší době kultivace, kdy adsorbované proteiny již nejsou schopny udržet vyšší počet buněk či jejich souvislou vrstvu (pro přehled viz Bačáková *et al.*, 2011).

Na základě řady výsledků získané dlouhodobým testováním širokého spektra biomateriálů můžeme říci, že jsou buňky opravdu schopné rozlišit mezi různými drsnostmi materiálu (i téhož druhu), chemickým složením či jeho smáčivostí. Na výsledné buněčné odpovědi buňky se kromě těchto faktorů významně podílí i míra maturace buňky v době kontaktu s materiálem (Boyan *et al.*, 1996). Pro co nejpříznivější reakci buněk na námi studovaný materiál, lze pro účely tkáňového inženýrství materiály různě modifikovat, např. mechanickým opracováním, nanášením vrstev jiných materiálů či navázáním chemických funkčních skupin a biomolekul (např. aminokyselinové sekvence, proteiny a růstové faktory).

### 3. 2. 6 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky jsou tzv. dospělé multipotentní kmenové buňky mezenchymálního původu, které ač byly poprvé izolovány pouze z kostní dřene, můžeme najít téměř v každé tkáni lidského těla – periferní a pupečnickové krvi, kostní dřeni, tukové tkáni, kůži, mléčných zubech, slezině, plicích, svalech, slinivce břišní, srdci, játrech a dalších orgánech a tkáních (Väänänen, 2005). MSCs mají vysoký diferenciační potenciál a nejčastěji diferencují do buněk kostní, chrupavčité, tukové, svalové a nervové tkáně. Výhodou ve srovnání s jinými druhy kmenových buněk je jejich poměrně snadná izolace s vysokými výtěžky (Roberts, 2004).

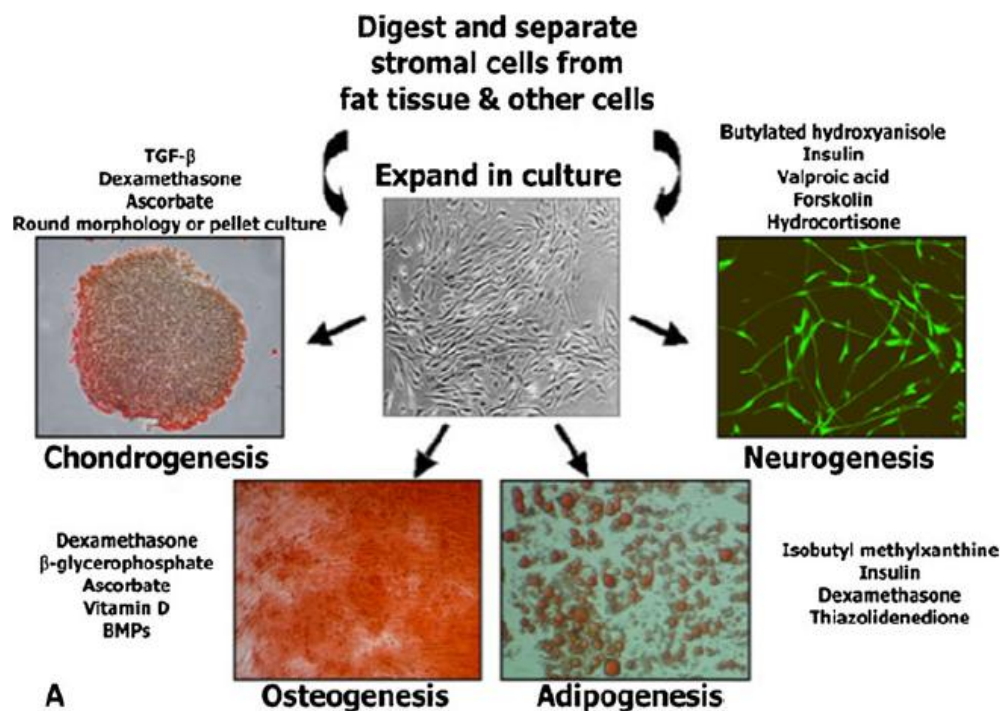
Fenotypická charakterizace a určení biologické niky (soubor podmínek prostředí) mezenchymálních kmenových buněk je bohužel poněkud problematické, vzhledem k mnoha místům jejich výskytu v organismu a schopnosti tzv. homingu, tedy migrace buněk zpět do místa původu po působení v místě zánětu či poranění v organismu - imunomodulační efekt. MSCs stále postrádají specifické markery pro jejich charakterizaci, avšak k těm nejčastěji používaným CD markerům (cluster of differentiation, diferenciační skupina) patří – CD34, CD31, CD45, CD146, CD90, CD29, CD73 a CD105. MSCs by měly být negativní na přítomnost CD31, CD34 a CD45 (markery označující přítomnost zbylých krevních buněk po izolaci) a CD146 (marker signalizující kontaminaci populace MSCs buňkami endotelu). Naopak bývá potvrzena přítomnost markerů CD90, CD29, CD73 a CD105, což jsou markery kmenovosti a důležitých adhezních molekul (Mosna *et al.*, 2010).

MSCs jsou jedny z prvních buněk, které společně s makrofágy dorazí k lokálnímu poškození či zánětu v těle. Kromě diferenciačního potenciálu jsou u MSCs zkoumány i jejich imunomodulační a imunosupresivní schopnosti. Zároveň uvolňují i řadu růstových faktorů, cytokinů a chemoatraktantů důležitých pro aktivaci regenerace buněk poškozené tkáně (Mosna *et al.*, 2010; Boeuf *et al.*, 2010). Potenciál mezenchymálních kmenových buněk lze využít jak pro tkáňové inženýrství (dobře přijímány i jako allografty díky jejich imunosupresivním schopnostem), tak pro léčbu různých degenerativních onemocnění a poškození tkáně samotnými buňkami (Roberts, 2004).



### 3. 2. 6. 1 Tukové kmenové buňky a jejich využití pro bioarteficiální náhrady kostí

Tukové kmenové buňky (adipose-derived stem cells, ASCs) jsou typem multipotentních mezenchymálních kmenových buněk vřetenovitého tvaru, svým vzhledem připomínající fibroblasty (Bunnell *et al.*, 2008). V současnosti jsou tyto buňky podrobovány intenzivnímu výzkumu vzhledem k jejich značným výhodám oproti jiným typům mezenchymálních kmenových buněk. Např. tukové tkáně bývá často v těle nadbytek, metody odběru tkáně nejsou nijak náročné a invazivní, výtěžky kmenových buněk jsou daleko vyšší než u jiných tkání a plasticita buněk je často daleko vyšší, než u mezenchymálních kmenových buněk z jiných zdrojů. ASCs jsou schopné diferencovat do osteoblastů, chondrocytů, adipocytů, neuronů a případně dalších buněčných typů, jak je ukázáno na obr. 5 (Baer *et al.*, 2012).



**Obr. 5:** Schéma znázorňující diferenciační potenciál kmenových buněk tukové tkáně vlivem různých chemických stimulů (upraveno podle Guilak *et al.*, 2010).

Obrovskou výhodou pro aplikaci ASCs v regenerativní medicíně je tedy nadbytek tukové tkáně jako zdroje těchto buněk a větší výtěžky kmenových buněk ze vzorku tkáně. Například ve srovnání s mezenchymálními kmenovými buňkami kostní dřene, kde pouze 0,001 – 0,01 % tvoří kmenové buňky z celkového množství buněk ve vzorku. U vzorku tukové tkáně jsou to až 3 % kmenových buněk. ASCs jsou navíc získávány metodou liposukce, což není tolik invazivní, bolestivá a nebezpečná procedura pro pacienta jako odběr

kostní dřevě (Baer *et al.*, 2012). Dá se říci, že v případě kmenových buněk tukové tkáně jde o užitečnou recyklaci jinak odpadního materiálu vznikajícího při liposukci a excizi tukové tkáně. Jen v některých případech je takto získaný tuk použit pro další úkony plastické chirurgie, jako např. tkáňové výplně.

Při izolaci kmenových buněk tukové tkáně je na konci celého procesu získána tzv. stromální vaskulární frakce (SVF), což je heterogenní směs kmenových buněk, krevních buněk, fibroblastů, endotelových buněk a pericytů. ASCs vyselektovány buď pasivně - kultivací (stejně jako jiné MSC) či aktivně pomocí průtokové cytometrie nebo imunomagnetické separace. V případě pasivní selekce by měly ASCs adherovat k povrchu kultivační nádoby, krevní buňky rostou jen jako suspenzní kultura a tím pádem se neuchytí a buňky endotelu jsou velmi náročné na kultivační podmínky a obvykle dediferencují či podlehnou apoptóze (Baer *et al.*, 2012).

Charakterizace ASCs naráží na stejný problém, jako u všech kmenových buněk mezenchymálního původu – neexistuje žádný vysoce specifický marker pro tyto buňky. K určení fenotypu kmenových buněk tukové tkáně se používají podobné CD markery jako u MSCs. ASCs se také vyznačují imunomodulačními a imunosupresivními schopnostmi, podporují angiogenezi a hematopoezu a secernují řadu růstových faktorů a hormonů důležitých pro regeneraci tkáně. Další výhodou či naopak nevýhodou používání kmenových buněk tukové tkáně je to, že způsobem provedení metody liposukce (použitý tlak, složení tumescentního média, anestetikum) můžeme ovlivnit vlastnosti a chování buněk. Stejně tak zdravotní stav, věk, pohlaví či etnický původ dárce tukové tkáně může mít vliv na množství a kvalitu izolovaných ASCs (Baer *et al.*, 2012).

Pole působnosti kmenových buněk tukové tkáně je pro účely regenerativní medicíny poměrně široké. Dobré využití mají tyto buňky i pro účely tkáňového inženýrství kosti. Diferenciace směrem do osteoblastů obvykle patří mezi ty méně náročné ve srovnání třeba s nervovou tkání. Vyizolované ASCs lze diferencovat pomocí chemického (složení média) či fyzikálního (mechanický stres, substrát) stimulu. Osteogenní média pro diferenciaci ASCs obvykle obsahují dexamethazon, kyselinu askorbovou, glycerolfosfát, vitamín D a další faktory. Pro nastartování osteogenní diferenciaci je vhodné použít i různé růstové faktory jako např. FGF-2 (fibroblastový růstový faktor, fibroblast growth factor), BMP (kostní morfogenetický protein, bone morphogenic protein) aj. (Guilak *et al.*, 2010). Co se týče použití mechanického stresu, buňky lépe odpovídají na vibrace než na vyvíjení tahu a tlaku (Gabbay *et al.*, 2005). Podpořit osteogenní diferenciaci lze i použitím materiálu s dostatečnou drsností a pevností, které běžně preferují samotné osteoblasty – kovy, keramika apod. Pro léčbu kostních defektů lze buňky do těla aplikovat samotné, již částečně diferencované či v kombinaci s vybraným materiálem, na kterém byly kultivovány a diferencovány.

## 4. Experimentální část

### 4. 1 Materiál a metody

#### 4. 1. 1 Materiál

Pro tuto diplomovou práci byly v jednotlivých pokusech použity celkem tři druhy materiálů – vzorky slitiny titanu Ti-6Al-4V (s povrchovými úpravami či bez), sklo (mikroskopické) a polystyren (kultivační lahve a destičky). Jak už bylo uvedeno výše, slitina Ti-6Al-4V je spolu s chirurgickou ocelí nejvíce používaným materiálem pro konstrukci kostních a kloubních implantátů. Vysoká mechanická a chemická odolnost a dobrá osteointegrace této slitiny jsou velmi ceněnými vlastnostmi v ortopedii.

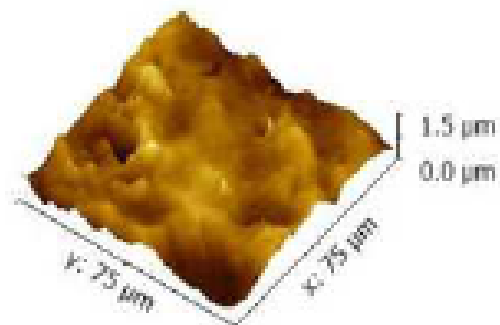
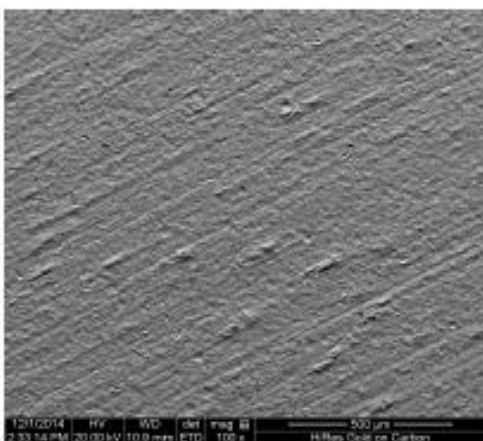
Vzorky slitiny Ti-6Al-4V byly dodány firmou VÚHŽ a.s., v rámci společného grantového projektu (TAČR č. TA04011214). Všechny vzorky ve formě disků, o průměru 14 mm a šířce 12 mm (viz obr. 6) byly vyrobeny jemným soustružením. Vzorky s různými povrchovými úpravami byly rozděleny na skupiny A, B a C a vzorky vstupního materiálu bez jakýchkoli úprav, tedy přímo z výroby, byly označeny jako vzorky K neboli kontrolní. Vzorky skupiny A byly opracovány tryskáním (gumovka o zrnitosti 120) a matováním (balotina 70/110 při 5 atm.), vzorky skupiny B byly opracovány omíláním (omílací tělíska PI4 x 10 ZS) a vzorky skupiny C byly opracovány tryskáním (gumovka o zrnitosti 120), omíláním (omílací tělíska PI4 x 10 ZS) a leštěním (tělíska RP 6 x 10 ZS). Veškeré povrchové modifikace vzorků byly provedeny firmou Medin s. r. o. v rámci společného grantového projektu (TAČR č. TA04011214). Takto připravené vzorky se mezi sebou lišily svou povrchovou drsností (stanovena v kontaktním režimu, tj. vtlačováním hrotu mikroskopu atomárních sil do vzorku) a topografií zobrazenou pomocí skenovací elektronové mikroskopie (scanning electron microscopy, SEM) a mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy, AFM), viz obr. 7 - 10. Povrchové drsnosti jednotlivých skupin vzorků byly stanoveny pomocí parametru  $R_a$ , který vyjadřuje průměrnou výšku či hloubku nerovností vzhledem k povrchové rovině materiálu. Drsnost studovaných materiálů byla následující: vzorky sk. A –  $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ , vzorky sk. B –  $R_a = 0,1 \mu\text{m}$ , vzorky sk. C –  $R_a = 0,08 \mu\text{m}$  a vzorky sk. K –  $R_a = 0,28 \mu\text{m}$  (viz tab. 1). Nejvyšší drsnost tedy měly vzorky skupiny K, a drsnost pak postupně klesala přes vzorky skupin A a B až k nejnižší, která byla u vzorku skupiny C.

**Tab. 1:** Povrchové modifikace a drsnost vzorků Ti-6Al-4V

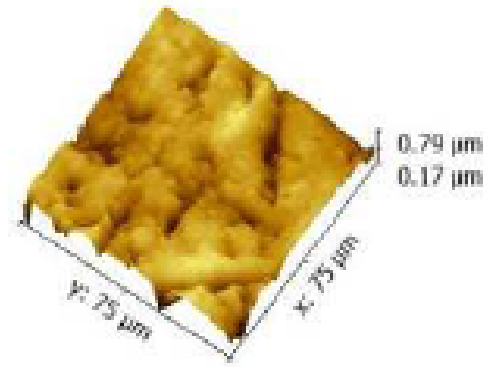
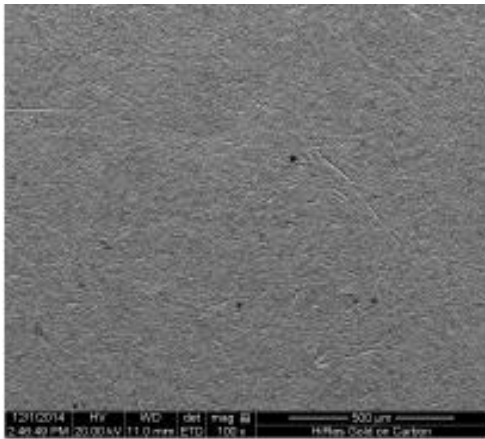
| Skupina vzorků | Modifikace   | Drsnost (Ra, nm) |
|----------------|--|------------------|
| <b>K</b>       | Bez modifikace   | 280              |
| <b>A</b>       | Tryskání (gumovka o zrnitosti 120), matování (balotina 70/110 při 5 atm.)                                  | 200              |
| <b>B</b>       | Omílání (omílací tělíska PI4 x 10 ZS)  | 100              |
| <b>C</b>       | Tryskání (gumovka o zrnitosti 120), omílání (omílací tělíska PI4 x 10 ZS) a leštění (tělíska RP 6 x 10 ZS) | 80               |



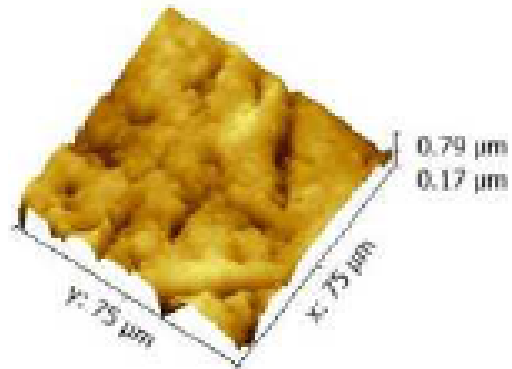
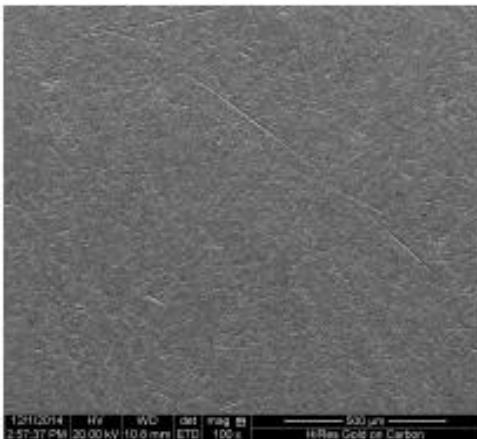
**Obr. 6:** Fotografie znázorňující vzorky slitiny titanu Ti-6Al-4V s nasazenými buňkami v kultivační destičce.



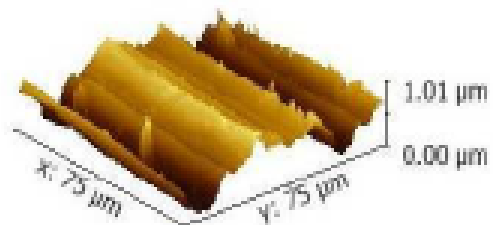
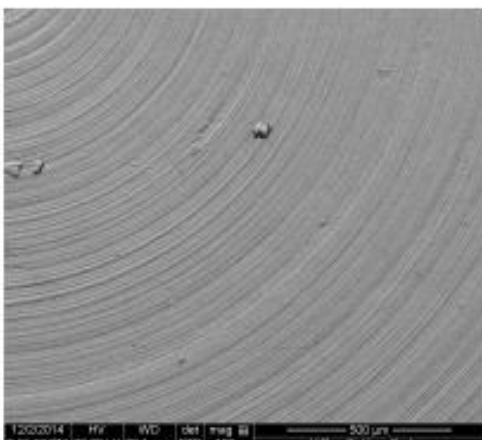
**Obr. 7:** Mikrofotografie pořízená pomocí SEM v módu SE a BSED (režim morfologie) zobrazující povrchu vzorku sk. A + topografie povrchu vzorku sk. A, znázorněná pomocí AFM (3D režim).



**Obr. 8:** Mikrofotografie pořízená pomocí SEM v módu SE a BSED (režim morfologie) zobrazující povrchu vzorku sk. B + topografie povrchu vzorku sk. B, znázorněná pomocí AFM (3D režim).



**Obr. 9:** Mikrofotografie pořízená pomocí SEM v módu SE a BSED (režim morfologie) zobrazující povrchu vzorku sk. C + topografie povrchu vzorku sk. C, znázorněná pomocí AFM (3D režim).



**Obr. 10:** Mikrofotografie pořízená pomocí SEM v módu SE a BSED (režim morfologie) zobrazující povrch vzorku sk. K + topografie povrchu vzorku sk. K, znázorněná pomocí AFM (3D režim).

Jednotlivé skupiny vzorků se mezi sebou lišily i svou smáčivostí a povrchovou energií, které byly stejně jako drsnost změřeny ve spolupráci s VŠCHT. Kontaktní úhel byl měřen na přístroji Krüss DSA 100 (Krüss GmbH, Německo). K měření byly použity dvě kapaliny: destilovaná voda a etylenglykol. Měření bylo provedeno pomocí kapek o objemu 3  $\mu$ l na 7 různých místech na vzorku. K měření byl použit 1 vzorek pro každou kapalinu. K vyhodnocení kontaktního úhlu a stanovení volné povrchové energie byl použit software DSA4. Kontaktní úhel byl stanoven metodou tangent 1. Volná povrchová energie byla poté vypočítána z průměrných hodnot kontaktních úhlů. K vyhodnocení povrchové energie byla použita metoda Owens-Wendt-Rabel-Kaelble. Stanovení probíhalo za laboratorní teploty. Další vzorek od každé experimentální skupiny byl použit na měření pomocí glycerolu. Bylo však zjištěno, že tato kapalina není vhodná pro měření vzorků B a C. Kapky na povrchu měly velmi nepravidelný tvar a každá kapka měla zcela odlišný kontaktní úhel v rámci jednoho vzorku, tj. hodnoty naměřené na jednom vzorku se pohybovaly v rozmezí 30° - 77°.

Kontrolní vzorky sk. K, byly poměrně hydrofobní (měly nejvyšší kontaktní úhel vodní kapky), kdežto v případě ostatních vzorků kontaktní úhel postupně klesal (viz tabulka 2). Povrchová energie byla nejnižší u kontrolních vzorků a naopak stoupala u vzorků skupiny A, B, C (viz tabulka 3). Polární část povrchové energie, která je podobně jako smáčivost považována za důležitý faktor pro adsorpci proteinů ECM umožňující adhezi buněk, byla vysoká u vzorků B a C, kdežto vzorků A setrvala na nízké hodnotě podobně jako u kontrolního vzorku.

**Tab. 2:** Kontaktní úhel vzorků slitiny Ti-6Al-4V

|                 | <b>kotaktní úhel,<br/>voda [°]</b> | <b>kotaktní úhel,<br/>etylenglykol [°]</b> |
|-----------------|------------------------------------|--|
| <b>Vzorek K</b> | 85,6 $\pm$ 4,9                     | 63,4 $\pm$ 4,1                             |
| <b>Vzorek A</b> | 56,8 $\pm$ 2,1                     | 12,4 $\pm$ 2,9                             |
| <b>Vzorek B</b> | 52,7 $\pm$ 4,7                     | 33,0 $\pm$ 0,7                             |
| <b>Vzorek C</b> | 44,0 $\pm$ 2,3                     | 30,4 $\pm$ 3,0                             |

- průměr S.D. (standardní odchylka) ze 7 měření pro každou skupinu vzorků a kapalinu.

**Tab. 3:** Volná povrchová energie vzorků Ti-6Al-4V

|                 | <b>volná povrchová energie [mN/m]</b> | <b>disperzní část povrchové energie [mN/m]</b> | <b>polární část povrchové energie [mN/m]</b> |
|-----------------|---------------------------------------|--|--|
| <b>vzorek K</b> | 25,4 ± 13,85                          | 19,5 ± 8,47                                    | 6 ± 5,38                                     |
| <b>vzorek A</b> | 50,9 ± 2,72                           | 45,3 ± 1,8                                     | 5,7 ± 0,9                                    |
| <b>vzorek B</b> | 47,0 ± 10,98                          | 12,8 ± 3,42                                    | 34,2 ± 7,55                                  |
| <b>vzorek C</b> | 55,4 ± 5,97                           | 8,7 ± 1,75                                     | 46,7 ± 4,22                                  |

- průměr S.D. (standardní odchylka) ze 7 měření pro každou skupinu vzorků a kapalinu

Jako kontrolní materiál pro srovnávání výsledků v jednotlivých experimentech byl použit polystyren, běžně užívaný ke kultivaci buněk (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko) a mikroskopické sklo o průměru 12 mm a šířce 1 mm (Merci s. r. o., ČR). Vzorky byly před každým použitím umyty v čistém etanolu a následně v destilované a deionizované vodě (DD). Vzorky ponořené v DD byly sterilizovány v autoklávu (120 °C, 1 atm, cyklus trvající 2 hod). Při experimentech byly vzorky sterilně vkládány do polystyrénových kultivačních destiček (průměr komůrky 1,5 až 2 cm) v laminárním boxu a osazovány buňkami.

#### 4. 1. 2 Použité typy buněk a kultivační podmínky

Pro základní testování adheze a proliferace buněk byly použity jednak komerčně dostupné lidské osteoblasty linie MG-63 (Human Osteoblast-Like MG 63 Cells, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) a Saos-2 (Human Osteogenic Sarcoma cells, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Německo). Obě linie se dnes běžně používají jako standardy pro testování biokompatibility a bioaktivity umělých materiálů vyvíjených pro konstrukci kostních implantátů. Středem našeho zájmu bylo otestovat adhezi, růst a diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně (ASCs), které jsou v současnosti intenzivně zkoumány jako alternativní zdroj mezenchymálních kmenových buněk pro účely tkáňového inženýrství kosti a to díky svým značným výhodám oproti jiným typům mezenchymálních kmenových buněk získaných například z kostní dřene. ASCs byly izolovány z lipoaspirátů, které byly získány metodou liposukce v rámci spolupráce s Klinikou plastické chirurgie fakultní nemocnice Na Bulovce, a to po souhlasu etické komise kliniky a informovaném souhlasu pacientky. Lipoaspiráty byly u téže pacientky získány dvojím způsobem - liposukcí při nízkém negativním tlaku (-200 mmHg; označeny jako „kmenové buňky N“) a při relativně vysokém negativním tlaku (kolem -700 mmHg; označeny jako „kmenové buňky V“).

Pro základní stanovení adheze a růstu buněk na jednotlivých povrchových úpravách vzorků Ti-6Al-4V pomocí fluorescenčního barvení byly použity jak tukové kmenové buňky (ASC-N i ASC-V), tak buněčná linie MG-63 jako kontrola. Pro imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciaci ASCs na vzorcích skla byla pro srovnání použita navíc i linie Saos-2, neboť si zachovala relativně vysokou hladinu osteogenní diferenciaci, podobnou primokultivovaným osteoblastům (Saldana *et al.* 2011). Stejně tak pro stanovení míry mineralizace extracelulární matrix buněk vápníkem pomocí histologického barvení barvivem Alizarin Red S. Pro imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciaci na vzorcích titanu byly použity pouze tukové kmenové buňky izolované při nízkém a vysokém negativním tlaku (ASC-N a ASC-V), které byly srovnávány navzájem mezi sebou. Na závěr byla míra exprese genů vybraných markerů osteogenní diferenciaci ASCs stanovena i pomocí metody kvantitativní real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase, polymerase chain reaction). V jednotlivých experimentech byly buňky nasazovány na vzorky většinou v množství 20 000 buněk/komůrku (1,5 až 2 cm) kultivační destičky (24 či 12-ti jamkové). Na každou jamku byl obvykle použit objem média 1,5 až 2 ml, v závislosti na objemu komůrek použité kultivační destičky.

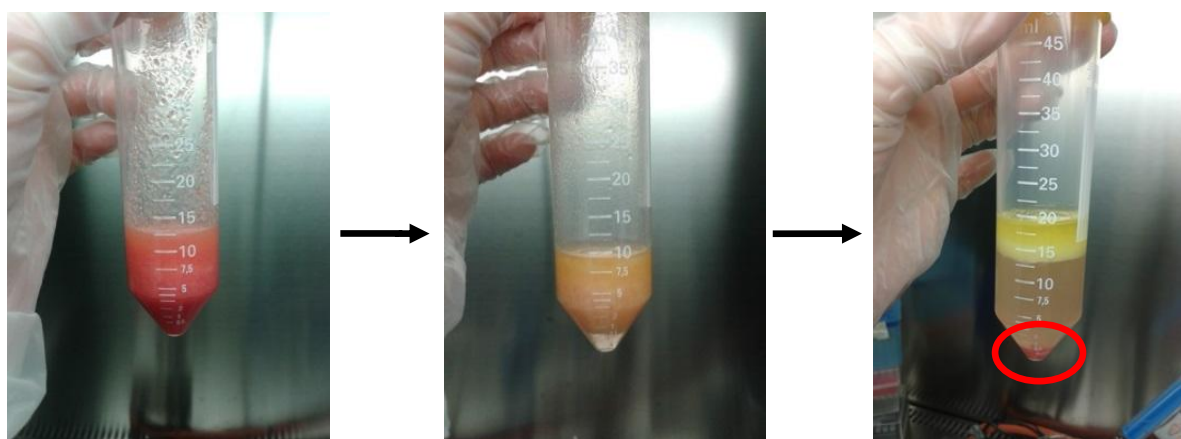
Ke kultivaci buněk linie MG-63 bylo použito Eaglovo minimální esenciální médium modifikované Dulbeccem (Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium – DMEM, Sigma-Aldrich, USA) s 10 % fetálního hovězího séra – FBS, fetal bovine serum (Sebak GmbH, Německo) a 40 µg/ml gentamycinu (LEK, Ljubljana, Slovinsko). V případě buněčné linie Saos-2 bylo použito McCoy's médium (Bio Concept Ltd., Švýcarsko) s 15% koncentrací FBS. Jako kultivační médium pro tukové kmenové buňky bylo použito DMEM s přidavkem růstového faktoru FGF-2 o koncentraci 5 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA). Pro účely osteogenní diferenciaci bylo pro tukové kmenové buňky a buněčnou linii MG-63 použito DMEM s 10 % FBS a 40 µg/ml gentamycinu, navíc obohacené o dexamethason (Sigma-Aldrich, USA) -  $10^{-8}$  mol/l (393 ng/ml), β-glycerolfosfát (Sigma-Aldrich, USA) - 10 mmol/l (2,16 mg/ml), L-glutamin (Thermo Fisher Scientific, USA) - 2 mmol/l (292 µg/ml), kyselinu askorbovou (Sigma-Aldrich, USA) - 50 µg/ml a dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA) -  $10^{-6}$  mol/l (385 ng/ml). Pro diferenciaci buněk Saos-2 bylo použito McCoy's médium s přidavkem stejných komponent a ve stejných koncentracích jako v osteogenním médiu pro ASCs a MG-63 .

Všechny druhy buněk byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C, s vlhkostí atmosféry cca 95 % a s 5% koncentrací oxidu uhličitého. ASCs byly po namnožení v kultuře pro dlouhodobé používání zamrazeny s použitím zamrazovacího média – DMEM + 10 % dimetylsulfoxidu – DMSO (Sigma-Aldrich, USA), který chrání buňky před poškozením a 20 % FBS. Nejprve byly buňky zamrazeny v -80 °C a následně byly přeneseny do tekutého dusíku o teplotě -180 °C.



### 4. 1. 3 Izolace kmenových buněk tukové tkáně

Z kliniky plastické chirurgie nemocnice Na Bulovce byly získány dva lipoaspiráty o objemu 10 ml, které byly získány metodou liposukce při nízkém a vysokém negativním tlaku. S oběma vzorky tkáně se pracovalo po celou dobu sterilně v laminárním boxu. Každý z lipoaspirátů, byl v plastové zkumavce o objemu 50 ml, smíchán s 10 ml roztoku pufrovaného fosfáty neboli PBS (phosphate-buffered saline; Sigma-Aldrich, USA) pro odstranění zbylého tuku a erytrocytů. Tuk, který vytvořil vrstvu nad buňkami tukové tkáně a erytrocyty, které naopak klesly na dno zkumavek, byly odstraněny pipetou. Tento postup byl několikrát zopakován pro úplné odstranění zbylých buněk tukové tkáně a erytrocytů. Před přípravou a aplikací enzymu pro rozvolnění tkáně, byly oba vzorky tkáně umístěny v 10 ml PBS na několik minut do termostatu. Pro rozvolnění získané tkáně byla vybrána kolagenáza typu I (Worthington, USA) – 0,1% kolagenáza byla rozmíchána v PBS s přidavkem 1% hovězího sérového albuminu, BSA (bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, USA), tedy 25 mg kolagenázy na 25 ml PBS s BSA. Poté byla kolagenáza přefiltrována přes antimikrobiální filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Německo). Takto připravený enzym byl v množství 10 ml přidán ke každému vzorku a ty byly následně na třepačce (Mini Orbital Shaker, SSM1, Stuart, UK) promíchávány při 150 rpm (revolutions per minute, otáčky za minutu) po dobu jedné hodiny v inkubátoru. Vzorky byly pak centrifugovány 5 minut při 300 g a teplotě 21  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byly vzorky promíchány a znovu centrifugovány. Po druhé centrifugaci byl zbylý supernatant, obsahující zbytek tuku a PBS, opatrně odstraněn. K získané stromální vaskulární frakci – SVF (viz obr. 11) byly přidány 2 - 3 ml DMEM s přidavkem FGF-2. Buňky byly přefiltrovány přes buněčný filtr o velikosti pórů 100  $\mu\text{m}$  (Millex Syringe-driven Filter Unit, Německo). Filtr byl poté propláchnut 7 - 10 ml nového média, a buňky byly znovu centrifugovány. Finálním krokem bylo nasazení buněk do kultivačních lahví (25  $\text{cm}^2$ ) v množství 0,16 ml původního lipoaspirátu na  $\text{cm}^2$  k namnožení. Do každé lahve bylo přidáno 5 ml média DMEM s FGF-2.



**Obr. 11:** Průběh separace tukové tkáně a erytrocytů při izolaci SVF (ohraňována červeně).

#### 4. 1. 4 Fenotypizace ASCs pomocí metody průtokové cytometrie

Pro účely stanovení fenotypu izolovaných ASCs-N a ASCs-V, a tedy potvrzení skutečnosti, že byly opravdu získány tukové kmenové buňky mezenchymálního původu, byly vybrány povrchové markery/molekuly, které jsou běžně používány pro charakterizaci mezenchymálních kmenových buněk: CD105, CD90, CD73, CD29, CD146, CD34, CD31 a CD45. Cílem bylo potvrdit přítomnost markerů CD90, CD29, CD73 a CD105 (markery kmenovosti a důležitých adhezních molekul) a vyvrátit přítomnost markerů CD31, CD34 a CD45 (markery krevních buněk) a CD146 (marker buněk endotelu). Jako kontrola byly použity buňky, ke kterým nebyly přidány značené protilátky. Pro tento pokus byly použity tukové kmenové buňky ve 2. pasáži, které dosáhly 85% konfluence.

Buňky byly po odsátí média a propláchnutí pomocí 8 - 10 ml PBS uvolněny ze dna kultivačních lahví aplikací 2 ml trypsinu po dobu 5 minut v termostatu. Působení enzymu bylo zastaveno přidáním 6 – 8 ml 10% fetálního hovězího séra v PBS. Buňky s přidáním sérem byly přeneseny do plastových zkumavek a centrifugovány při 1315 otáčkách po dobu 5 minut. Po opatrném odstranění vzniklého supernatantu bylo k peletám s buňkami přidáno 10 ml 0,5% BSA, které bylo připraveno naředěním v PBS. Byl použit vždy 1 ml pro daný marker (celkem 8), 1 ml pro neobarvené kontrolní buňky a 1 ml pro stanovení viability a počtu buněk ve vzorcích na přístroji vi-cell XR Analyser (Beckman Coulter, ČR) pro přibližné stanovení potřebného množství protilátek. Připravená suspenze každého buněčného typu byla rozdělena po 1 ml do ependorfeček, ke kterým bylo přidáváno určité množství protilátky proti konkrétnímu druhu markeru (viz tab. 4), a buňky byly takto inkubovány po dobu 45 minut ve tmě. Protilátky byly konjugovány s fluorescenční značkou: PE – fykoerytrin, TC, APC – alofykocyanin, FITC - fluorescenční isothiokyanatát (Caltag Laboratories, UK), Alexa 647 a Alexa 478 (Molecular Probes, Invitrogen, Life technologies, ČR).

Po uplynutí požadované doby inkubace buněk s fluorescenčně značenými protilátkami, byly buňky za použití centrifugace (3000 g po dobu 5 minut) 3x promyty 1 ml 0,5% BSA. Po kompletním promytí a odstranění zbylého supernatantu byly buňky resuspendovány v 700 µl PBS. Nakonec byla provedena detekce vybraných markerů obou populací kmenových buněk tukové tkáně (ASC-N a ASCs-V) a vyhodnocení získaných výsledků pomocí průtokového cytometru BD Accuri<sup>TM</sup> C6 plus (BD Accuri, USA). Mezi jednotlivými měřeními byl přístroj promýván 1 ml deionizované vody.

**Tab. 4:** Druh, charakteristika, množství a fluorescenční značení markerů pro fenotypizaci dvou druhů kmenových buněk tukové tkáně – ASCs-N a ASCs-V.

| Marker | Fluorescenční značka | Použité množství fluorescenčně značené protilátky | Popis markeru  |
|--------|----------------------|---|--|
| CD105  | PE                   | 10 $\mu$ l  | endoglin, regulační komponenta TGF- $\beta$  |
| CD90   | PE                   | 8 $\mu$ l   | asociován s multipotentní progenitorovou aktivitou   |
| CD73   | PE                   | 4 $\mu$ l   | Ekto-5'-nucleotidáza   |
| CD146  | PE                   | 4 $\mu$ l   | S-Endo, Muc18, exprimován buňkami endotelu   |
| CD34   | TC/PE/APC            | 10 $\mu$ l  | Povrchový glykoprotein, mezibuněčné interakce  |
| CD31   | FITC                 | 10 $\mu$ l  | Imunoglobulinová adhezní molekula na povrchu endotelových buněk, destiček monocytů a neutrofilů (jiný název: platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM) |
| CD45   | Alexa 647            | 10 $\mu$ l  | Leukocytární antigen   |
| CD29   | Alexa 488            | 4 $\mu$ l   | Fibronectinový receptor, zapojen do adheze buněk   |

#### 4. 1. 5 Stanovení adheze a růstu kmenových buněk tukové tkáně na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami

Ke stanovení vhodnosti vlivu různých povrchových úprav slitiny Ti-6Al-4V pro adhezi a růst buněk byl proveden experiment sledující schopnost adheze buněk k povrchu materiálu a jejich proliferaci. Byly použity oba typy kmenových buněk tukové tkáně (ASCs-N a ASCs-V) a buňky MG-63, jako kontrolní buněčná linie. Buňky byly analyzovány ve třech časových intervalech – 1. den, 3. den a 7. den po nasazení. První den byl použit pro stanovení úspěšnosti adheze buněk a měření velikosti adhezních ploch buněk. Třetí a sedmý den pak posloužily ke srovnání proliferace buněk na jednotlivých povrchových úpravách, a

také jednotlivých typů buněk navzájem mezi sebou. Buňky byly použity ve 2. pasáži v množství 10 000 buněk na komůrku kultivační destičky a byly kultivovány v DMEM, které bylo v případě kmenových buněk ještě obohaceno o FGF-2.

Po uplynutí jednotlivých intervalů byla adheze a proliferace buněk hodnocena za pomoci fluorescenčního barvení Texas Red C<sub>2</sub>-maleimid (Molecular Probes, Invitrogen, UK) o koncentraci 20 ng/ml v PBS a Hoechst #33342 (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 5 µg/ml také v PBS. Barvivo Texas Red bylo použito k vizualizaci buněčné membrány a cytoplazmy buněk (červený fluorescenční signál) a barvivo Hoechst k obarvení DNA a jádra buněk (modrý signál). Vzorky s buňkami v kultivačních destičkách byly zbaveny média, opláchnuty v PBS (Sigma-Aldrich, USA) a fixovány na materiálu po dobu 10 minut 70% etanolem vychlazeným na -20 °C a poté znovu opláchnuty pomocí PBS. Následně byl ke vzorkům s buňkami přidán připravený roztok s oběma fluorescenčními barvivy, který na buňky působil asi hodinu ve tmě (pro zabránění rychlému vysvícení fluorescenčních barviv). Po obarvení buněk byl roztok odstraněn, vzorky byly znovu opláchnuty v PBS nakonec hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu značky Olympus IX 51 digitální kamerou DP 71. Z každého vzorku bylo pořízeno 10 mikrofotografií a to náhodně vybraných polí, rovnoměrně rozložených na povrchu vzorku. Pro fotografování byl použit objektiv 10x a 20x. Při použití objektivu 10x zaujímal mikroskopické pole plochu 0,00544 cm<sup>2</sup>, při použití objektivu 20x (byl použit pro buňky MG-63, které dosahovaly 7. den po nasazení řádově vyšších populačních hustot než kmenové buňky) zaujímal pole 0,00136 cm<sup>2</sup>. V jednotlivých polích byl pak hodnocen počet buněk pomocí nástrojů programu Adobe Photoshop (Adobe Systems, USA) a také jejich morfologie. Morfologie buněk (zejména z hlediska jejich rozprostření na materiálu po adhezi) byla hodnocena 1. den, kde byly pomocí programu Atlas (Tescan Ltd., ČR) měřeny adhezní plochy buněk. Počet buněk byl u všech intervalů přepočítán na 1 cm<sup>2</sup>.

#### **4. 1. 6 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diference ASCs**

Pro ověření schopnosti kmenových buněk tukové tkáně diferencovat směrem k osteoblastům pod vlivem osteogenního média byly vybrány 3 markery osteogenní diference: kolagen I (KOL I), alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase, ALP) a osteocalcin (osteocalcin, OST). Kolagen I je časným markerem osteogenní diference, alkalická fosfatáza je střednědobým markerem osteogenní diference a osteocalcin je brán jako pozdní marker osteogenní diference. Všechny tyto proteiny jsou běžně exprimovány osteoblasty kostní tkáně a podílejí se na mineralizaci extracelulární matrix kostní tkáně vápníkem a fosfáty. Tento experiment byl zaměřen na osteogenní diferenciaci ASCs (oba typy), se kterými byly současně diferencovány i kostní buňky linií MG-63 a SaOS-2 pro srovnání výsledků. Množství jednotlivých proteinů exprimovaných v testovaných buňkách bylo stanoveno jako míra intenzity fluorescence fluorescenčně značených protilátek proti těmto markerům.

V rámci experimentu tedy byly použity čtyři buněčné typy: ASCs-L, ASCs-V, MG-63 a Saos-2. Jako vzorky bylo použito mikroskopické sklo o průměru 12 mm a šířce 1 mm (Merci s. r. o., ČR) a buňky byly na vzorky nasazeny ve 2. pasáži v množství 20 000 buněk na komůrku kultivační destičky. Buňky byly pro srovnání kultivovány jak pod vlivem běžného kultivačního média, tak pod vlivem osteogenního média v časových intervalech 5. a 12. den od přidání osteogenního média. Osteogenní média byla na buňky aplikována až po dosažení alespoň 80% konfluence při růstu v kultuře. Pro imunofluorescenční barvení buněk byla z destiček se vzorky skla s buňkami odstraněna média a buňky byly opláchnuty PBS. Následovala fixace buněk 70% etanolem po dobu 10 minut. Buňky byly poté 2x opláchnuty PBS. Pomocí 150  $\mu$ l 1% albuminu připraveného v PBS byla zablokována místa případné nespecifické vazby protilátek v buňkách. K albuminu byl rovněž přidán roztok 0.1% Tritonu X-100 (150  $\mu$ l), způsobující permeabilizaci buněčné membrány, která je nutná pro proniknutí protilátek do buněk. Obě látky jsme takto nechali na buňky působit cca 20 minut. Buňky byly znovu opláchnuty a byl přidáno 150  $\mu$ l 1% Tweenu 20 (Merck, USA) pro vyrušení autofluorescenčního pozadí, které projevuje víceméně každý materiál včetně skla. Po 20 minutách byl Tween odstraněn a buňky opláchnuty PBS. Pro detekci kolagenu I a osteokalcinu v buňkách byly vybrány králičí polyklonální protilátky anti-kolagen I (Cosmo Bio Co., USA) a anti-osteokalcin (Bachem Group, Peninsula Laboratories, USA). Proti alkalické fosfatáze byla použita myší monoklonální protilátka anti-alkalická fosfatáza (Sigma-Aldrich, USA). Všechny primární protilátky byly ředěny v poměru 1:200 v PBS. Na každý vzorek bylo aplikováno celkem 150  $\mu$ l primární protilátky, kterou jsme nechali inkubovat přes noc v chladu při teplotě 4 °C.

Na druhý den byla primární protilátka odstraněna, vzorky byly 2x opláchnuty v PBS a byla aplikována fluorescenčně značená sekundární protilátka, která emituje fluorescenční signál pouze tehdy, pokud je v buňkách specificky navázána i primární protilátka. Proti použité myší primární protilátce proti alkalické fosfatáze byla použita myší sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou Alexa Fluor®488 (Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies, ČR). Proti králičí primární protilátce použité proti kolagenu a osteokalcinu byla použita sekundární králičí protilátka konjugovaná s Alexa Fluor®488 (Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies, ČR). Obě sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:400, a navíc bylo k oběma přidáno fluorescenční barvivo Hoechst #33342 pro vizualizaci jader z důvodu stanovení počtů buněk na vzorcích, nutných pro normalizaci intenzity fluorescence na buňku. Barvivo Hoechst bylo ředěno v poměru 1:100. Inkubace sekundární protilátky s buňkami probíhala 1 hodinu ve tmě. Po ukončení inkubace sekundární protilátky byly vzorky opláchnuty v PBS a odsud byly přemístěny na mikroskopická podložní skla a otočeny buňkami směrem dolů, vzhledem k použitému inverznímu fluorescenčnímu mikroskopu Olympus IX 51 s digitální kamerou DP 70. Z každého vzorku vyfoceno 20 náhodných mikrofotografií – 10 pro stanovení počtů buněk a 10 pro změření intenzity fluorescenčního signálu pro daný marker. Fotografie byly pořizovány pomocí objektivu se zvětšením 20x. Při počítání buněk byly porovnány tři metody, a sice „ruční“ počítání buněk na mikrofotografiích (počet buněk násoben koeficientem 735x, plocha 0,00136 cm<sup>2</sup>), automatické počítání buněk na mikrofotografiích pomocí programu ImageJ (National Institutes of Health, USA), a počítání buněk pomocí přístroje Vi-CELL Analyser (Beckman)

(plocha skla: 1,1304 cm<sup>2</sup>), kde však musí být buňky od skla odděleny trypsinizací, a tudíž jsou nepoužitelné pro další imunofluorescenční analýzu. Intenzita fluorescence byla měřena pomocí programu Fluorescent Image Analysis software (Matějka, 2015), který byl zhotoven v laboratoři na FgÚ AVČR. Hodnoty fluorescence byly normalizovány na buňku. Jako kontrolní buňky pro odečet autofluorescence pozadí vzorků skla, byly použity buňky na vzorcích skla bez přídavku primární protilátky.

#### **4. 1. 6. 1 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami**

Tento experiment byl zaměřen na zjištění přímého vlivu jednotlivých modifikací slitiny titanu Ti-6Al-4V na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém a vysokém negativním tlaku. Jako markery osteogenní diferenciaci byly tentokrát použity pouze kolagen I - časný marker a osteokalcin – pozdní marker. Množství jednotlivých proteinů exprimovaných v testovaných buňkách bylo opět určeno pomocí intenzity fluorescence. Stejně tak jako u předchozího pokusu byly buňky kultivovány jak pod vlivem osteogenního média, tak v klasickém médiu (DMEM + 10% FBS + FGF-2), v časových intervalech 5. a 12. den od přídavku osteogenního média. Vždy bylo použito množství 20 000 buněk na komůrku kultivační destičky, a buňky byly ve 2. pasáži.

Postupy použité v tomto experimentu byly shodné s předchozím pokusem s výjimkou drobných detailů. Z důvodu větší velikosti použitých vzorků (průměr 14 mm, tloušťka 2 mm) bylo nutné použít větší objemy použitých chemikálií pro úplné ponoření povrchu vzorků pokrytými buňkami. Proto bylo použito namísto 150 µl 1% albuminu, 0,1% Tritonu X-100 a celkového množství primárních a sekundárních protilátek, 250 µl těchto chemikálií na vzorek. Výhodou titanu je, že prakticky nejeví autofluorescenci, ale i přesto byl použit 1% Tween 20 (v množství 250 µl). Dále byly jako kontrola barvení (pro každý buněčný typ, médium a markery) použity vzorky Ti-6Al-4V označené jako K, tedy kontrolní vzorky bez jakýchkoliv povrchových úprav. I zde byly v případě kontrol aplikovány pouze sekundární protilátky. Vzorky byly po imunofluorescenčním barvení také přemístěny na podložní mikroskopická skla (buňkami dolů) pro účely fotografování v inverzním mikroskopu. Celkově bylo z každého vzorku pořízeno 30 náhodně vybraných mikrofotografií – 15 pro intenzitu fluorescence a 15 pro stanovení počtu buněk na těchto snímcích, za použití objektivu se zvětšením 20x. Počty buněk byly v případě kratšího časového intervalu stanoveny počítáním v zorných polích, a v případě delšího intervalu, tj. při vysokých populačních hustotách, automaticky pomocí programu ImageJ. Intenzita fluorescence byla měřena pomocí programu Fluorescent Image Analysis software (Matějka, 2015). Výsledná intenzita fluorescence u obou markerů byla rovněž normalizována na buňku a intenzita fluorescence kontrolních vzorků (tj. bez přidání primární protilátky) byla odečtena.

#### **4. 1. 7 Stanovení mineralizace extracelulární matrix během osteogenní diferenciacce kmenových buněk tukové tkáně pomocí histologického barvení Alizarin Red S**

Cílem tohoto experimentu bylo určit, do jaké míry a jak rychle jsou schopny kmenové buňky tukové tkáně diferencovat směrem k osteoblastům a mineralizovat extracelulární matrix, což je poměrně pozdní proces v *in vivo* podmínkách. Barvivo Alizarin Red S bylo zvoleno proto, že má schopnost se vázat na depozita vápníku ve vzorcích tkáně či v buněčných kulturách. Použitými buňkami pro tento pokus byly kromě ASCs i MG-63 a Saos-2. Právě linie Saos-2 byla v tomto pokusu brána za standard, jelikož se jedná o více diferencovanou linii kostních buněk ve srovnání s linií MG-63. Buňky byly nasazeny pouze na dno kultivačních desek, a to v množství 20 000 buněk na komůrku. Pro kultivaci buněk (2. pasáž) byla použita jak osteogenní, tak neosteogenní (tj. standardní kultivační) média. Buňky byly analyzovány po 5 a 12 dnech růstu v osteogenním médiu. Mineralizace extracelulární matrix testovaných buněk byla nejprve hodnocena prostou vizualizací mineralizovaných složek ECM pomocí barviva Alizarin Red S.

Nejprve bylo z kultivačních destiček s buňkami odstraněno médium a buňky byly opláchnuty PBS. Následně byly buňky fixovány pomocí 70% etanolu zhruba 15 minut při pokojové teplotě. Po odstranění etanolu bylo k buňkám přidáno 500  $\mu$ l barviva Alizarin Red S. Roztok barviva byl připraven rozpuštěním 40 mM Alizarinu Red S (Sigma-Aldrich, USA) v destilované vodě, přičemž hodnota pH roztoku byla upravena na 4,1 pomocí kyseliny chlorovodíkové. Buňky společně s barvivem byly inkubovány po dobu 20 minut za stálého míchání na třepačce (Mini Orbital Shaker, SSM1, Stuart, UK). Po dobu inkubace bylo každých 5 minut nenavázané barvivo odstraněno a buňky promyty destilovanou vodou – celkem 4x. Po posledním promytí byla z destiček odstraněna veškerá tekutina a obarvená extracelulární matrix buněk byla hodnocena ve fázovém mikroskopu značky Olympus IX 51 s digitální kamerou DP 70 při zvětšení objektivu 4x. Toto relativně malé zvětšení bylo zvoleno pro zabránění co největších ploch na vzorcích, jelikož v centru pozornosti nebyla morfologie samotných buněk, ale detekce ložisek mineralizace matrix. Od každého typu buněk a použitého média bylo pořízeno vždy alespoň 10 mikrofotografií ke srovnání výsledků mineralizace ECM.

Mineralizace matrix produkované buňkami, byla sledována rovněž semikvantitativně. Do každé komůrky s obarvenými buňkami bylo přidáno 400  $\mu$ l 10% kyseliny octové, kterou jsme nechali na buňky působit 30 minut při pokojové teplotě. Kyselina se používá po snížení pH a uvolnění vrstvy mineralizované matrix ode dna kultivační desky. Tato vrstva, obarvená Alizarinem Red S, byla společně i s kyselinou seškrábána ze dna komůrek a přenesena do 1,5 ml eppendorfky širokoústou pipetou. Vše bylo promícháno na vortexu a překryto vrstvou 250  $\mu$ l minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA) pro zabránění odpaření vzorků při následujícím zahřívání – 10 minut při 85 °C. Po rychlém zchlazení byly buňky centrifugovány 15 minut při 20 000 g a po opatrném odstranění minerálního oleje, byly supernatanty přeneseny do nových eppendorfek. Obsah zkumavek byl neutralizován přidávkem 100  $\mu$ l 10% hydroxidu amonného. Pro práci s kyselinami a hydroxidy byla použita digestoř. Takto připravené

supernatanty byly naneseny v tripletech o objemu 150  $\mu$ l do 96-ti jamkové destičky (Nunc, Německo), ve které byla kolorimetricky stanovena intenzita obarvení extracelulární matrix buněk, tedy míra její mineralizace, měřením absorbance na přístroji Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, USA). Absorbance byla pro ověření správné přípravy roztoku barviva Alizarin Red S měřena při dvou vlnových délkách - 405 a 550 nm.

#### **4. 1. 8 Stanovení genové exprese markerů osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR**

Pro stanovení míry osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně až na úrovni genové exprese byla použita metoda real-time PCR, která patří k nejcitlivějším a nejvíce používaným metodám molekulární biologie. Pomocí PCR jsme se pokusili stanovit míru exprese genů námi vybraných markerů osteogenní diferenciaci - kolagenu I, alkalické fosfatázy a osteokalcinu. Dále byl zvolen RUNX (Runt-related transcription factor, transkripční faktor odvozený z Runt genu) jako progenitorový marker ASCs. RunX je transkripční faktor podporující diferenciaci kmenových buněk směrem k chondrocytům a osteoblastům. Jako referenční gen byl použit GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), který je tzv. housekeepingovým genem, který je v buňce stabilně exprimován. Srovnávali jsme mezi sebou tukové kmenové buňky izolované při nižším negativním tlaku (ASCs-N) a při vyšším negativním tlaku (ASCs-V) ve druhé pasáži. Buňky byly sledovány ve třech časových intervalech, a sice 1. den, 7. den a 14. den od přidavku osteogenního média. Pro srovnání rozdílů byly buňky kultivovány také v neosteogenním médiu. Buňky byly pěstovány pouze na polystyrenu a na komůrku (12-ti jamková kultivační destička) bylo nasazeno 20 000 buněk. Pro normalizaci výsledků osteogenní diferenciaci u delších časových intervalů byl použit interval označený jako tzv. 0. den – buňky v konfluenci před aplikací osteogenního média. Genová exprese každého markeru byla stanovena ze získaných hodnot prahových cyklů (Ct, threshold cycle). Exprese každého genu byla vyčíslena jako  $2^{-\Delta Ct}$ , kdy  $\Delta Ct$  představuje rozdíl Ct hodnot sledovaných genů a referenčního genu GAPDH pro oba typy ASCs.

##### **4. 1. 8. 1 Izolace RNA**

Pro izolaci RNA z kmenových buněk tukové tkáně byl použit Total RNA Purification Micro Kit (Norgen Biotec Corp., Kanada). Nejprve byl v digestoři připraven lyzační roztok pro buňky, kdy na každý 1 ml lyzačního roztoku připadlo 10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich). Buňky byly po odstranění média opláchnuty PBS a poté bylo k buňkám 2x přidáno 350  $\mu$ l lyzačního roztoku. Roztok jsme nechali vždy asi 5 minut působit a poté byl i spolu s buňkami důkladně propipetován a přemístěn do mikrocentrifugačních zkumavek. K lyzátu bylo přidáno 400  $\mu$ l 95% etanolu a obsah byl promíchán ručně či na vortexu za vzniku bílé sraženiny (vysrážená RNA). Směs lyzátu a etanolu byla nanesena na kolonky



umístěné ve sběrných mikrocentrifugačních zkumavkách. Celkem bylo na kolonky nanášeno 2x 600 µl buněčného lyzátu, který byl pokaždé centrifugován po dobu 1 minuty při 14 000 rpm v centrifuzě vychlazené na 6 °C. Vzniklý supernatant byl pokaždé ze sběrných zkumavek odstraněn. Poté byl na kolonky aplikován promývací roztok, a to celkem 3x (1x 600 µl a 2x 400 µl). Po každé aplikaci následovala centrifugace opět po dobu 1 minuty při 14 000 rpm a odstranění supernatantu. Po třetí centrifugaci byly prázdné sběrné zkumavky spolu s kolonkami dodatečně centrifugovány po dobu 2 minut při 14 000 rpm pro úplné odstranění promývacího roztoku. Po tomto kroku byly kolonky umístěny do sterilních 1,7ml elučnicích zkumavek a na každou kolonku bylo nakapáno 40 µl elučního roztoku pro získání vyizolované RNA z kolonky. Posledním krokem izolace byla centrifugace zkumavek s kolonkami po dobu 2 minut při 2 000 rpm a poté 1 minutu při 14 000 rpm. Kolonky byly po eluci vyhozeny a získaná RNA byla umístěna na led. U jednotlivých vzorků byla na přístroji Implen NanoPhotometer (Implen, Německo) změřena čistota RNA a její koncentrace. Jako blank byl použit eluční roztok.

#### 4. 1. 8. 2 Reverzní transkripce

K získání cDNA (complementary DNA, komplementární DNA) pro analýzu genové exprese pomocí PCR byla použita metoda reverzní transkripce, která je za pomoci enzymu reverzní transkriptázy a přidaných komponent schopná tzv. přepsat RNA do cDNA. Tento jev přirozeně nastává například u retrovirů (při vstupu do hostitelského organismu), ze kterých je také enzym získáván. Reverzní transkripce byla provedena pomocí ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kitu (BioLabs, USA). Vzorky RNA a veškeré reagenty byly na začátku promíchány a centrifugovány. Nejprve byla do sterilních stripů plastových mikrozkušavek v laminárním PCR boxu (Esco® PCR cabinet) napipetována nuclease-free voda (voda bez přítomnosti nukleáz, které by mohly degradovat nestabilní jednovláčkovou RNA) - variabilní množství v závislosti na koncentraci vzorků a oligodeoxynukleotidy d(T)<sub>23</sub> VN (50 µM) – 2 µl. Poté byly do stripů přidány i jednotlivé vzorky RNA, opět ve variabilním množství, v závislosti na jejich koncentraci (v rozmezí 1 – 6 µl RNA). Celkový objem všech reagentů v každé mikrozkušavce byl 8 µl a reverzní transkripce byla pro každý vzorek RNA prováděna v tripletu. Pomocí Biometra T Personal Thermocycleru (Biometra, Německo) byly vzorky RNA denaturovány - 5 minut při 70 °C (pro snadnější přístup oligo dT k RNA) a poté rychle zchlazeny na ledu a centrifugovány (microplate microcentrifuge, Benchmark Scientific, Německo). V mezičase byla v PCR boxu připravena reakční směs smícháním 10 µl M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus, virus Moloneyho myši leukemie) reakčního mixu se 2 µl M-MuLV mixu enzymu. Celkem tedy na každý vzorek připadlo 12 µl reakční směsi spolu s reverzní transkriptázou. Jako kontrola reakce byly použity některé ze vzorků o vyšší koncentraci, u kterých bylo namísto 2 µl reverzní transkriptázy přidány 2 µl nuclease-free vody. Použité vzorky RNA a reverzní transkriptáza byly po celou dobu reakce chlazeny na ledu. Ke zchlazeným vzorkům RNA s přídavkem vody a nukleotidů bylo přidáno 12 µl reakční směsi s enzymem, a tak výsledný objem každé z reakcí byl 20 µl. Pro syntézu cDNA byly vzorky zahřívány v Biometra T Personal Thermocycleru při teplotě 42 °C asi 1 hodinu.

Po uplynutí této doby byl enzym inaktivován zahřátím vzorků na 80 °C po dobu 5 minut. Získaná cDNA byla na závěr naředěna na objem 50 µl pomocí 30 µl nuclease-free vody. Tato poměrně stabilní cDNA může být dlouhodobě uchovávána při teplotě -20 °C.

#### 4. 1. 8. 3 Kvantitativní real-time PCR za použití fluorescenčního barviva SYBR Green

Veškeré chemikálie a vzorky byly před použitím rozmrazeny, promíchány a centrifugovány. Pro PCR reakci byl použit FastStart Universal SYBR Green Master Mix - ROX (Roche, Německo). Pro každý marker a GAPDH byly v PCR boxu sterilně připraveny reakční směsi se specifickými primery (0,3 µM), SYBR Green Master Mixem a DNase/RNase free vodou (viz tabulka 5), které byly až do doby přidání ke vzorkům, uchovávány ve tmě kvůli přítomnému fluorescenčnímu barvivu. Poté byly do 96-ti jamkové destičky (Bio-Rad, ČR) nanесeny vždy 2 µl od každého vzorku a to v dubletech pro každý marker a referenční gen. Jako negativní kontrola byly použity 2 µl DNase/RNase free vody namísto vzorku cDNA. Nakonec bylo ke všem vzorkům a kontrolám přidáno 18 µl jednotlivých reakčních směsí – celkový objem jedné PCR reakce byl 20 µl. Genová exprese jednotlivých markerů byla měřena na přístroji IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, ČR) a vyhodnocena pomocí příslušného programu. Genová exprese každého markeru byla stanovená ze získaných hodnot prahových cyklů (Ct, threshold cycle). Expresse každého genu byla vyčíslena jako  $2^{-\Delta Ct}$ , kdy  $\Delta Ct$  představuje rozdíl Ct hodnot sledovaných genů a referenčního genu GAPDH pro oba typy ASCs.

**Tab. 5:** Druh a množství jednotlivých reagensů pro PCR reakci.

| Druh reagensie                           | Celkový objem |
|--|---------------|
| SYBR Green Mix                           | 10 µl         |
| Forward primer                           | 0,2 µl        |
| Reverse primer                           | 0,2 µl        |
| DNase/RNase free H <sub>2</sub> O        | 7,6 µl        |
| DNA templát                              | 2 µl          |
| <b>Celkový objem reakce pro 1 marker</b> | <b>20 µl</b>  |

#### **4. 1. 9 Ověření vlivu fibroblastového růstového faktoru FGF-2 na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR**

Vzhledem k výsledkům osteogenní diferenciaci tukových kmenových buněk získaných pomocí předchozího PCR experimentu, kde nebyly u všech markerů nalezeny výrazné rozdíly v jejich expresi v osteogenním a neosteogenním médiu, jsme se rozhodli ověřit vliv fibroblastového růstového faktoru, běžně přidávaného do neosteogenního média určeného ke kultivaci ASCs. FGF-2 je používán pro tzv. pre-treatment tukových kmenových buněk před jejich diferenciací. Má se za to, že jeho hlavní funkcí je stimulace proliferace mezenchymálních kmenových buněk. Účelem tohoto experimentu tedy bylo srovnání osteogenní diferenciaci ASCs, která mohla být navíc podpořena vlivem pre-treatmentu buněk pomocí FGF-2 a osteogenního média (předchozí experiment) a osteogenní diferenciaci způsobené pouze vlivem osteogenního média.

Pro stanovení míry genové exprese pomocí real-time PCR byly použity stejné markery i referenční gen jako v předchozím experimentu, srovnávány byly oba dva typy tukových kmenových buněk (2. pasáž) ve stejném množství – nasazeno 20 000 buněk na komůrku kultivační destičky, a buňky byly opět kultivovány v podmínkách osteogenního i neosteogenního média. Jedinými rozdíly v případě tohoto experimentu bylo vynechání fibroblastového růstového faktoru z neosteogenního média a vynechání čtrnáctidenního intervalu osteogenní diferenciaci buněk z toho důvodu, že jsme v předchozím experimentu nepozorovali žádné výrazné rozdíly v diferenciaci mezi 7. a 14. dnem. Dílčí kroky pokusu jako: izolace RNA, reverzní transkripce a PCR reakce byly také shodné s předchozím experimentem.

#### **4. 1. 10 Statistická analýza**

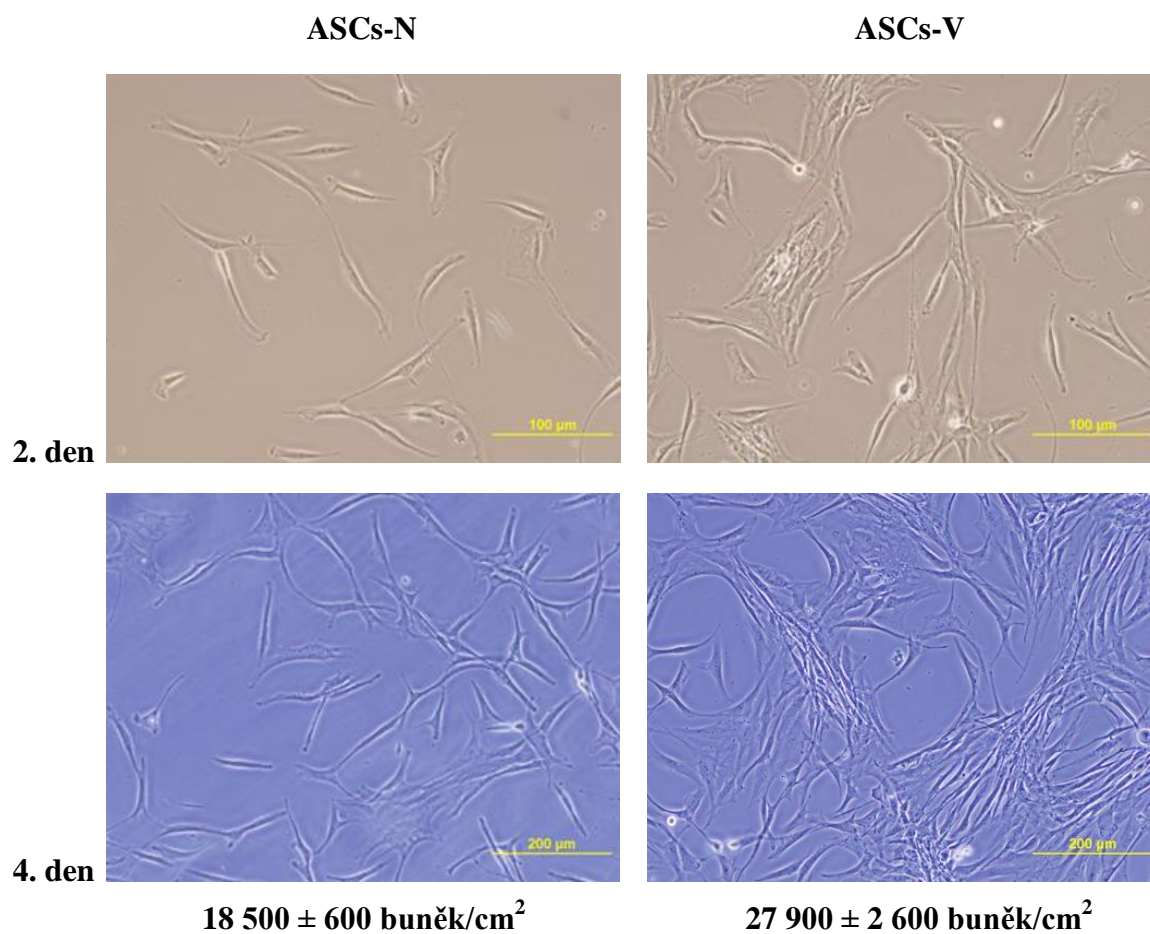
Ke statistické analýze byl použit program SigmaStat (Jandel Corporation, USA). Kvantitativní data byla vyjádřena jako aritmetický průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru, Standart Error of Mean). Jednotlivé skupiny vzorků byly mezi sebou srovnávány pomocí testu ANOVA, za použití Student-Newman-Keulsovy metody. Hodnota  $p \leq 0.05$  byla považována za statisticky významnou.

## 5. Výsledky

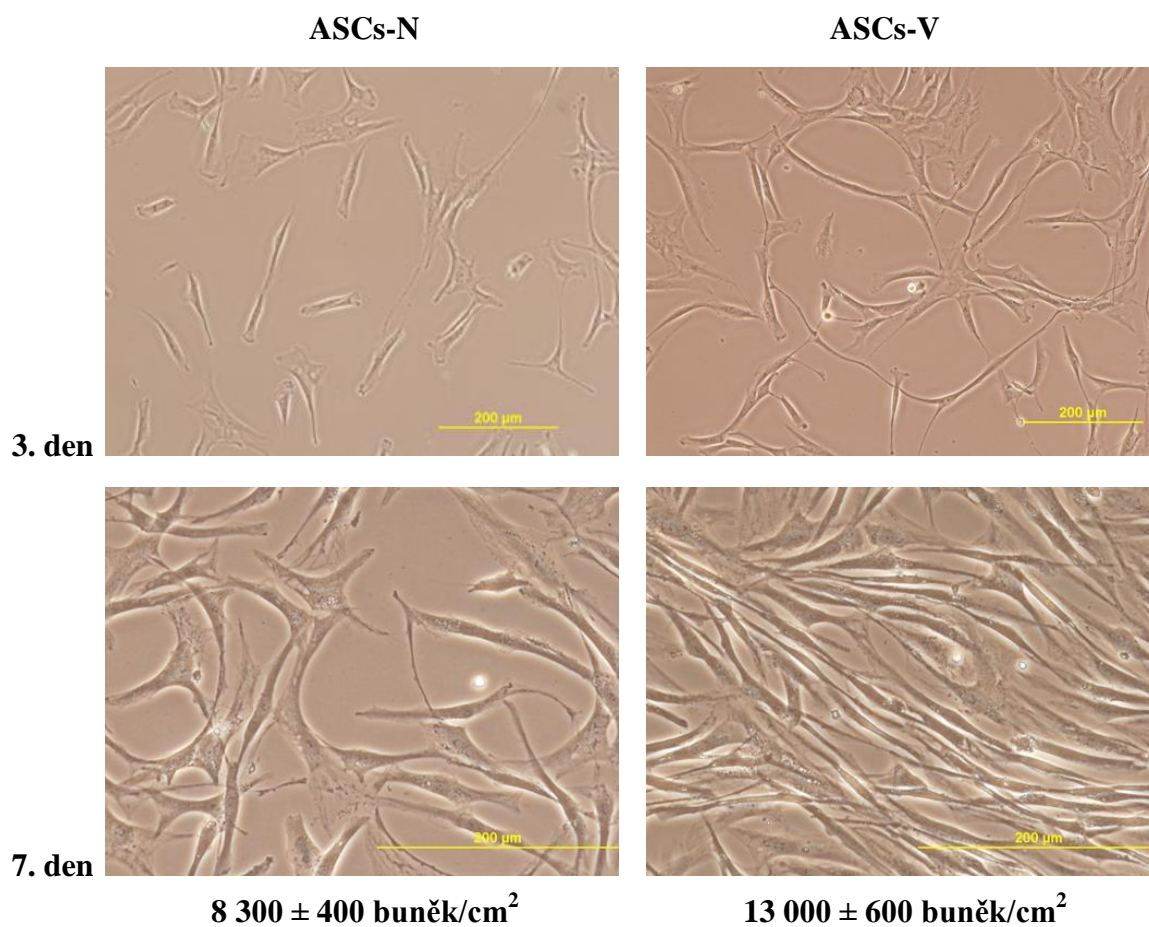
### 5. 1 Rozdíly v proliferaci kmenových buněk tukové tkáně získaných liposukcí při nízkém a vysokém negativním tlaku (ASCs-N a ASCs-V)

Z **obr. 12** a **13** je zřejmé, že se dvě populace tukových kmenových buněk, odebraných liposukcí při dvou různých negativních tlacích (-200 a -700 mmHg), mezi sebou navzájem liší. Po izolaci ASCs ze dvou různých lipoaspirátů o objemu 10 ml (promytí PBS, natrávení kolagenázou typu I, centrifugace a filtrace pomocí buněčného filtru – 100  $\mu\text{m}$ ) byly buňky nasazeny do kultivačních lahví v množství 4 000 buněk/ $\text{cm}^2$ . Po adhezi buněk bylo možné sledovat rozdíly v rychlosti jejich proliferace a zvyšování počtu. Rozdíly mezi buňkami byly patrné již druhý den, kdy se zdálo, že buňky izolované při nižším negativním tlaku adherují ke dnu kultivační lahve pomaleji a stejně pomalu i proliferují. Největší rozdíly mezi buňkami byly patrné asi 7. den od nasazení (**obr. 13**). ASCs-H dosahovaly daleko vyšších populačních hustot a 5. den od nasazení se jejich populační denzita pohybovala až kolem  $\sim 63\,000$  buněk/ $\text{cm}^2$ . ASCs-N dosahovaly populační denzitu pouze okolo  $\sim 40\,000$  buněk/ $\text{cm}^2$ .

Rozdíly mezi dvěma různými populacemi jednoho buněčného typu si vysvětlujeme tak, že během liposukce při vyšším negativním tlaku jsou získávány tukové kmenové buňky trochu jiných vlastností a kvality ze spodnějších vrstev tukové tkáně, než při nižším negativním tlaku. Navíc mohlo být ve stromální vaskulární frakci, izolované z lipoaspirátu získaném při nižším negativním tlaku, přítomno více tukových kmenových buněk, které dobře adherují na rozdíl od jiných typů buněk přítomných ve SVF. Rozdíly v proliferaci ASCs-N a ASCs-V přetrvávaly i v dalších pasážích, ba dokonce se prohlubovaly, a to i po procedurách jako jsou trypsinizace a kryopreservace buněk. Lepší a rychlejší proliferace ASCs-V je poměrně překvapivá, jelikož lze logicky předpokládat větší poškození těchto buněk vlivem vyššího negativního tlaku použitého při jejich izolaci.



**Obr. 12:** Proliferace kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém negativním tlaku (-200 mmHg, ASC-N) a vysokém negativním tlaku (-700 mmHg, ASC-V) 2. a 4. den po nasazení (1. pasáž). Oba typy buněk byly nasazeny v množství 4 000 buněk na cm<sup>2</sup> kultivační lahve. Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 10x. Úsečka představuje 100 μm (1. den) nebo 200 μm (4. den).



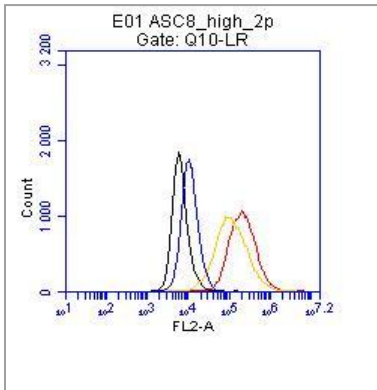
**Obr. 13:** Proliferace kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém negativním tlaku (-200 mmHg, ASC-N) a vysokém negativním tlaku (-700 mmHg, ASC-V) 3. a 7. den po nasazení (2. pasáž). Oba typy buněk byly nasazeny v množství 4 000 buněk na cm<sup>2</sup> kultivační lahve. Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 10x (3. den) nebo 20x (7. den). Úsečka představuje 200 μm.

## 5. 2 Charakterizace ASCs- N a ASCs-V pomocí průtokové cytometrie

U buněk izolovaných při nízkém negativním tlaku (ASCs-N) a u buněk izolovaných při vysokém negativním tlaku (ASCs-V), byl ve druhé pasáži pomocí vybraných imunofluorescenčně značených povrchových CD markerů, stanoven fenotyp, a to na principu emise fluorescenčního signálu po vazbě protilátky k antigenu na povrchu buňky, pomocí laserového paprsku a jeho následného zachycení detekčním zařízením v průtokovém cytometru. Na jednotlivých histogramech je patrné, že jak u ASCs-N, tak u ASCs-V byla prokázána přítomnost markerů kmenovosti a důležitých adhezních molekul - CD105 (endoglin, tj. regulační komponenta TGF-beta receptoru), CD90 (spojován s multipotentní progenitorovou aktivitou), CD73 (ecto-5'-nukleotidáza) a CD29 (fibronectinový receptor, tj. integrinová adhezní molekula, důležitá pro buněčnou adhezi) a zároveň vyvrácena přítomnost markerů značících výskyt dalších buněčných typů, jako třeba buněk endotelu a krve - CD146 (buňky endotelu), CD34 (hematopoetické progenitorové buňky), CD31 (krevní destičky, neutrofil, monocyty, T-buňky, marker důležitý pro angiogenezi a migraci leukocytů) a CD45 (charakteristický pro leukocyty) - viz obr. 14 a tab. 6. Populace ASCs-V však byla více homogenní a buňky se pro dané markery lépe imunofluorescenčně barvily. Populace buněk ASC-N se naopak jevila jako heterogenní (výskyt dvou různých populací), což může být způsobeno rozdíly v tlaku při liposukci a následnému odběru buněk ze svrchních vrstev tukové tkáně.

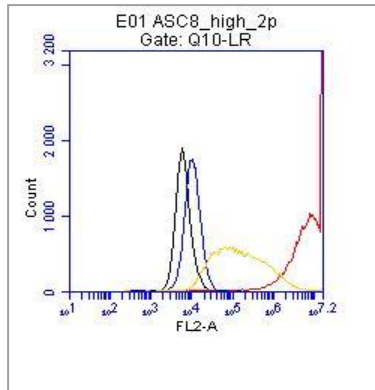
Bližší určení případných subpopulací přítomných u ASCs-N, způsobujících jejich heterogenitu, by mohlo být provedeno až na základě dalších pokusů za použití jiné skupiny markerů. Problémem je všeobecná nespecifičnost markerů, používaných k charakterizaci mezenchymálních kmenových buněk a to, že samotné ASCs, jsou běžně heterogenní směsí, obsahující subpopulace kmenových a progenitorových buněk, které často koexistují s pericyty a buňkami endotelu. Stejně tak zdravotní stav naší dárkyně (kuřačka, 43 let, po onkologickém nálezu), podmínky odběru buněk (použity dva různé tlaky) a místo jejich odběru (v případě naší pacientky se jednalo o odběr tukové tkáně z břicha), může ovlivnit vlastnosti a tedy i fenotyp získaných ASCs. Nesmí být opomenut také fakt, že se fenotypické vyžívání buněk, může následkem pasážování a dalších laboratorních úkonů, časem postupně měnit.

**CD105**



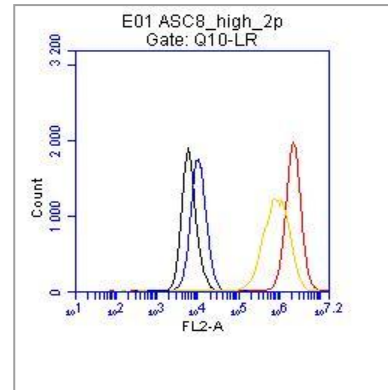
**ASCs-N: 70 %**  
**ASCs-V: 88 %**

**CD90**



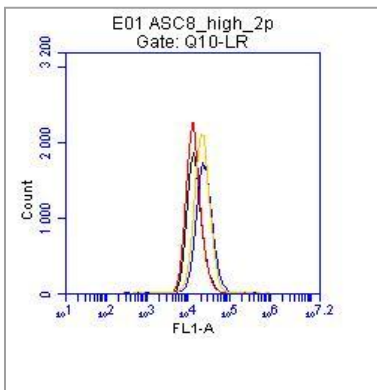
**ASCs-N: 90 %**  
**ASCs-V: 100 %**

**CD73**



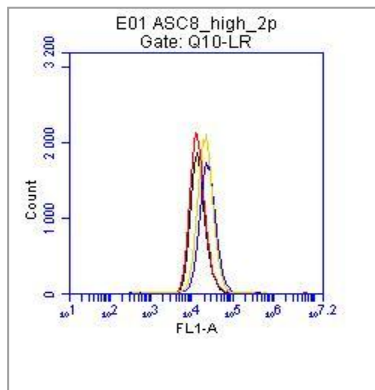
**ASCs-N: 99 %**  
**ASCs-V: 100 %**

**CD146**



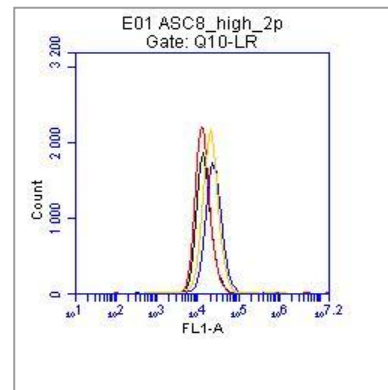
**ASCs-N: nedetekováno**  
**ASCs-V: nedetekováno**

**CD34**



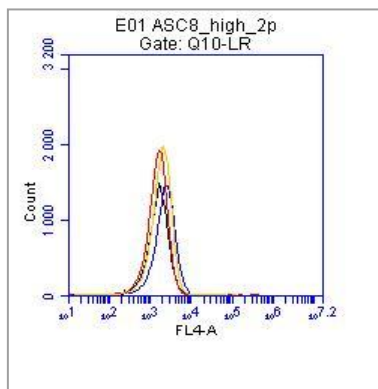
**ASCs-N: nedetekováno**  
**ASCs-V: nedetekováno**

**CD31**



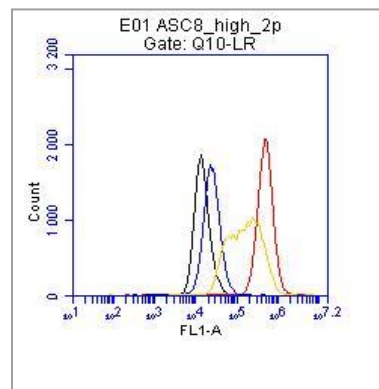
**ASCs-N: nedetekováno**  
**ASCs-V: nedetekováno**

**CD45**



**ASCs-N: nedetekováno**  
**ASCs-V: nedetekováno**

**CD29**



**ASCs-N: 60 %**  
**ASCs-V: 100 %**



**Obr. 14:** Výsledky cytometrické analýzy dvou populací tukových kmenových buněk ASCs-N (izolovány při -200 mmHg) a ASCs-V (izolovány při -700 mmHg). Na základě detekce signálů vyvolaných vazbou fluorescenčně značené protilátky k antigenu/markeru na povrchu buňky, byly získány dvouparametrové histogramy a procenta zastoupení buněk nesoucí tyto markery. Černé a modré křivky představují kontrolní vzorky pro ASCs-V a ASCs-N bez fluorescenčně značených protilátek, a červeně a žlutě znázorněné křivky představují ASCs-V a ASCs-N s detekovaným fluorescenčním signálem pro daný marker. Analýza byla provedena na buňkách ve druhé pasáži, na průtokovém cytometru BD Accuri<sup>TM</sup> C6 plus.

**Tab. 6:** Druh, charakteristika, fluorescenční značení a výsledné procentuální zastoupení vybraných markerů fenotypizace dvou populací tukových kmenových buněk - ASCs-N a ASCs-V pomocí průtokové cytometrie.

| Marker       | Fluorescenční značka | Popis markeru  | ASCs-N             | ASCs-V             |
|--------------|----------------------|--|--------------------|--------------------|
| <b>CD105</b> | PE                   | Endoglin, regulační komponenta TGF- $\beta$  | <b>70 %</b>        | <b>88 %</b>        |
| <b>CD90</b>  | PE                   | Asociován s multipotentní progenitorovou aktivitou   | <b>90 %</b>        | <b>100 %</b>       |
| <b>CD73</b>  | PE                   | Ekto-5'-nucleotidáza   | <b>99 %</b>        | <b>100 %</b>       |
| <b>CD146</b> | PE                   | S-Endo, Muc18, exprimován buňkami endotelu   | <b>Nedetekován</b> | <b>Nedetekován</b> |
| <b>CD34</b>  | TC/PE/APC            | Povrchový glykoprotein, mezibuněčné interakce  | <b>Nedetekován</b> | <b>Nedetekován</b> |
| <b>CD31</b>  | FITC                 | Imunoglobulinová adhezí molekula na povrchu endotelových buněk, destiček monocytů a neutrofilů (jiný název: platelet-endothelial cel adhesion molecule, PECAM) | <b>Nedetekován</b> | <b>Nedetekován</b> |
| <b>CD45</b>  | Alexa 647            | Leukocytární antigen   | <b>Nedetekován</b> | <b>Nedetekován</b> |
| <b>CD29</b>  | Alexa 488            | Fibronektinový receptor, zapojen do adheze buněk   | <b>60 %</b>        | <b>100 %</b>       |

### 5. 3 Srovnání adheze a růstu kmenových buněk tukové (ASCs-L, ASCs-V) na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami

Pro tento druh experimentu byla jako standard ke srovnání dosažených výsledků použita linie lidských osteoblastů MG-63, tj. buňky s doboru adhezí a proliferační aktivitou. Můžeme s jistotou říci, že všechny skupiny testovaných vzorků slitiny Ti-6Al-4V umožňovaly adhezi všech tří typů použitých buněk.

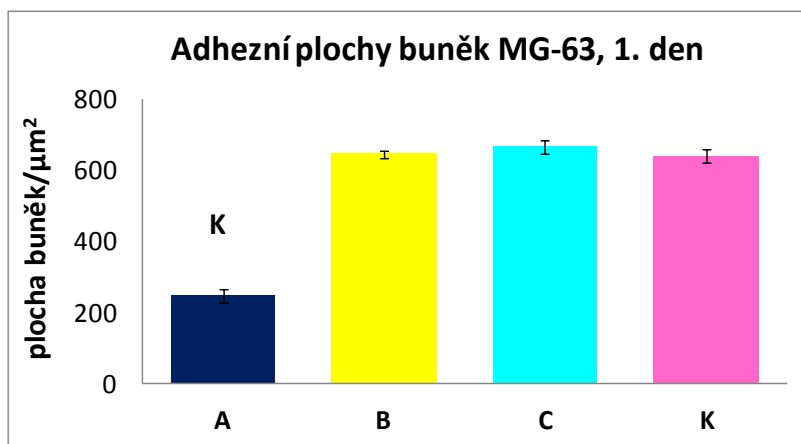
V případě intervalu 1. dne byly změřeny adhezí plochy buněk rozprostřených na jednotlivých materiálech (buňky se při nízkých populačních hustotách v časných kultivačních intervalech obvykle navzájem nedotýkají, a nedochází tak ke zkreslení výsledků měření velikosti adhezí ploch). Na základě výsledků z proměřování mikrofotografií můžeme říci, že největší adhezí plochy zaujímaly kmenové buňky na vzorcích sk. A a K (povrchové úpravy vzorků s poměrně nízkou polární složkou povrchové energie) - 1060-1310  $\mu\text{m}^2$ . Naopak nejnižšího rozprostření dosahovaly kmenové buňky na vzorcích sk. B (poměrně vysoká povrchová smáčivost) - 730-820  $\mu\text{m}^2$  (**obr. 15: A-C**). Tyto rozdíly byly patrnější u ASC-V než u ASC-N. Adhezí plochy buněk byly nejnižší na vzorcích A, a u ostatních skupin vzorků se navzájem nelišily. Tento výsledek lze vysvětlit nižší citlivostí buněčných linií, zvláště nádorových buněk, k fyzikálním a chemickým vlastnostem materiálu, než je tomu u buněk primokultivovaných a nízcе pasážovaných. Adhezí plochy byly rovněž všeobecně větší u buněk kmenových než u buněk MG-63.

První den po nasazení nebyly nijak patrné výrazné rozdíly v počtu buněk (**obr. 16: A-C**) a statisticky významné rozdíly byly viditelné až 3. den po nasazení. Lidské osteoblasty linie MG-63 dosahovaly na vzorcích sk. B a C (povrchové úpravy vzorků s nejvyšší smáčivostí a nejvyšší polární složkou povrchové energie) daleko vyšších počtů než na vzorcích kontrolní skupiny K a A (**obr. 16: D**). Podobných výsledků bylo dosaženo i u kmenových buněk. U kmenových buněk N (ASCs-N) bylo nejvyšších počtů dosaženo na vzorcích sk. C, a u kmenových buněk V (ASCs-V) zase na vzorcích sk. B (**obr. 16: E a F**). Finální populační hustoty buněk, dosažené 7. den po nasazení, byly vysoké i u buněk na vzorcích sk. A. U všech sledovaných typů buněk, tedy MG-63, ASCs-N a ASCs-V, byly populační hustoty na vzorcích A vždy významně vyšší, než na kontrolních vzorcích K (**obr. 16: G-I**). U ASCs-N byly populační hustoty na vzorcích A dokonce vyšší i ve srovnání se vzorky B a C (**obr. 16: H**). Můžeme tedy shrnout, že všechny sledované modifikace podpořily adhezi a růst lidských osteoblastů linie MG-63 i tukových kmenových buněk. Modifikace B a C se jeví jako vhodnější k podpoře rychlého nástupu proliferace buněk, kdežto v dlouhodobějším sledování se jeví jako vhodnější vzorky skupiny A, na nichž všechny tři sledované buněčné typy spolehlivě dosahovaly nejvyšších finálních populačních hustot (**obr. 16 J-L**).

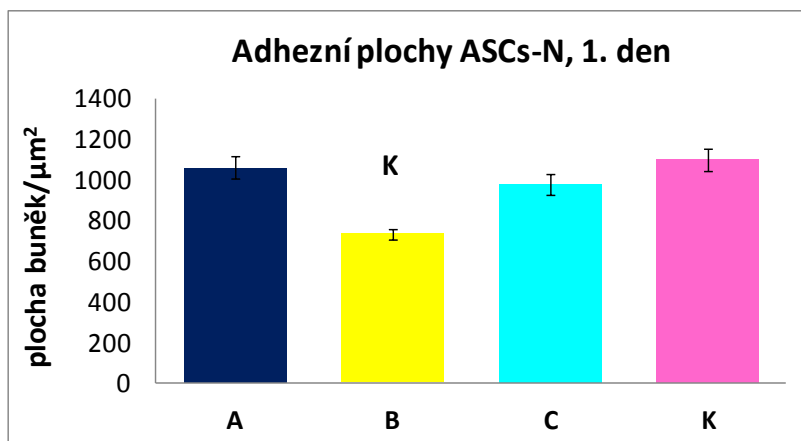
Tvar buněk byl za 1. den po nasazení obdobný u všech typů buněk a na všech typech materiálů – protáhlý až polygonální (**obr. 17**). Za tři a zejména za 7 dnů po nasazení, přibývalo v kulturách ASCs buněk polygonálních, a to zejména v kulturách ASCs-N (**obr. 18**). Sedmý den byly buňky ASCs-N na modifikovaných materiálech skupin A, B a C převážně polygonální, kdežto buňky ASCs-V převážně protáhlé (**obr. 19**). Kmenové buňky

byly výrazně větší než buňky MG-63, a to i 3. den, kdy MG-63 dosud nedosahovaly konfluence a nebyly tak omezeny v rozprostření díky vysoké míře vzájemného dotyku.

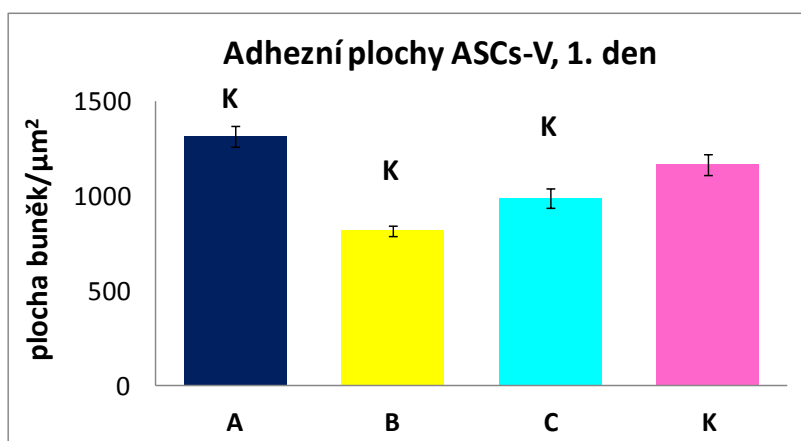
A.



B.

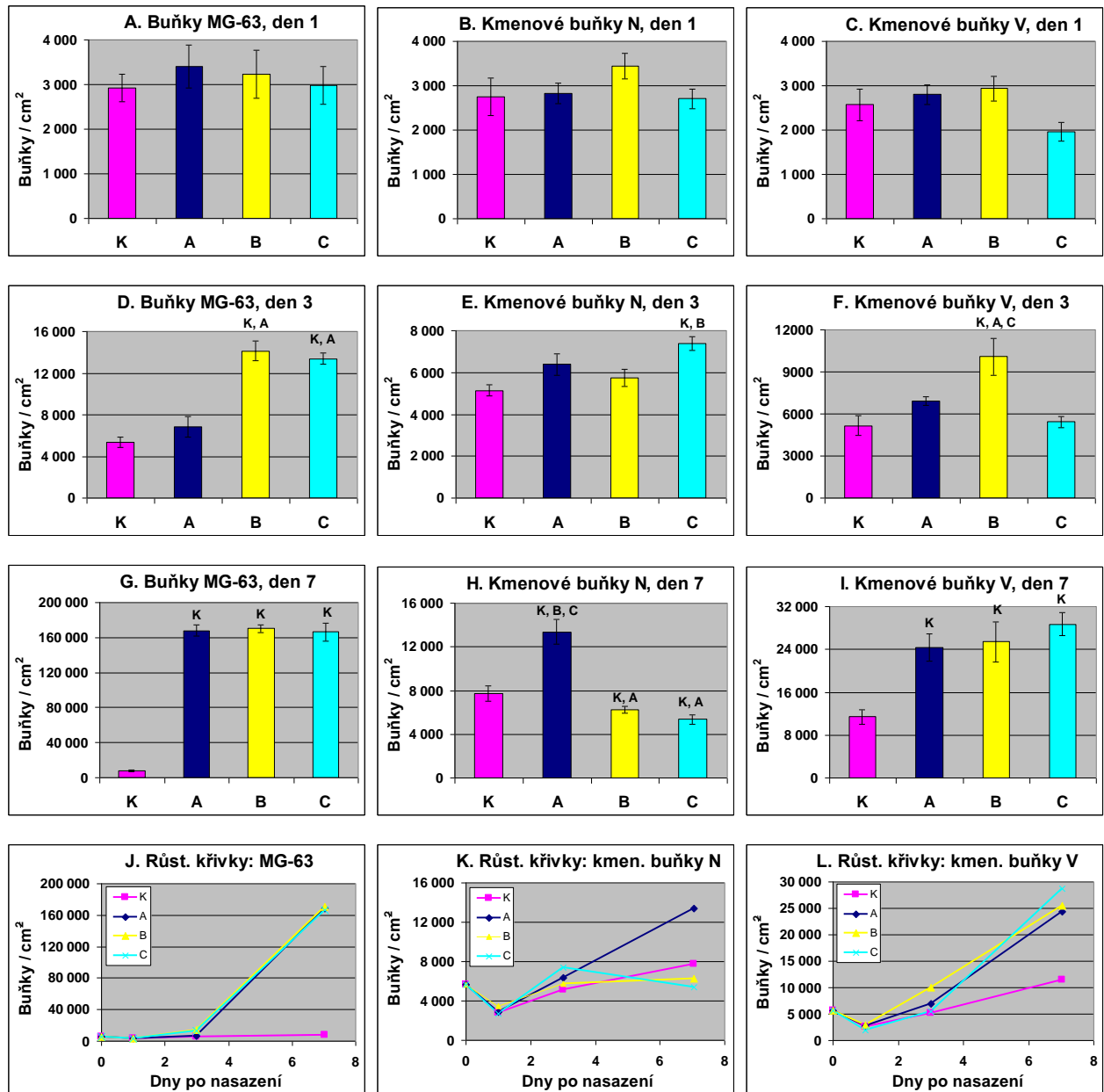


C.

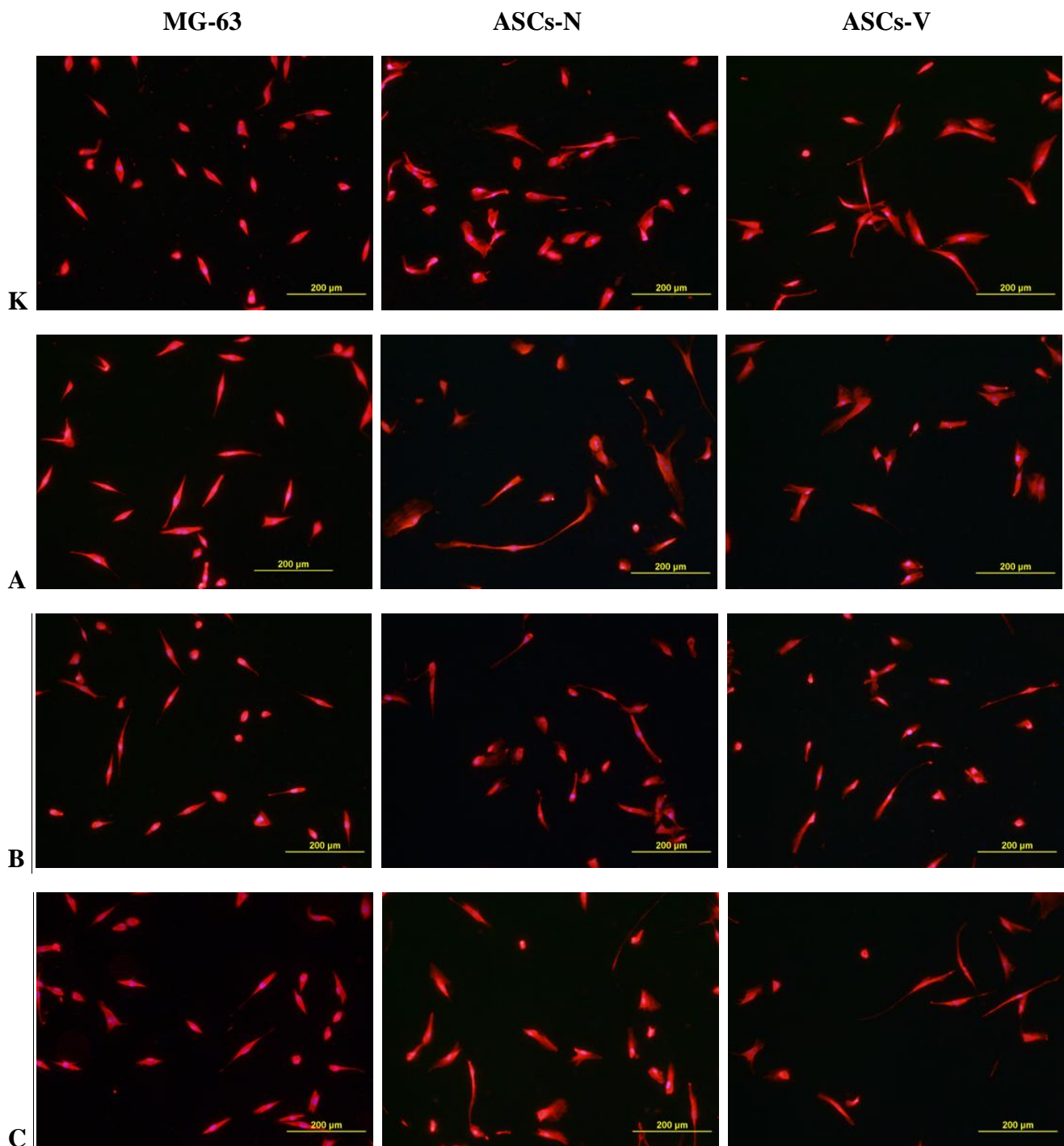


**Obr. 15: A-C** – Adhezní plochy MG-63, ASCs-N a ASCs-V na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C), 1. den od nasazení. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření pro každou skupinu vzorků, buněčný typ a časový

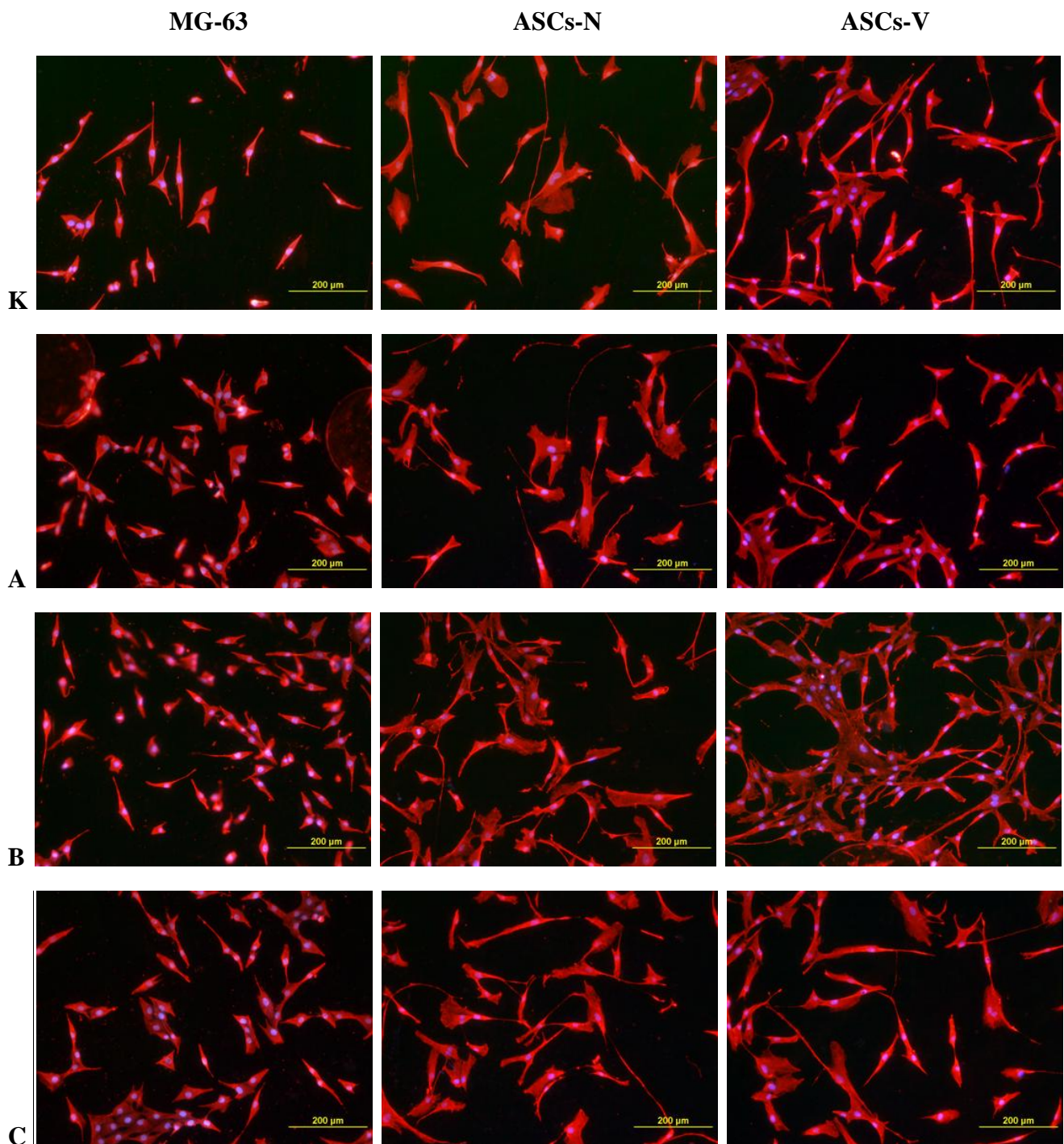
interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: Písmena nad některými sloupci označují statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) vůči skupinám vzorků označených těmito písmeny.



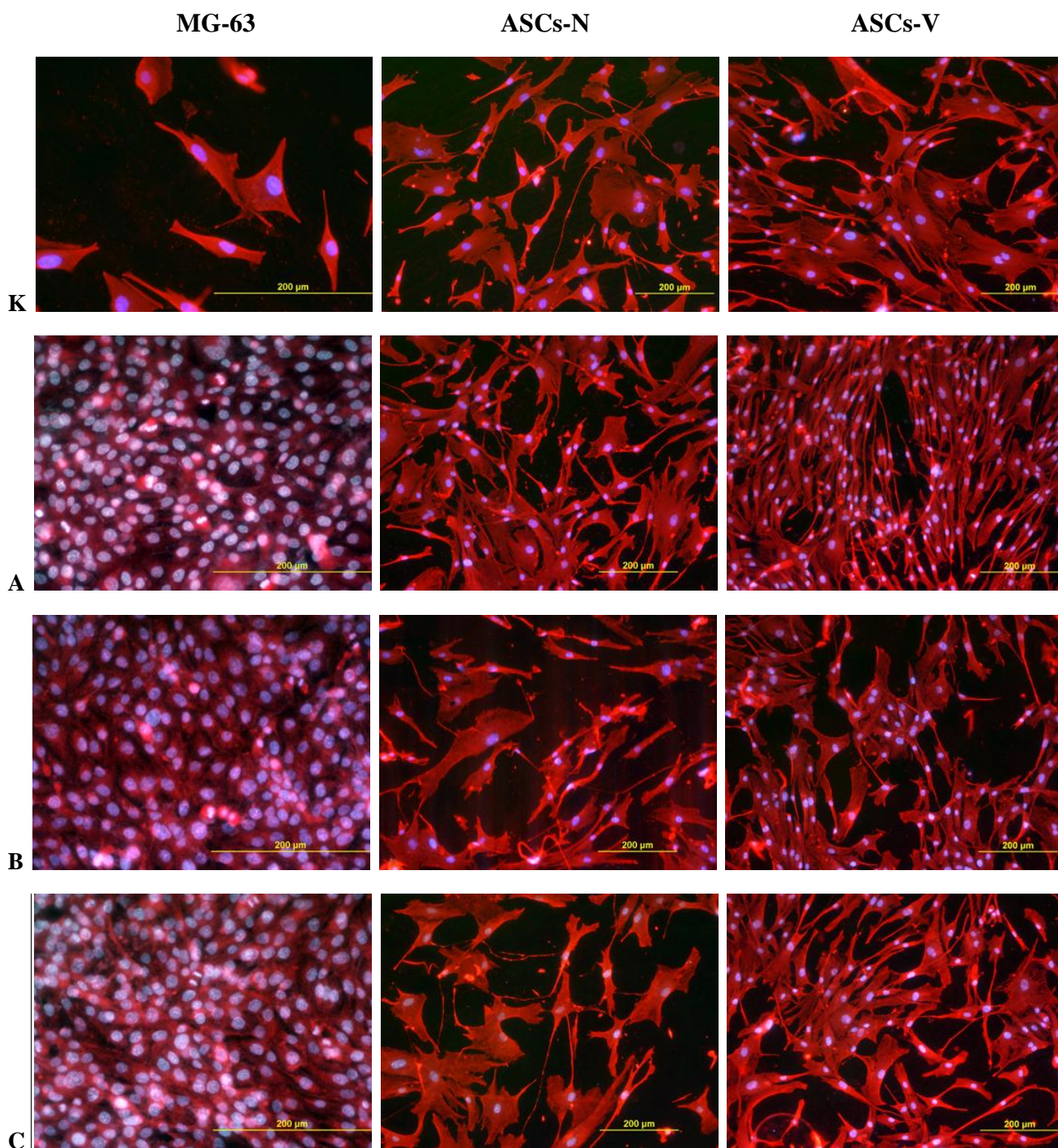
**Obr. 16:** A-I - Počet lidských osteoblastů MG-63 a kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém (ASCs-N) a vysokém tlaku (ASCs-V) na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C) za 1, 3 a 7 dnů po nasazení. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření pro každou skupinu vzorků, buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: Písmena nad některými sloupci označují statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) vůči skupinám vzorků označených těmito písmeny. J-L - dynamika růstu buněk na vzorcích v intervalech 1. až 7. den od nasazení.



**Obr. 17:** Morfologie lidských osteoblastů MG-63 a kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém (ASCs-N) a vysokém tlaku (ASCs-V) na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C), 1. den od nasazení. Barveno kombinací Texas Red C<sub>2</sub>-Maleimid (červená fluorescence) a Hoechst 33258 (modrá fluorescence). Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 10x, úsečka představuje 200 μm.



**Obr. 18:** Morfologie lidských osteoblastů MG-63 a kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém (ASCs-N) a vysokém tlaku (ASCs-V) na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C), 3. den od nasazení. Barveno kombinací Texas Red C<sub>2</sub>-Maleimid (červená fluorescence) a Hoechst 33258 (modrá fluorescence). Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 10x, úsečka představuje 200 μm.



**Obr. 19:** Morfologie lidských osteoblastů MG-63 a kmenových buněk tukové tkáně izolovaných při nízkém (ASCs-N) a vysokém tlaku (ASCs-V) na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C), 7. den od nasazení. Barveno kombinací Texas Red C<sub>2</sub>-Maleimid (červená fluorescence) a Hoechst 33258 (modrá fluorescence). Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 20x (K, A, B, C) nebo 10x (ostatní snímky). Úsečka představuje 200 μm.

## 5. 4 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciace kmenových buněk tukové tkáně na mikroskopických krycích sklech

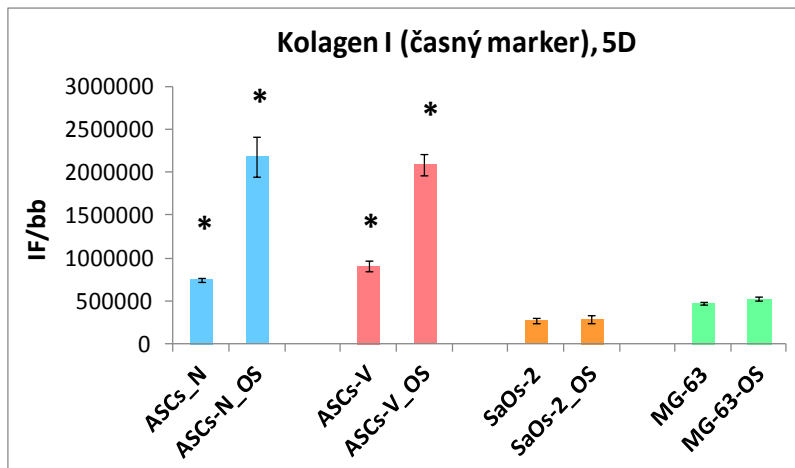
Diferenciace kmenových buněk tukové tkáně byla nejprve sledována na mikroskopických krycích sklech, a teprve v další fázi na materiálech z Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami. Podle míry intenzity fluorescence vybraných markerů osteogenní diferenciace - kolagenu I, alkalické fosfatázy a osteokalcinu u tukových kmenových buněk (ASCs-N a ASCs-V), MG-63 a Saos-2 (standardní linie lidských kostních buněk, které byly použity pro srovnání získaných výsledků diferenciace ASCs) lze říci, že u všech typů buněk byly detekovány osteogenní markery, ať už ve větší či menší míře. Největší produkce osteogenních markerů byla očekávána u buněk kultivovaných v podmínkách osteogenního média, což bylo nejvíce patrné u tukových kmenových buněk, konkrétně u buněk izolovaných při nižším negativním tlaku, ASCs-N (**obr. 20: A-C**). ASCs-V na vliv osteogenního média nereagovaly tak výrazně, jako ASCs-N. Kontrolní linie MG-63 a Saos-2 prakticky vůbec nereagovaly na přidavek osteogenního média a produkce osteogenních markerů byla výrazně nižší ve srovnání s kmenovými buňkami. Nejvýraznější změny v produkci markerů osteogenní diferenciace byly vidět v případě pátého dne po aplikaci osteogenního média, kdežto u delšího, 12-ti denního intervalu, docházelo ke snižování odpovědi buněk na vliv osteogenního média (**obr. 21: D-F**).

Chování jednotlivých buněčných typů pod vlivem osteogenního média by bylo možné vysvětlit takto: v případě tukových kmenových buněk N byly dosaženy velmi dobré výsledky zřejmě z důvodu pomalejšího růstu a poněkud odlišných vlastností této populace ASCs (větší heterogenita), čímž se patrně více hodí pro dlouhodobé experimenty a využití pro diferenciaci. U tukových kmenových buněk V byla prokázána v předchozích experimentech schopnost rychlé proliferace a vyšší populační homogenita, čímž mohou vznikat rozdíly v chování oproti ASCs-N. Můžeme tedy říci, že pro budoucí využití tukových kmenových buněk pro účely tkáňového inženýrství, by bylo vhodnější vyselektovat pouze ASCs-N, které zatím jeví větší diferenciační potenciál. Důvodem, proč kontrolní linie buněk MG-63 a Saos-2 téměř nereagovaly na účinek osteogenního média může být ten, že jsou obě linie původem z osteosarkomu a tím se tyto buňky nechovají zcela fyziologicky. Nejvíce překvapivé je však chování buněk Saos-2, které jsou považovány jako standard v osteogenní diferenciaci, jelikož se jedná o více diferencovanou linii kostních buněk ve srovnání s buňkami MG-63. Tyto buňky by měly produkovat množství osteogenních markerů srovnatelné s diferencovanými osteoblasty (Saldana *et al.* 2011).

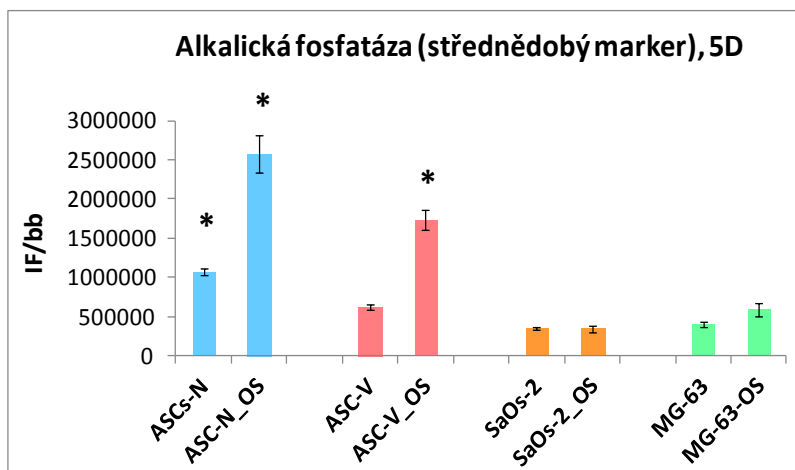
Co se týká jednotlivých markerů, tak v případě kratšího intervalu (5. den) byla nejvyšší produkce všech markerů u kmenových buněk N (**obr. 20: A-C**). V případě delšího intervalu (12. den) byla pozorována nejvyšší produkce kolagenu I a osteokalcinu u buněk MG-63 (**obr. 21: D a F**) a alkalické fosfatázy u kmenových buněk N (**obr. 21: E**).



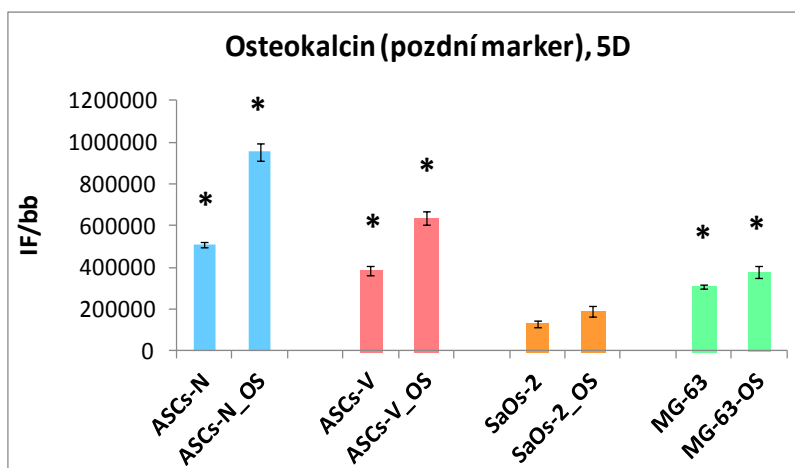
A.



B.



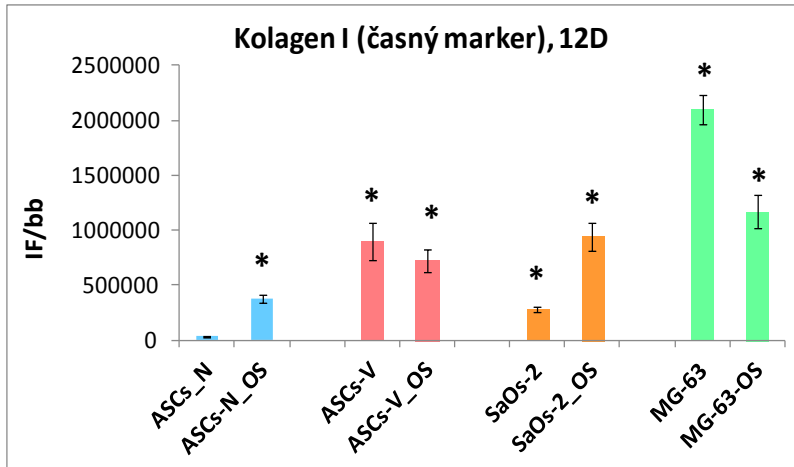
C.



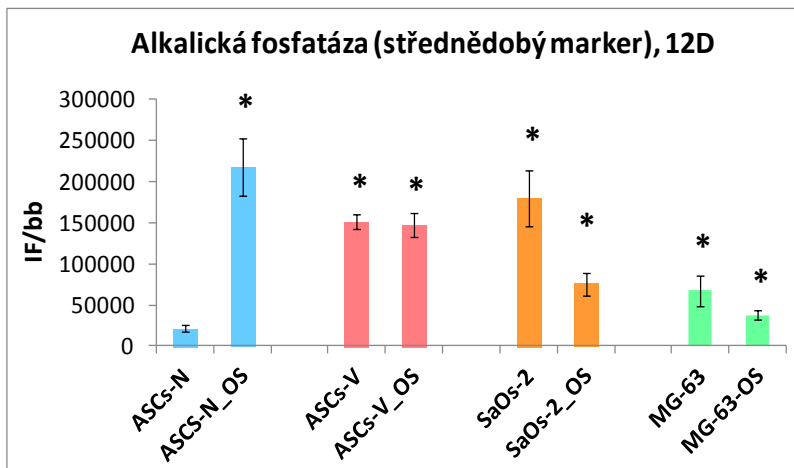
**Obr. 20: A-C** – Intenzita fluorescence vybraných markerů osteogenní diferenciace buněk MG-63, SaOs-2, ASCs-N a ASCs-V na vzorcích mikroskopického krycího skla, 5. den od přidavku osteogenního média. Intenzita fluorescence byla normalizována na buňku a intenzita kontrolních vzorků byla odečtena. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření pro každý buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda.

Statistická významnost: symbol (\*) nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) vůči různým typům buněk kultivovaných pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média.

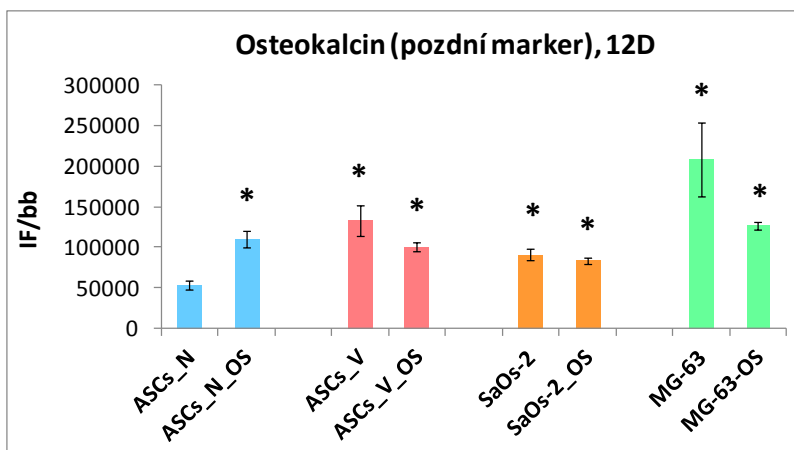
**D.**



**E.**



**F.**



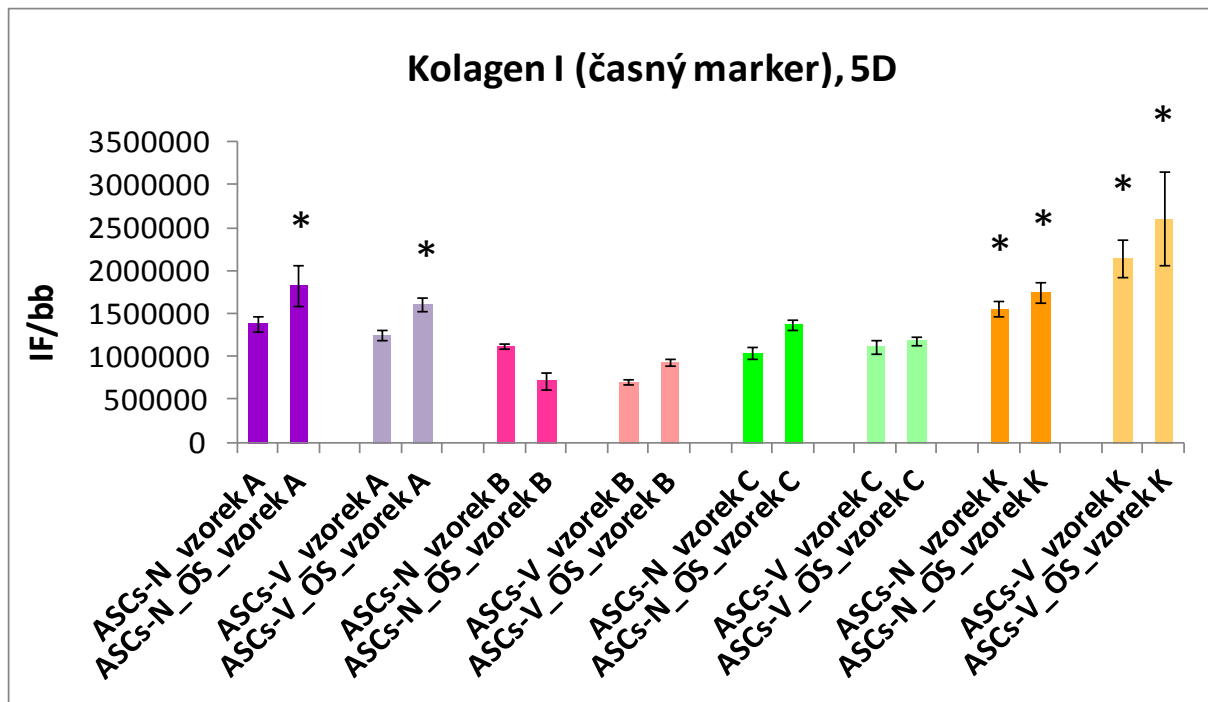
**Obr. 21: D-F** - Intenzita fluorescence vybraných markerů osteogenní diferenciace buněk MG-63, SaOs-2, ASCs-N a ASCs-V na vzorcích mikroskopického krycího skla, 12. den od přidavku osteogenního média. Intenzita fluorescence byla normalizována na buňku a intenzita kontrolních vzorků byla odečtena. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření pro každý buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: symbol (\*) nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) vůči různým typům buněk kultivovaných pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média.

## **5. 5 Imunofluorescenční stanovení markerů osteogenní diferenciace kmenových buněk tukové tkáně N a V na vzorcích slitiny titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými modifikacemi**

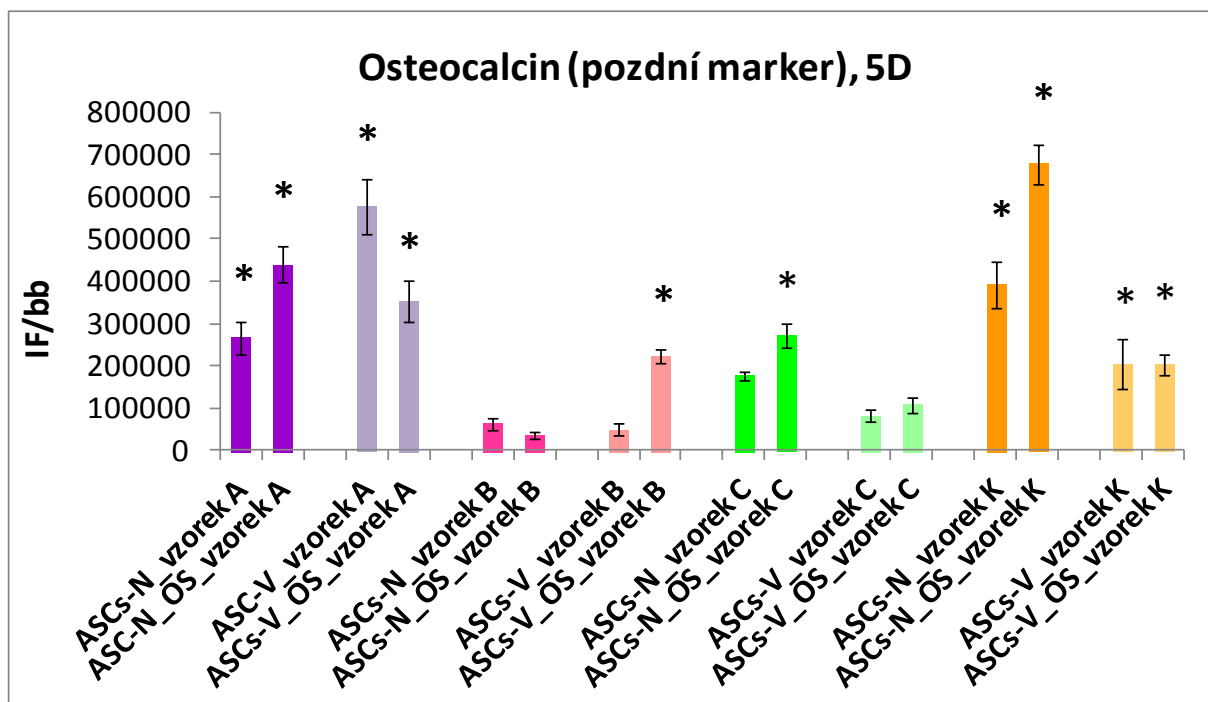
Pro charakterizaci osteogenní diferenciace tukových kmenových buněk jsme tentokrát použili pouze dva markery – kolagen I jako časný marker a osteokalcin jako pozdní marker. Podle grafů můžeme říci, že oba typy kmenových buněk tukové tkáně, tedy jak ASCs-N, tak ASCs-V, diferencovaly v osteogenním médiu lépe a to zejména v případě 5. dne od přidavku osteogenního média (**obr. 22: A a B**). Ovšem v některých případech byla detekována nižší intenzita fluorescence daného markeru i při kultivaci buněk v osteogenním médiu. Tento jev byl pozorován zejména u delšího časového intervalu, a sice 10. dne (**obr. 23: C a D**), což může být způsobeno nižší citlivostí buněk na vliv osteogenního média po uplynutí delší doby. Buňky zřejmě potřebují pouze pár dnů pro aktivaci určitých signálních drah a změnu genové exprese pro nastartování osteogenní diferenciace a později už tak výrazně nereagují na účinky osteogenního média, tak jako na začátku.

Významných rozdílů v osteogenní diferenciaci bylo dosaženo zejména u vzorků skupiny A a K, které se již v dřívějších studiích zaměřených na růst a adhezi buněk, potvrdily jako nejvhodnější povrchové modifikace slitiny Ti-6Al-4V pro dlouhodobou podporu růstu buněk. Jak víme, vzorky sk. A a K mají poměrně nízkou polární složku volné povrchové energie a jsou tedy méně smáčivé, což však nebrání adhezi buněk k jejich povrchu, které v jednom z předchozích experimentů dosahovaly největších adhezních ploch. Jak se zdá, dostatečné rozprostření buňky na povrchu materiálu je velmi důležité pro diferenciaci buněk. Dle získaných výsledků můžeme říci, že nejvyšší diferenciační potenciál z obou typů tukových kmenových buněk mají ASCs-N, u kterých dosahovaly osteogenní markery nejvyšší intenzity fluorescence. Tento stav si buňky udržely při delším časovém intervalu.

A.



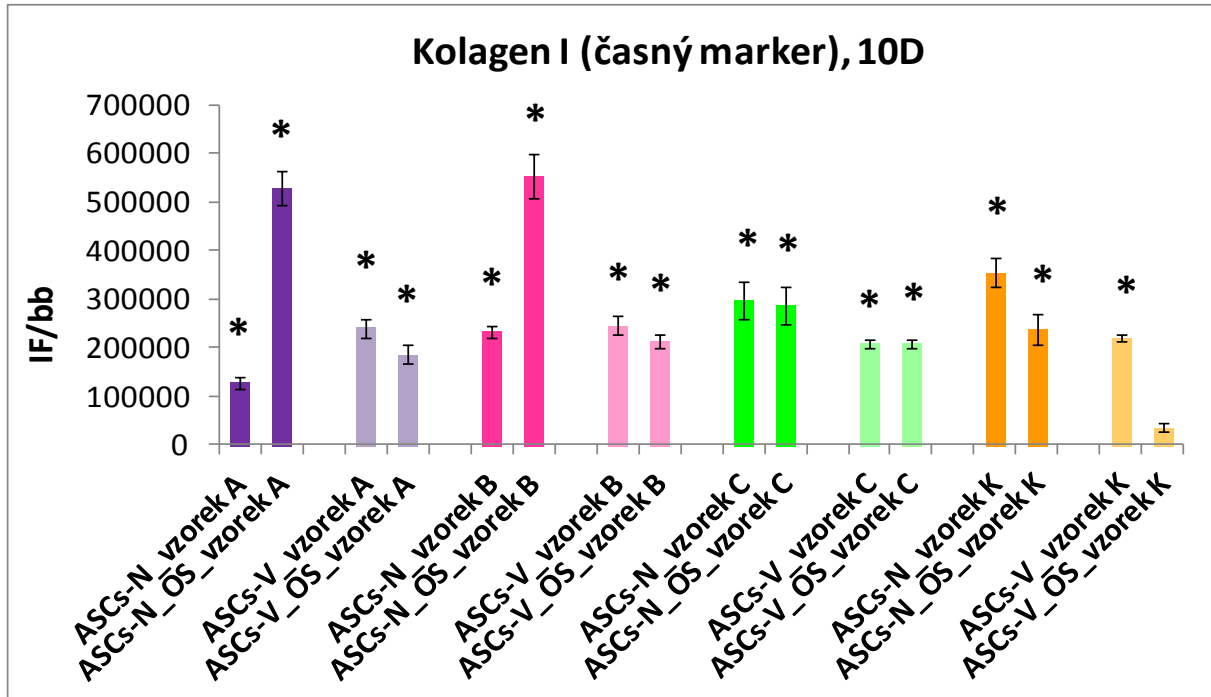
B.



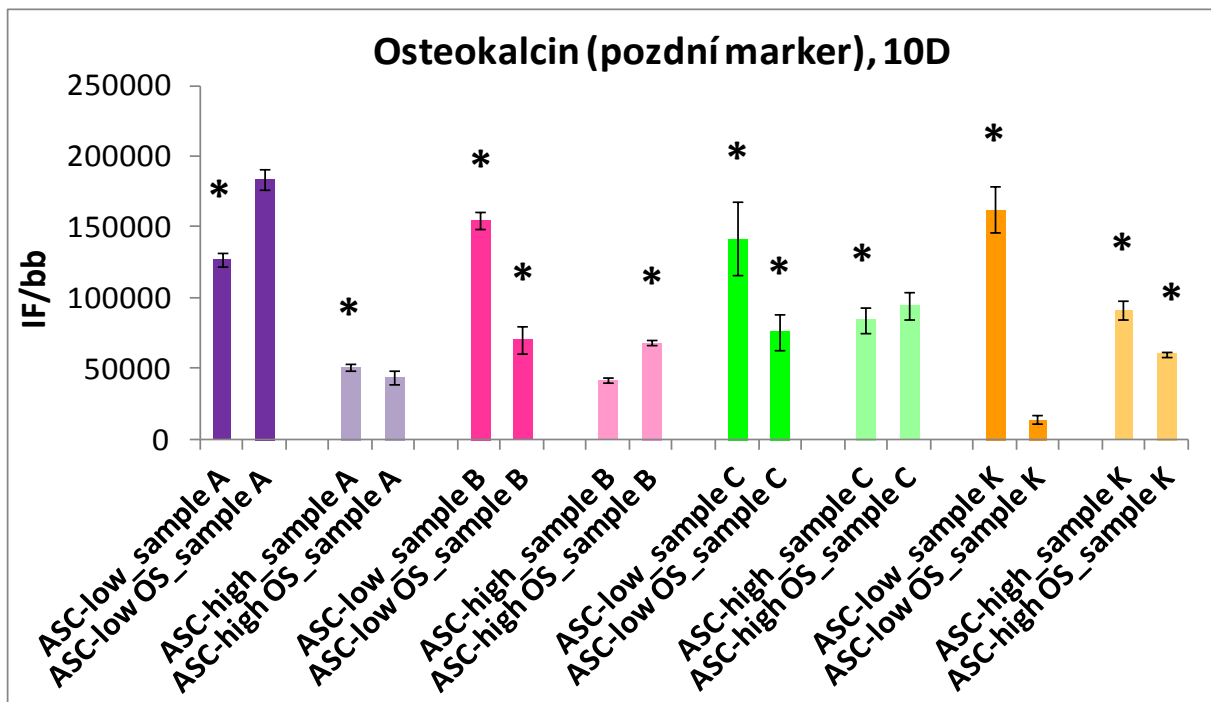
**Obr. 22: A, B** - Intenzita fluorescence vybraných markerů osteogenní diferenciace buněk ASCs-N a ASCs-V na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C), 5. den od přidavku osteogenního média. Intenzita fluorescence byla normalizována na buňku a intenzita kontrolních vzorků byla odečtena. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření pro každou skupinu vzorků, buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: symbol (\*)

nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) vůči různým typům buněk kultivovaných pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média.

C.



D.



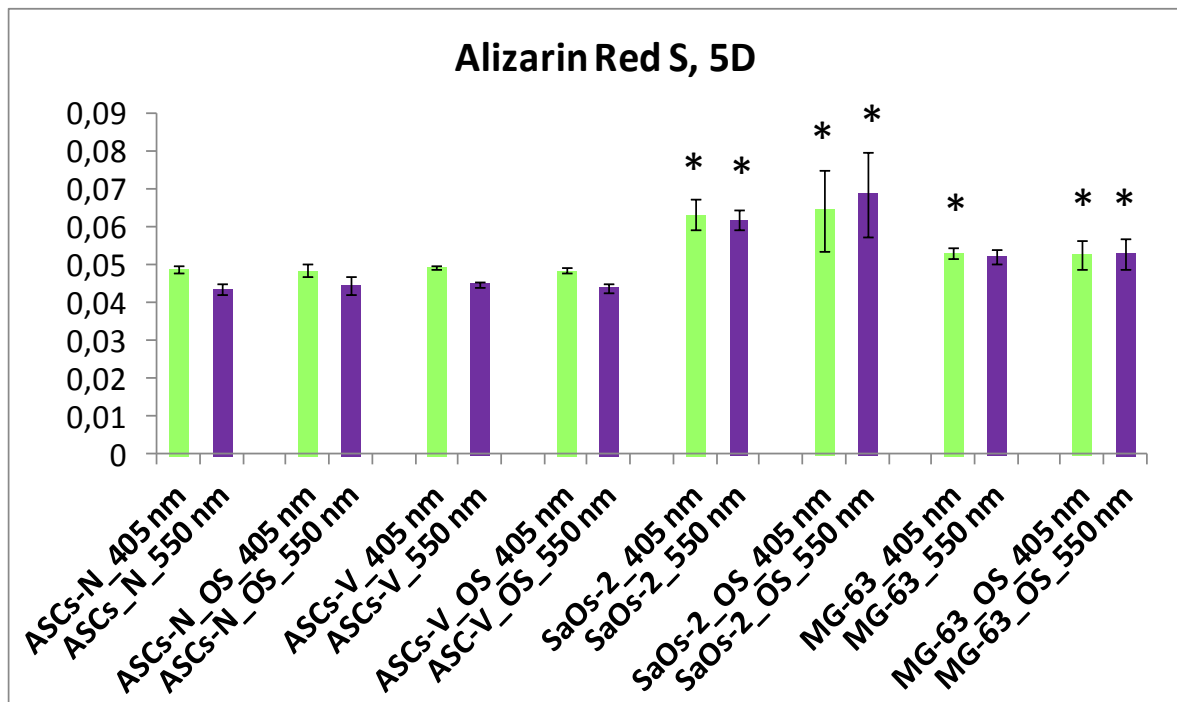
**Obr. 23: C, D** - Intenzita fluorescence vybraných markerů osteogenní diferenciace buněk ASCs-N a ASCs-V na vzorcích Ti-6Al-4V kontrolní skupiny (K) a modifikovaných skupin (A, B a C), 10. den od přidavku osteogenního média. Intenzita fluorescence byla normalizována na buňku a intenzita kontrolních vzorků byla odečtena. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 20 měření pro každou skupinu vzorků, buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: symbol (\*) nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) vůči různým typům buněk kultivovaných pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média.

## 5. 6 Stanovení mineralizace extracelulární matrix během osteogenní diferenciace kmenových buněk tukové tkáně pomocí histologického barvení Alizarin Red S

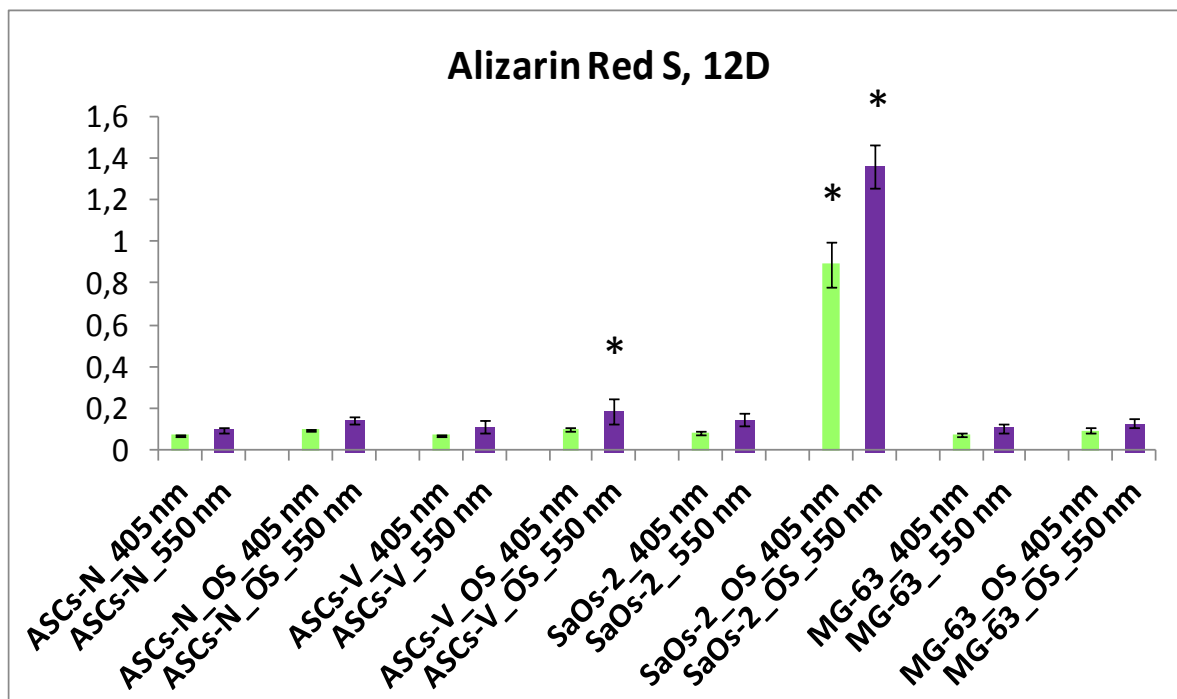
Vzhledem k výsledkům kolorimetrického měření barviva Alizarin Red S navázaného více či méně k vápníkovým depozitům v ECM analyzovaných buněk kultivovaných v podmínkách osteogenního média můžeme říci, že nejvýraznější odpověď buněk na účinky tohoto média byla stejně jako u předchozích pokusů s osteogenní diferenciací pozorovatelná u kratšího časového intervalu, zřejmě plně dostačujícího pro aktivaci signálních drah a změnu genové exprese buněk, pro nastartování osteogenní diferenciace. Zdá se, že všechny buňky v případě 5. dne (**obr. 24: A**) od přidavku osteogenního média, daleko více mineralizovaly svou extracelulární matrix vápníkem než u 12. dne (**obr. 24: B**), kde zřejmě došlo k útlumu či ustálení míry mineralizace matrix a snížení citlivosti buněk na jednotlivé komponenty osteogenního média. Rozdíly v mineralizaci buněčné matrix v osteogenním a neosteogenním médiu byly sice patrné, avšak daleko méně, než jsme předpokládali. Výjimkou byla buněčná linie Saos-2, kde byly rozdíly mezi použitými médii opravdu výrazné u obou intervalů.

Výrazně nejvyšší mineralizace extracelulární matrix byla tedy pozorována u buněk Saos-2, které jsme spolu s buňkami linie MG-63 použili jako standardy ke srovnání míry diferenciace kmenových buněk tukové tkáně V a N. V rámci delšího časového intervalu se míra mineralizace matrix u buněk Saos-2 ještě zvýšila (**obr. 24: B**). Tento výsledek byl očekáván, a to vzhledem k počáteční vyšší diferencovanosti této linie oproti buňkám MG-63 a ASCs-N a ASCs-V. Výsledek z kolorimetrického měření byl potvrzen i na mikrofotografiích (**obr. 25 a 26**), kde jsou depozita vápníku v matrix jasně červeně obarveny v osteogenním médiu. V případě buněk MG-63 a tukových kmenových buněk docházelo zejména u 12. dne v osteogenním médiu k lehkému narůžovělému zabarvení matrix a tvorbě shluků barviva (**obr. 26**), což mohl být náznak začínající mineralizace extracelulární matrix, čímž si však nemůžeme být jisti, jelikož za pozitivní výsledek je pokládáno u tohoto experimentu pouze jasně červené zbarvení ECM. Získané výsledky můžeme shrnout tak, že se nám po kultivaci kmenových buněk tukové tkáně po 5 a 12 dnech v osteogenním médiu nepodařilo vizuálně prokázat dostatečnou mineralizaci extracelulární matrix vápníkem, ač určitá míra mineralizace byla kolorimetricky potvrzena u ASCs-N i ASCs-V. Usuzujeme, že mineralizace extracelulární matrix kmenových buněk tukové tkáně vyžaduje delší dobu kultivace v osteogenním médiu (alespoň 3 týdny) a že změny mimo vnitřní prostředí buňky při osteogenní diferenciaci, jako je např. mineralizace ECM, nastávají daleko později než změna expresního profilu buněk.

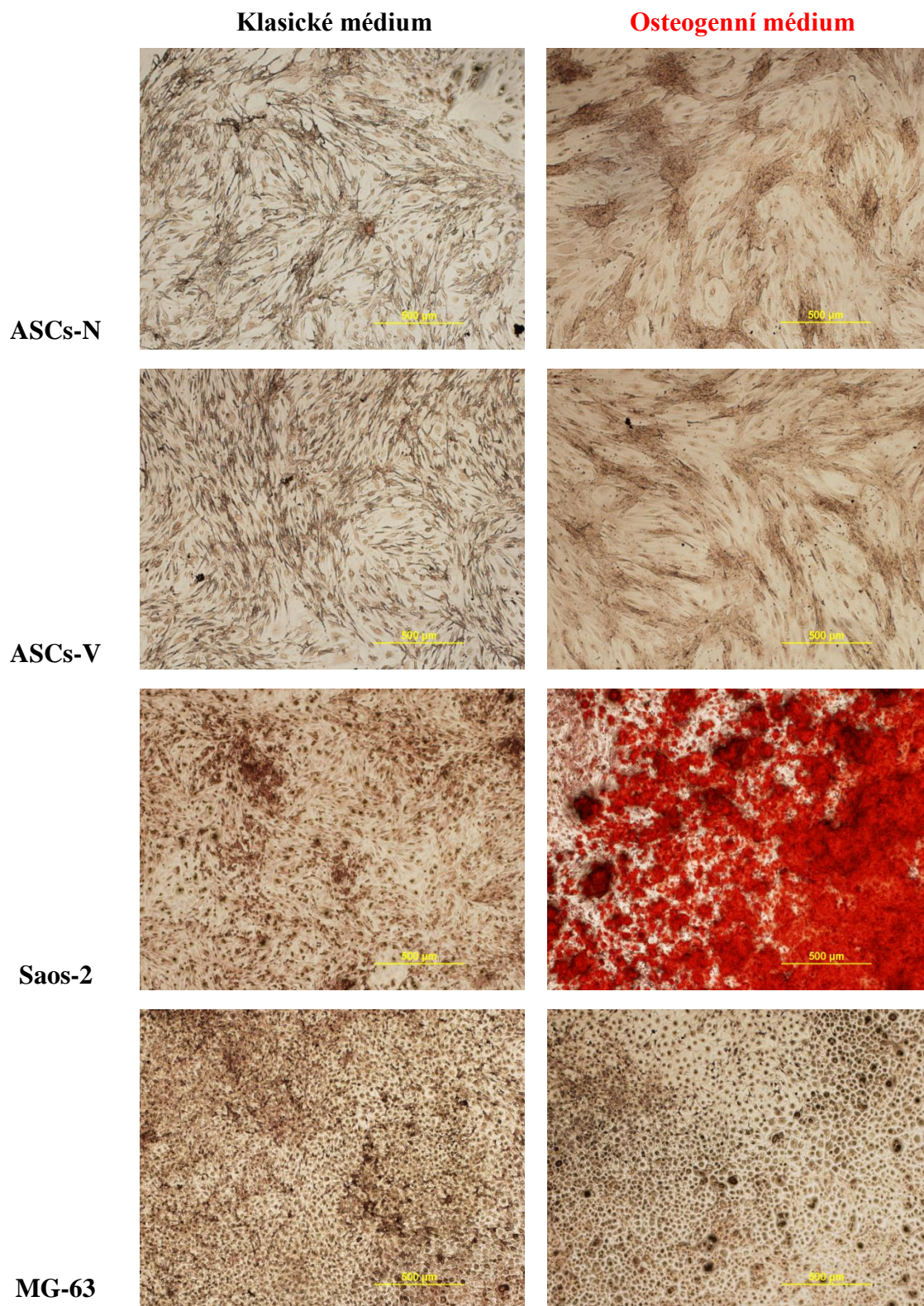
A.



B.



**Obr. 24: A, B** – Míra mineralizace ECM kmenových buněk tukové tkáně a kontrolních buněčných linií SaOs-2 a MG-63, vizualizovaná pomocí barviva Alizarin Red S, a to 5. a 12. den od přidavku osteogenního média. Intenzita obarvení ECM byla měřena při 405 a 550 nm. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) z 9 měření pro každý buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: symbol (\*) nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,001$ ) vůči různým typům buněk kultivovaných pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média.



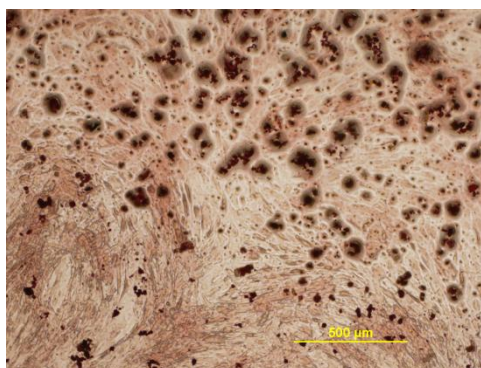
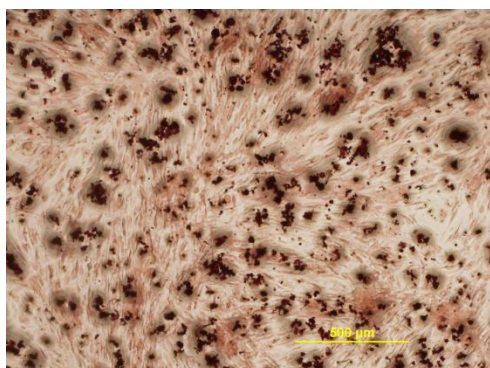
**Obr. 25:** Vizualizace mineralizace extracelulární matrix depozity vápníku u tukových kmenových buněk (ASCs-N a ASCs-V) a kontrolních linií lidských osteoblastů MG-63 a SaOs-2, pomocí barviva Alizarin Red S, 5. den od přidavku osteogenního média. Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 4x, úsečka představuje 500  $\mu\text{m}$ .



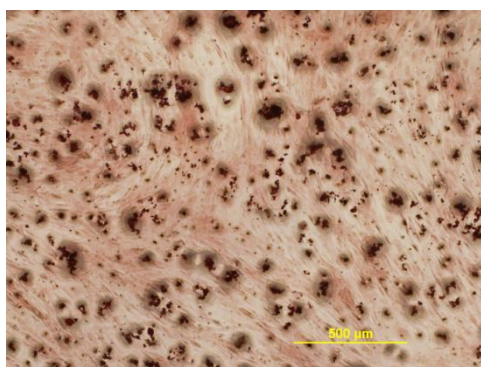
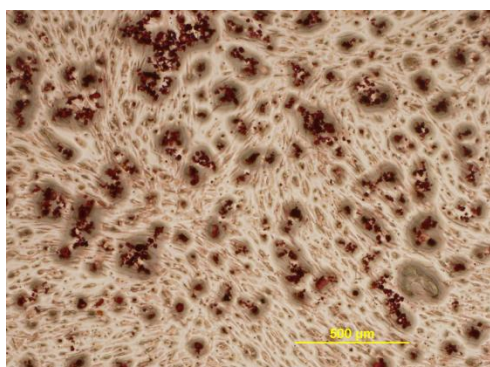
### Klasické médium

### Osteogenní médium

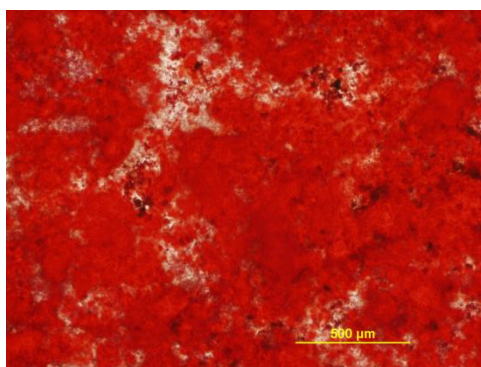
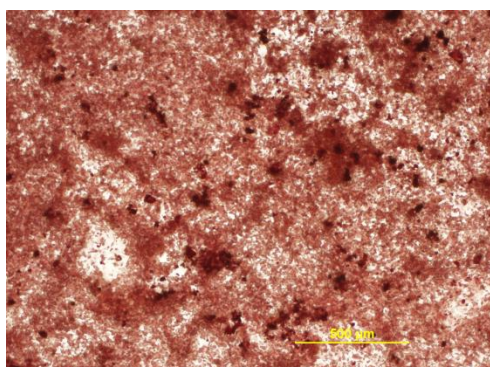
ASCs-N



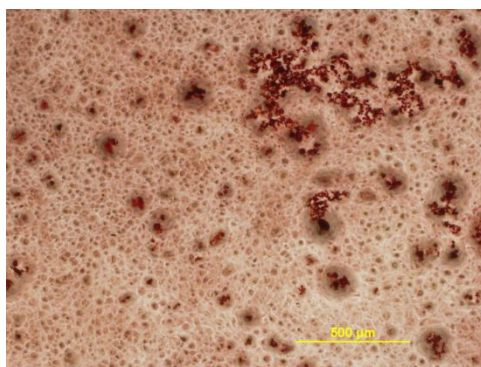
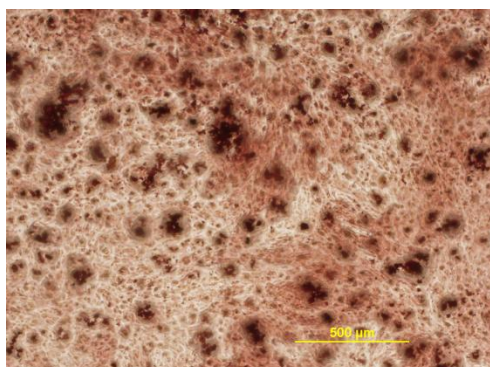
ASCs-V



Saos-2



MG-63

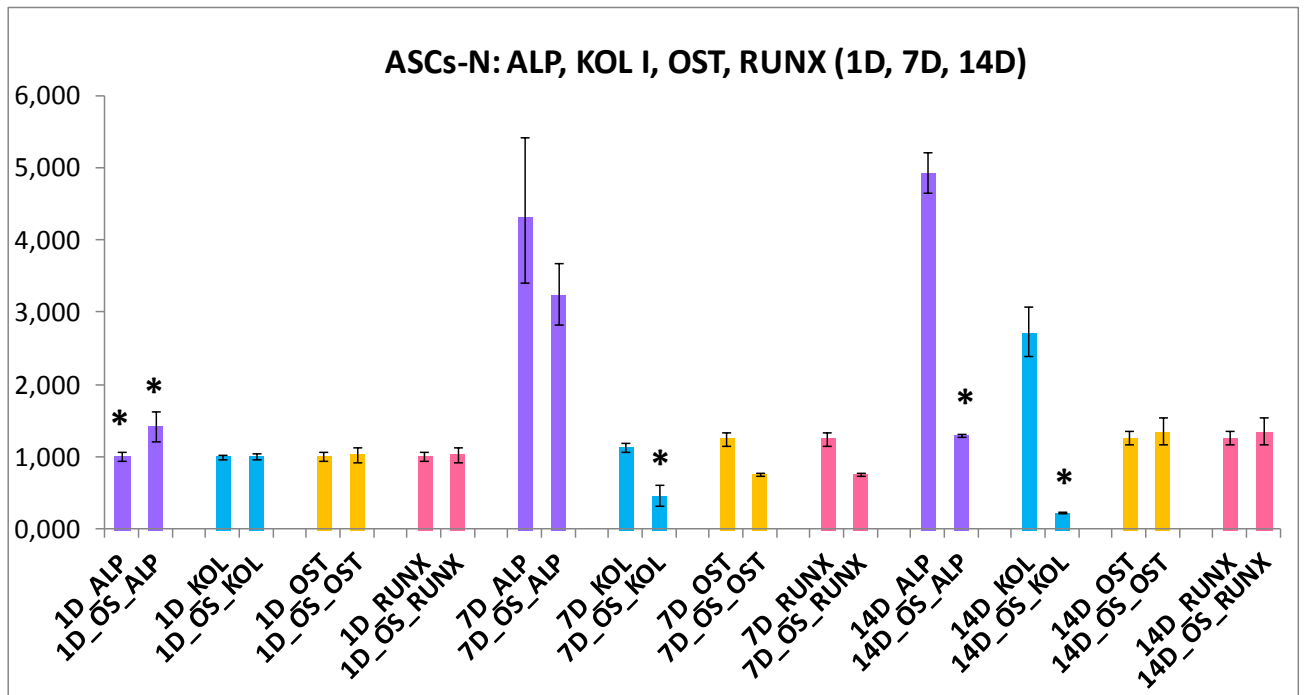


**Obr. 26:** Vizualizace mineralizace extracelulární matrix depozity vápníku u kmenových buněk tukové tkáně (ASCs-N a ASCs-V) a kontrolních linií lidských osteoblastů MG-63 a SaOs-2, pomocí barviva Alizarin Red S, 12. den od přidavku osteogenního média. Mikroskop Olympus IX 51, digitální kamera DP 71, objektiv 4x, úsečka představuje 500 µm.

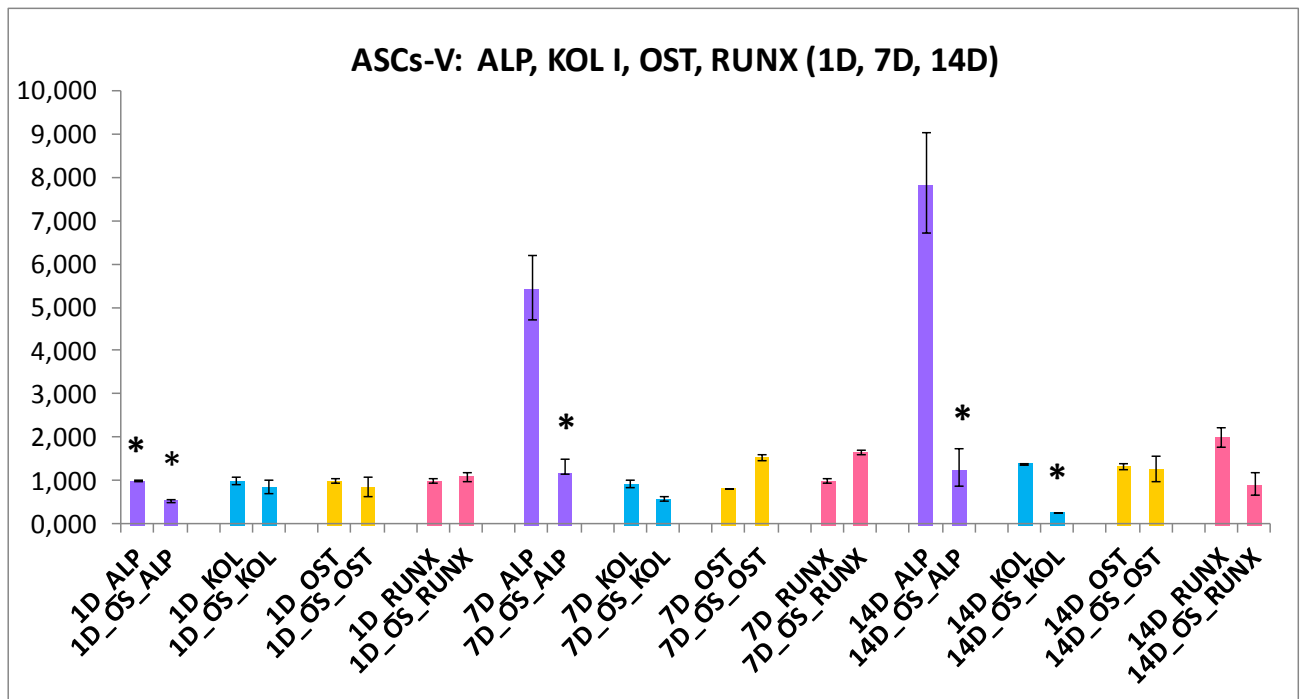
## 5. 7 Stanovení genové exprese markerů osteogenní diferenciace kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR

Z výsledků osteogenní diferenciace získaných pomocí metody kvantitativní real-time PCR můžeme hned na začátku konstatovat rozdíly v expresi genů progenitorových a osteogenních markerů mezi kmenovými buňkami tukové tkáně N (ASCs-N) a kmenovými buňkami tukové tkáně V (ASCs-V). ASCs-N (**obr. 27: A**) produkují statisticky významně vyšší množství markerů osteogenní diferenciace než ASCs-V (**obr. 27: B**) ve všech časových intervalech, což nám znovu potvrzuje větší diferenciační potenciál a odlišnost této na první pohled stejné populace kmenových buněk tukové tkáně. Stejně tak jako u předchozích experimentů, nastávají významné změny v osteogenní diferenciaci, resp. nejvýraznější odezva buněk na vliv osteogenního média, v rámci kratšího časového intervalu (**obr. 27: A**). Po uplynutí intervalu 14. dne jsme nepozorovali nikterak výrazné rozdíly v chování buněk. Můžeme tedy říci, že největší rozdíly v expresi genů osteogenních a dalších markerů byly nejvíce patrné mezi 1. a 7. dnem po přidavku osteogenního média. Mezi markery s nejvyšší genovou expresí patřila u obou typů buněk alkalická fosfatáza. Nutné je vyzdvihnout také fakt, že u obou typů tukových kmenových buněk byla exprese osteogenních markerů zvýšena naopak v podmínkách neosteogenního média, což je velmi překvapivý výsledek. Domníváme se, že to může být způsobeno účinkem fibroblastového růstového faktoru, který je přidáván ke standardnímu médiu pro kultivaci ASCs. Z tohoto důvodu hodláme v budoucnu ověřit účinky FGF-2 na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně.

**A.**



**B.**

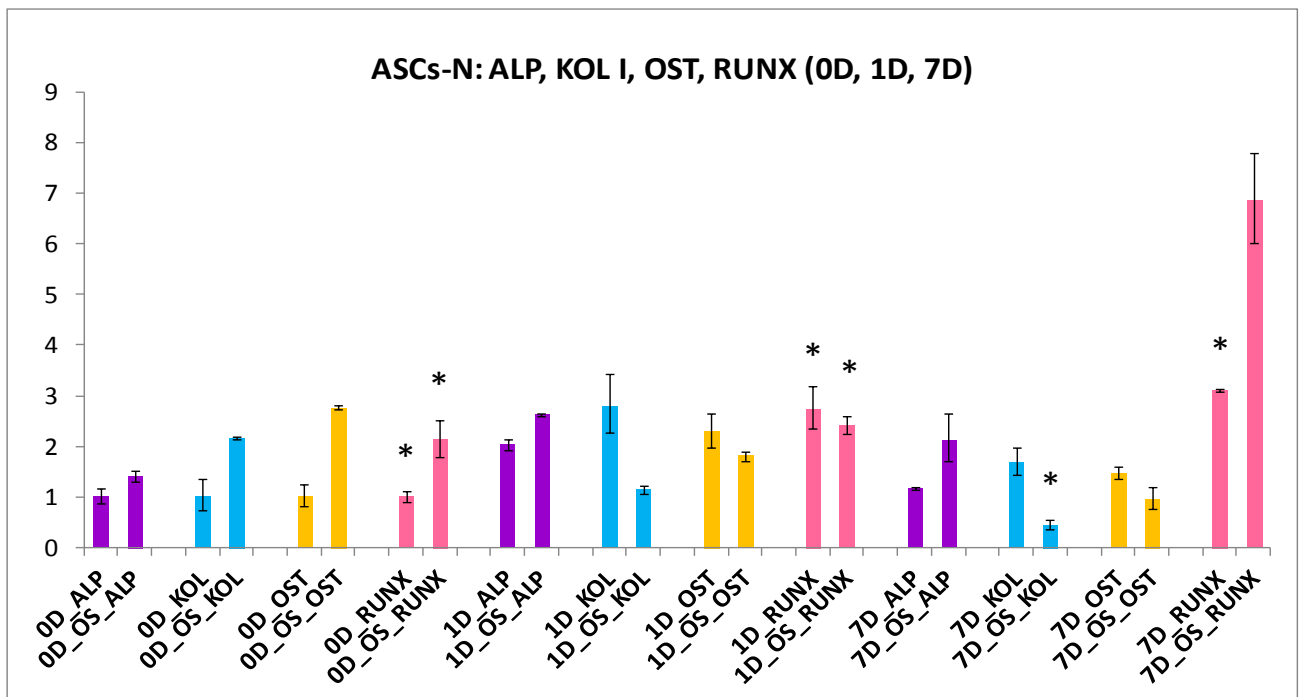


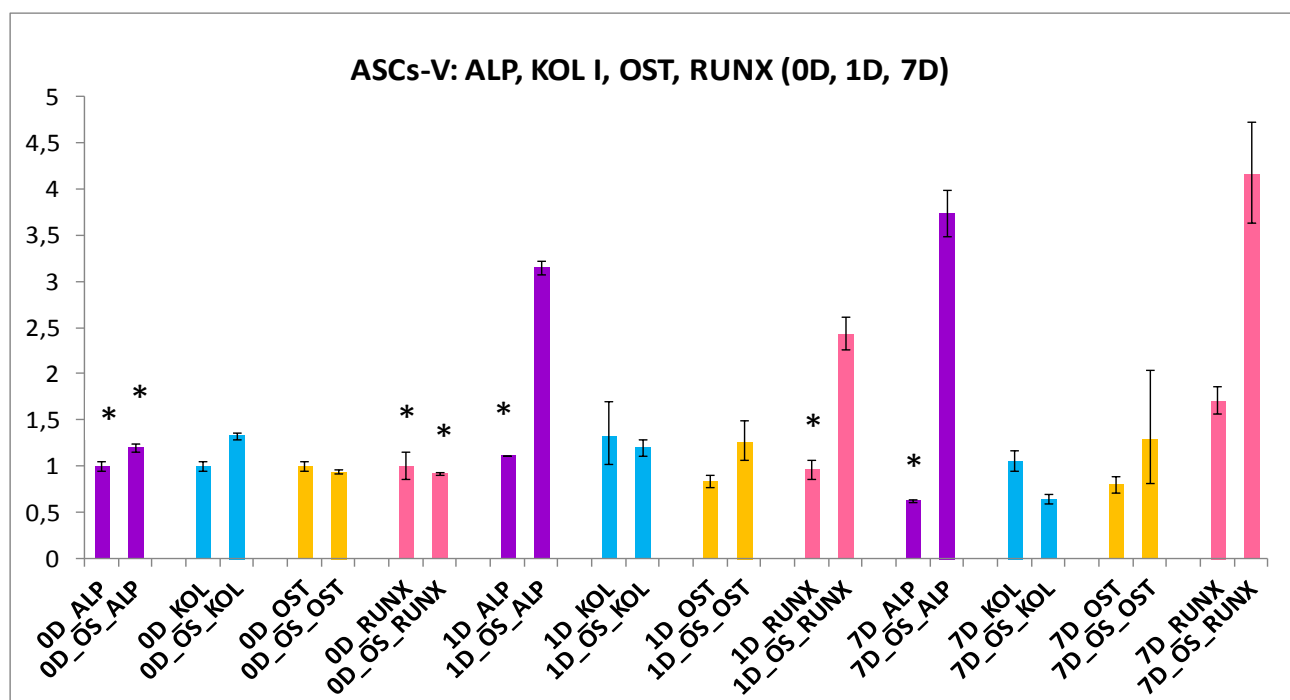
**Obr. 27: A, B** – Kvantifikace genové exprese vybraných osteogenních a progenitorových markerů kmenových buněk tukové tkáně ASCs-N a ASCs-V pomocí kvantitativní real-time PCR, 1. 7. a 14. den od přidavku osteogenního média. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) ze 2 měření pro každý buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: symbol (\*) nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,001$ ) vůči ASCs-N a ASCs-V kultivovaným pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média a vybraným markerům.

## 5. 8 Ověření vlivu fibroblastového růstového faktoru FGF-2 na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně pomocí metody kvantitativní real-time PCR

Srovnáním získaných výsledků genové exprese markerů osteogenní diferenciaci, a to za podmínek bez přídavku FGF-2 do standardního kultivačního média tukových kmenových buněk před aplikací osteogenního média, můžeme říci, že se opravdu potvrdil vliv tohoto růstového faktoru na osteogenní diferenciaci ASCs. Jak u ASCs-N (**obr. 28: A**), tak u ASCs-V (**obr. 28: B**) můžeme pozorovat zvýšenou expresi většiny markerů v osteogenním médiu a tedy signifikantní rozdíly v jejich produkci v obou typech média. Nejvýznamnější rozdíly v expresi genů osteogenních markerů byly pozorovatelné mezi tzv. 0. a 1. dnem od přídavku osteogenního média a 7. den se exprese ještě zvýšila. Mezi markery s nejvyšší genovou expresí patřil u obou typů ASCs RunX, což je progenitorový marker tukových kmenových buněk. Jeho zvýšená exprese oproti předchozímu experimentu, kde výrazně vedla alkalická fosfatáza, může vypovídat o menší diferencovanosti tukových kmenových buněk a může být považována jako další důkaz o výrazném osteogenním vlivu růstového faktoru FGF-2 na tukové kmenové buňky.

A.



**B.**

**Obr. 28: A, B** – Kvantifikace genové exprese vybraných osteogenních a progenitorových markerů kmenových buněk tukové tkáně ASCs-N a ASCs-V pomocí kvantitativní real-time PCR, 0. 1. a 7. den od přidavku osteogenního média. Průměr ± S.E.M. (střední chyba průměru) ze 2 měření pro každý buněčný typ a časový interval. ANOVA, Student-Newman-Keulsova metoda. Statistická významnost: symbol (\*) nad některými sloupci označuje statisticky významný rozdíl ( $p \leq 0,001$ ) vůči ASCs-N a ASCs-V kultivovaným pod vlivem osteogenního (OS) či neosteogenního média bez přidavku růstového faktoru FgF-2 a vybraným markerům.

## 6. Diskuze

Tzv. dospělé mezenchymální kmenové buňky jsou pro účely regenerativní medicíny v současnosti velmi oblíbeným typem kmenových buněk, díky jejich poměrně snadné dostupnosti, dobré buněčné plasticitě a bezproblémovosti v rámci etiky na rozdíl od embryonálních kmenových buněk. Mezi mezenchymální kmenové buňky patří i tukové kmenové buňky (adipose-derived stem cells, ASCs), které jsme si zvolili ke studiu potenciálního využití těchto buněk pro aplikace kostního tkáňového inženýrství. Nejprve byl u tukových kmenových buněk zkoumán vliv podmínek metody liposukce na jejich morfologii, fenotyp, schopnost adheze a proliferaci. Během odběru tukové tkáně pomocí liposukce byly získány dvě populace ASCs získané při nízkém (N, -200 mmHg) a vysokém (V, -700 mmHg) negativním tlaku. Vhled a chování těchto buněk jsme zkoumali v jedné z prvních studií, kdy byly buňky nasazeny do kultivačních lahví v množství 4 000 buněk/cm<sup>2</sup>. První rozdíly mezi buňkami byly patrné hned druhý den od nasazení, kdy ASCs-N adherovaly ke dnu kultivační lahve daleko pomaleji než ASCs-V, zaujímaly odlišný tvar vlivem většího rozprostření a dosahovaly menších populačních hustot. Po několika dnech se rozdíly v růstu obou populací ASCs výrazně zvětšily a byly pozorovatelné i pouhým okem. Dle našich výsledků se 5. den od nasazení, pohybovala populační denzita u ASCs-V až kolem ~63 000 buněk/cm<sup>2</sup>. V případě druhé populace izolované při nižším negativním tlaku ASCs-N bylo dosaženo populační denzity pouze okolo ~40 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Takovéto výrazné rozdíly mezi oběma populacemi ASCs signalizují zřejmě přítomnost ještě dalších typů buněk v populaci ASCs-N či alespoň dalších subpopulací, které vykazují pomalejší adhezi a proliferaci. Tato domněnka je celkem pravděpodobná vzhledem k faktu, že tuková tkáň rozhodně není homogenní ve všech vrstvách a částech těla. Stejně tak jako je známo, že stromální vaskulární frakce, ze které jsou buňky běžně rozpěstovávány, obsahuje široké spektrum buněk a že ASCs by měly být schopné, se jako jediné z této frakce vyselektovat vlivem kultivačních podmínek.

Pomocí charakterizace buněk za použití metody průtokové cytometrie, se nám podařilo potvrdit heterogenitu populace ASCs-N díky nižšímu procentuálnímu zastoupení vybraných povrchových markerů – CD105, CD90, CD73 a CD29. Avšak sama fenotypizace kmenových buněk mezenchymálního původu je poměrně problematická a jednoznačné charakteristiky obou buněčných typů by mohlo být provedeny až na základě dalších cytometrických měření, použitím dalších markerů či použitím jiných možných metod charakterizujících vlastnosti ASCs. Jak víme, jedním z problémů je, že sama biologická nika MSCs je jen těžko definovatelná, a navíc tyto buňky stále nemají žádné unikátní markery ke stanovení jejich kmenovosti, a často sdílejí markery i s jinými buněčnými typy např. fibroblasty (Alt *et al.*, 2011). Stejně tak zdravotní stav dárce tkáně, podmínky provádění odběru vzorku a následné podmínky kultivace buněk v laboratorních podmínkách mohou ovlivnit chování buněk.

Pro studium adheze, růstu a osteogenní diferenciace tukových kmenových buněk byla vybrána slitina titanu Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami. V rámci této studie jsme se zajímali o vliv jednotlivých mechanických povrchových úprav vzorků na chování ASCs. Vzorky se díky těmto modifikacím mezi sebou lišily svou povrchovou drsností a smáčivostí. Po adhezi buněk k povrchům jednotlivých skupin vzorků zaujímaly ASCs-N převážně polygonální tvar, kdežto ASCs-V spíše vřetenovitý tvar. Míra adheze obou typů buněk napovídala o velikosti jejich adhezních ploch, kdy největší byly dosaženy na vzorcích sk. A a K (nízká smáčivost) - 1060-1310  $\mu\text{m}^2$ . Naopak nejnižšího rozprostření dosahovaly buňky na vzorcích sk. B (vysoká smáčivost) - 730-820  $\mu\text{m}^2$ . Buňky tedy zřejmě preferují jen lehce smáčivé povrchy materiálů, jak je ostatně popsáno i v odborné literatuře (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011). Výsledky adheze se lišily pouze u buněk MG-63, což je zřejmě způsobeno jejich pozměněným chováním vzhledem k tomu, že představují buněčnou linii nádorového původu.

První významné rozdíly v počtu buněk jsme pozorovali až 3. den od nasazení. Kontrolní buňky MG-63 dosahovaly na vzorcích sk. B a C daleko vyšších populačních hustot než na vzorcích kontrolní skupiny K a vzorcích skupiny A. Podobných výsledků bylo dosaženo i u kmenových buněk N a V. Finální populační hustoty buněk, dosažené 7. den po nasazení, byly vysoké i u buněk na vzorcích sk. A. U všech sledovaných typů buněk byly populační hustoty na vzorcích sk. A vždy významně vyšší, než na kontrolních vzorcích sk. K. U ASCs-N byly populační hustoty na vzorcích sk. A dokonce vyšší i ve srovnání se vzorky sk. B a C.

Na základě tohoto pokusu lze říci, že všechny sledované modifikace podpořily adhezi MG-63 i tukových kmenových buněk. Povrchové modifikace B a C se zdají jako více vhodné pro účely rychlé proliferace buněk, kdežto pro aplikace vyžadující delší kultivaci buněk, jako je např. diferenciace, se jeví vhodnější modifikace vorků skupiny A. Z našich dřívějších studií zaměřených na interakci materiál-buňka vyplývá, že vysoká smáčivost a vysoká polární složka povrchové energie materiálu sice krátkodobě podporuje adhezi a růst buněk, ale vlivem nižší stability adsorpce proteinů ECM k povrchu materiálu může dojít k odloučení vrstvy buněk v pozdějších kultivačních intervalech s vysokou konfluencí, kdy slabě adsorbované proteiny již nejsou schopny i nadále udržet vysoké počty buněk na povrchu materiálu.

Osteogenní diferenciace tukových kmenových buněk byla zkoumána hned pomocí několika metod. Tou první bylo imunofluorescenční barvení vybraných markerů osteogenní diferenciace, kolagenu I (časný marker), alkalické fosfatázy (střednědobý marker) a osteokalcinu (pozdní marker). Na základě míry intenzity fluorescence těchto markerů u ASCs-N a ASCs-V a kontrolních buněčných linií MG-63 a SaOs-2 lze říci, že u všech typů buněk byly osteogenní markery detekovány. Největší produkce osteogenních markerů byla očekávána u buněk kultivovaných v podmínkách osteogenního média, což bylo nejvíce patrné u ASCs-N. Pozoruhodné však je, že druhá populace kmenových buněk - ASCs-V, nereagovala na přidavek osteogenního média zvýšenou produkcí specifických markerů, tak jako ASCs-N. Obdobné výsledky byly dosaženy u linií MG-63 a SaOs-2, u které byla předpokládána nejvýraznější produkce osteogenních markerů, vzhledem k její největší diferencovanosti ve srovnání se zbylými třemi typy buněk. Signifikantní nárůst tvorby

osteogenních markerů byl zaznamenán již 5. den od přidavku osteogenního média, ale v pozdějším časovém intervalu docházelo k útlumu produkce markerů. Podle dosažených výsledků můžeme říci, že byly znovu potvrzeny rozdíly mezi oběma populacemi tukových kmenových buněk a že ASCs-N, vzhledem k jejich schopnosti lépe adherovat, mají také vyšší diferenciační potenciál, pro který je právě adhezní schopnost buněk velmi důležitá.

U kmenových buněk tukové tkáně jsme se kromě vlivu chemického stimulu (tj. osteogenního média) na osteogenní diferenciaci, zaměřili i na podporu diferenciace pomocí použitého materiálu, kterým byla opět slitina Ti-6Al-4V s různými povrchovými úpravami. Oba typy kmenových buněk sice reagovaly na přidavek osteogenního média, výsledky však byly často nesourodé a v některých případech naopak docházelo ke zvýšené produkci osteogenních markerů v klasickém médiu, což jsme přikládali možnému vlivu FGF-2 na diferenciaci buněk v médiu, který jsme později také ověřovali. Populace ASCs-N dosahovala opět daleko lepších výsledků v diferenciaci než populace ASCs-V, a významných rozdílů bylo dosaženo zejména u vzorků skupiny A a K, které se také již dříve potvrdily jako nejvhodnější povrchové modifikace pro dlouhodobé růstové studie buněk a především pro jejich diferenciaci. Vyšší produkce osteogenních markerů u ASCs-N přetrvávala i v případě delšího časového intervalu.

Další metodou pro stanovení diferenciačního potenciálu ASCs bylo určení míry mineralizace extracelulární matrix pomocí vazby histologického barviva Alizarin Red S k depozitům vápníku, který je spolu s fosfátem, klíčovým prvkem pro mineralizaci kostní matrix (např. ve formě hydroxyapatitu a dalších fosfátů vápníku). Buňky byly opět kultivovány v podmínkách osteogenního média, přičemž nejvíce reagovaly na jeho přidavek při kratší kultivaci, a sice 5. den. Tento výsledek se nám znovu opakuje i v předchozích analýzách. Z toho důvodu se domníváme, že pro aktivaci signálních drah ovlivňující osteogenní diferenciaci buněk, jako je třeba signální dráha BMP (zejména BMP-2, BMP-6, BMP-7 či BMP-9) důležitá pro novotvorbu kostí (Beederman *et al.*, 2013), stačí buňky vystavit působení stimulu pouze na krátkou dobu. Rozdíly v mineralizaci ECM v osteogenním a neosteogenním médiu byly u všech typů buněk zřetelné, avšak daleko méně, než jsme předpokládali. Výjimkou byla buněčná linie Saos-2, kde byly rozdíly mezi použitými médii opravdu výrazné u obou intervalů.

Největší míra mineralizace extracelulární matrix byla očekávána u linie buněk Saos-2, které jsme spolu s buňkami linie MG-63, použili jako standardy ke srovnání diferenciace tukových kmenových buněk V a N. Toto očekávání se nám také potvrdilo, a za 12 dnů od přidavku osteogenního média se míra mineralizace matrix těchto buněk ještě zvýšila. Výsledek z kolorimetrického měření byl potvrzen i vizuálně, kdy byla depozita vápníku v matrix buněk Saos-2 jasně červeně obarvena po kultivaci v osteogenním médiu. V případě buněk MG-63 a tukových kmenových buněk docházelo zejména u 12. dne kultivace v osteogenním médiu k lehkému narůžovělému zabarvení matrix a tvorbě shluků barviva, což mohl být buď náznak začínající mineralizace či pouhé vysrážené barvivo. Za pozitivní výsledek je však pokládáno pouze jasně červené zbarvení ECM buněk.



Můžeme shrnout, že mineralizaci extracelulární matrix obou populací ASCs se nám nepodařilo ani po 12-ti dnech kultivace v osteogenním médiu zcela potvrdit. Předpokládáme, že změny buněčného fenotypu až na úrovni extracelulární matrix, vyžadují daleko více času, než změny na úrovni jádra buněk.

Poslední metodou pro stanovení osteogenní diferenciaci u tukových kmenových buněk bylo určení míry genové exprese markerů osteogenní diferenciaci (KOL I, ALP a OST) a kmenovosti buněk (RunX) pomocí metody kvantitativní real-time PCR. U našich výsledků můžeme konstatovat rozdíly v expresi genů progenitorových a osteogenních markerů mezi ASCs-N i ASCs-V. Tukové kmenové buňky N produkovaly signifikantně větší množství markerů osteogenní diferenciaci než kmenové buňky V a to ve všech časových intervalech, což nám znovu a znovu potvrzuje hypotézu vyššího diferenciacního potenciálu a odlišnosti této populace tukových kmenových buněk. A stejně tak jako u předchozích experimentů, nastávají významné změny v osteogenní diferenciaci spíše v rámci kratšího časového intervalu. Po uplynutí 14. dne od přidavku osteogenního média jsme nepozorovali nikterak výrazné rozdíly v genové expresi buněk. Největší rozdíly v expresi genů osteogenních a dalších markerů byly pozorovatelné mezi 1. a 7. dnem. V rámci markerů buňky nejvíce exprimovaly alkalickou fosfatázu. Znovu se nám také opakovala opačná odpověď buněk na použití osteogenního a neosteogenního média. Z tohoto důvodu se opět vracíme k možnému stimulačnímu účinku FGF-2, přítomného v neosteogenním médiu, na osteogenní diferenciaci tukových kmenových buněk.

K ověření předpokladu, že za neočekávaným chováním buněk při osteogenní diferenciaci stojí FGF-2, který byl po celou dobu kultivace ASCs přidáván do standardního média, byla znovu změřena míra exprese genů vybraných markerů, avšak právě bez použití tohoto růstového faktoru. Výsledky nám potvrdily naši teorii, kdy jsme po kultivaci ASCs ve standardním médiu bez přidavku FGF-2 (před aplikací osteogenního média), pozorovali očekávanou zvýšenou expresi většiny markerů v osteogenním médiu ve srovnání se standardním médiem. Nejvíce patrné rozdíly v expresi genů osteogenních markerů byly pozorovatelné mezi tzv. 0. a 1. dnem od přidavku osteogenního média a 7. den se exprese ještě zvýšila. U obou typů ASCs byl nejvíce exprimován progenitorový marker RunX. Jeho zvýšená exprese může vypovídat o menší diferencovanosti tukových kmenových buněk a lze ji považovat za další důkaz osteogenního vlivu růstového faktoru FGF-2 na tukové kmenové buňky. Otázkou však stále zůstává, do jaké míry je FGF-2 schopen nasměrovat tukové kmenové buňky k osteogenní diferenciaci a zda je tato změna po několika pasážích v takovémto médiu již nevratná a fenotyp buněk trvale pozměněn. Pro úplné objasnění vlivu růstového faktoru FGF-2 na diferenciacní potenciál kmenových buněk tukové tkáně, se hodláme touto tematikou zabývat i nadále.

Lze jen konstatovat, že výběr růstových faktorů pro kultivaci kmenových buněk je daleko složitější, vzhledem jejich velkému množství funkcí v organismu. Zároveň je důležité si uvědomit i to, že směs několika různých růstových faktorů může mít na buňku zcela jiný účinek, než působení jediného růstového faktoru. Podle studie Lim *et al.*, 2016, zaměřené právě na účinky FGF-2 na osteogenní diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně, způsoboval pre-treatment tukových kmenových buněk pomocí FGF-2, zvýšenou osteogenní

diferenciaci buněk a také podporu chondrogenese. V rámci osteogenních a progenitorových markerů citovaní autoři, podobně jako my, sledovali zvýšenou expresi ALP a RunX. Míra účinku tohoto faktoru byla závislá na použité koncentraci. Fibroblastový růstový faktor FGF-2 byl dodnes znám spíše pro své proliferační účinky na mezenchymální kmenové buňky.

## 7. Závěr

Na základě jednotlivých experimentů, které byly provedeny v rámci této diplomové práce, jsme dospěli hned k několika závěrům. Podle počátečních experimentů zaměřených na rozdíly v adhezi, proliferační aktivitě a morfologii dvou populací tukových kmenových buněk, odebraných při rozdílných podmínkách liposukce (nízký a vysoký negativní tlak) jsme usoudili, že se vlastnosti a chování těchto buněk navzájem liší. ASCs-N zaujímaly spíše polygonální tvar, dosahovaly větších adhezních ploch na materiálu a pomaleji rostly. Naopak ASCs-V zaujímaly spíše protáhlý či vřetenovitý tvar, byly méně rozprostřené na materiálu a rychleji proliferovaly, což je poměrně překvapivé vzhledem k očekávanému většímu poškození buněk vlivem použitého vyššího tlaku při jejich izolaci. Fenotypizace ASCs nám opět potvrdila odlišnost obou buněčných populací, kdy se tukové kmenové buňky N jevily více heterogenní, pravděpodobně díky přítomnosti nějaké jiné subpopulace buněk. V rámci testování vlivu povrchových úprav materiálu na růst a adhezi buněk můžeme s jistotou říci, že všechny povrchové úpravy slitiny titanu Ti-6Al-4V podporovaly adhezi a růst kmenových buněk tukové tkáně. Povrchové modifikace vzorků skupiny B a C se zdály více vhodné pro podporu rychlého nástupu proliferace u buněk. Naopak na vzorcích skupiny A a K dosahovaly buňky daleko lepšího rozprostření při adhezi, což může být považováno za výhodu při přípravě kostních implantátů obohacených o diferencované kmenové buňky. Kromě charakterizace buněk a zkoumání rozdílů v chování našich dvou populací tukových kmenových buněk vlivem použitého materiálu, byl středem našeho zájmu i diferenciační potenciál toho druhu mezenchymálních kmenových buněk.

Schopnost těchto buněk diferencovat směrem k osteoblastům byla ověřována hned několika metodami, které nám potvrdily, že tukové kmenové buňky N jsou mnohem více vhodné pro účely osteogenní diferenciaci než tukové kmenové buňky V. V kombinaci s analyzovaným materiálem, produkovaly ASCs-N největší množství osteogenních markerů na vzorcích sk. A a K, což je zřejmě podporováno dostatečným rozprostřením buněk na těchto vzorcích, jak bylo již dříve potvrzeno. Studium mineralizace extracelulární matrix kmenových buněk tukové tkáně jsme si ověřili, že ač jsou tyto buňky schopné poměrně brzy produkovat markery osteogenní diferenciaci, mineralizace jejich matrix je časově daleko náročnější. Po 12. dnech kultivace buněk v osteogenním médiu se nám totiž nepodařilo jednoznačně potvrdit přítomnost vápníkových depozitů. Dále, jak již bylo také řečeno, ASCs většinou produkovaly markery osteogenní diferenciaci ve větší míře pod vlivem osteogenního média. Časem však začaly buňky reagovat spíše naopak, kdy v neosteogenním médiu produkce osteogenních markerů rostla. Takovéto chování buněk jsme připisovali vlivu FGF-2 přidávaného do běžného kultivačního média, což jsme také potvrdili. Zdá se, že FGF-2 má nejen proliferační účinek na ASCs, ale i významně podporuje jejich osteogenní diferenciaci. Lze shrnout, že diferenciační potenciál tukových kmenových buněk je pro kostní tkáňové inženýrství značný, dále že výsledný fenotyp kmenových buněk může být ovlivněn řadou různých faktorů, a konečně že námi testované nové povrchové úpravy komerčně používané slitiny titanu Ti-6Al-4V by mohly výrazně zlepšit osteointegraci implantátu a navíc ještě podpořit i tvorbu kosti nové.

## 8. Seznam použité literatury

Alt E., Yan Y., Gehmert S., Song Y., Altman A., Sanga Gehmert S., Vykoukal D., Bai X. **Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential.** *Biology of the Cell*, 103, 197–208, 2011.

Alvarez K., Nakajima H. **Metallic scaffolds for bone regeneration.** *Materials*, 2, 790-832, 2009.

Bačáková L., Filová E., Pařízek M., Ruml T., Švorčík V. **Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. Review.** *Biotechnology Advances*, 29(6), 739-767, 2011.

Baer P. C., Geiger H. **Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization and heterogeneity.** *Stem Cells International*, 3 (812693), 2012.

Basha R. Y., Sampath Kumar T. S., Doble M. **Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration.** *Materials Science and Engineering*, C 57, 452–463, 2015.

Beederman M., Lamplot J. D., Nan G., Wang J., Liu X., Yin L., Li R., Shui W., Zhang H., Kim S. H. **BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation.** *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 6, 32-52, 2013.

Biano F., Novajra G., Vitale-Brovarone Ch. **Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 (202), 2015.

Boeuf S., Richter W. **Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors.** *Stem Cell Research & Therapy*, 1 (4), 31, 2010.

Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A. **Recent advantages in bone tissue engineering scaffolds.** *Trends in Biotechnology*, 30 (10), 546-54, 2012.

Bovan B. D., Hummert T. W., Dean D. D., Schwartz Z. **Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response.** *Biomaterials*, 17, 137-146, 1996.

Bunnell B. A., Flaat M., Gagliardi Ch., Patel B., Ripoll C. **Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation.** *Methods*, 45, 115-120, 2008.

Burg K. J. L., Porter S., Kellam J. F. **Biomaterial developments for bone tissue engineering.** *Biomaterials*, 21, 2347-2359, 2000.

Clarke B. **Normal bone anatomy and physiology.** *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3, S131–S139, 2008.

Demers C., Hamdy C. R., Corsi K., Chellat F., Tabrizian M., Yahia L. **Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review.** *Bio-Medical Materials and Engineering*, 12, 15–35, 2002.

Denry I., Kuhn L. T. **Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering.** *Dental Materials*, 32, 43–53, 2016.

Gabbay J. S., Mitchell S. C., Heller J. B., Zuk P. A., O'Hara C. M., Benhaim P., Bradley J. P. **Mechanical stimulation potentiates osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells.** *Journal of the American College of Surgeons*, 201 (3), 1072–7515, 2005.

Guilak F., Estes B. T., Diekman B. O., Moutos F. T., Gimple J. M. **2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering.** *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468, 2530–2540, 2010.

Harris D. A., Fong A. J., Buchanan E. P., Monson L., Khechoyan, D., Sandi L. **History of synthetic materials in alloplastic cranioplasty.** *Neurosurg Focus*, 34 (4), 2014.

Hench L. L., Jones J. R. **Bioactive glasses: frontiers and challenges.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 (193), 2015.

Hench L. L., Polak J. M. **Third-generation biomedical materials.** *Science*, 295 (5557), 1014–7, 2002.

Hutmacher D. W. **Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.** *Biomaterials*, 21 (24), 2529–43, 2000.

Lim S., Cho H., Lee E., Won Y., Kim Ch., Ahn W., Lee E., Son Y. **Osteogenic stimulation of human adipose-derived stem cells by pre-treatment with fibroblast growth factor 2.** *Cell Tissue Research*, 364, 137–147, 2016.

Liu X., Ma P. X. **Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering.** *Annals of Biomedical Engineering*, 32 (3), 477–486, 2004.

Long M., Rack H. J. **Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective.** *Biomaterials*, 19, 1621–1639, 1998.

Matejka R. **ALICE: fluorescent image analyser (version 1.0) [software].** Dostupné na: <http://alice.fbmi.cvut.cz>.

- Mosna F., Sensebe L., Krampera M. **Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide.** *Stem cells and development*, 19 (10), 1449-70, 2010.
- Navarro M., Michiardi A., Castano O., Planell J. A. **Biomaterials in orthopaedics.** *Journal of the Royal Society Interface*, 5, 1137–1158, 2008.
- Prolo D. J., Oklund S. A. **The use of bone grafts and alloplastic materials in cranioplasty.** *Western Transplantation Services*, 268, 1991.
- Ramay H. R. R., Zhang M. **Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering.** *Biomaterials*, 25, 5171–5180, 2004.
- Rezwan K., Chen Q. Z., Blaker J. J., Boccaccini A. R. **Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering.** *Biomaterials*, 27, 3413–3431, 2006.
- Roberts I. **Mesenchymal stem cells.** *Vox Sanguinis*, 87, S38-S41, 2004.
- Saldaña L., Bensiamar F., Boré A., Vilaboa N. **In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies.** *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4210-4221, 2011.
- Salgado A. J., Coutinho O. P., Reis R. L. **Bone tissue engineering: state of the art and future trends.** *Macromolecular Bioscience*, 4, 743–765, 2004.
- Silva R. F., Sasso G. R. S., Cerri E. S., Simões M. J., Cerri P. S. **Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells.** *BioMed Research International*, 1, 2015.
- Väänänen H. K. **Mesenchymal stem cells.** *Annals of Medicine*, 37, 469–479, 2005.
- Wang M. **Developing bioactive composite materials for tissue replacement.** *Biomaterials*, 24, 2133–2151, 2003.