

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Věra Lukášová

Vliv peptidů na osteogenní diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk
Effect of the peptides on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Praha, 2015

PROHLÁŠENÍ O AUTORSTVÍ PRÁCE

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Vliv peptidů na osteogenní diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk* vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.4.2015

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. E. Amlerovi za to, že mi umožnil toto téma zpracovat. Děkuji celému jeho týmu za podporu a pomoc v průběhu zpracování diplomové práce. Dále bych srdečně poděkovala Mgr. M. Buzgovi, za jeho cenné rady, trpělivost a konzultace v průběhu celé práce.

Projekt byl financován z grantu GAUK č. 545313.

ABSTRAKT

Vytvořením bioaktivního buněčného nosiče napodobujícího vlastnosti kostní ECM by bylo možné navodit osteogenní diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk nejen za pomoci osteogenních suplementů, ale právě díky diferenciacním peptidům aktivujícím vhodné signální dráhy vedoucí k diferenciaci buněk. Cílem práce bylo ověření efektu vybraných diferenciacních peptidů na adhezi, metabolickou aktivitu, proliferaci a osteogenní diferenciaci prasečích MSC. Byly vybrány čtyři peptidy s aminokyselinovou sekvencí DGEA, IAGVGGEKSGGF, GQGFSYPYKAVFSTQ a KIPKASSVPTELSAISTLYL. Tyto peptidy byly, popořadě, odvozeny ze sekvencí vázajících buněčné receptory z kolagenu I, kolagenu III, kostního morfogenetického proteinu 7 (BMP-7) a z BMP-2. Připraveny byly buněčné nosiče z poly-ε-kaprolaktonu (PCL), což je biokompatibilní a biodegradabilní polymer vhodný pro kultivaci buněk. V průběhu experimentu byly buňky na takto připravených nosičích kultivovány tři týdny. K buňkám byly přidávány různé koncentrace diferenciacních peptidů. V případě kultivace buněk v bazálním médiu s přidavkem diferenciacních peptidů nebyl pozorován vliv na adhezi, metabolickou aktivitu či proliferaci prasečích mesenchymálních kmenových buněk. Pouze v případě skupin s použitými peptidy odvozenými z BMP-2 a BMP-7 bylo pozorováno vyšší množství osteokalcinu než na zbylých skupinách. V případě inkubace buněk s osteogenními suplementy byla pozorována lepší osteogenní diferenciacie v důsledku přidavku peptidů odvozených z BMP-7 a BMP-2. Peptid odvozený z kolagenu III přispíval k vyšší tvorbě osteokalcinu. Peptid odvozený z kolagenu I výrazný vliv na osteogenní diferenciaci neprokázal.

KLÍČOVÁ SLOVA: Diferenciacní peptidy, mesenchymální kmenové buňky, osteogenní diferenciacie

ABSTRACT

Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) would be possible to induce by creating of a cell bioactive scaffold that mimic the properties of bone extracellular matrix (ECM). This induction will be not only due to the addition of osteogenic supplements, but also due to the addition of differentiation peptides. These peptides activate signaling pathways leading to cell differentiation. The aim of this study was to evaluate the effect of selected peptides on adhesion, metabolic activity, proliferation and osteogenic differentiation of porcine MSCs. Four peptides with amino acid sequences of DGEA, IAGVGGEEKSGGF, GQGFSYPYKAVFSTQ and KIPKASSVPTELSAISTLYL were selected. These peptides were derived from receptor binding sequences of collagen I, collagen III, BMP-7 and BMP-2 respectively. Scaffolds were prepared from a biocompatible and biodegradable poly-ε-caprolactone (PCL) polymer, suitable for cell cultivation. Cells were cultured on scaffolds for three weeks. Various concentration of differentiation peptides were added to the culture medium. As observed in the experiment of cells cultured in basal medium supplemented with differentiation peptides no effect on adhesion, proliferation or metabolic activity of porcine MSCs was observed. In groups treated with peptides derived from BMP-2 and BMP-7, a greater amount of osteocalcin was detected compared to other groups. Osteogenic differentiation was observed in cultured cells with osteogenic supplements due to the addition of differentiation peptides derived from proteins BMP-7 and BMP-2. The peptide derived from collagen III contributed to increased formation of the osteocalcin. The peptide derived from collagen I had no important effect on osteogenic differentiation.

KEY WORDS: Differentiation peptides, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation

OBSAH

Abstrakt	1
Abstract	2
Obsah	3
Seznam použitých zkratek	5
Úvod.....	8
1 Teoretická část	10
1.1 Mesenchymální kmenové buňky	10
1.1.1 Charakterizace	10
1.1.2 Izolace.....	12
1.1.3 Nika	12
1.2 Terapeutické využití	14
1.2.1 Mesenchymální kmenové buňky a imunitní systém.....	16
1.2.2 Homing mechanismus	17
1.2.3 Diferenciace mesenchymálních kmenových buněk.....	18
1.2.3.1 Osteogenní diferenciace.....	18
1.2.3.2 Chondrogenní diferenciace	19
1.2.3.3 Adipogenní diferenciace	20
1.3 Formace kosti	21
1.3.1 Endochondrální osifikace	23
1.3.2 Zrání a diferenciace osteoblastů	25
1.3.2.1 Transkripční faktory	25
1.3.2.2 Hormonální faktory.....	32
1.3.2.3 Růstové faktory.....	33
1.3.3 Kostní extracelulární matrix	38
1.3.3.1 Komponenty extracelulární matrix	38
1.3.3.2 Mineralizace extracelulární matrix	42
1.4 Náprava kostních defektů	45
1.4.1 Kaskáda hojení kosti.....	45
1.4.2 Implantáty pro nápravu kostních defektů	47
1.4.2.1 Vlastnosti náhrad kostních štěpů	48
1.4.2.2 Náhrady kostních štěpů.....	49
1.4.3 Elektrostatické zvláknování.....	52
1.4.3.1 Nanovláknenné nosiče pro tkáňové inženýrství kosti.....	52
1.5 Diferenční peptidy	54
1.5.1 Navození osteogeneze diferenčními peptidy	55
1.5.2 Osteogeneze <i>in vitro</i>	58
2 Praktická část	59
2.1 Materiál a metody.....	59
2.1.1 Materiál a přístroje.....	59
2.1.2 Metody.....	60
2.1.2.1 Elektrostatické zvláknování.....	60
2.1.2.2 Analýza polykaprolaktonového nosiče.....	60
2.1.2.3 Příprava a sterilizace buněčných nosičů	61

2.1.2.4 Izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk	61
2.1.2.5 Pasážování mesenchymálních kmenových buněk	62
2.1.2.6 Příprava a sterilizace diferenciačních peptidů	62
2.1.2.7 Nasazování mesenchymálních kmenových buněk	63
2.1.2.8 Test metabolické aktivity	63
2.1.2.9 Měření aktivity alkalické fosfatázy	63
2.1.2.10 Kvantifikace obsahu buněčné DNA	64
2.1.2.11 Skenovací elektronová mikroskopie	64
2.1.2.12 Vizualizace buněk	64
2.1.2.13 Barvení osteokalcinu	65
2.1.2.14 Obrazová analýza	65
2.1.2.15 Statistika	66
2.2 Výsledky	67
2.2.1 Analýza polykaprolaktonového nosiče	67
2.2.2 Vliv diferenciačních peptidů přidaných volně do bazálního média	69
2.2.2.1 Kvantifikace obsahu buněčné DNA	70
2.2.2.2 Test metabolické aktivity	72
2.2.2.3 Aktivita alkalické fosfatázy	75
2.2.2.4 Vizualizace adheze buněk	77
2.2.2.5 Barvení osteokalcinu	84
2.2.2.6 Skenovací elektronová mikroskopie	89
2.2.3 Vliv diferenciačních peptidů přidaných volně do bazálního média s osteogenními suplementy	94
2.2.3.1 Kvantifikace obsahu buněčné DNA	95
2.2.3.2 Test metabolické aktivity	97
2.2.3.3 Aktivita alkalické fosfatázy	100
2.2.3.4 Vizualizace adheze buněk	103
2.2.3.5 Barvení osteokalcinu	111
2.2.3.6 Skenovací elektronová mikroskopie	117
Diskuze	123
Závěr	131
Seznam citované literatury	133

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADAMT Disintegrin a metaloproteáza s motivem trombospondinu typu 1	ECM Extracelulární matrix
ALP Alkalická fosfatáza	EDTA Etylendiaminotetraoctová kyselina
ALP substrát p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System	EGF Epidermální růstový faktor
AMH Anti-Müllerian hormon	FBS Fetální hovězí sérum
AP-1 Aktivační protein 1	FGF Fibroblastový růstový faktor
APC Anafázi podporující komplex	G Aminokyselinová sekvence GQGFSYPYKAVFSTQ
ATF4 Aktivační transkripční faktor 4	GCSF Stimulační faktor kolonií granulocytů
Bapx-1 Bagpipe homeobox protein 1	GDF5 Růstový diferenciační faktor 5
bFGF Základní FGF	GPI kotva Glykosylfosfatidová kotva
BMP Kostní morfogenetický protein	HAT Histon acetyl transferáza
BMU Kostní mnohjaderná jednotka	HDAC Histon deacetyláza
C/EBP CCAAT enhancerový vazebný protein	HGF Hepatocytární růstový faktor
cAMP Cyklický adenosin monofosfát	HIF-2α Hypoxií indukovaný faktor-2 α
Cbaf1 Kóre vazebný faktor α 1	HLA Lidský antigen leukocytů
Cbfb Kóre vazebný faktor β	HMDS Hexamethyldisilazan
CDKI Inhibitor cyklin dependentních kináz	Hoxa-2 Homeobox A2 protein
CFU-F Kolonie formující jednotky	Hoxc8 Homeobox C8 protein
Co-Smad Koaktivační Smad	HSC Hematopoetické kmenové buňky
CRE cAMP response element	I Aminokyselinová sekvence IAGVGGEKSGGF
CREB2 Protein odpovědný za vazbu cAMP elementu 2	I-Smad Inhibiční Smad
D Aminokyselinová sekvence DGEA	ICAM Interbuněčná adhezní molekula
DiOC6 3,3'-dietyloxakarbokyanin jodid	Id DNA vazebný proteinový inhibitor
Dlx Méně distální homeobox protein	IGF-1 Inzulínu podobný růstový faktor
DMSO Dimethyl sulfoxid	IGFBP IGF vazebný protein
DNA Deoxyribonukleová kyselina	Ihh Indian hedgehog

IL-6 Interleukin-6	MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
INFγ Interferon γ	NK Natural killer
ISCT Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii	NPPI Fosfodiesteráza nukleotid pyrofosfátu
JNK Jun NH ₂ terminální kináza	Nrf2 Jaderý faktor odvozený z erythroidu 2
K Aminokyselinová sekvence	NTP Nukleosidtrifosfát
KIPKASSVPTELSAISTLYL	oct-4 Oktamer vazebný transkripční faktor-4
LAP Latentní asociovaný protein	OSE2 Osteoblastický specifický element 2
LEF1 Lymfoidní enhancer vazebný faktor 1	Osx Osterix
LIF Leukemii inhibující faktor	P/CAF p300/CBP asociovaný faktor
LLC Velký latentní komplex	P300/CBP p300/creb vazebný protein
LRP LDL receptoru příbuzný protein	PBS Fosfátový pufr
LTBP Latentní TGF β vazebný protein	PC-1 Glykoprotein 1 přítomný v plazmatické buněčné membráně
MAPK Mitogenem aktivovaná protein kináza	PCL Poly- ϵ -kaprolakton
MCSF Stimulační faktor kolonií makrofágů	PCR Polymerázová řetězová reakce
MEF Myeloidní Elf-1 podobný faktor	PDGF Z destiček odvozený růstový faktor
MEM Minimum Essential Medium Earle's Salts with L-Glutamin	PEG Polyethylenglykol
MHC Hlavní histokompatibilní komplex	PEO Polyethylenoxid
MLR Smíšená lymfocytární reakce	PGA Polyglykolid
MMP Matrix metaloproteináza	PI3K Fosfatidyl inozitol 3 kináza
MORF Monocytický leukemický faktor příbuzný proteinu zinkového prstu	PKC Protein kináza C
MOZ Monocytický leukemický protein zinkového prstu	PLLA Kyselina poly-L-mléčná
MSC Mesenchymální kmenové buňky	pNNP ρ -nitrofenylfosfát
Msx Msh homeobox protein	PPARγ Receptor aktivovaný proliferátory peroxizómů γ
	PTH1R Parathyroidní hormonový receptor typu 1

RANKL Ligand aktivující receptor
jaderného faktoru kappa-B
Rb Retinoblastomový protein
rex-1 Protein zinkového prstu 42
R-Smad Receptory regulovaný Smad
RunX2 Runt příbuzný transkripční
faktor 2
SARA Smad kotvící protein
SATB2 Speciální protein vázající AT
bohaté sekvence
Sca-1 Antigen kmenových buněk-1
SDF-1 Ze stroma odvozený faktor 1
Smurf1 Smad specifická E3 ubiquitin
ligáza
Sox-2 Pohlaví determinující region
Y-box 2
Sp3 Specifický protein 3
Stat2 Signální transduktor a aktivátor
transkripce 2
STRO-1 Stromální prekurzorový
antigen-1

TAZ Tafazzinový protein
TCF/LEF T buněčný faktor/lymfoid
podporující faktor
TGF β Transformující růstový faktor
 β
TIMP Metalopeptidázový inhibitor
TLR Receptor podobný toll
TNAP Tkáňově nespecifická
alkalická fosfatáza
TNF α Tumorový nekrotický faktor α
TRAIL TNF příbuzný apoptózu
indukující ligand
Tris Tris(hydroxymethyl)aminometan
VCAM Adhezní molekula cévních
buněk
VEGF Vaskulární endoteliální
růstový faktor
YAP Yes asociovaný protein
 α SMA α aktin hladkého svalstva

ÚVOD

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní buňky, které lze diferencovat pomocí vhodných signálních molekul. Díky této vlastnosti jsou MSC potencionálním zdrojem buněk pro užití v regenerativní medicíně. V *in vitro* podmínkách se pro osteogenní diferenciaci využívají suplementy na bázi proteinů, hormonů a vitamínů, které se přidávají do kultivačního média. Výrazný buněčný vliv dále vykazuje i extracelulární matrix (ECM), což je složitý komplex polysacharidů a proteinů obklopující buňky. Nadějnou skupinou signálních molekul řídících diferenciaci MSC jsou peptidy odvozené z vazebných sekvencí růstových faktorů a proteinů ECM. Diferenciační peptidy odvozené z proteinů ECM mají potenciál navodit osteogenní diferenciaci MSC prostřednictvím vazby těchto peptidových sekvencí na povrchové buněčné receptory.

Hlavním cílem této práce je ověření vlivu diferenciačních peptidů odvozených z kolagenu I, kolagenu III, kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) a z BMP-7 na adhezi, viabilitu, proliferaci a osteogenní diferenciaci prasečích MSC. Dále bude provedeno porovnání výsledků z testů provedených s prasečími MSC inkubovanými s různou koncentrací diferenciačních peptidů volně přidaných do bazálního média a do bazálního média s přidávkem osteogenních suplementů.

Práce je členěna na teoretickou a praktickou část. Teoretická část je věnována mesenchymálním kmenovým buňkám, formaci kosti, nápravě kostních defektů a diferenciačním peptidům. Kapitola mesenchymální kmenové buňky v sobě shrnuje poznatky o tomto buněčném typu. Zabývá se jejich charakterizací, izolací, kultivací, terapeutickým využitím a diferenciačním potenciálem. Část formace kosti se zabývá posloupností dějů, ke kterým dochází v průběhu vzniku kostní tkáně. Jsou zde shrnuty signální molekuly a vliv ECM na proces osteogenní diferenciaci. V kapitole náprava kostních defektů je popsána kaskáda hojení kosti. Dále jsou zde shrnuty různé typy kostních štěpů a syntetických implantátů, které lze použít při selhání procesu hojení kostních defektů. V této kapitole jsou rovněž sepsány požadavky, které by ideální kostní implantát měl splňovat. Poslední kapitola v teoretické části nese název diferenciační peptidy. Tato kapitola se zabývá vlastnostmi diferenciačních peptidů odvozených z ECM a výhodami v jejich používání v porovnání s používáním celých proteinů. Je zde uveden seznam proteinů a diferenciačních peptidů z nich odvozených, dále je tu uveden vliv jednotlivých peptidů na diferenciaci MSC.

Praktická část obsahuje kapitolu materiál a metody, kde jsou uvedeny seznamy chemikálií a přístrojů používaných při vypracování této diplomové práce a dále jsou zde uvedeny postupy, jimiž bylo dosaženo výsledků. Kapitola výsledky je stěžejní kapitolou a výstupem celé práce. Jsou zde pospány výsledky z jednotlivých experimentů doplněné o grafy a snímky pořízené z mikroskopů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

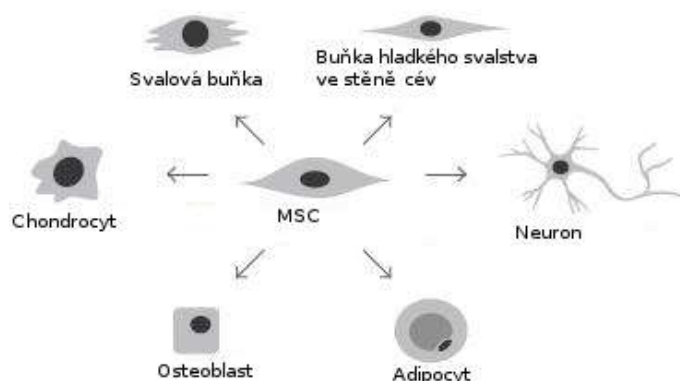
Označení kmenová buňka lze přiřadit těm buňkám, které splňují několik kritérií. Mezi tato kritéria patří samoobnovovací funkce, schopnost diferenciaci do více než jednoho buněčného typu a zachování si kapacity buněčného dělení po celý život [1, 2]. V kostní dřeni dospělých jedinců spolu koexistují dva druhy dospělých buněčných kmenových populací. Prvním typem je velmi dobře charakterizovaná populace neadherentních, cirkulujících hematopoetických kmenových buněk (HSC, hematopoietic stem cell) [1, 3]. Jejich úkolem je udržení celoživotní produkce krevních buněk. Druhou populací jsou mesenchymální kmenové buňky neboli mesenchymální stromální buňky (MSC, mesenchymal stem cell) [3]. Reprezentují pouze malou frakci jaderných buněk zastoupených v kostní dřeni, jedná se o 0,001-0,01 % z celkové populace jaderných buněk [4, 5]. MSC pravděpodobně tvoří v dospělé tkáni rezervoár reparativních buněk, které jsou připraveny k mobilizaci a diferenciaci v případě signalizace poranění či nemoci [6].

Stroma v kostní dřeni je část nehematopoetické pojivové tkáně, která poskytuje systém strukturní podpory pro vývoj HSC a funkční podporu pro proces hematopoézy [4]. To se děje díky unikátnímu mikroprostředí, které dodává vhodné růstové regulátory a podporuje interakce mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM) [3]. MSC vykazují expresi povrchových receptorů důležitých pro interakci s HSC, čímž dochází k regulaci hematopoézy [4]. Celková buněčná kompozice kostní dřene je dále tvořena heterogenními populacemi buněk retikulárních, adipocytů, osteogenních buněk vyskytujících se blízko povrchu kosti, vaskulárních endoteliálních buněk, buněk hladkého svalstva ve stěně cév a makrofágů [3, 4].

1.1.1 CHARAKTERIZACE

Poprvé byly MSC identifikovány v roce 1966 ve studii Friedensteina a kolektivu [7]. Ti z kostní dřene krysy izolovali kost formující progenitorové buňky. Tyto buňky vykazovaly kapacitu diferencovat do různých buněčných linií pojivové tkáně. Při použití diferenciačních médií, a tedy vhodné signalizaci, je možno navodit diferenciaci MSC do osteoblastů, chondroblastů, myoblastů, fibroblastů, adipoblastů a neuroblastů,

viz obrázek č. 1 [1-4, 6, 8, 9]. Z tohoto důvodu se o tyto buňky zajímá regenerativní medicína a tkáňové inženýrství.



Obrázek č. 1: **Diferenční potenciál MSC**: Multipotentní MSC mají potenciál diferencovat do mnoha buněčných linií. To zahrnuje diferenciaci do osteoblastů, chondrocytů, svalových buněk, adipocytů, buněk hladkého svalstva cév a neuronů. Upraveno podle: [10].

MSC jsou multipotentní progenitorové buňky mezenchymu, nemají definovanou morfologii. V buněčné kultuře vykazují MSC morfologii fibroblastů. Během iničiálního růstu *in vitro* podmínkách tvoří takzvané kolonie formující jednotky (CFU-F) [1, 4, 6, 8]. Kvůli těmto úskalím byly objeveny až v šedesátých letech [1].

MSC postrádají tkáňově specifické markery. Fenotypicky však lze MSC charakterizovat na základě kombinace pozitivních a negativních markerů. Mezi negativní se řadí CD3, CD11a, CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD36, CD38, CD40, CD45, CD50, CD79, CD80, CD86, CD113, CD133, CD184, lidský antigen leukocytů-DR (HLA-DR), glykoforin A [2, 4, 6, 8, 11]. Mezi pozitivní markery se řadí CD10, CD13, CD 29, CD44, CD54, CD63, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD147, CD166, antigen kmenových buněk-1 (Sca-1), stromální prekurzor antigenu-1 (STRO-1), HLA-ABC [2-6, 8, 11, 12]. Dále MSC exprimují vysoký počet integrinů $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, nízký počet integrinů $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αV , $\beta 4$, $\beta 2$ a neexprimují $\alpha 4$, αL , $\beta 2$ [3].

Nedefinovaná buněčná morfologie a nepřítomnost specifických buněčných markerů, které by jasně určily zda se jedná o MSC, vedly v roce 2006 Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (ISCT) k návržení minimálních kritérií pro definování lidských MSC [1, 2, 6]. Musí se jednat, za standardních kultivačních podmínek, o adherentní buňky [11]. Za druhé musí tyto buňky exprimovat CD73, CD90, CD105 a nesmí exprimovat CD34, CD45, HLA-DR, CD14 nebo CD11b, CD79a nebo CD19 povrchové molekuly. Za třetí musí být *in vitro* podmínkách schopny diferencovat do osteoblastů, chondroblastů a adipocytů [2].

1.1.2 IZOLACE

MSC je možné z kostní dřevě izolovat a poté s vysokou účinností expandovat užitím standardních kultivačních technik. Nejběžněji se MSC izolují z nasáté kostní dřevě, která je odebírána z kosti kyčelní [5, 6]. Odebraná kostní dřevě se nechá frakcionovat díky hustotnímu gradientu v roztoku. Poté jsou tyto adherentní buňky nasazeny do kultivační nádoby v hustotě $1 \times 10^4 - 0,4 \times 10^6$ buněk/cm². Během prvních dní kultivace je frakce neadherentních HSC z kultury odčerpána, zatímco adherentní MSC zůstávají přichyceny ke kultivačnímu plastiku [2, 4-6, 11].

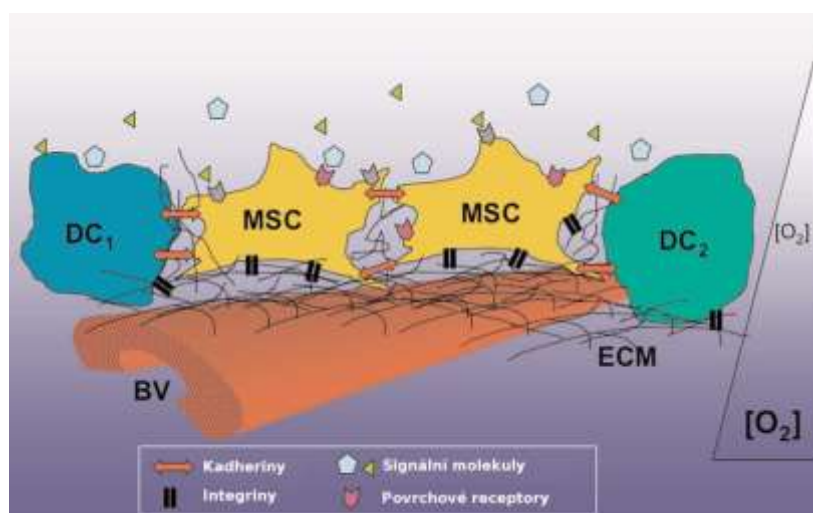
Dospělé MSC lze kromě kostní dřevě nalézt také v okostici, trámčité kosti, tukové tkáni, synoviu, kosterním svalstvu, plicích, v dočasném chrupu, periferní krvi, placentě, pupečnickové krvi a amnionu [5, 6, 13]. Obecně lze říci, že bez ohledu na původ MSC, všechny mají schopnost diferenciaci do více buněčných linií, diferenciacní potenciál odráží lokální mikroprostředí [6].

1.1.3 NIKA

Různorodost tkání kde lze MSC nalézt vede k otázce, zda existuje MSC nika, která je společná všem typům tkání nebo zda MSC fungují autonomně bez ohledu na okolním mikroprostředí. Termín nika zahrnuje veškeré elementy bezprostředně obklopující kmenové buňky v momentě, kdy se nachází v naivním stavu [13, 14]. Obecně nika kmenových buněk obsahuje samotné kmenové buňky, podpůrné stromální buňky, které interagují mezi sebou navzájem a s kmenovými buňkami pomocí povrchových receptorů a rozpustných faktorů. Dále obsahuje proteiny ECM, které poskytují strukturní, organizační a mechanickou signalizaci nice. Jsou zde krevní cévy, které přináší systémovou signalizaci a poskytují přívod zánětlivých a dalších cirkulujících buněk do niky. V neposlední řadě se zde nachází i nervové vstupy, které předávají vzdálené fyziologické podněty do mikroprostředí kmenových buněk [15]. Toto mikroprostředí, viz obrázek č. 2, napomáhá udržovat kmenové buňky v nediferencovaném stavu [13].

Niku MSC se doposud nepodařilo zdárně identifikovat [13, 15]. Analýza povrchových markerů populací MSC izolovaných z různých zdrojů však odhalila, že vykazují podobný imunofenotyp. Na základě exprese α aktinu hladkého svalstva (α SMA) se zdá, že MSC nika má perivaskulární podobu [14, 16]. Tomuto tvrzení napomáhá i přítomnost pozitivních markerů STRO-1 a CD146. Díky lokalizaci MSC v perivaskulárním prostoru je jim umožněn snadnější přístup k tělním tkáním prostřednictvím krevního systému [13, 14].

Pro kostní dřeň je typický nízký obsah kyslíku [13]. Studie zkoumající efekt různé koncentrace kyslíku na proliferaci MSC potvrzuje, že redukované množství kyslíku udržuje MSC v proliferativním stavu [17]. Mechanismus fungování hypoxických podmínek na MSC je zatím neznámý, ale například u embryonálních kmenových buněk, kde je 3-5% obsah kyslíku, je kmenovost udržována díky hypoxii indukovanému faktoru-2 α (HIF-2 α), což je transkripční faktor, který zvyšuje expresi oktamer vazebného transkripčního faktoru-4 (oct-4) [18].



Obrázek č. 2: **Nika MSC:** MSC se nachází v perivaskulárním prostředí. Interagují s množstvím diferencovaných buněk prostřednictvím povrchových adhezních molekul, například kadherinů, integrinových receptorů, signálních molekul, gap junction. Další proměnnou je kyslík. Hypoxie je asociovaná s MSC přítomnými v kostní dřeni. Zkratky: DC znamená diferencovaná buňka, BV znamená krevní céva. Upraveno podle: [13]

V kmenovém stavu jsou MSC udržovány díky vnitřní a vnější signalizaci zprostředkované řadou cytokinů a růstových faktorů. Přesné mechanismy jejich působení zůstávají stále neobjasněné. Například leukemii inhibující faktor (LIF) je cytokin účastnící se udržování kmenovosti nejen u MSC, ale také jiných typů kmenových buněk. Nejspíš se zde jedná o parakrinní signalizaci mezi sousedními buňkami [13]. Dalším cytokinem, sekretovaným MSC a HSC je interleukin-6 (IL-6). Tento cytokin zlepšuje proliferaci, inhibuje apoptózu a potlačuje chondrogenní a adipogenní diferenciaci MSC [19]. Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF2) prodlužuje viabilitu MSC v kultuře, a tím napomáhá udržet kmenový stav MSC. Cílové geny působení FGF2 nejsou známy, ovšem je možné, že se zde jedná o autokrinní smyčku podobnou té, která s uplatňuje při vývoji končetin obratlovců, které se účastní FGF4, -8 a -10 [13].

Wnt faktory se podílejí na udržení kmenovosti řady kmenových buněk. Specificky u MSC se jedná o Wnt3a, který podporuje jejich proliferaci a zabraňuje

osteogenní diferenciaci [19]. Ovšem určit přesný mechanismus působení Wnt signalizace je nesnadné kvůli pleiotropnímu účinku těchto signalizačních molekul [13]. Exprese specifických integrinů je asociována s danými proteiny ECM. Například řetězec α 4-lamininu, nacházející se v lamininu-8, -9 a -14, je vysoce exprimován MSC a napomáhá udržovat jejich kmenový stav. Diferenciace MSC pak může souviset se změnou exprese integrinů a isoform lamininů [19]. V neposlední řadě MSC exprimují genové markery embryonálních kmenových buněk, kterými jsou oct-4, pohlaví determinující region Y-box 2 (sox-2) a protein zinkového prstu 42 (rex-1) [13].

1.2 TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ

Muskoskeletální choroby jsou akutní i chronické stavy, které postihují kteroukoliv část muskoskeletálního aparátu, například kosti, svaly, chrupavky, šlachy nebo nervy [20]. Stáří je asociováno se sníženou schopností oprav zlomenin kostí a s redukcí kostní hmoty [1]. Podílí se na tom i snížení populace MSC a snížení reparační kapacity kostní tkáně [6]. MSC poskytují atraktivní volbu pro buněčnou terapii. Jsou slibným zdrojem buněk pro léčení muskoskeletálních chorob, jelikož je lze izolovat z řady tkání a mohou být indukovány k diferenciaci do relevantních buněčných typů. Navíc použití MSC odstraňuje etické problémy spojené s užíváním embryonálních kmenových buněk a indukovaných pluripotentních kmenových buněk [20]. Multipotentní potenciál MSC a fakt, že je možné tyto buňky expandovat, vede tedy k jejich výzkumu při nápravě tkání a buněčné terapii [2].

Osteoartritida je degenerativní onemocnění, které je typické ztrátou chrupavky a přerůstáním kosti v oblasti kloubu, což indukuje lokální zánětlivé reakce. Intraartikulární injektování MSC bylo poprvé zveřejněno v roce 2008. Muži po čtyřicítce byly injektovány autologní MSC, po šesti měsících bylo zaznamenáno zvýšení objemu chrupavky spolu s lepší pohyblivostí kloubu a s menší bolestivostí [21]. Implantace trojrozměrného biomimetického nosiče osazeného MSC expandovanými *in vitro* může napomoci vyplňování dutin a integraci hostitelské tkáně. To bylo prokázáno v preklinických studiích při užití hydroxyapatitových nosičů implantovaných například do myši či psa. Ve všech případech byla pozorována formace kosti [22, 23].

Ačkoliv MSC vykazují terapeutický potenciál, jejich použití zatím není optimální [24]. Izolace MSC probíhá dvěma způsoby. Jednak je to metoda založená na adhezivitě buněk a dále se využívá metoda sortování buněk. Sortování buněk probíhá pomocí

fluorescencí aktivovaného buněčného sortování nebo imunosortování pomocí magnetických částic. Takto získaná populace MSC je čistší, avšak zároveň jsou tyto metody nákladnější, náročnější a způsobují ztrátu a poničení izolovaných MSC. Z tohoto důvodu se v klinickém využití používají jen zřídka. Druhý typ izolace probíhá na základě adheze buněk, touto metodou je však získána heterogenní směs buněk obsahující nejen MSC. Většina kontaminujících buněk je v průběhu pasážování odstraněna, ovšem tyto kontaminace ovlivňují expanzi a výsledný efekt působení MSC [25].

MSC izolované z různých tkání nejsou identické. Proto je třeba dále zkoumat tento fenomén a zaměřit se na to, zda MSC v závislosti na svém původu nejsou efektivnější pro specifické terapeutické aplikace. MSC se *in vivo* vyskytují v nízkých koncentracích a před použitím je tedy potřeba jejich *ex vivo* expanze [26]. Protokoly používané k expanzi MSC v klinických studiích jsou však rozporuplné. Liší se jednak typem izolace buněk, používáním různých typů plastů a kultivačními médii, hustotou nasazení buněk i pasážováním [25].

MSC zatím nebyly jednoznačně identifikovány. Bylo zjištěno, že pericyty vykazují mnoho společných vlastností s MSC [26]. Pericyty byly izolovány z blízkosti krevních cév, vykazují diferenciaci do více buněčných linií a exprimují podobné povrchové markery. Na základě těchto dat se usuzuje, že by bylo možné považovat MSC a pericyty za jeden a tentýž buněčný typ [19, 26]. Mezi negativa v používání MSC pro klinické účely patří i jejich migrace do nádorové tkáně, kde tvoří stromální buňky a také fakt, že buňky v místě poškození mohou diferencovat i do jiných buněčných linií než je pro léčbu dané tkáně třeba. V současnosti probíhá mnoho klinických studií, které využívají MSC pro léčbu například zlomenin, osteonekrózy a osteoartritidy. Většina těchto testů je ve fázi schvalování bezpečnosti a schvalování užití pro léčení lidí [20].

Terapie kmenovými buňkami zahrnuje autologní či alogenní transplantace a to systémovou infuzí a nebo lokálním doručením buněk [6]. K doručení MSC se v klinice používají dva postupy. Prvním je intravenózní podání MSC, v tomto případě je třeba pacienta vystavit vysoké dávce buněk, ta se pohybuje v rozmezí 1-5 milionů buněk/kg. Navíc bylo prokázáno, že 48 hodin po zákroku se 90 % MSC kumuluje v plicích [24]. Druhou možností je injektování MSC přímo do místa poškozené tkáně. V tomto případě je třeba provést invazivní zákrok. Odpovídající směřování buněk do místa poškozené tkáně je třeba důkladněji prozkoumat, aby bylo možné dodávat přesnou dávku MSC potřebnou k hojení tkání [26].

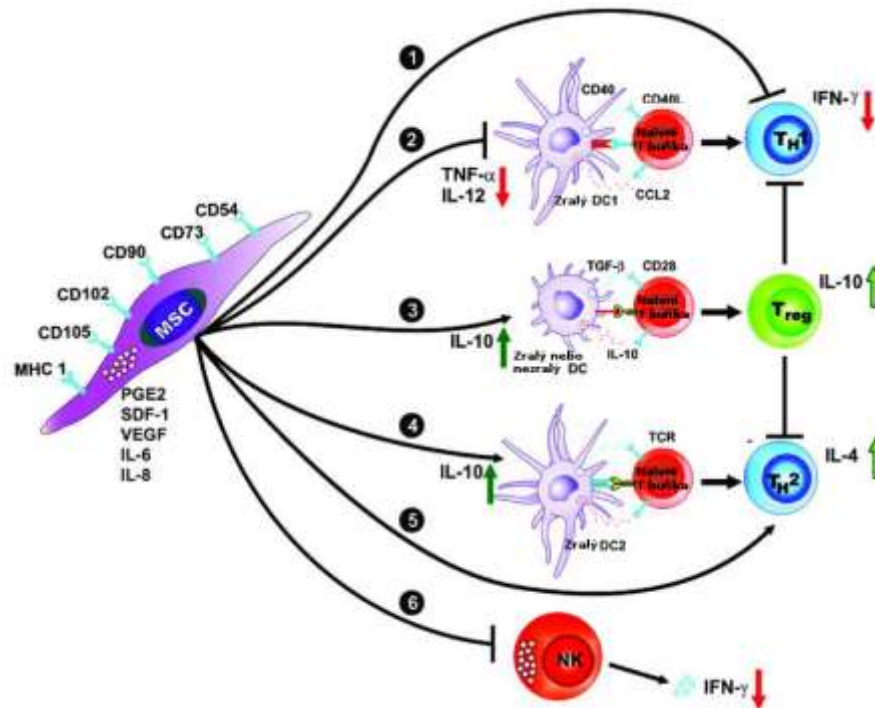
Pro porozumění mechanismu terapie kmenovými buňkami je nutné si uvědomit několik věcí. Za prvé jde o působení MSC na imunitní systém [2]. Za druhé jsou MSC schopné migrace a takzvaného „homing“ mechanismu do místa poškození tkáně, způsobeného například zánětem, poraněním, vznikem tumoru nebo ischemií [11]. A v neposlední řadě jde o schopnost jejich diferenciaci [6].

1.2.1 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY A IMUNITNÍ SYSTÉM

MSC regulují hematopoézu, jelikož podporují sebeobnovu, proliferaci a diferenciaci HSC [2-4]. MSC tedy vykazují imunomodulační vlastnosti a podporují diferenciaci imunitních prekurzorů a maturaci diferencovaných imunitních buněk [2, 11].

Fenotyp MSC je asociován s absencí exprese hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) glykoproteinů II třídy a také s nízkou expresí MHC glykoproteinů I třídy, proto jsou MSC nízkoimunogenní [2, 9, 11]. MHC glykoproteiny II třídy rovněž chybí na diferencovaných MSC, které tedy nevyvolávají aloreaktivní reakce lymfocytů [5, 6].

V místě poškození vykazují MSC imunomodulační efekt, viz obrázek č. 3 [27]. Imunosupresivní funkce MSC se projevuje ve schopnosti těchto buněk potlačit smíšenou lymfocytární reakci (MLR) a redukcí reakce štěpu versus hostitel [2, 6, 11]. To se děje díky aktivnímu potlačování proliferace T lymfocytů například pomocí protizánětlivého IL-10, který MSC produkují [2, 5, 27]. MSC snižují syntézu tumorového nekrotického faktoru α (TNF α) a interferonu γ (INF γ) z T_H1 lymfocytů a zvyšují syntézu IL-4 z T_H2 lymfocytů [27]. Dále MSC inhibují fungování tzv. natural killer buněk (NK buněk) a diferenciaci dendritických buněk z monocytů. Takto nezralé dendritické buňky nejsou schopny indukovat aktivaci T lymfocytů. Menší část MSC pak produkuje prozánětlivé mediátory, jako například IL-6 a -8 [2].



Obrázek č. 3: **Interakce MSC s antigen prezentujícími buňkami:** MSC inhibují sekreci $TNF-\alpha$ a podporují sekreci IL-10. To může mít vliv na zrání a funkci dendritických buněk. Výsledkem tohoto působení jsou fenotypicky tolerantní dendritické buňky, které mají protizánětlivý vliv. Pokud se MSC nachází v zánětlivém prostředí, pak inhibují sekreci $IFN-\gamma$ z T_H1 a NK buněk a zvyšují sekreci IL-4 z T_H2 lymfocytů, což napomáhá přechodu T_H1 lymfocytů na T_H2 lymfocytů. Zkratky: DC znamená dendritická buňka, T_H znamená pomocný T lymfocyt. Upraveno podle: [28].

1.2.2 HOMING MECHANISMUS

Důležitou vlastností MSC je jejich schopnost migrace a tzv. homing mechanismu do místa či okolí poškozené tkáně ischemií, zánětem, zraněním či výskytem tumoru. Za homing mechanismus je označována schopnost buněk migrovat do správného místa a osídlit orgán, tkáň a nebo poškozenou tkáň [11, 13]. Tento fenomén byl pozorován u kostní fraktury, infarktu myokardu či při ischemické mozkové příhodě [6]. MSC lze do těla doručit různými způsoby, například intravenózně, lokálně, epidurálně či pomocí infúze. Homing mechanismus MSC zatím nebyl zcela objasněn [6, 11]. Jedná se však o vícekový proces skládající se z přichycení a migrace MSC do lumen cév, pravděpodobně pomocí takzvaného rolujícího adhezního mechanismu (rolling mechanismus), adheze a transendoteliální migrace skrze cévní stěnu a následné invaze do cílové tkáně [11].

Chemotaxe je zprostředkována pomocí chemokinů. Většina těchto molekul je sekretována do okolí, ale existují i membránově vázané chemokiny. Dělí se do čtyř základních skupin na CXC, CC, C a CX3C chemokiny. Ke každé skupině náleží receptory spřažené s G proteiny. Poškozená tkáň exprimuje specifické receptory, chemokiny a růstové faktory [11]. Například se jedná o stroma odvozený faktor 1 (SDF-

1), což je CXCL12. K němu je na MSC exprimován odpovídající CXCR4 receptor. Během zánětu poškozená tkáň sekretuje inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), IL-6 a z destiček odvozený růstový faktor (PDGF), TNF příbuzný apoptózu indukující ligand (TRAIL), ligand aktivující receptor jaderného faktoru kappa-B (RANKL), základní FGF (bFGF), INF- γ , epidermální růstový faktor (EGF) či erythropoetin, jimž odpovídají příslušné receptory na MSC [2, 11]. Tyto signální molekuly jsou důležité pro migraci MSC. Dále bylo prokázáno, že stimulace MSC pomocí receptorů podobným toll 3 a -4 (TLR3 a -4) podporuje migraci MSC [11].

Pro migraci do krevního řečiště a následnou transendoteliální invazi je důležitá interakce MSC s endoteliálními buňkami. Tato interakce se uskutečňuje pomocí membránově vázaných glykoproteinů podobných selektinům, dále MSC exprimují některé integriny, a to zejména třídy $\beta 1$ a $\alpha 4$ a dále například adhezní molekuly cévních buněk 1 (VCAM-1) či interbuněčné adhezní molekuly 1 a -3 (ICAM-1 a -3) [2, 11, 26]. Zánětlivé cytokiny, jako jsou transformující růstový faktor β (TGF β), IL-1 β a TNF- α , stimulují tvorbu matrix metaloproteináz 1 a -2 (MMP1, -2), které jsou důležité pro chemotaktickou migraci skrze ECM [2]. Invaze MSC je závislá nejen na míře exprese MMP, ale zároveň na vyvážené interakci MMP s metalopeptidázovými inhibitory (TIMP) [11].

1.2.3 DIFERENCIACE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

Řízená diferenciací MSC či zabránění jejich nechtěné diferenciaci je potřebné pro klinické aplikace, jakými je tkáňové inženýrství a regenerativní medicína [13]. Podmínkou pro to, aby mohly být MSC používány pro terapeutické aplikace, je vývoj efektivních, standardizovaných protokolů. Díky těmto postupům je možné MSC indukovat k žádanému typu buněčné diferenciaci [9].

Existuje řada optimalizovaných protokolů pro diferenciaci MSC do osteogenní, chondrogenní a adipogenní buněčné linie. Dále je pomocí těchto protokolů možná diferenciací do endoteliálních a vaskulárních buněk hladkého svalstva [9]. Z tohoto důvodu jsou MSC vhodnými kandidáty pro strategie klinické reparace tkání, například pro lokální reparaci a regeneraci kostí, kloubů a šlach.

1.2.3.1 OSTEOGENNÍ DIFERENCIACE

Při diferenciaci MSC do osteogenní linie dochází ke změně buněčné morfologie. Buňky fibroblastového typu získávají kuboidální morfologii. Klasický diferenciací protokol zahrnuje inkubaci konfluentní vrstvy MSC s přísadkou dexamethasonu,

β -glycerolfosfátu a kyseliny askorbové [9, 29-32]. Samotné bazální medium sice vede ke zvýšené aktivitě alkalické fosfatázy (ALP), ovšem nedochází k mineralizaci ECM a k expresi osteogenních markerů [9].

Dexamethason je syntetický glukokortikoid s vlivem na transkripční aktivitu, například indukuje transkripci kostního sialoproteinu a integrinu $\alpha 5$, což vede k aktivaci na Runx2 závislé genové transkripce. β -glycerol fosfát slouží jako substrát pro ALP, a je tak důležitým zdrojem anorganického fosfátu. Kyselina askorbová je kofaktor v procesu hydroxylace prolinu a lysinu na řetězcích kolagenu. Její přítomnost má tak vliv na vyšší produkci kolagenu. Kyselina askorbová je za kultivačních podmínek poměrně nestálá, a proto se používá stabilní derivát vitamínu C, a sice askorbát-2-fosfát [9].

Mimo užívání standardních diferenciačních médií je možné k buňkám přidávat růstové faktory či hormony. Nejčastěji se přidává vitamín D3, který interaguje s jaderným receptorem pro vitamín D3 a stimuluje tak expresi genů asociovaných s osteogenní diferenciací [33]. Vitamín D3 spolupůsobí s dexamethasonem a kostním morfogenetickým proteinem-2 (BMP-2), ovšem sám o sobě není schopen indukovat mineralizaci ECM. Dále byl prokázán vliv na osteogenní diferenciaci MSC po přidání BMP-2, -4 či -7 [9, 33]. V klinice se v současné době již používá BMP-2, pod názvem INFUSE, a BMP-7, pod názvem OP-1 [34]. Ranou osteogenní diferenciací je také možné stimulovat přidávkem TGF β 1 nebo bFGF [9, 35].

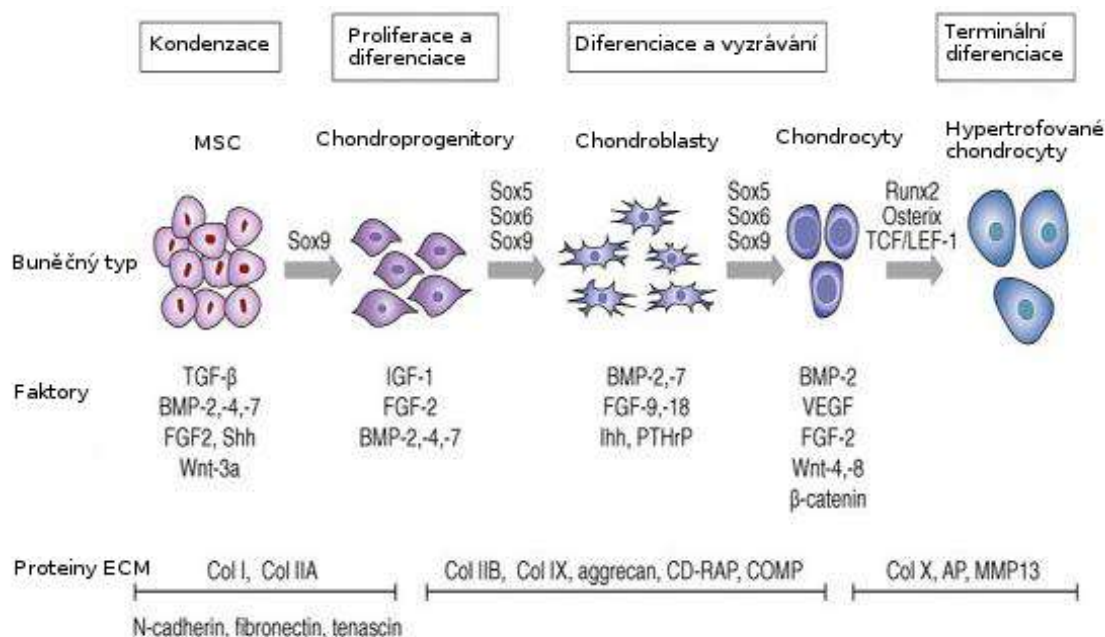
1.2.3.2 CHONDROGENNÍ DIFERENCIACE

Během chondrogenní diference se mění buňky fibroblastového typu na morfologicky velké a kulaté buňky, které jsou hojně obklopeny ECM, skládající se především z kolagenu II, proteoglykanů a glykosaminoglykanů. Při chondrogenní diferenciaci je vyžadován mezibuněčný kontakt a přidání chondrogenních bioaktivních faktorů. Nejúčinnějšími se jeví dexamethason, askorbát-2-fosfát, insulin-transferin-selenium (ITS), pyruvát sodný, TGF β 2 a -3 [9, 30-32].

Dexamethason aktivuje transkripci chondrogenních markerů, především kolagenu II. V kombinaci s TGF β je funkce dexamethasonu podpořena a dochází tak k aktivaci dalších markerů chondrogenní diference, jakými jsou například agrekan či kolagen II [9].

Dále je možné přidat BMP-2, -4, -6 a -7, které spolupůsobí s TGF β , ovšem samy o sobě nejsou dostačující pro indukci chondrogenní diference [31]. Přídavek FGF-1, -2 a IGF-1 také stimuluje expresi chondrogenních markerů. Při diferenciaci

se pak často používají bezsérová média, aby se zabránilo sérem indukované apoptóze. Místo séra se používá na destičky bohatá plazma [9, 36].



Obrázek č. 4: **Posloupnost událostí vedoucí k diferenciaci MSC do chondrocytů:** Časový expresní profil růstových a diferenciačních faktorů je uveden pod jednotlivými stádii chondrogenese. V nejnižší části obrázku jsou pak uvedeny proteiny charakteristické pro jednotlivá stádia chondrogení diferenciaci. TGF β stimuluje chondrogení diferenciaci a produkci ECM, FGF stimuluje proliferaci MSC a má pozitivní vliv v průběhu celého procesu chondrogení diferenciaci. Další diferenciaci se děje pod vlivem IGF-1, který podporuje syntézu proteoglykanů, dále zde působí BMP, řada Sox transkripčních faktorů, RunX2 a Osx. TGF β v pozdních fázích napomáhá hypertrofii chondrocytů. Zkratky: AP znamená alkalická fosfatáza, CD-RAP znamená z chrupavky odvozený protein citlivý na kyselinu retinovou, COMP znamená chrupavkový oligomerní protein. Upraveno podle: [37]

1.2.3.3 ADIPOGENNÍ DIFERENCIACE

Během adipogenní diferenciaci se buňky stávají sférickými a plně konfluentními. Jsou obklopeny ECM skládající se z fibronektinu, lamininu a kolagenu I, III-VI. Při diferenciaci se plně konfluentní buňky kultivují v přítomnosti dexamethasonu, 3-isobutyl-1-methylxantinu, insulinu a indomethacinu. Dále je možné přidávat askorbát-2-fosfát, trijodothyronin a FGF-2 [9, 30, 32].

1.3 FORMACE KOSTI

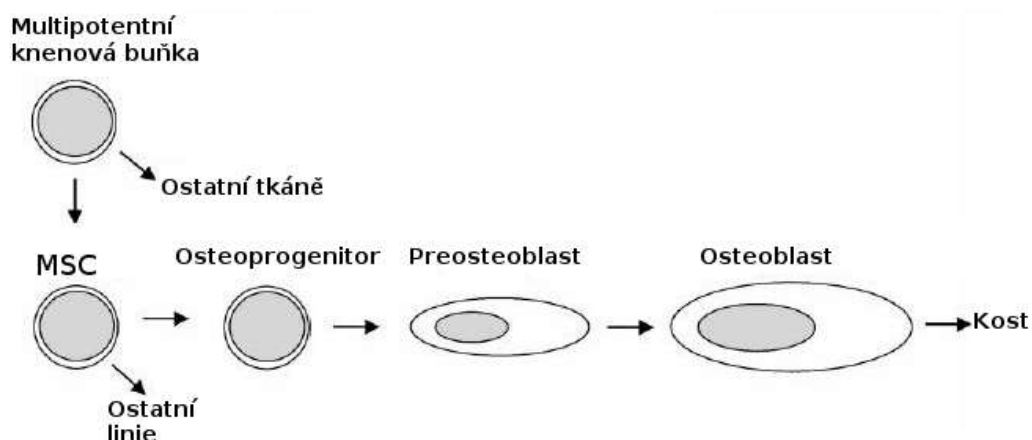
Kost je mineralizovanou pojivovou tkání obratlovců. Dává oporu váze těla, pomáhá pohybu organismu, ochraňuje vnitřní orgány od vnějších sil a udržuje minerální homeostázi. Kostní homeostáze je zajištěna rovnováhou mezi formací a resorpcí kosti, což závisí na osteoblastech a osteoklastech. Kostní masa dramaticky vzrůstá během embryonálního a raného postnatálního vývoje a také v době puberty. Vrcholu dosahuje okolo dvacátého roku života a poté zůstává zhruba konstantní po celý život. Náhlý pokles kostní masy může vést ke zlomeninám [38].

Multipotentní MSC jsou buněčné prekurzory, které dávají vzniknout různým typům buněk mesenchymálního původu. Jedním z nich je osteogenní buněčná linie [10, 39]. Osteoblasty, které z MSC vznikají, formují kost. Fenotyp osteoblastu lze charakterizovat schopností formovat kost, vysokou hladinou exprese ALP, kolagenu I a nekolagenních proteinů, jako například osteonektinu, osteopontinu, kostního sialoproteinu, osteokalcinu a dále schopností reagovat na parathormon [40]. Kolagen I a ALP jsou markery rané diferenciace. Pozdní diferenciace je typická expresí osteokalcinu a mineralizací ECM [41]. Vývoj nezralého osteoblastu do zralého probíhá v několika fázích, které lze označit jako proliferace, dozrávání, syntéza ECM a mineralizace ECM [10].

Celý proces vývoje kosti zahajují osteoprogenitorní buňky odvozené z MSC, viz obrázek č. 5. Tyto buňky jsou vysoce proliferativní a diferencují do preosteoblastů [10, 39, 42, 43]. Nejdůležitějším transkripčním faktorem pro tento přechod je Runt příbuzný transkripční faktor 2 (RunX2) [41]. Preosteoblasty jsou přechodovým stádiem mezi progenitorními buňkami a osteoblasty [42]. V tomto stádiu ještě nedochází k expresi typických markerových genů osteoblastů, jako jsou ALP, osteonektin či osteopontin [42]. Preosteoblasty jsou stále bipotentní buňky, které mají potenciál diferencovat jak do osteoblastů, tak do chondrocytů [41].

Preosteoblasty spolu kondenzují a následně vznikají zralé osteoblasty [10, 42]. V tomto procesu jsou zahrnuty transkripční faktory Osterix (Osx) a RunX2. Množství markerových genů osteoblastů má v promotoru vazebná místa pro tyto transkripční faktory [41]. Funkcí osteoblastů je syntéza nemineralizované kostní ECM nazývané osteoid. Nemineralizovaná ECM se následně stává vysoce mineralizovanou, formuje kost a později funguje v kostní remodelaci a minerálním metabolismu [10, 43]. Nakonec

se osteoblast přemění na osteocyt, který již neprodukuje ECM. Pro celý proces vývoje kosti je třeba přítomnosti řady signálních a transkripčních faktorů a extracelulární signalizace [10, 39].



Obrázek č. 5: **Populace kostních buněk**: Různé typy kostních buněk jsou odvozeny z multipotentních MSC. Proces proliferace a osteogenní diferenciace vede až k deponování nové kosti. Upraveno podle: [42].

Kost se skládá z kostní ECM a kostních buněk. ECM je z 90 % tvořena kolagenem I a zbylých 10 % je složeno z nekolagenních proteinů a z proteoglykanů. Nekolagenní proteiny se podílí na maturaci ECM, její mineralizaci a mohou tak regulovat funkční aktivitu kosti [8]. V kosti se nachází dvě kostní buněčné linie. Jednou z nich jsou buňky formující kost. Mezi ně se řadí osteoblasty, osteocyty a kost lemuující buňky. Kost lemuující buňky zůstávají na povrchu kosti a regulují výměnu minerálních iontů a ponechávají si schopnost rediferenciace do sekretujících osteoblastů. Osteocyty jsou metabolicky pasivní osteoblasty usazené v kostní ECM [39].

Druhou linií jsou buňky resorbující kost, osteoklasty, neboli mnohojaderné kost resorbující buňky. Tyto buňky jsou odvozené z HSC [38, 44]. Osteoklasty spolu s asociovanými buňkami, endoteliálními a nervovými, tvoří specializované jednotky nazývané kostní mnohojaderné jednotky (BMU), jejichž funkcí je remodelace kosti [8].

Existují dva typy mechanismů díky nimž dochází k formaci kostí. Ty se nazývají intramembránová a endochondrální osifikace. Oba procesy jsou zahájeny proliferací a formací kondenzátů z MSC, které předurčují tvar a lokaci budoucí kosti. Během intramembránové osifikace dochází k přímé diferenciaci MSC do osteoblastů [41, 44-46]. V průběhu vývoje se tento typ objevuje hlavně v oblasti hlavy [46]. Naopak vývoj dlouhých kostí a proces regenerace kostí se děje procesem zvaným endochondrální osifikace [41, 44, 45]. Tento mechanismus je využíván jak v době fetálního, tak v době postnatálního růstu [45, 47].

1.3.1 ENDOCHONDRÁLNÍ OSIFIKACE

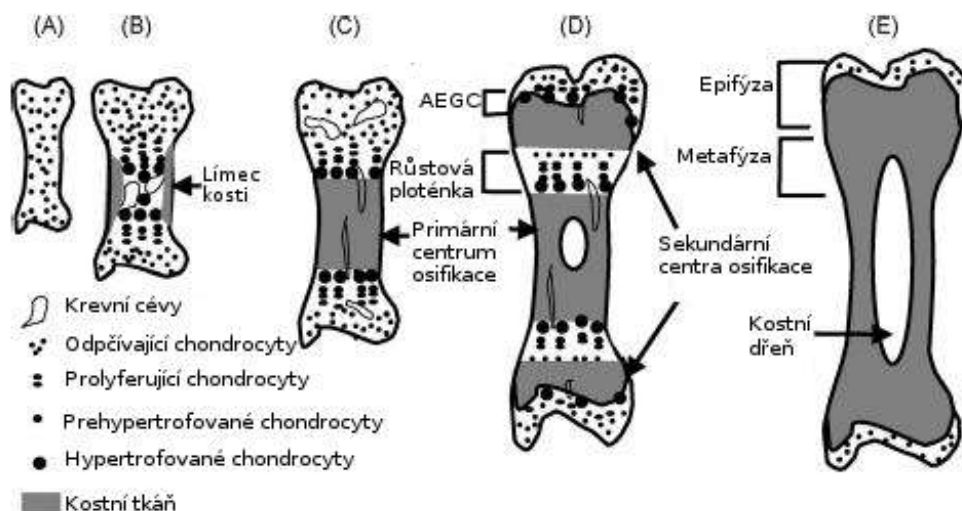
Endochondrální osifikace je zahájena diferenciací MSC do proliferujících chondrocytů, viz obrázek č. 6. Dochází tak k formaci výchozí chrupavčité předlohy neboli růstové chrupavky [45, 46]. V centru růstové chrupavky chondrocyty dále diferencují do hypertrofovaných chondrocytů [39, 45]. V momentě, kdy začínají chondrocyty podstupovat hypertrofii, MSC v perichondriu, tedy okolo hypertrofovaných chondrocytů, diferencují do osteoblastů a formují strukturu zvanou límec kostní tkáň [44, 45, 48].

Dalším krokem je invaze krevních cév [45]. Ta je zahájena procesem obklopování plně diferencovaných, hypertrofovaných chondrocytů zvápenatělou ECM. Tato mineralizovaná ECM přispívá s pomocí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) k vaskulární invazi z kostního límce. Tento proces je důležitý ze dvou důvodů. Za prvé jsou do místa hypertrofovaných chondrocytů dodávány chondroklasty, které napomáhají degradovat okolní ECM, a za druhé jsou sem dopravovány progenitory osteoblastů. Progenitory se do centra budoucího kostního elementu dostávají z cév, skrze kanálky vytvořené osteoklasty v kostním límci. Kolagenní ECM bohatá na kolagen X je nahrazována kostní ECM, bohatou na kolagen I [44].

Nejprve dochází k invazi cév ve středové části, tím se formuje primární centrum osifikace, které se ustanovuje jako první. Jeho expanzi řídí růstová ploténka [46, 47]. Tato avaskulární struktura obklopuje primární centrum osifikace na obou stranách expandující kosti. Uvnitř růstové ploténky se nachází množství subpopulací chondrocytů [44]. Zóna nejdále od hranice probíhající osifikace je zóna takzvaných odpočívajících chondrocytů. Přilehlá zóna je zónou proliferace. Zde dochází k syntéze ECM bohaté na kolagen II. Následně se z kulatých proliferujících chondrocytů stávají buňky morfologicky zploštělé, jelikož začínají tvořit vícebuněčné klastry. Tyto chondrocyty jsou prehypertrofované. V jejich ECM začíná ubývat kolagenu II [44, 47].

Následuje zóna, kde po proliferaci chondrocyty prodělávají změnu a stávají se hypertrofovanými [47]. Chondrocyty podstupující hypertrofii zvyšují dramaticky svůj objem a ve stejném čase sekretují ECM bohatou na kolagen X. Kolagen II již exprimován není. Tyto děje způsobují prodlužování kostí [44, 47]. Hypertrofované chondrocyty také syntetizují VEGF [44].

Druhá oblast v pořadí, kam prorůstají cévy, jsou okraje kosti. Zde vznikají sekundární centra osifikace [46]. Jejich expanzi řídí kloubní epifyzální růstová chrupavka [47].



Obrázek č. 6: **Proces endochondrální osifikace:** V procesu endochondrální osifikace je chrupavčitý templát postupně nahrazen kostní tkání. (A) Chrupavčitý model (B) Formace primárního centra osifikace: Krevní cévy a hypertrofovaná chrupavka jsou v místě budoucího centra osifikace stále přítomny. (C) Založení primárního centra osifikace: Krevní cévy jsou přítomny v chrupavčitých kanálech v okolí centra. (D) Formace sekundárního centra osifikace: Zformovaná sekundární centra osifikace jsou oddělena od primárního centra růstovou ploténkou, která je zodpovědná za podélný růst kosti. Kloubní epifyzální růstová chrupavka (AEGC) zůstává pod permanentní kloubní chrupavkou a je zodpovědná za růst a tvarování epifýzy. (E) U dospělého jedince dochází k fúzi metafýzy s epifýzou, což vede k vymizení růstové ploténky. AEGC je nahrazena kostí a jediná chrupavka, která zůstává, je permanentní kloubní chrupavka na obou koncích kosti. Upraveno podle: [47].

Hypertrofované chondrocyty následně odumírají [41, 47]. Mnoho autorů popisuje, že se tak děje na základě zlomů deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a tedy, že umírají procesem apoptózy. Jiné studie zkoumající definitivní morfologii hypertrofovaných chondrocytů uvádějí, že k smrti dochází procesem autofagie. Následkem odumírání hypertrofovaných chondrocytů vznikají struktury z ECM, tak zvaná příčná a podélná chrupavčitá septa. Příčná septa jsou pomocí proteináz degradována a vertikální septa jsou zanechána neporušena. Tato degradace umožňuje vstup invadujících buněk krevních cév, osteoklastů a buněk kostní dřevě. Osteoklasty napomáhají dalšímu odebírání chrupavčité matrix a diferencující osteoblasty užívají zbývající ECM jakožto podklad pro depozici kostní ECM [47].

V pubertě se frontální strany osifikace primárního a sekundárního centra protahují přes růstovou ploténku, která se nachází mezi nimi. Tento proces vede k fúzi zformované kosti v primárním centru osifikace, v oblasti metafýzy, se zformovanou kostí v sekundárním centru osifikace, tedy s epifýzou [44, 46]. Celý proces se nazývá epifyzální fúze [47].

Proces endochondrální diferenciaci je neobvyklý, jelikož zahrnuje postupné nahrazování dočasné struktury za strukturu permanentní, která je vhodnější z hlediska mechanických požadavků dospělého jedince. Navíc tato organogeneze přetrvává

až do zakončení růstu [47]. Dočasná chrupavčitá předloha je pro celý proces důležitá především proto, že zajišťuje mechanicky stabilní předlohu a umožňuje podélný růst kostí [44].

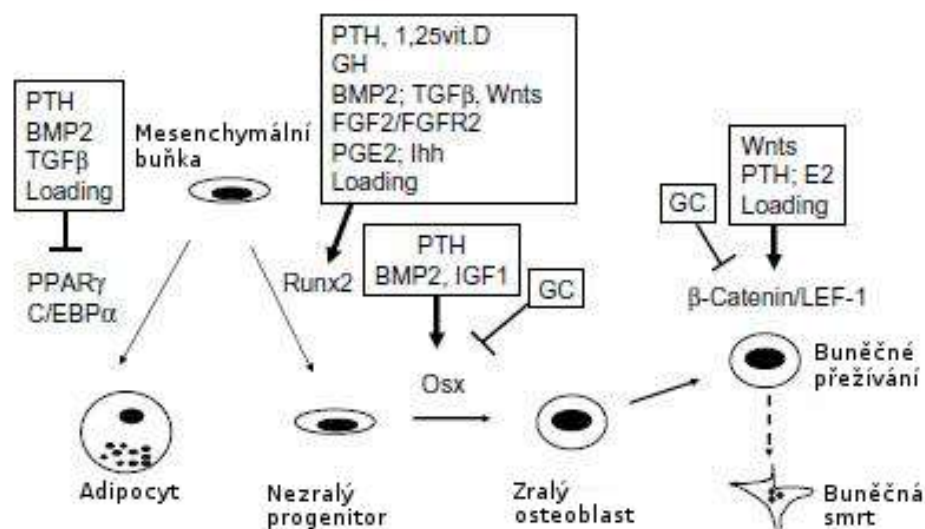
1.3.2 ZRÁNÍ A DIFERENCIACE OSTEOLASTŮ

Proces diferenciaci a zrání osteoblastů je přísně regulován. V jeho průběhu progenitory osteoblastů v mesenchymálních kondenzátech jak při endochondrální, tak při intramembránové osifikaci, diferencují nejprve do preosteoblastů a následně do osteoblastů [41]. Tato diferenciaci je po celou dobu řízena transkripčními faktory, jejichž exprese je pod vlivem hormonálních a růstových faktorů. Funkcí transkripčních faktorů je regulace exprese genů a získání fenotypu osteoblastů. Aktivace a funkce různých typů faktorů v průběhu diferenciaci osteoblastů je řízena koordinovanými komplexními procesy [43].

1.3.2.1 TRANSKRIPČNÍ FAKTORY

Proteiny podílející se na iniciaci transkripce se nazývají transkripční faktory. Je pro ně typická silná vazba na DNA, přítomnost domény aktivující transkripci a lokalizaci v jádře [41]. Transkripční mechanismy zahrnují víceúrovňovou kontrolu osteogeneze, což zahrnuje interakce transkripčních faktorů s DNA. Dále interakci transkripčních faktorů s proteiny ovlivňujícími jejich lokalizaci do promotoru genů, což vede ke změnám v architektuře chromatinu. V neposlední řadě je aktivita transkripčních faktorů fyzicky regulována skrze posttranslační modifikace [49].

Indukce diferenciaci osteoblastů probíhá zejména pod kontrolou transkripčních faktorů RunX2, Osx, méně distálního homeobox 5 proteinu (Dlx5), Msh homeobox 2 proteinu (Msx2) a Twist [42, 43]. Koordinovaná aktivita těchto transkripčních faktorů vede k expresi genů charakteristických pro diferenciaci a funkci osteoblastů, viz obrázek č. 7. To zahrnuje geny pro ALP, kolagen I, osteokalcin, osteopontin, osteonektin a kostní sialoprotein, které jsou v průběhu osteogeneze postupně exprimovány [50].



Obrázek č. 7: **Diferenciace osteoblastů pod kontrolou transkripčních faktorů:** Diferenciace osteoblastů je zahájena diferenciací MSC do osteoprogenitorních buněk. Ty následně diferencují do nezralých preosteoblastů, které poté vyzrávají a exprimují geny typické pro osteoblasty. Proces diferenciace je zakončen stádiem osteocytu či buněčnou smrtí. Rada transkripčních faktorů, jako je RunX2 či Osx, koordinují proces diferenciace v čase a místě. Samy transkripční faktory jsou úzce regulovány množstvím hormonů, lokálních a externích faktorů, které působí na jejich aktivaci či represi, a tím ovlivňují buněčnou diferenciaci a přežívání. Upraveno podle: [43].

RunX2

RunX2, někdy také nazývaný kóre vazebný faktor $\alpha 1$ (Cbfa1), je transkripční faktor z rodiny runt, který je důležitý pro ranou diferenciaci osteoblastů [39, 42, 43, 45]. Vykazuje mnoho různých regulačních funkcí jako aktivaci či represi genové exprese a integraci biologických signálů z vývojových podnětů, jako jsou BMP, TGF β , Wnt a Src signální dráhy [49]. MSC exprimují RunX2 na začátku vývoje kostí. RunX2 je přítomen v osteoblastech v průběhu jejich diferenciace [42]. Po dobu diferenciace se jeho množství zvyšuje, pokles v koncentraci nastává až v momentě dozrávání osteoblastů [49]. RunX2 kontroluje formaci kostí během jejich vývoje, ale také v průběhu postnatálního života [42, 43]. Během buněčného dělení je většina transkripčních faktorů degradována v průběhu mitózy. Procento RunX2 ovšem degradováno není, ale interaguje s kondenzovanými mitotickými chromozómy, nejspíše s oblastmi genů asociovaných s diferenciací osteoblastů. To napovídá tomu, že RunX2 je důležitý pro postmitotickou transkripční kontrolu [49].

RunX2 je součástí heterodimerního transkripčního faktoru, je jeho α podjednotkou. RunX1 a RunX3 jsou další typy α podjednotek. Podjednotka α nese runt doménu potřebnou pro vazbu na DNA a také pro heterodimerizaci s β podjednotkou. β podjednotka je pouze jedna a jmenuje se kóre vazebný faktor β (Cbf β) [41, 43].

Fosforylace na serinu 104 u RunX2 vede k inhibici heterodimerizace s Cbfb, a tím i k inhibici jeho transkripční aktivity [41].

C-terminální doména RunX2 nese signální značku, targetovací signál do jaderné matrix [41]. Toto targetování je důležitým rysem pro správné fungování RunX2. Lokalizace RunX2 do různých jaderných mikroprostředí znamená možnost formovat multimerní komplexy se specifickými koregulátory, což má rozdílný vliv na promotory genů v daném místě. RunX proteiny jsou důležité proteiny sloužící jako lešení. Interagují s mnoha třídami koregulačních proteinů, což poskytuje RunX faktorům kompetenci k fungování jakožto hlavní přepínače v průběhu buněčné diferenciaci [49].

RunX2 se váže na RunX konsenzus sekvenci (PuACCPuCA) nazývanou osteoblastický specifický element 2 (OSE2). Tento regulační element lze nalézt v promotoru u všech hlavních genů důležitých pro navození fenotypu osteoblastů, což zahrnuje řetězec α kolagenu I, osteopontin, osteokalcin a kostní sialoprotein [39, 43, 49].

RunX2 je klíčový osteogenní transkripční faktor, je jedním z prvních, který řídí diferenciaci MSC do osteoblastů. Funguje dříve než Osx či Dlx5 [38]. RunX2 moduluje funkci několika kináz. Jednou z nich je p85 fosfatidyl inozitolová 3 kináza (PI3K), která kontroluje přežívání a diferenciaci osteoblastů. Dalším mechanismem působení RunX2 je kontrola transkripční aktivity genů pomocí balancování mezi acetylovaným a deacetylovaným stavem chromatinu. RunX2 tedy interaguje s histon acetyl transferázami (HAT), jako jsou například p300/creb vazebný protein (p300/CBP) či monocytický leukemický protein zinkového prstu (MOZ) a monocytický leukemický faktor příbuzný proteinu zinkového prstu (MORF). Interakce RunX2 s histon deacetylázami (HDAC) negativně reguluje diferenciaci osteoblastů, například HDAC3 interaguje s N-koncem RunX2, HDAC6 interaguje s C-koncem RunX2, HDAC4 reprimuje aktivitu RunX2 v průběhu endochondrální osifikace [43, 49].

Vazba TGF β 1 či BMP-2 na specifické receptory aktivuje Smad. Smad1, -3 a -5 interagují s RunX2 a zvyšují jeho transkripční aktivitu [41, 43]. Pro tuto interakci je důležitá fosforylace RunX2. Komplexy Smad s RunX2 jsou schopné vazby na DNA ve vazebných místech pro RunX2, ale i pro Smad. Pouze Smad aktivované z BMP signalizace vedou k diferenciaci osteoblastů. Smad-RunX interakce v odpovědi na signalizaci TGF β vede k represí osteoblastogeneze a také k represí genové exprese osteokalcinu [49].

RunX2 negativně ovlivňuje terminální diferenciaci osteoblastů a zanechává osteoblasty v nezralém stavu [43]. Exprese RunX2 je tedy v pozdních stádiích vyžívání osteoblastů snižována, a to v momentě, kdy ze zralých osteoblastů vzniká zralá kost [39]. RunX2 dále negativně reguluje proliferaci osteoblastů, jelikož reguluje buněčný cyklus, napomáhá jeho ukončení [43]. Geny pro inhibitory cyklin dependentních kináz (CDKI) p21 a p27 jsou cíle RunX2. Zvýšená koncentrace CDKI vede k inhibici postupu do syntetické fáze buněčného cyklu (S fáze), a tím je podpořen konec buněčného cyklu [49].

RunX2 je velmi důležitý pro osteoblastogenezi a jeho exprese je tedy pod kontrolou mnoha transkripčních faktorů. Jedním z nich je homeobox A2 protein (Hoxa-2), člen rodiny transkripčních faktorů s Hox homeodoménou. Hoxa-2 inhibuje expresi RunX2. Speciální protein vázající AT bohaté sekvence (SATB2) je protein nacházející se v jaderné matrix, reprimuje Hoxa-2 expresi, a tím aktivuje RunX2 dependentní diferenciaci. Signální transduktor a aktivátor transkripce 2 (Stat2) a Sox9 interagují s RunX2 a snižují jeho transkripční aktivitu [43]. Stat1 vyvazuje RunX2 v cytoplasmě, čímž snižuje jeho množství v jádře [49]. Sox8 reprimuje expresi RunX2 a je negativním regulátorem diferenciaci osteoblastů. Aj8, myeloidní Elf-1 podobný faktor (MEF), lymfoidní enhancer vazebný faktor 1 (LEF1), Twist, receptor aktivovaný proliferátory peroxizómů γ (PPAR γ), Msx2 a jaderný faktor odvozený z erythroidu 2 (Nrf2) také reprimují RunX2 aktivitu [38, 43, 49].

RunX2 může být aktivován díky fosforylaci od mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) po vazbě $\alpha 2\beta 1$ integrinu na kolagen I [43, 49]. FGF-2 zvyšuje fosforylaci MAPK1 a -3, což následně zvyšuje fosforylaci RunX2 [41]. Tumor supresorový protein p53 negativně reguluje RunX2 aktivitu. RunX2 aktivita je dále pozitivně regulována retinoblastomovým proteinem (Rb), tafazzinovým proteinem (TAZ), Hoxa-10, bagpipe homeoboxovým proteinem 1 (Bapx-1) a Indian hedgehogem (Ihh) [39, 43, 44]. TAZ přímo interaguje s RunX2 a koaktivuje RunX2 dependentní genovou transkripci. Signalizace aktivní nerekceptorové kinázy Src negativně ovlivňuje diferenciaci osteoblastů, jelikož Yes asociovaný protein (YAP), adaptorový protein Src signalizace, se váže na jadernou doménu RunX2, a brání tak expresi RunX2 regulovaných genů [49].

RunX2 je možno regulovat i na úrovni proteinové stability [43, 49]. Cyklická adenosin monofosfátová (cAMP) dráha snižuje koncentraci RunX2 v osteoblastech. Tento efekt je zprostředkován jeho proteolytickou degradací díky ubiquitinilaci [41].

Na základě signalizace TGF β Smad specifická E3 ubiquitin ligáza (Smurf1) interaguje s C-terminálním koncem RunX2, a tím je podpořena jeho degradace proteazómem [43, 49, 51].

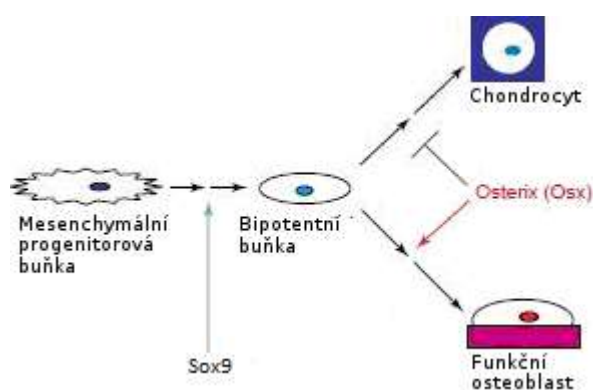
RunX2 je hlavním transkripčním faktorem v regulaci genové exprese v průběhu diferenciace osteoblastů. Je regulován na mnoha úrovních, aby byla zajištěna jeho správná exprese a funkce, a tím i správná osteoblastogeneze. Obecně RunX2 reaguje s mnoha regulačními proteiny v jádře. To vede k aktivaci či represi genů kontrolujících přežívání a diferenciaci osteoblastů [43].

Osterix

Osx je transkripční faktor exprimovaný v progenitorech osteoblastů. Má vliv na diferenciaci preosteoblastů do zralých osteoblastů a na proliferaci progenitorních buněk [43, 44]. Nachází se až po působení RunX2, který ho pozitivně ovlivňuje [41, 49].

Osx je negativním regulátorem Sox9, a tím i negativním regulátorem procesu chondrogenese. Sox9 je transkripční faktor nutný pro ustavení osteochondroprogenitoru. Jakmile je však chondrogenní mesenchymální kondenzát zajištěn, pak již Sox9 není dále pro navození buněčné linie osteoblastů potřebný [41]. Osx má tedy funkci v mechanismu, který odděluje buněčné linie osteoblastů a chondrocytů ze společného osteochondroprogenitoru, viz obrázek č. 8 [38].

Regulace Osx je zatím málo prozkoumána, ví se však, že p53 reprimuje transkripci Osx, a tím p53 zabraňuje osteoblastogenezi [43]. V pozdějších stádiích Osx inhibuje diferenciaci osteoblastů [39].



Obrázek č. 8: **Působení Osx při segregaci osteoblastů a chondrocytů:** Prekurzorová buňka, osteochondroprogenitor, je bipotentní buňka exprimující RunX2 a Sox9. Osx je negativním regulátorem Sox9, a tedy prekurzorové buňky v přítomnosti Osx diferencují do osteoblastů a ne do chondrocytů. Upraveno podle: [41].

β-katenin

Kanonická neboli Wnt/β-kateninová signální dráha je důležitá pro osteoblastogenezi. Tato dráha kontroluje stabilitu β-kateninu, což je transkripční faktor kanonické Wnt dráhy [43, 45]. V kanonické dráze dochází k navázání Wnt ligandu na Frizzled receptor a na koreceptor nazývaný LDL receptoru příbuzný protein 5 a 6 (LRP5/6) [43]. Tato signalizace vede k inaktivaci multiproteinového komplexu složeného z β-kateninu, glykogen syntázy kinázy-3β (GSK3β), kasein kinázy, anafázi podporujícího komplexu (APC) a axinu. Výsledkem je stabilní β-katenin, který může být importován do jádra. V jádře β-katenin nahrazuje korepresor T buněčného faktoru/lymfoid podporujícího faktoru (TCF/LEF). Vzniká aktivní komplex, který targetuje promotory genů a vede k zahájení transkripce [49]. Kanonická Wnt dráha je aktivnější v osteogenních mesenchymálních kondenzátech. V nepřítomnosti Wnt ligandu je β-katenin fosforylován, a tím označen pro degradaci [45].

β-katenin je důležitý pro diferenciaci osteoblastů. Jeden z cílů Wnt signalizace je RunX2, jelikož β-katenin/TCF/LEF podporují jeho expresi a aktivitu [43]. Ovšem v plně diferencovaném osteoblastu LEF-1 interaguje s RunX2 a tím negativně reguluje jeho transkripční aktivitu vzhledem k cílovým genům [49].

Transkripční faktory homeobox rodiny

Také některé transkripční faktory z rodiny proteinů s homeodoménou hrají důležitou roli při diferenciaci osteoblastů [43]. Proteiny, které jsou přímo regulovány proteiny s homeodoménou v procesu diferenciaci osteoblastů, jsou kolagen, osteopontin, ALP, kostní sialoprotein, osteokalcin, RunX2 či Osx. Mezi proteiny s homeodoménou s vlivem na diferenciaci osteoblastů se řadí například Msx1 a -2, Dlx3, -5, -6 [41-43, 49]. Tyto transkripční faktory se váží do promotorů osteogenních genů, kde je jejich funkcí represe nebo aktivace transkripce. Proteiny s homeodoménou jsou důležité pro normální průběh osifikace [43].

Bylo zjištěno, že Msx2 má jak pozitivní, tak negativní vliv na diferenciaci osteoblastů, a to v závislosti na buněčném fenotypu a cílovém genu, který ovlivňuje. Msx2 je exprimován hlavně v osteoprogenitorech. Během diferenciaci je jeho koncentrace snižována. Msx2 podporuje proliferaci a diferenciaci osteoblastů, ale inhibuje RunX2 aktivitu a expresi genů typických pro osteoblasty ve vyzářejších osteoblastech [38, 43, 49]. K této inhibici dochází díky tomu, že spolu RunX2 a Msx2 vytváří komplex, který je neaktivní. Dále je antagonistou k Dlx5 v průběhu diferenciaci

osteoblastů. Tyto transkripční faktory spolu kompetují o vazbu na promotory genů osteokalcinu či ALP. Tyto dva proteiny spolu také mohou tvořit komplex, který maskuje DNA vazebnou sekvenci, což vede k inaktivaci obou transkripčních faktorů [38].

Dlx3 a Dlx5 jsou exprimovány ve všech fázích diferenciaci osteoblastů. Jejich exprese se zvyšuje ve zralých osteoblastech [38, 43]. Dlx3 má komplexní roli, jelikož má jak pozitivní, tak negativní vliv na genovou transkripci osteokalcinu [43]. RunX2 je prvotním regulátorem genové transkripce při diferenciaci osteoblastů a funguje dřív než Dlx5. Ovšem BMP-2 indukovaná signální dráha aktivuje Dlx5, který je v tomto případě regulátorem RunX2 a Osx. Tato signální dráha je menšinovou při diferenciaci osteoblastů a objevuje se až v pozdějším stádiu diferenciaci [38]. Dlx5 dále aktivuje expresi osteokalcinu a kostního sialoproteinu [43].

Helix-loop-helix proteiny

Pro správnou indukci genů typických pro fenotyp osteoblastů je třeba snížení aktivity řady negativních transkripčních faktorů v průběhu procesu formace kostí. Helix-loop-helix proteiny Twist a DNA vazebný proteinový inhibitor (Id) jsou exprimovány v osteoblastech v průběhu proliferativní fáze [41, 43].

Twist je zahrnut v diferenciaci mesodermu, je exprimován v osteoprogenitorních buňkách a interaguje s RunX2, má vliv na jeho umlčení [41, 49]. Dále Twist například kontroluje expresi RunX2 a RunX2 závislých genů v osteoblastech stejně jako jejich proliferaci a přežívání [43]. Je negativním regulátorem formace kostí, jelikož vykazuje inhibiční efekt na diferenciaci a proliferaci osteoblastů [41, 49]. RunX2 exprese je asociována se sníženou koncentrací Twist [43].

Další transkripční faktory

Aktivační protein 1 (AP-1) je transkripční faktor složený z heterodimeru proteinů z rodiny Fos a Jun (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2; c-Jun, JunB, JunD) [43]. Je důležitým regulátorem v průběhu formace kostí, má vliv i na proliferaci osteoblastů [41, 43, 49]. Mimo přímého efektu na geny osteoblastů mohou některé členy z AP-1 interagovat s dalšími transkripčními faktory. Například Jun proteiny mohou tvořit heterodimery s proteiny odpovědnými za vazbu cAMP elementu (CRE), a tím regulovat genovou expresi [43].

CRE vazebný protein 2 (CREB2) neboli aktivační transkripční faktor 4 (ATF4) je dalším transkripčním faktorem kontrolujícím osteoblasty. CREB2 interaguje s RunX2, a tím reguluje transkripční aktivitu osteokalcinu [43, 49]. CREB2 působí v pozdní fázi

zrání osteoblastů [49]. Specifický protein 3 (Sp3) je transkripční faktor důležitý při pozdním vývoji kostí [41].

Další transkripční faktor zahrnutý v diferenciaci MSC do osteoblastů je PPAR γ 2. Jeho zvýšená exprese však podporuje v MSC adipogenezi a redukuje diferenciaci do osteoblastů. PPAR γ 2 se váže na RunX2, tím je inhibována jeho transkripční aktivita [43, 49]. TAZ, transkripční aktivátor RunX2, inhibuje PPAR γ 2, což vysvětluje jeho pozitivní efekt na diferenciaci do osteoblastů spíše než do adipocytů [43].

CCAAT enhancerový vazebný protein (C/EBP) je transkripční faktor regulující expresi genů kritických pro diferenciaci adipocytů a osteoblastů. C/EBP δ moduluje expresi a aktivitu růstových faktorů a jejich receptorů zahrnutých v procesu diferenciaci osteoblastů. C/EBP δ a C/EBP β například aktivují genovou transkripci osteokalcinu [43, 49].

1.3.2.2 HORMONÁLNÍ FAKTORY

Expresi a aktivita transkripčních faktorů v průběhu osteoblastogeneze je regulována některými hormonálními faktory. Například parathormon, estrogen, glukokortikoidy nebo vitamín D podporují osteoblastogenezi díky aktivaci RunX2. Dále aktivují Wnt/ β -kateninem zprostředkované přežívání osteoblastů [43]. Zároveň RunX2 pozitivně reguluje aktivitu estrogenu [49].

Parathormon reguluje remodelaci kosti díky organizaci signalizace lokálních faktorů, jako jsou TGF β , BMP, Wnt a IGF-1 [52, 53]. Během interakce parathormonu s TGF β signální dráhou indukuje parathormon rekrutaci TGF β receptoru typu II jakožto endocytického aktivátoru. TGF β receptor typu II fosforyluje cytoplazmatickou doménu parathyroidního hormonového receptoru typu I (PTH1R), a usnadňuje tak parathormonem indukovanou endocytózu celého komplexu PTH1R a TGF β receptoru typu II. Parathormon dále stimuluje determinaci buněčné linie směrem do osteoblastů díky zesílení BMP a Wnt signalizace [52]. To vede jak k fosforylaci a aktivaci RunX2, tak ke zvýšené expresi Osx a redukci exprese PPAR γ 2 v osteoprogenitorních buňkách. Parathormon také z části inhibuje proteazomální degradaci RunX2 [43].

Vitamín D zvyšuje expresi RunX2 a snižuje expresi PPAR γ 2 [43]. Mechanismus podpory transkripce osteokalcinu funguje na základě formace multimerního komplexu RunX2 s p300, nezávisle na jeho histon acetyltransferázové aktivitě, a formuje tak multimerní komplex s receptorem pro vitamín D a s p300/CBP asociovaným faktorem

(P/CAF), který má histon acetyltransferázovou aktivitu. Tento multimerní komplex vede k remodelaci chromatinu [49].

1.3.2.3 RŮSTOVÉ FAKTORY

Kromě hormonálních faktorů ovlivňují osteoblastogenezi také růstové faktory. Nejvíce růstových faktorů má vliv na tento proces prostřednictvím regulace aktivity a exprese transkripčních faktorů [43].

Rodina Transformujících růstových faktorů β

TGF β rodina se skládá z více než čtyřiceti členů. Jsou jimi například izoformy TGF β 1, -2, -3 nebo strukturně podobné proteiny BMP, aktiviny či anti-Müllerian hormon (AMH) [39, 42, 52]. TGF β receptory jsou transmembránové proteiny typu I a II s vnitřní serin/threonin kinázovou aktivitou. Vazba TGF β ligandu, což je dimer, způsobuje asociaci receptorů typu I a II [51, 54]. Receptor typu II fosforyluje receptor typu I. Fosforylace vede k aktivaci kinázové domény receptoru [38, 54].

Aktivovaný receptor typu I dále aktivuje intracelulární mediátory [51]. Těmito mediátory jsou receptory regulované Smad (R-Smad), konkrétně Smad1, -2, -3, -5 a -8. R-Smad jsou fosforylovány na C-konci. Tato fosforylace vede k jejich vypuštění z komplexu Smad kotvícího proteinu (SARA), což je protein, který ukotvuje Smad v membráně [49, 54]. Fosforylovaný R-Smad pak tvoří heteromerní komplex s koaktivčním Smad (Co-Smad), jediným členem je Smad-4. Tento komplex je translokován do jádra, kde asociuje s transkripčními aktivátory či korepresory [51, 54]. Smad6 a -7 patří do skupiny inhibičních Smad (I-Smad). Ty potlačují efekt R-Smad a působí antagonisticky na TGF β signalizaci [54]. TGF β /BMP indukuje aktivaci dalších signálních drah, v nichž jsou aktivovány kinázy, například MAPK, protein kináza C (PKC), jun NH₂ terminální kináza (JNK), p38. Tyto kinázy také přispívají k fosforylaci Smad a k aktivaci fenotypu osteoblastů [38, 49, 51, 54].

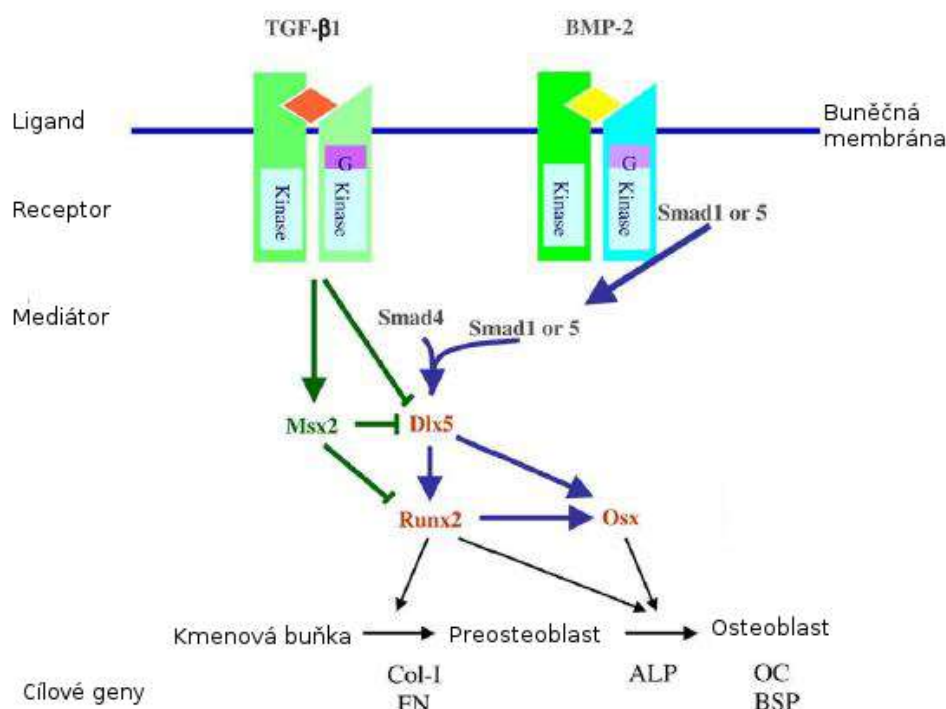
TGF β signalizace je kontrolována na různých úrovních. Existují antagonisté TGF β ligandu, kteří tento ligand váží a zabraňují tak jeho vazbě na receptor. Příkladem je Noggin, který se váže na BMP-2, -4 a -7 či Sklerostin, který se váže na BMP-5, -6 a -7 [51]. Smad6 se váže na TGF β receptor typu I a tato vazba zabraňuje vazbě ligandu a fosforylaci receptoru. Exprese Smad6 je regulována BMP signalizací, konkrétně má v promotoru vazebná místa pro Smad1 a Smad5. Antiproliferativní protein Tob se váže na Smad1 a -5, tím inhibuje jejich funkci. Smurf1 ubiquitin ligáza se váže na Smad1 a -5, a zprostředkovává tak jejich degradaci [51, 54].

BMP signalizace je hlavní signální dráhou indukující diferenciaci osteoblastů. BMP-2, -4 a -7 mají schopnost indukovat nezralé buňky k diferenciaci do osteoblastů [39, 49]. Tato signalizace aktivuje Smad1, -5 a -8 [51, 54]. Cílové molekuly této signalizace jsou například geny transkripčních faktorů s homeodoménou či helix-loop-helix proteinů a nebo Osx a RunX2. Konkrétně například BMP-2 podporuje RunX2 expresi v osteoprogenitorech a osteoblastech, dále podporuje expresi Osx a Dlx5 v osteoblastech, viz obrázek č. 9 [38, 43, 49]. BMP-7 indukuje expresi RunX2 [39].

Smad1 a -5 interagují s RunX2 a spolu s ním aktivují transkripci genů, například kolagenu X. Smad1 interaguje s homeobox C8 proteinem (Hoxc8) a aktivuje transkripci genu pro osteopontin. Smad6 heterodimerizuje s Hoxc8 a reprimuje BMP-2 indukovanou genovou transkripci [51].

TGFβ1 signalizace, během endochondrální osifikace, podporuje chondrogenezi a také proliferaci a ranou diferenciaci osteoblastů [41, 42, 44]. TGFβ1 podporuje formaci kosti díky zvýšení exprese RunX2 a snížení exprese PPARγ2 [38, 43, 55]. Pozdější diferenciaci osteoblastů naopak inhibuje [38]. Výsledkem TGFβ1 signalizace je fosforylace a aktivace Smad2 a -3, které interagují s RunX2 a tato interakce má za následek represí osteoblastogeneze [49, 54, 55]. Dlx5 je cílem negativní regulace TGFβ1 signalizace. TGFβ1 stimulovanými molekulami jsou dále AP-1 a Msx2 [38].

TGFβ je syntetizován a sekretován v kostní kultuře, kde stimuluje růst kostních buněk, je zahrnut v kostní reabsorpci a remodelaci. TGFβ je přítomen v kosti jakožto latentní komplex v ECM [42]. Sekretovaný TGFβ tvoří homodimer, který interaguje se dvěma polypeptidy, s latentním TGFβ vazebným proteinem (LTBP) a s latentním asociovaným proteinem (LAP). Po této interakci se formuje komplex nazývaný velký latentní komplex (LLC). Tímto způsobem je maskováno vazebné místo pro TGFβ receptor a TGFβ ligand je tak neaktivní. Aktivace TGFβ se děje díky proteolytickému štěpení LLC, například pomocí MMP [52]. LLC je aktivován i kyselým prostředím produkovaným osteoklasty. Zvyšující se reabsorbce kosti vede ke zvyšujícímu se uvolňování a aktivaci TGFβ1, který následně stimuluje migraci MSC, které formují kost na místě resorpce [42, 52].



Obrázek č. 9: **BMP-2 indukovaná diferenciace osteoblastů:** RunX2 je transkripční faktor aktivovaný v raném stádiu embryonálního vývoje kosti. Ovšem při BMP-2 indukované osteogenezi je nejprve aktivován Dlx5, který následně reguluje transkripční faktory RunX2 a Osx. Tyto transkripční faktory poté nezávisle na sobě či v kooperaci stimulují expresi osteogenních genů, jako je kolagen I, ALP či osteokalcin. Signalizace indukovaná ligandem TGFβ1 vede k represi RunX2 a k negativní regulaci Dlx5. Zkratky: OC znamená osteokalcin, BSP znamená kostní sialoprotein, FN znamená fibronectin. Upraveno podle: [38].

Wnt

Expresí Wnt během vývoje skeletu je klíčovou signalizací při regulaci diferenciace chondrocytů a osteoblastů [41, 45]. Wnt jsou sekretované molekuly. Těchto ligandů je ve Wnt signalizaci zahrnuto nejméně 19 [45]. Wnt signalizace se uskutečňuje prostřednictvím třech různých drah. První z nich je kanonická Wnt/β-kateninová dráha, dále planární polarita buňky a v poslední řadě je to Wnt/vápníková dráha [49].

Interakce některých Wnt proteinů s Frizzled a LRP5/6 koreceptory vede k inhibici GSK-3 mediované fosforylaci β-kateninu [43, 49]. To vede k akumulaci β-kateninu a jeho translokaci do jádra. Zde se váže na TCF/LEF transkripční faktory a aktivují se tak cíle této signalizace [43, 45]. V procesu endochondrální osifikace je kanonická Wnt signalizace důležitým přepínacím mechanismem, jelikož podporuje zrání hypertrofovaných chondrocytů a formaci kosti. Wnt signalizace je na mnoha místech pod kontrolou antagonistů této dráhy [49].

Blokace navázání Wnt ligandu na Frizzled receptor se děje díky antagonistům jako jsou sekretované proteiny podobné frizzled proteinu, Wnt indukčním faktorům a nebo díky Cerberusu. Antagonisté Dickkopfs 1, -2 a Kremen se váží na koreceptor

LRP6. Dalším antagonistou schopným vazby na LRP5/6 je Sklerostin [49, 51]. RunX2 přímo reguluje jeho expresi v osteoblastech, zvyšuje ji, a tím přispívá k negativní regulaci Wnt signalizace v pozdních stádiích mineralizace v průběhu formace kosti. Wnt signalizace nastává až po BMP signalizaci. Pro vývoj kostí je důležité prokřížení těchto dvou drah. BMP-2 moduluje aktivitu Wnt při diferenciaci osteoblastů [49].

Wnt proteiny jako Wnt3a a -10 upregulují RunX2 expresi díky aktivaci Wnt/ β -kateninové dráhy. Wnt10b například indukuje expresi RunX2, Osx a Dlx5 a inhibuje expresi adipogenních transkripčních faktorů C/EBP α a PPAR γ [43, 49].

Inzulinu podobný růstový faktor 1

IGF-1 je růstový faktor sekretovaný zralými osteoblasty, které reagují na hormonální a cytokinovou signalizaci parathormonu, FGF-2 či TGF β právě jeho zvýšenou syntézou [42, 55, 56]. IGF-1 stimuluje proliferaci a diferenciaci osteoblastů díky specifickým membránovým receptorům [52, 55]. Tyto receptory jsou složeny z α a β podjednotek. Po vazbě IGF-1 na receptor dojde k aktivaci vnitřní tyrozin kinázy, která fosforyluje β podjednotku. Tím jsou aktivovány dvě signální dráhy – Ras/MAPK a PI3-K dráha, které vedou ke stimulaci exprese proteinů ECM a prevenci apoptózy osteoblastů [56].

IGF-1 může být lokálně skladován inaktivní v kostní ECM, dokud není vypuštěn během resorpce kosti [55]. V kostní ECM se nachází v komplexu s IGF vazebnými proteiny (IGFBP). Je jich šest typů a v kosti se vyskytují na různých místech. Díky této vazbě je inhibována funkce IGF-1. Například IGFBP3, -4 a -5 jsou produkovány osteoblasty. TGF β inhibuje produkci IGFBP4 a -5. Reabsorpce kosti uvolňuje aktivní IGF-1, které následně stimuluje osteogenní buňky [42, 56].

IGF-1 neřídí ranou diferenciaci MSC, ale napomáhá až zralým osteoblastům. IGF-1 také hraje roli při diferenciaci chondrocytů [55]. Dále podporuje expresi Osx v osteoblastech [43]. IGF-1 se ukazuje být potenciálním chemoatraktantem, který indukuje migraci osteoblastů během formace kosti [39]. Proliferaci osteoblastů stimuluje také IGF-2 [42, 44].

Fibroblastový růstový faktor

Další růstový faktor s vlivem na diferenciaci osteoblastů je FGF, který reguluje mnoho genů charakteristických pro udržení osteofenotypu, viz obrázek č. 10 [44, 50]. Vazba FGF ligandu na FGF receptor vede k dimerizaci tohoto receptoru a fosforylaci vnitřních tyrosinových zbytků, což vede k aktivaci různých signálních drah [50, 57]. Například FGF2 stimulovaná MAPK signální dráha vede ke stimulaci exprese AP-1, který následně

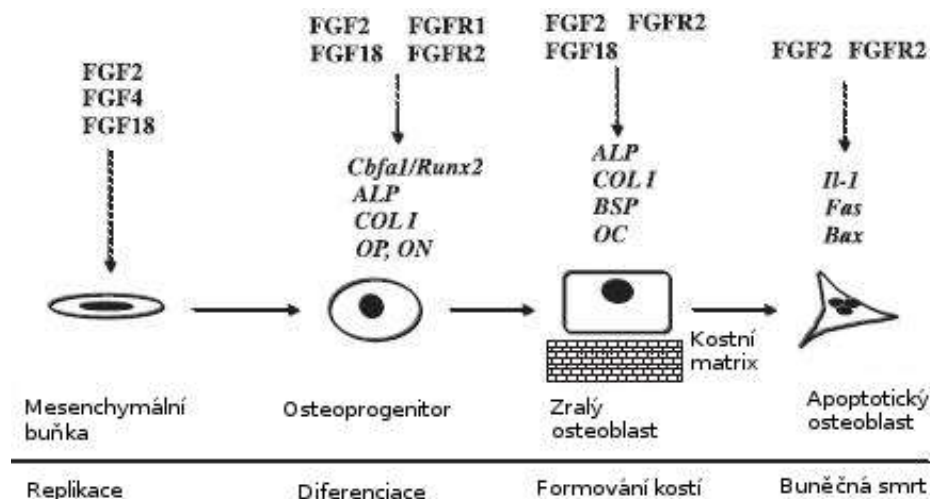
indukuje expresi osteokalcinu, osteopontinu a VEGF, a dále ke stimulaci fosforylace a transkripční aktivitě RunX2 [50]. p38 MAPK aktivovaná FGF-2 vede ke zvýšené syntéze IL-6, který reguluje apoptózu osteoblastů [39]. Aktivace PKC signální dráhy vede ke stimulaci exprese RunX2 [50, 57].

FGF-2, -9 a -18 jsou produkovány MSC a osteoblasty [39, 41, 44, 57]. FGF-2 produkováno zralými osteoblasty je skladováno v ECM. Receptory pro FGF jsou typu 1 a 2, jsou exprimovány v MSC během jejich kondenzace, která předchází depozici kostní matrix. Během pozdějšího vývoje kostí se na preosteoblastech a osteoblastech nachází FGF receptory typu 1, 2 a 3 [50].

Koordinace fungování FGF nezávisí pouze na expresi jejich receptorů, ale taktéž na afinitě jednotlivých FGF ligandů k různým typům FGF receptorů [50]. Signalizace prostřednictvím FGF receptoru typu 1 má negativní vliv na diferenciaci. FGF receptor typu 2 má pozitivní vliv na diferenciaci osteoblastů. FGF receptor typu 3 má pozitivní vliv na chondrogenezi a v menší míře taktéž na osteogenezi [57].

FGF mají dvojí funkci, jelikož v nezralých osteoblastech indukují proliferaci i diferenciaci [38, 43, 50]. FGF-2 signalizace ve zralých osteoblastech vede k indukci apoptózy, dále zvyšuje expresi IGF-1 a inhibuje expresi IGFBP5, který je jeho inhibitorem. FGF-2 inhibují expresi Nogginu, antagonisty BMP signalizace [50, 57]. FGF signalizace inhibuje expresi ALP a kolagenu I a zvyšuje expresi osteopontinu, kostního sialoproteinu a osteonektinu. FGF zvyšují expresi VEGF, což je důležitý mitogenní faktor osteoprogenitorových buněk [50]. TGF β reguluje expresi FGF-2 a FGF receptorů v osteoblastech [50]. RunX2 formuje komplex s TCF4/LEF1 v promotoru FGF-18, což indukuje jeho expresi [43].

FGF také regulují geny zahrnuté v degradaci ECM, například zvyšují expresi IL-6 a prostaglandinu E2, proteinů důležitých pro resorpci kosti. Dále reguluje expresi a aktivitu kolagenázy 3 a TIMP1 a -3. FGF se tedy podílí i na modelaci proteolýzy kostní ECM [50].



Obrázek č. 10: **Role FGF signalizace při procesu regulace osteogenní diferenciace MSC:** Během procesu osteogenní diferenciace je regulována exprese řady genů typických pro kostní fenotyp, například ALP, osteopontin, osteonektin, osteokalcin, kolagenu I a dalších, pomocí signalizace FGF1, -2, -4, -18 molekul působících prostřednictvím FGF receptorů. Zkratky: OP znamená osteopontin, ON znamená osteonektin, Col I znamená kolagen I, BSP znamená kostní sialoprotein, OC znamená osteokalcin. Upraveno podle: [57].

Interleukiny

Osteoblasty dále sekretují IL-1 a IL-6. IL-1 má vliv na proliferaci osteoblastů, syntézu kolagenu, osteokalcinu a na produkci ALP. IL-6 reguluje apoptózu osteoblastů [39].

1.3.3 KOSTNÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Prekurzory osteoblastů podstupující proliferaci a zrání v preosteoblasty jsou elipsovité buňky neschopné depozice kostní ECM. Během aktivní proliferativní fáze preosteoblasty exprimují geny kódující proteiny ECM. Pro tyto buňky je typický velký Golgiho aparát, jsou bohaté na drsné endoplazmatické retikulum a taktéž mají k dispozici specializované části plazmatické membrány k sekreci vezikulů, které usnadňují depozici kostní ECM. Během postproliferativní fáze se ECM stává mineralizovanou [39].

Ke konci procesu syntézy a mineralizace ECM dochází díky selektivní expresi genů k zastavení buněčného cyklu, z části se tak děje i díky akumulaci proteinů ECM. V tuto dobu 50-70 % osteoblastů podstupuje apoptózu. Zbylé osteoblasty mohou diferencovat do kost lemujících buněk nebo osteocytů, či transdiferencovat do buněk deponujících chrupavčitou kost [39].

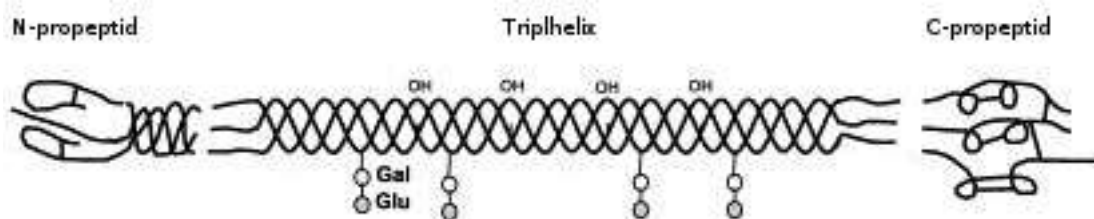
1.3.3.1 KOMPONENTY EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Komponenty ECM hrají důležitou roli ve správné organizaci kostních buněk a jejich proliferaci [41]. Kostní ECM je složena zejména z kolagenu I a z množství nekolagenních proteinů asociovaných s mineralizací ECM – osteokalcinu, osteopontinu,

osteonektinu a kostního sialoproteinu [39, 49]. Tyto proteiny jsou bohaté na kyselé aminokyseliny a některé z těchto proteinů jsou vysoce fosforylovány. Vykazují schopnost vazby vápníkových iontů, čímž urychlují nukleaci kalcium fosfátu. Dále vykazují afinitu pro krystaly hydroxyapatitu [58].

Kolagen I

Kolagen I je organickou složkou kosti, která se podílí na stavbě ECM [8]. Jedná se o fibrilární protein se strukturou triplhelixu, viz obrázek č. 11. Tento triplhelix je složen ze tří řetězců, nejčastěji dvou identických $\alpha 1$ řetězců a jednoho $\alpha 2$ řetězce. Díky této struktuře kostní ECM vykazuje své specifické biomechanické vlastnosti, jako je odolnost proti zátěži, pevnost v tahu a torzní tuhost, a to obzvláště po mineralizaci ECM [59]. Řetězce mají charakteristický aminokyselinový motiv Glycin-X-Y, kde X a Y jsou nejčastěji aminokyseliny hydroxyprolin a hydroxylysin [60]. Kolagen I dále obsahuje doménu složenou z aminokyselinové sekvence arginin-glycin-kyselina asparagová (RGD), kterou se váže na proteiny ECM nebo na osteoblasty pomocí integrinových receptorů. Tato vazba má vliv na expresi genů podporujících osteogenezi [61]. Kolagenní fibrily jsou důležité, jelikož tvoří základní matici pro mineralizaci [58].



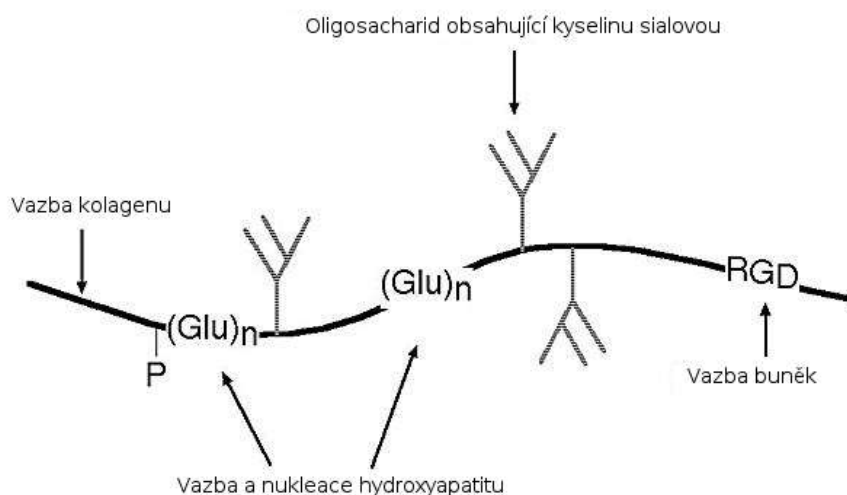
Obrázek č. 11: **Struktura triplhelixu kolagenu I:** V průběhu translace kolagenního α řetězce dochází k hydroxylaci prolinu a lysinu, kofaktorem je vitamín C. Po dosyntetizování celého proteinu jsou na hydroxy skupiny přidány cukerné zbytky, galaktóza a glukóza. K formaci triplhelixu dochází díky interakci N- a C-propeptidových domén. Takto zformovaný prokolagen je sekretován z buňky. V extracelulárním prostředí dochází k odstranění N- a C-koncových globulárních domén. Dále dochází k deaminaci lysinu, tím vznikají aldehydicke skupiny, které napomáhají provázání jednotlivých triplhelixů a formují se tak kolagenní fibrily. Upraveno podle: [59].

Kostní sialoprotein

Kostní sialoprotein je sulfátový fosforylovaný glykoprotein se záporným nábojem. Je exprimován téměř výhradně v tkáních, kde je proces mineralizace již zahájen [56, 62]. Jeho velikost je 75 kDa, polovinu této váhy tvoří oligosacharidové řetězce [58].

Na C-konci kostního sialoproteinu je přítomna aminokyselinová sekvence RGD, která je schopna vázat určité typy integrinů [62]. Na N-konci proteinu je přítomna doména pro vazbu kolagenu. Tato vazba je zprostředkována zejména na základě hydrofobních interakcí [58]. Kostní sialoprotein obsahuje taktéž doménu schopnou vazby

vápníku [62]. Dále má oligosacharidový řetězec obsahující kyselinu sialovou a také se zde nacházejí sekvence kyseliny polyglutamové ((Glu)_n), které představují místa nukleace a vazby hydroxyapatitu, viz obrázek č. 12 [58].

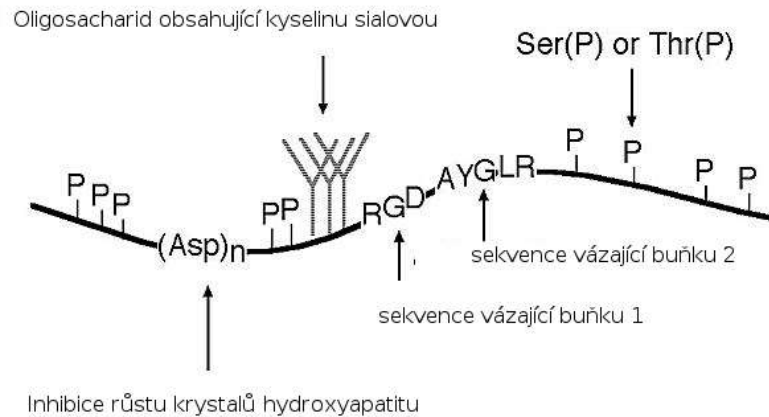


Obrázek č. 12: **Kostní sialoprotein:** Na struktuře kostního sialoproteinu je vidět oligosacharidy obsahující kyselinu sialovou, RGD sekvenci pro vazbu integrinů na C-konci proteinu, sekvence polyglutamové kyseliny, na N-konci proteinu je přítomna sekvence pro vazbu kolagenu. Upraveno podle: [58].

Osteopontin

Osteopontin je glykoprotein vysoce exprimovaný během aktivní proliferace osteoblastů [39]. Je bohatý na fosfoserin, fosfothreonin a oligosacharidy obsahující kyselinu sialovou. Jeho náboj je tedy negativní. Velikost osteopontinu je 66 kDa [58, 62]. V době postproliferativní fáze dochází k poklesu v jeho expresi a následně, během nástupu mineralizace, dosahuje jeho exprese nejvyšších hodnot [39].

Na N-konci osteopontinu se vyskytuje sekvence kyseliny polyaspartátové ((Asp)_n), která je zodpovědná za inhibici růstu krystalů hydroxyapatitu, viz obrázek č. 13. Nefosforylovaný osteopontin však na formaci hydroxyapatitu nemá vliv. Důležitou funkcí osteopontinu je zakotvení osteoklastů pomocí integrinových receptorů do kostní matrix [58]. Vazba na integrinové receptory osteoklastů je zprostředkována RGD aminokyselinovou vazebnou sekvencí [39, 58, 62].

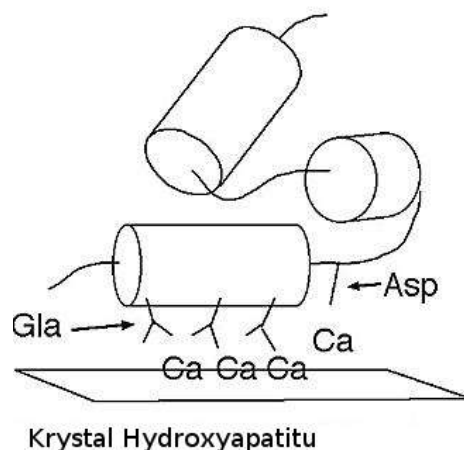


Obrázek č. 13: **Osteopontin:** Na struktuře osteopontinu je vidět RGD aminokyselinová sekvence pro vazbu integrinů, sousedící s druhým vazebným místem a dále obsahuje sekvenci z kyseliny polyaspartátové. Upraveno podle: [58]

Osteokalcin

Osteokalcin je prvním z proteinů kostní matrix, který byl charakterizován. Jedná se o malý, 6kDa velký protein [58]. Jeho syntéza je závislá na vitamínu K [58, 62]. Osteokalcin napomáhá regulaci depozice mineralizované ECM a chová se jakožto signál podporující diferenciaci a aktivaci osteoblastů [39].

60-90 % vznikajícího osteokalcinu je zabudováno do ECM, kde se během mineralizace ECM navazuje na hydroxyapatit pomocí tří α helikálních segmentů [39, 62]. Na každém ze segmentů jsou přítomny tři γ -karboxyglutamové zbytky, viz obrázek č. 14. Právě tyto zbytky představují vazebná místa pro krystaly hydroxyapatitu [42, 58, 62]. Jelikož je exprimován osteoblasty v postproliferativní fázi, je považován za marker zralých osteoblastů [39, 41].



Obrázek č. 14: **Osteokalcin:** Osteokalcin má v přítomnosti vápníku tři α helikální segmenty, na jednom z nich jsou přítomny γ -karboxyglutamové kyseliny, všechny jsou orientovány na stejnou stranu. Upraveno podle: [58].

Osteonektin

Osteonektin je nejběžnější nekolagenní protein v kostní ECM. Taktéž obsahuje vápník vazebnou doménu, kterou se váže na krystaly hydroxyapatitu [62]. Dále je schopen vazby na kolagen. Touto vazbou je umožněno propojení minerální a organické fáze v kostní tkáni [42].

1.3.3.2 MINERALIZACE EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

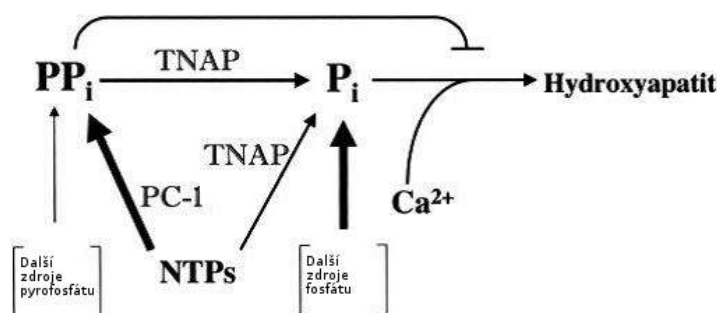
Kostní tkáň se na základě váhových procent skládá ze 70 % anorganických komponent, 20 % proteinů a 10 % vody. Hlavní anorganickou komponentou kosti jsou nanokrystaly hydroxyapatitu. Hydroxyapatit je hexagonální krystal složený z $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Je to typ kalcium fosfátu, který je sbalen a propojen s organickou složkou ECM, tedy s kolagenem a s kyselými proteiny [58, 63]. V průběhu procesu mineralizace dochází k depozici hydroxyapatitu na extracelulární organické komponenty [64]. Organické komponenty zde hrají důležitou roli, jelikož kontrolují lokalizaci hydroxyapatitu, jeho organizaci, místa nukleace a orientaci [63].

Kost je příkladem tvrdé tkáně. Typické funkce kosti jsou udávání tvaru, podpora a ochrana těla. Kosti pomáhají tělu v pohybu, obsahují kostní dřev a skladují mnoho minerálů. Všechny tyto funkce jsou umožněny díky faktu, že kost prochází procesem mineralizace. Tvrdost kosti je dána její specifickou kompozicí. V porovnání s měkkými tkáněmi je značná část vody nahrazena v kosti anorganickým materiálem, tedy vápníkem a fosforem. Poměr Ca/P je 2.33, krystaly v kosti se tedy převážně skládají z hydroxyapatitu [65].

Mineralizace kosti je zahájena pučením matrixových váček obklopených lipidovou dvouvrstvou z osteoblastů [53, 65]. Tyto váčky jsou malé, 20-200nm sférická tělíska pozorovatelná v premineralizované matrix. Často asociují s malými minerálními krystalky kalcium fosfátu a obsahují MMP2 a -9, tkáňově nespecifickou alkalickou fosfatázu (TNAP) a fosfodiesterázu nukleotid pyrofosfátu (NPP1) [53, 64].

Aktivita NNP1 neboli glykoproteinu 1 přítomného v plazmatické buněčné membráně (PC-1) zvyšuje extracelulární koncentraci pyrofosfátu, který je formován z extracelulárního nukleosidtrifosfátu (NTP), viz obrázek č. 15. Tím dochází k potlačování formace a růstu hydroxyapatitových krystalů a tedy k inhibici procesu mineralizace. TNAP je izoenzym z rodiny enzymů tvořené čtyřmi homology lidských genů kódujících ALP. Je na externím povrchu matrixových váček zabudována pomocí glykosylfosfatidové kotvy (GPI kotvy). Tento enzym podporuje mineralizaci, jelikož

snižuje koncentraci pyrofosfátu a zvyšuje koncentraci fosfátu [53, 66]. Jak v osteoblastech, tak v osteoidech se nachází ALP, která svou funkcí rovněž přispívá k procesu mineralizace kosti [65].



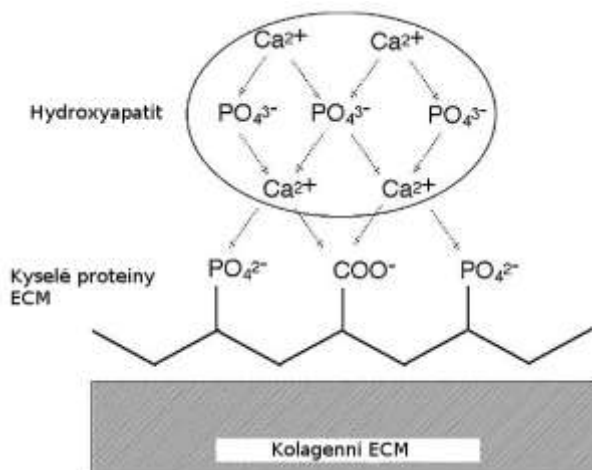
Obrázek č. 15: **Schéma koregulace TNAP a PC-1 při modulaci extracelulární koncentrace pyrofosfátu:** V kostní matrix je PC-1 hlavním producentem pyrofosfátu, který má inhibiční efekt na depozici hydroxyapatitu. TNAP vykazuje pozitivní vliv na mineralizaci díky kontrole koncentrace pyrofosfátu pomocí její pyrofosfátázové aktivity. TNAP také produkuje fosfát za užití NTP a pyrofosfátu jako substrátů. I další zdroje fosfátu, například absorpce ze střeva, přispívají k množství fosfátu, který je třeba pro depozici hydroxyapatitu. Upraveno podle: [66]

Organická fáze kosti je z 90 % složena z kolagenních fibril. Ty fungují jako lešení pro mineralizaci. Celému procesu napomáhají i kyselé nekolagenní proteiny obsažené v ECM, viz obrázek č. 16 [53, 65]. Většina těchto proteinů má schopnost vazby vápníku [42, 62]. Tyto proteiny buďto inhibují mineralizaci, jako například osteopontin, či jí napomáhají, jako například kostní sialoprotein [53, 65]. Mnoho z těchto proteinů je dále vysoce fosforylováno, což zvyšuje jejich kyselé pH a mohou sloužit jako substrát pro TNAP. U řady z těchto proteinů je přítomna aminokyselinová sekvence RGD, vazebná doména pro buňky [53].

Klíčovým bodem mineralizace je depozice hydroxyapatitových krystalků do prostoru mezi kolagenní vlákna. Přesný mechanismus formace hydroxyapatitu není znám [53, 64]. Na začátku procesu je pravděpodobně transport anorganických iontů do matrixových váček. Vápník se do nich dostává prostřednictvím annexinových kanálů, fosfát pomocí Na⁺ dependentního transportéru typu III. Z těchto iontů se formuje hydroxyapatit a poté dochází k jeho nukleaci [53]. Prvotní nukleace tedy nastává pravděpodobně již v matrixovém váčku a následně pokračuje vně [65, 66]. Depozici minerálů mezi kolagenní vlákna usnadňuje vazba matrixových váček na kolagen, například pomocí annexinů [53].

Lokalizovaná remodelace kolagenních vláken tak, aby vznikl volný prostor pro ukládání krystalků hydroxyapatitu, je zprostředkována pomocí MMP asociovaných s matrixovými váčky a exprimovaných kostními buňkami a dále pomocí extracelulární proteázy nazývané disintegrin a metaloproteáza s motivem trombospondinu typu 1

(ADAMT). MMP2, -8 a -13 jsou exprimovány v osteoblastech a osteocytech [46, 53, 64]. V průběhu formace kostní ECM dochází k poklesu proteinů fibronektinu a osteopontinu. Tyto proteiny jsou důležité pro ranou osteogenezi, ovšem vykazují inhibiční efekt na proces mineralizace [64].



Obrázek č. 16: **Nukleace hydroxyapatitu kyselými proteiny přítomnými v kostní matrix:** Některé z kyselých proteinů mají afinitu ke kolagenu, povrch nerozpustného kolagenu poskytuje centra pro redukcí mezifázové energie potřebné pro nukleaci. Vápenaté ionty jsou vázány ke kyselým skupinám na proteinech a anorganický fosfát je přitahován k vápenatým iontům. Tento komplex následně vytváří krystalickou strukturu. Upraveno podle: [58].

1.4 NÁPRAVA KOSTNÍCH DEFEKTŮ

K narušení kosti dochází například v důsledku poranění, tkáňové resekce tumorů, revizních operací, osteonekróz, deformit páteře a infekcí. Ačkoliv proces přirozené nápravy kostí při hojení zlomenin je dostačující, může při něm docházet k řadě komplikací, což znamená významný klinický a socioekonomický problém. Zejména během léčby velkých zlomenin kostí dochází ke vzniku paklobů. Při vzniku paklobů či u defektů nadkritické velikosti je třeba dočasně použít materiál na vyplnění defektu [67].

1.4.1 KASKÁDA HOJENÍ KOSTI

Při procesu hojení kosti dochází ke stádiím formování hematomu, zánětu, dochází k revaskularizaci, vzniku chrupavky, mineralizaci vzniklé chrupavky, odstranění chrupavky, vzniku kosti a její následné remodelaci, viz obrázek č. 17. V podstatě zde dochází k zopakování normálního embryonálního vývoje kosti [67, 68].

Při porušení kosti nejprve dochází k naplnění kosti krevní sraženinou z prasklé cévy [69]. To vede k lokalizované hypoxii a okyselení. Bioaktivní krevní sraženina aktivuje krevní destičky a ty sekretují α -granula, která obsahují například VEGF, PDGF, FGF, EGF, hepatocytární růstový faktor (HGF), IGF, MMP, TGF β , angiostatin, endostatin [70]. To vede k přeměně krevní sraženiny v hematom bohatý na fibrin. Buňky imunitního systému, neutrofilů, monocytů a lymfocytů, se objevují postupně z porušené krevní cévy a migrují do místa hematomu. Iniciální prozánětlivá odpověď zahrnuje sekreci TNF α a IL-1, -6, -11 a -18 [67, 68].

V místě hematomu se tak nachází řada chemokinů a cytokinů. Tyto faktory vykazují prozánětlivou a angiogenní funkci, dále stimulují aktivaci a migraci fibroblastů a progenitorních buněk, tedy MSC [69]. Migrace je stimulována zejména IL-6, TNF α , stimulačním faktorem kolonií granulocytů (GCSF), SDF 1, stimulačním faktorem kolonií makrofágů (MCSF), bFGF a PDGF [71]. Migrace MSC je dále umožněna díky přítomnosti MMP [67].

Nejprve se v místě fraktury formuje granulační tkáň. Ta je produkována fibroblasty a je složena z fibronektinu, kolagenu I, lamininu a glykosaminoglykanů [72]. Po zlomení vykazují jednotlivé fragmenty významné pohyby, které generují mezifragmentární tah. Právě granulační tkáň tento vysoký tah toleruje. Kostní tkáň se v tomto momentě vytvořit nemůže, jelikož osteoblasty nejsou schopny takto vysoký tah

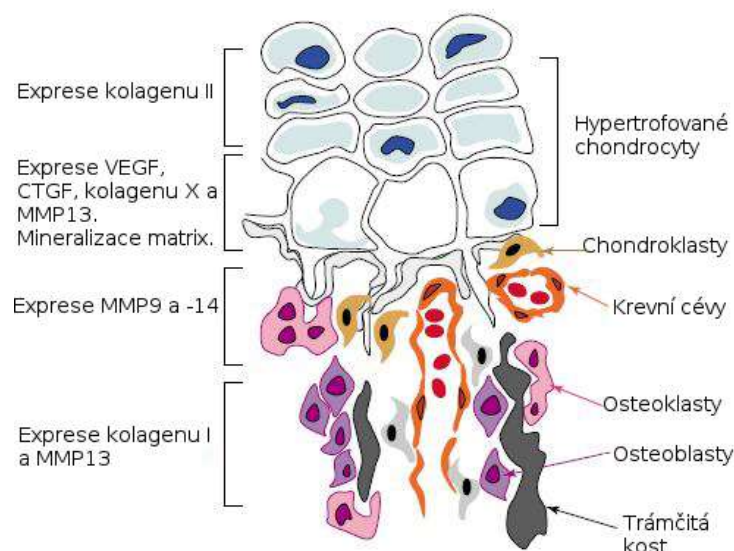
tolerovat. Jak granulační tkáň vyzrává, dochází k redukci tahu objevujícího se napříč v místě zlomeniny, proto dochází postupně k formaci chrupavčité a následně kostní tkáně.

Rekrutované MSC se mohou podílet na imunomodulaci a diferencují do osteoblastů nebo chondrogenních buněk. Diferenciace je pod kontrolou řady růstových faktorů, hormonů a transkripčních signálů [67]. Například TGFβ₂, -3, BMP-2 a růstový diferenciační faktor 5 (GDF5) se podílí na chondrogenезi MSC [67]. Vzniklé chondrocyty proliferují a syntetizují ECM bohatou na kolagen II a proteoglykany. Jakmile dojde k mechanické stabilitě, pak chondrocyty hypertrofují a ECM kalcifikuje. Současně krevní cévy penetrují chondrogenní tkáň, přináší chondroklasty a mesenchymální progenitory, které iniciují nahrazení chrupavky [67, 68].

Osteogenní diferenciace probíhá zejména pod vlivem BMP2, -4 a -7, TGFβ₁, -2 a -3, IGF-1 [67]. Pro udržení rovnováhy je třeba přítomnosti inhibičních molekul. Příkladem inhibičního působení je Noggin, který je antagonistou k BMP [68]. Dalším důležitým faktorem je mechanická stimulace osteoblastů v průběhu jejich diferenciace.

Jak již bylo zmíněno, při hojení kostí je potřebné adekvátní krevní zásobení [68]. Hypoxické podmínky indukují angiogenní HIF-1α dráhu. Revaskularizační proces zraněné oblasti tak začíná v oblasti hematomu [67]. Následně během fáze degradace chrupavky a remodelace kosti pomocí MMP dochází k infiltraci dané oblasti krevními cévami [68]. Exprese VEGF v hypertrofované chrupavce je klíčová pro regulaci transformace chrupavčité matrix do vaskularizované kostní tkáně [67]. Angiopoietin 1 a 2 napomáhají formování větších cév a jejich větvení z již vzniklých cév [68].

Následná remodelace kosti probíhá díky osteoklastům, tedy buňkám resorbujícím kost. Osteoklasty mají schopnost degradovat mineralizovanou ECM, tím je umožněna regulace kostní masy po celý život [44]. Výsledkem kaskády hojení kosti je navrácení mechanické a biologické funkce kosti. Celá léčebná kaskáda je řízena striktní kontrolou jak prostorovou, tak časovou, díky biologickým signálům produkovaným buňkami a ECM v místě zranění [67].



Obrázek č. 17: **Remodelace ECM během endochondrální osifikace:** Proces endochondrální osifikace závisí na změnách v expresi molekul ECM. Proliferující chondrocyty exprimují kolagen II, hypertrofované chondrocyty exprimují kolagen X, MMP13 a vysoké množství VEGF. Osteoklasty exprimují MMP9, osteoblasty exprimují MMP13 a kolagen I. Zkratky: CTGF znamená růstový faktor pojivové tkáně. Upraveno podle: [46]

1.4.2 IMPLANTÁTY PRO NÁPRAVU KOSTNÍCH DEFEKTŮ

Existuje několik podmínek, při nichž není poraněná kost schopna procesu hojení. Poranění kosti vzniklé při masivním traumatu či při primární resekci tumoru může překonat kritickou velikost defektu [73]. Kritická velikost defektu je taková, která překoná dva a půlkrát délku poloměru kosti. V těchto případech nedojde při pouhé fixaci kosti ke správnému zhojení, ale ke vzniku paklobu, jelikož buňkám chybí matrice k překonání vzniklé mezery [73, 74]. Defekty kritické velikosti je proto třeba vyplnit přídavným materiálem, implantátem, který zaplní vzniklou mezeru [73]. K tomu, aby se implantáty tvrdých tkání integrovaly do existující kosti, musejí se prekuzory osteoblastů navázat na implantovaný povrch, diferencovat a formovat kostní matrix [75].

Nejčastěji používaným materiálem při hojení defektů kritické velikosti jsou autologní kostní štěpy [73]. Při jejich užití nehrozí riziko odhojení a navíc štěp poskytuje optimální osteoinduktivní, osteokonduktivní a osteogenní vlastnosti. Negativa používání autologních štěpů souvisí s tím, že je třeba provést více operativních zákroků, což je finančně nákladnější a bolestivější. Při odběru hrozí v dárcovském místě nebezpečí vzniku morbidit, může docházet k chronickým bolestem či k formaci hematomu a infekci v odběrovém místě. Navíc většina osteogenních buněk nemusí přežít transplantaci a kvalita buněk se snižuje s věkem pacienta. Nejběžněji se jedná o odběr z kosti kyčelní [34, 76-78].

Alternativou k používání autogenních štěpů jsou alogenní štěpy [76]. Ty jsou k dispozici ve zmraženém, lyofilizovaném a nebo čerstvém stavu [78]. Štěpy v čerstvém stavu se již v klinice nepoužívají, jelikož je zde riziko přenosu nemocí [77]. Alogenní štěpy jsou osteokonduktivní, ale vykazují pouze nízké procento osteoinduktivity [34, 78]. Procesované autogenní štěpy nevykazují osteogenní účinky, jelikož proces přípravy zbaví štěp všech osteogenních buněk [78]. Z tohoto důvodu se zkoumají a nebo využívají při hojení kostí náhrady autogenní a alogenních kostních štěpů.

1.4.2.1 VLASTNOSTI NÁHRAD KOSTNÍCH ŠTĚPŮ

Základními vlastnostmi vyrobených štěpů by měla být mechanika nosiče, osteokonduktivita, osteoinduktivita a podpora osteogeneze [34, 77]. Mechanickými vlastnostmi nosiče se myslí hlavně splnění požadavků na tuhost a pevnost [34, 79]. Pevnost materiálu znamená odolnost proti nevratným deformacím, tuhost znamená míru tolerance materiálu k poškození, neboli odolnost ke vzniku zlomenin [79]. Materiál musí odolat stresovému působení v průběhu neogeneze tkáně [76]. Kost získává svou unikátní mechanickou odolnost díky své architektuře, která zahrnuje nanoskopickou a mikroskopickou dimenzi. Rezistence kosti proti zlomeninám pochází z přírodních mechanismů, které probíhají na každé ze zmíněných dimenzí. Konkrétně menší rozměry zajišťují vnitřní odolnost proti zlomeninám díky plasticitě a tím ovlivňují pevnost kosti, tuto vlastnost zajišťuje ECM a nanostrukturované krystalky hydroxyapatitu. Větší rozměry poskytují vnější ztužení kosti tím, že zabraňují vzniku a rozpínání prasklin čímž ovlivňují její houževnatost. Zajišťováno je to Haversovým systémem [79]. Mechanické vlastnosti kosti se liší, pokud se jedná o kortikální kost, pak se hodnoty Youngova modulu pohybují v rozmezí 15-20 GPa, u kosti spongiózní se jedná o rozmezí 0,1-2 GPa. Tlaková síla pro kost kortikální je 100-200 MPa a pro spongiózní kost je to 2-20 MPa [80]. Díky velkému rozmezí mechanických vlastností kosti je těžké vyrobit ideální syntetický štěp.

Osteokonduktivita je proces, při němž štěp poskytuje lešení pro vrůst nové kosti. Tuto vlastnost splňují autogenní a alogenní štěpy, náhražky minerální části kosti či bioaktivní sklo. Osteoinduktivitou se rozumí, že nosič stimuluje regeneraci a produkci nové kosti díky rekrutaci a stimulaci hostitelových MSC, napomáhá formaci a orientaci krevních cév a Haversova systému [34, 77, 78]. Tento proces je podporován proteiny, které se dostanou do místa poškození krevním řečištěm a dále řadou cytokinů a růstových faktorů [34]. Osteogeneze je proces přímé formace kosti, který probíhá pouze

u osteoblastů a jejich prekurzorů. Osteogenní nosič obsahuje buňky, které přežijí proces transplantace, a jsou tak schopné diferencovat v místě poškozené kosti [34, 77, 78]. Právě osteogenní vlastnosti má doposud pouze autogenní štěp.

Další důležitou vlastností buněčných nosičů je biokompatibilita. Tím se rozumí schopnost nosiče podporovat přirozenou buněčnou aktivitu, což zahrnuje molekulární signalizaci, bez jakýchkoliv lokálních a nebo systémových toxických efektů pro hostitelskou tkáň. V úvahu při navrhování nosičů je třeba vzít i velikost pórů [80]. Póry by měly být minimálně 100 μm velké, aby umožňovaly difúzi esenciálních živin a kyslíku, velikost pórů 200-350 μm se zdá být optimální pro vrůst nové kostní tkáně [74, 80]. Dále bylo pozorováno, že důležitá je nejen makroporozita, ale také mikroporozita nosiče. Přítomnost pórů o velikosti pod 20 μm dodává nosiči lepší vlastnosti. Porozita nosiče však snižuje jeho mechanické vlastnosti. Například porózní keramiky splňují požadavky na mechaniku kortikální kosti, polymery pak mechaniku kosti spongiózní [80].

Dále je třeba brát v úvahu možnost resorpce materiálu. Ta může být způsobena chemickým rozpouštěním, fagocytózou a nebo zabudováním do nově vzniklé kosti [34]. Bioresorbovatelnost nosiče umožňuje kontrolovanou remodelaci nosiče, a tedy vytvoření prostoru pro nově vznikající kost v *in vivo* podmínkách. Degradace nosiče by měla probíhat po dobu 9 měsíců při páteřní fúzi, nebo 3-6 měsíců při léčení lebečních a maxilofaciálních poranění [80]. V neposlední řadě by manipulace s nosičem měla být snadná a jeho cena přiměřeně efektivní [77].

1.4.2.2 NÁHRADY KOSTNÍCH ŠTĚPŮ

Velké množství alternativ auto- a zoogenních kostních štěpů je již v klinické ortopedii používáno. Štěpy se liší ve složení, mechanismu účinku a ve speciálních charakteristikách. Náhrady jsou buďto přírodní, jako demineralizovaná kostní matrix, a nebo syntetické. Syntetické kostní štěpy většinou vykazují pouze osteokonduktivní a osteointegrační vlastnosti [77]. Syntetické náhrady kostních štěpů neslouží k permanentnímu nahrazení kostní tkáně. Tyto náhrady jsou užívány pouze v mezifázi hojení a slouží jako průvodce pro stimulaci růstu nové kosti [73]. Dalším typem jsou kombinované náhrady kostních štěpů [77].

Demineralizovaná kostní matrix

Demineralizovaná kostní matrix se připravuje dekalifikací kortikální kosti [77]. Je složena z kolagenu, nekolagenních proteinů a růstových faktorů. Výhodou tohoto nosiče

je přítomnost osteoinduktivních růstových faktorů a osteokonduktivní kolagenní ECM, ovšem vzniklá matrix má nižší pevnost než původní kost [77, 78]. Demineralizace probíhá chemickým a radiačním ošetřením, tyto procesy oslabují potenciál indukovat formaci kosti. Komerčně je již vyráběn Grafton či Dynagraft. Existují ve formě prášků, past nebo tmelu [34, 77].

Kovy

Výhodou nosičů vyrobených z nerezové oceli či titanu je biokompatibilita použitého materiálu, jednoduchost tvarování a relativně nízká cena. Tyto nosiče nejsou biodegradabilní, jsou neohebné. Do kovových nosičů není možné integrovat bioaktivní molekuly [73, 80]. Kovy mají vysoký Youngův modul, který zastiňuje tlak a napětí v kosti, a tedy nedochází k mechanické stimulaci vznikající tkáně. Tato stimulace je zejména z počátku velmi důležitá pro aktivaci a diferenciaci osteoblastů. V posledních letech byl vyroben biodegradabilní kovový nosič na bázi slitiny hořčíku [73].

Kompozity

Kost je mineralizovaná tkáň, z toho důvodu jsou zkoumány kompozity, což jsou nosiče s přídavkem minerální komponenty. Minerály dodávají nejen strukturní integritu nosiče, ale také osteoinduktivitu [34, 76]. Nejčastěji se přidávají hydroxyapatit a kalcium fosfát [76]. Opteform je spongiózní kost v kombinaci s demineralizovanou kostní matrix. Collagraft je složenina hovězí kolagenní matrix spolu s hydroxyapatitem a trikalcium fosfátem [34].

Keramiky

Keramiky jsou anorganické, nekovové minerály. To zahrnuje i cement. Jsou připravovány zahřátím minerální soli nad 1000 °C v procesu zvaném spékání. Materiál je díky tomuto procesu pevný, avšak nevykazuje osteoinduktivní ani osteogenní vlastnosti. Po aplikaci do kosti nemá remodelační a resorpční kapacitu. Výhodou je minimální riziko zánětu při užití keramik a osteokonduktivita štěpu. Nejvíce keramik je vyráběno z hydroxyapatitu a nebo trikalciumfosfátu či kalcium sulfátu [34, 77, 78].

Endobon je keramika vyráběná z hovězí kosti, která je spékána a procesována tak, že zbudou pouze minerály. Dalšími produkty jsou ProOsteon, Osteoset či Calceon. Užívány jsou i injektovatelné cementy, schválenými produkty jsou například Skeletal Repair System skládající se z kalcium fosfátu a uhlikatého apatitu. Používán je i Bone Source, který se skládá z kalcium fosfátu [34].

Bioaktivní sklo

Bioaktivní sklo se skládá ze silikonového materiálu v kombinaci s biokompatibilním materiálem, jako je například kalcium fosfát [34, 77]. Bioaktivní sklo je tvrdý, neporézní materiál, který je ostokonduktivní i osteointegrativní a vykazuje lepší mechanickou pevnost v porovnání například s keramikou z hydroxyapatitu. Vyráběno je jako nerosorbovatelné či rozpustné, v závislosti na změně poměru oxidu sodného a oxidu vápenatého [77]. Používají se produkty Bioglass či Cortoss [34].

Polymery

Polymery jsou snadno procesovatelné, biokompatibilní a biodegradabilní materiály [73]. Primárně degradují hydrolýzou a jen mírně na základě enzymatických reakcí [73, 79]. Proto může být míra degradability nosiče modifikována na základě kopolymerizace či změn v hydrofobicitě materiálu. Degradaci ovšem může docházet ke vzniku mikrokystalů, které mohou způsobit imunitní odpověď a také se může lokálně zvýšit kyselost prostředí [73]. Výhodou užívání polymerů je fakt, že mohou být modifikovány bioaktivními molekulami [79].

Přírodní polymery využívané pro vznik náhrad jsou fibrin, kolagen, alginát či chitosan. Ze syntetických polymerů jsou hojně využívány kyselina poly-L-mléčná (PLLA), polyglykolid (PGA), poly-ε-kaprolakton (PCL), polyethylenglykol (PEG). Mechanické vlastnosti polymerů jsou opačné k vlastnostem keramik. Proto jsou zkoumány složeniny polymerů a keramik, nejčastěji polymerů s hydroxyapatitem, což dodá nosičům osteoinduktivní charakter [73]. V klinice se využívá PGA a PLLA polymer a v preklinických studiích se testují kopolymery s kalciumfosfátem [73, 76].

Kombinované náhrady

Kombinované náhrady kostních štěpů jsou velmi slibnou alternativou. Tyto náhrady se skládají z osteogenních buněk a osteoinduktivních faktorů spolu s osteokonduktivním syntetickým nosičem [77]. Růstové faktory jakožto induktory formace nové kosti jsou intenzivně zkoumány, jelikož vykazují mitogenní, angiogenní a morfogenní efekt. Růstové faktory lze nalézt v autogenním odběru z kostní dřeně, kde jsou zastoupeny také osteoprogenitorové buňky [34, 78]. Dalším zdrojem růstových faktorů je ultrakonzentrát z centrifugované krve neboli na krvinky bohatá plazma [34]. Osazením nosiče pomocí odebraných buněk a faktorů by vznikl materiál, který by se svými vlastnostmi blížil autogenním a autologním kostním štěpům [77]. V současnosti se již

v klinice používají dva růstové faktory, a to BMP-2 neboli INFUSE a BMP-7 neboli OP-1 [34].

1.4.3 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

Proces elektrostatického zvlákňování byl poprvé použit na začátku devatenáctého století pro textilní průmysl a výrobu filtrů. Principem elektrostatického zvlákňování je užití elektrického pole k překonání povrchového napětí polymerní kapaliny [76]. Po sepnutí napětí je náboj dané polaridy injektován do kapky polymerní tekutiny, která se nachází na zvlákňovací elektrodě [76]. V tomto momentě dochází v polymeru k odpudivým reakcím mezi shodně nabitými náboji a zároveň zde působí přitažlivé síly mezi polymerem a kolektorem. Kolektor má opačný náboj než je náboj zvlákňovací elektrody a obě elektrody se nachází naproti sobě [81].

V momentě, kdy je dosaženo rovnováhy mezi oběma působícími silami, dojde k vytvoření takzvaného Taylorova kužele. Odpor mezi shodně nabitými náboji v kapce polymerní tekutiny sílí a překonává se povrchové napětí. V důsledku toho dochází ke zhroucení Taylorova kužele a k vytvoření trysky polymerního roztoku, která směřuje ke kolektoru. V průběhu letu je ze vzniklé trysky odpařováno rozpouštědlo a na kolektor tak dopadají pevná polymerní vlákna [81].

Výsledkem procesu je nanovláknenná struktura s průměry vláken v rozmezí desítek nanometrů až do pár mikrometrů [81]. Mnoho vlastností ovlivňuje proces elektrostatického zvlákňování. Patří mezi ně typ polymerního roztoku a jeho koncentrace, vybrané rozpouštědlo, použité napětí nebo vzdálenost zvlákňovací elektrody od kolektoru [76].

1.4.3.1 NANOVLÁKENNÉ NOSIČE PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ KOSTI

Polymerů, z nichž je možné vyrábět nanovláknenné nosiče, je celá řada. Jsou přírodního nebo syntetického původu. PLLA a PGA jsou již schválenými polymery, dále se testují syntetické polymery jako například PCL, který je flexibilní, co se syntézy týče a je možné jeho povrch modifikovat například obohacením o růstové faktory a nebo minerály [73]. Ty se mohou přidávat k polymeru před procesem elektrostatického zvlákňování a nebo mohou být deponovány či navazovány na povrch dodatečně [73, 76].

Modelem pro výrobu nanovláknenných nosičů je ECM. Ta je v případě kosti složena především z vláknenného kolagenu. Vlákna mají tloušťku v rozmezí 50-500 nm [76]. Nanomateriály se snaží napodobit přirozenou architekturu nanorozměru kosti. Inkorporace nanorozměru sice zvyšuje pevnost materiálu, ovšem snižuje jeho tuhost.

Nanorozměr dále napomáhá buněčné adhezi a proliferaci. Materiály s nanorozměry poskytují lepší povrch pro adhezi fibrinové sraženiny, která se vytváří po implantaci a dále umožňují migraci osteogenních buněk na povrch implantovaného materiálu [79].

Nanovláknenné nosiče jsou vysoce porézní, čímž je umožněno vrůstání buněk a zároveň zásobení živinami, kyslíkem, růstovými faktory a odstraňovány jsou odpadní látky. Při výběru vhodného polymeru jsou nosiče biodegradabilní i biokompatibilní [76]. Jednou ze strategií, jak dále vylepšit integraci implantátu je funkcionalizace povrchu pomocí peptidů nebo osazování nosičů osteoprogenitorními buňkami, což dodá nosičům osteoinduktivní a osteogenní charakter [75, 82].

Takto připravené nosiče vykazují řadu zmíněných výhod, ale jsou zde i negativa, která je třeba překonat. Například je nesnadné vytvořit klinicky relevantní a dostatečně velký trojrozměrný nosič. Je třeba lepší kontroly architektury nosiče, zejména z pohledu porozity, aby byla usnadněna nejen migrace buněk, ale rovněž odpovídající vaskularizace, čímž se zabrání nekróze vznikající ve středu nosiče [76].

Nanovláknenné nosiče se vyrábí nejen metodou elektrostatického zvlákňování, ale také samouspořádáním a nebo fázovou separací [76, 79]. Méně běžnými technikami jsou hydrogely odvozené z bakterií a nebo elektrohydrodynamický tisk [76].

1.5 DIFERENCIAČNÍ PEPTIDY

Interakce mezi ECM a buňkami přímo reguluje buněčné chování jako je proliferace, růst, přežití, polarita, morfologie, migrace a diferenciaci buněk. Navíc různé typy molekul přítomných v ECM mohou selektivně ovlivňovat odlišné signální dráhy. Je tedy možné vyrobit biomimetický nosič pro regeneraci daného typu tkáně díky inkorporaci specifických buněčných adhezivních ligandů [83].

Několik růstových faktorů, produkovaných osteoblasty a ukládaných do kostní ECM, bylo buďto přidáváno volně do média, a nebo imobilizováno na buněčný nosič s cílem osteogenní diferenciaci MSC [84]. Mezi tyto faktory patří například FGF-2, IGF-1 a -2, PDGF, TGF β a BMP. Tyto aktivní molekuly mají velikost několika set aminokyselin, což činí většinu z nich problematicky imobilizovatelnou na povrch buněčného nosiče. Například BMP jsou přibližně 2-3 nm velké, v závislosti na jejich konformaci, a jejich sekundární struktura bývá příliš komplexní [84, 85]. Ve vodných fyziologických roztocích jsou použité molekuly náchylné k degradaci, v důsledku čehož dochází ke ztrátě jejich bioaktivity [85]. Navíc produkce rekombinantních molekul je velmi drahou procedurou a jsou zde zahrnuty kroky jako purifikace proteinů, která je náročnou metodou [86, 87].

Schopnost doručit či prezentovat biologicky aktivní molekuly v průběhu času skrze vhodný nosič do místa regenerace tkáně nabízí obrovskou terapeutickou efektivitu. Speciálně pro lokální tkáňovou regeneraci, například pro formaci kostí, je důležité, aby lokální koncentrace použitého bioaktivního peptidu byla udržována v potřebné míře [88]. Při použití rozpustných faktorů dochází k difúzi z místa doručení [86, 87, 89]. To vede k rapidnímu poklesu koncentrace a tudíž k nedostatečnému trvání působení molekul v místě defektu. Proto je efektivní dávka aktivních molekul potřebných ke stimulaci formace kosti suprafyziologická. Ovšem tato koncentrace často vede k neregulované signalizaci [86].

Zabránění difúzi aplikovaných molekul lze vyřešit pomocí imobilizace aktivních molekul na povrch buněčného nosiče. Kovalentní vazba molekul na povrch biomateriálu, často pomocí bioaktivních chemických sloučenin, tak vede k zachování odpovídající koncentrace v porovnání s molekulami na povrch adsorbovanými [89].

1.5.1 NAVOZENÍ OSTEOGENEZE DIFERENCIAČNÍMI PEPTIDY

Použití krátkých peptidových sekvencí odvozených z aktivní oblasti molekul ECM může mít výhody v porovnání s používáním celých nativních struktur [84, 90, 91]. Předchází se tak možné imunogenicitě, krátkému poločasu životnosti a vedlejším efektům spojeným s tumory [90]. Funkcí těchto peptidů je napodobit přirozenou ECM s důrazem na poskytnutí vazebných míst pro receptory přítomné na osteogenních buňkách [75].

Krátké peptidy mohou být snadno použity pro povrchovou funkcionalizaci nosičů díky své menší velikosti a jednoduché modifikaci N- či C-konce peptidu [84, 85]. Tím je docíleno jednodušší imobilizace a přítomné peptidy jsou prezentovány na povrchu biomateriálu ve vysoké a konstantní hustotě, při zanechané funkčnosti a bioaktivitě [85, 90]. Z těchto důvodů se předpokládá, že peptidy v kombinaci s biomateriály jsou způsobilé pro užití v regenerativní terapii [90].

Použití aminokyselinová sekvence GTPGPQGIAGQRGVV, odvozené z řetězce α kolagenu I, bylo již zaznamenáno v klinických studiích. Tato sekvence se označuje jako peptid P-15. P-15 kostní štěp je kombinací peptidu P-15 s OsteoGrafem, což je minerální složka kosti. Minerální složka obsahuje kalcium fosfát a přirozenou mineralizovanou ECM, která podporuje buněčnou invazi. Peptid P-15 pak podporuje adhezi, migraci, proliferaci a diferenciaci buněk. Od roku 2000 do roku 2003 bylo léčeno 22 pacientů ve věku od 18 do 74 let se špatně zhojenými zlomeninami pomocí P-15 kostního štěpu v místě zlomeniny. U 90 % pacientů bylo dosaženo plného sloučení štěpu s kostí. Průměrný čas hojení byl 4,2 měsíce [92].

Aminokyselinovou sekvenci RGD lze najít v mnoha ECM molekulách, viz tabulka č. 1 [83, 89]. Tuto sekvenci váže zhruba polovina známých integrinových receptorů [93]. Byl prokázán vliv RGD sekvence na osteogenní diferenciaci a mineralizaci osteoblastů. RGD peptid byl již konjugován s mnoha typy nosičů, například s polyethylenoxidem (PEO), PCL, PLLA a chitosanem [94]. Kromě vlivu na ostochondrální regeneraci byl však v řadě případů prokázán i vliv RGD sekvence na chondrogenní diferenciaci [95, 96].

GTPGPQGIAGQRGVV, DGEA a GFOGER jsou aminokyselinové sekvence odvozené z kolagenu I. Tyto sekvence zprostředkovávají vazbu na integriny a iniciují buněčnou adhezi, roztažení buněk a podporují osteogenní diferenciaci. [75, 83, 86, 94] Na rozdíl od RGD sekvence se váží na jiné integrinové receptory [75]. GFOGER sekvence váže $\alpha 2\beta 1$ integrin, DGEA se specificky váže na osteoblasty pomocí $\alpha 2\beta 1$

integrinu [83, 93, 97]. Studie Liu et al. prokázala vliv GFOGER aminokyselinové sekvence i na chondrogenní diferenciaci [98].

Degradace ECM má za následek vypouštění malých kryptických peptidů s neobvyklou bioaktivitou, nepřítomnou u původních proteinů ECM. Specifický kryptický peptid odvozený z C-konce telopeptidového regionu podjednotky α z kolagenu III má aminokyselinové složení IAGVGGGEKSGGF. Tento peptid má potencionální chemotaktickou aktivitu *in vitro* a *in vivo* na mnoho progenitorních buněk, a může tak ovlivňovat i osteogenní diferenciaci [99].

BMP-2, -4 a -7 indukují expresi genů osteoblastů a mineralizaci ECM v primární kultuře lidských MSC [82, 85, 100]. Konkrétně BMP-2 a -7 byly schváleny Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro klinické užití ve Spojených státech amerických v roce 2002 [86]. Z BMP-7 byly odvozené aminokyselinové sekvence SNVILKKYRN, KPSSAPTQLN, KAISVLYFDDS a GQGFSYPYKAVFSTQ [82, 85]. Peptidový fragment odvozený z BMP-2, z knuckle epitopu residua 73-92, má aminokyselinovou sekvenci KIPKASSVPTEILSAYSTLYL [87, 94, 101-104]. Tato sekvence se váže na BMP receptor typu I a II [94, 104]. RKKNPNCRRH je aminokyselinová sekvence odvozená z residua 15-24 z BMP-4, jedná se o heparin vazebnou sekvenci [100].

Osteopontin je důležitý protein podílející se na mineralizaci kolagenních fibril v průběhu osteogenní diferenciaci. Obsahuje sekvence bohaté na kyselinu glutamovou, a tedy indukuje nukleaci hydroxyapatitu. Aminokyselinová sekvence GLRSKSKKFRRPDIQYDPDATDEDITSHM je kolagen vazebný motiv odvozený z osteopontinu, jedná se o residuum 150-177 [88]. Další sekvencí odvozenou s osteopontinu je SVVYGLRGSGSGS. Tato sekvence se váže na $\alpha 9\beta 1$ integrin a podporuje adhezi a migraci endoteliálních buněk, což vede ke zlepšení angiogeneze [101].

KEDGRLL je aminokyselinová sekvence, residuum 77-83, odvozená z FGF-2 [90]. FHRRIKA je aminokyselinová sekvence odvozená z kostního sialoproteinu. I tyto sekvence podporují buněčnou adhezi a osteogenní diferenciaci [90, 93]. KRSR je aminokyselinová sekvence odvozená z více typů molekul ECM, viz tabulka č. 1 [93]. Váže se na transmembránové proteoglykany a selektivně zvyšuje adhezi osteoblastů [83].

Tabulka č. 1: **Názvy proteinů a z nich odvozených aminokyselinových sekvencí s vlivem na osteogenní diferenciaci:** Sestaveno podle: [75, 84-90, 93-99, 101-104]

Protein ECM	Odvozená aminokyselinová sekvence
BMP-2	KIPKASSVPTELSAISTLYL
BMP-4	RKKNPNCRRH
BMP-7	SNVILKKYRN
	KPSSAPTQLN
	KAISVLYFDDS
	GQGFSYPYKAVFSTQ
BSP	KRSR
	FHRIKA
FGF-2	RGD
	KEDGRLL
Fibrinogen	RGD
Fibronektin Vitronektin	RGD
	KRSR
Kolagen I	RGD
	GTPGPQGIAGQRGVV
	DGEA
	GFOGER
Kolagen III	IAGVGGEEKSGGF
Laminin	RGD
Osteopontin	RGD
	GLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHM
	SVVYGLRGSGSGS
Trombospondin	KRSR

1.5.2 OSTEOGENEZE *IN VITRO*

Efektům působení různých typů diferenciačních peptidů na osteogenní diferenciaci MSC se doposud zabývalo již několik vědeckých skupin [75, 84-90, 93-99, 101-104]. V centru primárního zájmu je vyvinutí osteoinduktivního funkcionalizovaného biomateriálu. Tento materiál by řídil diferenciaci MSC v nepřítomnosti osteogenních suplementů poskytovaných médiem při klasické indukci diferenciace [83, 91]. Ačkoliv tyto suplementy jsou efektivní, je výhodnější vyvinout biomateriál, pro účely regenerativní medicíny kostní tkáně, schopný řídit osteogenní diferenciaci pouze na základě přítomných ligandů [91].

Nastavení pokusů při nichž je testován vliv diferenciačních peptidů na MSC si je do značné míry u většiny skupin podobné. Peptidy jsou imobilizovány na buněčný nosič a nebo jsou přidávány volně do média. Na nosiče jsou nasazeny MSC, které jsou takto kultivovány po dobu dvou až čtyř týdnů. Kultivace probíhá v bazálním médiu i v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů [75, 84-90, 93-99, 101-104].

Osteogenní diferenciace MSC v *in vitro* podmínkách probíhá ve třech časových etapách. První část trvá od prvního do čtvrtého dne, v této době je vidět maximum v počtu buněk. Po tomto stádiu následuje časná diferenciace, od pátého do čtrnáctého dne. Pro časnou diferenciaci je typická transkripce a proteinová exprese ALP. Po tomto iniciačním vrcholu dochází k postupnému poklesu exprese [32]. Dále v této fázi dochází k expresi kolagenu I, na nějž jsou ukládány minerály, a také je tato fáze charakteristická pro expresi markerů RunX2 a Osx. Finální stádium, od čtrnáctého do dvacátého osmého dne, je charakteristické vysokou expresí osteokalcinu a osteopontinu a dochází k ukládání vápníku a fosfátu [32, 79].

Míra vlivu diferenciačních peptidů na osteogenní diferenciaci se tedy stanovuje na základě buněčné morfologie, osteogenních markerů a depozice mineralizace. Mezi nejčastěji stanovované osteogenní markery patří RunX2, ALP, osteokalcin, kolagen I, kostní sialoprotein a osteopontin. Jejich detekce probíhá za pomoci metod konfokální mikroskopie, polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo enzymatické aktivity ALP. Detekce mineralizace ECM probíhá nejčastěji rovněž na základě metod konfokální mikroskopie. Vliv diferenciačních peptidů na adhezi a proliferaci se vyhodnocuje pomocí testů adheze, buněčného roztažení a proliferace [75, 84-90, 93-99, 101-104].

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 MATERIÁL A METODY

2.1.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

V tabulce č. 2 je uveden seznam použitých chemikálií, včetně výrobců a země původu.

V tabulce č. 3 je uveden seznam používaných přístrojů, včetně výrobců a země původu.

Tabulka č. 2: Abecední seznam chemikálií

Název chemikálie	Katalogové číslo	Výrobce	Země původu
Alexa Fluor 488	A-10667	Invitrogen	USA
ALP	N7653	Sigma Aldrich	Německo
Dexamed		Medochemie	Kypr
DiOC6	52303	Enzo	Německo
Diferenční peptidy	Zakázková syntéza	Vidia	ČR
DMSO	D2438	Sigma Aldrich	Německo
EDTA	EDS	Sigma Aldrich	Německo
Etanol 96%	70390	Penta	ČR
Etanol Absolutní	71250	Penta	ČR
FBS	F7524	Sigma Aldrich	Německo
Formaldehyd	14150	Penta	ČR
Glutaraldehyd	G5882	Sigma Aldrich	Německo
HMDS	440191	Sigma Aldrich	Německo
KCl	16210	Penta	ČR
K ₂ HPO ₄	15070	Penta	ČR
L-ascorbic acid 2-phosphate	A8960	Sigma Aldrich	Německo
MEM	51411C	Sigma Aldrich	Německo
Metanol	21210	Penta	ČR
MTS	G3581	Promega	USA
Na ₂ HPO ₄	15130	Penta	ČR
NaCl	16610	Penta	ČR
NaOH	15670	Penta	ČR
Protilátka proti osteokalcinu	ab13420	Abcam	USA
PCL	440752	Sigma Aldrich	Německo
Penicilin/Streptomycin	15140-122	Invitrogen	USA
PicoGreen Quant- iT Assay kit	Q-33120	Invitrogen	USA
Propidium jodide	P4864	Sigma Aldrich	Německo
Tetraspan 6%	FV87353	B. Braun Medical	ČR
Tris	T1503	Sigma Aldrich	Německo

Triton X-100	T8787	Sigma Aldrich	Německo
Trypsin-EDTA	59418C	Sigma Aldrich	Německo
Tween 20	P9416	Sigma Aldrich	Německo
β -Glycerol fosfát	50020	Sigma Aldrich	Německo

Tabulka č. 3: Abecední seznam přístrojů

Přístroj	Výrobní název	Výrobce	Země původu
Analytické váhy	T5939	Kern	Německo
Centrifuga	NF800R	Nüve	Turecko
Centrifuga	Spectrafuge 24D	Labnet	USA
CO ₂ inkubátor	2424-2	Shel Lab	USA
Fluorescenční reader	Synergy HT	BioTek	USA
Konfokální mikroskop	LSM 5 DUO	Zeiss	Německo
Laboratorní třepačka	Rotamax 120	Heidolph	Německo
Laminární box	Safe flow 1.2	Bioair	Itálie
NanoDrop	ND 1000	Thermo Scientific	ČR
Nanospider	NS 500	Elmarco	ČR
Ohřívací Lázeň	NB-301	BioTek	USA
Pokovovací zařízení	Q 150R ES	Quorum	Velká Británie
Přístroj na měření kontaktního úhlu	See System E	Advex instruments	ČR
Skenovací elektronový mikroskop	Vega3	Tescan	ČR
Světelný mikroskop	TH4-200	Olympus	Japonsko
Vortex	ZXClassic	VELP Scientifica	Itálie

2.1.2 METODY

2.1.2.1 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

Buněčné nosiče byly vyrobeny metodou elektrostatického zvlákňování na zařízení Nanospider NS 500. Jako zvlákňovací elektroda byla použita struna, na kterou byl po celou dobu procesu kontinuálně nanášen zvlákňovaný polymer. Nanovláknna byla zachytávána na statický kolektor potažený netkanou textilií spunbond, pro snadnější manipulaci s nanovláknennou vrstvou. PCL nanovláknenná vrstva byla připravena z 24% roztoku (w/v). PCL byl rozpouštěn ve směsi chloroform : ethanol v poměru 9:1. Pro přípravu PCL nosiče bylo použito napětí v rozmezí 80-100 kV a vzdálenost zvlákňovací elektrody od kolektoru byla 20 cm.

2.1.2.2 ANALÝZA POLYKAPROLAKTONOVÉHO NOSIČE

Nosič vyrobený elektrostatickým zvlákňováním z polymeru PCL byl analyzován skenovacím elektronovým mikroskopem. Na pořízených snímcích bylo provedeno

měření průměru vláken a odhad velikosti pórů. Měření průměru vláken probíhalo na snímcích nasnímaných při 10000 násobném zvětšení. Bylo analyzováno 5 náhodně pořízených snímků. Na snímcích se náhodně vytyčily dvě desetimetrové úsečky. U veškerých vláken protínajících tyto úsečky byl změřen jejich průměr, pomocí programu ImageJ, celkem bylo změřeno 278 průměrů vláken. Na základě těchto měření byl z hodnot sestaven histogram četnosti průměrů vláken.

Velikost pórů se standardně určuje z řezu nanovlákněné vrstvy. PCL vrstvy není možné řezat, jelikož při tom dojde ke spečení vrstvy na řezu. Řez tedy nelze nasnímat. Z toho důvodu byl proveden odhad velikosti pórů. Analýza velikosti pórů probíhala na stejných snímcích jako měření průměru vláken. Na snímek byla na náhodné místo umístěna čtyřramenná směrová růžice. Poté se počítaly veškeré průniky vláken v místech růžice. Následně se odhadla hloubka vrstvy, ve které byly počítány průniky vláken. Z těchto hodnot byl vytvořen graf odhadu velikosti pórů.

Kontaktní úhel byl měřen přístrojem See System E. Na podkladový stolek přístroje byl uchycen vzorek PCL nosiče. Po uchycení se vzorek nastavil před snímací kameru. Na vzorky bylo postupně kapáno 10 μ l destilované vody. Poté se vzorek posunul a opět na něj byla umístěna kapka vody. Vše snímala po celou dobu kamera. Následně byl na snímcích pořízených bezprostředně po dopadnutí kapky na povrch nosiče analyzován kontaktní úhel pomocí programu See System.

2.1.2.3 PŘÍPRAVA A STERILIZACE BUNĚČNÝCH NOSIČŮ

Z nanovlákněných vrstev byly připraveny buněčné nosiče, které měly kruhový tvar a jejich průměr byl 6 mm. Takto připravené nosiče byly máčeny 30 minut v 70% (v/v) etanolu. Následně byly třikrát promyty v PBS. Na sterilní nosiče byly ihned nasazeny prasečí MSC.

2.1.2.4 IZOLACE A KULTIVACE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

Nejprve byla odebrána krev z kostní dřeně prasat chovaných v ÚŽFG Liběchov. Krev se odebírala sterilně do zkumavek obsahujících fosfátový pufr (PBS), 2% fetální hovězí sérum (FBS) a heparin (25 IU/ml). K vzniklé směsi byl přidán 6% Tetraspan, tak aby tvořil 25 % finálního objemu. Vše se nechalo 30 minut při pokojové teplotě sedimentovat, následně se směs stočila na centrifuze NF8002, Nüve, při 15000 rpm po dobu 15 minut. Poté byla odebrána plazma a zbylý obsah byl převeden do kultivačních lahví s bazálním médiem. Skládalo se z MEM, 15% FBS a 1%

Penicilin/Streptomycin. MSC se nechaly adherovat v Shel Lab 2424-2 inkubátoru při 37 °C a s 5% CO₂ atmosférou.

Po pěti dnech bylo v kultivačních lahvích vyměněno médium. Touto procedurou došlo k odplavení erytrocytů a neadherovaných mononukleárních buněk. Čerstvé médium se skládalo z takzvaného minimum essential medium Earle's Salts with L-glutamin (MEM), 10% FBS a 1% Penicilin/Streptomycin.

2.1.2.5 PASÁŽOVÁNÍ MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

MSC byly po dosažení 80% konfluency pasážovány. Z kultivačních lahví bylo odebráno médium, dno lahve bylo opláchnuto PBS s 0,002% etylendiaminotetraoctovou kyselinou (EDTA). Pasážování buněk se provádělo dvakrát koncentrovaným roztokem Trypsin/EDTA. Buňky se nechaly 10 minut inkubovat v inkubátoru. Následně byla zastavena trypsinizační reakce pomocí média obsahujícího 10% FBS a buňky byly nasazeny do nových kultivačních lahví v poměru 1:3.

2.1.2.6 PŘÍPRAVA A STERILIZACE DIFERENCIAČNÍCH PEPTIDŮ

Diferenciační peptidy byly syntetizovány na zakázku firmou VIDIA a dodány byly v lyofilizované formě. Peptidy byly před použitím rozpuštěny v PBS na koncentrace uvedené v tabulce č. 4. V případě KIPKASSVPTELSAISTLYL (K) peptidu se jednalo o hydrofobní sekvenci, z toho důvodu byl přidán dimethylsulfoxid (DMSO), tvořil 5 % finálního objemu. Přidáním DMSO se docílilo rozpuštění peptidu K. Rozpuštěné peptidy byly sterilizovány filtrací pomocí Corning Spin-X UF. Následně byly peptidy zamrazeny v mrazáku, -20 °C.

Tabulka č. 4: **Koncentrace peptidů po rozpuštění v PBS**

Diferenciační peptid	Koncentrace peptidu	Přídavek
DGEA (D)	10000 g/ml	
GQGFSYPYKAVFSTQ (G)	5000 g/ml	
IAGVGGEKSGGF (I)	5000 g/ml	
KIPKASSVPTELSAISTLYL (K)	2700 g/ml	DMSO

V den nasazení buněk na PCL nosiče byly peptidy naředěny v médiu na testované koncentrace a následně napipetovány k jednotlivým skupinám. Koncentrace jednotlivých peptidů byly 1, 5 a 10 µg/ml média. Taktéž při výměně média v průběhu pokusu byly peptidy znovu přidávány v požadovaných koncentracích do čerstvého média.

2.1.2.7 NASAZOVÁNÍ MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

MSC z druhé pasáže byly spočteny pomocí Bürkerovy komůrky a resuspendovány v bazálním médiu v koncentraci 35000 buněk/50 μ l média, tedy asi 124 000 buněk/cm². V případě média bez osteogenních suplementů se jednalo o bazální médium, v případě média s osteogenními suplementy obsahovalo bazální médium přídavek 100 nM dexamethasonu, 100 nM β -glycerolfosfátu a 40 μ g/ml askorbát-2-fosfátu. Na dno jamek v antiadhezivní devadesáti šesti jamkové platničce byly umístěny sterilní PCL nosiče, na které bylo nepipetováno 50 μ l buněčné suspenze. Buňky se nechaly na nosiče adherovat dvě hodiny v inkubátoru. Po dvou hodinách bylo k buňkám přidáno 200 μ l odpovídajícího média s obsahem nebo bez obsahu osteogenních suplementů s požadovanou koncentrací jednotlivých diferenciačních peptidů. Buňky byly po dobu 21denního pokusu inkubovány v inkubátoru, každý sedmý den byla provedena výměna 200 μ l média za čerstvých 200 μ l příslušného média.

2.1.2.8 TEST METABOLICKÉ AKTIVITY

Testování metabolické aktivity buněk bylo prováděno pomocí MTS testu, a to 1., 3., 7., 14. a 21. den. V příslušný den byly buněčné nosiče přesunuty do nových jamek a bylo k nim přidáno 100 μ l bazálního média a 20 μ l MTS substrátu (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Poté probíhala dvě hodiny inkubace buněk s MTS substrátem v inkubátoru. Během této doby byl substrát metabolizován pomocí mitochondriálních enzymů na rozpustný formazan, který má absorpenci při vlnové délce 490 nm. Vzniklý formazan byl spektrofotometricky měřen u 100 μ l odběrů pomocí readeru Synergy HT, BioTek. Měření se provádělo při vlnových délkách 490 nm a 690 nm. Měření při 690 nm je referenční hodnota odečítaná od hodnot absorpance. Dále byla od hodnot odečítána absorpance MTS substrátu s buněčným nosičem bez buněk.

2.1.2.9 MĚŘENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY

Každý 1., 7., 14. a 21. den byl prováděn test na enzymatickou aktivitu ALP. Nosiče po inkubaci s MTS substrátem byly dvakrát opláchnuty v PBS. Následně k nim bylo přidáno 100 μ l ALP substrátu (p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System), s ním se buňky nechaly inkubovat třicet min při pokojové teplotě, ve tmě. Během inkubace ALP katalyzuje hydrolýzu bezbarvého p-nitrofenylfosfátu (pNPP) na p-nitrofenol, který má absorpenci při vlnové délce 405 nm. Po inkubaci se celkový obsah jamek přepipetoval do nové destičky a do každé jamky bylo přidáno 25 μ l 3M roztoku NaOH,

který zastavil celou reakci. Vzniklý p-nitrofenol byl detekován na readeru Synergy HT při vlnové délce 405 nm. Od jednotlivých hodnot byla odečtena absorbance ALP substrátu s buněčným nosičem bez buněk.

2.1.2.10 KVANTIFIKACE OBSAHU BUNĚČNÉ DNA

Ve stanovené dny, 1., 3., 7., 14. a 21., byla prováděna kvantifikace DNA. Buněčné nosiče byly po provedeném MTS testu a testu na aktivitu alkalické fosfatázy přendány do 500 µl lyzačního pufru, který se skládal z 10mM tris(hydroxymethyl)aminometanu (Tris), 1mM EDTA, 0,0004% Triton-X-100 a destilované vody. Takto připravené vzorky byly ve třech cyklech zamrazeny v mrazáku, -20°C, a rozmrazeny. Při každém rozmražení byly vzorky míchány pomocí vortexu ZXClassic, VELP Scientifica. Do černé devadesáti šesti jamkové destičky bylo nanášeno 200 µl pracovního roztoku Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Reagent, který po vazbě na dvouřetězcovou DNA emituje fluorescenční signál. Z jednotlivých vzorků pak bylo k reagentu přidáváno 20 µl buněčného lyzátu. Součástí eseje jsou i DNA standardy bakteriofágu lambda, které byly přidávány po 10 µl k reagentu. Fluorescence reagentu byla měřena pomocí fluorescenčního readeru Synergy HT při hodnotách excitace 485 nm a emise 528 nm.

2.1.2.11 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Pro analýzu buněčné morfologie pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly nosiče osázené buňkami opláchnuty v roztoku PBS a poté fixovány dvě hodiny v 2,5% glutaraldehydu při 4 °C. Následovala etanolová řada s 35, 48, 56, 70, 96 a 99,8% etanolem, inkubace probíhala vždy deset minut při pokojové teplotě. V absolutním etanolu byly vzorky ponechány dvakrát deset minut. Následně byly pokapány roztokem hexamethyldisilazanu (HMDS), který se v digestoři nechal odpařit. Celá procedura probíhala v devadesáti šesti jamkové platničce.

Vzorky s buňkami nebo bez buněk byly přichyceny na nosný terčík a pokoveny zlatem v naprašovacím zařízení Quorum Q150R. Následná analýza byla prováděna na skenovacím elektronovém mikroskopu Vega 3 od firmy Tescan při napětí v rozmezí 10-30 kV.

2.1.2.12 VIZUALIZACE BUNĚK

Pro vizualizaci adheze buněk na nosičích byly buňky každý 1., 3., 7., 14. a 21. den barveny pomocí 3,3'-dietyloxakarbokyanin jodidu (DiOC6), který barví membránové struktury a propidium jodidu, který se váže na buněčnou DNA. Buňky byly opláchnuty

v PBS a následně fixovány po dobu deseti min chlazeným metanolem, -20°C . Následovalo další propláchnutí v PBS a poté se přidalo 120 μl DiOC6 v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ PBS. Inkubace probíhala za tmy, při pokojové teplotě, čtyřicet pět minut. Následně byly vzorky propláchnuty v PBS a bylo k nim přidáno 120 μl propidium jodidu v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ PBS, inkubace probíhala 5 minut za tmy, při pokojové teplotě. Následně se vzorky třikrát propláchly v PBS. Nabarvené buňky byly pozorovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 5 DUO. DiOC6 má hodnotu excitace 488 nm a emise 520 nm, propidium jodid excituje při 560 nm a emituje při 580 nm.

2.1.2.13 BARVENÍ OSTEOKALCINU

Barvení osteokalcinu probíhalo 14. a 21. den. Vzorky byly propláchnuty v PBS a následně fixovány 3,7% roztokem formaldehydu po dobu deseti minut. Následně byly vzorky propláchnuty v PBS a inkubovány třicet minut při pokojové teplotě s roztokem PBS s 3% FBS a 1% Triton-X-100. Poté byly vzorky opláchnuty v PBS a nechaly se inkubovat s 90 μl primární myši neznačené protilátky, která se specificky váže na osteokalcin. Koncentrace primární protilátky byla 5 $\mu\text{g/ml}$ PBS. Inkubace probíhala přes noc při 4°C . Následně byly vzorky oplachovány 5, 10 a 15 minut roztokem PBS s 0,05% Tween-20. Následovalo dvakrát opláchnutí v PBS a k vzorkům byla přidána sekundární protilátka proti myši s fluoroforem, Alexa Fluor 488, která se váže na primární protilátku. Inkubace trvala sedmdesát pět minut a probíhala ve tmě, při pokojové teplotě, za třepání na třepačce. Následně se vzorky proplachovaly po dobu 5, 10 a 15 minut roztokem PBS s 0,05% Tween-20. Poté se vzorky dvakrát propláchly PBS a nechaly se po dobu 5 minut inkubovat s propidium jodidem o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ PBS. Nakonec se vzorky ještě třikrát propláchly roztokem PBS. Vzorky byly analyzovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 5 DUO. DiOC6 má hodnotu excitace 488 nm a emise 520 nm, propidium jodid excituje při 560 nm a emituje při 580 nm. Alexa Fluor 488 má hodnotu excitace 495 nm a emise 519 nm. Pro odečtení pozadí v podobě nespecifické vazby sekundární protilátky na buněčný nosič byly připraveny vzorky bez buněk stejným postupem. Při postupu se nepoužila primární protilátka. Průměrná hodnota nasnímané intenzity nespecificky navázané sekundární protilátky byla odečtena od všech snímků v programu ImageJ.

2.1.2.14 OBRAZOVÁ ANALÝZA

Obrazová analýza snímků pořízených při barvení osteokalcinu konfokálním mikroskopem byla upravena v programu ImageJ. Od všech snímků byla odečtena

intenzita pozadí, kterým je neodmytý a nenavázaný fluorofor Alexa Fluor 488. Program ImageJ byl dále použit i k výpočtu průměrů vláken u PCL vrstvy.

2.1.2.15 STATISTIKA

Statistické hodnoty uváděné u MTS, PicoGreen testu a u měření aktivity alkalické fosfatázy byly počítány v programu SigmaStat, se zvolenou úrovní signifikance 0,005.

2.2 VÝSLEDKY

Cílem práce bylo otestovat diferenciační potenciál čtyř sekvencí peptidů odvozených z proteinů ECM. První je peptid D, odvozený z kolagenu I, jeho aminokyselinová sekvence je DGEA. Druhým peptidem je peptid I, který je odvozen z α podjednotky kolagenu IIIa, aminokyselinová sekvence tohoto peptidu je IAGVGGEKSGGF. Třetí peptid je označován G, je odvozen z proteinu BMP-7 a jeho aminokyselinová sekvence je GQGFSYPYKAVFSTQ. Čtvrtým a posledním peptidem je peptid K, odvozený z proteinu BMP-2, aminokyselinová sekvence je KIPKASSVPTELSAISTLYL. Vybrané proteiny jsou asociovány s vlivem na osteogenní diferenciaci MSC. U vybraných diferenciačních peptidů se předpokládá, že by měly mít vliv na osteogenní diferenciaci MSC, jelikož jsou odvozeny ze sekvencí, které se váží na buněčné receptory.

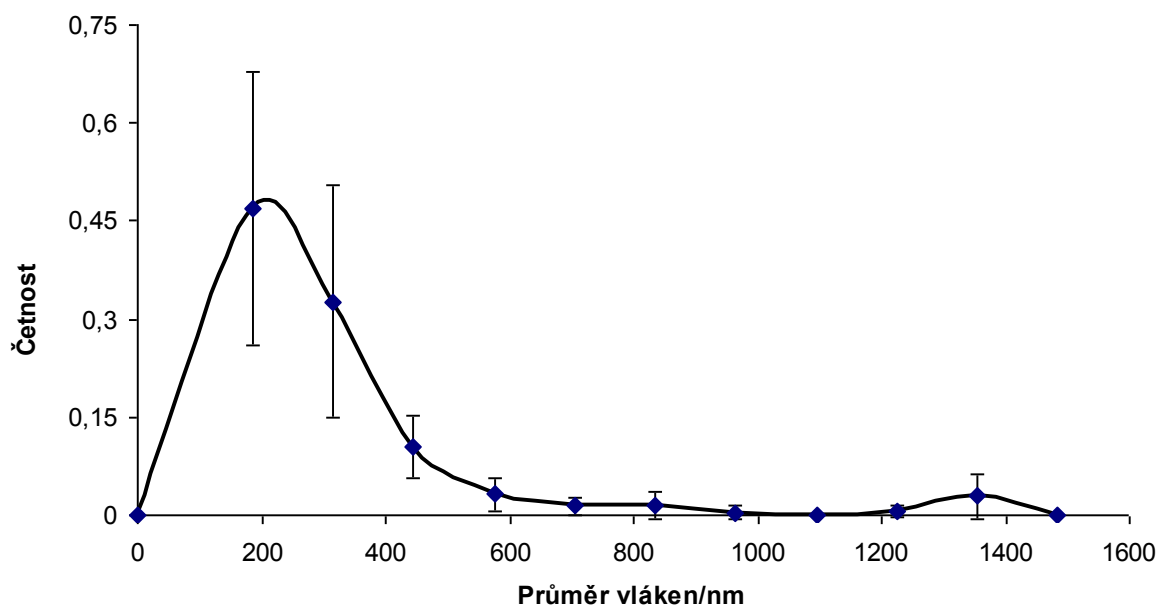
Osteogenní diferenciaci se nejčastěji navozuje pomocí média s přidavkem osteogenních suplementů. Záměrem této práce bylo porovnat, jaký vliv na diferenciaci prasečích MSC vykazují diferenciační peptidy v nepřítomnosti a přítomnosti osteogenních suplementů. MSC byly kultivovány na nanovlákných nosičích připravených metodou elektrostatického zvlákňování z PCL. Tento polymer je vhodný pro buněčné testování, jelikož je biodegradabilní, biokompatibilní a snadno zvláknitelný. Podporuje buněčnou adhezi a proliferaci. Z těchto důvodů byl vybrán jako vhodný buněčný nosič pro testování vlivu diferenciačních peptidů na osteogenní diferenciaci MSC.

2.2.1 ANALÝZA POLYKAPROLAKTONOVÉHO NOSIČE

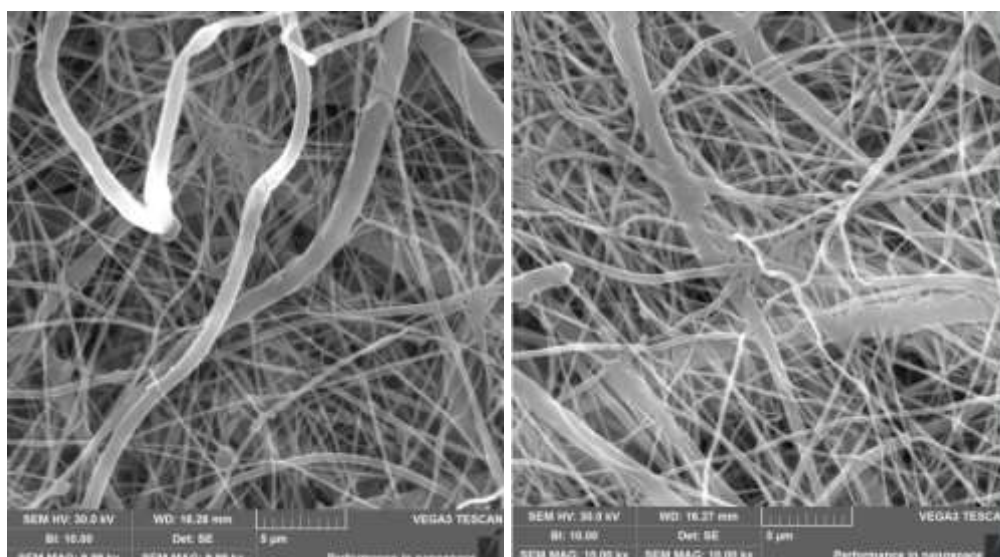
PCL nosiče byly analyzovány skenovacím elektronovým mikroskopem. Na pořízených snímcích bylo provedeno měření průměru vláken a odhad velikosti pórů, postup viz kapitola Metody.

Průměr vláken analyzovaných na PCL vrstvě se pohyboval v rozmezí od 110 nm po 1,485 μm , viz graf č. 1. Nejvyšší četnost měla vlákna s průměrem 110-240 nm. Četnost vláken se se zvyšujícím průměrem snižuje. V intervalu od 1-1,15 μm nebyla naměřena žádná vlákna s průměrem v tomto rozmezí. Následně byla naměřena vlákna v rozsahu intervalů 1,16-1,41 μm . Na PCL vrstvě se tedy nejčetněji vyskytují vlákna s průměrem v rozmezí stovek nanometrů. Dále se tu však vyskytuje i menší počet vláken s průměrem v rozmezí do 2 μm . Pro tento jev existuje dvojí vysvětlení. PCL byl rozpuštěn v ethanolu a chloroformu. Fáze vláken s ethanolom může formovat vlákna

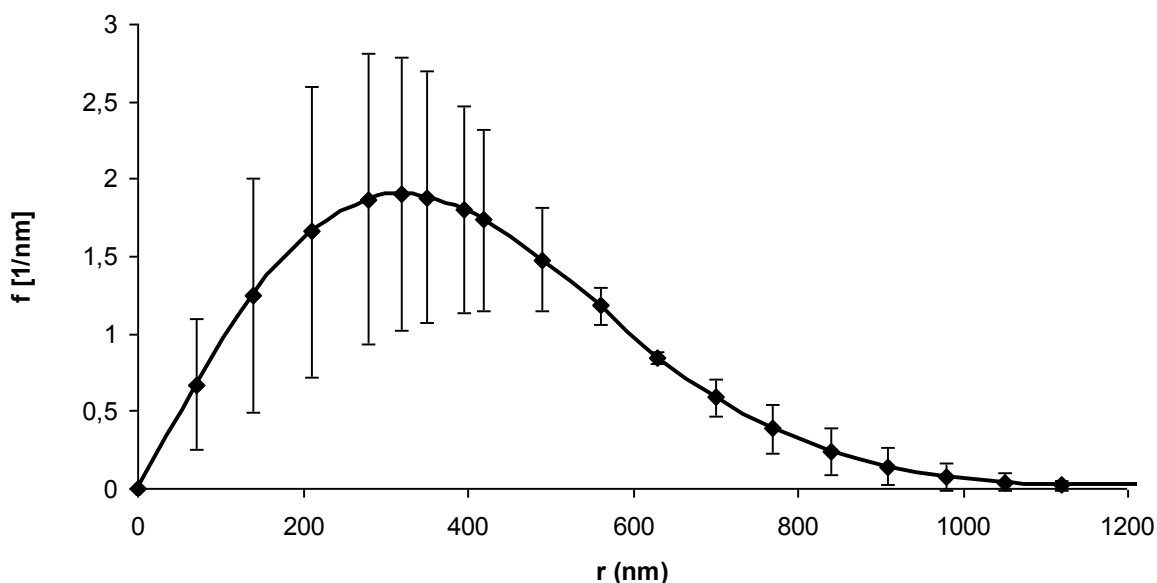
s menším průměrem a fáze vláken s chloroformem vlákna s vyšším průměrem. Druhá možná teorie vysvětlující výskyt vláken s různou tloušťkou je taková, že během formace trysky polymeru dochází k oddělování velkých kapek, z nichž se oddělují kapky menší, a ty formují nanovlákná. Velké kapky následně formují mikrovlákná. Výskyt nanovláken s množstvím mikrovláken je výhodné, jelikož buňky adherující na povrchy preferují různorodost. Adheze je poté efektivnější.



Graf č. 1: Četnost průměrů vláken PCL vrstvy



Obrázek č. 18: PCL vrstva připravená elektrostatickým zvlákňováním: Snímky pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem, na nichž bylo provedeno měření průměru vláken a byla na nich provedena také analýza odhadu velikosti pórů. Velikost měřky je 5 µm.



Graf č. 2: **Odhad velikosti pórů PCL vrstvy:** Funkce f značí hustotu pravděpodobnosti výskytu velikosti poloměru pórů.

Graf č. 2 udává odhad velikosti pórů PCL nosiče. Z uvedených hodnot vyplývá, že nejpravděpodobněji se vyskytují póry s velikostí poloměru 319 nm. Tato velikost pórů neumožňuje buňkám penetrovat do hloubky buněčného nosiče a buňky zůstávají na povrchu nosiče. Toto je patrné na obrázcích č. 45-57 a č. 86-99.

Kontaktní úhel naměřený na PCL vrstvě má velikost $82,61^\circ \pm 21,35^\circ$. Vrstvy s kontaktním úhlem nad 65° jsou označovány jako hydrofobní. U těchto vrstev je problém s iniciální adhezí buněk, jelikož objem média s buňkami při nasazování je pouze 50 μ l a tento objem má tendenci z PCL nosiče stékat. Tento problém byl však v těchto experimentech překonán postupem sterilizace buněčného nosiče. Nosiče byly nejprve po dobu 30 min máčeny v etanolu a následně proplachovány PBS pufrem.

2.2.2 VLIV DIFERENCIAČNÍCH PEPTIDŮ PŘIDANÝCH VOLNĚ DO BAZÁLNÍHO MÉDIA

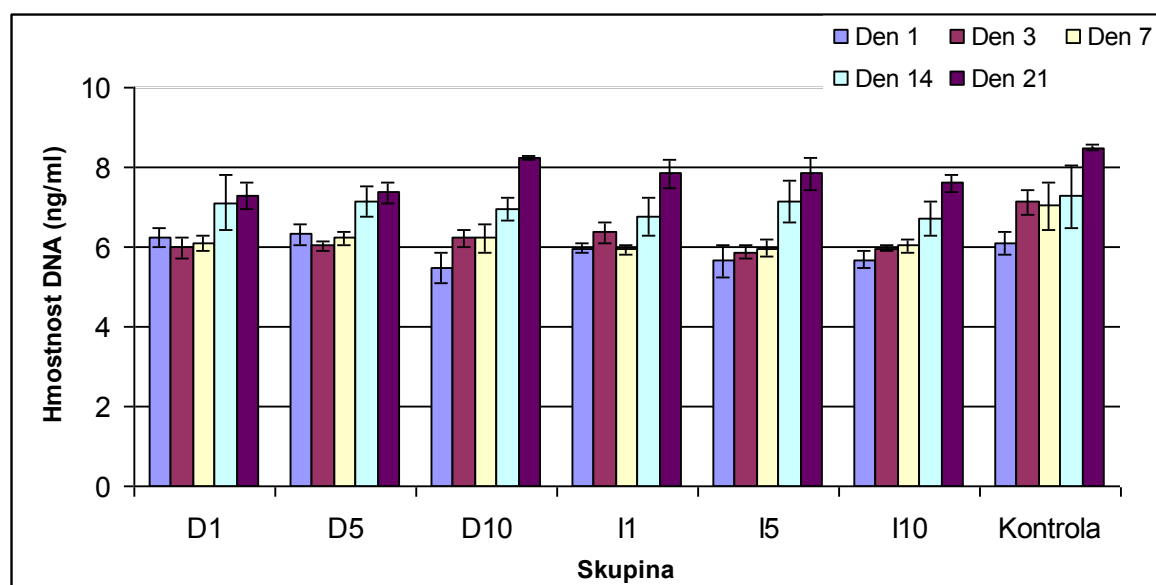
Nejprve byl testován vliv různých koncentrací diferenciačních peptidů volně přidaných do bazálního média skládajícího se z MEM, 10% FBS a 1% Penicilin/Streptomycin, na metabolickou aktivitu, adhezi, proliferaci a diferenciaci prasečích MSC. Buňky byly nasazovány na nosiče vyrobené elektrostatickým zvlákňováním z PCL a inkubovány po dobu tří týdnů. Kontrolní skupina byla v tomto pokusu zvolena jedna, její označení je Kontrola. Vzorek Kontrolní skupina byly prasečí MSC inkubované bez přídavku diferenciačních peptidů. Označení testovaných skupin s přídavkem peptidů a použité koncentrace těchto peptidů jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Označení skupin a použité koncentrace diferenciačních peptidů v experimentech

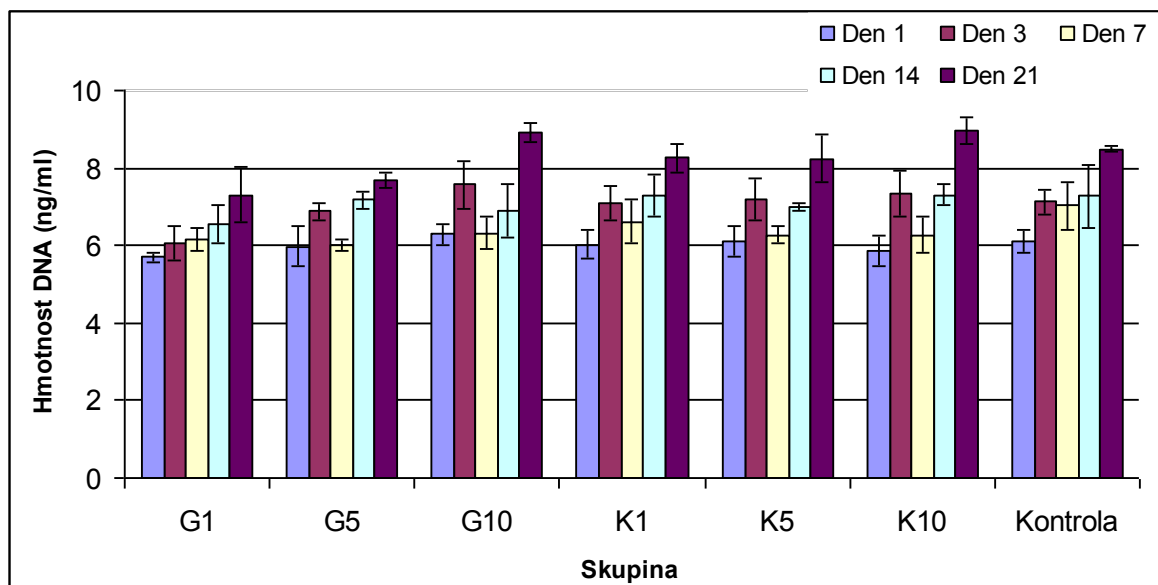
Aminokyselinová sekvence ↓	Koncentrace peptidu →	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
DGEA (D)		D1	D5	D10
IAGVGGEKSGGF (I)		I1	I5	I10
GQGFSYPYKAVFSTQ (G)		G1	G5	G10
KIPKASSVPTELSAISTLYL (K)		K1	K5	K10

2.2.2.1 KVANTIFIKACE OBSAHU BUNĚČNÉ DNA

Kvantifikace obsahu buněčné DNA byla měřena na stejných nosičích, na nichž probíhal MTS test a měření aktivity ALP. Kvantifikace probíhala pomocí PicoGreen testu 1., 3., 7., 14. a 21. den pokusu. Principem metody je detekce emitovaného fluorescenčního signálu po interkalaci PicoGreen reagentu do dvouřetězcové DNA. Celý postup viz kapitola Metody. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v grafech č. 3 a 4.



Graf č. 3: **Hmotnost DNA:** Naměřené hodnoty hmotnosti buněčné DNA na skupinách s přidávanými peptidy D a I v porovnání s Kontrolou. Měřeno pomocí PicoGreen testu.



Graf č. 4: **Hmotnost DNA:** Naměřené hodnoty hmotnosti buněčné DNA na vzorcích s přidanými peptidy G a K v porovnání s Kontrolou. Měřeno pomocí PicoGreen testu.

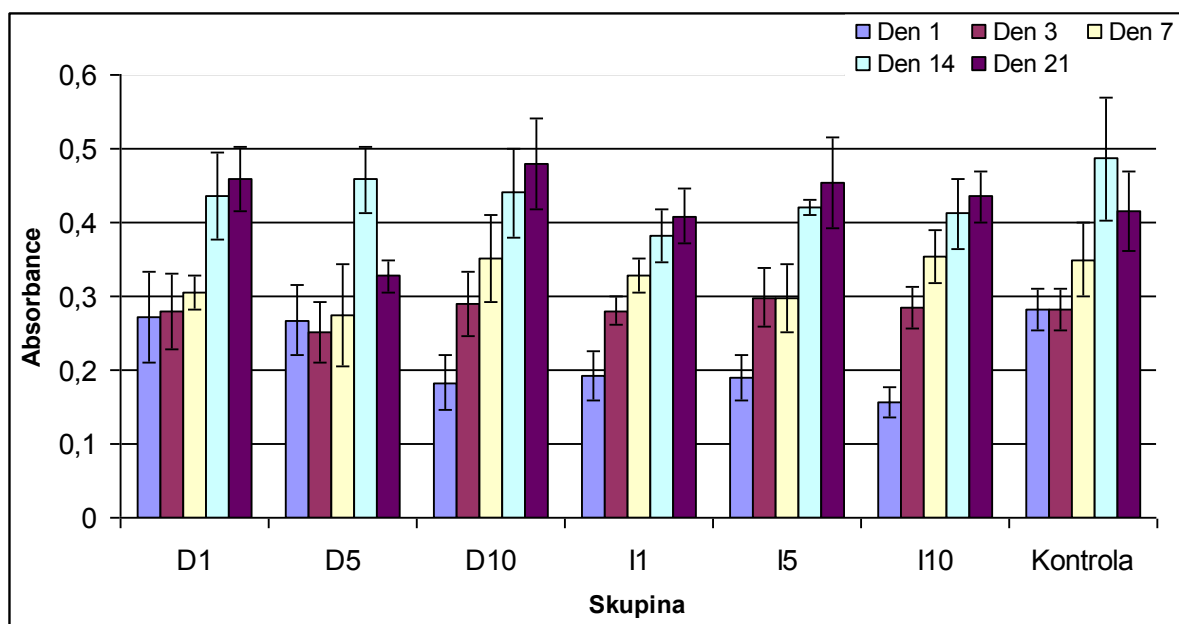
Z grafů č. 3 a 4 vyplývá, že v hmotnosti buněčné DNA na vzorcích nebyly 1. testovací den naměřeny signifikantní ($p \leq 0,05$) rozdíly. Třetí den byl naměřen jediný statisticky významný rozdíl, a to v hmotnosti buněčné DNA u skupiny G10, tato hodnota byla vyšší než hmotnost DNA u skupiny I5. V další dny, tedy 7. a 14., nebyly opět naměřeny signifikantní rozdíly mezi hmotnostmi DNA u testovaných vzorků. Signifikantní rozdíly byly naměřeny až 21. den pokusu. Hmotnost DNA u skupin K10 a G10 byla vyšší než hmotnosti u skupin D1, D5, I1, I5, I10, G1 a G5, zároveň to byly nejvyšší naměřené hodnoty. Hmotnost DNA u skupiny Kontrola byla vyšší než hodnoty na skupinách D1, D5, G1 a G5. Dále byla pro 21.den hmotnost DNA na skupinách D10, K1 a K5 vyšší než hodnoty naměřené u skupin D1, D5 a G1.

Z hodnot naměřených 1. den lze zjistit úspěšnost nasazení prasečích MSC na buněčné nosiče. Průměrná hmotnost vypočítána ze všech buněčných nosičů osazených buňkami je $5,946804 \pm 0,38053181$ ng/ml buněčné DNA. Hodnota vykazuje nízkou směrodatnou odchylku, navíc nebyl naměřen signifikantně výrazný rozdíl mezi hmotnostmi DNA 1. testovací den. Z toho plyne, že nasazení 1. den bylo úspěšné a na všechny nosiče byl nasazen přibližně stejný počet buněk. Z naměřených hodnot uvedených v grafech č. 3 a 4 vyplývá, že prasečí MSC na všech vzorcích po dobu dvaceti jedna dní proliferovaly, hmotnost buněčné DNA na vzorcích po celou dobu přibývala u všech testovaných skupin. U skupiny Kontrola, bez přidaných peptidů, můžeme rovněž pozorovat nárůst v hmotnosti buněčné DNA, z toho plyne, že PCL nosiče jsou

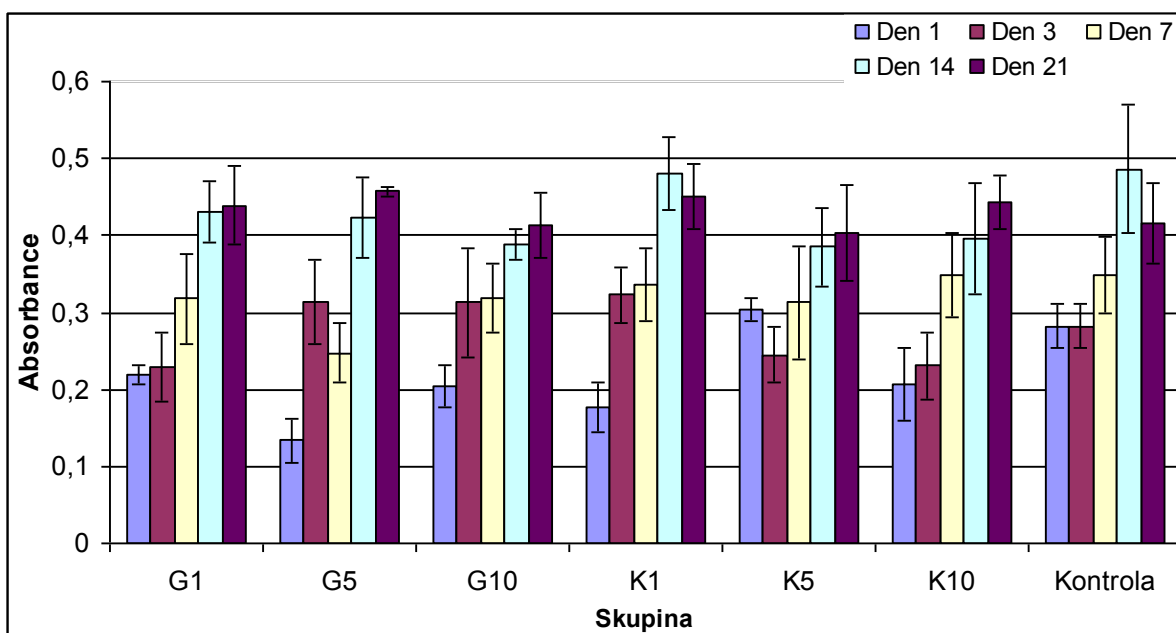
biokompatibilní. Jelikož se hmotnost buněčné DNA po celou dobu experimentu zvyšovala, nebylo dosaženo maxima v hmotnosti. Osteogenní diferenciaci je při tom v raném stádiu typická pro vrcholné hodnoty počtu buněk v průběhu do 4. dne. Tento trend neodpovídá ani jednomu typu použitého diferenciačního peptidu.

2.2.2.2 TEST METABOLICKÉ AKTIVITY

Pomocí MTS testu byla v experimentální dny, tedy 1., 3., 7., 14. a 21. den, měřena metabolická aktivita buněk. Měření probíhalo na základě MTS testu. Test je založen na aktivitě mitochondriálních enzymů, které metabolizují MTS substrát na formazan, který je detekován. Celý postup viz kapitola Metody. Z naměřených hodnot metabolické aktivity byly vytvořeny grafy č. 5 a 6.



Graf č. 5: **Metabolická aktivita buněk:** Naměřené hodnoty metabolické aktivity na vzorcích s přidanými peptidy D a I v porovnání s Kontrolou. Měřeno MTS testem.

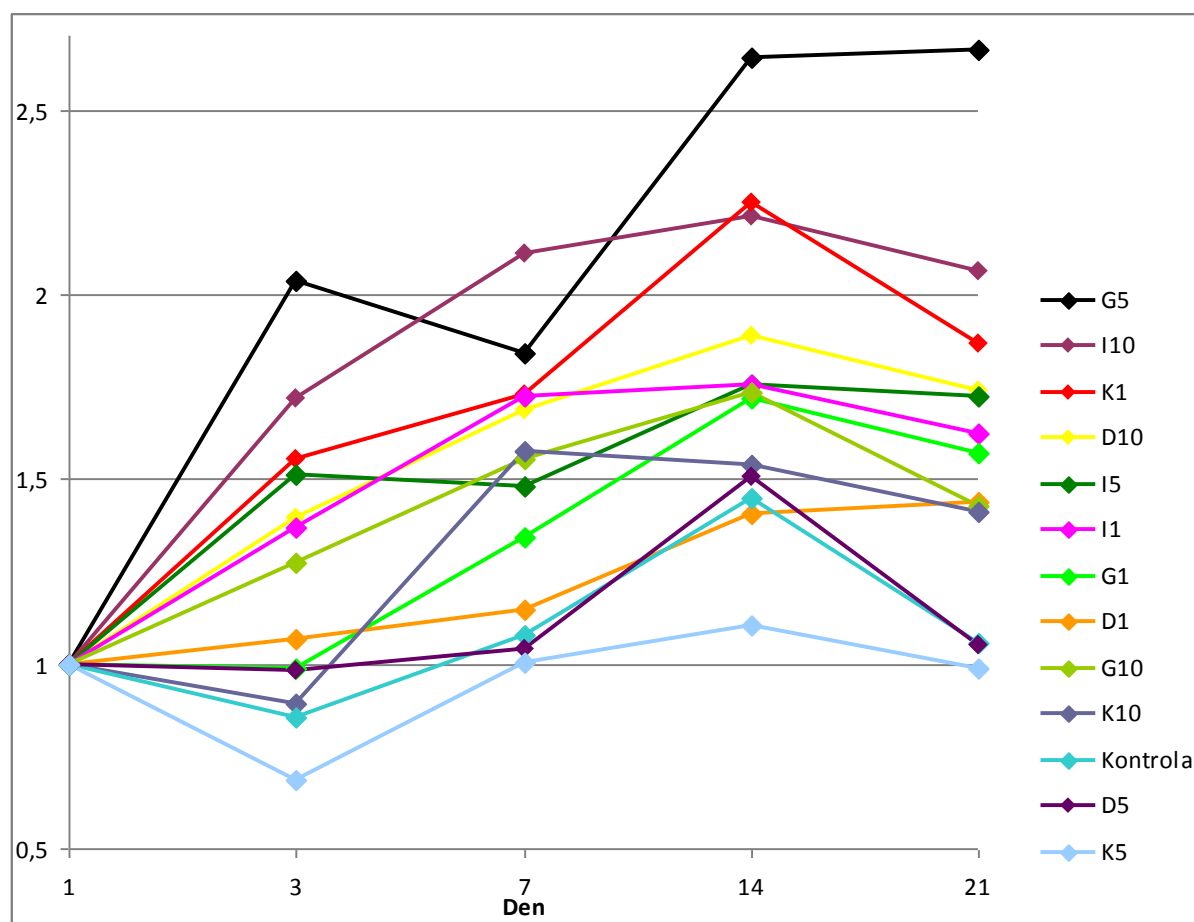


Graf č. 6: **Metabolická aktivita buněk:** Naměřené hodnoty metabolické aktivity na vzorcích s přidáním peptidy G a K v porovnání s Kontrolou. Měřeno MTS testem.

Z grafů č. 5 a 6 plyne, že nejvyšší metabolická aktivita byla naměřena 1. den u buněk nasazených na skupinu K5. Tato hodnota byla signifikantně vyšší než hodnota u buněk nasazených na skupiny D5, D10, I1, I5, 10, G1, G5, G10, K1 a K10. Dále byly naměřeny signifikantně vyšší hodnoty u skupiny Kontrola v porovnání se skupinami D10, I1, I5, I10, G5 a K1. Skupina D1 vykazuje statisticky vyšší hodnoty pro 1. den v porovnání se skupinami I10, G10 a K1. Vyšší signifikantní hodnota byla dále 1. den naměřena u skupiny D5 v porovnání se skupinami I10 a G5. V průběhu 3., 7. a 14. dne nebyly naměřeny statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami. Signifikantně vyšší hodnoty pak byly naměřeny až 21. den u skupin D1, D10, I5, I10, G1, G10, K1, K10 v porovnání se skupinou D5, hodnoty viz grafy č. 5a 6.

V průběhu pokusu trvajícího tři týdny se hodnota absorbance u všech testovaných skupin zvyšuje. Hodnoty pro 1. den se pohybují v rozmezí absorbance 0,13375 - 0,304417. K 21. dni hodnoty absorbance v průměru vzrostly o 50 %, nejvyšší naměřená absorbance pro 21. den je 0,47875 u skupiny D10. Tento fakt spolu s nárůstem buněčné DNA, měřené pomocí PicoGreen testu, vede k podpoře názoru, že PCL je biokompatibilním polymerem pro výrobu buněčných nosičů. Rozdíly naměřené 1. den byly již tři dny od nasazení sjednoceny. V průběhu dalších testovacích dní se rozdíly mezi skupinami vyrovnaly. Výjimkou je 21. den u vzorku D5, který vykazuje statisticky nejnižší naměřenou hodnotou absorbance, $0,3275 \pm 0,02136$.

Měření metabolické aktivity nereflektuje počet buněk na vzorcích. Vysoká hodnota může jednak znamenat, že na vzorcích je velký počet buněk, které jsou méně aktivní, a nebo může znamenat nízký počet buněk, které jsou velmi metabolicky aktivní. Roli zde hraje i počet mitochondrií v jedné buňce. Z těchto důvodů byl ve stejné testovací dny, jako probíhal MTS test, kvantifikován i obsah buněčné DNA na stejných nosičích, viz kapitola 2.2.2.1. Hodnota absorbance udává metabolickou aktivitu všech buněk na vzorku, viz grafy č. 5 a 6. Tato hodnota po vydělení hodnotou udávající hmotnost buněčné DNA z příslušného vzorku pro daný den, viz grafy č. 3 a 4, nám ukáže metabolickou aktivitu připadající pro jednu buňku na buněčném nosiči. Tato hodnota je uvedena v grafu č. 7 a je normována na první den.



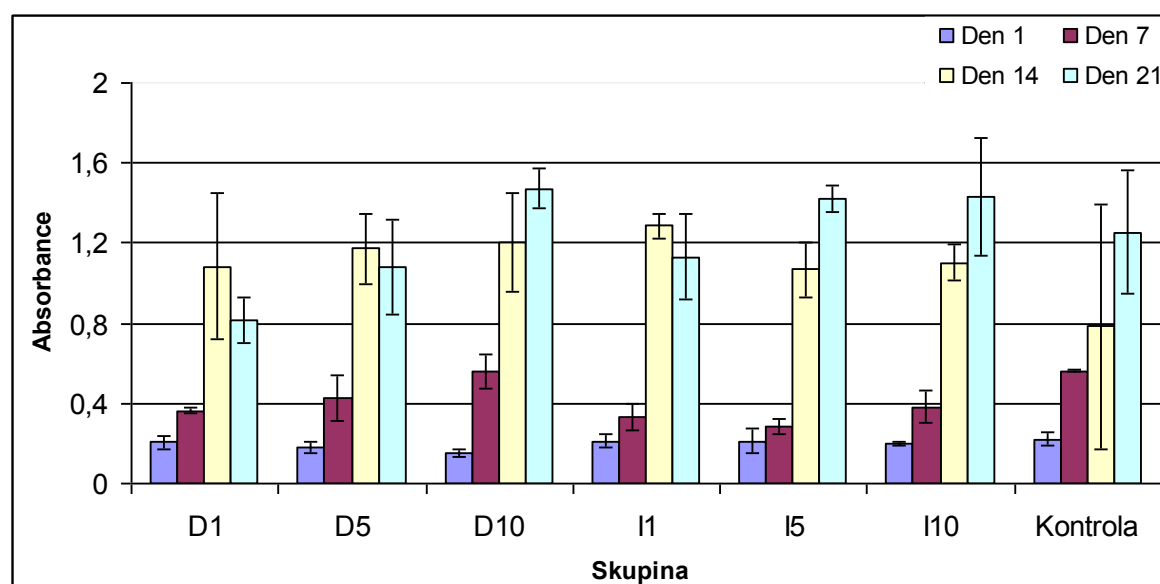
Graf č. 7: **Podíl absorbance ku hmotnosti buněčné DNA:** Graf vytvořený z naměřených hodnot PicoGreen a MTS testu, ukazující metabolickou aktivitu připadající na jednu buňku.

Z grafu č. 7 vyplývá, že hodnota metabolické aktivity jednotlivých buněk se na vzorcích zvyšuje až do 14. dne. Od 14. dne dochází k mírnému poklesu hodnot. To je s nejvyšší pravděpodobností způsobeno podmínkami při *in vitro* kultivaci. Buňky jsou kultivovány v systému odlišném od *in vivo* podmínek, nedochází zde k odčerpávání

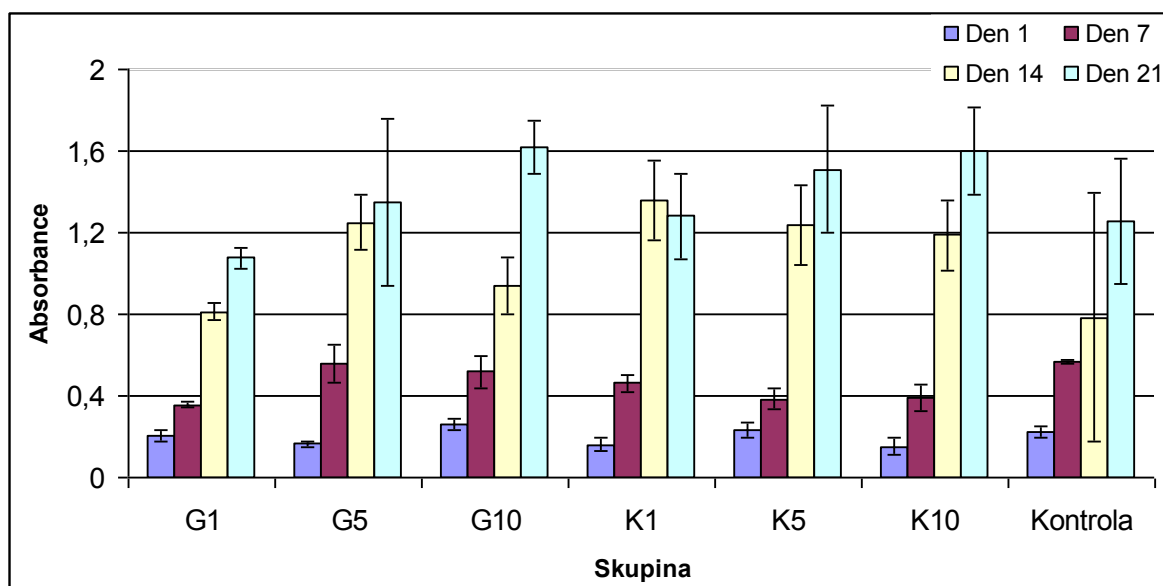
metabolitů z média, kumulují se zde mrtvé buňky, nedochází k interakci s dalšími buněčnými typy a chybí trojrozměrná ECM. Tedy to, že v průběhu pokusu chybí komplexita tkáně, má negativní vliv na buňky. Tento vliv se v průběhu pokusu kumuluje, a proto dochází k mírnému poklesu metabolické aktivity prasečích MSC. Výjimkou jsou skupiny G5 a D1, které vykazují vyšší metabolickou aktivitu i 21. den pokusu. Skupina G5 má pak nejvyšší hodnoty ze všech skupin. Na rozdíl od skupiny D1, která má jednu z nejnižších hodnot. Skupina Kontrola má velmi nízkou hodnotu metabolické aktivity. Tento fakt poukazuje na pozitivní vliv diferenčních peptidů na metabolickou aktivitu buněk, při čemž nejlepší vliv má již zmíněný peptid G5. Dále se lépe než skupina Kontrola jeví všechny skupiny kromě skupin K5 a D5. Skupina D5 vykazuje shodný průběh metabolické aktivity, jako je u Kontrolní skupiny. Skupina K5 má pak nejnižší hodnoty metabolické aktivity.

2.2.2.3 AKTIVITA ALKALICKÉ FOSFATÁZY

Aktivita ALP byla měřena na základě hydrolýzy pNPP, s nímž jsou buňky inkubovány, na p-nitrofenol, který byl následně detekován. Kvůli efektivnosti porovnávání naměřených hodnot byly nosiče po MTS testu promyty v PBS pufru a následně na nich byla měřena aktivita ALP. Celý postup viz kapitola Metody. Naměřené hodnoty z 1., 7. 14. a 21. dne jsou zaznamenány v grafech č. 8 a 9.



Graf č. 8: **Aktivita ALP:** Naměřené hodnoty aktivity ALP na vzorcích s přidanými peptidy D a I v porovnání s Kontrolou.



Graf č. 9: **Aktivita ALP:** Naměřené hodnoty aktivity ALP na vzorcích s přidanými peptidy G a K v porovnání s Kontrolou.

Hodnoty vynesené do grafů č. 8 a 9 uvádí, že rozdíly v aktivitě ALP na vzorcích nebyly 1. den signifikantně významné. Naměřené hodnoty absorbance se pohybovaly v rozmezí 0,1535 – 0,262417. Sedmý experimentální den měření byl zaznamenán statisticky významný rozdíl u skupin D10, G5 a G10 v porovnání s aktivitou ALP naměřenou na skupinách I5, tato hodnota byla nižší. Čtrnáctý den byla naměřena signifikantně vyšší aktivita ALP u skupin G1 a K1 v porovnání s Kontrolní skupinou. Aktivita ALP naměřená 21. den u skupin G10, K5 a K10 byla vyšší než aktivita ALP u skupiny D1.

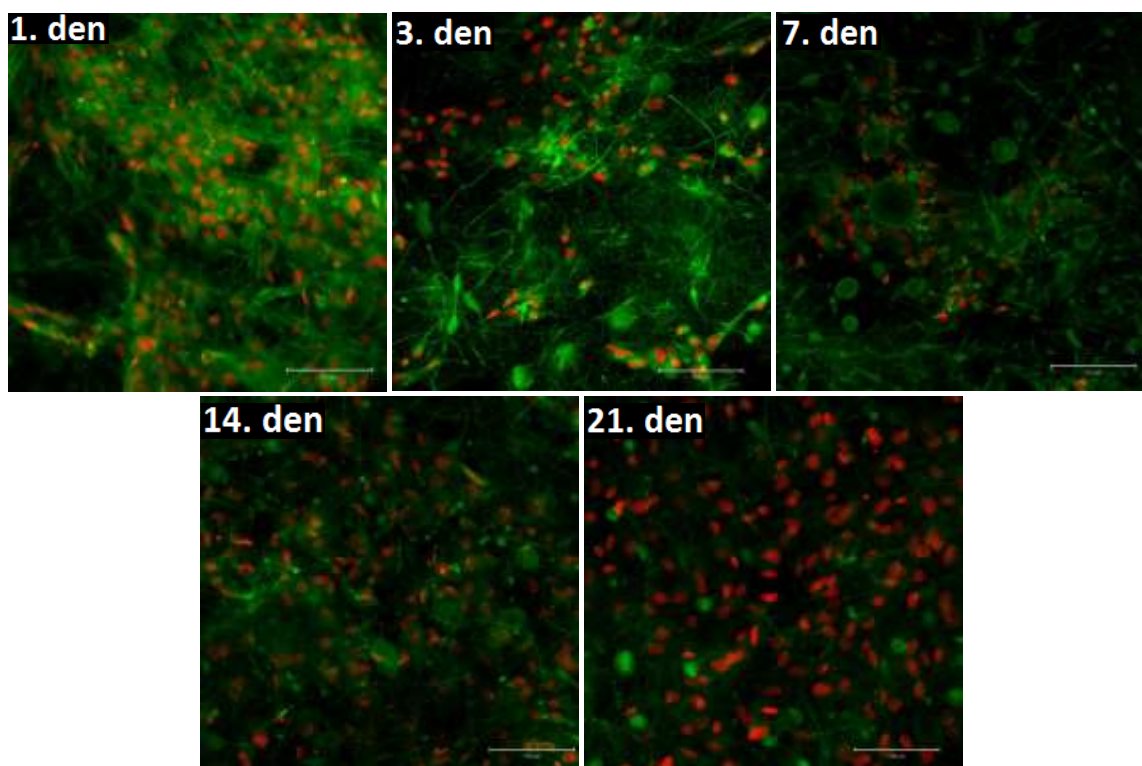
ALP je raným markerem osteogenní diferenciaci MSC. Její aktivita při osteogenní diferenciaci buněk by měla stoupat od 5. do 14. dne. V tomto časovém intervalu je při osteogenní diferenciaci dosaženo maxima v ALP aktivitě. Následně buňky dozrávají, dochází k poklesu ALP aktivity a k depozici minerálů. Při kultivaci buněk v médiu bez osteogenních suplementů by mělo docházet k expresi ALP, ovšem bez následného procesu mineralizace, jelikož v médiu chybí zdroj anorganického fosfátu, jakým je β -glycerol fosfát.

Na testovaných vzorcích je patrný nárůst aktivity ALP po celou dobu kultivace, která probíhala dvacet jedna dní. Za tuto dobu ovšem nebylo u většiny vzorků dosaženo maxima v aktivitě ALP. Maximální hodnota je pozorovatelná 7. den na vzorcích D5, I1 a K1. Stoupající hodnoty v aktivitě ALP jsou pozorovatelné i na vzorku Kontrola, na který nebylo působeno diferenciacními peptidy. Tyto výsledky naznačují, že

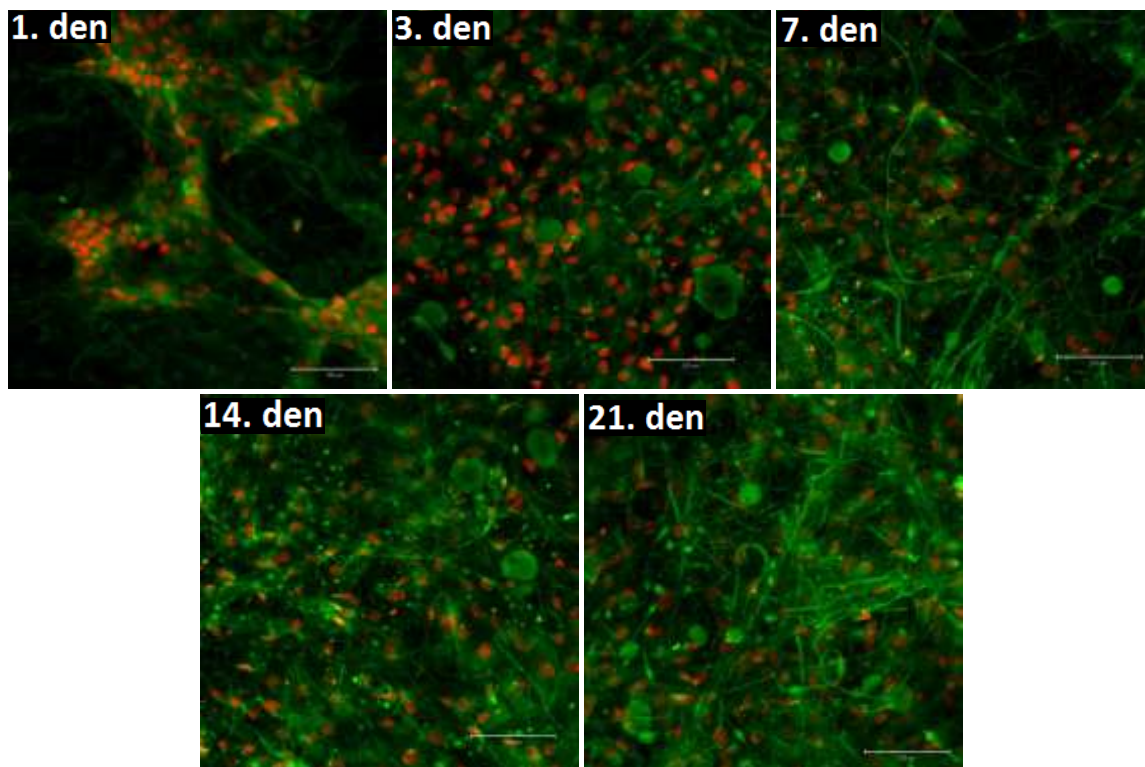
u prasečích MSC kultivovaných na všech typech vzorků dochází k expresi ALP. K expresi dochází i bez jakýchkoliv osteogenních suplementů, což je pozorovatelné na vzorku Kontrola. ALP aktivita se po dobu pokusu zvyšuje, ale nebylo dosaženo maxima v její aktivitě.

2.2.2.4 VIZUALIZACE ADHEZE BUNĚK

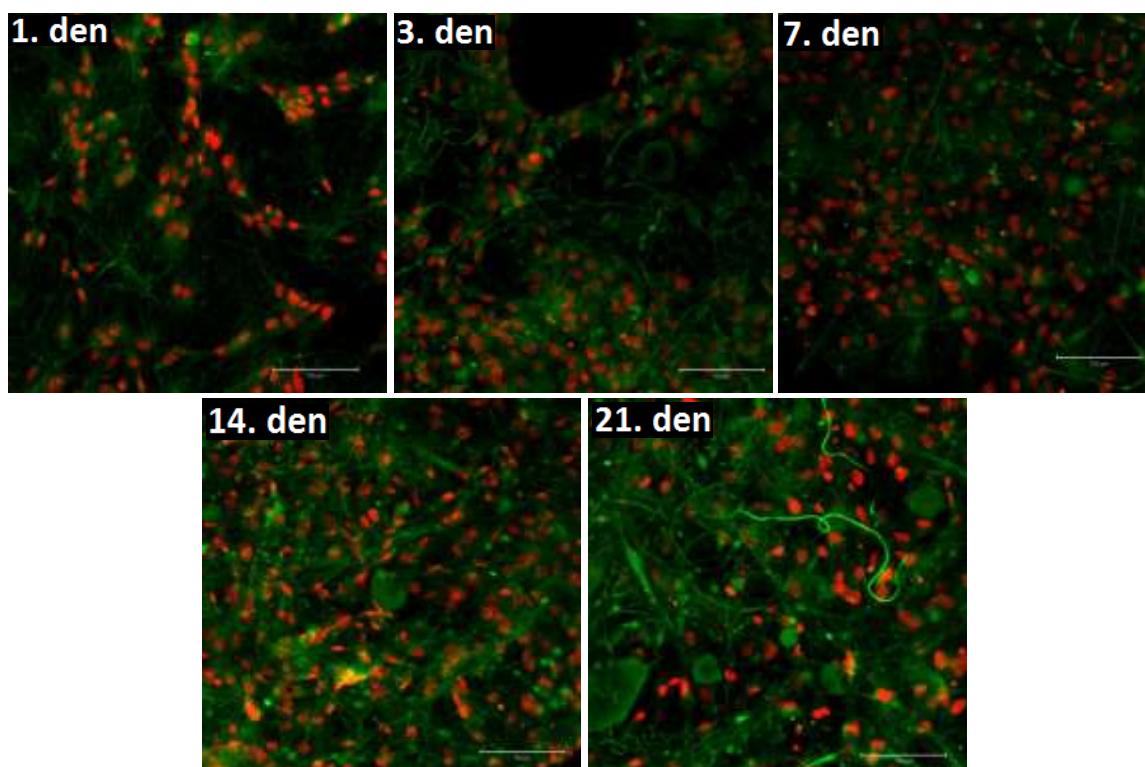
Adheze prasečích MSC na nosiče a chování těchto buněk v průběhu třítydenního pokusu bylo sledováno pomocí konfokální mikroskopie a je zachyceno na obrázcích č. 19-31. V experimentální dny, tedy 1., 3., 7., 14. a 21. den, byly buňky zafixovány metanolem a byly obarveny fluorescenčními barvivy. Jádra byla nabarvena propidium jodidem, červená jádra na snímcích, a membránové struktury barvou DiOC6, zelené struktury. Celý postup viz kapitola Metody.



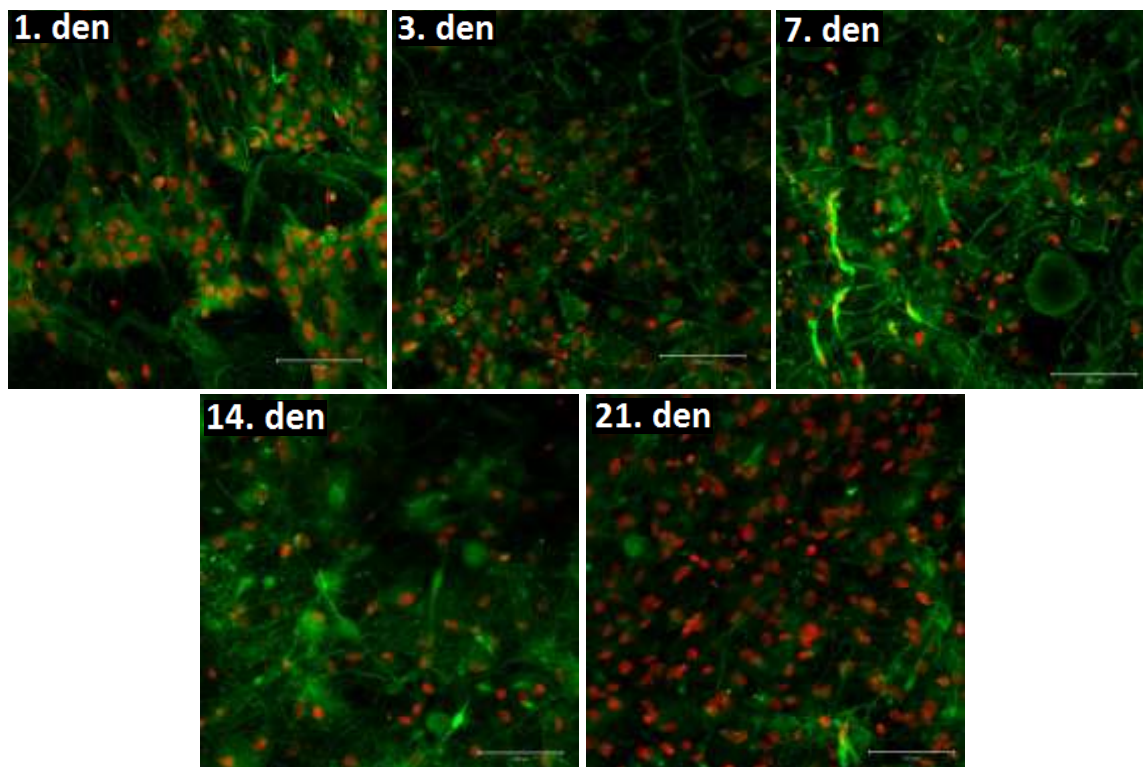
Obrázek č. 19: **Skupina D1:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



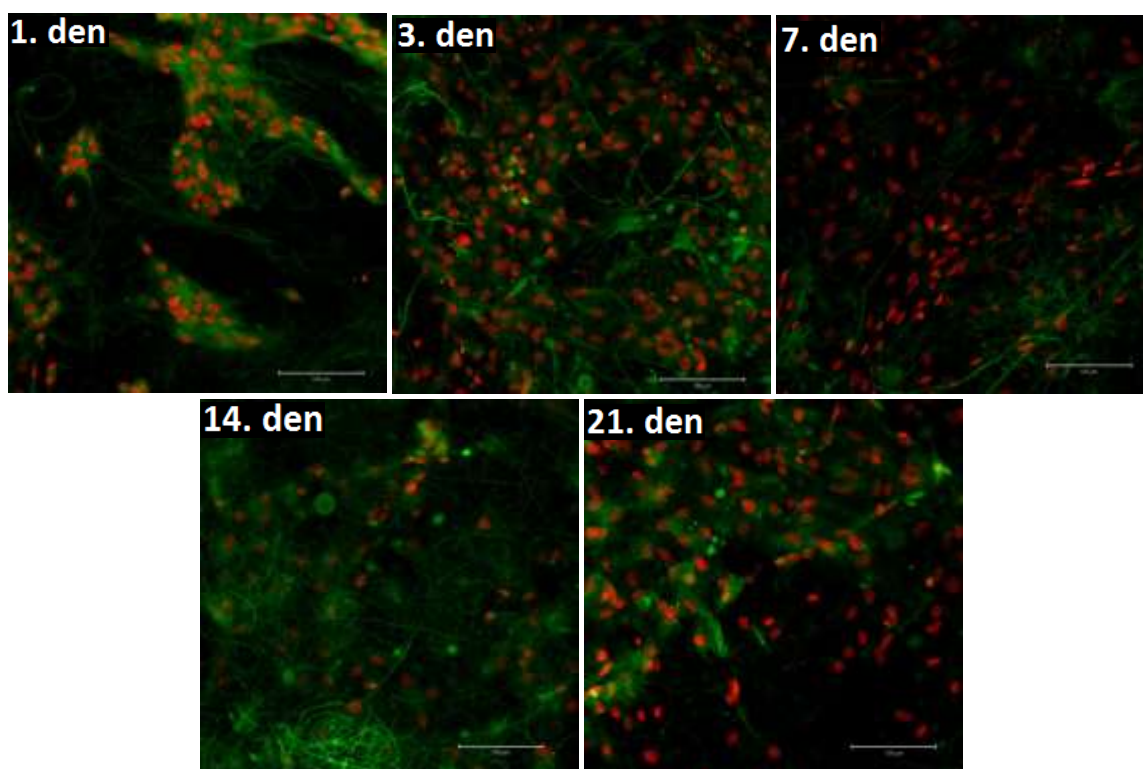
Obrázek č. 20: **Skupina D5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



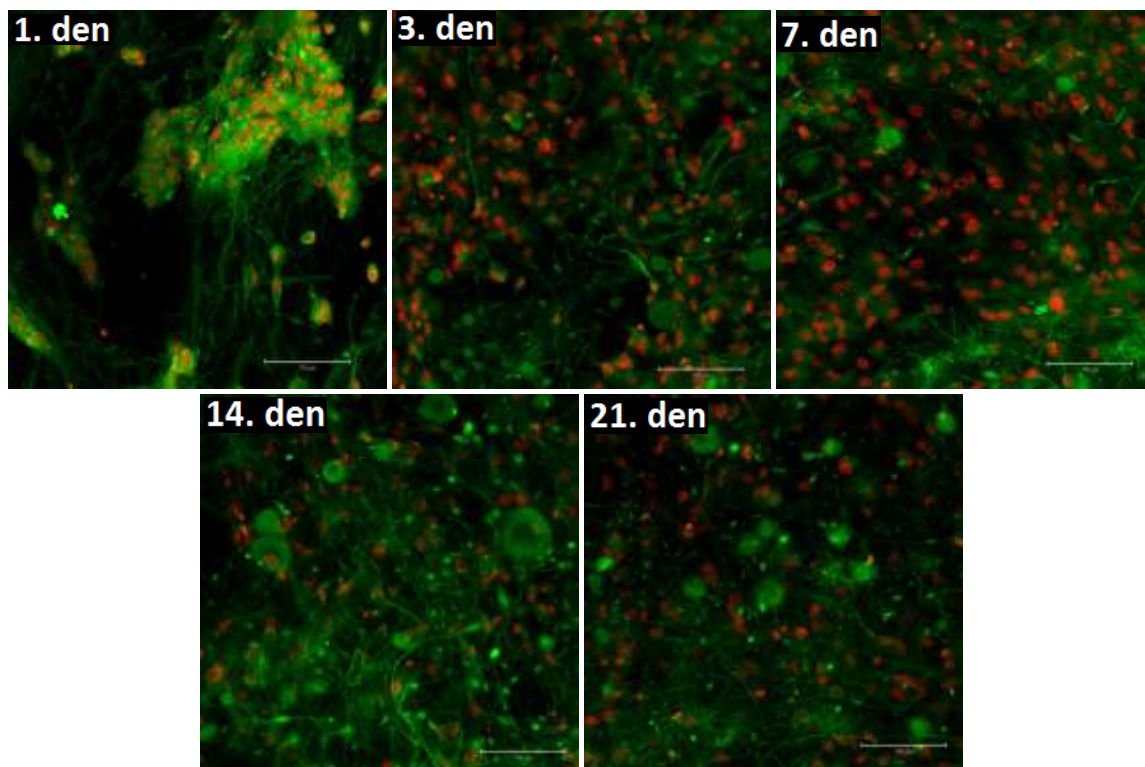
Obrázek č. 21: **Skupina D10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



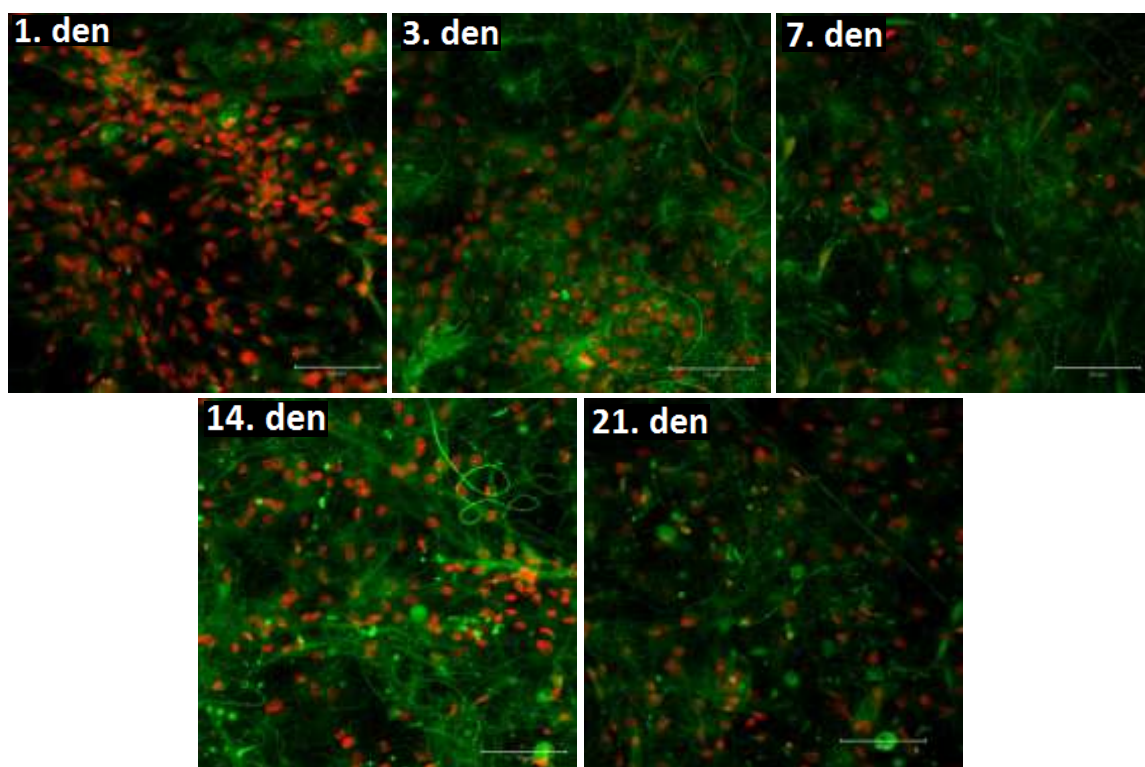
Obrázek č. 22: **Skupina II:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



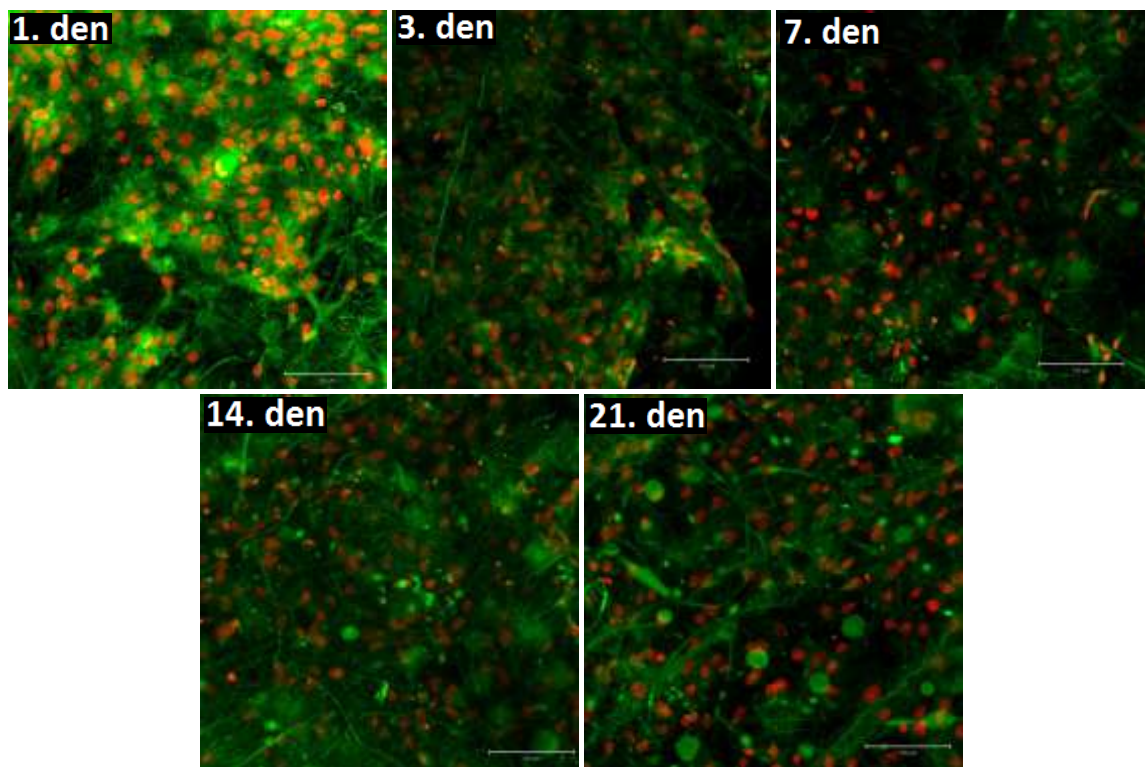
Obrázek č. 23: **Skupina I5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



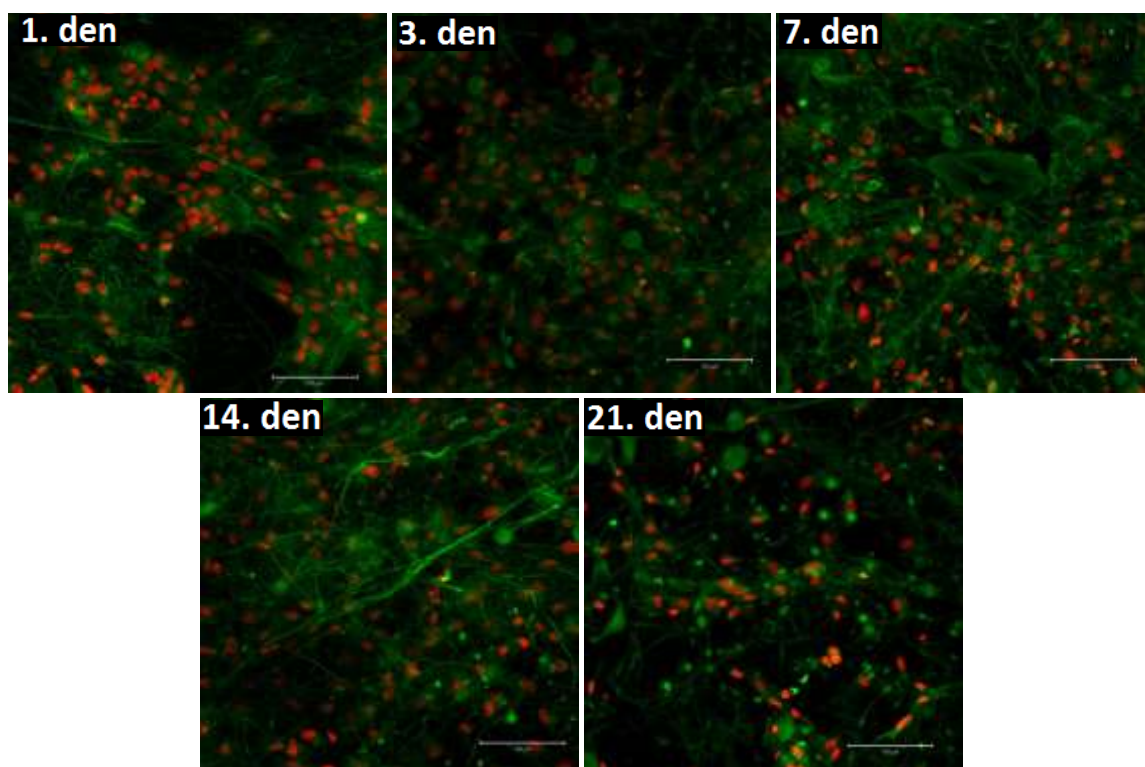
Obrázek č. 24: **Skupina I10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



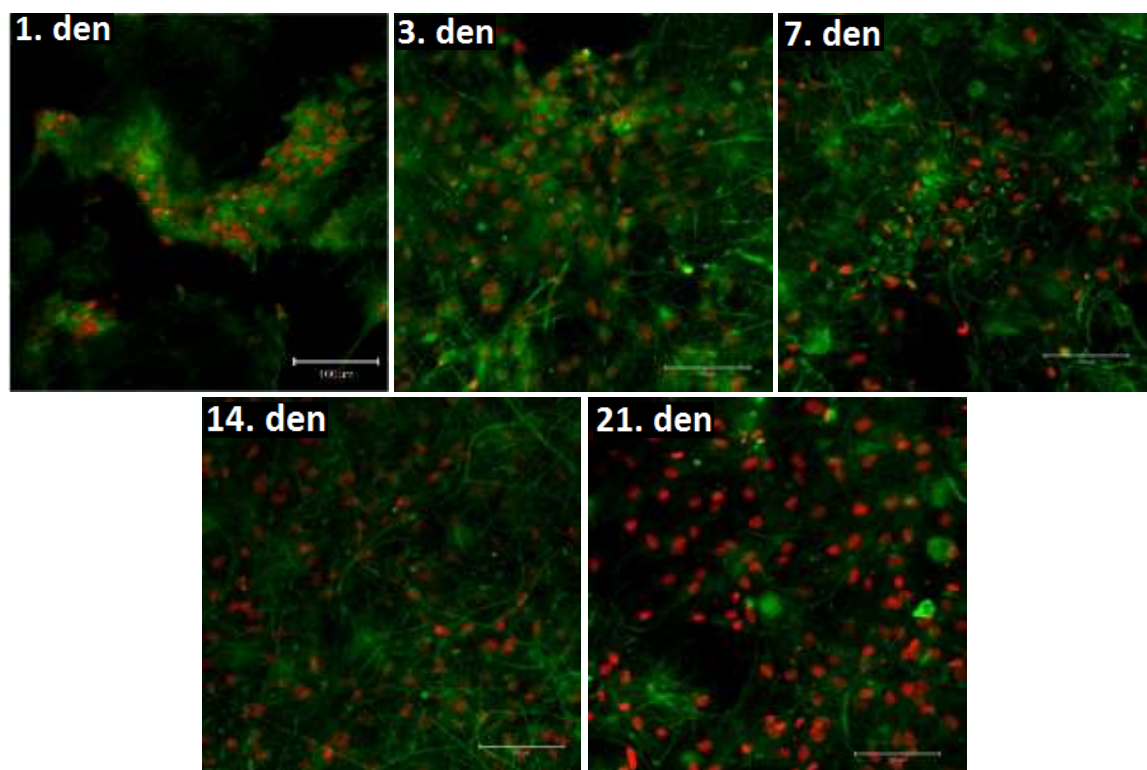
Obrázek č. 25: **Skupina G1:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



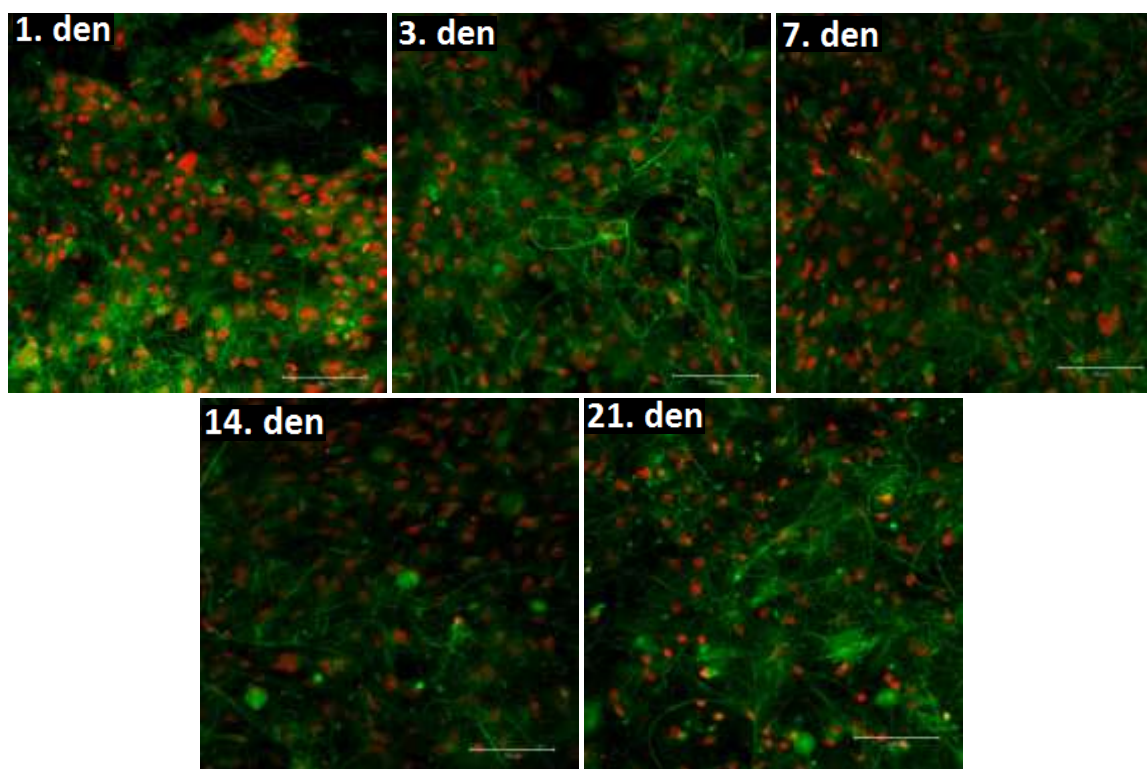
Obrázek č. 26: **Skupina G5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



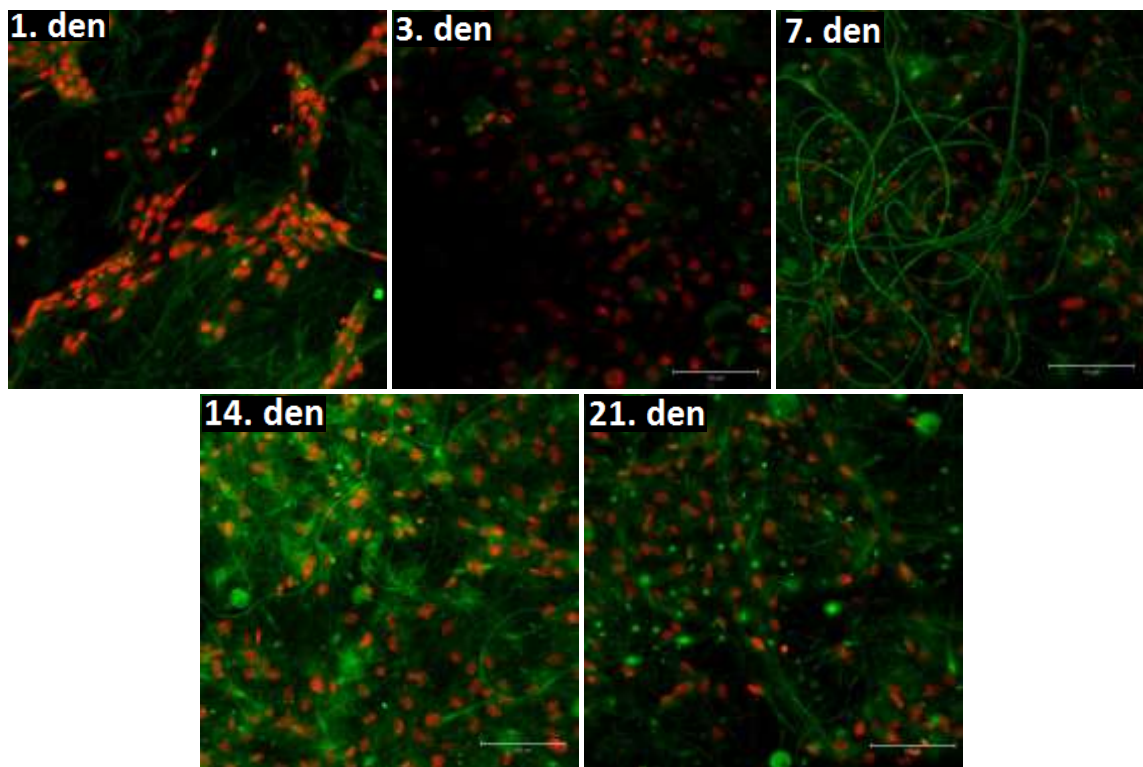
Obrázek č. 27: **Skupina G10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



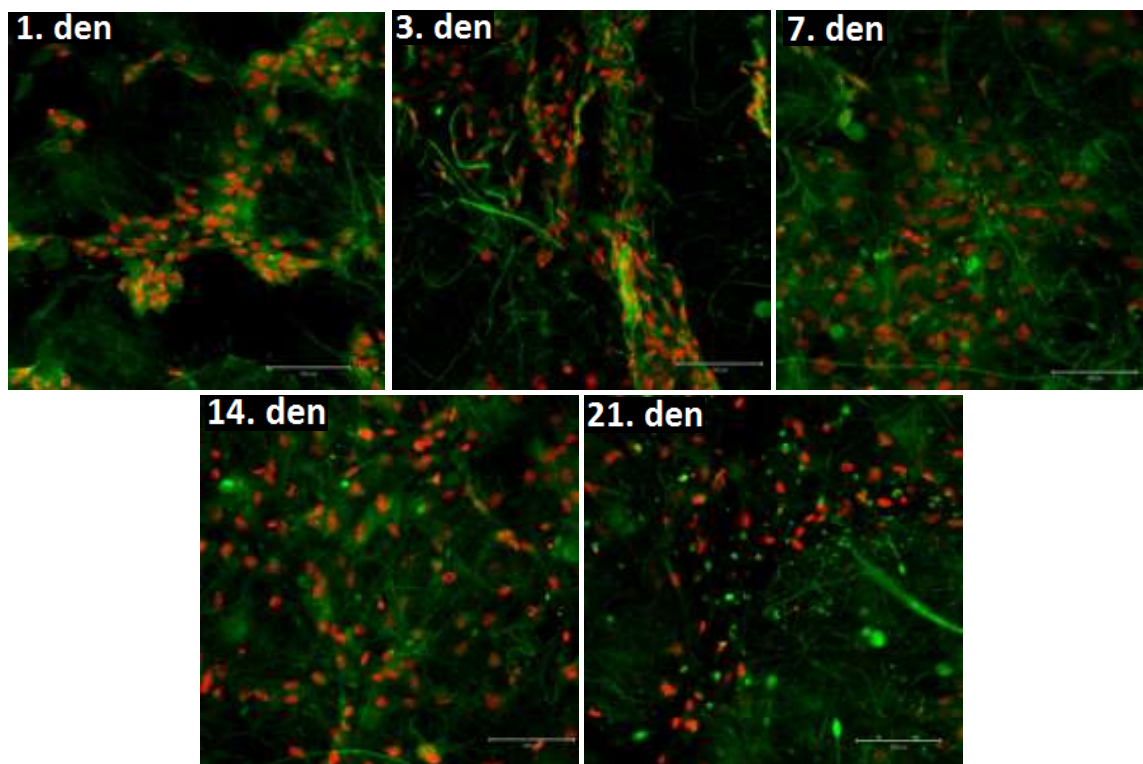
Obrázek č. 28: **Skupina K1:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



Obrázek č. 29: **Skupina K5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



Obrázek č. 30: **Skupina K10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



Obrázek č. 31: **Skupina Kontrola:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .

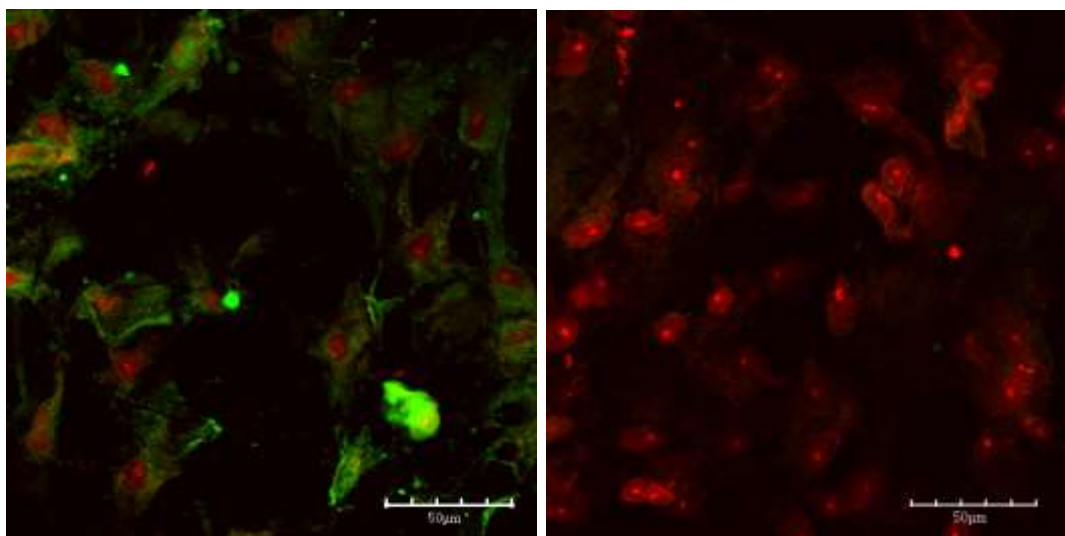
Na všech vzorcích, viz obrázky č. 19-31, jsou prasečí MSC 24 hodin po nasazení agregovány dohromady. Jelikož jsou buňky ve velkých shlucích a překrývají se, nebylo

možné spočítat plochu buněk adherentních na nosič. Pro představu o ploše buněk 1. den po nasazení byly pořízeny snímky pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, viz obrázky č. 45-57. V průběhu pokusu prasečí MSC postupně zaplnily celý nosič konfluentní vrstvou. Od 7. dne lze pozorovat na nosičích změnu, buňky disagregují a jsou na nosičích rozloženy rovnoměrněji a samostatněji. Na všech vzorcích dochází k podobnému vývoji a výrazný rozdíl mezi vzorky není zaznamenán.

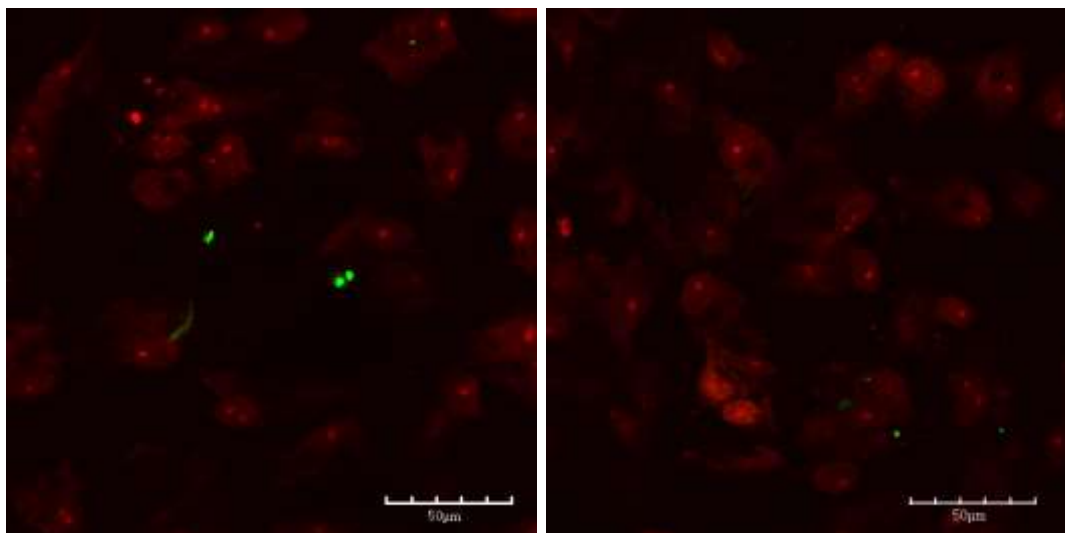
Z PicoGreen testu kvantifikace buněčné DNA víme, že hmotnost buněčné DNA na vzorcích po celou dobu stoupla a mezi jednotlivými skupinami se příliš nelišila, viz grafy č. 3 a 4. Případný rozdíl v počtu buněk na nosičích je tak způsoben promývacími kroky, které jsou součástí postupů barvení vzorků. Při nich mohlo docházet k odmytí buněk z povrchu PCL nosiče.

2.2.2.5 BARVENÍ OSTEOKALCINU

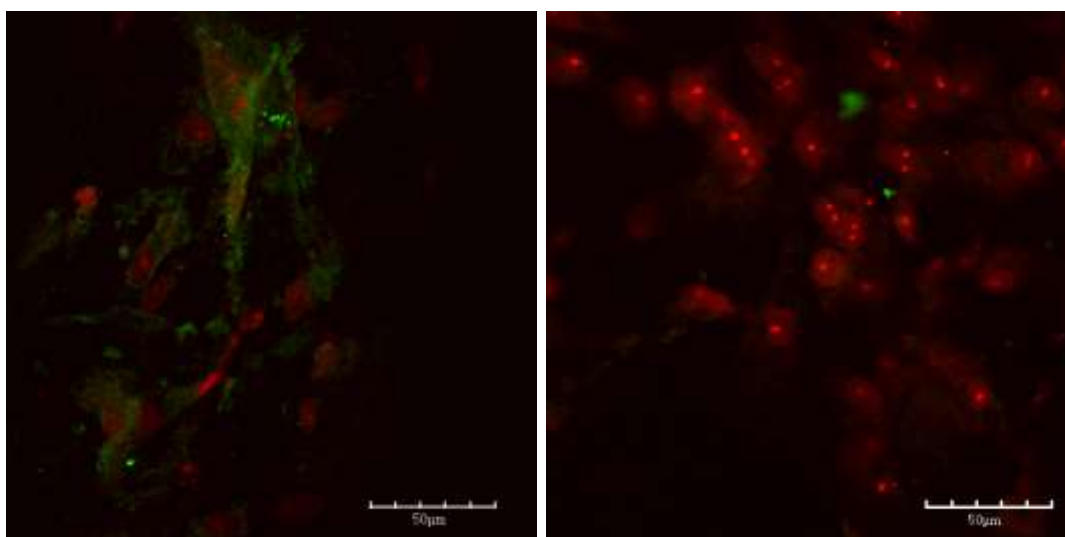
Osteokalcin je pozdní marker osteogenní diferenciace, z tohoto důvodu byly vzorky 14. a 21. den zafixovány formaldehydem a obarveny primární protilátkou proti osteokalcinu. Na primární protilátku byla navázána sekundární protilátka, Alexa Fluor 488 na snímcích z konfokálního mikroskopu svítí zeleně. Jádra byla obarvena propidium jodidem, který je na snímcích červený, viz obrázky č. 32-44. Celý postup viz kapitola Metody.



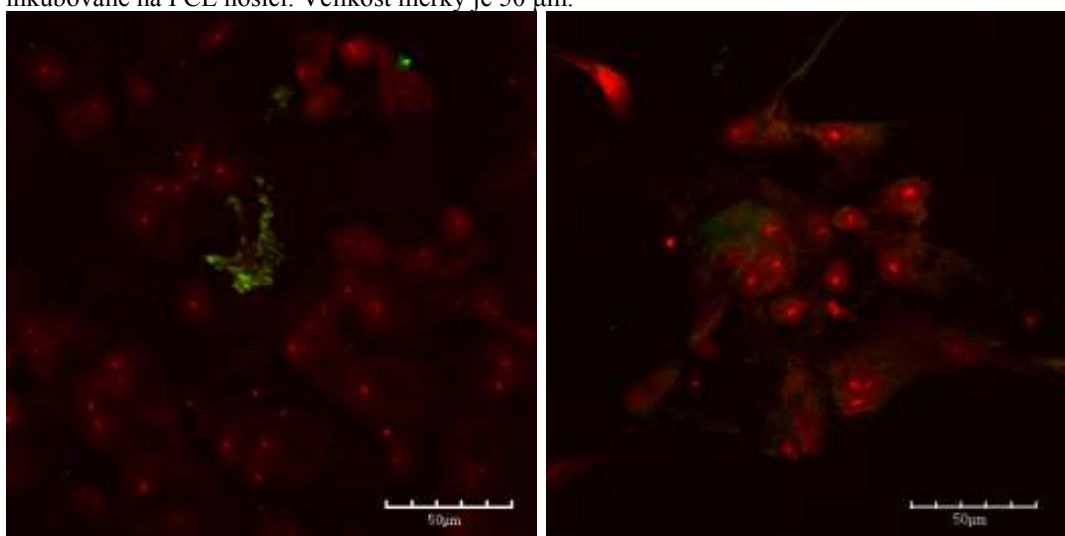
Obrázek č. 32: **Skupina D1:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



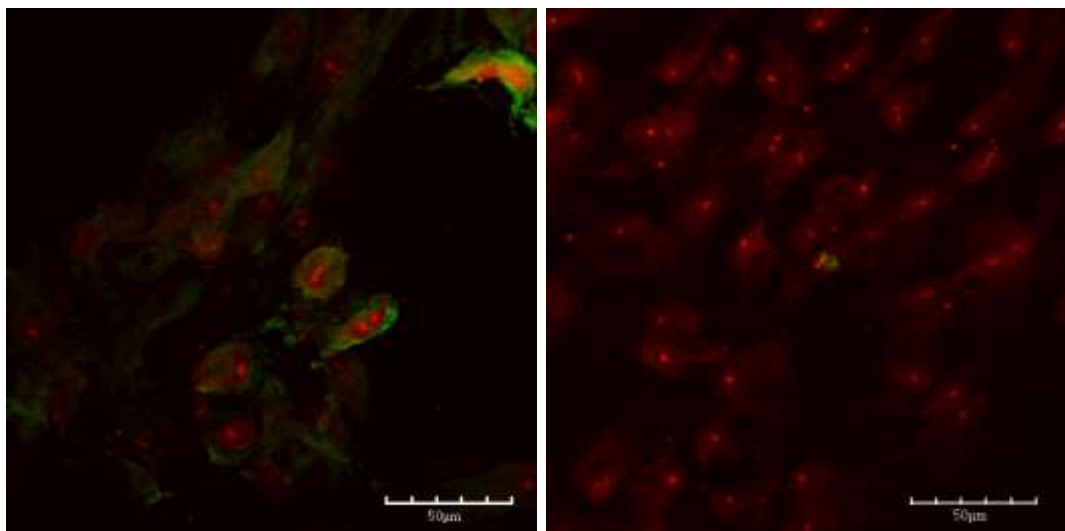
Obrázek č. 33: **Skupina D5:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



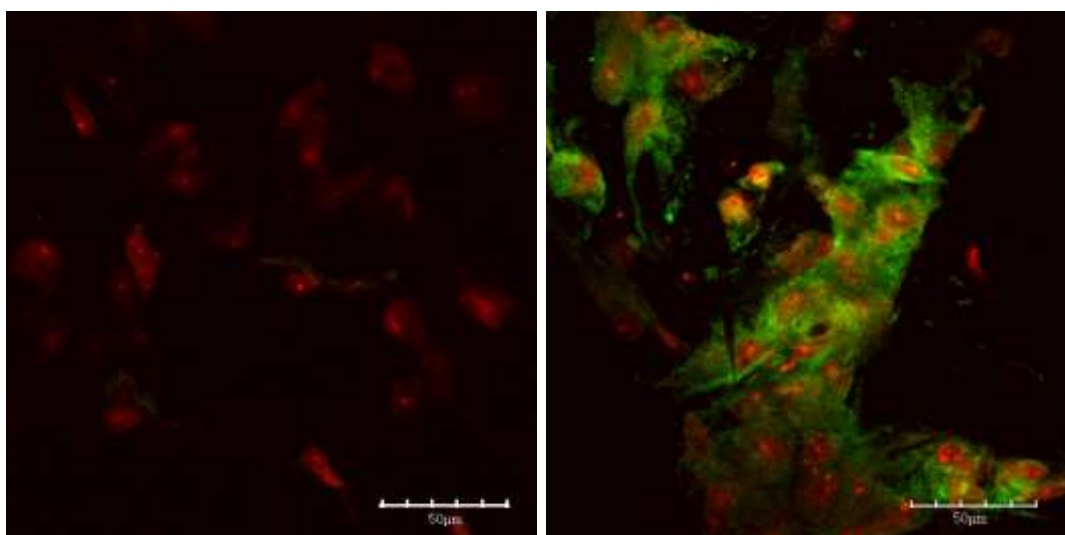
Obrázek č. 34: **Skupina D10:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



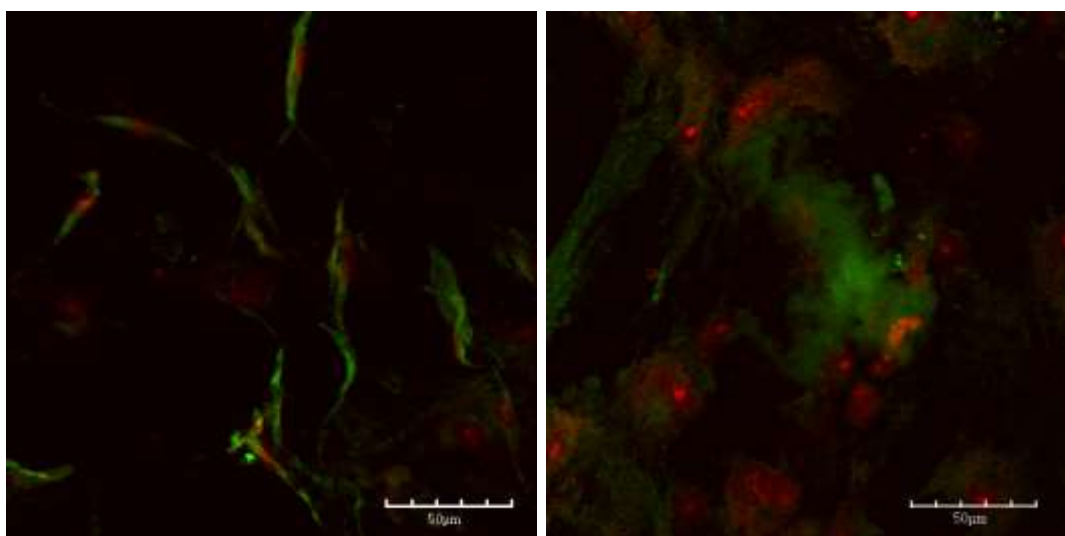
Obrázek č. 35: **Skupina I1:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



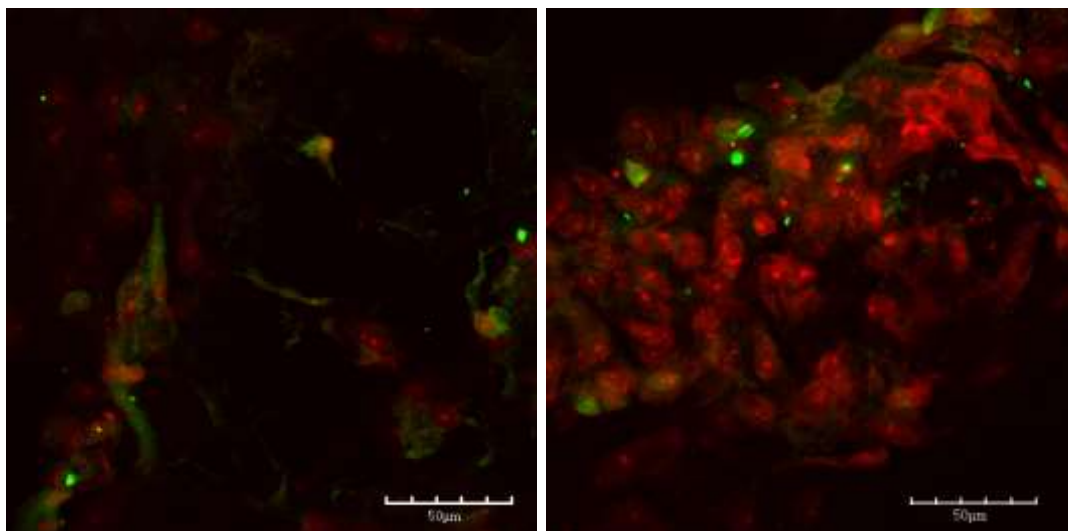
Obrázek č. 36: **Skupina 15:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



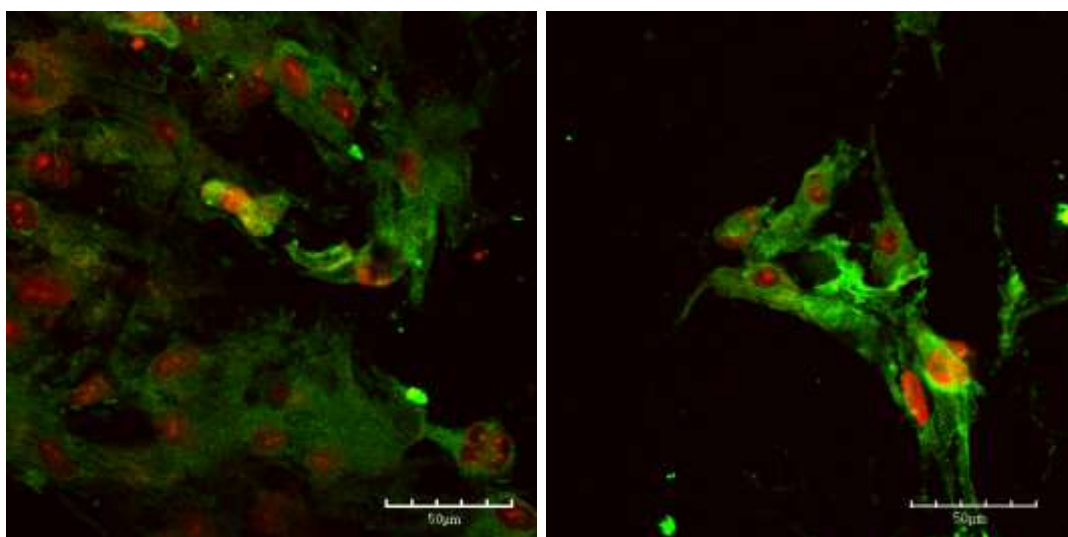
Obrázek č. 37: **Skupina I10:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



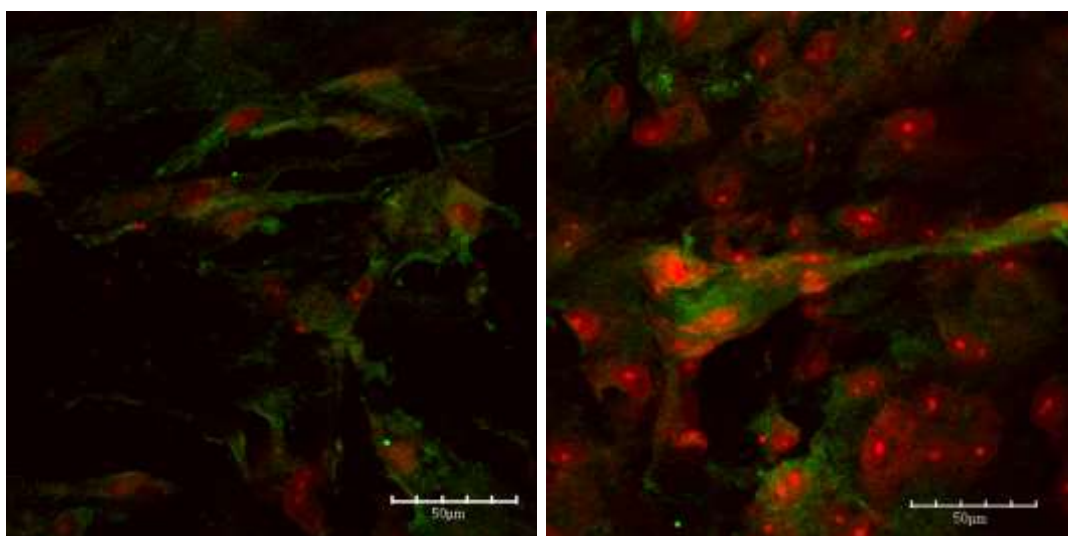
Obrázek č. 38: **G1:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



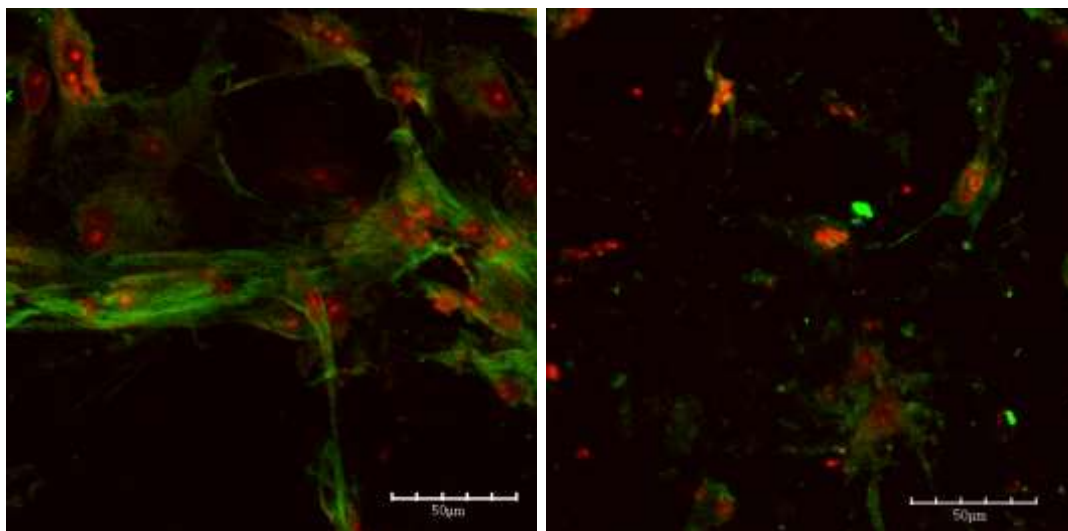
Obrázek č. 39: **Skupina G5:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



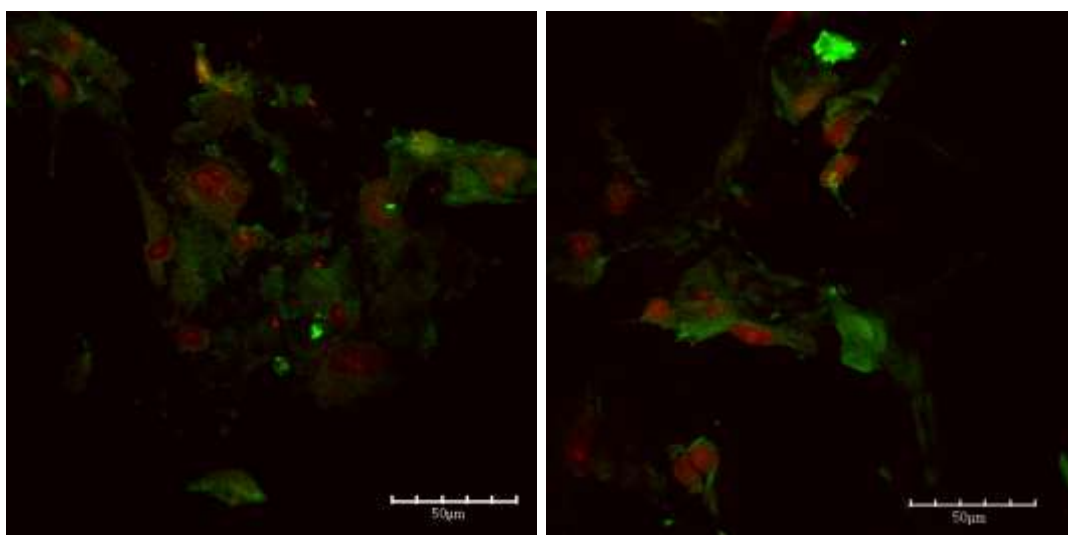
Obrázek č. 40: **Skupina G10:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



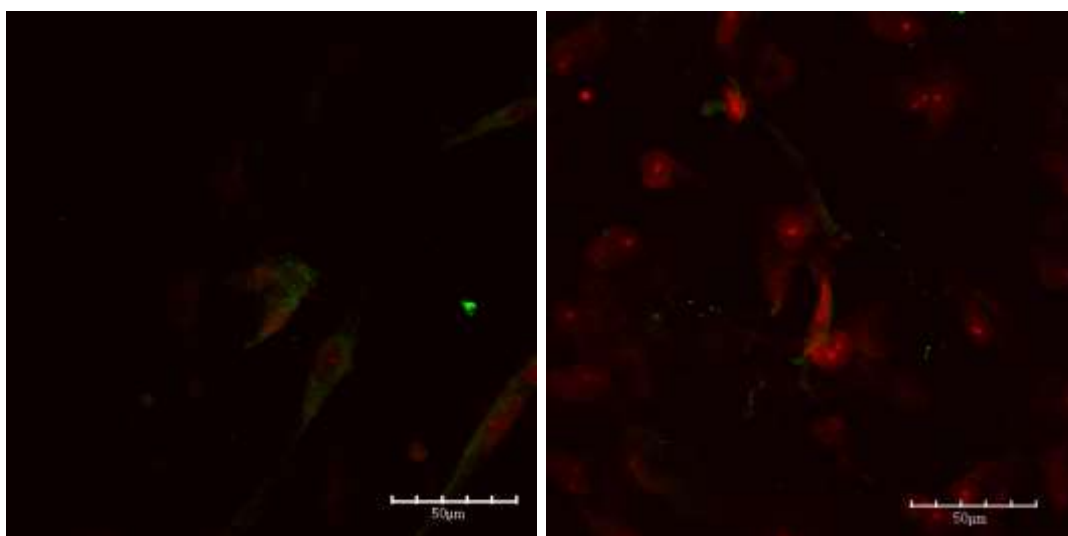
Obrázek č. 41: **Skupina K1:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



Obrázek č. 42: **Skupina K5:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



Obrázek č. 43: **Skupina K10:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



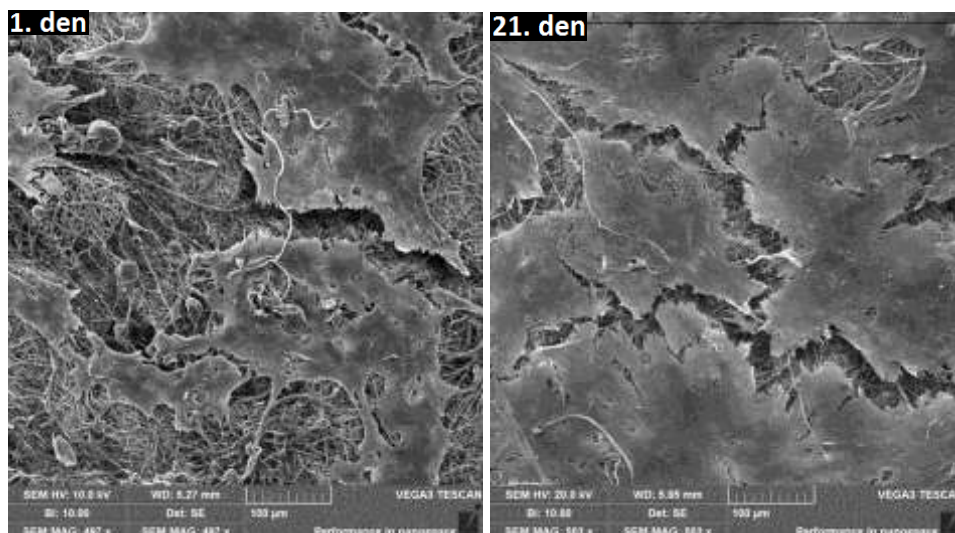
Obrázek č. 44: **Skupina Kontrola:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.

Osteokalcin je pozdní marker osteogenní diferenciaci. Barvení osteokalcinu odhalilo povětšinou jeho intracelulární přítomnost, jak je vidět na obrázcích č. 32-44. Na vzorku Kontrola, obrázek č. 44, je pozorováno nepatrné množství osteokalcinu 14. den pokusu, 21. den je pak pozorováno ještě méně osteokalcinu než 14. den. Vzorek D1, obrázek č. 32, vykazuje výrazně vyšší množství osteokalcinu 14. den pokusu v porovnání s Kontrolou, 21. den pak toto množství klesá. Na vzorku D5, obrázek č. 33, není osteokalcin téměř vůbec pozorovatelný, a to ani jeden z testovacích dní. Vzorek D10, obrázek č. 34, vykazuje menší množství osteokalcinu 14. den než vzorek D1, 21. den pak osteokalcin není téměř pozorovatelný. Na vzorku I1, obrázek č. 35, je pozorovatelné srovnatelné množství osteokalcinu s Kontrolním vzorkem, a to oba testované dny. Na vzorku I5, obrázek č. 36, je detekován osteokalcin ve větším množství než na Kontrole 14. den, 21. den pak osteokalcin není téměř pozorován. Na vzorku I10, obrázek č. 37, se 14. den osteokalcin nevyskytuje, ale 21. den je pozorováno výrazně větší množství než na Kontrole. U skupin s použitými peptidy G, obrázky č. 38-40, je osteokalcin detekovatelný ve větším množství než na Kontrolním vzorku oba testované dny. Vzorek G10, obrázek č. 40, vykazuje největší množství osteokalcinu. Skupiny s použitými peptidy K, obrázky č. 41-43, rovněž vykazují přítomnost osteokalcinu ve větším množství než na Kontrole oba testované dny.

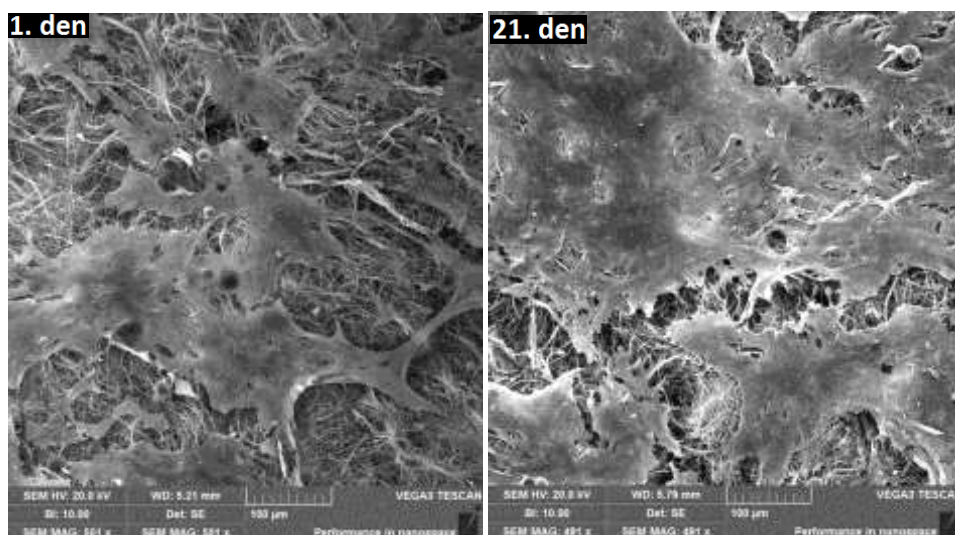
Z těchto výsledků jednoznačně na osteogenní diferenciaci poukazují vzorky s použitými peptidy G a K, a to u všech použitých koncentrací. U vzorků s peptidy D a I dochází k detekování většího množství osteokalcinu hlavně 14. den. Výjimkou je skupina I10, na které bylo 21. den pozorováno výrazné množství osteokalcinu a tedy se zdá, že rovněž vyšší koncentrace peptidu I podporuje osteogenní diferenciaci prasečích MSC. Na vzorku Kontrola, na němž nebyly prasečí MSC stimulovány k diferenciaci peptidy, téměř nedochází k produkci osteokalcinu.

2.2.2.6 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

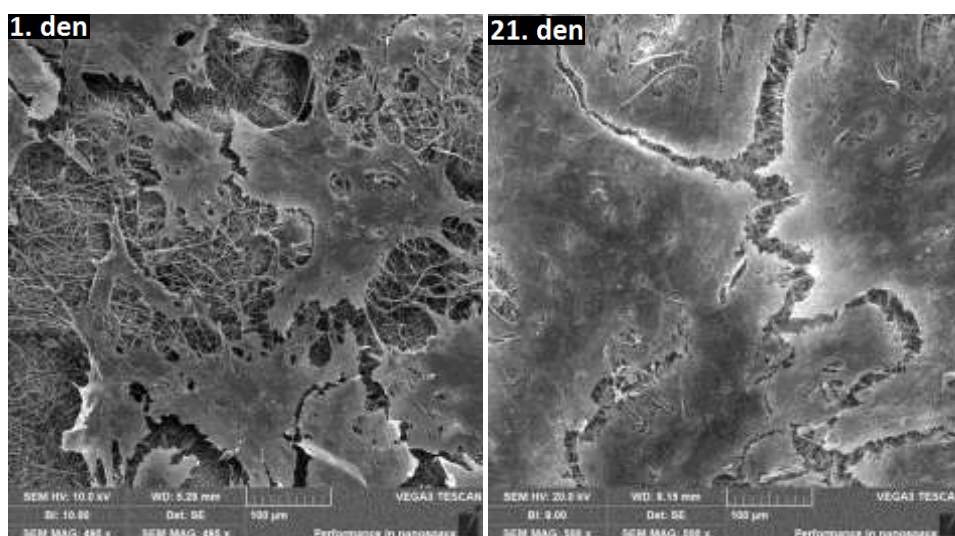
V průběhu 1. a 21. dne experimentu byly prasečí MSC na buněčných nosičích fixovány glutaraldehydem a následně byly pořizovány snímky pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, celý postup viz kapitola Metody. Z těchto snímků, viz obrázky č. 45-57, bylo možné zjistit, jak vypadaly prasečí MSC 1. den po nasazení. Tyto snímky jsou cenné, jelikož z vizualizace adheze buněk nebylo možné spočítat plochu buněk 1. den. Dvacátý první den byly pořizovány snímky proto, aby se porovnaly prasečí MSC z prvního a posledního dne experimentu.



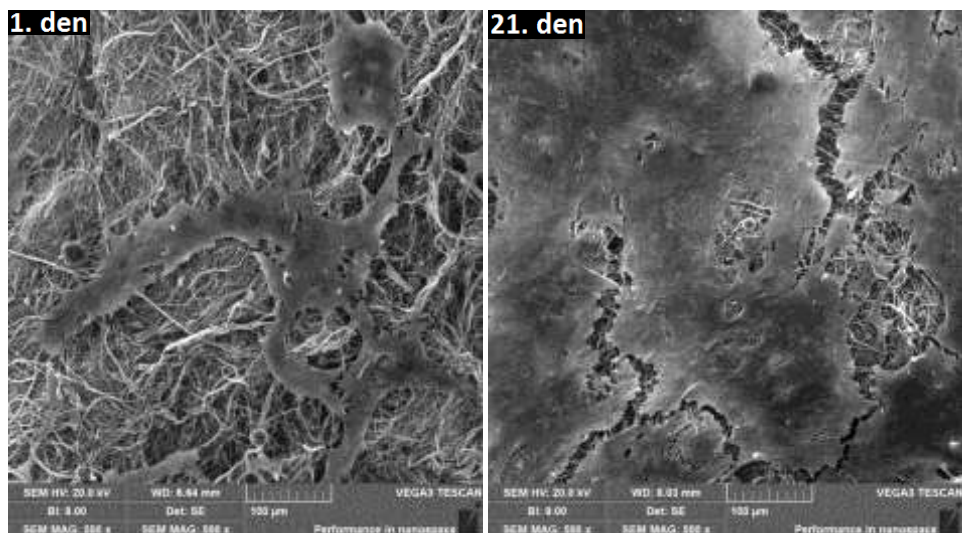
Obrázek č. 45: **Skupina D1:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



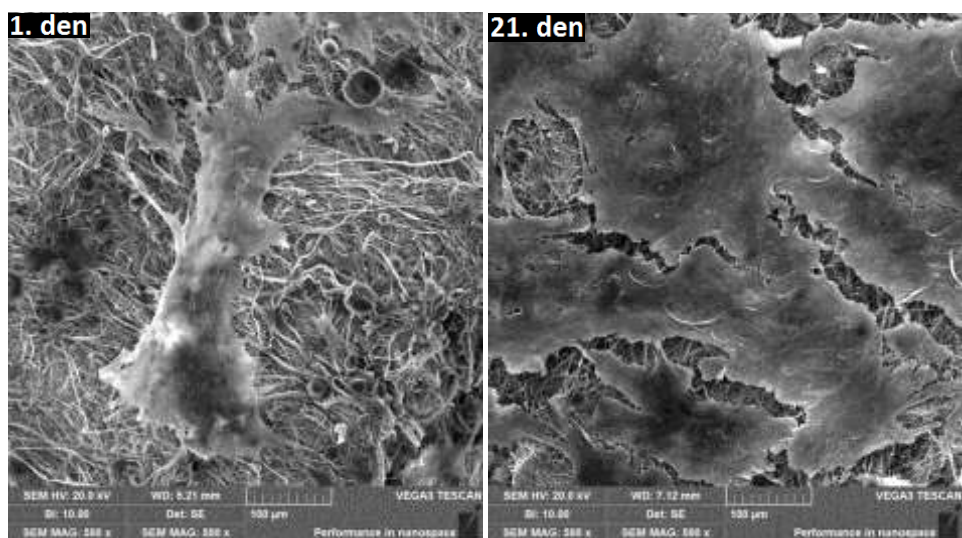
Obrázek č. 46: **Skupina D5:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



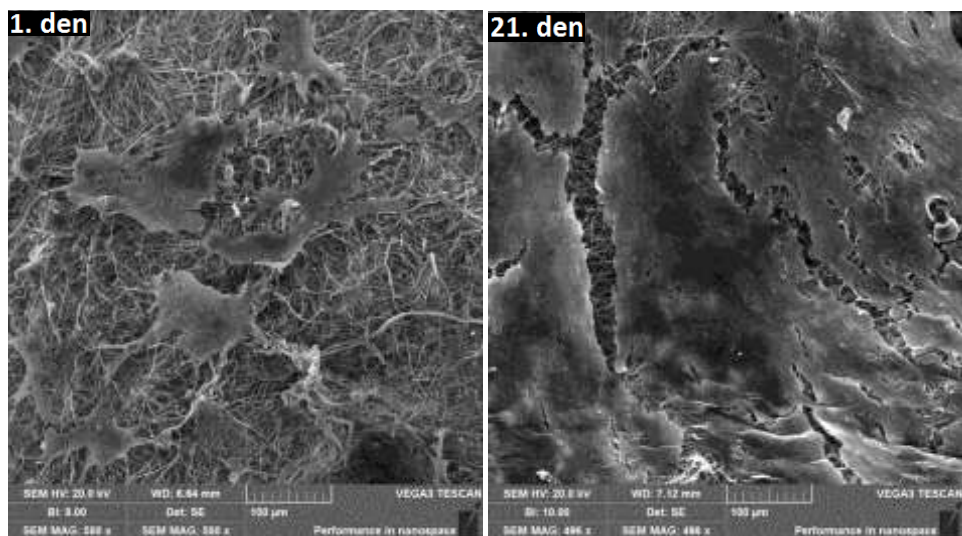
Obrázek č. 47: **Skupina D10:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



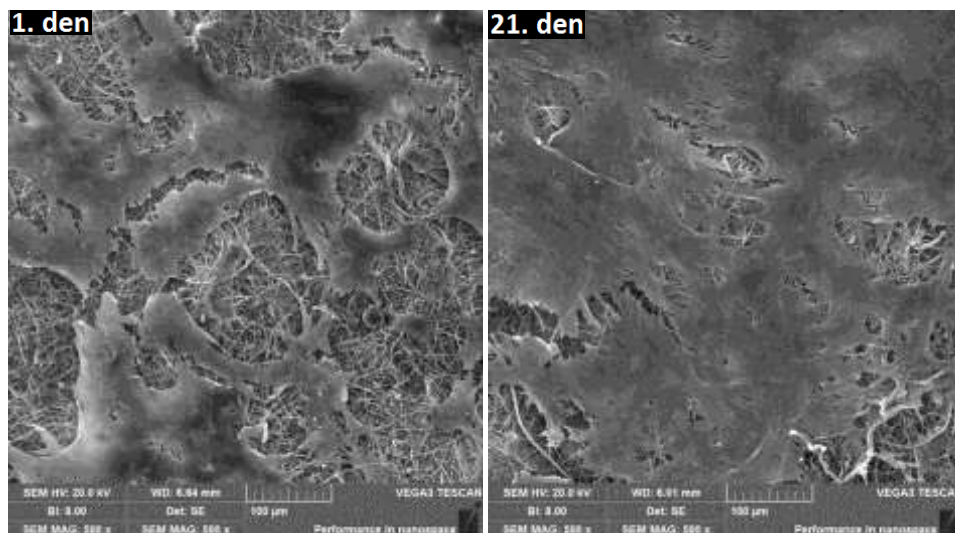
Obrázek č. 48: **Skupina I1:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



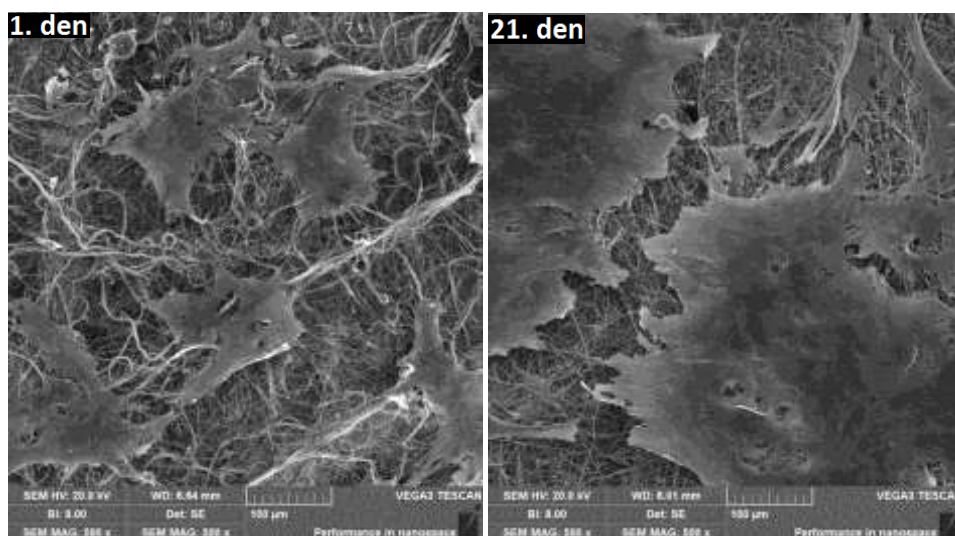
Obrázek č. 49: **Skupina I5:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



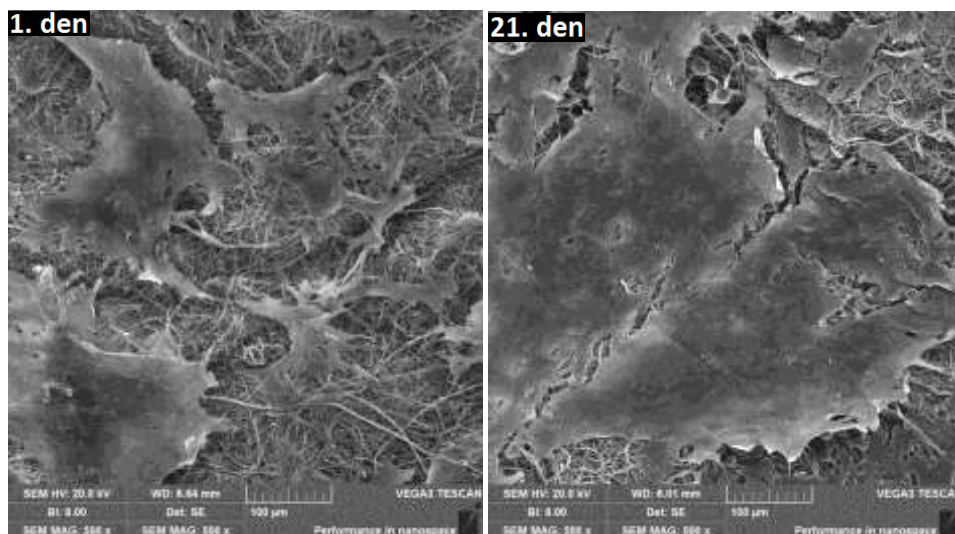
Obrázek č. 50: **Skupina I10:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



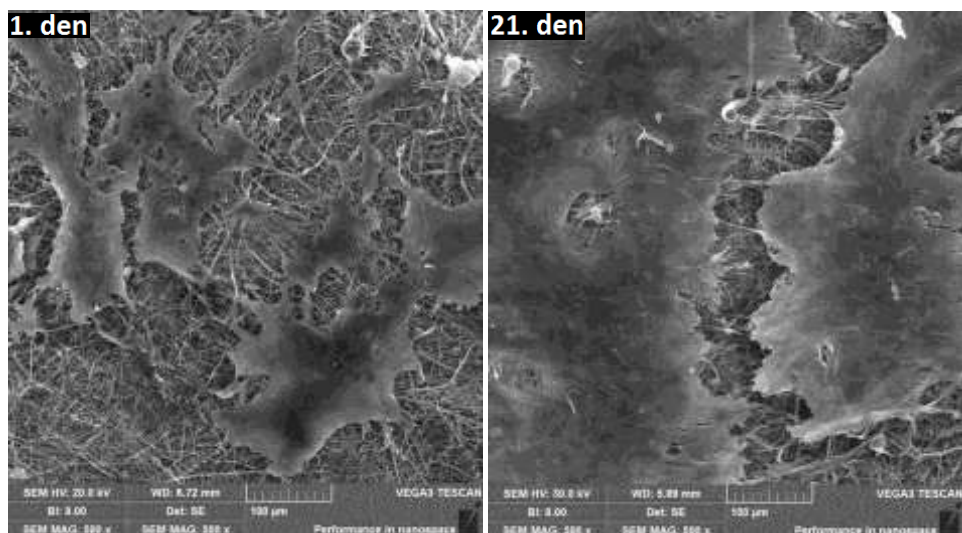
Obrázek č. 51: **Skupina G1:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



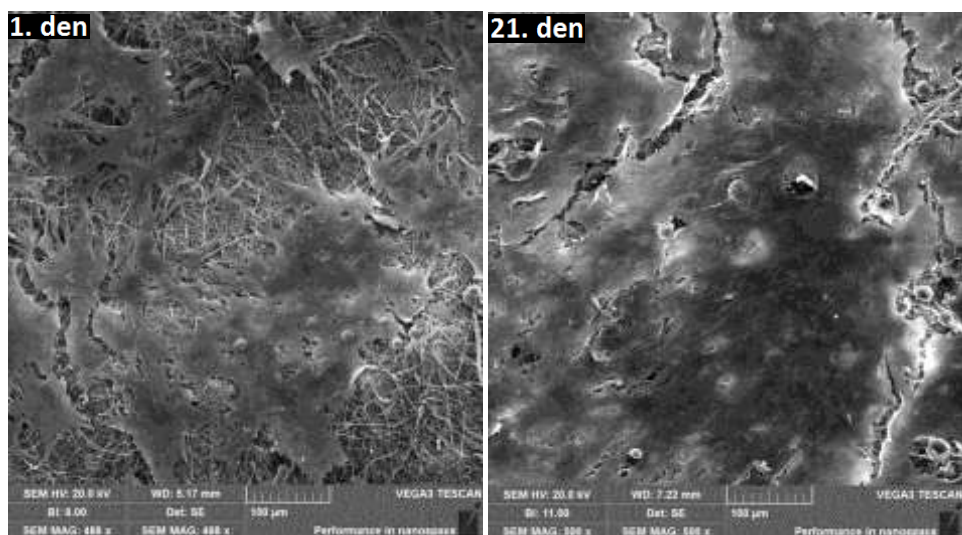
Obrázek č. 52: **Skupina G5:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



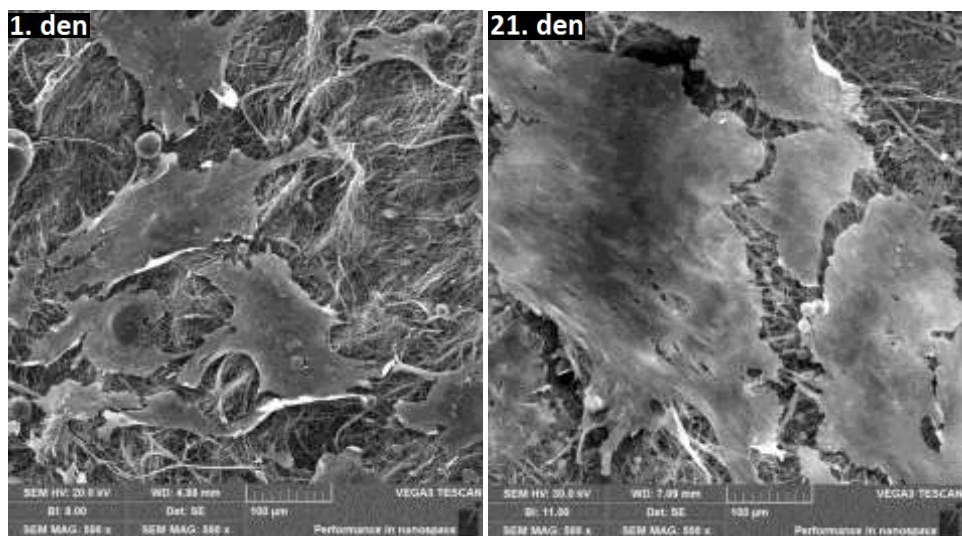
Obrázek č. 53: **Skupina G10:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



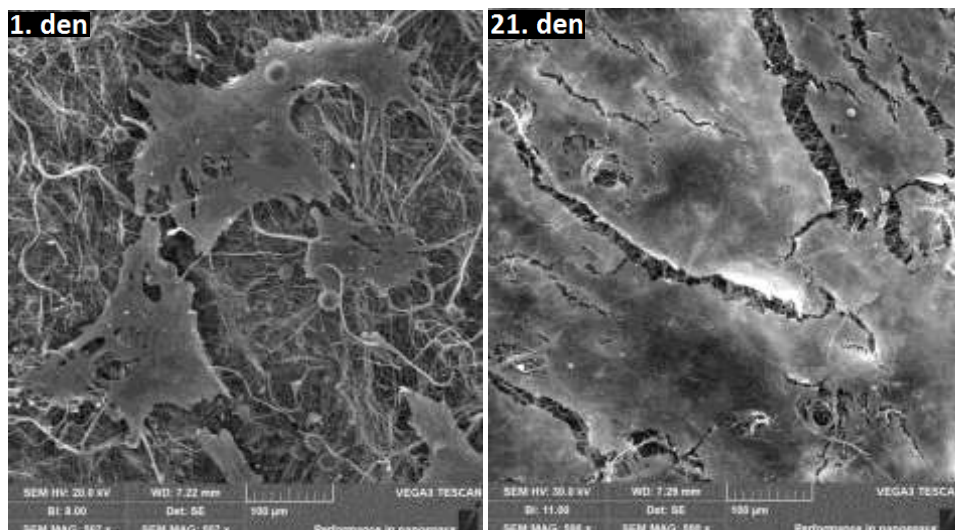
Obrázek č. 54: **Skupina K1:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 μ m.



Obrázek č. 55: **Skupina K5:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 μ m.



Obrázek č. 56: **Skupina K10:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 μ m.



Obrázek č. 57: **Skupina Kontrola:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měřky je 100 µm.

Ze snímků pořízených 1. den je patrné, že na buněčných nosičích dochází k roztahování buněk, viz obrázky č. 45-57. Buňky za 24 hodin od nasazení změnil svůj tvar z kulovitých, neadherovaných buněk, na buňky roztažené, zaujímají tvar fibroblastového typu. Buňky spolu na nosičích agregují. Nejlepší roztažení bylo 1. den docíleno na vzorcích s přidanými diferenciačními peptidy D, G, K, viz obrázky č. 45-47 a obrázky č. 51-56, u všech testovaných koncentrací a na vzorku Kontrola, obrázek č. 57. Buňky na skupinách s přidaným peptidem I, viz obrázky č. 48-50, vykazují odlišnou buněčnou morfoloii, buňky jsou užší a celkově menší, ne tolik roztažené.

K 21. dni buněčné kultivace jsou buněčné nosiče u všech testovaných skupin konfluentně porostlé vrstvou buněk. To naznačuje, že nanovláknenný PCL nosič je vhodný pro buněčnou kultivaci. Zároveň nebyl pozorován zřejmý rozdíl mezi vzorky s peptidy a vzorkem Kontrola. Vzorky s přidavkem peptidu I, obrázky č. 48-50, vykazovaly 21. den již shodné buněčné chování jako ostatní skupiny. Buňky se zejména 21. den jeví na nosičích potřhané či popraskané. Tento jev byl nejspíše způsoben při procesu fixace a následné manipulace se vzorky.

2.2.3 VLIV DIFERENCIAČNÍCH PEPTIDŮ PŘIDANÝCH VOLNĚ DO BAZÁLNÍHO MÉDIA

S OSTEOGENNÍMI SUPLEMENTY

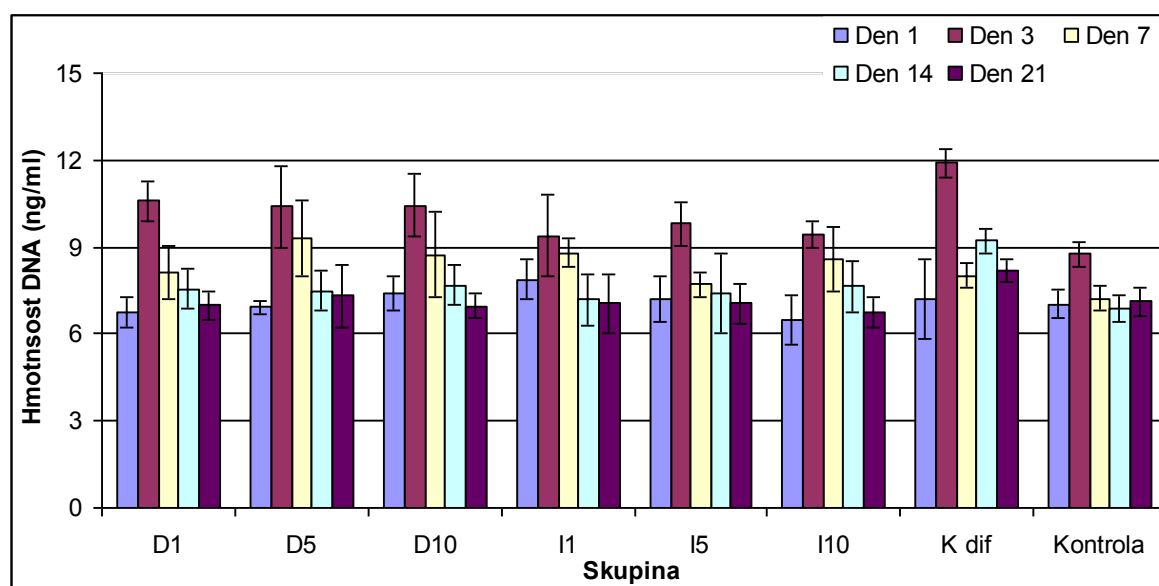
V dalším pokusu, při němž byl zjišťován efekt působících diferenciačních peptidů, byly prasečí MSC kultivovány v bazálním médiu složeném z MEM, 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin a s přidavkem osteogenních suplementů, tedy 100 nM dexamethasonu, 100 nM β -glycerol fosfátu a 40 µg/ml askorbát-2-fosfátu. Buňky byly

inkubovány na PCL nosiči, vyrobeném metodou elektrostatického zvlákňování po dobu dvaceti jedna dní.

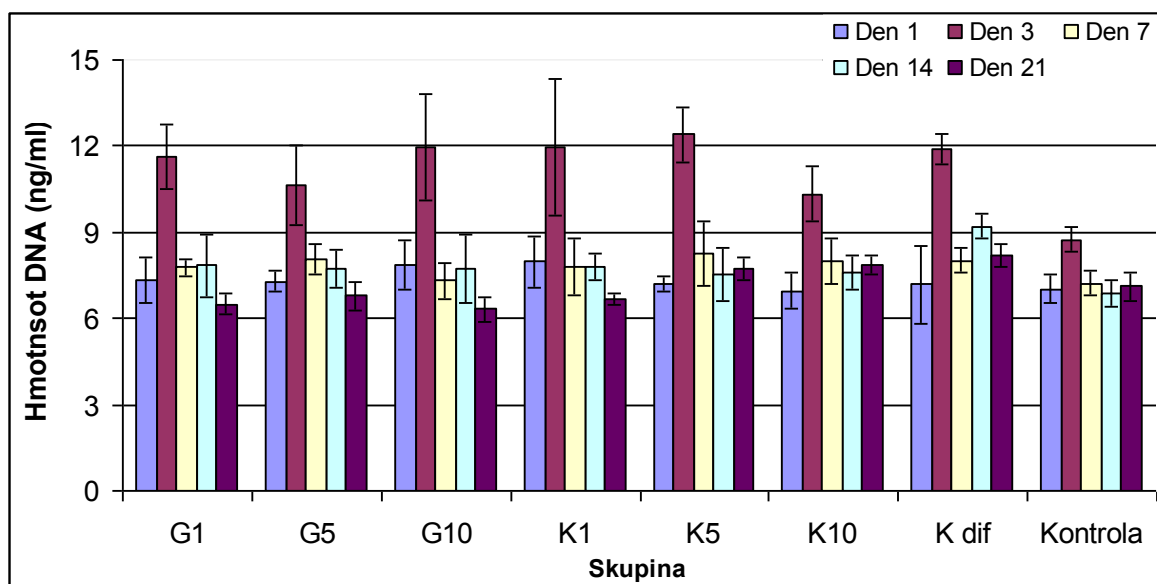
Pojmenování testovaných skupiny viz tabulka č. 5. Kontrolní skupiny byly v tomto pokusu zvoleny dvě. Vzorek s názvem Kontrola jsou prasečí MSC inkubované v bazálním médiu bez přídavku osteogenních suplementů a s nulovou koncentrací diferenciačních peptidů. Skupina s označením „K dif“ jsou prasečí MSC inkubované v bazálním médiu s přídavkem osteogenních suplementů a s nulovou koncentrací diferenciačních peptidů.

2.2.3.1 KVANTIFIKACE OBSAHU BUNĚČNÉ DNA

Ve stejné dny, kdy probíhalo měření metabolické aktivity buněk pomocí MTS testu, byl prováděn na stejných nosičích PicoGreen test na kvantifikaci obsahu buněčné DNA na vzorcích. Celý postup je popsán v kapitole Metody, hodnoty jsou zaznamenány v grafech č. 10 a 11.



Graf č. 10: **Hmotnost DNA:** Naměřené hodnoty hmotnosti buněčné DNA na vzorcích s přidanými peptidy D a I v porovnání s K dif a Kontrolou. Měřeno pomocí PicoGreen testu.



Graf č. 11: **Hmotnost DNA:** Naměřené hodnoty hmotnosti buněčné DNA na vzorcích s přidávanými peptidy G a K v porovnání s K dif a Kontrolou. Měřeno pomocí PicoGreen testu.

Z grafů č. 10 a 11 vyplývá, že měření probíhající 1. den neodhalilo statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách hmotnosti buněčné DNA mezi vzorky. Signifikantně vyšší hmotnost byla naměřena 3. den u skupiny K5 v porovnání se skupinami I1, I10 a Kontrola. Skupiny G1, G5, G10, K1 a K dif obsahovaly 3. den měření signifikantně víc buněčné DNA než skupina Kontrola. Měření prováděná 7. a 14. den byla bez statisticky významných rozdílů v hmotnosti mezi vzorky. Signifikantně vyšší hodnota hmotnosti buněčné DNA byla naměřena 21. den u skupiny K dif v porovnání se skupinami G5 a K1. Skupina K10 vykazovala signifikantně vyšší hmotnost v porovnání se skupinou K1 pro 21. den měření.

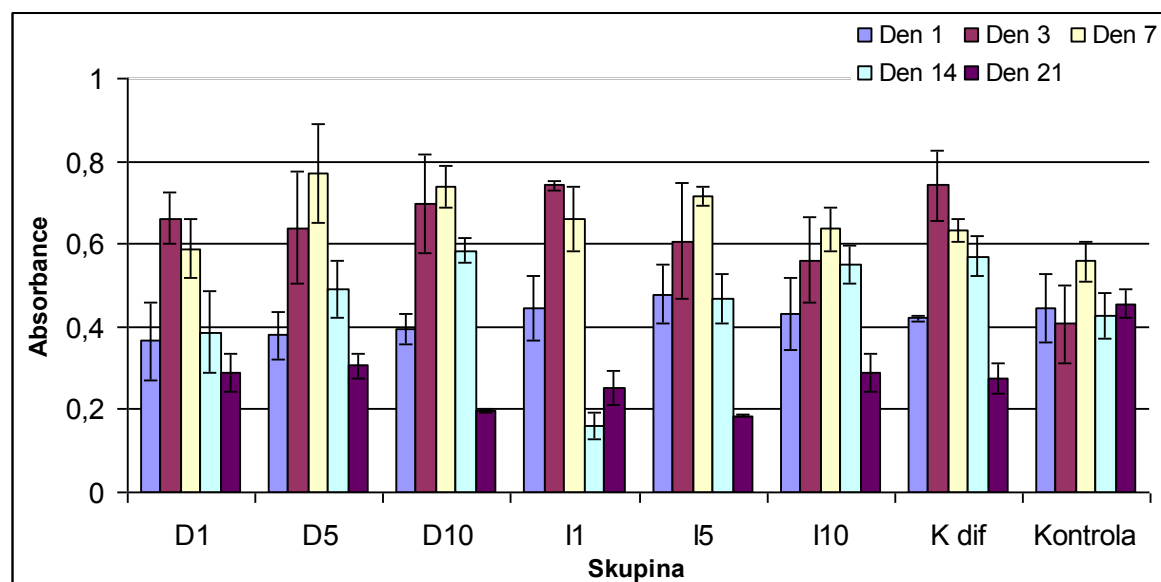
Na všech vzorcích došlo k nárůstu v hmotnosti buněčné DNA s vrcholem pozorovatelným 3. den, přičemž k výraznějšímu nárůstu došlo na vzorcích inkubovaných s přidávkou osteogenních suplementů. Hmotnost buněčné DNA se pohybuje v rozmezí 9,398395v - 12,39368 ng/ml. Signifikantně významný rozdíl v nárůstu hmotnosti ke 3. dni není pozorovatelný mezi vzorky inkubovanými s diferenciačními peptidy a vzorkem K dif, který byl inkubován bez přidavku diferenciačních peptidů. Přítomnost osteogenních suplementů tedy vedla k vyšší proliferaci buněk.

V průběhu od 3. do 7. dne došlo k výraznému poklesu v naměřené hmotnosti buněčné DNA na vzorcích, hmotnost se pohybuje v rozmezí 7,233985 ng/ml - 8,803836 ng/ml. Od 7. dne až do konce pokusu hmotnost buněčné DNA na vzorcích mírně klesala, nejnižší hodnota, viz graf č. 11, byla 21. den naměřena u skupiny G10, a nebo se držela zhruba na stejné hodnotě. Nejvyšší hodnota byla 21. den u skupiny K dif. Z porovnání

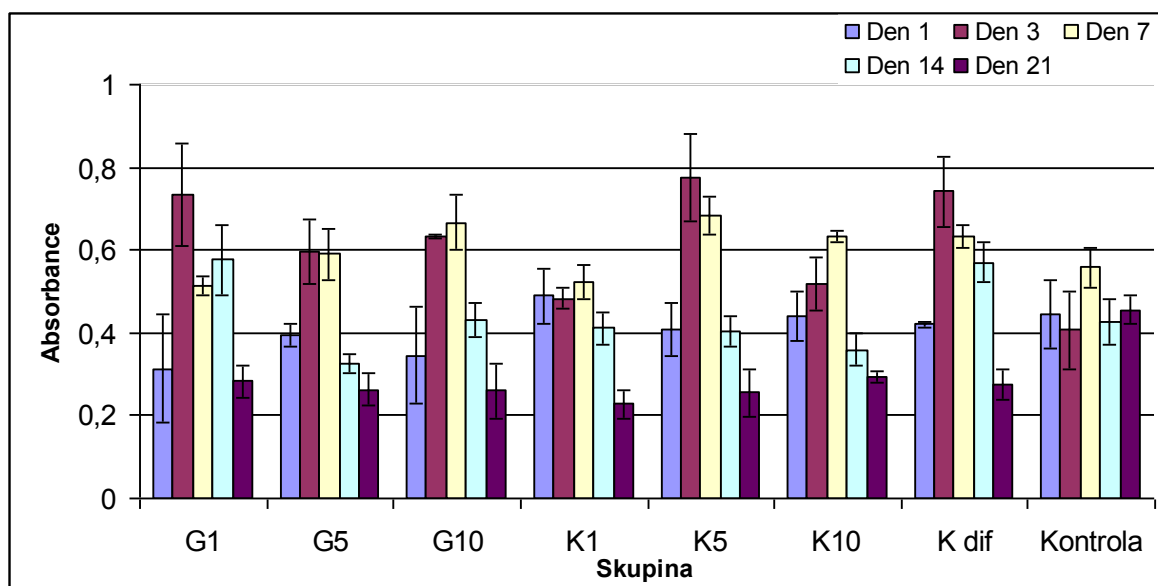
grafů č. 3 a 4 s grafy č. 10 a 11 je vidět, že hodnota hmotnosti 3. den přesáhla hodnoty hmotnosti buněčné DNA z 21. dne u grafů č. 3 a 4. Používané prasečí MSC jsou primární buňky, u kterých funguje kontaktní inhibice. V průběhu 3. dne tak nejspíš bylo dosaženo maximálního počtu buněk na nosičích a od tohoto dne pak docházelo na vzorcích k buněčné smrti v důsledku regulace počtu buněk na nosičích. Zároveň tento trend podporuje domněnku, že na nosičích byla zahájena raná osteogenní diferenciace, která vrcholí v době od 1. do 4. dne po nasazení buněk.

2.2.3.2 TEST METABOLICKÉ AKTIVITY

Metabolická aktivita buněk byla měřena pomocí MTS testu 1., 3., 7., 14. a 21. den experimentu. Postup a princip testu je popsán v kapitole Metody. Hodnoty jsou uvedeny v grafech č. 12 a 13.



Graf č. 12: **Metabolická aktivita buněk:** Naměřené hodnoty metabolické aktivity na vzorcích s přidáním peptidy D a I v porovnání s K dif a Kontrolou. Měřeno MTS testem.



Graf č. 13: **Metabolická aktivita buněk:** Naměřené hodnoty metabolické aktivity na vzorcích s přidáním peptidy G a K v porovnání s K dif a Kontrolou. Měřeno MTS testem.

Z grafů č. 12 a 13 vyplývá, že staticky významně vyšší hodnoty metabolické aktivity byly naměřeny 1. den u buněk inkubovaných na skupinách I5 a K1 v porovnání se skupinou G10. Hodnoty metabolické aktivity byly 3. den staticky vyšší na skupinách D1, D10, I1, G1, K5 a K dif v porovnání s Kontrolou. Statisticky vyšší hodnota metabolické aktivity buněk byla naměřena 7. den na skupině D5 v porovnání se skupinami D1, G1, K1 a Kontrolou. Hodnoty metabolické aktivity 7. den byly naměřeny signifikantně vyšší u skupin D5, D10, I1, I5, G10 a K5 v porovnání se skupinou G1. Dále byly 7. den naměřeny signifikantně vyšší hodnoty metabolické aktivity u skupin D5 a D10 v porovnání se skupinou K1 a také hodnoty naměřené u skupin D5, D10 a I5 byly signifikantně vyšší než hodnota metabolické aktivity změřená na Kontrolní skupině.

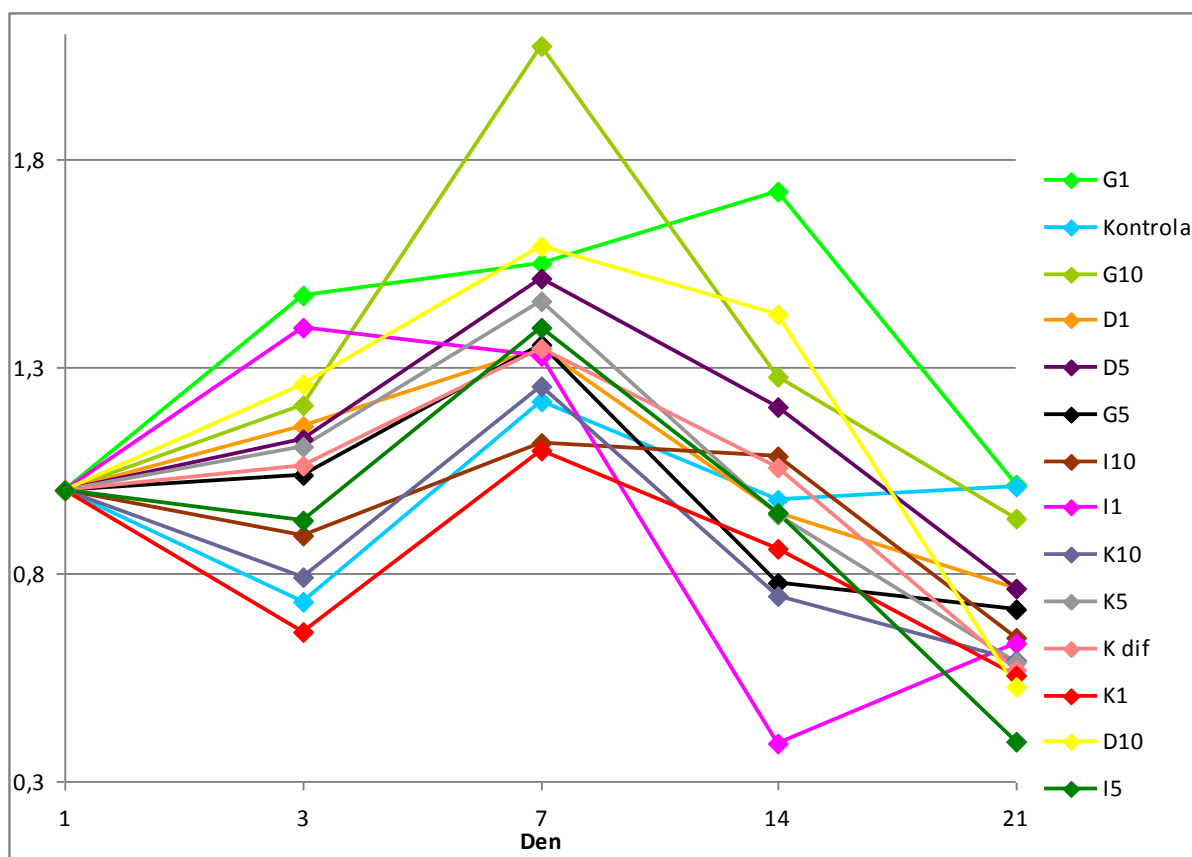
Z grafů č. 12 a 13 plyne, že hodnota metabolické aktivity měřená 14. den byla u skupiny I1 signifikantně nižší, než hodnoty naměřené na všech ostatních testovaných vzorcích. Dále byly 14. den naměřeny statisticky vyšší hodnoty u skupin D10, I10, G1 a K dif v porovnání s hodnotami ze skupin D1, G5, G10, K1, K5, K10 a Kontrolou. Metabolická aktivita 14. den naměřená u skupiny D10 byla signifikantně vyšší než hodnota u skupiny I5. Čtrnáctý den byla také naměřena signifikantně vyšší hodnota absorbance u skupiny D5 v porovnání se skupinami G5 a K10. V neposlední řadě byla i hodnota u skupiny I5 signifikantně vyšší než změřená metabolická aktivita buněk u skupiny G5. Poslední, tedy 21. testovací den byla signifikantně vyšší hodnota metabolické aktivity naměřena na skupině D5 v porovnání se skupinami D10 a I5. Signifikantně nejvyšší hodnota metabolické aktivity byla 21. den

naměřena na skupině Kontrola. Tato hodnota byla vyšší v porovnání se všemi testovanými vzorky.

Metabolická aktivita u všech testovaných skupin vrcholí 3. nebo 7. den, viz grafy č. 12 a 13. Následně je patrný pokles hodnot absorbance u všech testovaných skupin. K poklesu metabolické aktivity buněk došlo v důsledku jejich snižujícího se počtu na buněčných nosičích, jak je vidět z grafů č. 10 a 11. Maxima v hodnotách absorbance je dosaženo u většiny vzorků 3. den, tedy ve stejný den, kdy bylo dosaženo vrcholných hodnot taktéž v hmotnosti buněčné DNA.

V průběhu do 7. dne lze pozorovat vyšší hodnoty metabolické aktivity u buněk kultivovaných s přidavkem osteogenních suplementů, na Kontrole inkubované bez přidaných suplementů nejsou patrné tak vysoké hodnoty, viz graf č. 12 a 13. Toto zjištění vede k domněnce, že přidavek osteogenních suplementů, nikoliv diferenciačních peptidů, by mohl podporovat metabolickou aktivitu buněk. Pro 21. den pak byla naměřena metabolická aktivita buněk u Kontrolní skupiny nejvyšší ze všech vzorků.

Hodnoty absorbance změřené v MTS testu, uvedené v grafech č. 5 a 6, nepřesáhly po celou dobu experimentu hodnotu absorbance 0,5. Zároveň jsou hodnoty uvedené v grafech č. 12 a 13 u Kontrolního vzorku srovnatelné se vzorkem Kontrola v grafech č. 5 a 6. Hodnoty absorbance u vzorků s osteogenními suplementy byly naměřeny i okolo hodnoty absorbance 0,75. Tento fakt přispívá k domněnce, že přidavek osteogenních suplementů vedl ke zvýšení absorbance.

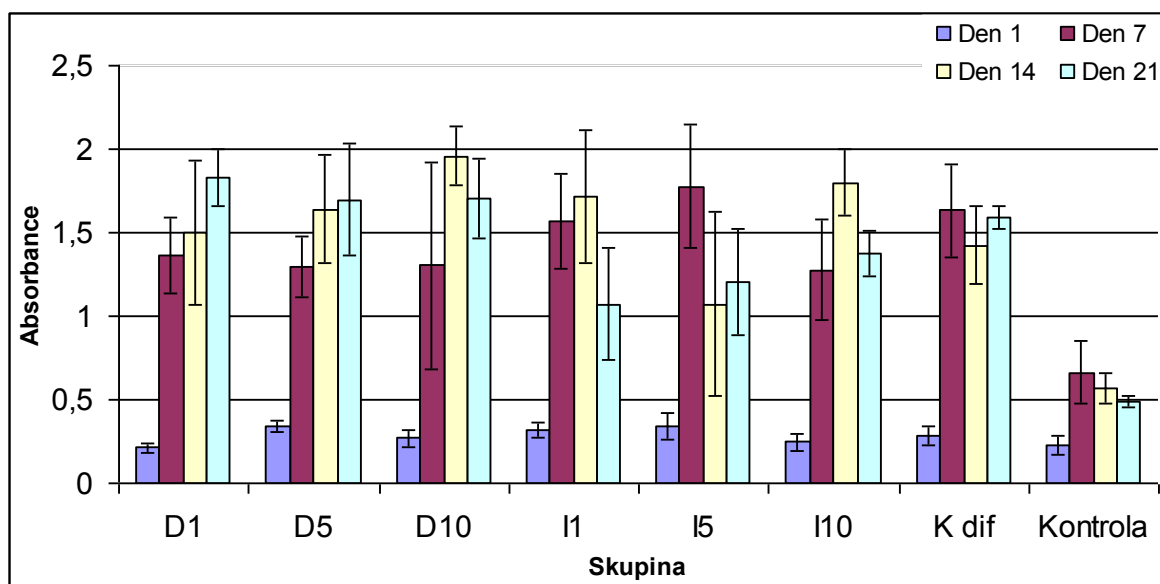


Graf č. 14: **Podíl absorbance ku hmotnosti buněčné DNA:** Graf vytvořený z naměřených hodnot PicoGreen a MTS testu ukazující metabolickou aktivitu připadající na jednu buňku.

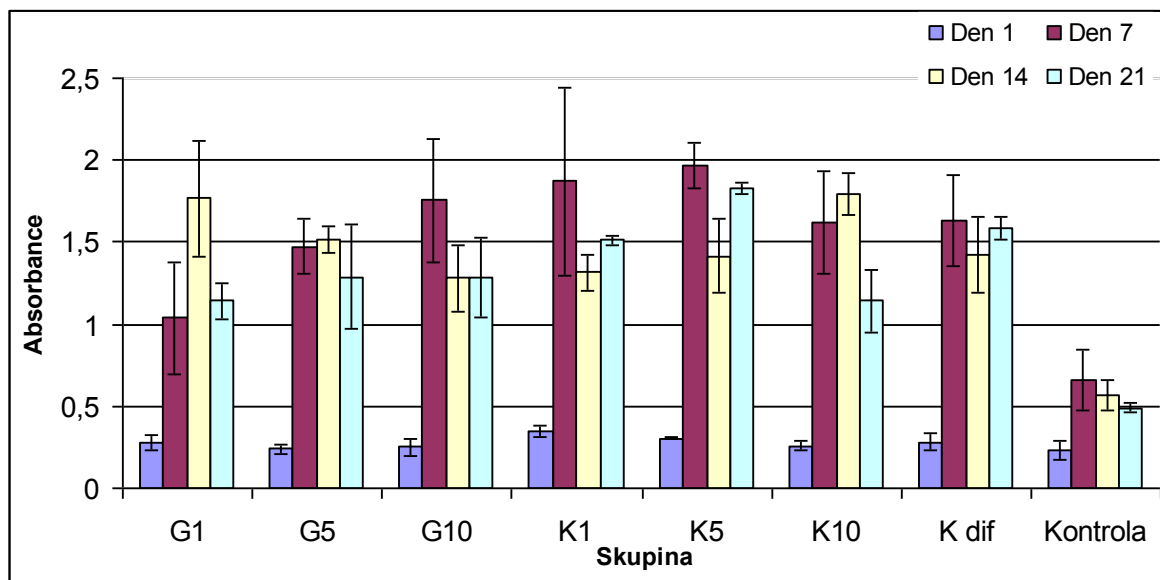
Graf č. 14 ukazuje metabolickou aktivitu připadající na jednu buňku. Hodnoty jsou normovány na 1. den. Graf byl vytvořen podělením hodnot metabolické aktivity uvedených v grafech č. 12 a 13, hmotnostmi buněčné DNA uvedenými v grafech č. 10 a 11. Z grafu č. 14 je patrné, že maximálních hodnot metabolické aktivity bylo dosaženo 7. den, tedy čtyři dny po poklesu počtu buněk na nosičích. Od 7. dne pak klesala metabolická aktivita u buněk kultivovaných na všech typech vzorků, kromě skupiny G1, která dosáhla maximální hodnoty až 14. den a následně klesla k 21. dni nejméně ze všech skupin. Klesající trend metabolické aktivity byl s největší pravděpodobností způsoben velkým odumíráním buněk na nosičích. Zbytky mrtvých buněk na nosičích zůstávají do konce experimentu a nejsou odstraněny tak, jako by k tomu došlo v *in vivo* prostředí, což má negativní vliv na okolní živé buňky.

2.2.3.3 AKTIVITA ALKALICKÉ FOSFATÁZY

Princip měření aktivity ALP a postup přípravy vzorků je popsán v kapitole Metody. Měření probíhalo na shodných vzorcích jako MTS a PicoGreen test. Naměřené hodnoty absorbance jsou uvedeny v grafech č. 15 a 16.



Graf č. 15: **Aktivita ALP:** Naměřené hodnoty aktivity ALP na vzorcích s přidanými peptidy D a I v porovnání s K dif a Kontrolou.



Graf č. 16: **Aktivita ALP:** Naměřené hodnoty aktivity ALP na vzorcích s přidanými peptidy G a K v porovnání s K dif a Kontrolou.

Naměřené hodnoty absorbance z 1. dne jsou signifikantně vyšší u skupin D5, I5 a K5 v porovnání se skupinou D1, jak je vidět na grafech č. 15 a 16. Signifikantně vyšší hodnota absorbance byla naměřena 7. den u skupiny K5 v porovnání s Kontrolní skupinou. Signifikantně významnější hodnota absorbance byla naměřena 14. den u skupin D10 a I10 v porovnání se skupinou I5. V průběhu 14. a 21. dne měření byla zjištěna statisticky významně vyšší hodnota absorbance u všech vzorků v porovnání s Kontrolou. Dále byla 21. den naměřena signifikantně vyšší hodnota absorbance u skupin D1 a K5 v porovnání se skupinami I1, I5, G1 a K10. Ve stejný den byla hodnota

absorbance u skupiny D5 signifikantně vyšší než hodnota u skupiny I1. V neposlední řadě byla 21. den zjištěna statisticky vyšší hodnota absorbance u skupiny D10 v porovnání se skupinami I1, G1 a K10.

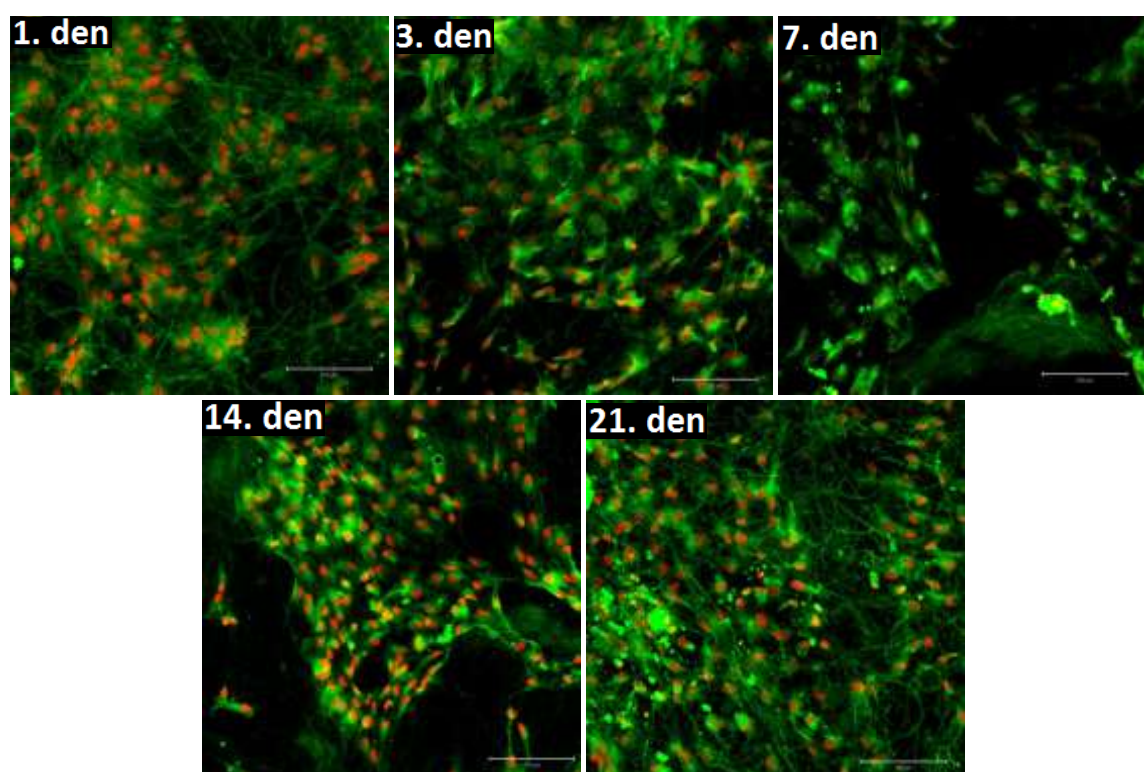
Z průběhu absorbancí uvedených v grafech č. 15 a 16, naměřených při zjišťování aktivity ALP, jsou pozorovatelné celkově vyšší hodnoty absorbance na vzorcích inkubovaných s přidavkem osteogenních suplementů. Hodnota absorbance u skupiny Kontrola je od 14. dne signifikantně nižší. Aktivita ALP u prasečích MSC vykazuje vrcholové hodnoty u většiny vzorků 7. a nebo 14. den inkubace. K 21. dni aktivita mírně klesá. Toto naznačuje, že na buněčných nosičích probíhá raná fáze osteogenní diferenciaci, jelikož aktivita ALP dosáhla v průběhu pokusu maximálních hodnot po nichž následoval pokles absorbance. Aktivita ALP u vzorků stoupá až do 7. a nebo 14. dne a to i přes fakt, že PicoGreen test, viz grafy č. 10 a 11, poukazuje na snižující se počet buněk na nosičích po 3. dni kultivace.

V porovnání s grafy č. 8 a 9, tedy s daty získanými z pokusu při němž byly prasečí MSC inkubovány bez osteogenních suplementů, je vidět celkově nižší hodnoty absorbancí a to i přes to, že v tomto pokusu nebylo dosaženo maximálních hodnot. Důvodem je nepřítomnost osteogenních suplementů, které osteogenní diferenciaci prasečích MSC výrazně napomáhají. Statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými na vzorcích inkubovaných s přidavkem diferenciacních peptidů a na vzorku K dif, tedy s nulovou koncentrací peptidů, naměřen nebyl. Vzorky inkubované s diferenciacními peptidy však vykazovaly od 7. dne rozdílné chování, jak vypovídají naměřené hodnoty absorbance.

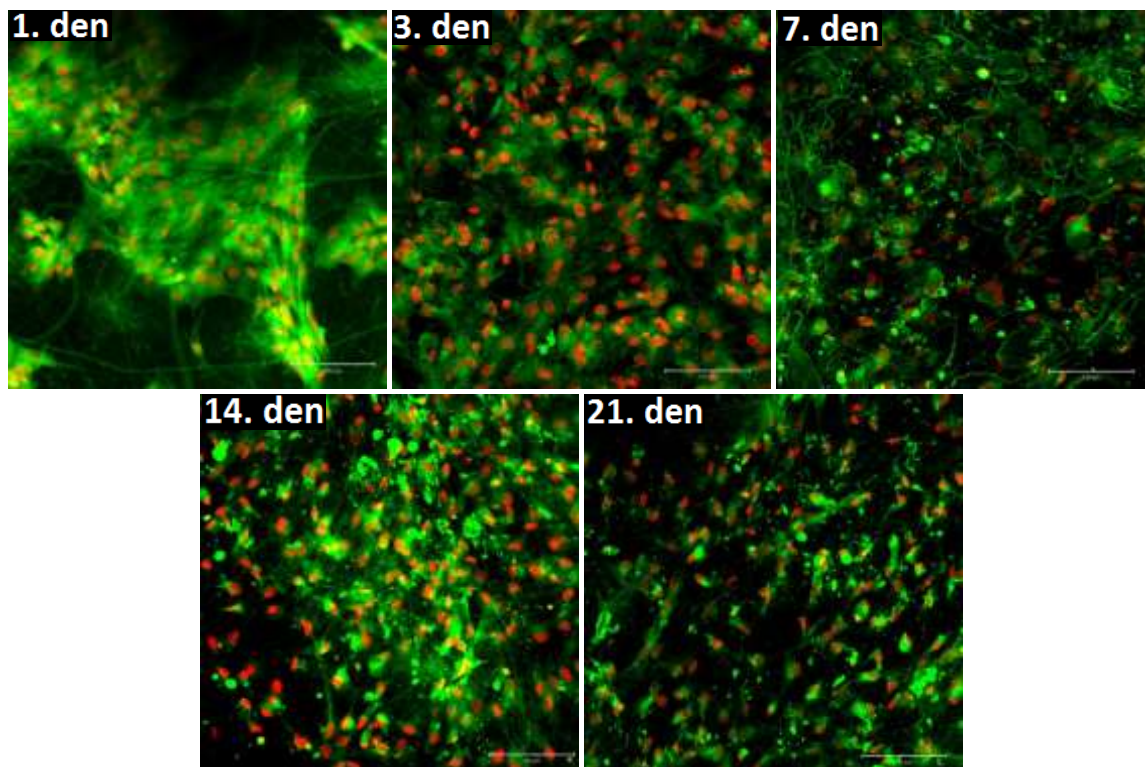
U peptidu D, odvozeného z kolagenu I, je dosaženo maximální hodnoty ALP pouze u skupiny s nejvyšší koncentrací peptidu, tedy D10. U peptidu I odvozeného z kolagenu III bylo dosaženo maximálních hodnot až 14. den kultivace, nástup osteogenní diferenciaci je zde tedy pozvolnější. Skupina G1 dosáhla maximální hodnoty až 14. den, avšak skupiny G5 a G10 již 7. den, což naznačuje, že zvyšující se koncentrace peptidu odvozeného z BMP-7 má vliv na osteogenní diferenciaci. Peptid K, odvozený z BMP-2, vykazoval maximální hodnoty již při 7. dni kultivace, byla zde tedy zahájena raná fáze osteogenní diferenciaci dříve, a to u všech testovaných koncentrací peptidu K. U skupiny K dif bylo dosaženo maximální hodnoty v aktivitě ALP 7. den a poté byl pozorován pouze nepatrný pokles v její aktivitě.

2.2.3.4 VIZUALIZACE ADHEZE BUNĚK

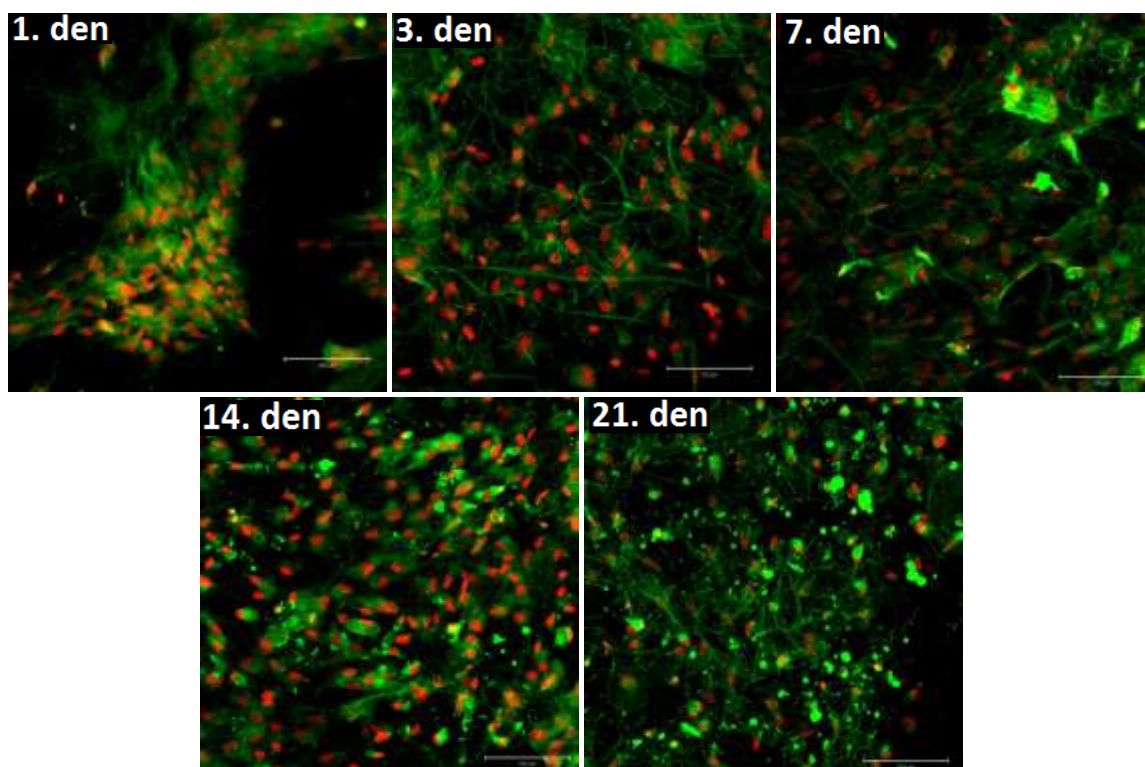
V průběhu třítydenního pokusu byla sledována adheze, roztažení a chování prasečích MSC na nosičích pomocí konfokální mikroskopie. V experimentální dny, tedy 1., 3., 7., 14. a 21. den, byly buňky zafixovány metanolem a následně obarveny fluorescenčními barvivy. Jádra jsou obarvena propidium jodidem a svítí červeně, membránové struktury jsou zelené, byly obarveny barvou DiOC6, snímky jsou na obrázcích č. 58-71. Celý postup přípravy vzorků je popsán v kapitole Metody.



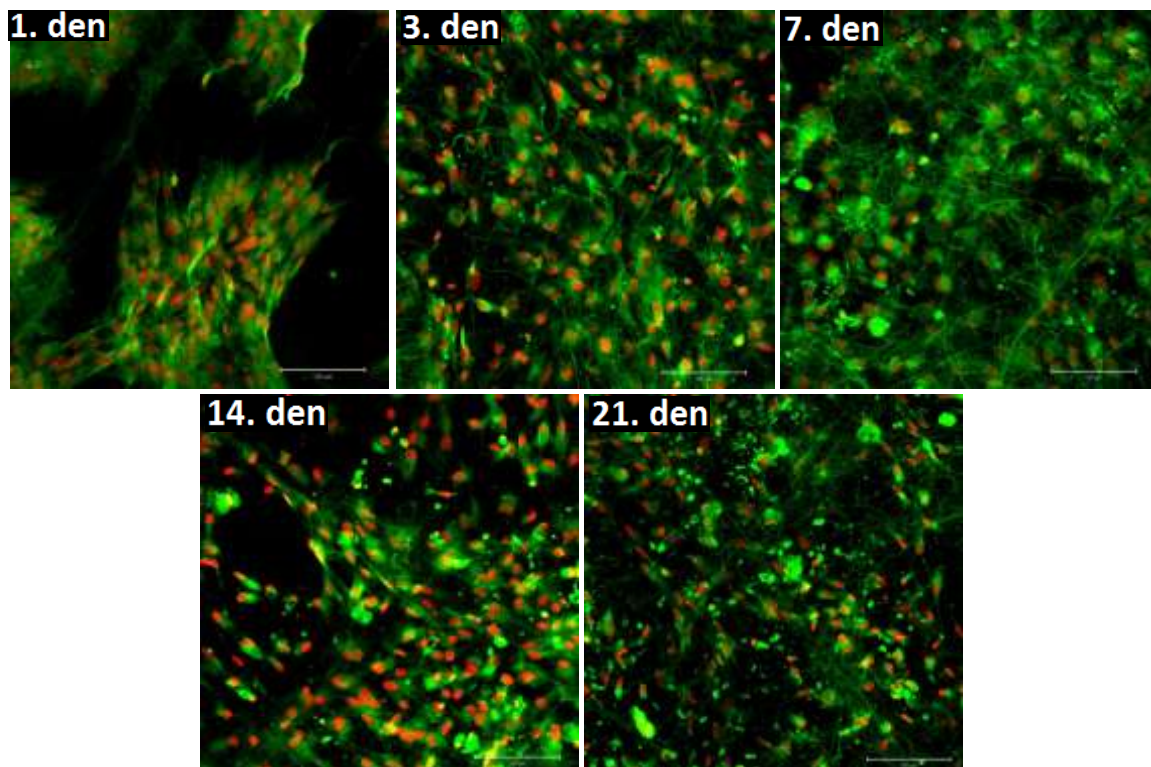
Obrázek č. 58: **Skupina D1:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



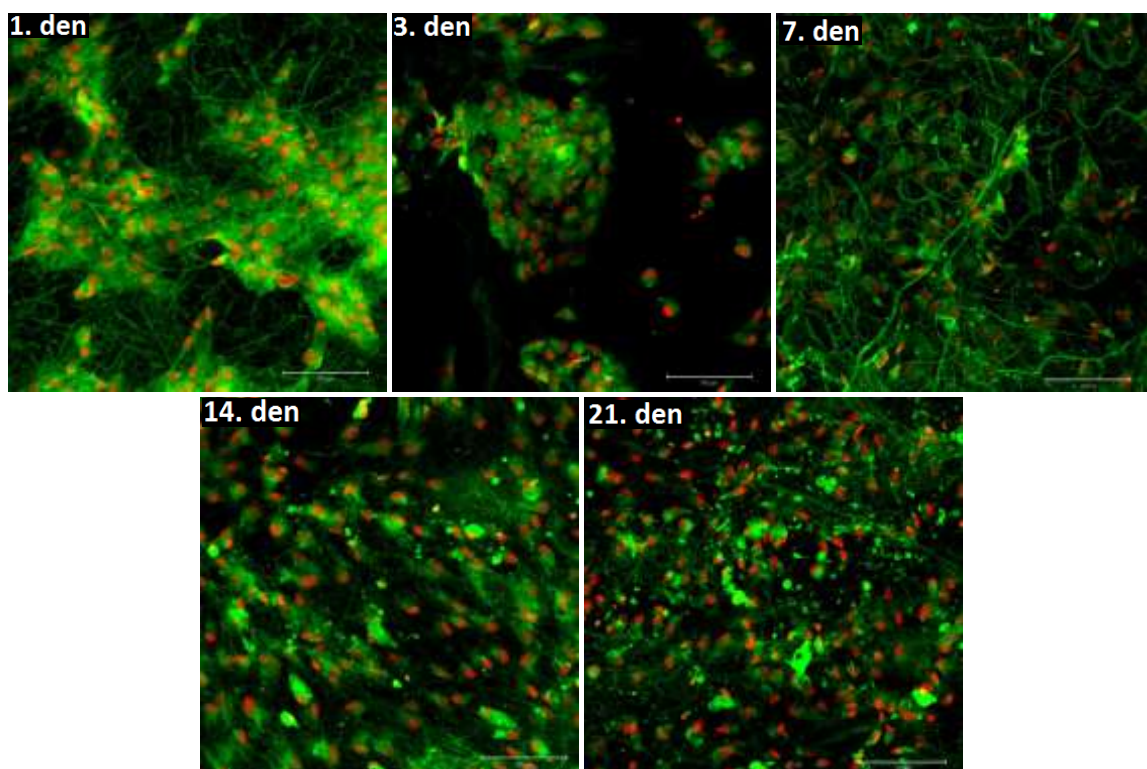
Obrázek č. 59: **Skupina D5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



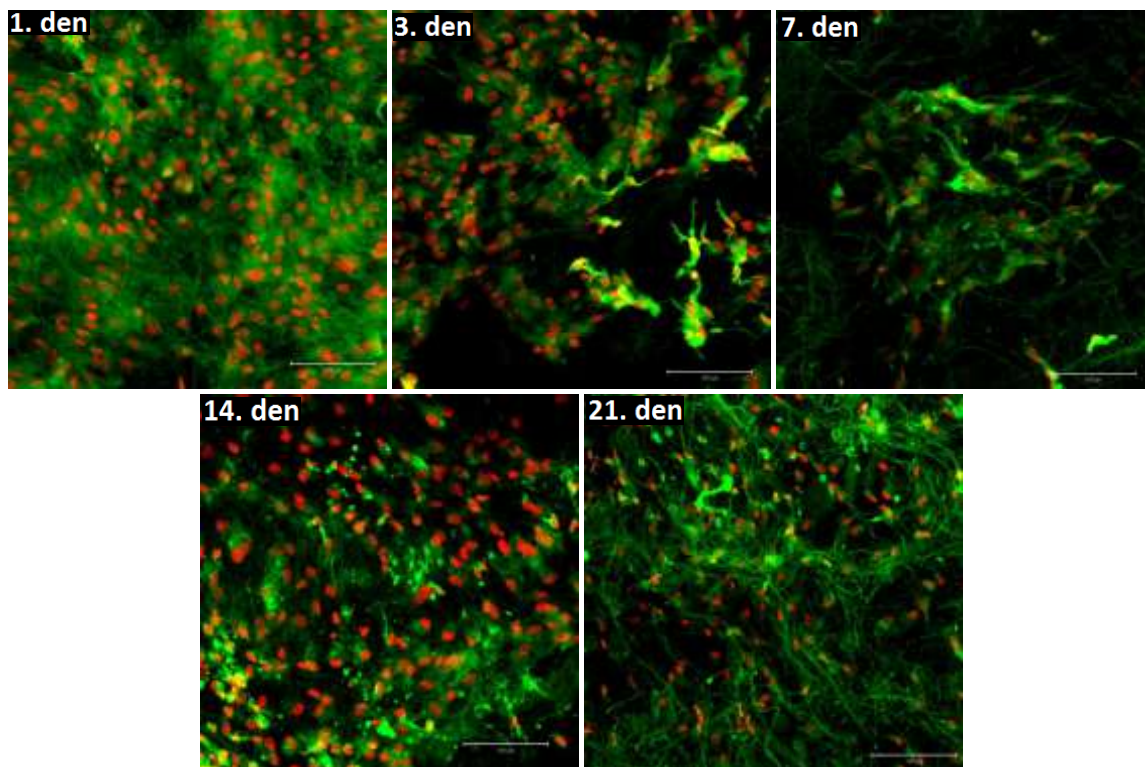
Obrázek č. 60: **Skupina D10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



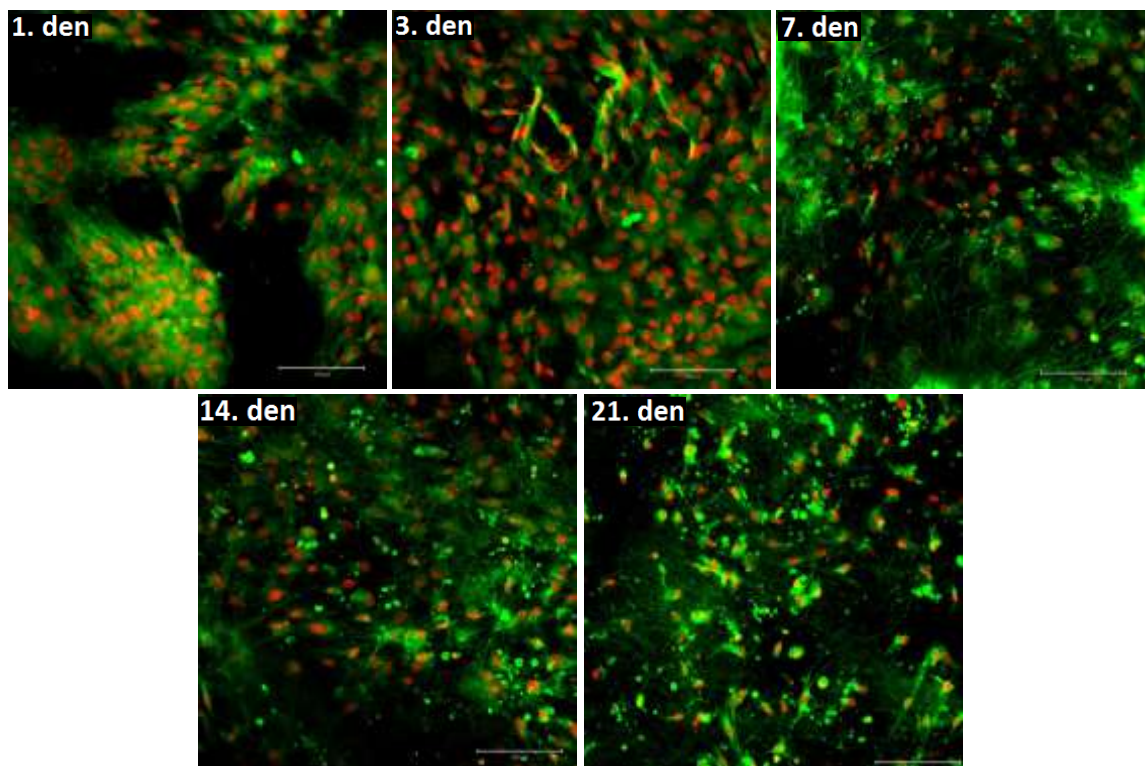
Obrázek č. 61: **Skupina II:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



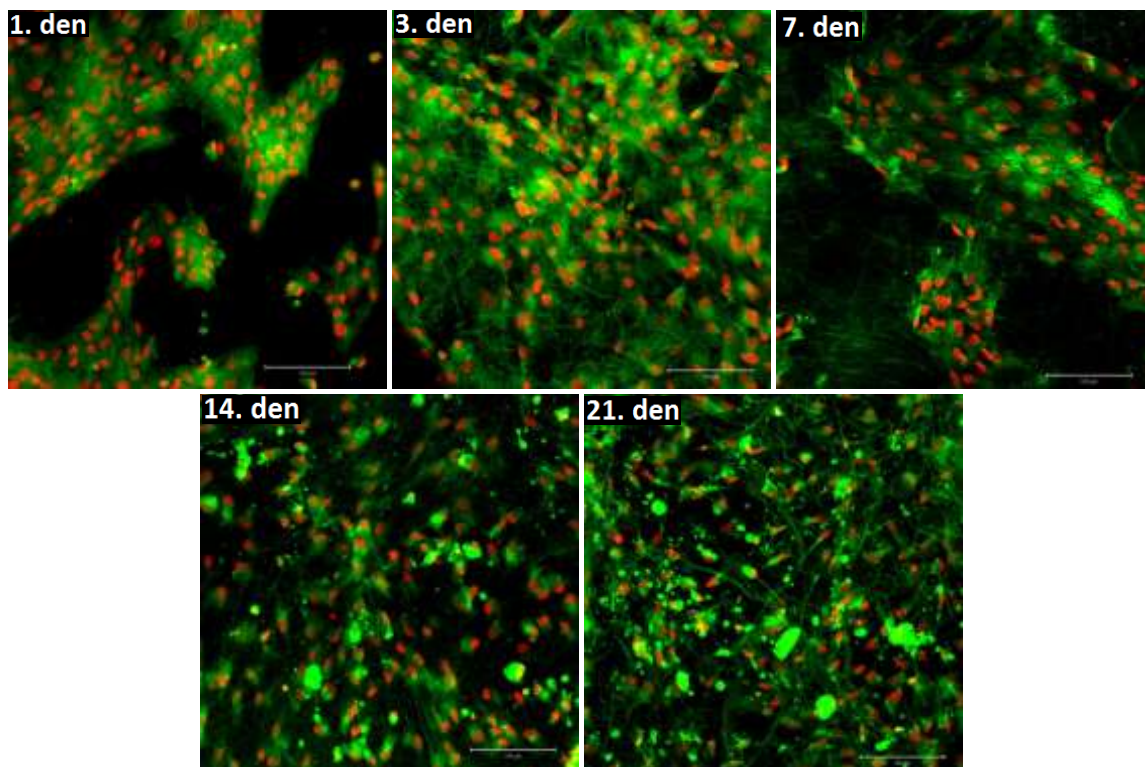
Obrázek č. 62: **Skupina I5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



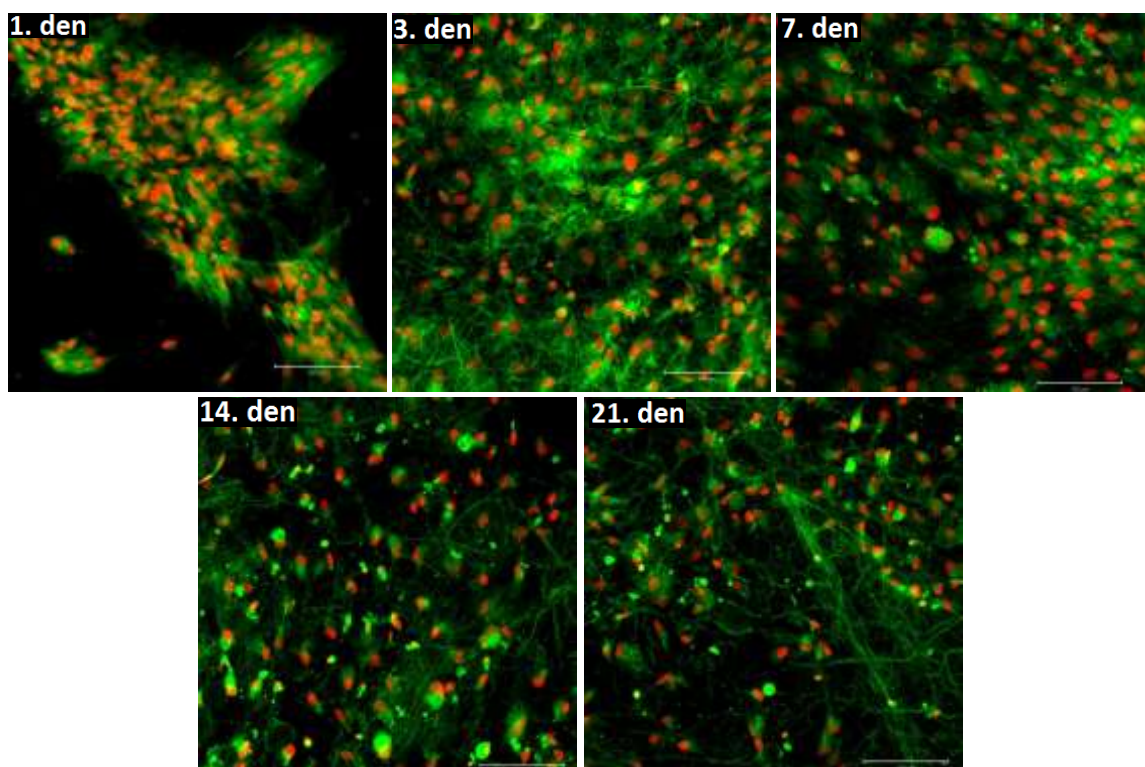
Obrázek č. 63: **Skupina I10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



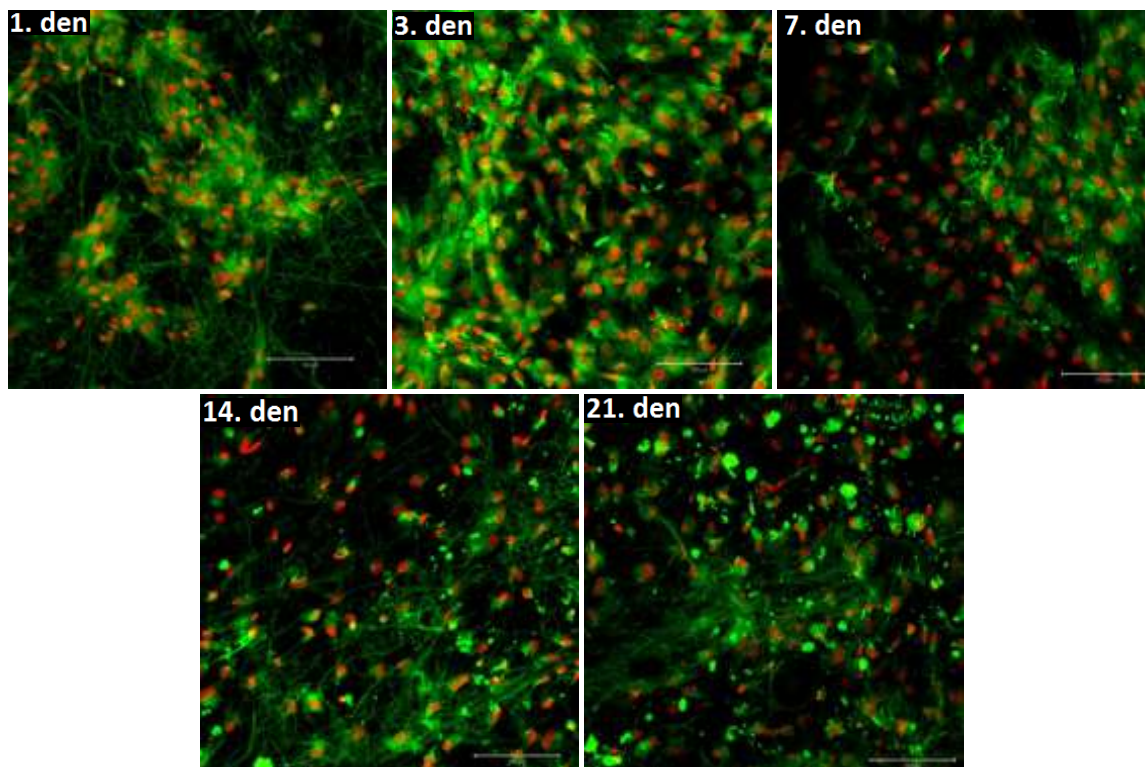
Obrázek č. 64: **Skupina G1:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



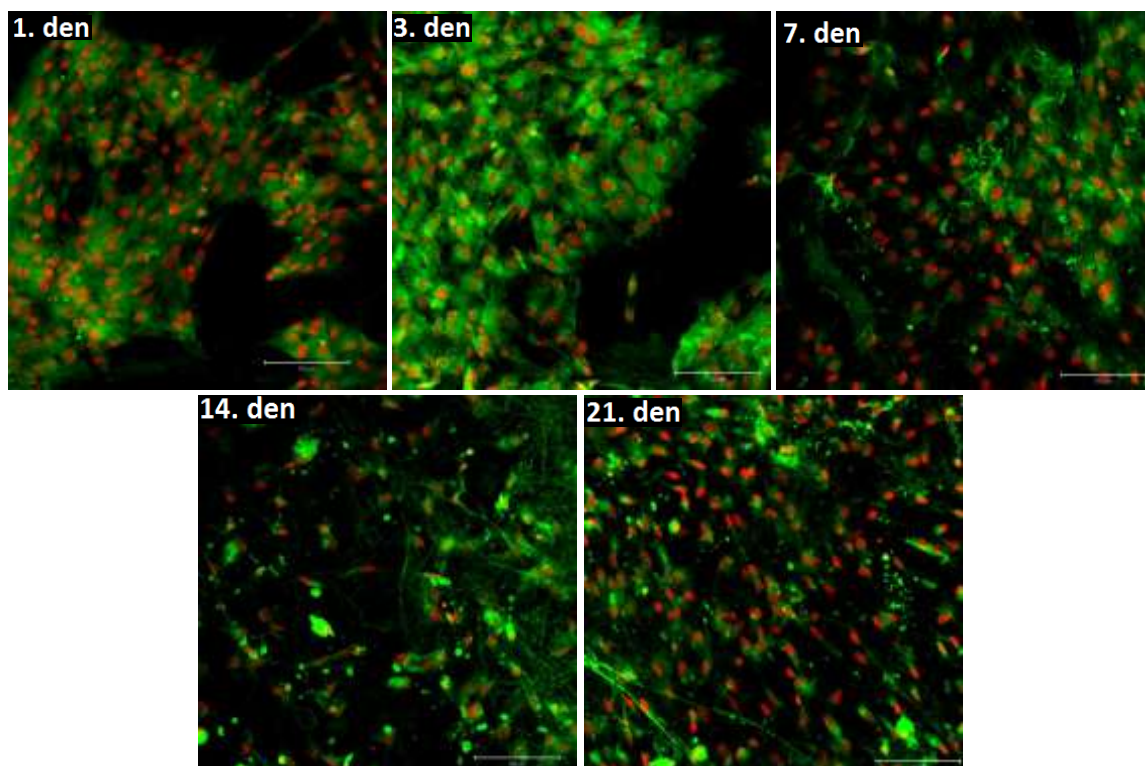
Obrázek č. 65: **Skupina G5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



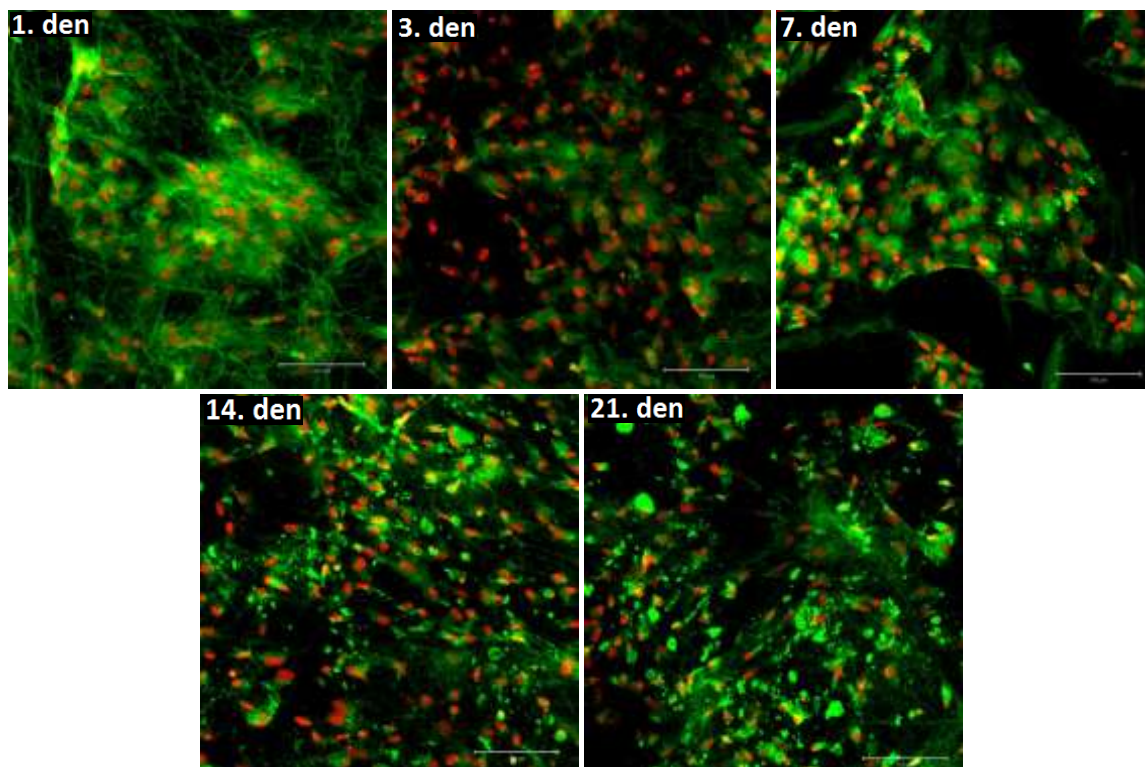
Obrázek č. 66: **Skupina G10:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



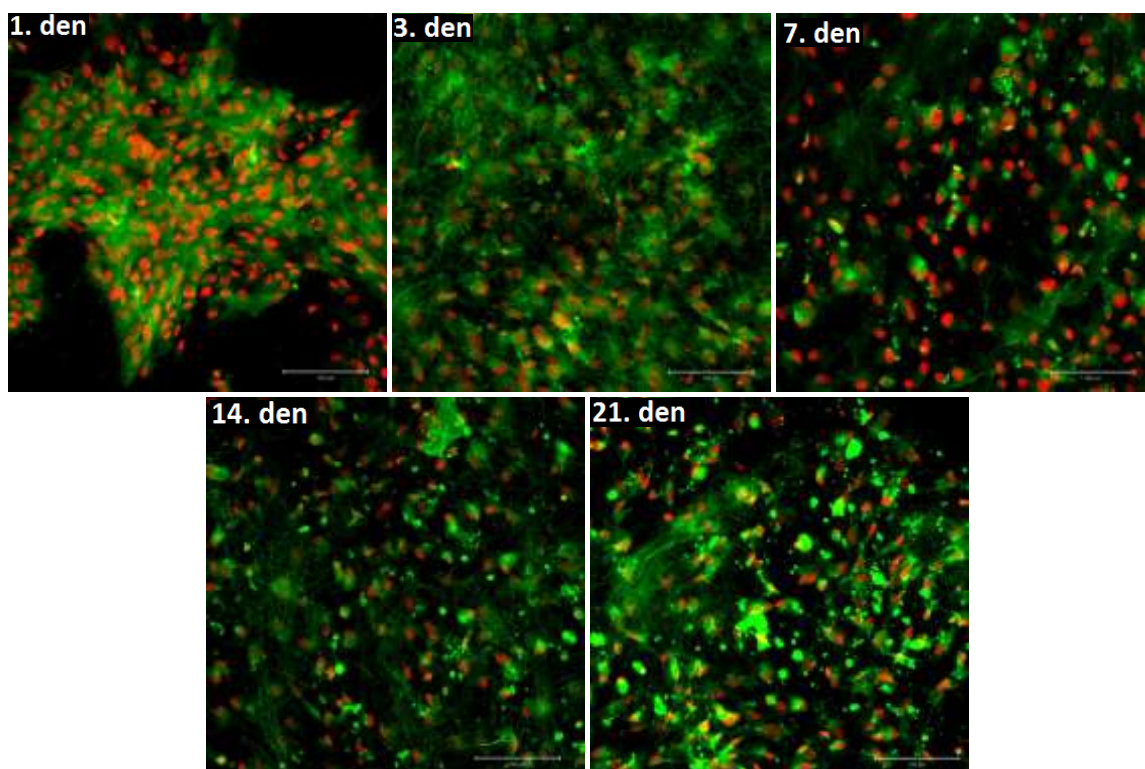
Obrázek č. 67: **Skupina K1:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



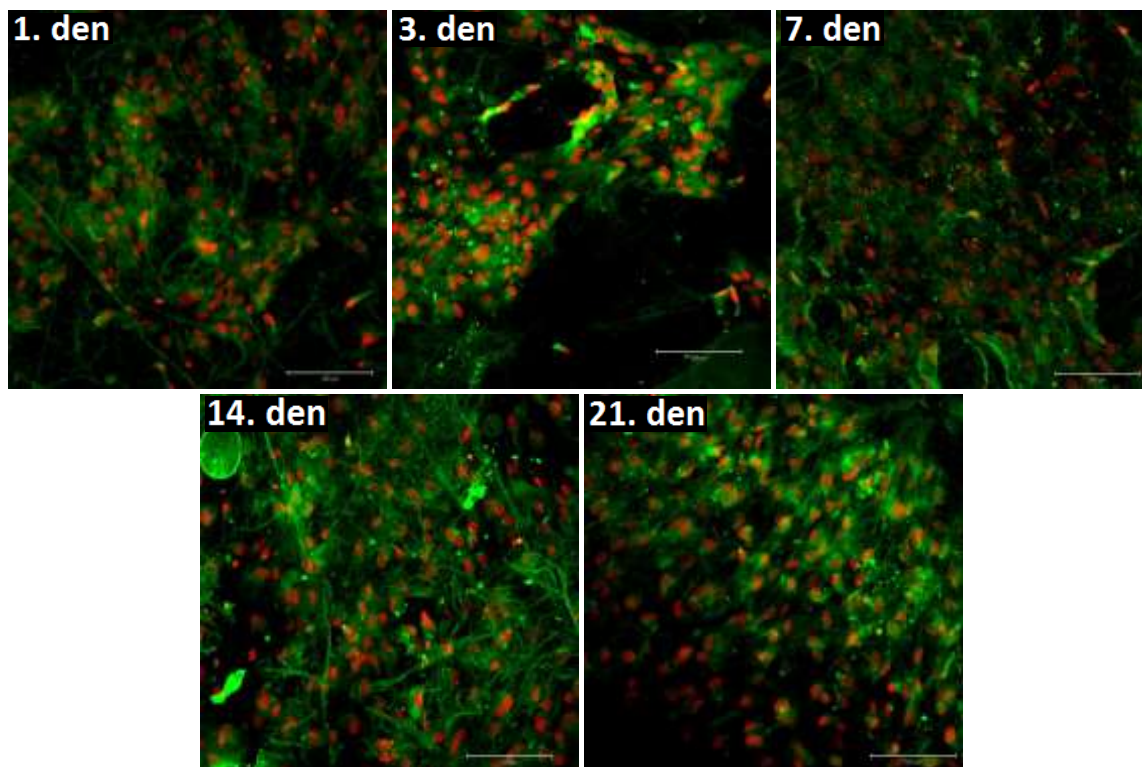
Obrázek č. 68: **Skupina K5:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .



Obrázek č. 69: **Skupina K10**: Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .



Obrázek č. 70: **Skupina K dif**: Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měrky je 200 μm .

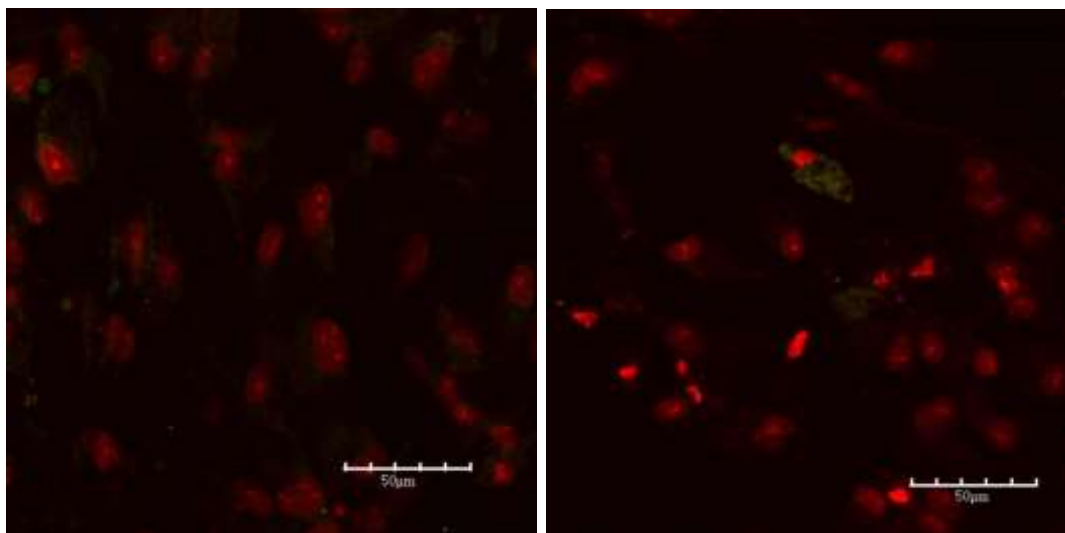


Obrázek č. 71: **Skupina Kontrola:** Vizualizace prasečích MSC inkubovaných na PCL nosičích pomocí fluorescenčních barev propidium jodid a DiOC6. Velikost měřky je 200 μm .

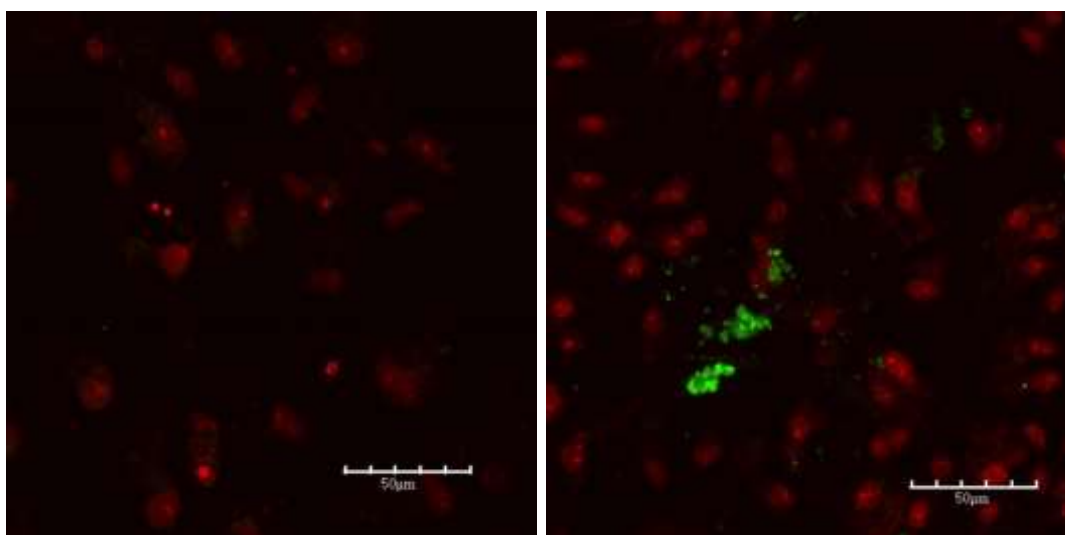
Na všech nosičích s použitým osteogenním médiem je pozorován shodný průběh vývoje buněčného chování, viz obrázky č. 58-71. Buňky jsou 1. den po nasazení na buněčných nosičích agregovány do shluků. Nebylo tedy možné spočítat jejich plochu, ta je ovšem pozorovatelná na snímcích pořízených ze skenovacího elektronového mikroskopu, viz obrázky č. 86-99. Buňky jsou na nosičích agregovány i v průběhu 3. dne, kdy je na nosičích pozorován největší počet buněk, které jsou po většinou v konfluentní vrstvě. Od 7. dne pak dochází k postupnému poklesu v počtu prasečích MSC na nosičích, což je ve shodě s výsledky PicoGreen testu, viz garfy č. 10 a 11. Od 7. dne rovněž dochází k segregaci buněk, které i přes nižší počet zaplňují celou plochu buněčného nosiče. V průběhu 14. a 21. dne se na snímcích objevuje značné množství obarvených membránových struktur v prostředí okolo buněk. To mohou být sekretované matrixové váčky, které se objevují v procesu mineralizace ECM. Na vzorku Kontrola, viz obrázek č. 71, je pozorováno rozdílné buněčné chování od 3. dne, počet buněk na nosičích neklesá tak významně jako na ostatních vzorcích, 14. a 21. den pak nejsou téměř pozorovány membránové struktury vně buněk. I v průběhu 21. dne se zdá, že buňky jsou více agregovány, než na zbývajících nosičích.

2.2.3.5 BARVENÍ OSTEOKALCINU

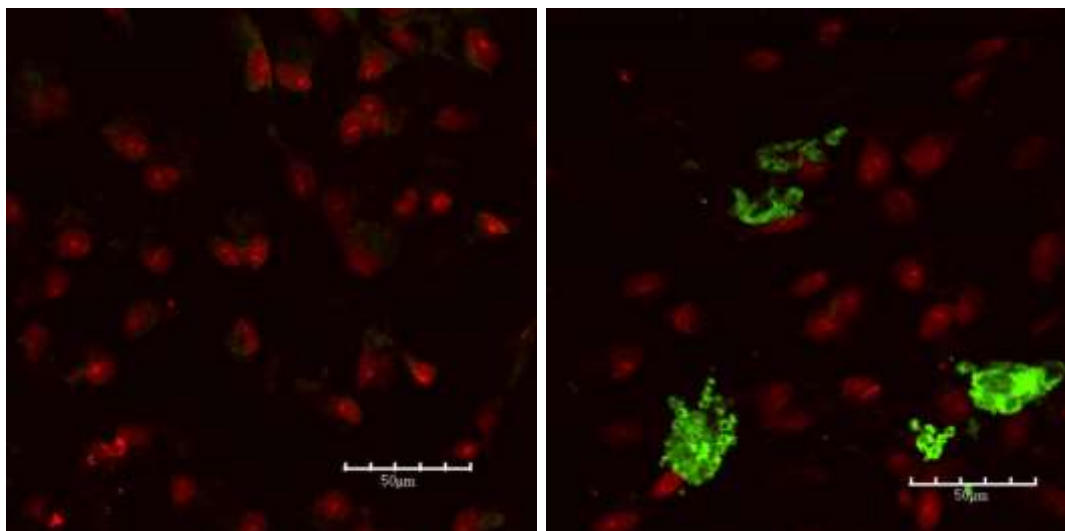
V průběhu experimentu byl 14. a 21. den barven osteokalcin, což je pozdní marker osteogeneze. Celý postup je popsán v kapitole Metody. Na snímcích je zeleně zachycen osteokalcin, který je barven primární protilátkou proti osteokalcniu a sekundární protilátkou Alexa Fluor 488. Červeně jsou pak na snímcích zachycena jádra obarvená fluorescenční barvou propidium jodid, viz obrázky č. 72-85.



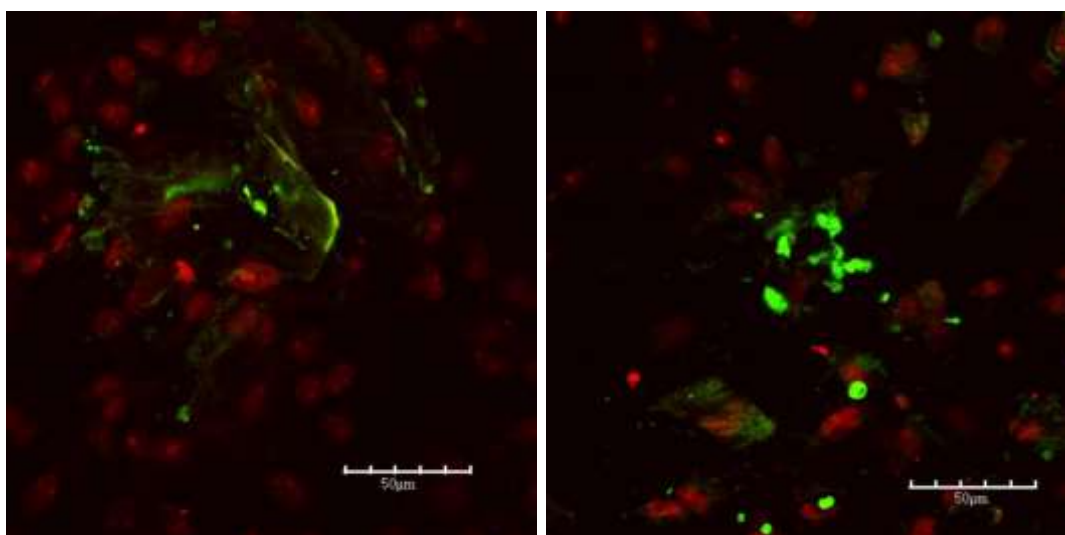
Obrázek č. 72: **Skupina D1:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



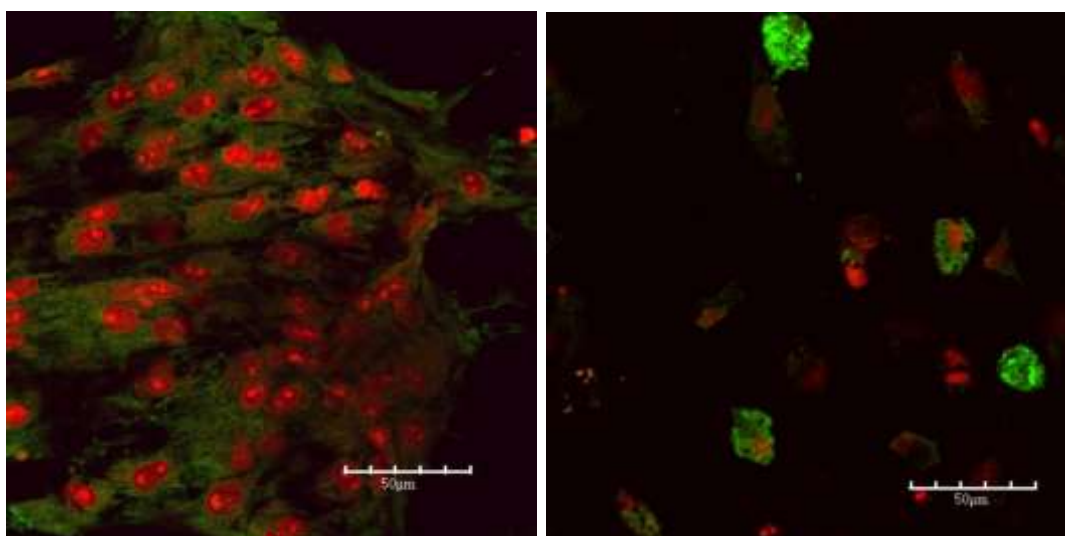
Obrázek č. 73: **Skupina D5:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



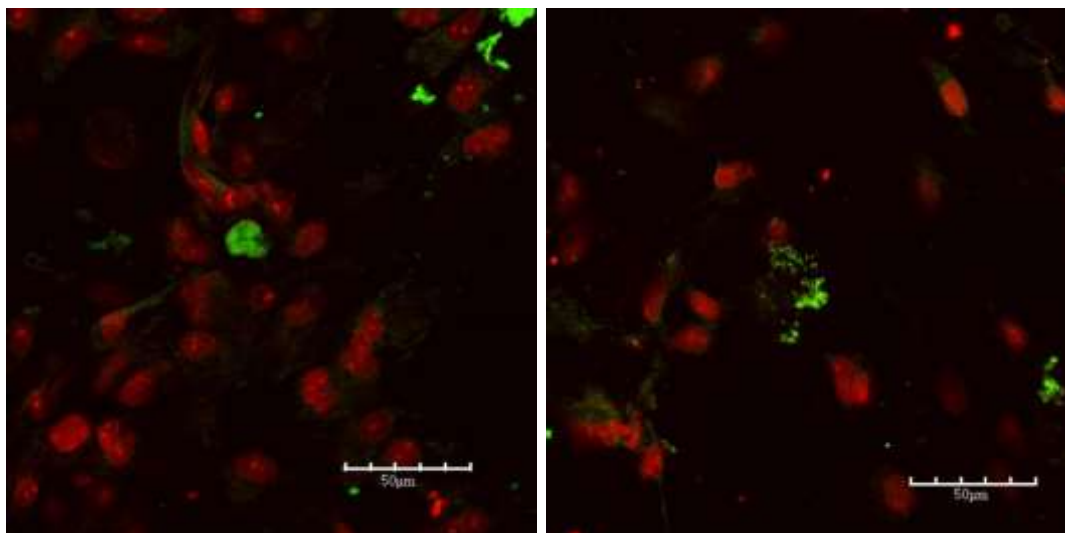
Obrázek č. 74: **Skupina D10**: Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 μm.



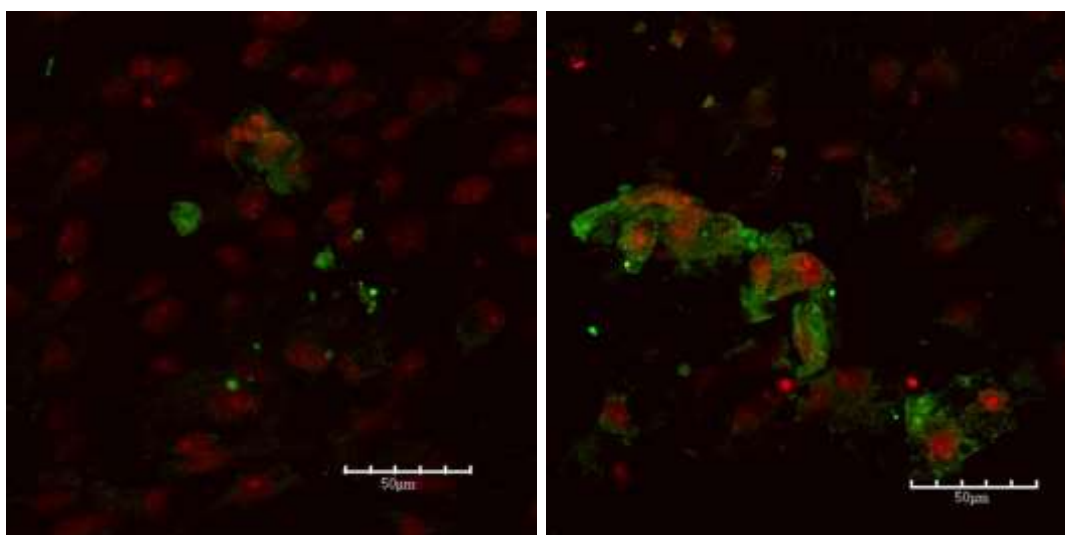
Obrázek č. 75: **Skupina I1**: Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 μm.



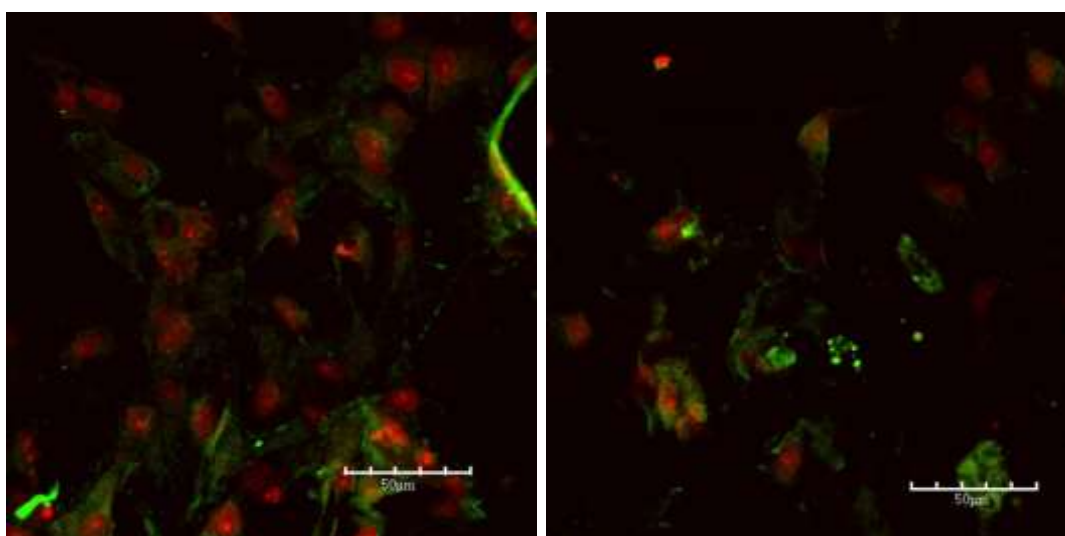
Obrázek č. 76: **Skupina I5**: Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 μm.



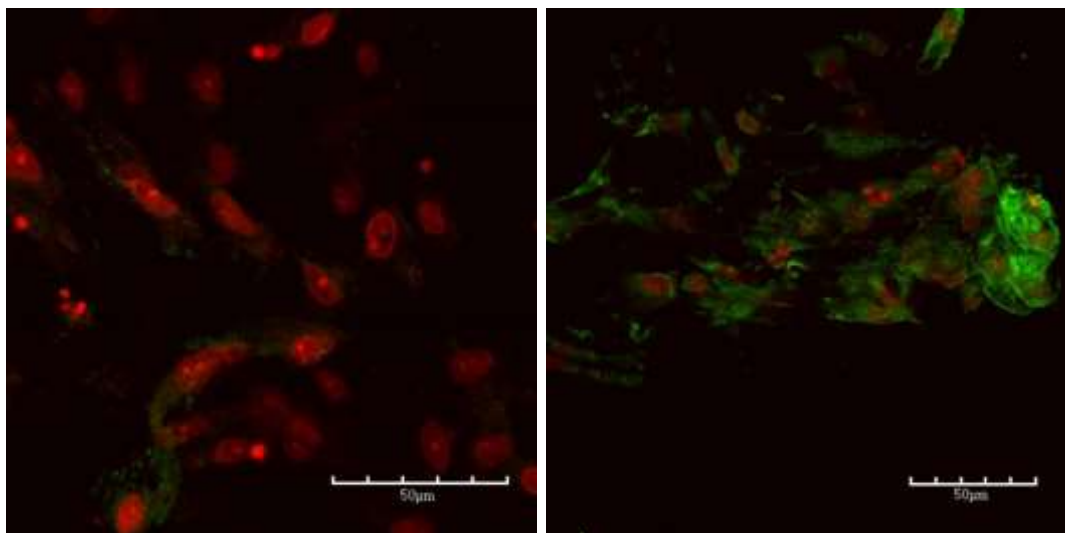
Obrázek č. 77: **Skupina I10**: Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



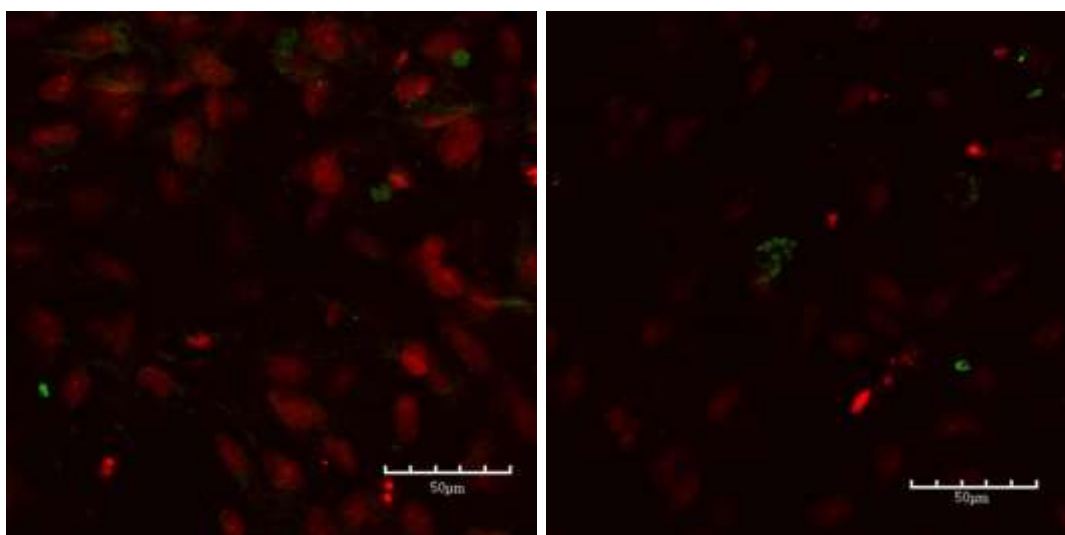
Obrázek č. 78: **Skupina G1**: Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



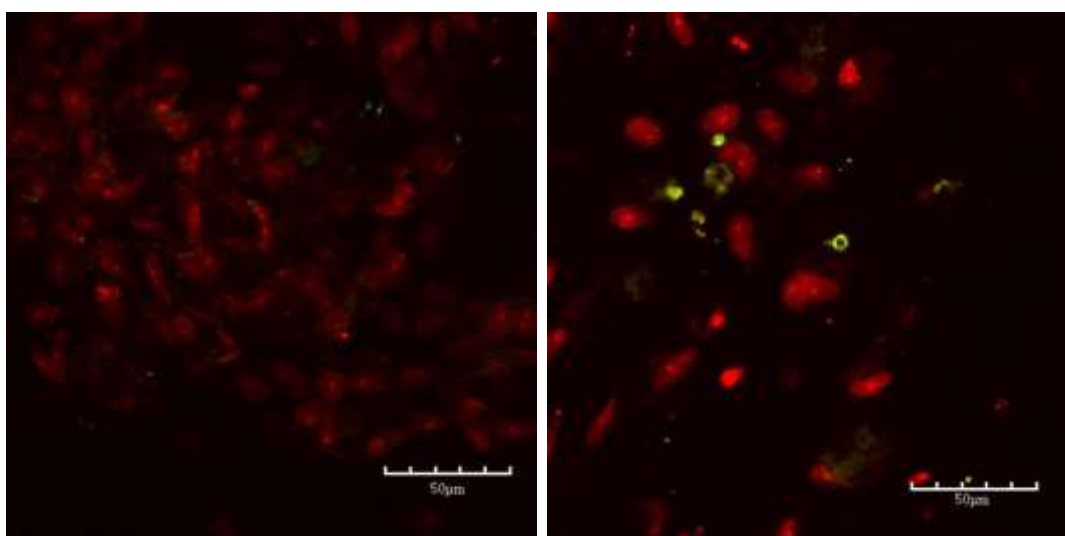
Obrázek č. 79: **Skupina G5**: Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měrky je 50 µm.



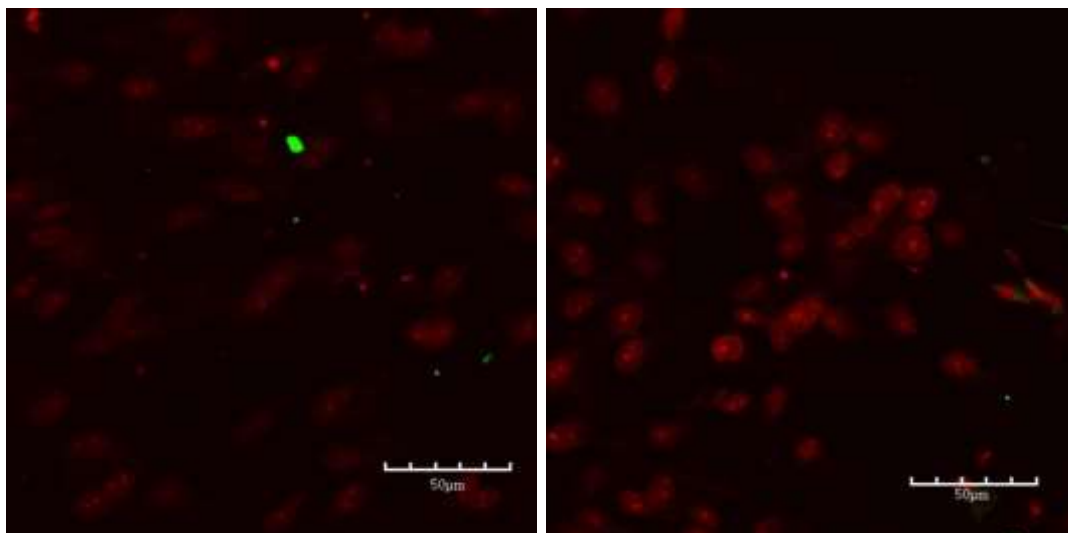
Obrázek č. 80: **Skupina G10:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



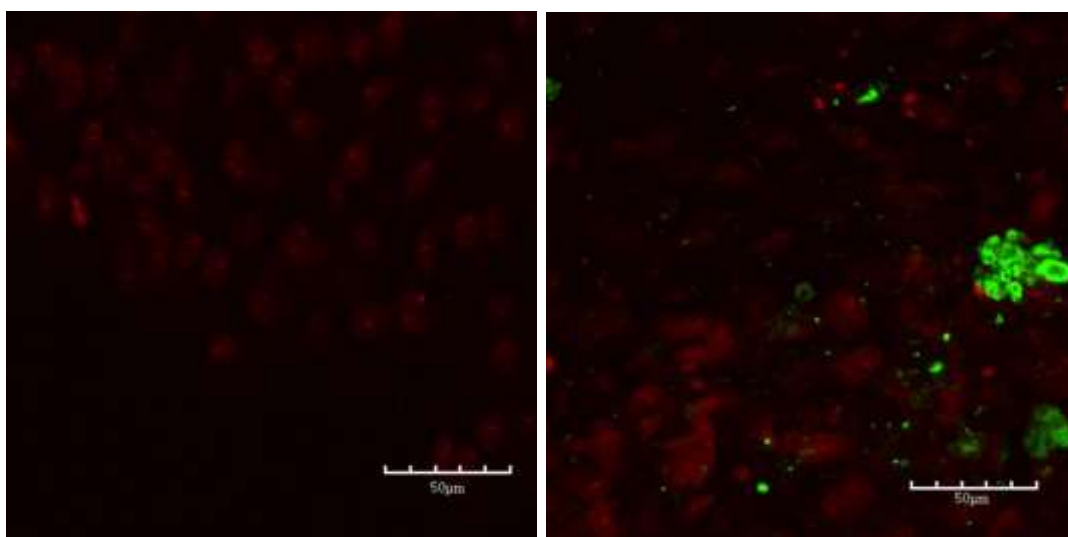
Obrázek č. 81: **Skupina K1:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



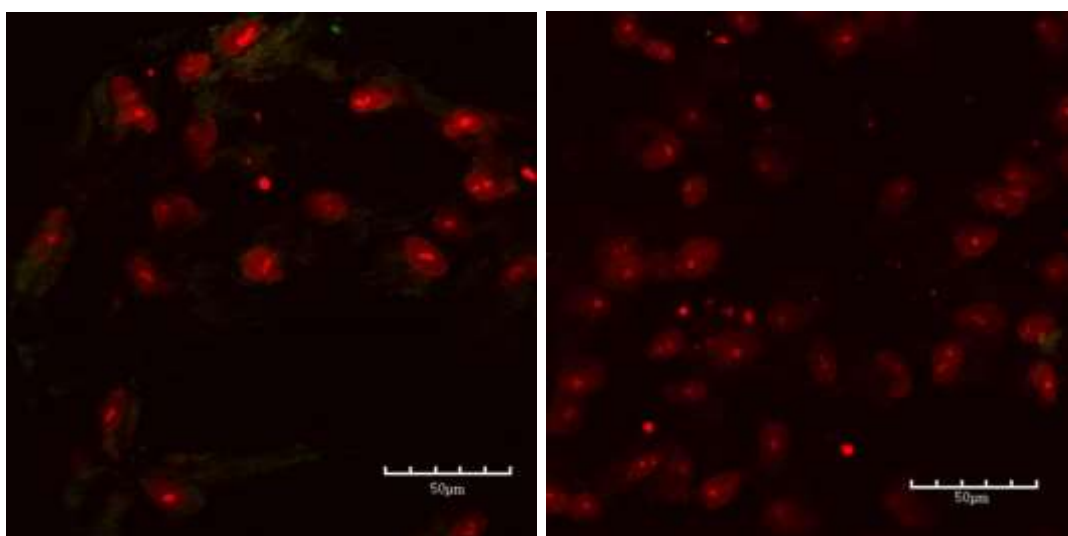
Obrázek č. 82: **Skupina K5:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



Obrázek č. 83: **Skupina K10:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



Obrázek č. 84: **Skupina K dif:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.



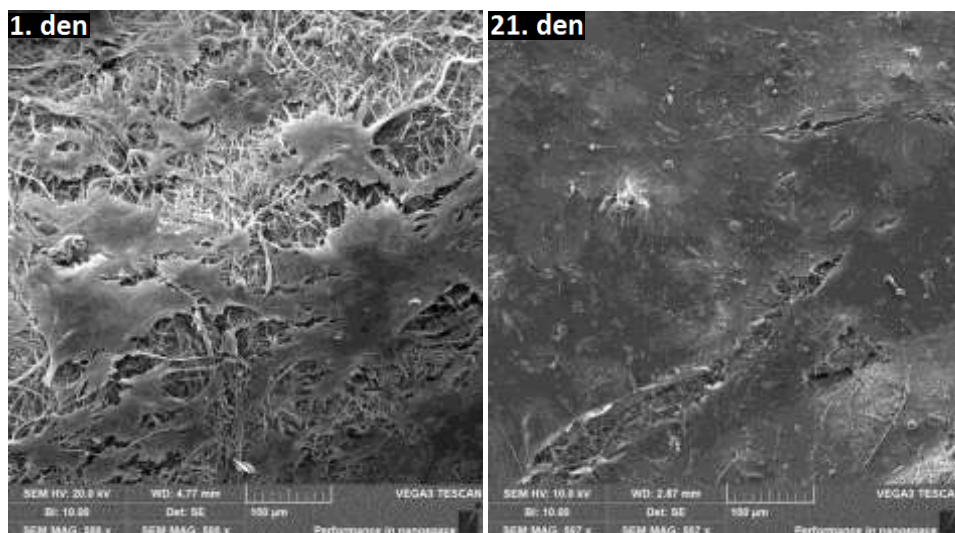
Obrázek č. 85: **Skupina Kontrola:** Barvení osteokalcinu, vlevo 14. den, vpravo 21. den. Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Velikost měřky je 50 µm.

Na vzorku K dif, viz obrázek č. 84, je 21. den pozorovatelný osteokalcin, 14. den však ne. Na vzorku Kontrola, obrázek č. 85, je velmi málo pozorovatelný osteokalcin 14. den, 21. den pak osteokalcin není téměř vůbec přítomen. Na vzorku D1, obrázek č. 72, je pozorovatelné shodné, avšak nepatrné množství osteokalcinu 14. i 21. den pokusu. Při zvyšující se koncentraci peptidu je pak na vzorcích D5 a D10, obrázky č. 73 a 74, pozorováno výrazné množství osteokalcinu 21. den. Průběh na vzorcích D5 a D10 je shodný se vzorkem K dif, obrázek č. 84. Na vzorcích I1 a I5, viz obrázky č. 75 a 76, je pozorován osteokalcin ve vyšším množství než na vzorku K dif oba testované dny. Na vzorku I10, obrázek č. 77, je pozorován osteokalcin rovněž oba testované dny, je ho zde nepatrně méně než u skupin I1 a I5. Na vzorcích G1 a G5, obrázky č. 78 a 79, je osteokalcin ve větším množství než na vzorku K dif oba testované dny. Na vzorku G10, obrázek č. 80, je pak 14. den osteokalcinu méně než na vzorcích G1 a G5, ovšem 21. den je již osteokalcin přítomen ve vyšším množství. Na vzorcích s peptidy K u všech použitých koncentrací, obrázky č. 81-83, je v oba testované dny pozorováno jen nepatrné množství osteokalcinu, srovnatelné s Kontrolním vzorkem, obrázek č. 85.

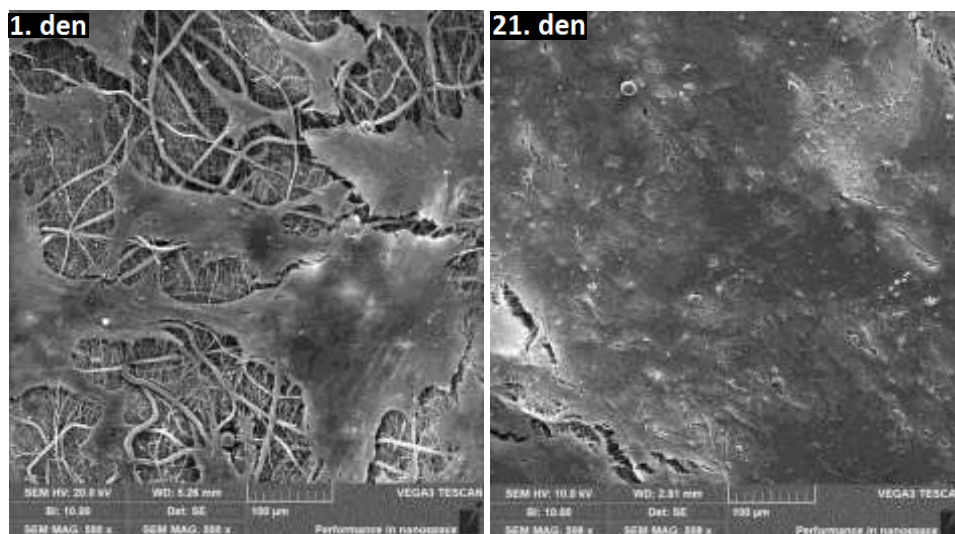
Ze získaných hodnot je patrné, že peptidy I a G v přítomnosti osteogenních suplementů podporují nejvíce osteogenní diferenciaci prasečích MSC. Osteokalcin byl na vzorcích přítomen ve vyšším množství než na vzorku K dif. Shodné množství osteokalcinu jako na vzorku K dif bylo na vzorcích D5 a D10. Vzorek D1 a pak všechny vzorky s použitým peptidem K vykazovaly téměř nulové množství osteokalcinu, což je shodný trend s průběhem na vzorku Kontrola.

2.2.3.6 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

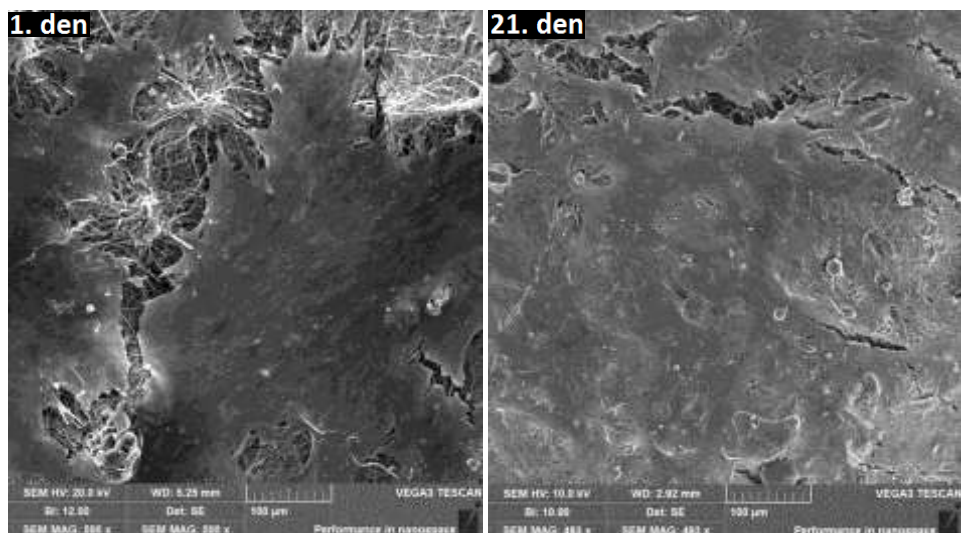
Buňky na buněčných nosičích byly 1. a 21. den experimentu fixovány glutaraldehydem a pozorovány na skenovacím elektronovém mikroskopu, viz obrázky č. 86-99. Postup je popsán v kapitole Metody.



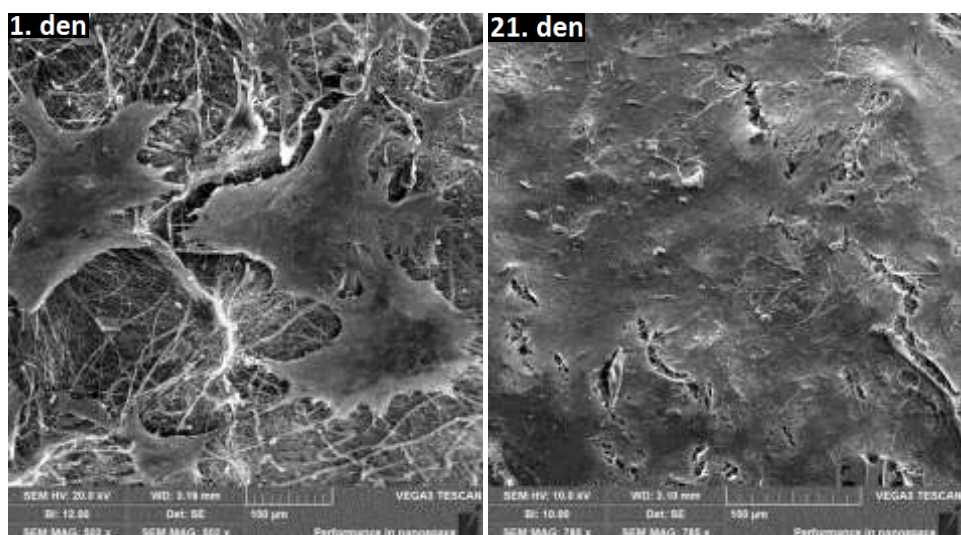
Obrázek č. 86: **Skupina D1:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



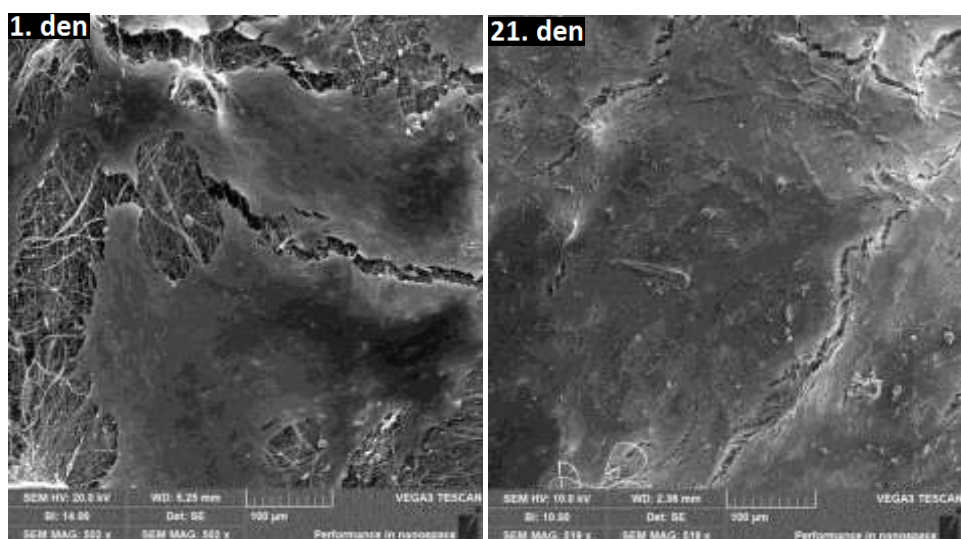
Obrázek č. 87: **Skupina D5:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



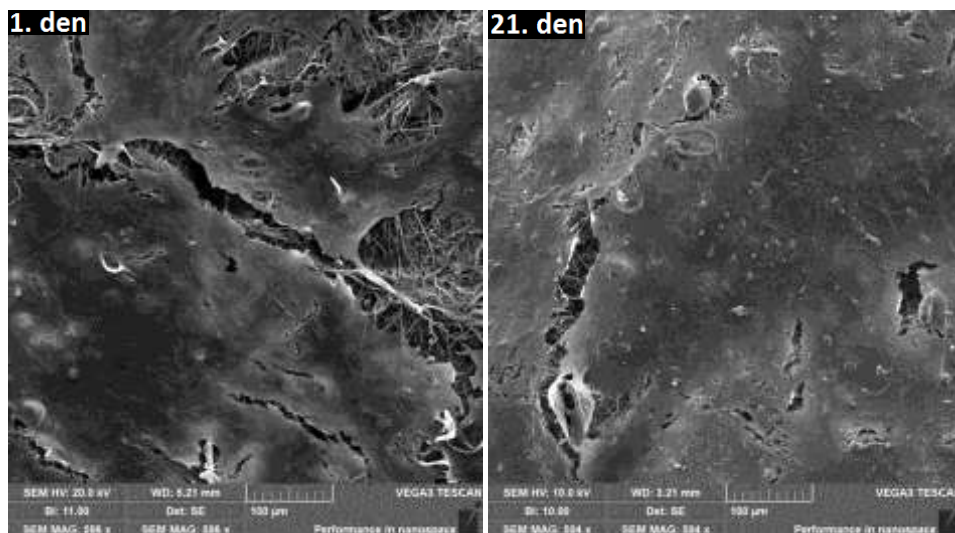
Obrázek č. 88: **Skupina D10**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



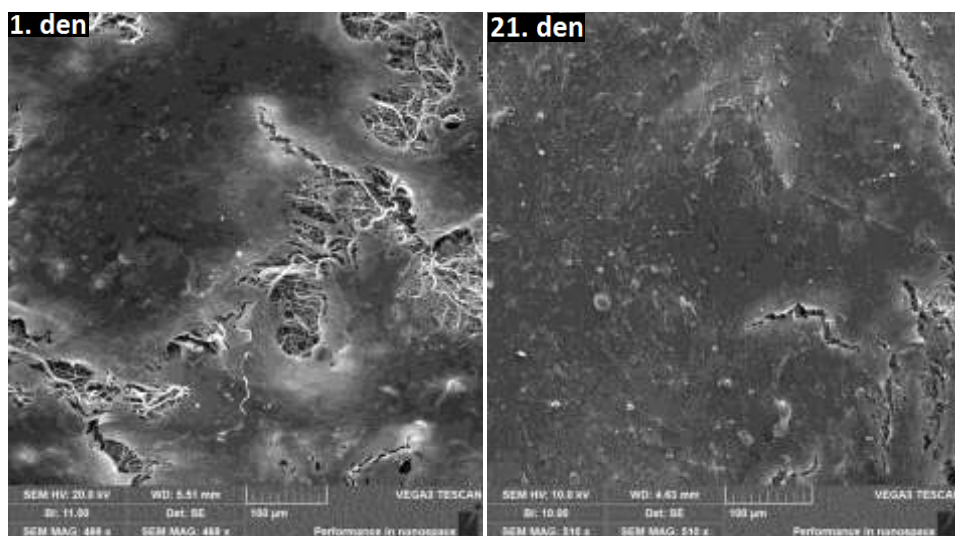
Obrázek č. 89: **Skupina I1**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



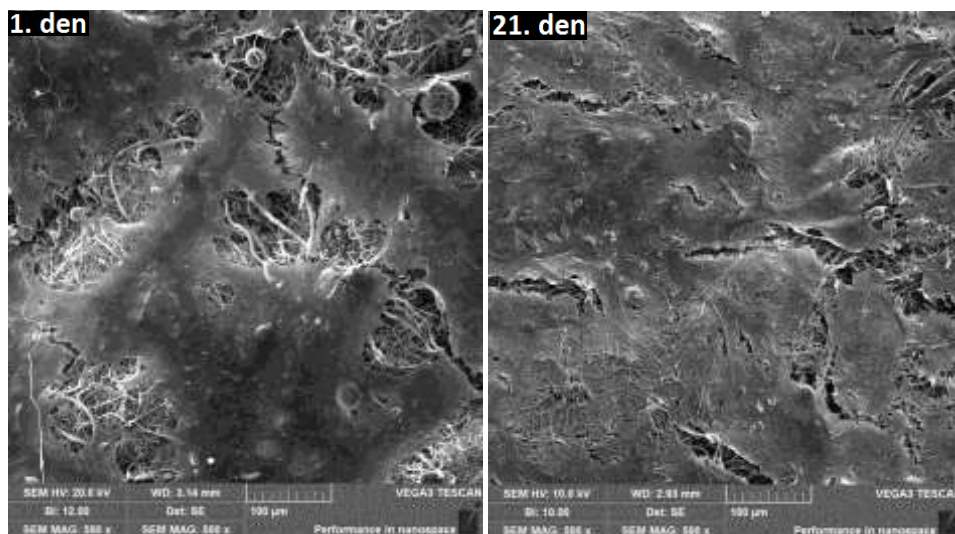
Obrázek č. 90: **Skupina I5**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



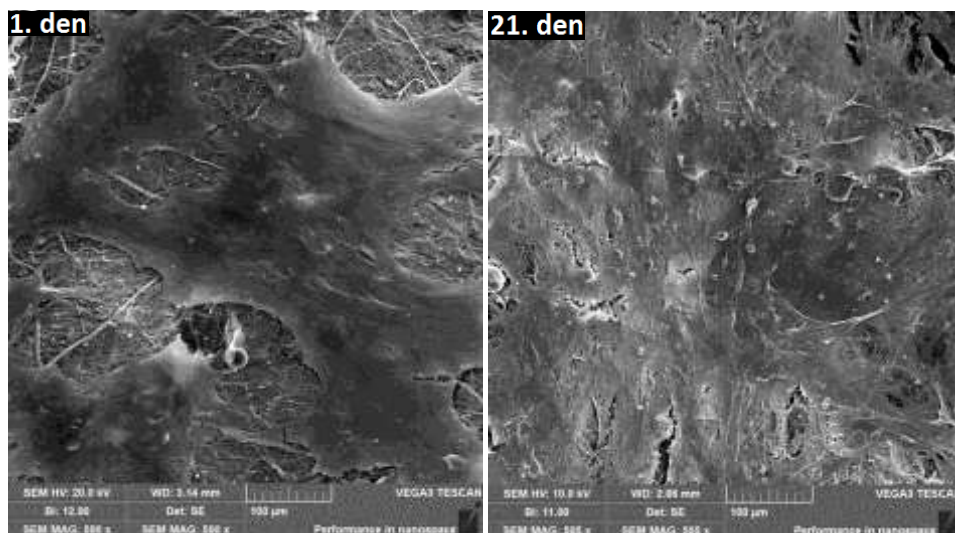
Obrázek č. 91: **Skupina I10:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



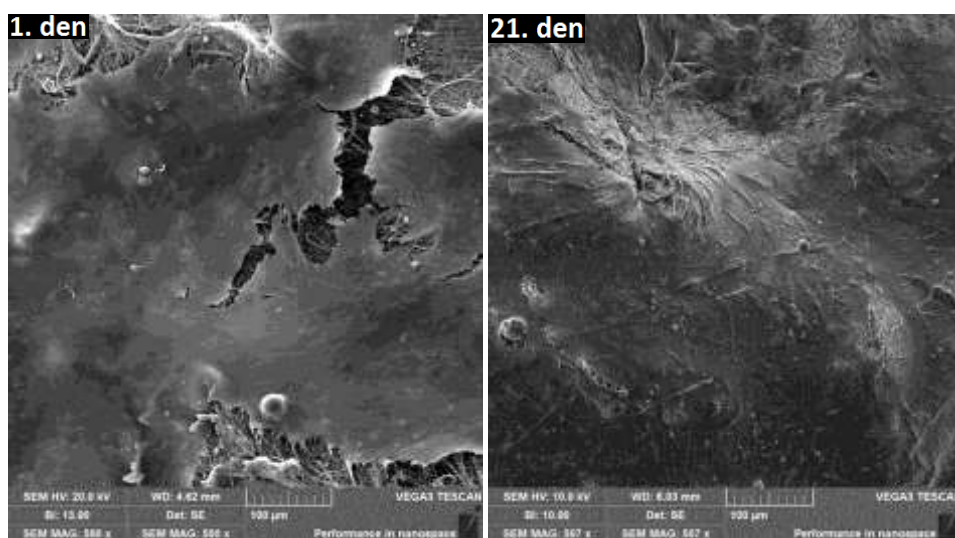
Obrázek č. 92: **Skupina G1:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



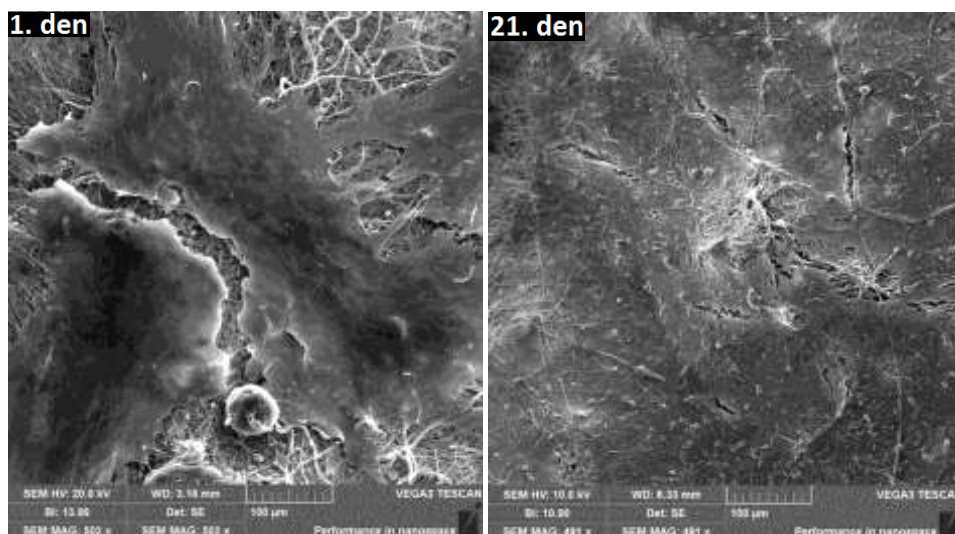
Obrázek č. 93: **Skupina G5:** Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



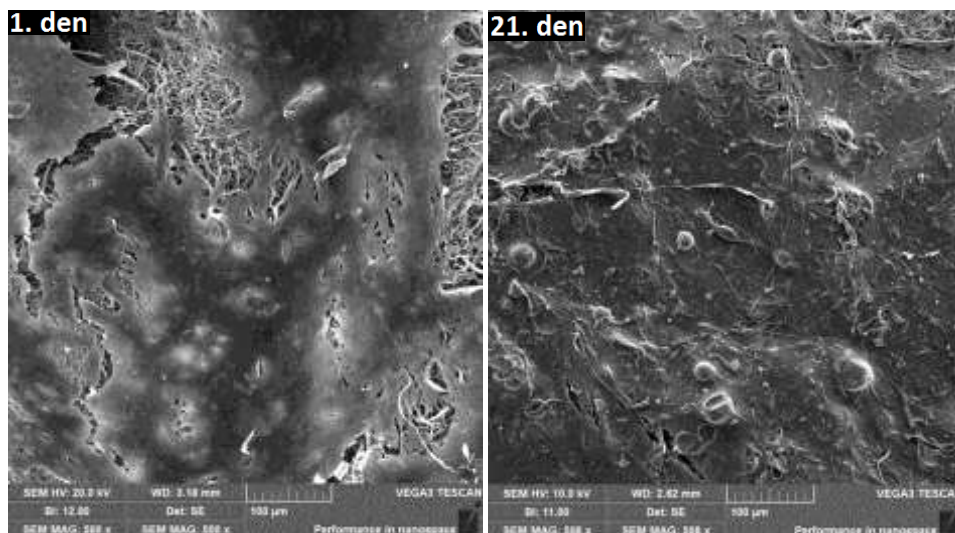
Obrázek č. 94: **Skupina G10**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



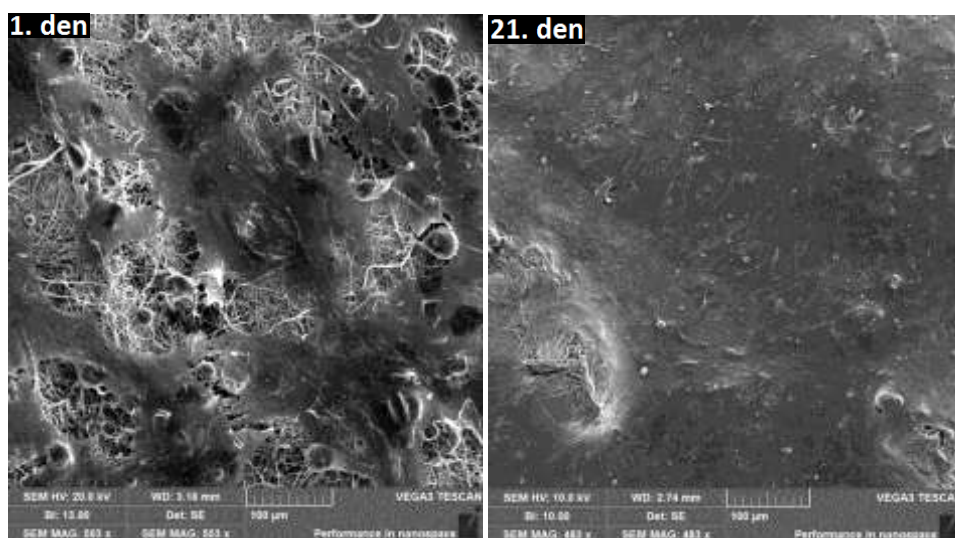
Obrázek č. 95: **Skupina K1**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



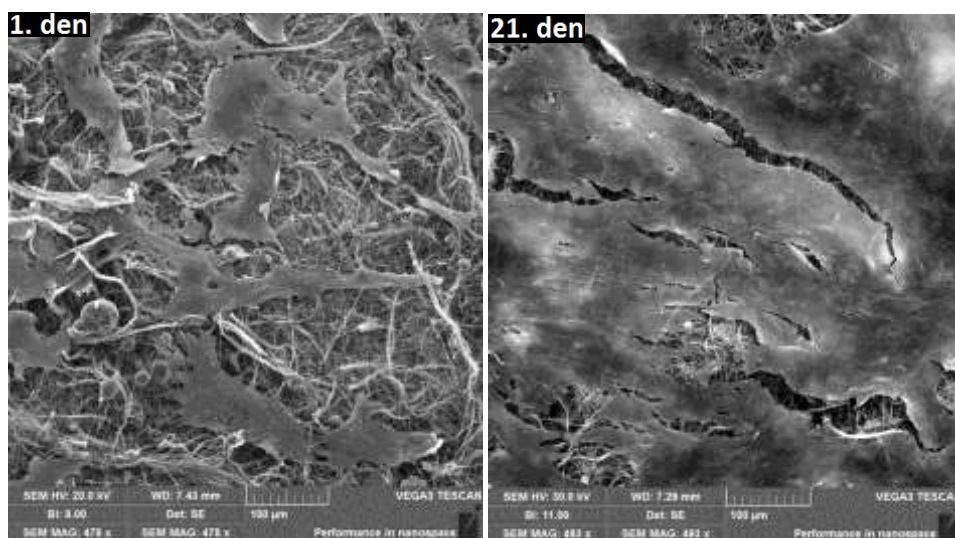
Obrázek č. 96: **Skupina K5**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



Obrázek č. 97: **Skupina K10**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



Obrázek č. 98: **Skupina K dif**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.



Obrázek č. 99: **Skupina Kontrola**: Prasečí MSC inkubované na PCL nosiči. Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Velikost měrky je 100 µm.

Snímky pořízené 1. den ukazují výbornou adhezi prasečích MSC na buněčný nosič. Buňky na nosičích agregují a jsou roztažené, viz obrázky č. 86-99. Největší agregáty jsou pozorovatelné u skupin D10, I5, I10 a u všech skupin s použitými peptidy G a K, viz obrázky č. 88, 90-97. Snímky u skupin D1, D5, I1 a K dif, viz obrázky č. 86, 87, 89, 98, ukazují menší buněčné agregáty. Z toho plyne, že přidavek vyšší koncentrace peptidů D a I a přidavek peptidů G a K o všech testovaných koncentracích přispívá k adhezi a roztažení buněk. Na skupině Kontrola, obrázek č. 99, jsou pozorovatelné výraznější agregáty než na zbylých vzorcích, tedy přidavek osteogenních suplementů má vliv na adhezi a roztažení buněk 24 hodin po nasazení.

Snímky pořízené 21. den experimentu ukazují plně konfluentní vrstvy prasečích MSC na buněčných nosičích u všech skupin. Na skupinách s peptidy G a K je vidět krystalové struktury na povrchu buněk, což by mohl být deponovaný hydroxyapatit a nebo matrixové váčky, viz obrázky č. 92-97. Krystalků je méně na skupinách s peptidy D a I a na skupině K dif, viz obrázky č. 86-91 a 98. Na skupině Kontrola, obrázek č. 91, se nevyskytují žádné krystalky a povrch buněk se jeví hladký. Z toho je patrné, že přidavek peptidů G a K vede k navození osteogenní diferenciaci.

DISKUZE

Interakce ECM s buněčnými receptory přímo ovlivňuje buněčné chování. Inkorporace proteinů ECM, a nebo z nich odvozených sekvencí může vést k diferenciaci MSC. Takto vytvořený biomimetický nosič by mohl mít potenciál ovlivnit osteogenní diferenciaci MSC po implantaci nosiče v místě defektu.

Na základě výše zmíněné hypotézy byl stanoven cíl práce. Cílem bylo ověřit, zda diferenciační peptidy odvozené z proteinů ECM mají vliv na adhezi, proliferaci, viabilitu a osteogenní diferenciaci prasečích MSC. Sekvence diferenciačních peptidů byly vybrány na základě článků věnujících se vlivu těchto peptidů na osteogenní diferenciaci. Zkoumaných peptidových sekvencí s vlivem na osteogenní diferenciaci je mnoho, viz tabulka č. 1. Pro tuto práci byly vybrány čtyři typy proteinů a to kolagen I, kolagen III, BMP-7 a BMP-2. Z nich odvozené aminokyselinové sekvence byly popořadě DGEA (D), IAGVGGEKSGGF (I), GQGFSYPYKAVFSTQ (G) a KIPKASSVPTELSAISTLYL (K). Tyto sekvence se jeví mít nejlepší potenciál k indukci osteogenní diferenciaci MSC.

Studie zabývající se vlivem diferenciačních peptidů na osteogenní diferenciaci mají různě nastaveny podmínky experimentů. Například existuje studie, která volí inkubaci jenom některých peptidů v bazálním médiu, jmenovitě RGD peptidu. Zbylé peptidy jako je peptid D inkubují v bazálním médiu s osteogenními suplementy [91]. Jiné studie zkoumají vliv diferenciačního peptidu G pouze v médiu s osteogenními suplementy [82, 105]. Tím pádem nelze říct, zda samotný peptid bez přídavku osteogenních suplementů má vliv na buněčnou diferenciaci. Dále existují studie zkoumající vliv peptidů na zlepšení funkce kultivovaných osteoblastů. Z těchto studií však nelze posoudit vliv peptidu na iniciační osteogenní diferenciaci MSC [84, 89, 101]. Další studie se zabývají osteogenní diferenciací peptidů s aminokyselinovou sekvencí RGD a GFOGER [86, 90, 91]. Jiné studie se však zabývají vlivem stejných aminokyselinových sekvencí na chondrogenní diferenciaci MSC [95, 96, 98]. Dále existuje studie, která se zabývá efektem peptidů D a K při inkubaci MSC na hydroxyapatitovém substrátu, který má také vliv na osteogenezi [75, 102].

Pro úspěšné detekování skutečného diferenciačního potenciálu peptidů byly pokusy nastaveny tak, že peptidy byly inkubovány s prasečími MSC nejprve v bazálním médiu. Samotné bazální médium by nemělo podporovat diferenciaci buněk. Následně

byly prováděny experimenty, při nichž byly peptidy inkubovány s přidavkem diferenciačních peptidů do bazálního média s osteogenními suplementy. Na základě těchto pokusů bylo možné porovnat efektivitu diferenciačních peptidů a zároveň říci, zda přítomnost diferenciačních peptidů v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů měla odlišný efekt od přidání peptidů do samotného bazálního média.

Prasečí MSC byly kultivovány na PCL nosičích vyrobených metodou elektrostatického zvlákňování po dobu dvaceti jedna dní. V tomto čase již lze stanovit, zda dochází k osteogenní diferenciaci. Pro ověření vlivu diferenciačního potenciálu byly MSC inkubovány s různými koncentracemi diferenciačních peptidů. Vybrané koncentrace byly 1, 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ kultivačního média. Tato množství byla zvolena, jelikož by měla mít potenciál navodit osteogenní diferenciaci a zároveň nejsou suprafyziologická. Testována byla nejen buněčná diferenciace, ale také adheze, viabilita a proliferace prasečích MSC.

PCL nosič byl vybrán, protože nepodporuje buněčnou diferenciaci. Zároveň je tento materiál biokompatibilní a buňky na něj adherují ve vysokém počtu. Metoda elektrostatického zvlákňování byla použita k výrobě nanovlákných PCL buněčných nosičů. Průměr vláken PCL nosiče se pohyboval v rozmezí 110 nm - 1,485 μm , viz graf č. 1. Různorodost povrchu nosiče je optimální. Buňky na takový nosič adherují ve vysoké míře [106]. Dále je toto rozmezí tloušťky vláken u PCL nosiče výhodné, jelikož přítomnost nanostruktur napodobuje ECM a nanokrystalky hydroxyapatitu [79]. Přítomnost mikrostruktur pak nosič vyztužují.

Odhad velikosti pórů stanovil, že nejběžněji se v PCL nosiči vyskytují póry s poloměrem 319 nm. S určitou pravděpodobností se také vyskytují póry až s velikostí poloměru 10 μm . Vyrobený mikroporézní nosič je odolný, menší póry nesnižují mechanickou odolnost nosiče tolik jako přítomnost makropórů [80]. Póry přítomné na dvouvrstevném PCL nosiči neumožňují buňkám penetrovat do hloubky nosiče. Penetrace je možná až při výskytu pórů s poloměrem nad 60 μm [107]. Buňky tak po celou dobu zůstávají na povrchu nosiče, kde mají dostatečný přísun živin.

Kontaktní úhel u vyrobené PCL vrstvy byl naměřen v hodnotě $82,61^\circ \pm 21,35^\circ$. Tato hodnota udává, že vyrobený PCL nosič je hydrofobní. Hranice určující zda je nosič hydrofilní, a nebo hydrofobní je 65° . Vyšší hydrofobicita nosiče je výhodná, jelikož na hydrofilních nosičích je problém s iniciální buněčnou adhezí a to i přes to, že nosič by byl biokompatibilní. Na povrchové skupiny nosiče se totiž přednostně navazují molekuly vody, které tak zabraňují buněčné adhezí.

V případě inkubace prasečích MSC na PCL nosiči v bazálním médiu s přidavkem diferenciačních peptidů docházelo k proliferaci buněk u všech skupin. To udávají výsledky z PicoGreen testu, viz grafy č. 3 a 4. Obsah buněčné DNA stoupal u všech testovaných skupin po celou dobu experimentu. Vzhledem ke shodným hodnotám Kontroly se skupinami inkubovanými s diferenciačními peptidy mohu usuzovat, že přidavek peptidů do média nemá vliv na buněčnou proliferaci. Toto zjištění se shoduje s výsledky studií zabývajících se vlivem peptidu D a I na proliferaci MSC. Vliv na zlepšení proliferace MSC rovněž nebyl prokázán [83, 91, 99].

V případě inkubace prasečích MSC s přidavkem různé koncentrace peptidů v bazálním médiu s osteogenními suplementy docházelo k nárůstu v obsahu buněčné DNA u všech vzorků pouze do 3. dne, viz graf č. 10 a 11. Po 3. dni hmotnost buněčné DNA na nosičích klesala. Jelikož maximum v počtu buněk do 4. dne kultivace je charakteristické pro osteogenní diferenciaci, nejspíš zde byla zahájena osteogenní diferenciace. Signifikantní rozdíly v obsahu buněčné DNA nebyly mezi skupinami pozorovány. Z toho plyne, že přidavek diferenciačních peptidů nemá vliv na buněčnou proliferaci ani v případě, kdy dochází k inkubaci buněk v bazálním médiu s osteogenními suplementy.

Vizualizace buněk inkubovaných na PCL nosiči byla provedena konfokální mikroskopií. Obrázky č. 19-31 byly pořízeny pro skupiny inkubované v médiu bez přidavku osteogenních suplementů. Buňky na všech nosičích po celou dobu pokusu proliferují. Toto pozorování je ve shodě s výsledky z PicoGreen testu, viz grafy č. 3 a 4. Buněčné agregáty jsou patrné do 3. dne. V průběhu 14. a 21. dne je vidět, že buňky na nosičích disagregují a tvoří konfluentní vrstvy. Rozdíly mezi skupinami nebyly pozorovány.

Snímky pořízené při inkubaci buněk v bazálním médiu s osteogenními suplementy, viz obrázky č. 58-71, ukazují maximální počet buněk 3. den po nasazení. Následně dochází na nosičích k úbytku buněk. Tento fakt opět potvrzuje výsledky měření obsahu buněčné DNA, viz grafy č. 10 a 11. Mezi skupinami nejsou patrné výraznější rozdíly. Dvacátý první den jsou na snímcích inkubovaných s přidavkem osteogenních suplementů patrné membránové struktury vně buněk. Ty nebyly pozorovány u skupiny Kontrola. Tyto struktury jsou nejspíše matrixové váčky, které se objevují v procesu mineralizace při osteogenní diferenciaci. Mezi skupinami s peptidy a skupinou K dif nebyl pozorován rozdíl v množství membránových struktur. Vliv na jejich sekreci mají tedy osteogenní suplementy.

Buňky inkubované v bazálním médiu tvořily již první den agregáty, charakteristické pro MSC. Viz obrázky č. 45-57 pořízené skenovací elektronovou mikroskopií. Buňky jsou na nosičích roztažené. Jelikož velikost pórů se pohybuje v rozmezí 319 nm – 10 μ m je patrné, že buňky zůstávají adherovány na povrchu a nepenetrují do hloubky nosiče. Dvacátý první den pokusu byly na nosičích pozorovány konfluentní vrstvy buněk, bez rozdílu mezi testovanými skupinami.

Skenovací elektronová mikroskopie buněk inkubovaných v bazálním médiu s osteogenními suplementy odhalila, že na nosičích vznikaly větší buněčné agregáty, viz obrázky č. 86-99. Tyto agregáty byly na skupině Kontrola menší. Dvacátý první den byly na nosičích konfluentní vrstvy MSC. U vzorků s přidavkem osteogenních suplementů byly na povrchu buněk pozorovány krystalické struktury. Nejspíš se jednalo o matrixové váčky, a nebo o vznikající krystalky hydroxyapatitu. Jelikož i na konfokálním mikroskopu byly u těchto vzorků patrné membránové struktury, usuzuji, že zde byla navozena osteogenní diferenciace. Nejvíce krystalků bylo pozorováno u buněk inkubovaných s diferenciačními peptidy G a K. Tyto peptidy mají tedy přídatný vliv na osteogenní diferenciaci při inkubaci s osteogenními suplementy. Krystalické struktury nebyly pozorovány u skupiny Kontrola.

Na základě PicoGreen testu, konfokální mikroskopie a snímků pořízených skenovací elektronovou mikroskopií vyvozují, že přidavek diferenciačních faktorů nemá vliv na adhezi a buněčnou proliferaci. Rozdíly patrné mezi oběma typy použitého kultivačního média prokazují nástup osteogenní diferenciace v důsledku přidání osteogenních suplementů. Osteogenní diferenciace byla vylepšena přidavkem peptidů G a K do bazálního média s osteogenními suplementy.

Prokázání vlivu diferenciačních peptidů na metabolickou aktivitu buněk bylo realizováno MTS testem. Buňky inkubované v bazálním médiu vykazovaly nárůst metabolické aktivity po celou dobu třítydenního pokusu, viz grafy č. 5 a 6. V průběhu pokusu se nevyskytovaly statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Rozličné tendence v metabolické aktivitě byly odhaleny při vztažení metabolické aktivity na jednu buňku, viz graf č. 7. Metabolická aktivita vztažená na jednu buňku byla nejnižší u Kontrolní skupiny a dále u skupin K5 a D5. Zbýlé hodnoty byly vyšší. Z toho vyplývá, že přidavek diferenciačních faktorů má vliv na metabolickou aktivitu jednotlivých buněk. Tyto rozdíly však nejsou pozorovány u hodnot uvedených pro celkovou populaci inkubovaných MSC.

Při inkubaci buněk s osteogenními suplementy docházelo k nárůstu metabolické aktivity u skupin do 3.-7. dne, viz grafy č. 12 a 13. Poté došlo k poklesu aktivity, což bylo způsobeno úbytkem buněk na nosičích. Signifikantně významné rozdíly mezi skupinami pozorovány nebyly. Hodnoty metabolické aktivity vztažené na jednu buňku se mezi skupinami výrazně neliší. Z toho plyne, že přídavek diferenciačních peptidů ani osteogenních suplementů neměl vliv na metabolickou aktivitu kultivovaných MSC. Shodného závěru dosáhly i studie zkoumající vliv peptidu G na metabolickou aktivitu MSC [82, 105].

Grafy č. 8 a 9 uvádí aktivitu ALP při inkubaci buněk v bazálním médiu. V průběhu experimentu nebylo dosaženo vrcholné hodnoty v její aktivitě. Jelikož ALP je časným markerem osteogenní diferenciace, měla by její aktivita stoupat od 5. do 14. dne. Aktivita ALP stoupala u všech skupin, ale jelikož v bazálním médiu nebyl zdroj anorganického fosfátu, nebylo dosaženo maxima v její aktivitě. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami s peptidy a Kontrolou naměřeny nebyly.

Měření aktivity ALP při inkubaci buněk v bazálním médiu s osteogenními suplementy, viz grafy č. 15 a 16, odhalilo odlišný vývoj v porovnání s buňkami inkubovanými pouze v bazálním médiu. Skupiny dosáhly vrcholu v aktivitě ALP v průběhu 7. dne u diferenciačních peptidů G, K a u skupiny K dif. V průběhu 14. dne dosáhla aktivita ALP svého maxima u skupin s použitými peptidy D a I. Skupina Kontrola vykazuje od 14. dne kultivace signifikantně nižší hodnoty v aktivitě ALP. Anderson *et al.* měřili aktivitu ALP 1., 14. a 21. den inkubace lidských MSC v bazálním médiu s přídavkem peptidu D. Signifikantně významný rozdíl v porovnání s kontrolou pozorován nebyl [83]. Studie testující peptidy D, I, G a K detekovaly zvýšenou aktivitu ALP po přidání peptidů do média. Měření však probíhala pouze jeden den pokusu. Zvoleny měly 3., 7., 12 nebo 14. den [75, 82, 99, 102, 103].

Osteokalcin je pozdním markerem osteogenní diferenciace. Fluorescenční barvení a následná vizualizace pomocí konfokální mikroskopie, viz obrázky č. 32-44, detekovala osteokalcin při inkubaci buněk v bazálním médiu. Na vzorku Kontrola bylo pozorováno pouze nepatrné množství osteokalcinu a to jak 14. tak 21. den. Na vzorcích D1, I10 a u skupin se všemi použitými koncentracemi diferenciačních peptidů G a K bylo možné pozorovat větší množství osteokalcinu. Z toho usuzuji, že na těchto skupinách dochází k navození osteogenní diferenciace na základě tvorby osteokalcinu. Rozdílný závěr od závěru na základě aktivity ALP je způsoben tím, že osteokalcin je protein, který se translatuje na základě specifické buněčné signalizace. Aktivita ALP však vyžaduje

externí zdroje fosfátu, například z parakrinní signalizace. Tento zdroj se při kultivaci nahrazuje přídavkem β -glycerol fosfátu. Ovšem v případě kultivace buněk v bazálním médiu tento zdroj nebyl k dispozici a aktivita ALP tak po celou dobu pokusu stoupala.

Barvení osteokalcinu při inkubaci buněk v bazálním médiu s přídavkem osteogenních suplementů, viz obrázky č. 72-85, ukazuje téměř žádný osteokalcin na skupině Kontrola. Na skupině K dif byl osteokalcin ve větší míře detekován 21. den. Na snímcích s různými koncentracemi peptidu K bylo množství osteokalcinu srovnatelné s Kontrolním vzorkem. Skupina se všemi typy koncentrací peptidu D byla srovnatelná se skupinou K dif. Největší množství osteokalcinu bylo pozorováno na vzorcích s peptidy I a G. Osteokalcin byl dokonce pozorovatelný i 14. den experimentu. Studie Kim *et al.* prokázala přítomnost osteokalcinu, na základě fluorescenční mikroskopie, již dvacet čtyři hodin po inkubaci MSC s přídavkem peptidu G v bazálním médiu s osteogenními suplementy. Buňky byly před nasazením po dobu tří dnů preinkubovány v médiu s osteogenními suplementy [105].

U skupin inkubovaných s přídavkem různých koncentrací peptidu G a s osteogenními suplementy v bazálním médiu, dochází v mých experimentech, k maximu v aktivitě ALP již 7. den. Tohoto vrcholu bylo dosaženo v případě vyšších koncentrací peptidu. Také při barvení osteokalcinu, a to jak při inkubaci v bazálním médiu, tak v bazálním médiu s osteogenními suplementy, bylo na skupinách s peptidem G pozorováno jedno z nejvyšších množství osteokalcinu. Inkubace buněk v bazálním médiu s osteogenními suplementy vedla 21. den inkubace k detekování krystalických struktur pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Krystalků bylo víc než u skupiny K dif. Z toho usuzuji, že peptid G odvozený z BMP-7 zlepšuje navození osteogenní diferenciace v bazálním médiu s osteogenními suplementy. V případě inkubace MSC v bazálním médiu má přídavek peptidu G vliv na vyšší produkci osteokalcinu. Z testů dále vyplývá, že i vliv koncentrace použitého peptidu má efekt na navození osteogenní diferenciace. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při nejvyšší koncentraci peptidu G, tedy u skupiny G10.

Ve studii Lee *et al.* prokázali vliv peptidu G v bazálním médiu s osteogenními suplementy na zvyšující se aktivitu ALP a depozici vápníku. Koncentrace peptidu byla 1 μ g/ml [82]. Kim *et al.* testovali vliv peptidu G o koncentraci 1 μ g/ml v bazálním médiu s osteogenními suplementy. Při testech docházelo ke zvýšení aktivity ALP, depozici vápníku i ke zvýšené expresi RunX2, ALP a kolagenu I. Fluorescenční barvení odhalilo vyšší přítomnost osteokalcinu při inkubaci MSC s peptidem G [105]. Ani jedna

z uvedených studií však nezkoumala vliv peptidu G na diferenciaci MSC v bazálním médiu.

Peptid K, v mých experimentech, vykazoval maximum v hodnotě aktivity ALP již 7. den, při inkubaci MSC v bazálním médiu s osteogenními suplementy. Množství osteokalcinu pozorované fluorescenčním mikroskopem bylo při inkubaci buněk v médiu s přidavkem osteogenních suplementů jedno z nejvyšších. Ovšem při barvení osteokalcinu u buněk inkubovaných v bazálním médiu s osteogenními suplementy, bylo množství osteokalcinu srovnatelné se vzorkem Kontrola. Při inkubaci buněk v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů bylo skenovací elektronovou mikroskopií odhaleno na povrchu buněk více krystalků než u skupiny K dif. Z toho usuzuji, že peptid K odvozený z BMP-2 má přídatný vliv na osteogenní diferenciaci v případě inkubace buněk s osteogenními suplementy. Bez osteogenních suplementů dochází k vyšší produkci osteokalcinu. Saito *et al.* zkoumali vliv peptidu K v bazálním médiu. Přídavek peptidu měl vliv na zvýšenou aktivitu ALP 3. den pokusu. Metoda PCR odhalila vyšší množství mRNA pro osteokalcin oproti kontrole, což byly buňky inkubované v bazálním médiu. V této studii bylo přidáváno 100 nebo 200 µg peptidu na jamku v devadesáti šesti jamkové destičce. [103].

Peptidy D a I, v mnou prováděných experimentech, vykazovaly maximální hodnoty v aktivitě ALP až 14. den kultivace MSC v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů. Barvení osteokalcinu při inkubaci buněk v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů odhalilo shodné množství tohoto proteinu u skupin s přidavkem peptidů D jako u skupiny K dif. V případě skupin inkubovaných s přidavkem peptidů I bylo pozorováno větší množství osteokalcinu. U inkubovaných buněk v bazálním médiu bylo množství pozorovaného osteokalcinu shodné se skupinou Kontrola, výjimkou byl 21. den u skupiny I10, kdy bylo přítomné vysoké množství osteokalcinu. Inkubace buněk v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů, jak s peptidem D tak I, vedla k přítomnosti krystalických struktur na povrchu buněk. Jejich množství bylo srovnatelné s množstvím krystalků na skupině K dif.

Usuzuji, že v případě peptidu I byl prokázán vliv na produkci osteokalcinu. Tento peptid má minoritní vliv na osteogenní diferenciaci. Agrawal *et al.* prokázali, že peptid I měl vliv na zlepšení osteogenní diferenciaci při inkubaci buněk v bazálním médiu s osteogenními suplementy na základě zvýšené aktivity ALP a depozice vápníku, při užití 100µM peptidu. Na základě PCR metody se prokázal vliv na zvýšení exprese kolagenu I,

osteopontinu a RunX2 pouze v bazálním médiu s přidavkem osteogenních suplementů. V bazálním médiu měl peptid I vliv jenom na zvýšenou aktivitu ALP [99].

Jelikož diferenciační peptid D vykazoval shodné výsledky jako Kontrolní či K dif skupiny, usuzují, že pravděpodobně nemá výrazný vliv na osteogenní diferenciaci. Anderson *et al.* prokázali, že po přidání peptidu D do bazálního média nedocházelo k mineralizaci ECM, ale ALP aktivita MSC byla zvýšena [83]. V další studii Anderson *et al.* prokázali zvýšenou aktivitu ALP při inkubaci peptidu D v bazálním médiu s osteogenními suplementy. Na základě metody PCR docházelo i ke zvýšené expresi mRNA pro RunX2, ALP a osteokalcin [91].

Z dosažených výsledků usuzují, že největší potenciál navodit osteogenní diferenciaci MSC měly peptidy G a K odvozené z BMP-7 a BMP-2. Tyto diferenciační peptidy se váží na BMP receptory, které způsobují fosforylaci Smad proteinů. Následně jsou aktivovány geny spojené s osteogenní diferenciací [103]. Peptid I odvozený z kolagenu III vykazuje v mých experimentech minoritní vliv na zlepšení osteogenní diferenciace. Peptid I se váže na integrinový receptor [99]. U peptidu D odvozeného z kolagenu I nebyl v mých experimentech prokázán vliv na osteogenní diferenciaci. Tato aminokyselinová sekvence se váže na integrin $\alpha 2\beta 1$ [97]. Z mých experimentů usuzují, že aktivace signálních drah prostřednictvím BMP receptorů má výraznější vliv na osteogenní diferenciaci MSC, než aktivace signálních drah prostřednictvím integrinových receptorů.

Dále na základě experimentů usuzují, že samotné peptidy v bazálním médiu nemají takový potenciál, pro navození osteogenní diferenciace, jako přidavek osteogenních suplementů. V kombinaci osteogenních suplementů s peptidem G nebo K však vykazovaly prasečí MSC lepší osteogenní diferenciaci.

Závěry týkající se osteogenní diferenciace byly stanoveny na základě aktivity ALP, produkci osteokalcinu, fluorescenčního barvení a skenovací elektronové mikroskopie. Barvení depozice vápníku, jako se provádí v řadě výše zmíněných studií, nebylo na PCL nosičích možné provést. Vlákna PCL nosiče mají velký specifický povrch. Váže se na ně velké množství alizarinové červeně. To znemožňuje detekci vápníku. Tato práce, na rozdíl od většiny zmíněných studií zabývajících se vlivem diferenciačních peptidů na osteogenní diferenciaci, si kladla za hlavní cíl otestovat více druhů diferenciačních peptidů při různých použitých koncentracích. Detekce exprese osteogenních markerů PCR metodou u takového množství skupin, které byly v této práci testovány, nebylo z finančních důvodů možné.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo otestovat vliv čtyř aminokyselinových sekvencí odvozených z proteinů ECM na adhezi, metabolickou aktivitu, proliferaci a osteogenní diferenciaci prasečích MSC. Jelikož standardně se osteogenní diferenciaci MSC navozuje pomocí osteogenních suplementů v bazálním médiu, snahou práce bylo zjistit, zda přidavek peptidů do bazálního média a nebo do média s osteogenními suplementy vykazuje zlepšení v procesu osteogenní diferenciaci.

Metodou elektrostatického zvláknování se podařilo připravit PCL nanovláknenné nosiče. Tyto nosiče byly mikroporézní a neumožňovaly buňkám penetrovat do hloubky. Buňky byly po celou dobu pokusu adherovány na povrchu, kde měly dostatečný přísun živin. Nosič byl mírně hydrofobní, takže umožňoval efektivní buněčnou adhezi. Zároveň byl změřen průměr vláken PCL nosiče. Z tohoto měření vyplývá, že vlákna se pohybovala v rozmezí nanometrů až mikrometrů. Toto široké rozpětí ve velikosti vláken také napomáhá buněčné adhezi.

U všech zkoumaných peptidů, tedy peptidu D odvozeného z kolagenu I, peptidu I odvozeného z kolagenu III, peptidu G odvozeného z BMP-7 a peptidu K odvozeného z BMP-2 se neprokázal vliv na adhezi, metabolickou aktivitu a proliferaci buněk. Tento fakt vyplývá jak z experimentů při nichž byly buňky inkubovány v bazálním médiu, tak z experimentů s kultivací MSC v médiu s přidavkem osteogenních suplementů.

Při inkubaci buněk bez přidavku osteogenních suplementů buňky proliferovaly po celou dobu experimentu, aktivita ALP rovněž po celou dobu stoupala, fluorescenční barvení neodhalilo přítomnost matrixových váčků, na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu nebyly pozorovány krystalické útvary. Pouze výsledky z barvení osteokalcinu ukazují, že byl tento protein přítomen ve vyšší míře u buněk s přidavkem diferenciacních peptidů G a K. U skupin s přidavkem peptidů D a I bylo množství osteokalcinu srovnatelné s Kontrolní skupinou.

Z testů při nichž byla sledována buněčná diferenciaci vyplývá, že nejlepších výsledků bylo dosaženo u buněk inkubovaných na nosičích s vyšším přidavkem diferenciacního peptidu G a v přítomnosti osteogenních suplementů v bazálním médiu. Maximální počet buněk byl dosažen 3. den experimentu, 21. den experimentu byly pozorovány konfokální mikroskopií matrixové váčky. Vrcholné hodnoty v aktivitě alkalické fosfatázy bylo dosaženo 7. den. Osteokalcin byl pozorovatelný již 14. den

experimentu. Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu bylo 21. den pozorováno vysoké množství krystalických útvarů.

V případě peptidu K bylo dosaženo podobných výsledků jako u peptidu G. Ovšem barvení osteokalcinu odhalilo o něco nižší množství tohoto proteinu v případě inkubace buněk s osteogenními suplementy. Peptid I měl ve většině testů průběh výsledků shodný se skupinami Kontrola a K dif, ovšem v jeho přítomnosti docházelo k vyšší produkci osteokalcinu, v porovnání s kontrolními skupinami. Tento protein má zřejmě minoritní vliv na osteogenní diferenciaci. Peptid D měl shodný průběh testů jako skupiny Kontrola a K dif. Jeho přídavek tedy nevedl k výraznějšímu navození osteogenní diferenciaci.

Výsledky práce přispěly k obohacení poznatků o vlivu peptidů na osteogenní diferenciaci MSC na nanovlákněném nosiči. Peptidy vykazují vlastnosti vhodné pro selektivní stimulaci diferenciaci buněk bez rizika spojeného s aplikací růstových faktorů. Jak je však z výsledků patrné, efektivita jejich účinku je různá. Pro širší aplikaci v tkáňovém inženýrství je třeba další zkoumání. Budoucí experimenty by měly porovnat vliv peptidů a růstových faktorů na diferenciaci a stabilitu v trojrozměrném prostředí při *in vivo* kultivačních podmínkách.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Oreffo, R.C., et al., *Mesenchymal stem cells*. Stem Cell Reviews, 2005. **1**(2): p. 169-178.
2. Fernández Vallone, V.B., et al., *Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved?* Differentiation, 2013. **85**(1–2): p. 1-10.
3. Short, B., et al., *Mesenchymal stem cells*. Archives of Medical Research, 2003. **34**(6): p. 565-571.
4. Deans, R.J. and A.B. Moseley, *Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses*. Experimental Hematology, 2000. **28**(8): p. 875-884.
5. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Communication and Signaling : CCS, 2011. **9**: p. 12-12.
6. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(4): p. 568-584.
7. Friedenstein, J.A., I.I. Piatetzky-Shapiro, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. The journal of embriological experiemntal morphology, 1966. **16**.
8. Kassem, M., B.M. Abdallah, and H. Saeed, *Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. **473**(2): p. 183-187.
9. Vater, C., P. Kasten, and M. Stiehler, *Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells*. Acta Biomater, 2011. **7**(2): p. 463-477.
10. James, A.W., *Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation*. Scientifica, 2013. **2013**: p. 17.
11. Kholodenko, I.V., et al., *Molecular mechanisms of migration and homing of intravenously transplanted mesenchymal stem cells*. journal of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, 2013. **2**(1).
12. Halfon, S., et al., *Markers Distinguishing Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts Are Downregulated with Passaging*. Stem Cells and Development., 2011. **20**(1): p. 53-66.

13. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Research & Therapy, 2007. **9**(1): p. 204-204.
14. Kusuma, G.D., et al., *Mesenchymal stem cells reside in a vascular niche in the decidua basalis and are absent in remodelled spiral arterioles*. Placenta, 2015. **36**(3): p. 312-321.
15. Jones, D.L. and A.J. Wagers, *No place like home: anatomy and function of the stem cell niche*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 11-21.
16. Meirelles, L.d.S., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(11): p. 2204-2213.
17. Grayson, W.L., et al., *Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **358**(3): p. 948-953.
18. Covelto, K.L., et al., *HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth*. Genes & Development, 2006. **20**(5): p. 557-570.
19. Kuhn, N.Z. and R.S. Tuan, *Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis*. Journal of Cellular Physiology, 2010. **222**(2): p. 268-277.
20. Carstairs, A. and P. Genever, *Stem cell treatment for musculoskeletal disease*. Current Opinion in Pharmacology, 2014. **16**(0): p. 1-6.
21. Centeno, C.J., et al., *Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells*. 2008. **11**: p. 343-353.
22. Liu, G., et al., *Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold*. Biomaterials, 2013. **34**(11): p. 2655-2664.
23. Mankani, M.H., et al., *In Vivo Bone Formation by Human Bone Marrow Stromal Cells: Reconstruction of the Mouse Calvarium and Mandible*. STEM CELLS, 2006. **24**(9): p. 2140-2149.
24. Wagner, J., et al., *Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics*. Current Opinion in Biotechnology, 2009. **20**(5): p. 531-536.

25. Ikebe, C. and K. Suzuki, *Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 11.
26. da Silva Meirelles, L., et al., *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2009. **20**(5–6): p. 419-427.
27. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. Journal of Cellular Physiology, 2007. **213**(2): p. 341-347.
28. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood journal, 2005. **105** (4).
29. Oswald, J., et al., *Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro*. STEM CELLS, 2004. **22**(3): p. 377-384.
30. Solchaga, L.A., K.J. Penick, and J.F. Welter, *Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2011. **698**: p. 253-278.
31. Gregory, C.A., D.J. Prockop, and J.L. Spees, *Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation*. Experimental Cell Research, 2005. **306**(2): p. 330-335.
32. Birmingham, E., et al., *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche*. eCM Journal, 2012. **23**: p. 13-27.
33. Song, I., et al., *Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **408**(1): p. 126-131.
34. Ilan, D.I. and A.L. Ladd, *Bone graft substitutes*. Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery, 2002. **9**(4): p. 151-160.
35. Hanada, K., J.E. Dennis, and A.I. Caplan, *Stimulatory Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*. Journal of Bone and Mineral Research, 1997. **12**(10): p. 1606-1614.
36. Kelc, R., et al., *Novel Therapies for the Management of Sports Injuries*. Current Issues in Sports and Exercise Medicine 2013.
37. Vinatier, C., et al., *Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors*. Trends in Biotechnology, 2009. **27**(5): p. 307-314.

38. Ryoo, H.-M., M.-H. Lee, and Y.-J. Kim, *Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells*. *Gene*, 2006. **366**(1): p. 51-57.
39. Neve, A., A. Corrado, and F. Cantatore, *Osteoblast physiology in normal and pathological conditions*. *Cell and Tissue Research*, 2011. **343**(2): p. 289-302.
40. Bianco, P., et al., *Bone formation via cartilage models: The "borderline" chondrocyte*. *Matrix Biology*, 1998. **17**(3): p. 185-192.
41. Nakashima, K. and B. de Crombrughe, *Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation*. *Trends in Genetics*, 2003. **19**(8): p. 458-466.
42. Long, M.W., *Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2001. **27**(3): p. 677-690.
43. Marie, P.J., *Transcription factors controlling osteoblastogenesis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008. **473**(2): p. 98-105.
44. Karsenty, G. and E.F. Wagner, *Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development*. *Developmental Cell*, 2002. **2**(4): p. 389-406.
45. Kelly, D.J. and C.R. Jacobs, *The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells*. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2010. **90**(1): p. 75-85.
46. Ortega, N., D.J. Behonick, and Z. Werb, *Matrix remodeling during endochondral ossification*. *Trends in cell biology*, 2004. **14**(2): p. 86-93.
47. Mackie, E.J., et al., *Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. **40**(1): p. 46-62.
48. Cancedda, R., et al., *Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis*. *Developmental Biology*, 2000. **44**: p. 707-714.
49. Lian, J., et al., *Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2006. **7**(1-2): p. 1-16.
50. Marie, P.J., *Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation*. *Gene*, 2003. **316**(0): p. 23-32.
51. Cao, X. and D. Chen, *The BMP signaling and in vivo bone formation*. *Gene*, 2005. **357**(1): p. 1-8.

52. Zhen, G. and X. Cao, *Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis*. Trends in Pharmacological Sciences, 2014. **35**(5): p. 227-236.
53. Golub, E.E., *Role of matrix vesicles in biomineralization*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2009. **1790**(12): p. 1592-1598.
54. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal Transduction by the TGF- β Superfamily*. Science, 2002. **296**: p. 1646-1647.
55. Ochiai, H., et al., *Inhibition of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Expression by Prolonged Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Administration Suppresses Osteoblast Differentiation*. The Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(27): p. 22654-22661.
56. Nakayama, Y., et al., *Insulin-like growth factor-1 increases bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor-2 response element and homeodomain protein-binding site in the proximal promoter of the BSP gene*. Journal of Cellular Physiology, 2006. **208**(2): p. 326-335.
57. Marie, P.J., *Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: An update*. Gene, 2012. **498**(1): p. 1-4.
58. Fujisawa, R. and M. Tamura, *Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification* Frontiers in Bioscience, 2012. **17**: p. 1891-1903.
59. Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner, *Collagens—structure, function, and biosynthesis*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(12): p. 1531-1546.
60. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-433.
61. Ruoslahti, E., *RGD and other recognition sequences for integrins*. Cell and Developmental Biology, 1996. **12**: p. 697-715.
62. Heinegard, D. and A. Oldberg, *Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules*. The FASEB Journal, 1989. **3**: p. 2042-2051.
63. Takeuchi, A., et al., *Heterogeneous nucleation of hydroxyapatite on protein: structural effect of silk sericin*. Journal of the Royal Society Interface, 2005. **2**(4): p. 373-378.
64. Sasano, Y., et al., *Remodeling of extracellular matrices initiates and advances calcification during development and healing of bones and teeth*. Journal of Oral Biosciences, 2012. **54**(1): p. 25-29.

65. Hoshi, K., *Fine structure of bone matrix calcification*. Journal of Oral Biosciences, 2012. **54**(1): p. 19-24.
66. Hesse, L., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(14): p. 9445-9449.
67. Mehta, M., et al., *Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**(12): p. 1257-1276.
68. Tsiridis, E., N. Upadhyay, and P. Giannoudis, *Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules?* Injury, 2007. **38**(1, Supplement): p. S11-S25.
69. Kolar, P., et al., *The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2010. **16**: p. 427-434.
70. Sabrkhany, S., A.W. Griffioen, and M.G.A. oude Egbrink, *The role of blood platelets in tumor angiogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2011. **1815**(2): p. 189-196.
71. Kitaori, T., et al., *Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model*. Arthritis & Rheumatism, 2009. **60**(3): p. 813-823.
72. Frazier, K., et al., *Stimulation of Fibroblast Cell Growth, Matrix Production, and Granulation Tissue Formation by Connective Tissue Growth Factor*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(3): p. 404-411.
73. Lichte, P., et al., *Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence*. Injury, 2011. **42**(6): p. 569-573.
74. Schroeder, J.E. and R. Mosheiff, *Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence*. Injury, 2011. **42**(6): p. 609-613.
75. Hennessy, K.M., et al., *The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces*. Biomaterials, 2009. **30**(10): p. 1898-1909.
76. Holzwarth, J.M. and P.X. Ma, *Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9622-9629.
77. Giannoudis, P.V., H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: An update*. Injury, 2005. **36**(3, Supplement): p. S20-S27.

78. McAuliffe, J.A., *Bone graft substitutes*. Journal of Hand Therapy, 2003. **16**(2): p. 180-187.
79. Saiz, E., et al., *Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering*. Dental Materials, 2013. **29**(1): p. 103-115.
80. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(10): p. 546-554.
81. Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.
82. Lee, Y.J., et al., *Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration*. Biomaterials, 2013. **34**(21): p. 5059-5069.
83. Anderson, J.M., et al., *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells directed by extracellular matrix-mimicking ligands in a biomimetic self-assembled peptide amphiphile nanomatrix*. Biomacromolecules, 2009. **10**(10): p. 2935-2944.
84. Chen, Y. and T.J. Webster, *Increased Osteoblast Functions in the Presence of BMP-7 Short Peptides for Nanostructured Biomaterial Applications*. J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(1): p. 296-304.
85. Lock, J. and H. Liu, *Nanomaterials enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells similar to a short peptide of BMP-7*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 2769-2777.
86. Wojtowicz, A.M., et al., *Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair*. Biomaterials, 2010. **31**(9): p. 2574-2582.
87. Lee, J.S., et al., *Modular Peptide Growth Factors for Substrate-Mediated Stem Cell Differentiation*. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2009. **48**(34): p. 6266-6269.
88. Lee, J.-Y., et al., *Injectable gel with synthetic collagen-binding peptide for enhanced osteogenesis in vitro and in vivo*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **357**(1): p. 68-74.
89. Kirkwood, K., et al., *In Vitro Mineralization Studies with Substrate-immobilized Bone Morphogenetic Protein Peptides*. Journal of Oral Implantology, 2003. **29**(2): p. 57-65.

90. Lee, J.-Y., et al., *Effect of immobilized cell-binding peptides on chitosan membranes for osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2009. **52**(1): p. 69-77.
91. Anderson, J.M., et al., *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells synergistically enhanced by biomimetic peptide amphiphiles combined with conditioned medium*. Acta Biomater, 2011. **7**(2): p. 675-682.
92. Gomar, F., et al., *P-15 small peptide bone graft substitute in the treatment of non-unions and delayed union. A pilot clinical trial*. International Orthopaedics, 2007. **31**(1): p. 93-99.
93. Schuler, M., et al., *Comparison of the response of cultured osteoblasts and osteoblasts outgrown from rat calvarial bone chips to nonfouling KRSR and FHRRIKA-peptide modified rough titanium surfaces*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2009. **91B**(2): p. 517-527.
94. Moore, N.M., et al., *Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients*. Acta Biomater, 2011. **7**(5): p. 2091-2100.
95. Salinas, C.N. and K.S. Anseth, *Decorin moieties tethered into PEG networks induce chondrogenesis of human mesenchymal stem cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **90A**(2): p. 456-464.
96. Connelly, J.T., et al., *Fibronectin- and collagen-mimetic ligands regulate bone marrow stromal cell chondrogenesis in three-dimensional hydrogels*. eCM Journal, 2011. **22**: p. 168-177.
97. Mizuno, M. and Y. Kuboki, *Osteoblast-Related Gene Expression of Bone Marrow Cells during the Osteoblastic Differentiation Induced by Type I Collagen*. Journal of Biochemistry, 2001. **129**(1): p. 133-138.
98. Liu, S.Q., et al., *Biomimetic hydrogels for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells to neocartilage*. Biomaterials, 2010. **31**(28): p. 7298-7307.
99. Agrawal, V., et al., *An Isolated Cryptic Peptide Influences Osteogenesis and Bone Remodeling in an Adult Mammalian Model of Digit Amputation*. Tissue Engineering. Part A, 2011. **17**(23-24): p. 3033-3044.
100. Choi, Y.J., et al., *The identification of a heparin binding domain peptide from bone morphogenetic protein-4 and its role on osteogenesis*. Biomaterials, 2010. **31**(28): p. 7226-7238.

101. Mitchell, E., et al., *Controlled spatial and conformational display of immobilised bone morphogenetic protein-2 and osteopontin signalling motifs regulates osteoblast adhesion and differentiation in vitro*. BMC Biology, 2010. **8**(1): p. 1-12.
102. Lee, J.S., J.S. Lee, and W.L. Murphy, *Modular peptides promote human mesenchymal stem cell differentiation on biomaterial surfaces*. Acta Biomater, 2010. **6**(1): p. 21-28.
103. Saito, A., et al., *Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2003. **1651**(1–2): p. 60-67.
104. Li, J.-F., et al., *Bone formation in ectopic and osteogenic tissue induced by a novel BMP-2-related peptide combined with rat tail collagen*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010. **15**(5): p. 725-732.
105. Kim, H.K., et al., *Osteogenesis induced by a bone forming peptide from the prodomain region of BMP-7*. Biomaterials, 2012. **33**(29): p. 7057-7063.
106. Curtis, A.S.G., et al., *Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important?* Biophysical Chemistry, 2001. **94**(3): p. 275-283.
107. Rampichová, M., et al., *Elastic three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Cell Prolif, 2013. **46**(1): p. 23-37.