

Interakce kmenových buněk s materiály

Bc. Kateřina Skopalová

Diplomová práce
2017

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Skopalová**
Osobní číslo: **T15266**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Interakce kmenových buněk s materiály**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými studiemi o vztahu povrchových vlastností, především topografie povrchu na růst a diferenciaci kmenových buněk. Zaměří se na problematiku niche kmenových buněk. V návaznosti na takto získané informace naplánuje a provede sérii experimentů za účelem stanovení adheze a růstu kmenových buněk na površích. Studentka se detailně seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur, modifikace a charakterizace povrchů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**
Centrum polymerních materiálů

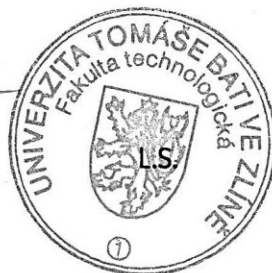
Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2017**

Ve Zlíně dne 1. března 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 18.5.2017


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Do kmenových buněk je v posledních letech vkládána velká naděje ve spojitosti s léčbou řady nevléčitelných nemocí. Pro takové využití mají obrovský potenciál díky tomu, že se jedná o buňky nediferencované, které mají schopnost přeměnit se na jiný typ buněk. Problémem při využívání kmenových buněk je příprava materiálů pro jejich *in vitro* kultivaci, které napodobují prostředí, v němž se kmenové buňky vyskytují *in vivo*. Předložená diplomová práce je proto zaměřena na jeden z parametrů mikroprostředí niche kmenových buněk, konkrétně na povrchové vlastnosti. Vlastnosti niche velmi zásadně ovlivňují jejich chování. V praktické části práce je pak vyhodnocen vliv topografie povrchu na diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk a na proliferaci myších fibroblastů.

Klíčová slova: biomateriály, niche kmenových buněk, povrchové vlastnosti materiálů, topografie

ABSTRACT

The stem cells are the point of hope in the late years regarding the treatment of many so far incurable illnesses. Their great potential results from the fact that stem cells are not yet differentiated, which means they can change into any other type of cell. The problem with using the stem cells is the preparation of materials for their *in vitro* cultivation mimicking their *in vivo* environment. The thesis is focused on one of the parameters of stem cells' microenvironment niche, i.e. their surface characteristics. Properties of the niche are crucial for their behavior. The practical part of the paper analyzes influence of topography of the surface for mesenchymal stem cells' differentiation and mice fibroblasts proliferation.

Keywords: biomaterials, stem cells niche, material surface characteristics, topography

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Petrovi Humpolíčkovi, Ph.D., za poskytnutí cenných rad, ochotu a velkou trpělivost při vedení této práce. Dále mé poděkování patří Mgr. Petře Rejmontové za pomoc při práci v laboratořích buněčných kultur.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	12
1.1 HISTORIE.....	12
1.2 ETICKÉ PROBLÉMY VYUŽÍVÁNÍ KMENOVÝCH BUNĚK	14
2 KMENOVÉ BUŇKY	15
2.1 DĚLENÍ KMENOVÝCH BUNĚK Z HLEDISKA DIFERENCIAČNÍHO POTENCIÁLU	15
2.1.1 Totipotentní.....	15
2.1.2 Pluripotentní.....	15
2.1.3 Multipotentní.....	16
2.1.4 Progenitorové (unipotentní).....	16
2.2 DĚLENÍ KMENOVÝCH BUNĚK NA ZÁKLADĚ JEJICH ZDROJE.....	16
2.2.1 Embryo	16
2.2.2 Dospělý jedinec	17
2.2.2.1 Mezenchymální kmenové buňky.....	18
2.2.2.2 Hematopoetické kmenové buňky	19
2.2.2.3 Kmenové buňky pupečnickové krve	20
2.2.2.4 Nervové kmenové buňky.....	20
3 NICHE KMENOVÝCH BUNĚK	21
3.1 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX NAPODOBUJÍCÍ STRATEGIE PRO NICHE KMENOVÝCH BUNĚK.....	22
3.1.1 Biochemické vlastnosti	22
3.1.2 Geometrické vlastnosti.....	24
3.1.2.1 Topografie povrchu jako regulátor chování SC	25
3.1.3 Mechanické vlastnosti.....	28
3.1.3.1 Tuhost jako regulátor chování kmenových buněk.....	28
3.1.3.2 Mechanické namáhání jako regulátor kmenových buněk	31
4 DIAGNOSTIKA DIFERENCIACE	34
4.1 qRT-PCR.....	34
4.2 ELEKTROFORÉZA.....	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
5 CÍL PRÁCE	39
6 MATERIÁL A METODIKA	40
6.1 TESTOVANÉ POVRCHY S ODLIŠNOU TOPOGRAFIÍ.....	40
6.2 BUNĚČNÉ KULTURY A MEDIUM	40
6.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	41
6.4 EXPERIMENT	41
6.4.1 Kultivace mezenchymálních buněk	41
6.4.2 Kultivace myších fibroblastů	41
6.4.3 Barvení buněk a fluorescenční mikroskopie	42
6.4.4 Skenovací elektronová mikroskopie	43
7 VÝSLEDKY	44

7.1	VYHODNOCENÍ Vlivu MODIFIKOVANÝCH POVRCHŮ NA LINII MEZENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK	44
7.2	VYHODNOCENÍ Vlivu MODIFIKOVANÝCH POVRCHŮ NA PROLIFERACI BUNĚČNÉ LINIE NIH/3T3	53
8	DISKUZE	57
	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
	SEZNAM TABULEK.....	73

ÚVOD

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který aplikuje principy a metody bioinženýrství, materiálových a biologických věd směrem k vytvoření biologických náhrad, které obnoví tkáň po poškození. Obecné principy tkáňového inženýrství zahrnují kombinaci živých buněk s přírodním či syntetickým substrátem nebo scaffoldem, aby se vytvořil trojrozměrný živý konstrukt, který je funkčně a strukturálně podobný tkáni, která má být nahrazena. Mezi nejčastěji využívané buňky v tomto oboru jsou buňky kmenové a to díky jejich schopnosti samoobnovy a diferenciaci na jiný typ buněk. Kmenové buňky žijí u dospělých jedinců v mikroprostředí nazývaném Niche kmenových buněk. Pro kultivaci *in vitro* a využití v oblasti tkáňového inženýrství je proto důležité toto prostředí buňkám uměle vytvořit. Dnes je již známo, že extracelulární matrix niche neslouží pouze jako opora pro buňky, ale podílí se na diferenciaci. V teoretické části práce jsou rozebrány jednotlivé vlastnosti (biochemické, geometrické a mechanické) extracelulární matrix a to jak konkrétně ovlivňují proliferaci a diferenciaci kmenových buněk.

V praktické části byl testován vliv geometrických vlastností (topografie povrchu) na mezenchymální kmenové buňky. Konkrétně bylo testováno 7 upravených polystyrenových povrchů, přičemž každý povrch měl jinou velikost pórů. Mezenchymální buňky byly kultivovány v médiu indukujícím adipogenní, osteogenní či chondrogenní prostředí. Diferenciace měla být vyhodnocena pomocí specifických barvení, avšak experiment musel být ukončen z důvodu infekce. Z tohoto důvodu byl vyhodnocen pouze vliv topografie povrchu na morfologii buněk. Výsledky byly vyhodnoceny na základě mikrofotografií pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu s fázovým kontrastem. Pro vybrané povrchy byly také pořízeny snímky pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Dále byl vyhodnocován vliv topografie povrchu na proliferaci buněčné linie NIH/3T3. Vyhodnocení bylo provedeno stejným způsobem jako v případě mezenchymálních kmenových buněk.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který využívá principů a metod bioinženýrství, materiálových věd a věd o živé přírodě k sestavení biologických náhrad sloužících pro obnovu nebo zlepšení funkcí tkání, které byly poškozené například vlivem onemocnění nebo vlivem traumatických procesů. Obecným principem tkáňového inženýrství je kombinování živých buněk s přirozeným nebo syntetickým scaffoldem (lešením) s cílem vytvoření trojrozměrné struktury, nahrazující tkáň, jež byla poškozena (Kim a Evans, 2005). Scaffoldy neposkytují jen mechanickou oporu buňkám, ale také ovlivňují jejich chování jako např. uchycení buněk či jejich proliferaci. Často jsou využívány kmenové buňky vzhledem k tomu, že poskytují řadu výhod proti diferenciovaným buňkám (Zippel et al., 2009). Problematice kmenových buněk bude věnována samostatná kapitola. Tkáňové inženýrství se aplikuje při léčení chrupavek, kostí, šlach, vazů, cév, ledvin, močového měchýře či jater (MedTech Europe).

1.1 Historie

Umělé tkáně a orgány plně nahrazující nefunkční byly v celé historii lidstva brány pouze jako mýtus či sen. Až v posledních desetiletích se stala tato vize proveditelná a byla zavedena v klinické medicíně. Jedním z nejznámějších milníků v tkáňovém inženýrství byla transplantace srdce v roce 1967, kterou provedl jihoafrický chirurg Christiaan Barnard. Tento zákrok vyvolal velmi intenzivní a kontroverzní debatu o etických otázkách ohledně transplantační medicíny (Meyer, 2009). Další diskuze ohledně etiky vyvolal v roce 1997 bizarní snímek myši s lidským uchem vyrůstajícím na jejích zádech v časopise *Plastic and Reconstructive Surgery*. Díky této fotografii vnikla vlna protestů proti genetickému inženýrství. Projekt „myší ucho“ začal už v roce 1989. Doktor Charles Vacanti a jeho tým pěstovali malý kousek lidské chrupavky v biologicky rozložitelném scaffoldu, který byl složen z 99% kyseliny polyglykolové a 1% kyseliny mléčné. Jako zdroj buněk byla použita chrupavka z kravského kolena. Jelikož se jim nepodařilo scaffold zásobovat živinami, voperovali ho pod kůži laboratorní myši (Kruszelnicki, 2006). Etickým problémům týkajících se využívání kmenových buněk bude věnována samostatná kapitola.

Ještě v roce 1980 byl termín tkáňové inženýrství aplikován při používání protetických pomůcek nebo při chirurgické manipulaci s tkání, používání tohoto termínu mělo tedy velmi málo co dočinění s disciplínou tkáňového inženýrství jakou známe dnes (Vacanti, 2006). V osmdesátých letech 20. století pak výzkum a vývoj v oblasti tkáňového inženýr-

ství vzlétl a po celém světě bylo zřízeno hned několik oddělení biomedicínského inženýrství. V roce 1981 byla například vytvořena umělá kůže, kdy byla přirozená pokožka napodobena silikonovou a dermis kůže pomocí porézního fibrilárního kolagenchondroitin sulfátu. Takto vytvořená kůže byla pak úspěšně použita k léčbě těžkých popálenin (Nature Biotechnology, 2000). Dále například v roce 1991 byly nasazeny chondrocyty na porézní polymerní vlákna, která byla uspořádána ve tvaru požadované tkáně. Vytvořený implantát byl vložen mladému pacientu, který trpěl Polandovým syndromem (absence hrudní kosti). Tento pacient se stal prvním člověkem, jemuž byl zaveden syntetický polymerní scaffold osázený autologními chondrocyty. Metoda byla provedena třemi původními členy zakládajícími Společnost pro tkáňové inženýrství (Dr. J. Upton a Drs. J. a C. Vacanti) v dětské nemocnici v Bostonu. 1998 byl pak podobným postupem vytvořen scaffold pro nahrazení části amputovaného palce. Scaffold byl osázen autologními buňkami pacienta získaných pomocí kostní biopsie. Takové studie představovaly obrovský potenciál při rozvoji a výrobě náhradních tkání pro lidi (Vacanti, 2006). V posledních dvou desetiletích se tedy vědci pokoušeli vyvíjet prakticky všechny tkáně lidského těla. Moderní medicína zvyšuje lidskou životnost a se stárnoucí populací roste potřeba dárcovských orgánů, kterých je nedostatek. To je jeden z důvodů velkého potenciálu tkáňového inženýrství z budoucího hlediska (Olson et al., 2011).



Obrázek 1 Bizarní snímek myši s lidským uchem (Vacanti, 2006)

1.2 Etické problémy využívání kmenových buněk

Výzkumy kmenových buněk nabízejí velký příslib pro pochopení základních mechanismů lidského vývoje. Studie kmenových buněk však také vyvolávají etické a politické spory a to především jedná-li se o buňky lidské embryonální. Například ve Spojených státech je otázka, kdy začíná lidský život, velmi kontroverzní a úzce spojená s diskusí o potratu. Využití reprogramování somatických buněk k produkci indukovaných pluripotentních buněk by takovým sporům mohlo předcházet. Avšak i zde nastávají problémy se souhlasem darování materiálu a následným dohledem nad výzkumem (Lo a Parham, 2009). Široká veřejnost bývá často vystrašena při vyslechnutí termínu „kmenové buňky“ a je jedno zda se jedná o dlouhodobě ověřené kloubní terapie či léčby zahrnující autologní nebo alogenní transplantaci lidských buněk. Díky dostupnosti velkého množství článků i konspirací týkající se tohoto tématu vyvolává nakládání s kmenovými buňkami u běžných čtenářů zmatek a spoustu otázek. U každého výzkumu jsou ale velmi pečlivě zvážena a posuzována možná rizika a přínos pro společnost. Přesun výzkumu z laboratoře do studií na zvířatech a ze zvířat na lidské subjekty vyžaduje zdůvodnění o budoucím přínosu a ve výsledku trvá i několik let než je daná studie schválena (King a Perin, 2014).

Na využívání embryonálních kmenových buněk existuje mnoho odlišných názorů. Někteří vědci věří, že embryo je v počáteční fázi jen skupinou buněk, které nemají morální status jednotlivce. Další se pak domnívají, že život jednotlivce začíná oplodněním a že embryo je tedy člověk. Podle tohoto názoru má embryo zájmy a práva, která musí být respektována. Existují také názory, že časné embryo si zaslouží zvláštní respekt jako potenciální lidská bytost, ale že je přijatelné jej použít pro určité typy výzkumu za předpokladu dobrého vědeckého zdůvodnění a souhlasu ženy, která darovala embryo výzkumu (Ghosh et al., 2016).

V České republice je nakládání s kmenovými buňkami ošetřeno zákonem č. 296 Sb. O zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (zákon o lidských tkáních a buňkách).

2 KMENOVÉ BUŇKY

V současné době se kmenovým buňkám (stem cell, SC) věnuje pozornost v nejrůznějších souvislostech. Vkládá se do nich naděje, že s jejich pomocí by se mohlo podařit vyléčit řadu nevyléčitelných onemocnění. (Doubek, 2008). Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které se mohou přeměnit na jiný typ buněk na základě jejich determinace. Díky této schopnosti se podílí na regeneraci opotřebované či poškozené části orgánů a tkání v těle, stejně tak mohou obnovovat i samy sebe (Čedíková et al., 2012). Kmenové buňky tedy představují v organismu něco jako univerzální zásobu „náhradních dílů“ pro nejrůznější tkáně a orgány (Doubek, 2008).

2.1 Dělení kmenových buněk z hlediska diferenciačního potenciálu

Kmenové buňky se mohou dělit do několika skupin podle toho, do jakých typů buněk jsou schopny se diferencovat. Patří sem buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a progenitorové neboli unipotentní (Čedíková et al., 2012).

2.1.1 Totipotentní

Totipotentní kmenové buňky mají schopnost diferencovat se v libovolné buňky v lidském těle. Lidský vývoj začíná spojením vajíčka a spermie za vzniku zygoty. Zygota projde procesem mitózy a následně se dělí na dvě identické buňky - totipotentní buňky. Tento proces se opakuje několikrát po dobu 5 až 6 dní za vzniku několika set buněk. Takové buňky jsou následně schopny tvořit celé lidské tělo. Totipotentní buňky jsou ideální pro buněčné a genové terapie a také pro transplantace a nahrazení nemocných buněk nebo tkání. Důležité do budoucna je odpovědět na všechny etické otázky týkající se práce s totipotentními buňkami, ale příslib účinné léčby či úplné vyléčení onemocnění je dostatečným důvodem pro rozvoj práce s kmenovými buňkami (Murnaghan, 2015).

2.1.2 Pluripotentní

Jak již bylo zmíněno, zygota se dělí po dobu 5 až 6 dní za vzniku několika set buněk. Zygota se tak dostane do stádia blastocysty. Po této době se buňky totipotentní začnou specializovat do pluripotentních buněk, z kterých následně vznikají tři zárodečné listy, tj. entoderm, ektoderm a mezoderm. Po ukončení embryonální fáze ztrácí tyto buňky svoji pluripotenci a mohou se z nich nadále vyvíjet pouze určité typy buněk (Murnaghan, 2015). Hlavním rozdílem mezi buňkou totipotentní a pluripotentní je tedy ten, že buňka totipo-

tentní může dát vznik dalším totipotentním i pluripotentním buňkám, kdežto buňka pluripotentní se nemůže vyvinout do buňky totipotentní (Čedíková et al, 2012). Známe několik typů pluripotentních buněk: embryonální kmenové buňky, které jsou izolovány z blastocysty, embryonální zárodečné buňky, které jsou převzaty z plodů a embryonální rakovinné buňky, které jsou izolovány z nádoru vyskytujícího se v plodu. Stejně jako tomu je u totipotentních buněk mají i pluripotentní buňky obrovský potenciál pro léčení onemocnění a využívání pro transplantace (Murnaghan, 2015).

2.1.3 Multipotentní

Pluripotentní buňky se po čase vyvinou do multipotentních. Multipotentní kmenové buňky se mohou diferencovat do dalších typů buněk ale již v omezené míře. Pro představu, multipotentní kmenové buňky vyskytující se v mozku diferencují do různých typů nervových buněk a krevetvorné buňky mohou vést ke vzniku různých typů krvinek, ale nemohou dát vznik mozkových buňkám. Multipotentní buňky můžeme najít v tkáních dospělých savců. Tento typ buněk je velmi užitečný při transplantacích, jelikož mohou být izolovány z tkáně člověka a následně transplantovány zpět stejnému pacientovi, čímž se zabrání možným imunologickým problémům. Užívání multipotentních buněk navíc nenese etické problémy tak jako je tomu u využívání embryonálních buněk (Murnaghan, 2015).

2.1.4 Progenitorové (unipotentní)

Progenitorové kmenové buňky mají ve srovnání s ostatními kmenovými buňkami omezenou schopnost diferenciaci. Jak již z názvu vyplývá (unipotentní) dávají vznik pouze jednomu typu buněk (Murnaghan, 2015).

2.2 Dělení kmenových buněk na základě jejich zdroje

Kmenové buňky mohou být rozděleny také podle zdroje. V tomto případě je dělíme na embryonální a adultní kmenové buňky.

2.2.1 Embryo

Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cell, ESC) jsou pluripotentní buněčné linie tvořené z nediferencovaných embryonálních buněk. Mají téměř neomezenou schopnost sebeobnovy a diferenciaci (Wobus, 2001). ESC mohou být izolovány z časných savčích embryí a následně pěstovány v kultuře. ESC diferencují do celé řady buněčných typů, a to buď *in vitro*, nebo po opětovném vložení do hostitelského embrya. Při pěstování

v suspenzní kultuře se lidské ESC první diferencují do mnohobuněčných agregátů, tzv. embryoid bodies (EB), a dále pak dochází k diferenciaci do tří zárodečných listů (endoderm, mesoderm, ektoderm) (Lodish, 2008). Mnohobuněčné agregáty mají pluripotentní vlastnosti. Pokud chceme tyto vlastnosti zachovat, je potřeba buňky udržovat v nediferencovaném stavu, např. přidávkem inhibičních faktorů diferenciace.

Existuje několik způsobů, jak indukovat tvorbu EB z buněk ESC. Tři základní metody jsou v kapalně suspenzní kultuře v bakteriálních nádobách, v kultuře v polotuhém prostředí methylcelulózy a pomocí metody visících kapek. Poslední zmíněná metoda je jednou z nejčastěji užívaných, jelikož závěsné kapky poskytují ESC dobré prostředí pro vytváření EB a zaoblené dno kapky umožňuje agregaci. Princip spočívá v kultivaci suspenze v malých kapkách zavěšených na víčku Petriho misek. Diferenciace buněk je pak ovlivněna koncentrací buněk v počáteční suspenzi, velikostí kapky (objem kapky se pohybuje v rozmezí 20 - 30 μ l) a dobou kultivace. Pro příklad, při diferenciaci v neurální linii se počáteční počet buněk v kapkách pohybuje v rozmezí 400 - 1000 buněk/kapku s dobou kultivace 2 - 4 dny (Ohnuki a Kurosawa, 2013), (Kurosawa, 2007).

2.2.2 Dospělý jedinec

Adultní kmenové buňky (Adult stem cell, ASC), můžeme nazvat též jako dospělé či diferencované kmenové buňky, mají stejné základní charakteristiky jako všechny ostatní kmenové buňky. Adultní kmenová buňka je tedy schopna sebeobnovy a diferenciace do specializovaných buněčných typů. U lidí je klíčovou funkcí ASC udržovat a opravovat konkrétní tkáň, kde jsou umístěny. ASC byly nalezeny v mnoha tkáních, ale jejich počet je velmi malý. Mohou se nacházet například v mozku, kůži, kostní dřeni, játrech či ve sva-lech (Murnaghan, 2016). Využití ASC pro léčbu je výhodné, jelikož mohou být izolovány z konkrétního pacienta. Díky tomu odpadá problém s možným odmítnutím organismu cizích těles. Také z hlediska etických a morálních jsou lépe tolerovány buňky adultní nežli embryonální (Types of Adult Stem Cells, 2017).

Kmenové buňky v dospělosti žijí v mikroprostředí nazývaném Niche kmenové buňky. Jedná se o prostředí, kde mohou ASC žít v klidovém režimu a je zde řízena jejich samoobnova a diferenciace (Jhala a Vasita, 2015). Této problematice bude věnována samostatná kapitola. V následujících kapitolách budou také rozebrány jednotlivé druhy adultních kmenových buněk.

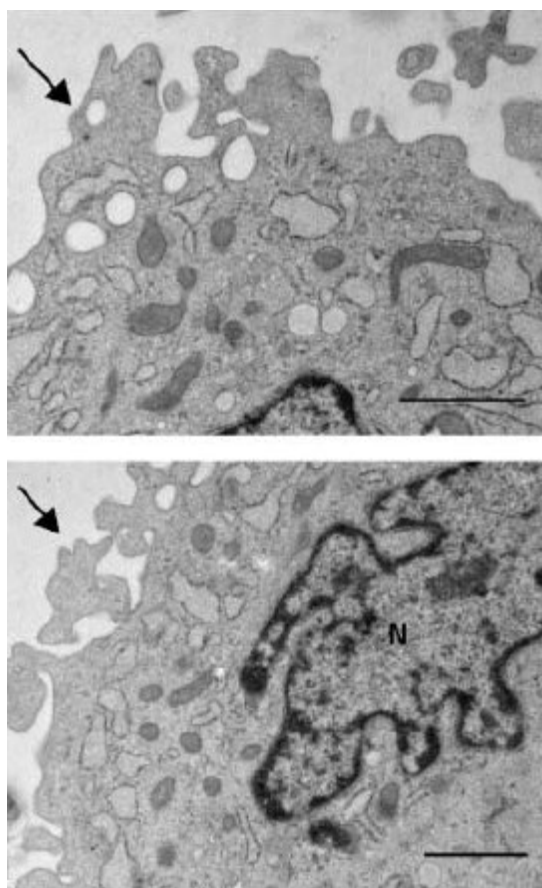
2.2.2.1 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal stem cell, MSC) mohou být získány punkcí kostní dřene například z lopatky či kyčelní kosti, dále odběrem tukové tkáně pomocí liposukce nebo z pupečnickové krve a následnou kultivací v in-vitro podmínkách. Takto získané kmenové buňky mají multipotentní vlastnosti, jsou nediferencované, nekrvotvorné a mají schopnost tvořit mnoho buněčných typů, jako jsou buňky kostní tkáně (osteoblasty), buňky chrupavek (chondrocyty), buňky šlach (tenocyty), buňky tukové tkáně (adipocyty) apod. (CellMaGel, 2013).

MSC tvoří populace heterogenních buněk, jejichž vlastnosti a funkce jsou závislé na typu prostředí, v němž se vyskytují. Jejich specifické vlastnosti, jako je velký proliferační potenciál (Bobis et al., 2006) a schopnost diferencovat do různých buněčných typů, je činní atraktivním nástrojem pro terapeutické aplikace v tkáňovém inženýrství, stejně jako pro buněčné a genové terapie (Djouhad et al., 2007). Díky tomu dochází ke zvýšení počtu klinických studií založených na použití právě MSC. Celkové léčení pomocí MSC je však složitý proces, je důležitá integrace tkáně s okolní hostitelskou tkání a diferenciací prostřednictvím přirozených signálních drah. MSC mají schopnost se včlenit do různých tkání nebo při aplikování infuzí do periferní krve mají schopnost migrovat na konkrétní místa poranění. Bobis et al. uvádí ve svém článku příklad schopnosti migrace MSC u zvířecích modelů zlomeniny kosti. 7. den po aplikaci se buňky vyskytovaly po celém myším těle. 18. den se pak většina buněk nacházela v plicích a játrech a 35 dní po infuzi se pak značný počet buněk nacházel v kostech, což poukazuje na to, že se účastnily tvorby kostní hmoty (Bobis et al., 2006).

Morfologie MSC ještě není zcela popsána, ale existuje již několik studií zabývajících se touto problematikou. Jak rozeznat MSC buňky od fibroblastů uvádí článek Raimondo et al., 2006. Pomocí elektronové mikroskopie byly pozorovány dva ultrastrukturální rysy, které MSC odlišují od fibroblastů a to: excentricky nepravidelné jádro a bohatý výskyt cytoplazmatických organel, konkrétně především mitochondrií a Golgiho aparátu. Ultrastrukturální vzhled MSC naznačuje, že jsou již v relativně pokročilém stavu diferenciací. Do roku 2006 byly publikované pouze 4 studie, které poskytovaly informace o ultrastruktuře MSC a to Zohar et al., 1997; Ghilzon et al., 1999; Colter et al., 2001 a Prockop et al., 2001. Porovnání Raimondovi studie s prvními dvěma zmíněnými je obtížné kvůli odlišnostem ve kvalitě elektronového mikroskopu, např. v případě studie Zohar et al., 1997 nebyla zaznamenána žádná kvalitní fotografie. Navíc bylo pozorování prováděno již ve druhý den kul-

tivace, v případě Raimondovi studie až 18-24 den. Studie Colter et al., 2001 a Prockop et al., 2001 se věnují pozorování MSC v 15 den kultivace. V obou je však uvedeno, že MSC jsou binukleární, což Raimondova studie vyvrací. Toto pozorování může být důsledkem nepravidelného tvaru jádra. Dále tyto studie uvádějí obsah velkého množství neidentifikovatelných vakuol v cytoplasmě. Pozorování Raimondo et al. ale naznačují, že tyto "neidentifikované vakuoly" jsou ve většině případů výsledkem dilatace endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Dále Wu et al., 2003 a Lee et al., 2004 vypožorovali přítomnost mnoha malých pseudopodií po celém obvodu buněk, které slouží pro jejich migraci k potřebné tkáni. Pseudopodia byla pozorována i ve studii Raimondo et al., 2006 viz. obrázek č. 2.



Obrázek 2 Fotky MSC vytvořené pomocí elektronového mikroskopu: N - nepravidelné jádro, šipky ukazují na výskyt pseudopodií na obvodu (Raimondo et al., 2006).

2.2.2.2 Hematopoetické kmenové buňky

Krevní buňky mohou být rozděleny do dvou hlavních tříd: lymfoidní buňky (T, B a NK buňky) a myeloidní buňky (granulocyty, monocyty, erytrocyty). Krevní buňky mají ome-

zenou životnost: granulocyty několik hodin, krvinky několik týdnů, a například T buňky až na několik let. Vzhledem k omezené životnosti musí být neustále vytvářeno velké množství náhradních buněk (Gunsilius et al, 2001). Hematopoetické kmenové buňky (HSC) dávají vznik novým typům krevních buněk a nacházejí se v kostní dřeni u dospělých savců. Z HSC se pak dále mohou vyvinout v již zmíněné kmenové buňky myeloické a lymfatické (Lodish, 2008).

2.2.2.3 Kmenové buňky pupečnickové krve

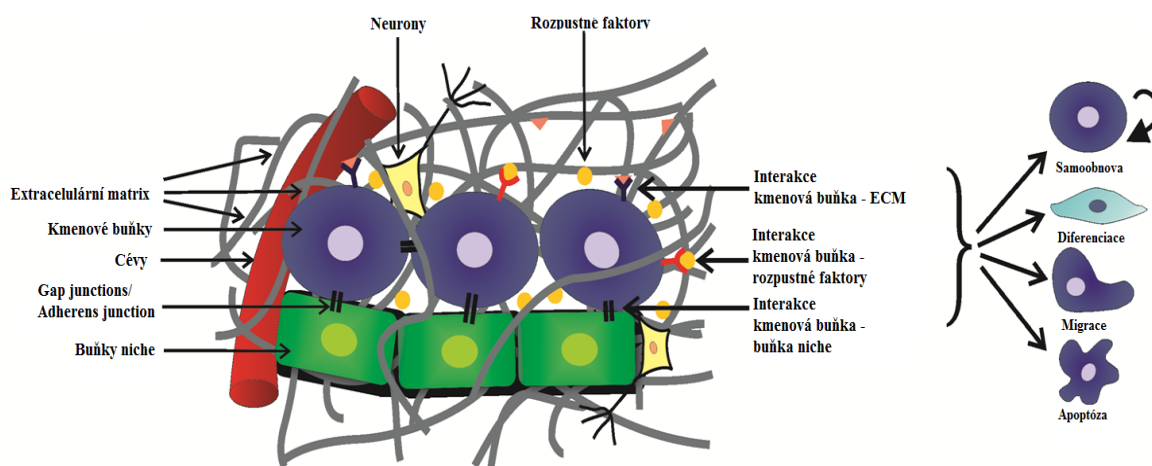
Pupečnicková krev se nachází v pupeční šňůře novorozenců a v placentě. Jedná se o jedinečný zdroj hematopoetických a mezenchymálních buněk. Výhodou je jejich dostupnost, jelikož se po porodu stává pupeční šňůra i placenta pro matku a plod nepotřebnou. Dalším pozitivem použití pupečnickové krve jako zdroje SC je nebolestivý odběr a nulová zátěž pro matku. Pupečnicková krev slouží k léčbě převážně hematologických onemocnění jako je leukémie a lymfomy. Své využití nachází také pro transplantaci SC po chemoterapiích, kdy je důležité obnovení krvetvorby. Dále se hovoří také o jejich možném využití při léčbě diabetu mellitu 1. typu, lupu erythematoses nebo dětské mozkové obrny a perinatální hypoxie (Čedíková et al., 2012).

2.2.2.4 Nervové kmenové buňky

Nervové kmenové buňky (NSC) jsou přítomny nejen během embryonálního vývoje, ale také v dospělém mozku všech druhů savců. Podílí se na vytváření funkčních neuronů v konkrétních oblastech mozku po celý život. NSC jsou schopny diferencovat do typů buněk, jako jsou neurony, astrocyty a oligodendrocyty (Ma et al., 2009) (Galli et al., 2003).

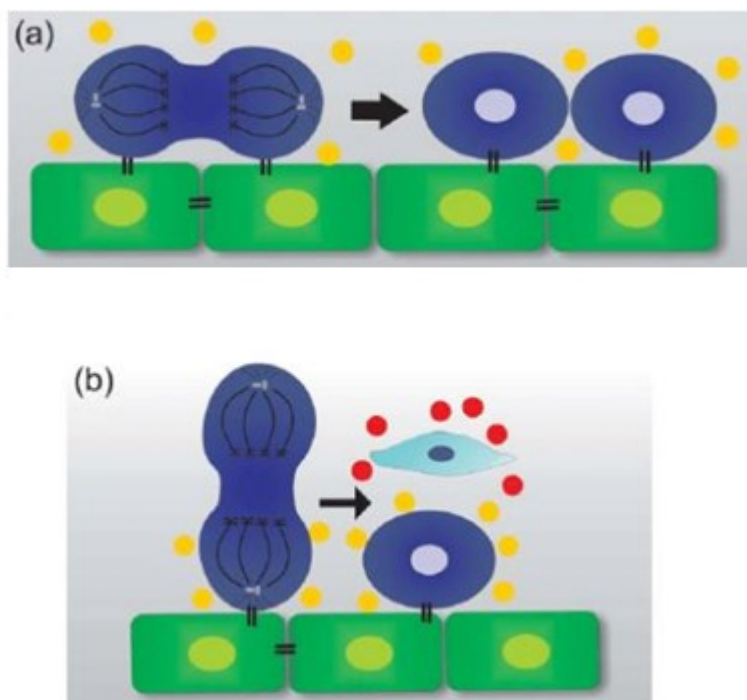
3 NICHE KMENOVÝCH BUNĚK

Kmenové buňky žijí u dospělých jedinců v mikroprostředí nazývaném Niche kmenových buněk (Stem Cell Niche, SCN) (Jhala a Vasita, 2015). *In vitro* růst kmenových buněk a regulace jejich chování je výzvou pro vědce, z tohoto důvodu je žádoucí vytvořit *něco jako* umělé SCN (Jones et al, 2008). Na obrázku č. 3 je zobrazeno schéma typické struktury SCN, skládá se z kmenových buněk, specializovaných buněk, extracelulární matrix (ECM) a rozpustných faktorů. Kmenové buňky jsou se specializovanými buňkami ve spojení pomocí gap junctions nebo adherens junction (Jhala a Vasita, 2015).



Obrázek 3 Struktura niche kmenových buněk. Upraveno dle Jhala a Vasita, 2015.

SCN se také významně podílí při dělení buněk. Kmenové buňky mohou podstoupit symetrické či asymetrické dělení. V případě symetrického dělení dochází ke vzniku dvou dceřiných buněk, které zůstávají v těsném kontaktu s buňkami niche, ty regulují jejich diferenciaci. Při asymetrickém dělení pak vznikají také dvě buňky dceřiné, avšak jedna z nich se dostane pryč z blízkosti buněk niche, tedy i signálním molekulám, které jsou pomocí specializovaných buněk produkovány a začne diferencovat. Schéma dělení je zobrazeno na obrázku č. 4. Poté řídí diferenciaci ECM. Dříve byla ECM brána pouze jako matrice, která poskytuje především oporu buněk, později bylo zjištěno, že hraje velmi důležitou roli i v jiných buněčných procesech. Na tuto vlastnost ECM je potřeba myslet i při vytváření podobných podmínek pro *in vitro* pěstování buněk (Morrison a Kimble, 2006).



Obrázek 4 Dělení kmenových buněk v SCN: a) symetrické b) asymetrické; červené a žluté tečky - růstové faktory (Jhala a Vasita, 2015).

3.1 Extracelulární matrix napodobující strategie pro niche kmenových buněk

Biofyzio-chemické vlastnosti ECM, jako je její složení, tvar, topografie, tuhost a mechanická pevnost, mohou řídit chování kmenových buněk. Se všemi těmito faktory je třeba počítat při jejich pěstování *in vitro*. Poznání, že ECM se podílí na řízení diferenciace SC a naopak, se uplatňuje při výrobě scaffoldů (Guilak et al, 2009). Následující kapitoly budou zaměřeny právě na to, jak veškeré vlastnosti ECM ovlivňují diferenciaci SC.

3.1.1 Biochemické vlastnosti

Extracelulární matrix je dynamická a komplexní síť více než 100 druhů různých biomolekul, včetně proteinů, glykoproteinů, proteoglykanů uspořádaných v určité trojrozměrné struktuře (Davies, 2001). Složení ECM převážně závisí na funkci tkáně nebo orgánu, jejich fyziologickém stavu a věku hostitele. Kolagen, fibronectin, laminin a elastin jsou jedněmi z hlavních proteinů v ECM. Kolagen je nejhojnější protein a sdílí 30 % celkové proteinové hmoty v lidském těle. Hlavní funkce kolagenu je poskytnout pevnost v tahu, přímý vývoj tkáně a regulace buněčné adheze a migrace (Rozario a DeSimone, 2010). Kolagen hraje důležitou roli při osteogenezi a chondrogenesi MSC (Chen et al.,

2005), (Salasznyk et al., 2005). Druhým nejhojnějším proteinem je fibronektin. Má vazebná místa pro glykosaminoglykany (GAG), integriny, kolageny a další proteiny ECM a zprostředkovává především uchycení buněk (Singh et al., 2010). Fibronektin hraje důležitou roli v chondrogenesi MSC (Singh et al., 2012). Laminin se nachází zejména v bazální membráně ECM. Stejně jako fibronektin, laminin má také vazebná místa umožňující adhezi buněk a jiných proteinů ECM. Hraje významnou roli při tvorbě a udržování cévní struktury, proto je velmi užitečný v tkáňovém inženýrství pro tvorbu scaffoldů (Ponce et al., 1999). Proteoglykany se podílí při vazbě růstových faktorů a cytokinů a zadržování vody. GAG mohou vyvolat osteogenní diferenciaci v kostní dřeni (Badylak, 2002).

Biochemické vlastnosti ECM mají vliv na uchycení kmenových buněk uvnitř SCN, na jejich uvolnění a v neposlední řadě také na jejich diferenciaci v konkrétní typy buněk. Jednou z možností jak vytvořit kmenovým buňkám jejich přirozené prostředí SCN je decelularizace ECM (Badylak et al., 2009), (Pei et al., 2002). Například v roce 2008 Ott et al. provedli decelularizaci krysího srdce. Decelularizované srdce následně osadili srdečními buňkami novorozenců štěňat a kultivovali v bioreaktoru. Využití takového postupu umožnilo diferenciaci buněk v kardiomyocyty aniž by bylo zapotřebí indukujících činidel v mediu. Stejný postup pak použili vědci Massachusetts General Hospital v roce 2016 na lidských srdcích. Pro danou studii bylo využito 73 dárcovských srdcí, která nebyla vhodná pro transplantaci. Získané srdeční scaffoldy byly osazeny pluripotentními kmenovými buňkami, které by mohly pocházet z potencionálních příjemců. V bioreaktoru byly simulovány podmínky živého organismu a to pomocí např. složení media či vyvíjením tlaku. Po 14 dnech kultivace dokázali pomocí elektrické stimulace funkčnost tkáně, jelikož došlo ke kontrakci komory. Nevýhodou využití této technologie je, že se jednotlivé decelularizované scaffoldy liší na základě dárce (Massachusetts General Hospital, 2016). Řešením takového problému může být syntéza scaffoldů z přírodních proteinů jako jsou již zmíněný kolagen, fibronektin, elastin či smísením těchto proteinů se syntetickými polymery, vzhledem k rychlé degradaci a špatné mechanické pevnosti přírodních proteinů. Nevýhodou syntetických polymerů je pak malá interakce s buňkami. Cheng et al., 2014 využili např. zesíteného kolagenu typu I, který kovalentně navázaly pomocí karbodiimidu na chitosan-polykaprolakton (PCL) a vytvořili scaffold pro diferenciaci buněk kostní dřeni potkanů v osteogenní linii. Battista et al., 2005 se věnoval vlivu materiálového složení scaffoldů (při použití kolagenu, fibronektinu a lamininu) na růst buněk a diferenciaci. Vysoké kon-

centrace kolagenu inhibovali kavitaci i diferenciaci. Laminin naopak podporoval diferenciaci buněk v kardiomyocyty.

Dalšími významnými látkami SCN, které regulují chování kmenových buněk, jsou růstové faktory. Při kultivaci a pasážování ESC je žádoucí, aby si buňky zachovaly nediferenciovaný stav a byly i nadále schopny diferenciaci na jakýkoliv typ buněk. Například ESC indukované z lidských fibroblastů potřebují pro udržení svého stavu fibroblastový růstový faktor (FGF). FGF je poté klíčovým prvkem media (Levenstein et al., 2006). Výskyt růstových faktorů v mediu znamená kontinuální přísun těchto látek SC, což se výrazně liší od *in vivo* podmínek. Řešením je zhotovení porézních scaffoldů, které umožňují postupné uvolňování látek. Hackett et al., 2010 připravili porézní implantáty s cílem obnovení funkce poraněné míchy. V této studii byly využívány multipotentní nervové SC izolované z hlodavců (z plodu i dospělých jedinců). Pomocí elektrospinningu bylo vytvořeno porézní lešení z polykaprolaktonu (PCL) a kolagenu. Porézní povaha nanovláken umožnila řízené uvolňování FGF-2 a nervového růstového faktoru (NGF) pro zvýšení proliferace a diferenciaci nervových kmenových buněk.

Jelikož je organismus velmi komplexní systém, je velmi důležité znát všechny souvislosti při napodobování přirozeného prostředí pro SC. Znát vliv biochemických vlastností je důležitý, stejně tak se ale nesmí zapomenout na roli geometrických a mechanických vlastností, které se na řízení osudu buněk bezpochyby také podílejí.

3.1.2 Geometrické vlastnosti

Pro vytvoření přirozeného prostředí SC je nezbytné znát i spojitost mezi diferenciací a geometrickými vlastnostmi ECM niche. Nejdůležitější geometrická vlastnost, která zcela chybí v běžných 2D kulturách je trojrozměrnost SCN. Buňky v těle dále zaujímají charakteristický tvar podle své funkce a umístění. Tvar buněk ovlivňuje strukturu SCN a naopak (Jhala a Vasita, 2015).

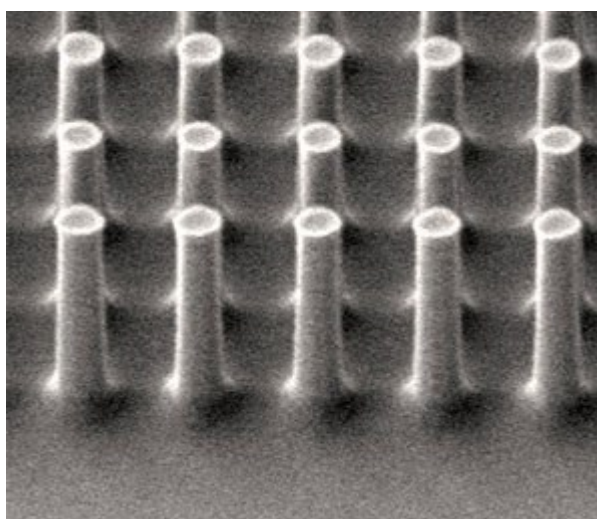
Tvar buňky se v průběhu vývojových procesů mění, v umělém prostředí pak může být řízen 3D lešením s různými geometrickými prvky. Jednou z možností regulace tvaru je nastavením hustoty lešení, tedy velikosti pórů, která může být řízena stupněm zesílení lešení. Např. vysoce zesílené hydrogely uzavírají buňky do kruhovitěho tvaru, méně zesílené pak umožňují jejich šíření, což má pak vliv na jejich chování (Kloxin et al., 2009). Kawano et al., 2013 vyvinuli polystyrenové lešení s voštinovými vzory s různou velikostí pórů a zkoumali jejich vliv na diferenciaci lidských MSC. SC podstupovaly osteogenezi v případě

kdy byly póry menší než velikost buněk, velikost pórů srovnatelná s velikostí buněk pak dávala vznik myogenetickým buňkám. Dále kultivovali NSC na voštinových filmech s různou velikostí pórů (3, 5, 8, 10, 15 μm), kdy menší póry (3 μm) udržovaly kmenové buňky v nediferencovaném stavu, naopak tomu bylo u pórů větších (Kawano et al., 2013). Stejně tak dřívější studie Yang et al., 1999 prokázala vliv tvaru buněk na diferenciaci. MSC byly pěstovány na porézních polykarbonátových membránách. V případě pórů o velikosti menší než velikost buněk nedocházelo k diferenciaci, u pórů větších pak buňky přecházely do podélného protáhlého tvaru - diferenciaci na buňky hladkého svalstva. Dále pak Li et al., 2012 potvrdili diferenciaci NSC na neurony, astrocyty a oligodendrocyty při použití scaffoldu z hydrogelu methakrylamidu a chitosanu s většími póry. Dalším faktorem ovlivňující chování buněk je hustota jejich očkování. Studie Eyckamns et al., 2012 tento vliv prokázala na lidských MSC, kdy při použití vyšší hustoty setí (85 000 buněk / cm^2) docházelo k chondogenní a adipogenní diferenciaci v porovnání s nižší hustotou (5000 buněk / cm^2).

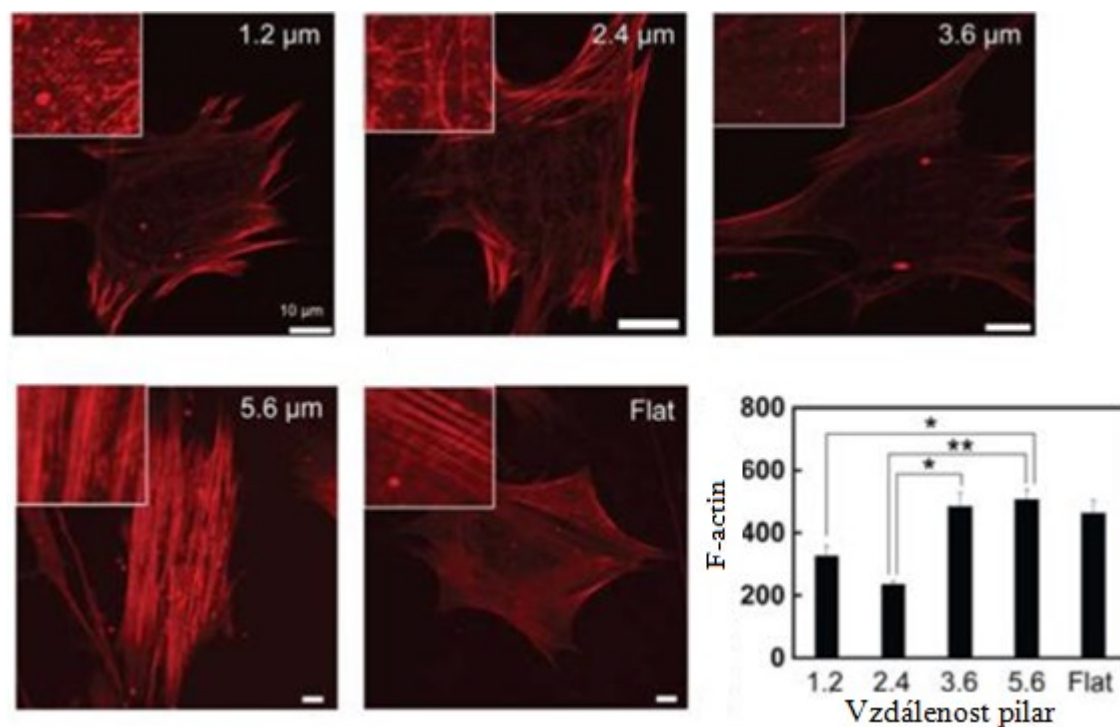
3.1.2.1 Topografie povrchu jako regulátor chování SC

Nové nanotechnologie nám dnes poskytují mnoho možností při syntéze biomateriálů a scaffoldů. Mikro a nanoskopické změny ECM niche má přímý vliv na růst SC i jejich diferenciaci (Martinez et al., 2009). Buňky používají transmembránové aktin-integrinové adhezní komplexy jako mechanosenzory ke zkoumání tuhosti extracelulárního prostředí. Dále tyto komplexy zprostředkovávají adhezi, spouští signalizaci a remodelují ECM (Gerecht et al., 2008). Výhodou dosažení diferenciaci pomocí vhodné topografie je, že odpadá použití indukčních faktorů (Seunghan et al., 2009). Několik studií ukázalo, že SC dávají přednost růstu na povrchu tvořeném nanovláknem než na povrchu rovném. Například Cheng et al., 2013 zkoumali osteogenní diferenciaci MSC na nanovlákněch z PCL a na klasickém plochém povrchu, k lepší proliferaci buněk docházelo na vláknitém povrchu. Diferenciaci pak byla ovlivněna také uspořádáním vláken, vlákna orientovaná v jednom směru podporovala osteogenezi více než vlákna orientovaná křížově. Dalším parametrem ovlivňujícím diferenciační potenciál by mohl být průměr nanovláken. Ve studii Christopherson et al., 2009 byly kultivovány neurální progenitorové kmenové buňky na lamininových vlákněch potažených polyethersulfonem (PES) o různých průměrech a to 283 ± 45 nm, 749 ± 153 nm a 1452 ± 312 nm. Vlákna o průměru 283 nm zvýšila diferenciaci na oligodendrocyty o 40 % a vlákna o průměru 749 nm podporovala diferenciaci na neurony o 20 % ve srovnání s kultivací na klasických polystyrenových površích. Vliv topografie

povrchu na diferenciaci potvrzuje i výzkum Seunghan et al., 2009 kde použili jako scaffold nanotrubičky oxidu titaničitého (TiO_2) na základě jeho dobré biokompatibility s cílem použití pro léčbu v ortopedické oblasti. Demonstrovali, že velikost nanotrubiček TiO_2 regulovala diferenciaci lidských MSC směrem k osteoblastové linii a to v nepřítomnosti osteogenních indukčních faktorů. Testovali několik průměrů nanotrubiček, přičemž struktury s průměrem 30 nm podporovaly pouze adhezi buněk bez zřetelné diferenciaci, zatímco struktury s průměrem trubiček o průměru 70 až 100 nm indukovaly diferenciaci osteoblastů. Dalším typem topografie ovlivňující buněčné chování jsou tzv. nanopilary (viz. obr. č. 5). Ahn et al., 2013 testovali vliv různých nanotopografických povrchů s vysokou přesností na diferenciaci lidských MSC, zejména vliv hustoty nanopilar na adipogenezi a osteogenezi. Jako podklad pro buňky byl použit polyuretan (PUR). Několik různých typů povrchů bylo nakombinováno na jedno krycí sklíčko, čímž odpadají odchylky výsledků při použití různých buněčných šarží a také složení média. Každá nanopilara měla stejnou šířku 700 nm, vzdálenosti mezi nimi byly nastavené na 1,2; 2,4; 3,6 a 5,6 μm . Tvary buněk byly více zaoblené v případě povrchů s vyšší hustotou nanopilar a naopak při nižší hustotě zaujímaly buňky větší plochu. Vzhledem k tomu že i tvar souvisí s diferenciací, docházelo v případě zaoblených buněk k upřednostňování adipogenní linie zatímco v případě buněk zaujímající větší plochu osteogenní linie. Odlišný tvar a stavbu buněk můžeme vidět na obrázku č. 6, kde jsou zobrazena aktinová vlákna buněk. Se zvětšující se vzdáleností nanopilar dochází k výraznější tvorbě vláken.



Obrázek 5 Nanopilary (Johnson, 2011).



Obrázek 6 Snímky aktinových vláken buněk pořízené fluorescenčním mikroskopem pro jednotlivé vzdálenosti nanopilar. Graf závislosti produkce F-actinu pro jednotlivé typy substrátu. Upraveno dle Ahn et al., 2013.

Dalším faktorem ovlivňující osud nediferencovaných buněk je geometrické uspořádání nanopilar. Některé studie prokázaly, že v případě neuspořádané symetrie nanopilar podporuje osteogenezi v porovnání s plochým povrchem či symetrickým čtvercovým vzorem. Dalby et al., 2007 tuto skutečnost testovali na povrchu z polymethylmetakrylátu (PMMA), jako geometrii rozložení nanopilar použili hexagonální, čtvercové, mírně neuspořádané čtvercové a náhodné pole. K vyšší produkci osteopontinu a osteokalcinu (indikace osteogeneze) docházelo v případě použití mírně nepravidelného čtvercového vzoru. Tuto skutečnost prokázali i Tsimbouri et al., 2013, kdy mírně neuspořádaná geometrie opět podporovala osteogenezi, v případě symetrického čtvercového vzoru docházelo ke snižování metabolické signální aktivity, která stojí za fenotypovými změnami v buňkách. Čtvercová symetrie tedy naopak udržovala buňky v nediferencovaném stavu. V obou studiích bylo testování provedeno na lidských MSC.

Testování vlivu topografie na diferenciaci bude věnována část praktické práce, kdy bylo testováno několik typů povrchů s různě velkými póry.

3.1.3 Mechanické vlastnosti

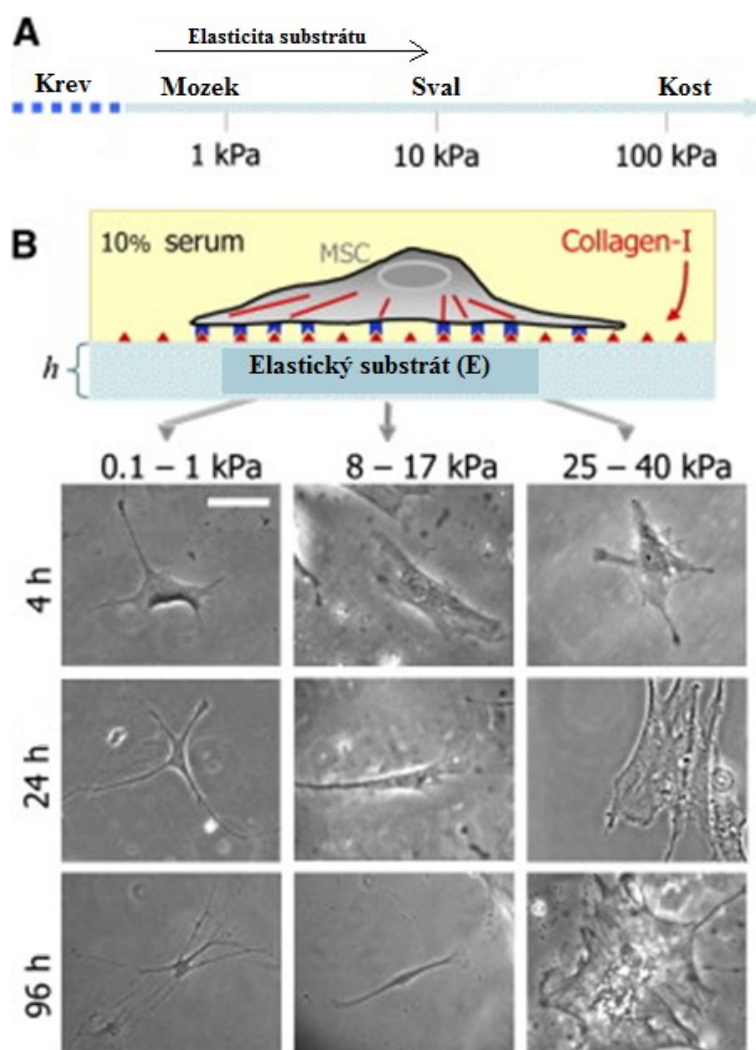
Vlastnosti ECM niche se liší v závislosti na umístění a funkci tkáně, vzhledem k tomu, že každému typu buněk vyhovuje jiné prostředí. Mezi takové proměnné řadíme i mechanické vlastnosti (tuhost a napětí). Od doby vývoje a po celou dobu života organismu jsou buňky těla neustále vystavovány různým mechanickým podnětům působením svalových sil, gravitace, krevního toku a dalším fyzikálním procesům. Interakce mezi buňkami a mechanickými faktory jsou rozhodující pro zdraví a funkci tkání a orgánů v těle, také se předpokládá, že hrají důležitou roli v různých onemocněních, jako je ateroskleróza, osteoartritida a osteoporóza (Guilak et al., 2009). Například buňky chrupavky jsou více funkční, pokud jsou pěstovány při mechanickém zatížení (Jhala a Vasita, 2015). Následující podkapitoly budou věnovány převážně výsledkům studií o testování tuhosti a mechanického zatížení na chování SC.

3.1.3.1 Tuhost jako regulátor chování kmenových buněk

Většina studií k pochopení účinku tuhosti na chování kmenových buněk je provedena pomocí MSC, protože jsou schopny diferencovat do buněk (osteocyty, chondrocyty, myocyty), které mají výrazně odlišnou tuhost ECM. Ke změnám tuhosti ECM dochází již v procesu diferenciaci. Yu et al., 2010 kultivovali lidské MSC kostní dřevě v adipogenním a osteogenním prostředí, přičemž byly měřeny elastické moduly pomocí mikropipetové aspirace. Kontrolní vzorky neprokázaly žádnou výraznou změnu modulu v průběhu celého experimentu a hodnoty se pohybovaly kolem 450 Pa. U buněk podstupující osteogenezi dosahoval Youngův modul téměř dvojnásobně vyšších hodnot než u reference, konkrétně byl modul zvýšen z 457 ± 88 Pa na 890 ± 219 Pa. Buňky kultivované v adipogenním mediu vykazovaly jen mírný nárůst modulu (671 ± 158 Pa) a po ustálení se hodnota pohybovala níže než tomu bylo u kontrolních vzorků (420 ± 52 Pa). Tyto změny tuhosti při diferenciaci byly inspirací dalším výzkumníkům pro využití tuhosti podkladu pro kultivaci jako regulátoru chování SC.

Zjednodušeně by se dalo říci, že měkký podklad, napodobující mozek, je neurogenní, tužší podklad, napodobující svaly, je myogenní a poměrně tuhý podklad, napodobující kost, je osteogenní. Na obrázku č. 7 (A) jsou zobrazeny hodnoty elasticity (tuhosti substrátu) pro jednotlivé tkáně (1 kPa - mozková tkáň, 10 kPa - svalová tkáň, 100 kPa - kostní tkáň). Engler et al., 2006 využili jako substrát pro buňky (MSC) gelový systém, elasticitu řídili pomocí zesílení gelu, kovalentním připojením kolagenu I a tloušťky substrátu (h).

Obrázek č. 7 (B) zobrazuje jednotlivou morfologii buněk pro dané elasticity. V případě použití měkkého substrátu (0,1 - 1 kPa) buňky dosahují spíše rozvětveného tvaru podobného buňkám nervovým. U substrátu napodobující svalovou tkáň (8 - 17 kPa) zaujímají buňky spíše vřetenovitý tvar, jež je typický pro myoblasty. U substrátu tuhého (25 - 40 kPa), zaujímala buňka tvar mnohoúhelníku a můžeme vidět jistou podobnost s osteoblasty. Stejně tak studie Khatiwala et al., 2007 potvrdila vliv elasticity substrátu na diferenciaci. Pro kultivaci použili substrát z polyethylenglykolu (PEG) s upravenými mechanickými vlastnostmi. Byla sledována hladina alkalické fosfatázy a produkce osteokalcinu, což je indikátor osteogenní diferenciaci. K vyšší produkci docházelo prokazatelně u tužších hydrogelů (423,9 kPa) než tomu bylo u měkkých hydrogelů (13,7 kPa).



Obrázek 7 (A) Hodnoty elasticit jednotlivých tkání. (B) Zobrazení morfologie buněk na jednotlivých substrátech s odlišnou elasticitou po 4, 24 a 96 hodinové kultivaci. Upraveno dle Engler et al., 2006.

Tuhost substrátu hraje důležitou roli také při udržování kmenovosti buněk. Jak již bylo zmíněno, mnoho dospělých tkání v lidském těle si díky SCN uchovává SC, které jsou potřebné hlavně při regeneraci tkání a nahrazování odumřelých buněk. Čerstvě izolované SC mají dobrou regenerační kapacitu, která se ale v průběhu kultivace vytrácí a buňky tak postupně ztrácí svůj diferenciační potenciál. Například buňky izolované ze svalového SCN podporují regeneraci kosterních svalů při transplantaci u myši, v případě transplantace buněk kultivovaných na standardním plastickém substrátu se regenerační vlastnosti snižují vlivem ztráty kmenovosti a vzniku progenitorů. Bylo zjištěno, že v případě použití substrátu s tuhostí podobné svalové tkáni si SC zachovávají svoji kmenovost a schopnost sebeobnovy lépe než v případě běžné kultivace (Gilbert et al., 2011).

Ačkoliv existuje několik studií prokazujících vliv tuhosti na diferenciaci, neplatí to ve všech případech, vzhledem k tomu, že určité tkáně mohou mít podobnou tuhost, jako jsou například svaly a kůže. Ve studii Boonen et al., 2009 zkoumali vliv samotné substrátové elasticity nebo v kombinaci s proteinovým potahem na primární proliferaci a diferenciaci myoblastů, byly zde tedy integrovány vlastnosti jak mechanické tak biochemické. Testování bylo provedeno na polyakrylamidových gelech s různou tuhostí (3, 14, 21, 48, 80 kPa) za použití myších MSC. Bylo zjištěno, že tuhost substrátu ovlivňovala pouze proliferaci buněk (nejlepší proliferace byla dosažena u substrátu s tuhostí 21 kPa), nikoliv diferenciaci. Spontánní diferenciace na svalové buňky bylo dosaženo, když byla vlákna potažena proteinovou vrstvou (kolagenem IV, poly-D-lysinem a lamininem). Myogenez byla vyhodnocena na základě sledování exprese markerů MyoD a MHC. Další podobné výsledky o vlivu mechano-biochemických faktorů byly zveřejněny ve článku Saha et al., 2008. Zde byl posuzován účinek tuhosti substrátu spolu s použitím séra s rozpustnými signálními molekulami na diferenciaci NSC izolovaných z dospělých krys. Stejně jako tomu bylo v přechozí uvedené studii, byla pomocí úpravy tuhosti ovlivněna především proliferace buněk. Nejlepší proliferace byla při tuhosti substrátu podobné mozkové tkáni. I přesto že v případě použití substrátu s elasticitou podobnou mozku byla indukována exprese β -tubulinu III (marker neurogeneze) bylo pro úspěšnou diferenciaci nutností dodání séra. Dále pak byla sledována produkce GFAP (marker gliálních buněk). V přítomnosti séra pak měkčí gely (0,1 až 0,5 kPa) podporovaly neurogenezi, zatímco tvrdší gely (1 až 10 kPa) indukovaly diferenciaci na gliální buňky. V jiné podobné studii byly vyrobeny scaffoldy z kolagenu s dvěma různými tuhostmi substrátu. Dále pak byla sledována diferenciace při úpravě scaffoldů pomocí glykosaminoglykanů (kyselina hyaluronová,

chondroitinsulfát). Jak bylo očekáváno, měkké lešení (0,5 kPa) zvýšilo expresi SOX9 (marker chondrogenese), zatímco tuhé lešení (1,5 kPa) zvýšilo expresi RUNX2 (marker osteogeneze). Po úpravě scaffoldů byla pak diferenciaci zesílena - kyselina hyaluronová podporovala chondrogenezi a chondroitinsulfát podporoval osteogenezi. Použitím takových scaffoldů odpadá nutnost kultivace v diferenciacích mediích (Murphy et al., 2012).

Shrnutí toho jak tuhost substrátu ovlivňuje chování kmenových buněk je uvedeno v tabulce č. 1.

*Tabulka 1 Shrnutí vlivu tuhosti substrátu na kmenové buňky,
upraveno dle Jhala a Vasita, 2015.*

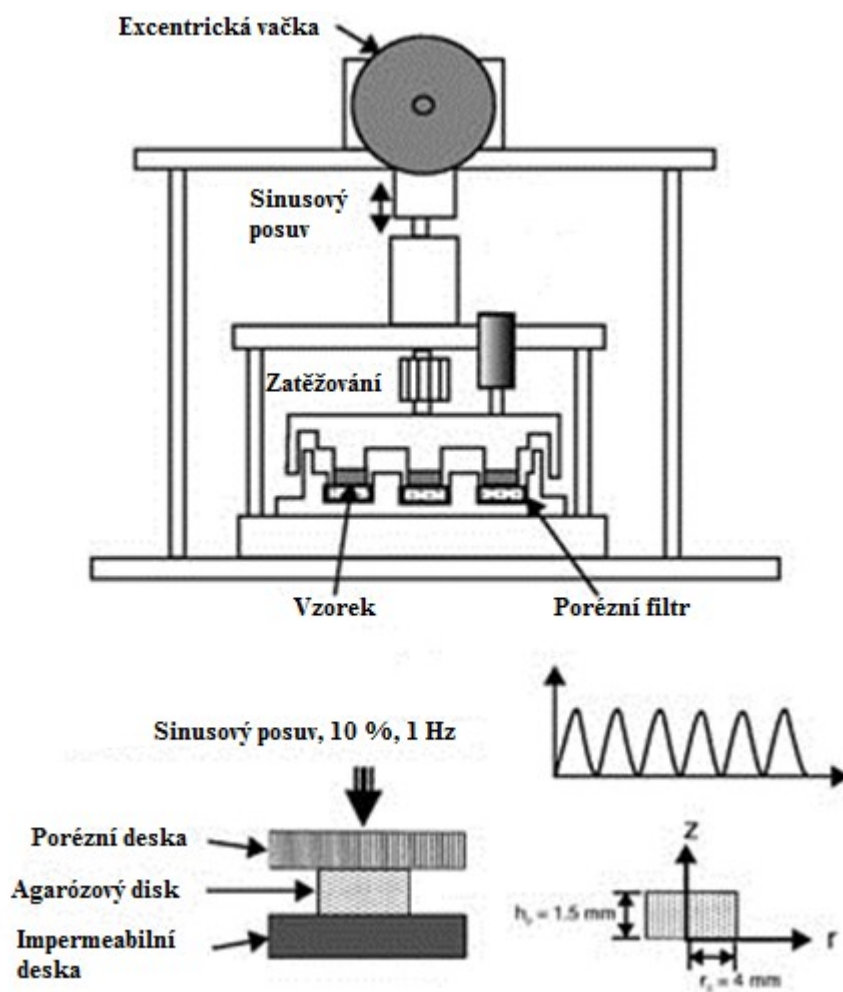
Tuhost →	<0,25 kPa	0,1 - 1 kPa	1 kPa	2 - 5 kPa	6,1 kPa	1 - 10 kPa	>25 kPa
SC ↓							
MSC	stavení buněčného cyklu	neurogeneze	chondrogenese, adipogeneze	endoteliální diferenciaci		myogeneze	osteogeneze
Ostatní		lepší sebeobnova, neurogeneze		udržování kmenovosti	gliální diferenciaci	lepší sebeobnova, svalové progenitorry	osteogeneze

3.1.3.2 Mechanické namáhání jako regulátor kmenových buněk

Mechanickým namáháním a jeho vlivem na chování buněk se zabývá obor mechanobiologie. V organismu jsou mechanicky namáhané především buňky chrupavek a kostí, díky tomu je této regulaci věnována pozornost v oblasti léčení chorobných procesů jako je osteoporóza, ateroskleróza a osteoartritida (Jacobs et al., 2010). Významným indikátorem při mechanickém zatěžování je produkce ECM. MSC při cyklickém tlaku začnou produkovat především glykosaminoglykany, proteoglykany, kolagen a to v závislosti na velikosti a trvání aplikovaného tlaku (Angele et al., 2003). Studie Huang et al., 2004 prokázala úči-

nek cyklického zatěžování na králičí MSC, buňky byly kultivovány na agarovém substrátu. Vzorky byly podrobeny sinusovému zatížení o 10 % deformaci po dobu 4 hodin za den, zatěžování bylo aplikováno po dobu 3, 7 a 14 po sobě jdoucích dnů. U vzorků byla indikovaná produkce TGF β , což je indukční faktor pro chondrogenezi. Cyklické zatěžování tedy vyvolávalo samo o sobě chondrogenezi, čímž se předešlo potřebě růstových faktorů, které jsou jednak drahé tak mají mnohdy krátkou životnost. Jednoduché schéma bioreaktoru, ve kterém bylo mechanické zatěžování prováděno je uvedeno na obrázku č. 8. Další možností jak ovlivnit diferenciaci je mechanické protahování. Wu et al., 2013 studovali mechanické protahování v souvislosti s léčbou osteoporózy. Studie byla provedena na potkaních MSC, vzorky byly podrobeny cyklickému protahování o 5 a 10 % dvakrát denně po dobu 4 hodin. V případě 10 % protahování byla zaznamenána aktivita alkalické fosfatázy (ALP), což je indikace osteogeneze, již po 3 dnech. Další zajímavá studie byla provedena skupinou Yourek et al., 2010 kde byl testován vliv smykového napětí vyvolaný tekutinou na lidské MSC. Vzorky byly podrobovány smykovému napětí v jednoduchém bioreaktoru (systém paralelních deskových průtokových komor). Bylo potvrzeno, že proud tekutiny podporuje osteogenní diferenciaci vzhledem k aktivitě ALP a expresi genů BMP-2 a osteopontinu. Navíc tento účinek byl výraznější u vzorků bez osteogenních medií, což by opět eliminovalo potřebu růstových faktorů a dalších chemických látek. Určit však přesnou hodnotu smykového napětí vhodného pro nejefektivnější osteogenezi je velmi obtížné, vzhledem k velké škále používaných substrátů a typů buněk.

Mechanické napětí tedy způsobuje produkci ECM a diferenciaci MSC na osteoblasty či chondrocyty. Buňky veškeré vnější podněty vnímají, takže i mechanické signály ovlivňují jejich následné chování. Není ale vůbec jednoduché napodobit *in vivo* podmínky SCN, vzhledem k tomu že v organismu hraje roli několik faktorů jako například napětí, deformace, stres, tlak a tok tekutin, které se navíc v čase mění.



Obrázek 8 Schéma bioreaktoru pro mechanické zatěžování. Upraveno dle Huang et al., 2004.

4 DIAGNOSTIKA DIFERENCIACE

Již víme, že diferenciaci buněk ovlivňuje několik faktorů, které byly zmíněny v předchozích kapitolách. Důležité je tedy znát postupy, jak správně posoudit vlastnosti a vzhled buněk a na základě toho vyhodnotit jakou diferenciací dráhu podstupují. Jednou ze sledovaných vlastností je morfologie buněk, pomocí níž může být vyhodnocen zdravotní stav (apoptické, nekrotické tělíška) či jejich tvar. Pro posouzení morfologie slouží fluorescenční mikroskop a klasický optický mikroskop (Machado a Fleck, 2010). Morfologii je možné dále posoudit pomocí kryosekční techniky, kdy jsou buňky ve zmrazeném mediu umístěny do kapalného dusíku a následně nařezány na Cryotomu. Metodou pro posuzování histologie je barvení buněk, kdy dochází k interakci daného barviva s určitou částí tkáně. Pro posouzení adipogeneze se používá například barvivo Oil Red O (Dvorakova et al., 2008) pomocí kterého jsou obarveny lipidové kapičky (obsahující triglyceridy, neutrální lipidy a cholesterol), jež jsou přítomné převážně v adipocytech (Sigma-Aldrich, 2014). Diferenciace v osteoblasty se identifikuje pomocí barviva Alizarin Red (Dvorakova et al., 2008). Toto barvivo se používá již desetiletí pro pozorování mineralizovaných tkání, jelikož se specificky váže na vápník (Gregory et al., 2004). Přítomnost vápníku je také prokazatelná pomocí barvení dle Kossa (Bonewald et al., 2003). Chondrogenní diferenciace bývá rozpoznána pomocí barvení Mayerovým barvivem (důkaz kolagenu) a Alcianovou modří (důkaz glykosaminoglykanů) (Dvorakova et al., 2008).

Všechny buňky mnohobuněčného organismu jsou vybaveny stejnou genetickou informací, obsahují tedy totožnou DNA. Odlišnost jednotlivých buněk je dána aktivitou jednotlivých genů. Svalová buňka nepotřebuje exprimovat stejné geny jako například nervová a naopak, proto dochází k jejich vypnutí. Výjimkou jsou tzv. house-keeping geny, které potřebuje každá buňka ke svému fungování (Diferenciace a epigenetika, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích). Na základě této informace můžeme sledovat diferenciaci právě podle exprese genů, které jsou pro každý typ buněk typické, např. RUNX2 pro osteogenezi, SOX9 pro chondrogenesi apod. (Murphy et al., 2012). V tomto případě se využívají metody jako je qRT-PCR a elektroforéza, které budou blíže rozebrány v následujících kapitolách.

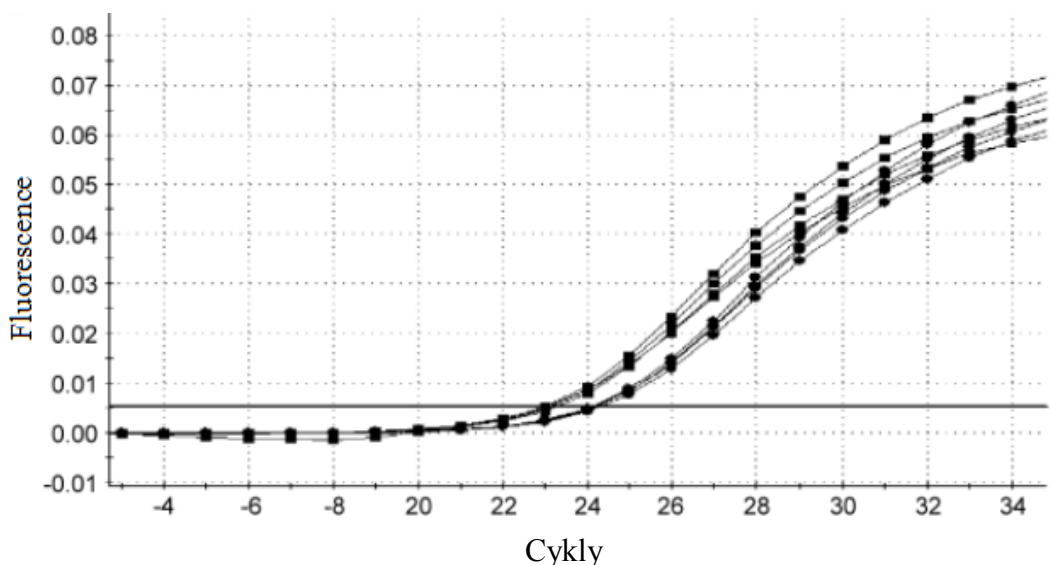
4.1 qRT-PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase qRT-PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction) je technologie která umožňuje amplifikaci specifických

sekvencí DNA tisíc až miliónkrát za použití sekvenčně specifických oligonukleotidů, tepelně stabilní DNA polymerázy a tepelného cyklu. Celý proces probíhá v termocykleru. U klasické PCR metody následuje po posledním cyklu post analýza a to elektroforéza kdy dochází k detekci až finálního produktu. V případě qRT-PCR není elektroforéza potřeba, jelikož se měří produkt v každém cyklu. Kvantifikace amplifikovaného produktu se získává za použití fluorescenčních sond nebo fluorescenčních barviv vázaných na DNA a nástrojů PCR v reálném čase, které měří fluorescenci při průběhu každého tepelného cyklu (Ginzinger, 2002), (Real-time PCR handbook, 2012). Existují tři hlavní kroky, které tvoří každý cyklus qRT-PCR, přičemž se reakce obecně provádějí po dobu 40 cyklů:

- Denaturace: V této fázi dochází ke zvýšení teploty vzorku obvykle na 95 °C a dochází k narušení sekundární struktury DNA, dojde tedy k rozvolnění dvoušroubovice na jednotlivé řetězce (Real-time PCR handbook, 2012).
- Annealing: Zde dochází k navázání primerů na řetězec DNA. Primer volíme podle toho, jaký úsek na DNA je potřeba identifikovat. Reakční směs je ochlazená na 50 - 60 °C (přesná teplota závisí na teplotě tání primerů), což umožní navázání primeru na řetězec pomocí vodíkových můstků. Primery slouží jako výchozí bod pro syntézu DNA, jelikož DNA polymeráza, která zahajuje kopírování řetězce, se může navázat pouze k dvojitému řetězci DNA.
- Extending: V tomto kroku dochází k navýšení teploty na 72 °C, což umožní navázání DNA polymerázy. Jednotlivé DNA báze obsažené v roztoku začnou tvořit vlákno na základě komplementarity bází. Výsledkem je nový řetězec DNA (What is PCR?, 2016).

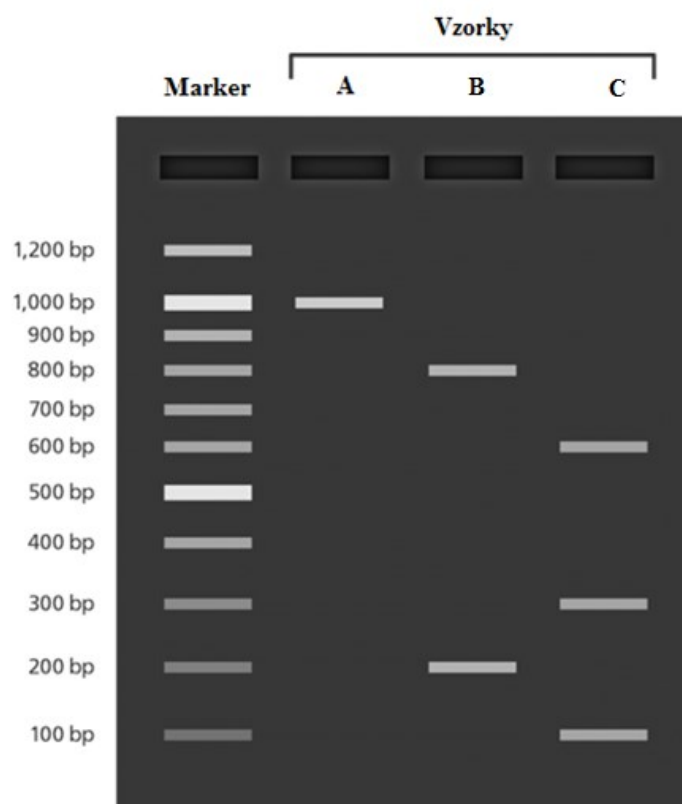
Vyhodnocení celého procesu je prováděno pomocí grafu závislosti intenzity fluorescence na počtu cyklů (viz obr. č. 9)



Obrázek 9 Graf závislosti intenzity fluorescence na počtu cyklů (Bustin, 2005).

4.2 Elektroforéza

U klasické PCR metody následuje po posledním cyklu post analýza a to elektroforéza (ELFO). Pro analýzu DNA je nejčastěji využívána gelová ELFO. Vhodnou maticí pro tuto metodu je polyakrylamidový gel a to díky jeho porézní struktuře. Obecným principem je oddělení molekul v gelovém elektrickém poli na základě jejich odlišných nábojů. Při umístění do elektrického pole se nabitě biomolekuly pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem kvůli fenoménu elektrostatické přitažlivosti. Relativní mobilita jednotlivých molekul závisí na několika faktorech. Nejdůležitější z nich jsou čistý náboj a jeho velikost, velikost molekuly, molekulární tvar a také vlastnosti matrice, kterou molekuly migrují. Jedním z nejdůležitějších aspektů techniky gelové elektroforézy je barvení. Jakmile se molekuly vzorku oddělí v gelové matrici, je nutné viditelně zjistit jejich polohu. Toho se dosáhne barvením pomocí činidla vhodného pro vzorek. Pro barvení DNA úseků se používá například chlorid stříbrný či ethidium bromid. Vyhodnocení se provádí pomocí velikostního markeru, který se nanáší na gel společně se vzorkem (Magdelin, 2012).



Obrázek 10 Obrázek znázorňující DNA fragmenty oddělené pomocí gelové ELFO. Délka fragmentů DNA se porovná s markerem obsahujícím fragmenty známé délky. (*What is gel electrophoresis?*, 2016).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

- Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk do adipogenní, osteogenní a chondrogenní linie.
- Vyhodnocení vlivu topografie povrchu na morfologii mezenchymálních kmenových buněk.
- Vyhodnocení vlivu topografie povrchu na proliferaci buněčné linie NIH/3T3.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Testované povrchy s odlišnou topografií

Pro testování vlivu topografie povrchu na diferenciaci MSC byly použity polystyrenové Petriho misky s upraveným povrchem, které byly připraveny na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Testováno bylo celkem 7 modifikací viz. publikace Wrzecionko et al., 2017. Jednotlivé povrchy se lišily ve velikosti pórů.

6.2 Buněčné kultury a medium

Pro daný experiment byla použita buněčná linie mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Experimenty s MSC byly provedeny ve spolupráci s Ústavem experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Pro zajištění diferenciaci byly MSC kultivovány ve 3 diferenciacních prostředích:

- Pro indukci adipogeneze: α -MEM médium s obsahem telecího séra (BioSera, Francie) v koncentraci 10 %. Médium dále obsahovalo antibiotika Penicilin/Streptomycin v koncentraci 1 % (GE Healthcare HyClone, Velká Británie), 0,5 μ M dexamethazonu, 50 μ M indomethacinu a 0,5 mM isobuthylmethylxanthinu (Sigma).
- Pro indukci osteogeneze: α -MEM médium s obsahem telecího séra (BioSera, Francie) v koncentraci 10 %. Médium dále obsahovalo antibiotika Penicilin/Streptomycin v koncentraci 1 % (GE Healthcare HyClone, Velká Británie), 0,01 μ M dexamethazonu, 200 μ M askorbátu-2-fosfátu (Fluka, St Louis, MO) a 10 mM β -glycerol-fosfátu (Sigma).
- Pro indukci chondrogeneze: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, Rakousko) s obsahem antibiotik Penicilin/Streptomycin v koncentraci 1 % (GE Healthcare HyClone, Velká Británie), 0,1 μ M dexamethazonu, 40 μ g/ml proline mix (Sigma), 50 μ g/ml askorbátu-2-fosfátu (Fluka, St Louis, MO) a 10 μ g/ml TGF- β 3 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Na vybraných površích byla také kultivována buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, USA). Jako kultivační médium bylo použito DMEM (PAA Laboratories GmbH, Rakousko). K médiu pak bylo přidáno 10% fetálního telecího séra (BioSera, Francie) a antibiotika – Penicillin/Streptomycin (100 μ g/ml) (PAA Labora-

ories GmbH, Rakousko). Obě buněčné linie byly kultivovány při teplotě 37 °C v inkubátoru s řízenou atmosférou (5 % CO₂) a za vysoké relativní vlhkosti.

6.3 Použité přístroje a pomůcky

Při experimentu byl využíván biologický inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific, USA), dále laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERASafe KSP (Thermo Scientific, USA), fluorescenční mikroskop s fázovým kontrastem Olympus IX 81 (Olympus, Japonsko), rastrovací elektronový mikroskop Phenom G2 (Edlin), centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo), tkáňový plastik (TPP, Švýcarsko), automatické pipety a mikropipety (Eppendorf, Německo).

6.4 Experiment

Následující podkapitoly obsahují jednotlivé kroky experimentu, které byly provedeny při testování diferenciaci MSc a proliferace linie NIH/3T3 na modifikovaných površích.

6.4.1 Kultivace mezenchymálních buněk

MSC buňky byly nasazeny na Petriho misky s upraveným povrchem. Celkem bylo testováno 7 modifikací v 5 opakováních a jako reference sloužily obyčejné Petriho misky. Buňky byly vysety v koncentraci 1×10^3 buněk/cm². Adipogenní, osteogenní a chondogenní médium bylo přidáno po týdnu kultivování. V průběhu celé kultivace (14 dní) byla prováděna výměna média a to 2x týdně.

6.4.2 Kultivace myších fibroblastů

Buněčná linie NIH/3T3 byla pěstována v kultivační nádobě (T75, TPP), před trypsinizací byl stav buněk zkontrolován pomocí mikroskopu. Z kultivační nádoby bylo následně odsáto medium, aniž by došlo k poškození adherovaných buněk. Buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) o koncentraci 0,2 ml/cm² (odstranění zbytků média a séra). Následně byl pufr odsát a do kultivační nádoby byl přidán trypsin o koncentraci 0,1 ml/cm² (došlo k přerušení vazeb buňka-buňka a buňka-plastik). Kultivační nádoba s trypsinem byla umístěna na 15-20 minut do inkubátoru. Po tuto dobu byly buňky kontrolovány pod mikroskopem a po uvolnění buněk bylo do nádoby přidáno stejné množství média jako trypsinu. Vzniklý roztok byl odsán do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla vložena do předem vytemperované centrifugy, přičemž centrifugace probíhala 3 minuty při otáčkách 100 rpm. Po centrifugaci byl odsát vzniklý supernatant a buňky usazené na dně zkumavky

byly pomocí média naředěny na koncentraci 1.10^5 buněk/ml média. Buňky linie NIH/3T3 byly pěstovány pouze na vybraných površích (povrch 4, 5, 6 a 7). Buňky byly vysety na jednotlivé Petriho misky v koncentraci 2.10^5 buněk/ml média. Misky byly připraveny ve 3 opakováních plus reference. Buňky byly kultivovány v inkubátoru po dobu 2 dnů. Proliferace a stav buněk byl kontrolován pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem.

6.4.3 Barvení buněk a fluorescenční mikroskopie

Po 3 týdenní kultivaci měly být MSc na Petriho miskách obarveny příslušnými barvivými pro vyhodnocení diferenciací. Před tímto krokem musel být však experiment předčasně ukončen kvůli infekci MSc buněk. Dále však bude zmíněn zamýšlený postup barvení:

- Důkaz adipogeneze: Identifikace diferenciací v adipogenní linii měla být provedena pomocí barviva Oil Red O (Sigma). Buňky měly být zafixovány 10 % formaldehydem po dobu 30 minut. Dále měly být promyty a dehydratovány 60% isopropanolem po dobu 2-5 minut a nabarveny roztokem Oil Red O dle protokolu výrobce a kontrastně nabarveny Mayerovým Hematoxylinem (BioOptica, Milan, Italy).
- Důkaz osteogeneze: Diferenciací měla být prokázána barvením pomocí Alizarin Red a barvením podle Kossa. Pro barvení Alizarin Red měly být buňky zafixovány 70% ledově chladným ethanolem po dobu 15 minut. Dále měly být promyty destilovanou vodou a obarveny barvivem Alazarin Red (Sigma) a po 5-10 minutách opět důkladně promyty. Pro barvení podle Kossa měly být buňky opět zafixovány ethanolem po dobu 15 minut. Po promytí destilovanou vodou měly být buňky inkubovány v 5 % dusičnanu stříbrném (Sigma) pod UV světlem po dobu 30 minut. Následně měly být opět propláchnuty destilovanou vodou a pokryty 5% thiosíranem sodným (Lachema, Brno, Česká Republika) na 2 minuty a opět propláchnuty.
- Důkaz chondrogenese: V tomto případě měly být buňky zafixovány acetonem po dobu 10 minut. Obecná struktura chondrogenní tkáně měla být prokázána Mayerovým barvivem Haematoxylin/Eosin (BioOptica, Milan, Italy). Glykosaminoglykanové usazeniny měly být barveny 1% Alcianovou modří (Sigma) v 3 % roztoku kyseliny octové.

Výsledky měly být vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu s fázovým kontrastem.

Po objevení infekce byly MSC zafixovány a nabarveny barvivem ActinRed (Life Technologies, USA) a barvivem Hoechst 33258 (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Barvivo ActinRed se váže na proteiny, které jsou obsaženy v cytoskeletu buněk a Hoechst pak pro-

stupuje do jader buněk, kde se váže na DNA. Postup byl následující: Z Petriho misek bylo odsáto médium a poté byly buňky zafixovány pomocí 4 % formaldehydu (množství 1 ml na misku) po dobu 15 minut. Po uplynutí doby byl formaldehyd odsát a misky byly propláchnuty 1 ml PBS. Po odsátí PBS byl na misky napipetován 0,5 % Triton, doba působení byla 5 minut, a následně byl opět odsán. Následoval proplach pomocí PBS (3x každá miska). Poté bylo do misky napipetováno 1 ml PBS a přidány barviva, AcktinRed v množství 1 kapky/ml a Hoechst v koncentraci 30 $\mu\text{l/ml}$. Petriho misky byly ponechány v inkubátoru po dobu 30 minut a po uplynutí doby byl jejich obsah odsán. Na závěr byl na každou misku přidán opět 1 ml PBS. Morfologie buněk pak byla sledována pomocí fluorescenčního mikroskopu s fázovým kontrastem.

Z důvodu infekce MSc byla testována i proliferace buněčných linií myších fibroblastů na modifikovaných površích. Postup barvení i vyhodnocení byl stejný jako v případě MSc.

6.4.4 Skenovací elektronová mikroskopie

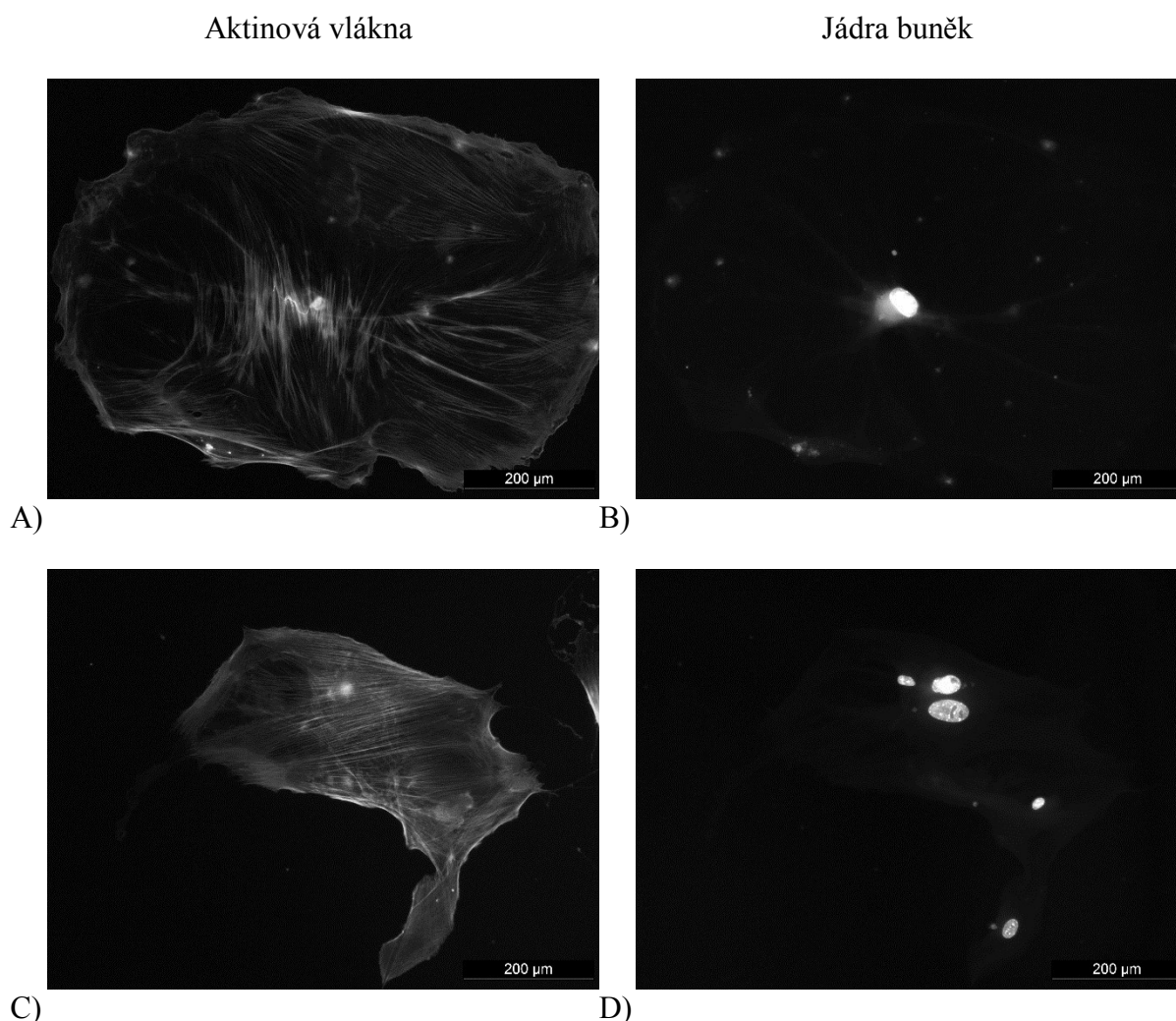
Morfologie obou buněčných linií byla pozorována také pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). U elektronového mikroskopu jsou na rozdíl od světelného nahrazeny fotony elektrony a skleněné čočky nahrazeny elektromagnetickými. Elektronový mikroskop má vyšší rozlišovací schopnost díky tomu, že elektrony mají kratší vlnovou délku, než je tomu u viditelného světla. U elektronového mikroskopu můžeme dosáhnout až 1 000 000 x zvětšení (Cais, 2015).

7 VÝSLEDKY

Vzhledem k vyskytnuvší se infekci MSC v průběhu experimentu nemohla být vyhodnocena diferenciací MSC buněk v dané buněčné línii. Tato kapitola tak bude věnována pouze vyhodnocení vlivu topografie povrchů na proliferaci a morfologii buněk. Výsledky jsou prezentovány v podobě mikrofotografií pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu s fázovým kontrastem a pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.

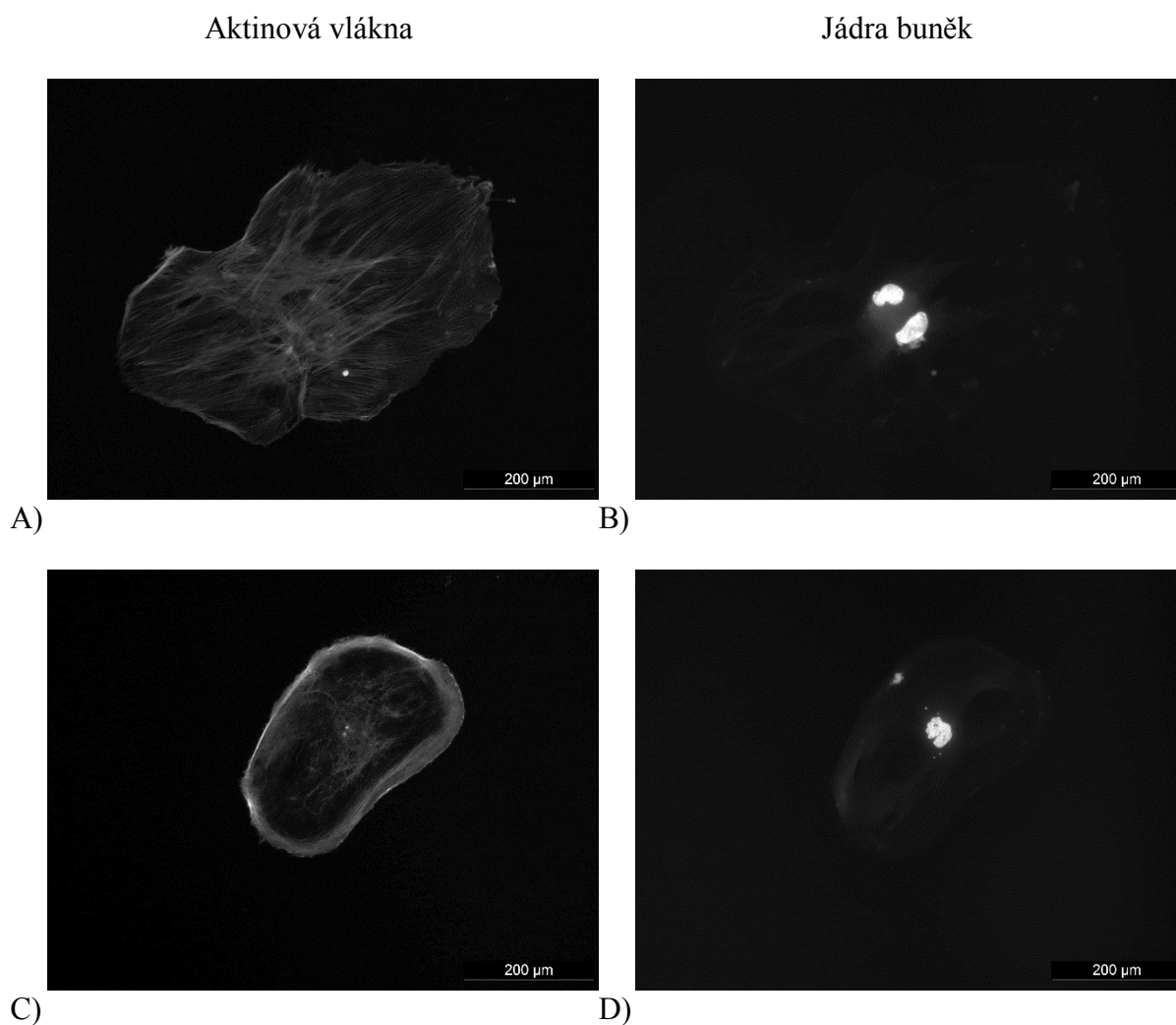
7.1 Vyhodnocení vlivu modifikovaných povrchů na linii mezenchymálních kmenových buněk

V následujících obrázcích jsou vždy uvedeny v levé části mikrofotografie zobrazující cytoskelet buněk (konkrétně aktinová vlákna) a v levé části pak tomu odpovídající jejich jádra. Na obrázku 11 vidíme morfologii MSC kultivovaných na referenčních miskách. V případě reference buňky zaujímaly plošný a oválný tvar.



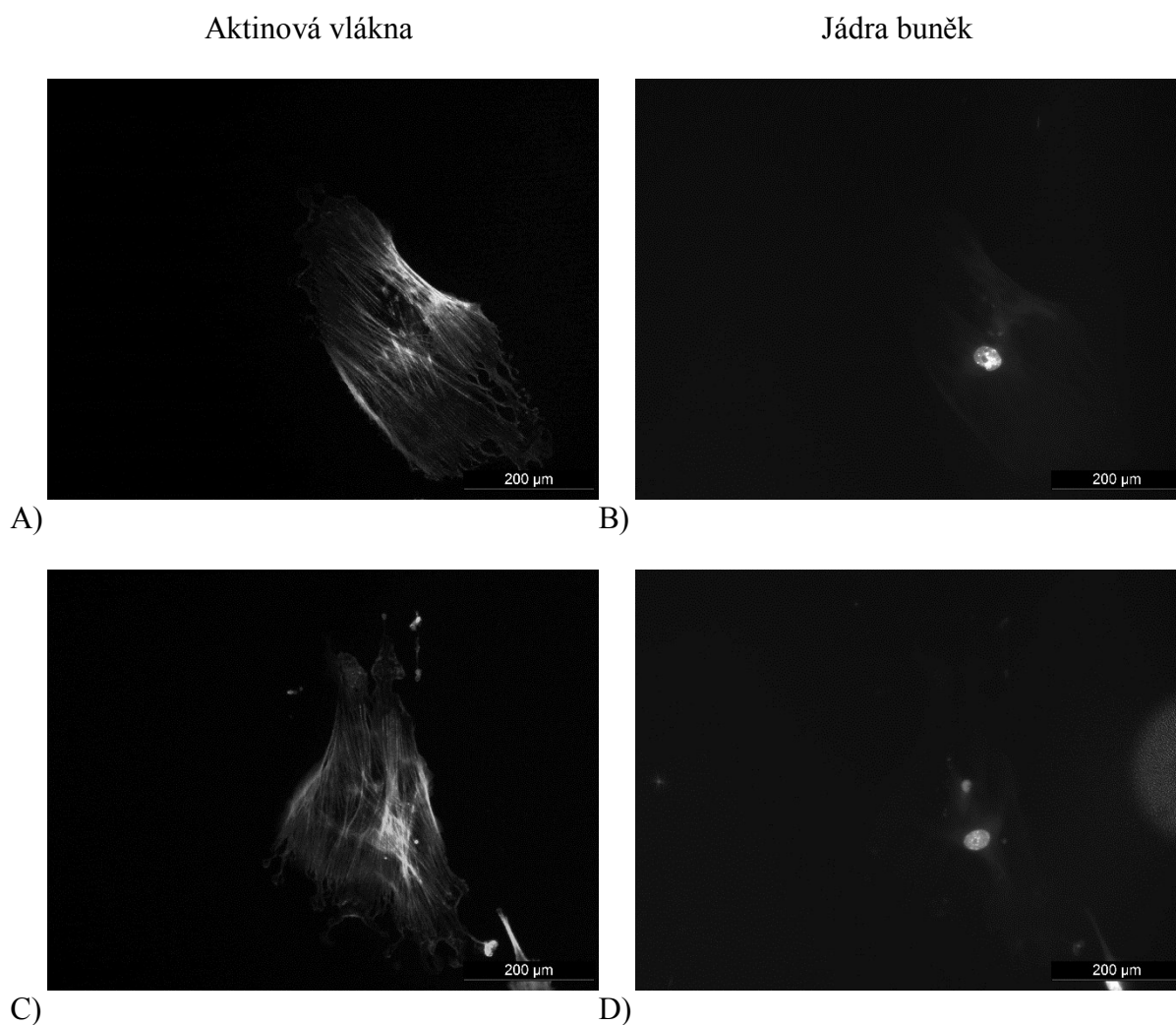
Obrázek 11 Mikrofotografie MSC pěstovaných na referenčních miskách pořizené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

Obrázek 12 zachycuje morfologii MSC na modifikovaném povrchu 1. Vzhledem k tomu, že tato modifikace se nejméně lišila od reference, byla očekávána i jistá podobnost morfologie buněk. Buňky i zde zaujímají plošný a oválný tvar. Z teoretické části víme, že tvar buněk také souvisí s diferenciací. Příklad, že buňky mají kulovitý či oválný tvar, může znamenat zachování kmenových buněk v nediferencovaném stavu. Vezmeme-li v úvahu vzhled adipocytů, které jsou právě kulovité, můžeme i uvažovat o diferenciaci buněk do adipogenní linie. Vzhledem k výskytu infekce ale nemohou být tyto výsledky potvrzeny a jsou pouze spekulativní.



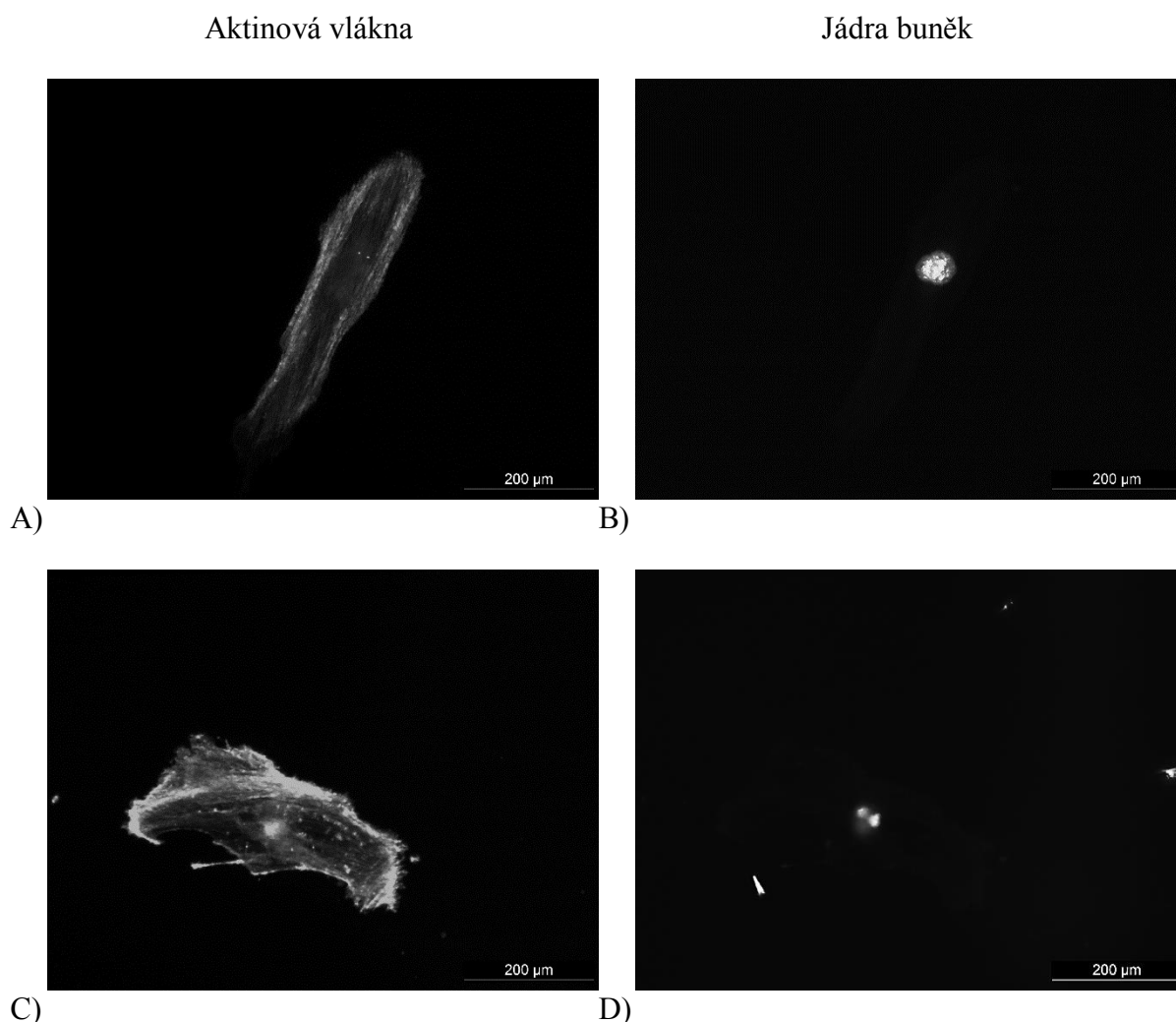
Obrázek 12 Mikrofotografie MSC (povrch 1) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

Na obrázku 13 je zobrazena morfologie testovaného povrchu 2. Zde již začíná být vzhled mírně odlišný na rozdíl od reference. Buňky zaujímají tvar mnohoúhelníku a můžeme zde vidět podobnost s osteoblasty.



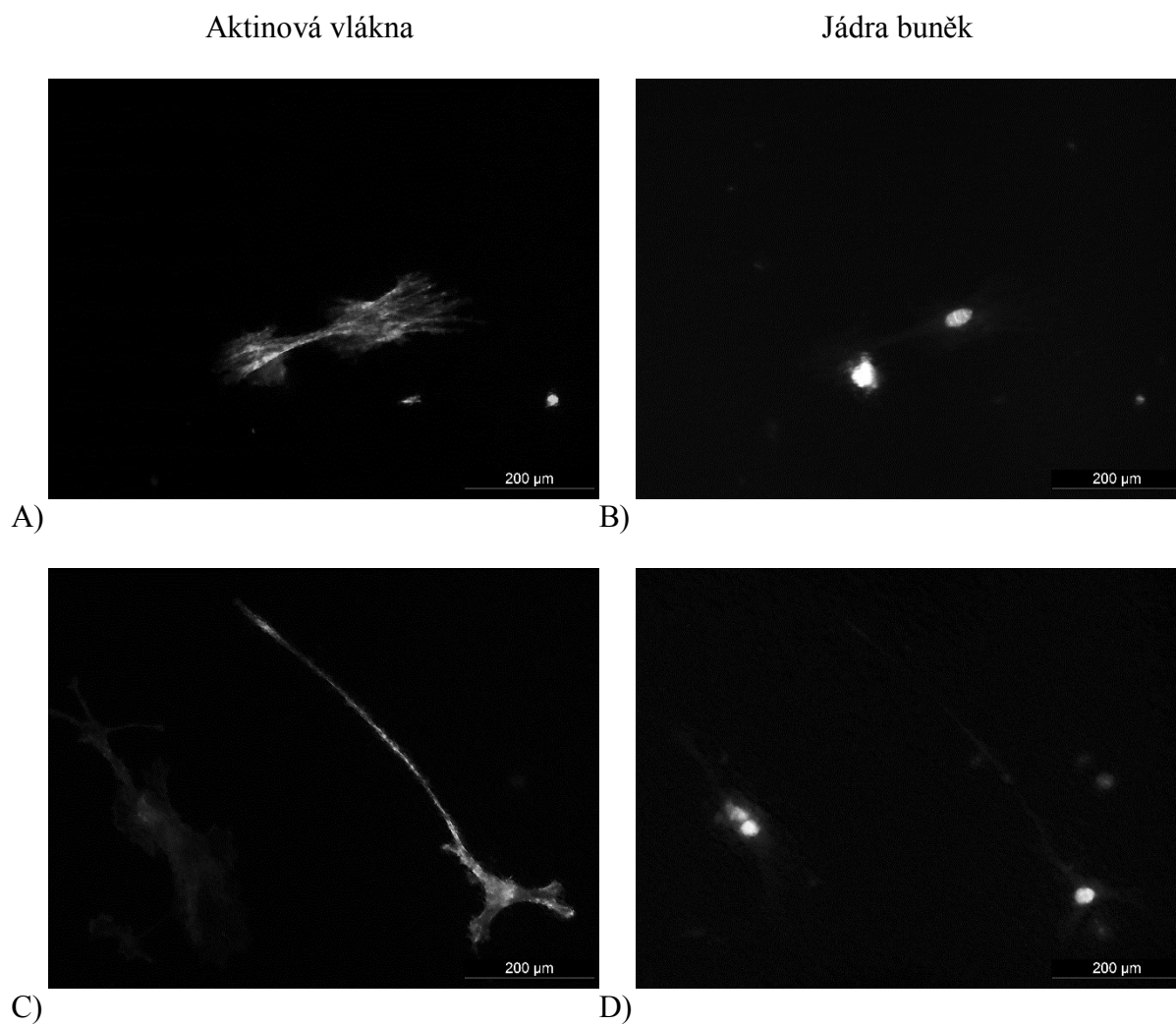
Obrázek 13 Mikrofotografie MSC (povrch 2) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

Mikrofotografie v obrázku 14 zobrazují vzhled buněk na modifikovaném povrchu číslo 3. Vidíme, že se zvětšující se velikostí pórů, dochází také k větší odlišnosti morfologie buněk oproti referenci. Buňky zaujímají protáhlejší tvar než v předchozích příkladech, svým vzhledem mohou připomínat myocyty.

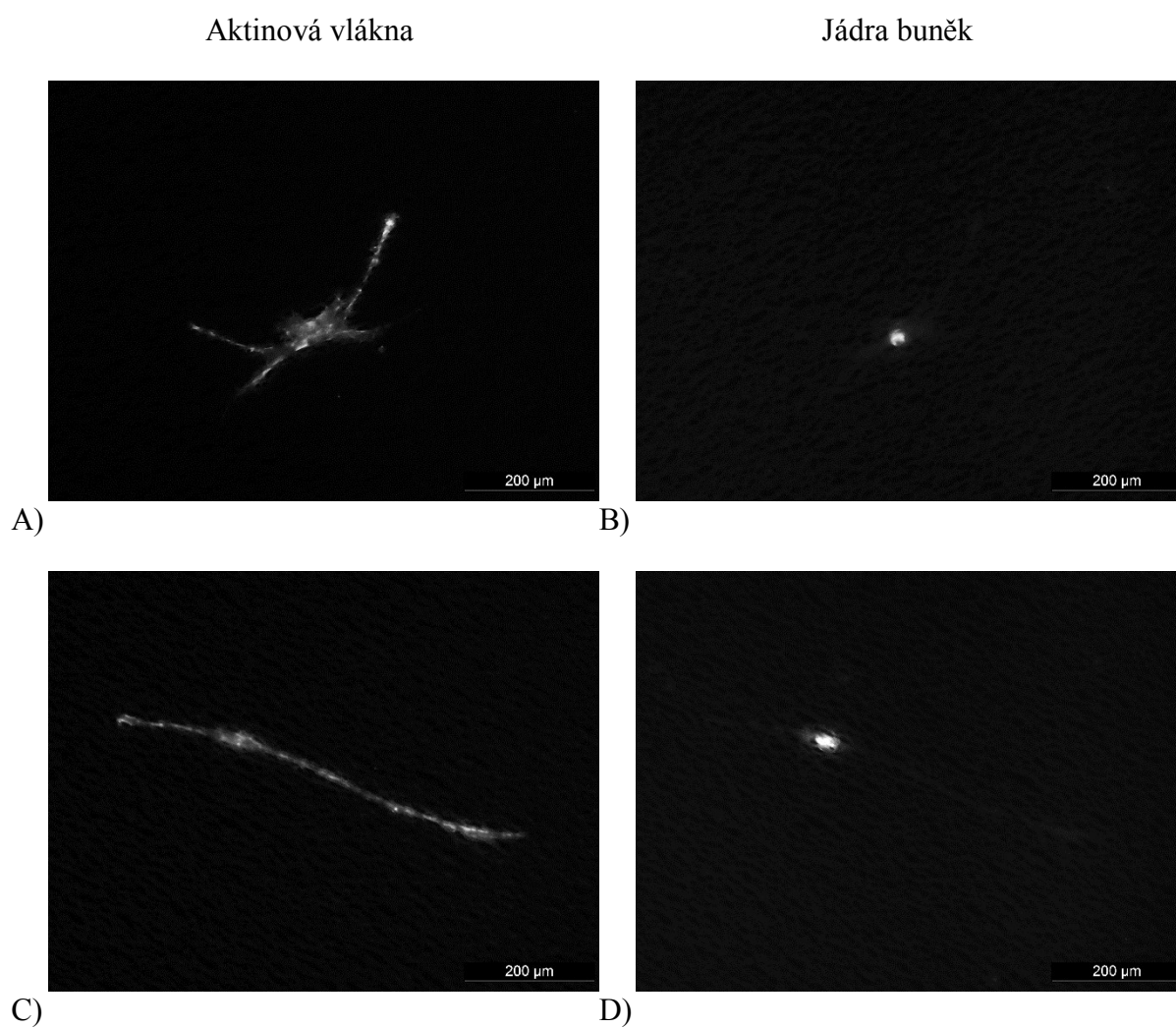


Obrázek 14 Mikrofotografie MSC (povrch 3) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. A), C) zachycují aktinová vlákna; B), D) zobrazují jádra buněk. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

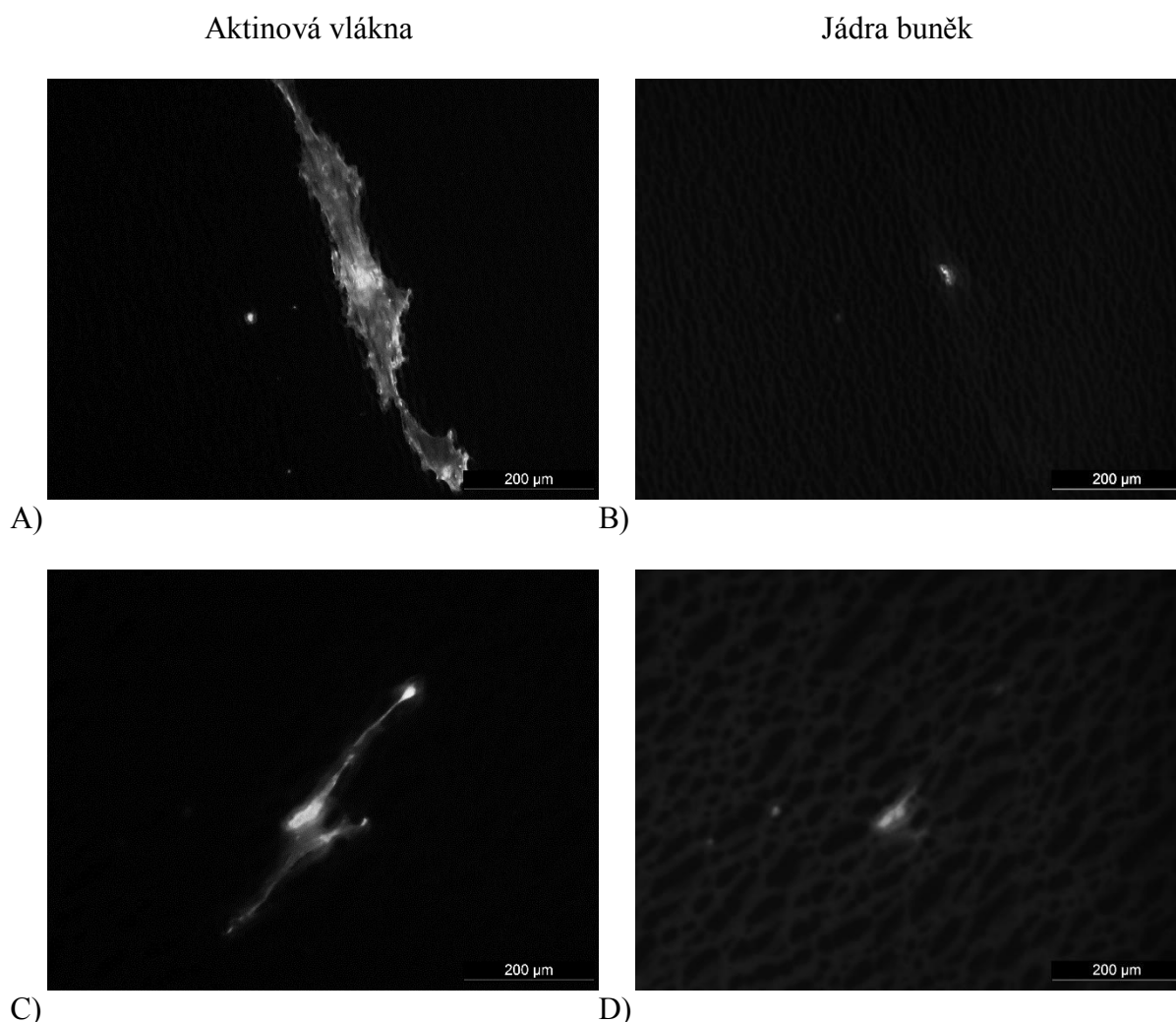
Následující obrázky 15 - 17 obsahují mikrofotografie MSC kultivovaných na površích 4 - 6. Kvalita pořízených fotografií klesá s rostoucí pórovitostí povrchů. Pomocí fluorescenční mikroskopie dochází k pořizování snímků osvětlením spodní části Petriho misky, vzhledem k tomu může být viděn na některých snímcích i vzhled dané topografie, který narušuje celkový vzhled buňky. Nicméně pro posouzení tvaru buněk jsou mikrofotografie dostačující. S rostoucí velikostí pórů můžeme říct, že dochází k protahování buněk. V některých případech buňky zaujímají tvar podobný nervovým buňkám (např. obrázek 15 C) nebo obrázek 16 A)). Tato podobnost je ale čistě náhodná, jelikož z k neurogenezi dochází jen v případě, jsou-li diferencovány NSC.



Obrázek 15 Mikrofotografie MSC (povrch 4) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

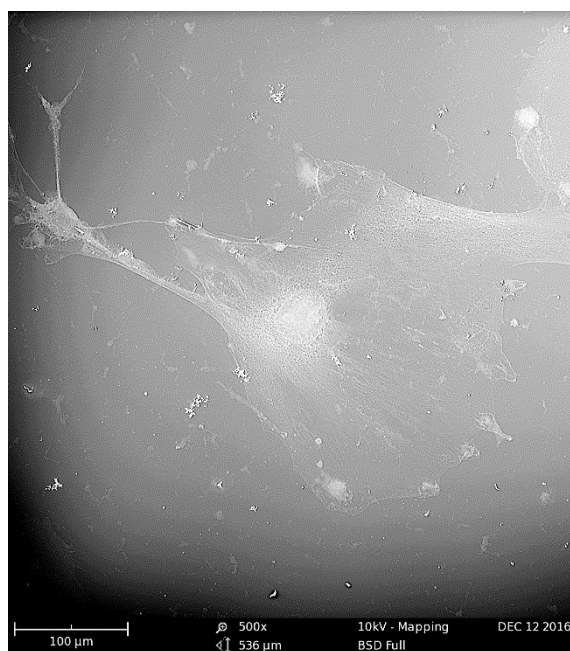


Obrázek 16 Mikrofotografie MSC (povrch 5) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

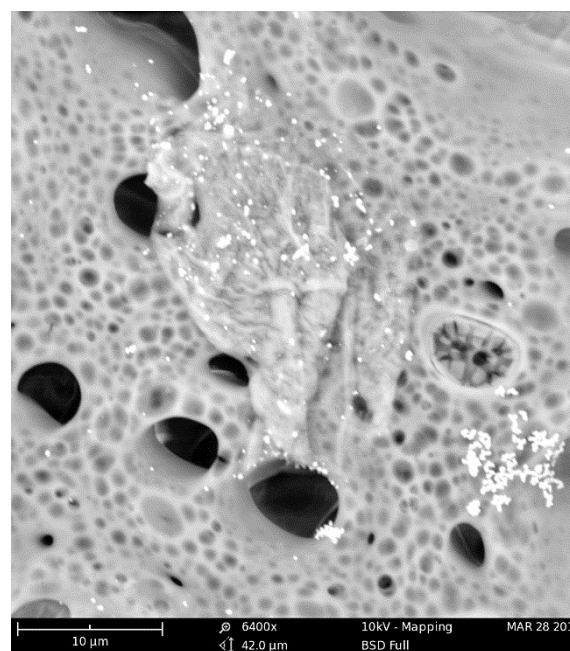


Obrázek 17 Mikrofotografie MSC (povrch 6) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

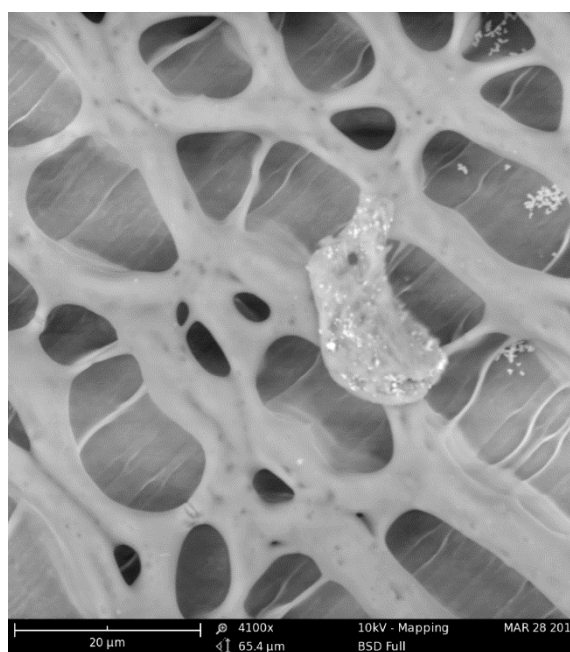
Mikrofotografie pořízené pro povrch 7 v této práci zveřejněny nejsou, jelikož dosahovaly velmi špatné kvality. Z toho důvodu bylo zrealizováno focení pomocí skenovacího elektrického mikroskopu. Na obrázku 18 vidíme pořízené snímky pro A) referenci, B) povrch 5 a C) povrch 7. Vzhled buněk kultivovaných na referenci je na snímku ze SEM shodný se snímek pořízeným pomocí mikroskopu fluorescenčního, buňka zaujímá plošný tvar. Je však třeba konstatovat, že postup fixace výrazně ovlivňuje vzhled buněk. Na snímku C) pak vidíme MSC rostoucí na povrchu 7 a je zde i dobře zobrazena topografie povrchu s velkými póry.



A)



B)



C)

Obrázek 18 Mikrofotografie MSC pořízené pomocí elektronového mikroskopu.

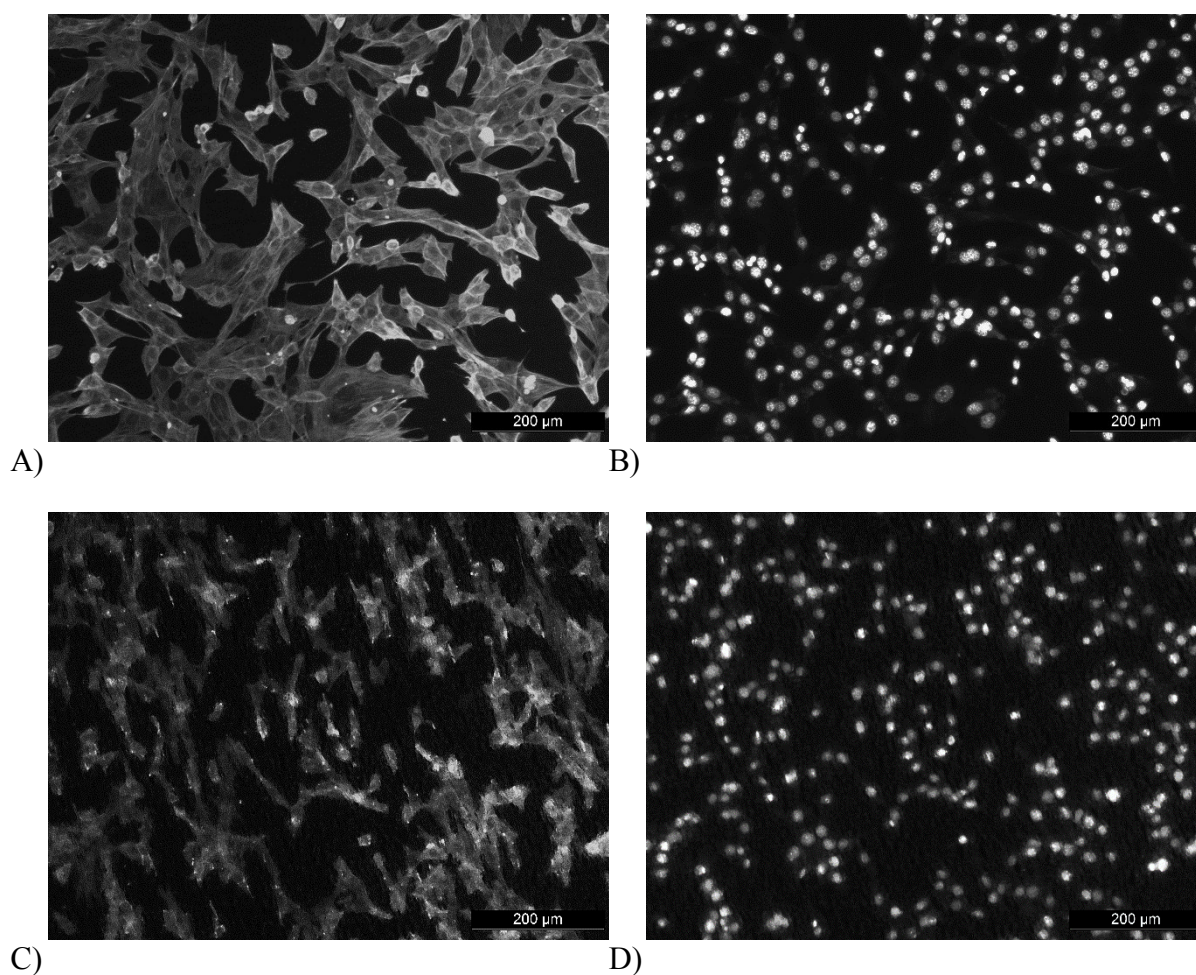
A) Reference, B) Povrch 5, C) Povrch 7.

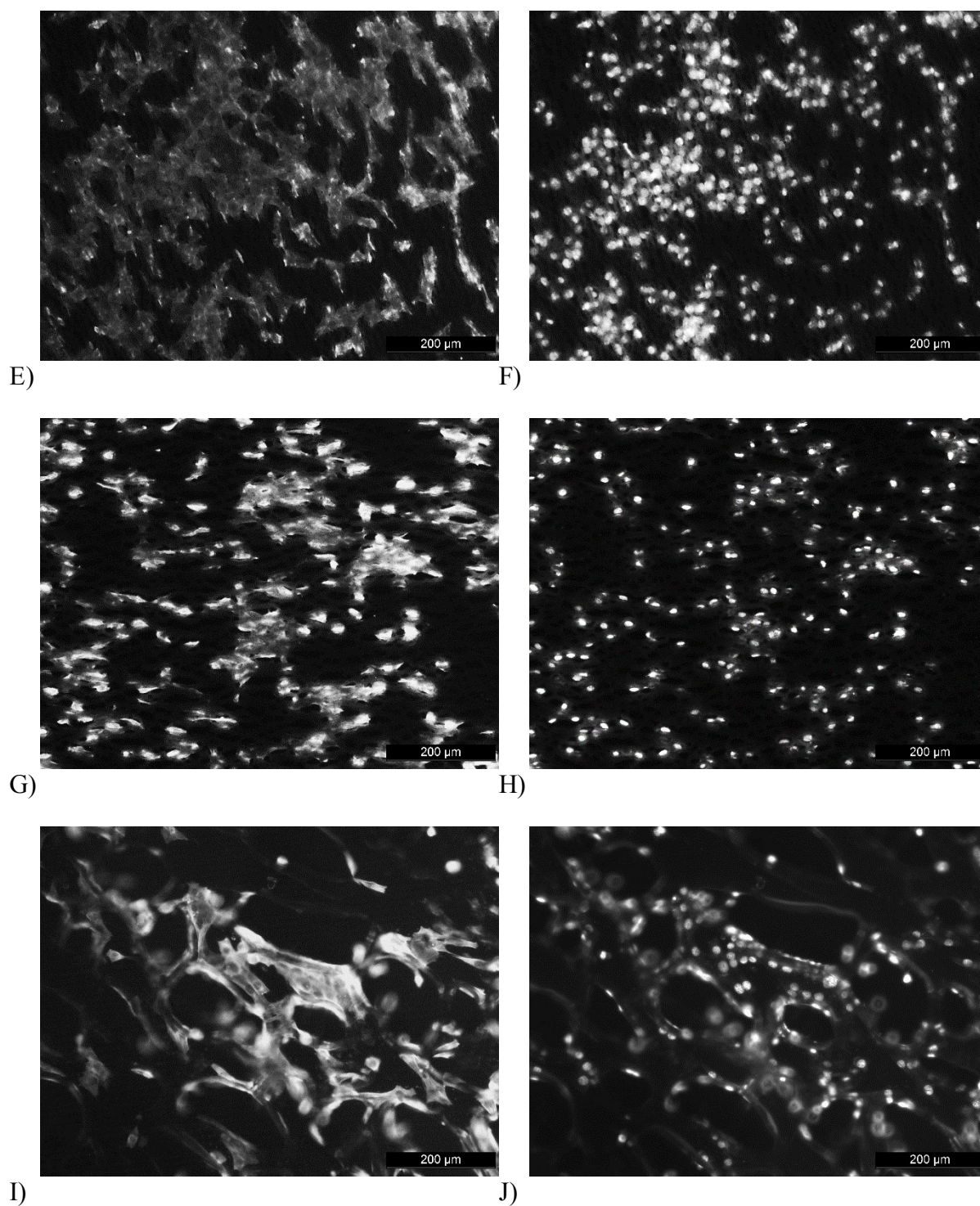
7.2 Vyhodnocení vlivu modifikovaných povrchů na proliferaci buněčné linie NIH/3T3

Na modifikovaných površích Petriho misek byla také sledována proliferace buněčné linie NIH/3T3. Fibroblasty jsou již diferencované buňky a zaujímají nejčastěji hvězdicový tvar. Vzhledem k tomu nebyla změna morfologie na površích očekávána. Na obrázku 19 jsou zobrazeny snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem pro referenci a všechny testované povrchy. Na všech snímcích si můžeme všimnout podobného množství buněk, žádný z povrchů tedy nepodporoval či inhiboval růst této buněčné linie. Morfologie buněk se nicméně lišila.

Aktinová vlákna

Jádra buněk



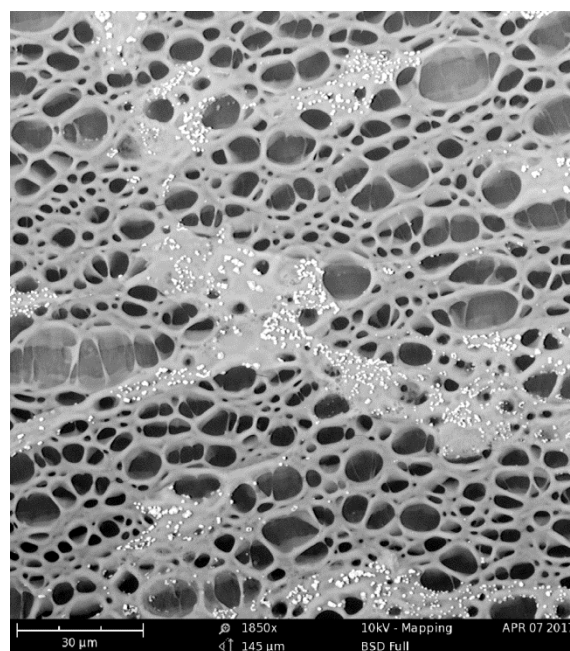


Obrázek 19 Mikrofotografie NIH/3T3 pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. A), B) Reference; C), D) Povrch 4; E), F) Povrch 5; G), H) Povrch 6; I), J) Povrch 7. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

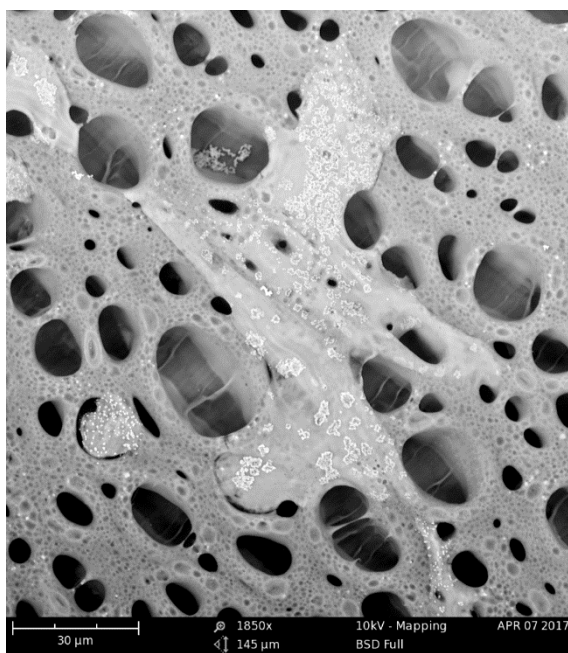
Na obrázku 20 jsou zobrazeny snímky pořízené elektronovým mikroskopem pro linii fibroblastů. Snímky byly pořízeny pro A) referenci, B) povrch 4, C) povrch 5, D) povrch 6 a E) povrch 7. Na mikrofotografii C) a D) si můžeme povšimnout, jak buňky prorůstají i skrz póry a neproliferují pouze na povrchu substrátu. Na snímku E) je pak vidět i růst uvnitř pórů.



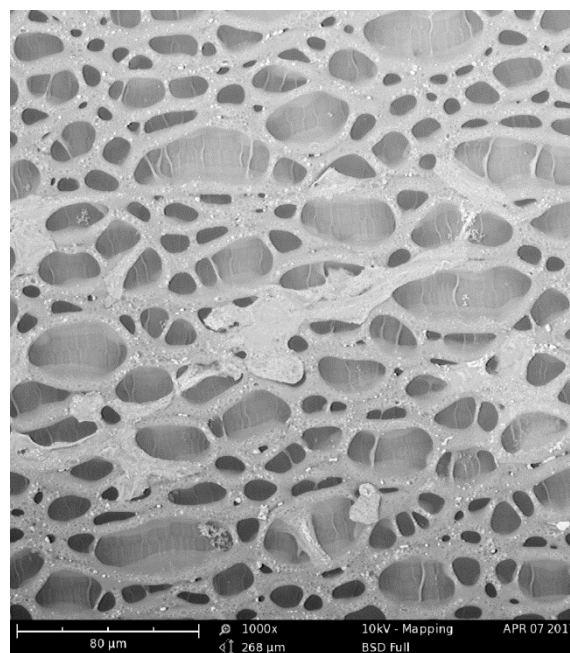
A)



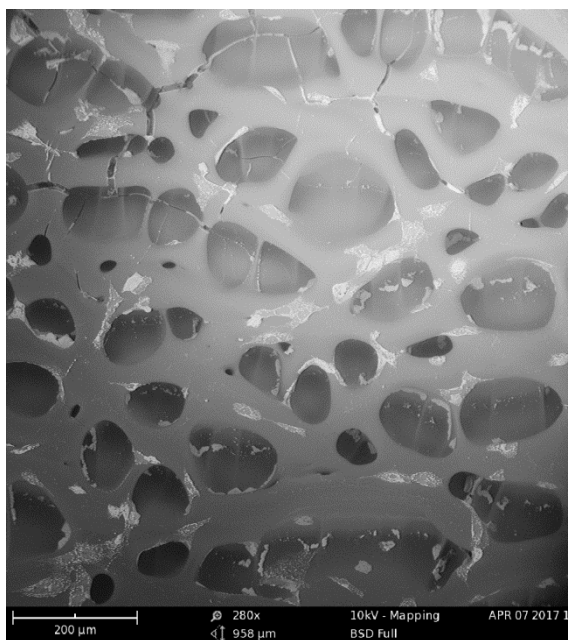
B)



C)



D)



E)

Obrázek 20 Mikrofotografie NIH/3T3 pořízené pomocí elektronového mikroskopu. A) Reference, B) Povrch 4, C) Povrch 5, D) Povrch 6, E) Povrch 7.

8 DISKUZE

Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, mohou obnovovat samy sebe nebo mohou diferencovat na jiný typ buněk. Díky těmto vlastnostem se přirozeně podílí na regeneraci tkání v organismu. To je hlavní důvod, proč se jim v poslední době věnuje tolik pozornosti. Pomocí kmenových buněk by se mohly v budoucnu léčit či minimálně zmírnit příznaky řady nemocí. Pro výzkum jsou často používané kmenové buňky získané z dospělých jedinců, například mezenchymální kmenové buňky, vzhledem k tomu, že tím odpadá řada etických otázek týkajících se embryonálních kmenových buněk. Mezenchymální kmenové buňky mohou být získány jednoduše punkcí kostní dřeně z lopatky nebo kyčelní kosti či odběrem tukové tkáně pomocí liposukce. Mezenchymální kmenové buňky jsou schopny diferencovat v různé buněčné typy jako jsou např. osteoblasty, chondrocyty či adipocyty. Pro základní i aplikovaný výzkum je velmi důležité buňkám nastavit co nejvhodnější podmínky v *in vitro* experimentech, v nejlepším případě podmínky připomínající jejich přirozené prostředí. V dospělosti žijí kmenové buňky v mikroprostředí nazývaném niche kmenových buněk, které řídí jejich osud. Vlastnosti extracelulární matrix tohoto mikroprostředí a to jak biochemické, tak geometrické a mechanické, ovlivňují osud kmenových buněk (např. diferenciaci a dělení).

V této práci byl testován vliv geometrických vlastností. Mezenchymální buňky měly být diferencovány do adipogenní, osteogenní a chondrogenní linie pomocí standartních protokolů pro jejich diferenciaci a současně zjišťováno, zda dojde k ovlivnění diferenciaci i pomocí povrchových vlastností (především topografií) kultivačního substrátu. Z důvodu infekce mezenchymálních kmenových buněk musel být experiment předčasně ukončen a byl vyhodnocován pouze vliv topografie na morfologii buněk. To, že topografie může sloužit jako regulátor diferenciaci, bylo již dokázáno několika výzkumy, z nichž jsou některé zveřejněny i v teoretické části práce, konkrétně kapitola 3.1.2.1 „Topografie povrchu jako regulátor chování kmenových buněk“. Zde bylo zmíněno několik studií, jako například studie Cheng et al., 2013, která zkoumala osteogenní diferenciaci a bylo zjištěno, že buňky lépe proliferují na vláknitém povrchu než na plochém. Testovány byly lidské mezenchymální kmenové buňky. Další již zmíněnou studií byla od skupiny vědců Ahn et al., zde byl testován vliv hustoty nanopilar. Tvary buněk byly více zaoblené v případě povrchů s vyšší hustotou nanopilar a naopak při nižší hustotě zaujímaly buňky větší plochu. V případě zaoblených buněk probíhala diferenciaci do adipogenní linie zatímco v případě buněk zaujímající větší plochu osteogenní linie. V této diplomové práci byly konkrétně

testovány povrchy s odlišnou velikostí pórů. Na pořízených mikrosnímcích pro jednotlivé povrchové modifikace můžeme sledovat odlišnou morfologii buněk. Buňky zaujímaly na površích s menšími póry spíše plošný a oválný tvar, se zvětšující se velikostí pórů pak docházelo k jejich protahování. Jedním z projevu diferenciaci je změna tvaru buněk a mohly bychom předpokládat, že i v tomto případě tomu tak bude. Dalo by se tedy říci, že povrchy s menšími póry indukovali diferenciaci buněk v adipocyty, u povrchů s póry většími by pak mohlo docházet k indukci osteoblastů a chondrocytů. Vzhledem k tomu ale že byl experiment ukončen ještě před specifickým barvením buněk, které mělo sloužit k identifikaci daných buněčných linií, jsou výsledky pouze prvotní a bude nutné experiment provést znovu. Xu et al., 2016 testovali také vliv pórovitých struktur na MSC ale na upraveném titanovém povrchu. Buňky na površích kultivovali v přítomnosti normálního média a v přítomnosti osteogenního média. Experimentální výsledky ukázaly, že topografie dramaticky podporuje adhezi MSC pěstovaných na povrchu, ale tvar, morfologie a šíření buněk nebyly významně ovlivněny. Tyto výsledky se neshodují s výsledky této práce. Jedním z důvodů proč tomu tak je, může být materiálová odlišnost substrátů. Další studie zabývající se vlivem pórovitosti na diferenciaci byla zveřejněna v práci Oh et al., 2010. Testovali lešení připravené z polykaprolaktonu (PCL) s velikostí pórů od 90 do 400 μm . Vliv velikosti pórů byl aplikován na diferenciaci tukových kmenových buněk na chondrogenní diferenciaci. Jako nejpříznivější prostředí pro chondrogenezi bylo vyhodnoceno lešení s velikostí pórů 370-400 μm . Porézní scaffold může být připraven také z materiálu, který je organismu vlastní. Choi et al., 2010 připravili lešení z lidských tukových buněk. Lešení z lidské tukové tkáně obsahovalo složky extracelulární matrix včetně kolagenu a bylo vyrobeno v různých makroskopických tvarech s otevřenou pórovou mikrostrukturou a vysokým stupněm vzájemného propojení. Testované lešení podporovalo proliferaci tukových kmenových buněk a mohlo by být velkým příslibem pro mnoho klinických aplikací, zejména u pacientů vyžadujících regeneraci měkkých tkání.

Dále byl v praktické části vyhodnocen vliv modifikovaných povrchů na proliferaci buněčné linie NIH/3T3. Na všech snímcích (viz. obrázek 19) si můžeme všimnout podobného množství buněk, žádný z povrchů tedy nepodporoval či inhiboval růst této buněčné linie. Fibroblasty jsou již diferencované buňky, proto na vnější podmínky nereagují tak citlivě jako buňky kmenové. Výrazná změna morfologie nebyla tedy očekávána, nicméně určitá odlišnost byla zaznamenána. Na mikrofotografiích pořízených pomocí elektronového mikroskopu (obrázek 20) pak byl zaznamenán růst buněk skrz póry.

Geometrické vlastnosti substrátu bezpochyby ovlivňují diferenciaci kmenových buněk, nicméně při jejich pěstování *in vitro* je třeba pochopit i další souvislosti jako jsou mechanické a biochemické vlastnosti. Jen tak mohou být vytvořeny co nejpřirozenější podmínky pro kultivaci. Schopnost řídit diferenciaci kmenových buněk je v tkáňovém inženýrství velmi důležitá při vytváření umělých tkání, vzhledem k tomu že jsou odlišné tkáně tvořeny různým typem buněk. Využití kmenových buněk pro léčbu je často zatím jen na výzkumné úrovni, proto je potřeba se tímto tématem nadále zabývat a získávat nové poznatky v možnostech řízení osudu buněk.

ZÁVĚR

Tkáňové inženýrství je obor, který na základě svých obecných principů vytváří přírodní či syntetické substráty a scaffoldy, které jsou funkčně a strukturálně podobné tkáni, která má být nahrazena. Mezi nejčastěji využívané buňky v tomto oboru se řadí buňky kmenové, a to díky jejich schopnosti samoobnovy a diferenciaci na jiný typ buněk. Kmenové buňky žijí u dospělých jedinců v mikroprostředí nazývaném niche kmenových buněk a pro kultivaci in vitro je důležité jeho umělé vytvoření. Proto byla teoretická část předložené diplomové práce věnována převážně vlastnostem extracelulární matrix niche kmenových buněk a to konkrétně vlastnostem biochemickým, geometrickým a mechanickým.

Cílem praktické části bylo vyhodnocení vlivu topografie povrchu na diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk. Testováno bylo 7 upravených polystyrenových povrchů, které byly připraveny na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Jednotlivé povrchy se lišily velikostí pórů. Mezenchymální buňky byly kultivovány v médiu indukujícím adipogenní, osteogenní či chondrogenní prostředí. Z důvodu infekce však musel být experiment předčasně ukončen a byl vyhodnocen pouze vliv topografie na morfologii buněk. Výsledky byly vyhodnoceny na základě mikrofotografií pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu s fázovým kontrastem a skenovacího elektronového mikroskopu. Pořízené snímky prokázaly vliv povrchových vlastností na morfologii. Buňky zaujímaly na površích s menšími póry spíše plošný a oválný tvar, při zvětšující se velikosti pórů pak docházelo k jejich protahování. Výsledky byly více komentovány v diskuzi předložené práce. Dále byl vyhodnocen vliv topografie povrchu na proliferaci buněčné linie NIH/3T3. Vyhodnocení bylo provedeno stejným způsobem jako v případě mezenchymálních kmenových buněk. Významný vliv na růst této buněčné linie nebyl zaznamenán. Vzhledem k tomu, že fibroblasty jsou již diferencované buňky, nereagují na vnější podmínky tak citlivě jako buňky kmenové. Vélky rozdíl v morfologii buněk tedy nebyl očekáván.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AHN, Eun Hyun et al., 2014. Spatial control of adult stem cell fate using nanotopographic cues. *Biomaterials*. **35**(8), pp. 2401-2410. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.037.
- ANGELE, P. et al., 2003. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*. **21**(3), pp. 451-457. DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00230-9
- BADYLAK, Stephen F., 2002. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell*. **13**(5), pp. 377-383. DOI: 10.1016/S1084952102000940.
- BADYLAK, Stephen et al., 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. **5**(1), pp. 1-13. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.09.013.
- BATTISTA, Sabrina et al., 2005. The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation: Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. Chichester, UK: John Wiley, **26**(31), pp. 6194-6207. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.003.
- BOBIS, Sylwia et al., 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications, *Folia histochemica et cytobiologica*. 44, pp. 215-230.
- BOONEN, K. J. M. et al., 2009. Essential environmental cues from the satellite cell niche: optimizing proliferation and differentiation. *AJP: Cell Physiology*. **296**(6), pp. C1338-C1345. DOI: 10.1152/ajpcell.00015.2009
- BONEWALD, L. F. et al., 2003-5-1. Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation. *Calcified Tissue International*. **72**(5), pp. 537-547. DOI: 10.1007/s00223-002-1057-y.
- BUSTIN, Stephen A., 2005. Real-Time PCR. University of London, London, U.K., pp. 1117-1125. DOI: 10.1081/E-EDGP 120020684.
- CAIS, Jaromír, 2015. *Elektronová mikroskopie. Metalografie Metodická příručka*. Praha: Centrum pro studium vysokého školství. ISBN 978-80-86302-67-6.
- CellMaGell, 2013. Cellmagell. Dostupné z: <http://cellmagel.cz/cs/uvodni-stranka/moznosti-lecby-kmenovymi-bunkami>

CHANG, Jui-Chih et al., 2013. Cell orientation and regulation of cell–cell communication in human mesenchymal stem cells on different patterns of electrospun fibers. *Biomedical Materials*. **8**(5), 055002-. DOI: 10.1088/1748-6041/8/5/055002.

CHEN, C. W. et al., 2005. Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells: A dynamic view. *Journal of Orthopaedic Research*. **23**(2), pp. 446–453. DOI: 10.1016/j.orthres.2004.09.002.

CHENG, Yixing et al., 2014. Collagen Functionalized Bioactive Nanofiber Matrices for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **10**(2), pp. 287–298. DOI: 10.1166/jbn.2014.1753.

CHRISTOPHERSON, Gregory et al., 2009. The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*. **30**(4), pp. 556–564. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.004.

COLTER, D. C. et al., 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**(14), pp. 7841–7845. DOI: 10.1073/pnas.141221698.

ČEDÍKOVÁ, Miroslava et al., 2012. On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciacních postupů. Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

DALBY, Matthew J. et al., 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*. **6**(12), pp. 997–1003. DOI: 10.1038/nmat2013.

DAVIES, Jamie A., 2001. Extracellular Matrix. *ELS*. Chichester, UK: John Wiley. DOI: 10.1038/npg.els.0001274.

Diferenciace a epigenetika, In: *Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*. České Budějovice. Dostupné z: <http://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/diferenciace-a-epigenetika.html>

DJOUAD, Farida et al., 2007. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells*. **25**(8), pp. 2025–2032. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0548.

DOUBEK, Michael. 2008 Kmenové buňky a onkologie. *Onkologická péče*. (2), pp. 18–21.

- DVORAKOVA, Jana et al., 2008. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biology International*. **32**(9), pp. 1116-1125. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.04.024.
- ENGLER, Adam J. et al., 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. **126**(4), pp. 677-689. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- EYCKMANS, J., G. L. LIN a C. S. CHEN, 2012. Adhesive and mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation in human bone marrow and periosteum-derived progenitor cells. *Biology Open*. **1**(11), pp. 1058-1068. DOI: 10.1242/bio.20122162.
- Functional heart muscle regenerated in decellularized human hearts, 2016. In: *Massachusetts General Hospital*. Dostupné z: <http://www.massgeneral.org/News/pressrelease.aspx?id=1910>
- GALLI, R., 2003. Neural Stem Cells: An Overview. *Circulation Research*. **92**(6), pp. 598-608. DOI: 10.1161/01.RES.0000065580.02404.F4.
- GERECHT, Sharon et al., 2007. The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. *Biomaterials*. **28**(28), pp. 4068-4077. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.027.
- GREGORY, Carl A et al., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*. **329**(1), pp. 77-84. DOI: 10.1016/j.ab.2004.02.002.
- GHILZON R. et al., 1999. Stromal mesenchymal progenitor cells. *Leukemia Lymphoma* **32**, pp. 211-221.
- GINZINGER, David G, 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology*. **30**(6), pp. 503-512. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00806-8.
- CHOI, Ji Suk et al., 2010. Fabrication of Porous Extracellular Matrix Scaffolds from Human Adipose Tissue. *Tissue Engineering Part C: Methods*. **16**(3), pp. 387-396. DOI: 10.1089/ten.tec.2009.0276.
- GHOSH, Debabrata et al., 2016. Ethical issues in biomedical use of human embryonic stem cells (hESCs). *Journal of Reproductive Health and Medicine*. **2**, pp. 37-47. DOI: 10.1016/j.jrh.2016.09.002

GILBERT, P. M. et al., 2010. Substrate Elasticity Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Self-Renewal in Culture. *Science*. **329**(5995), pp. 1078-1081. DOI: 10.1126/science.1191035.

GUILAK, Farshid et al., 2009. Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix: anatomy and function of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. **5**(1), pp. 17-26. DOI: 10.1016/j.stem.2009.06.016.

GUNSILIUS, E. et al., 2001. Hematopoietic stem cells. *Biomedicine*. **55**(4), pp. 186-194. DOI: 10.1016/S0753-3322(01)00051-8.

HACKETT, Joanne M. et al., 2010. Electrospun Biocomposite Polycaprolactone/Collagen Tubes as Scaffolds for Neural Stem Cell Differentiation. *Materials*. **3**(6), pp. 3714-3728. DOI: 10.3390/ma3063714.

HUANG, C-Y C., 2004. Effects of Cyclic Compressive Loading on Chondrogenesis of Rabbit Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. **22**(3), pp. 313-323. DOI: 10.1634/stemcells.22-3-313.

JACOBS, Christopher R et al., 2010. Osteocyte Mechanobiology and Pericellular Mechanics. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **12**(1), pp. 369-400. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105302.

JHALA, Dhvani a Rajesh VASITA, 2015. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polymer Reviews*. **55**(4), pp. 561-595. DOI: 10.1080/15583724.2015.1040552.

JOHNSON, Dexter, 2011. Nanopillars on Surface of Thin-Film Silicon Could Lead to Better Solar Cells. In: *IEEE SPECTRUM*. Dostupné z: <http://spectrum.ieee.org/nanoclast/semiconductors/nanotechnology/nanopillars-on-surface-of-thinfilm-silicon-could-lead-to-better-solar-cells>

JONES, D. Leanne et al., 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **9**(1), pp. 11-21. DOI: 10.1038/nrm2319. ISSN 1471-0072.

KADEREIT, Suzanne a Gerald UDOLPH, 2011 Umbilical cord blood: a future for regenerative medicine. Singapore: World Scientific. ISBN 978-981-2833-297.

KAWANO, Takahito et al., 2014. Honeycomb-shaped surface topography induces differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs): uniform porous polymer scaffolds

prepared by the breath figure technique. *Biomater. Sci.* **2**(1), pp. 52-56. DOI: 10.1039/C3BM60195A.

KHATIWALA, Chirag B. et al., 2007. The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation. *Journal of Cellular Physiology.* **211**(3), pp. 661-672. DOI: 10.1002/jcp.20974.

KIM, K.M. a G.R.D EVANS, 2005. Tissue Engineering: The Future of Stem Cells. Topics in Tissue Engineering. 2.

KING, Nancy MP a Jacob PERRIN, 2014. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Research.* **5**(4), p. 85-. DOI: 10.1186/scrt474.

KLOXIN, April M. et al., 2009. Photodegradable Hydrogels for Dynamic Tuning of Physical and Chemical Properties. *Science.* **324**(5923), pp. 59-63. DOI: 10.1126/science.1169494.

KRUSZELNICKI, Karl, 2006. Mouse with human ear. In: *ABC Science*. Dostupné z: <http://www.abc.net.au/science/articles/2006/06/02/1644154.htm>

KUROSAWA, Hiroshi, 2007. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **103**(5), pp. 389-398. DOI: 10.1263/jbb.103.389.

Lee MS. et al., 2004. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med* **5**, pp. 82-98.

LEVENSTEIN, Mark E. et al., 2006. Basic Fibroblast Growth Factor Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells.* **24**(3), pp. 568-574. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0247

LI, Hang et al., 2012. 3D Differentiation of Neural Stem Cells in Macroporous Photopolymerizable Hydrogel Scaffolds. *PLoS ONE.* **7**(11), e48824-. DOI: 10.1371/journal.pone.0048824.

LO, Bernard a Lindsay PARHAM, 2009. Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocrine Reviews.* **30**(3), pp. 204-213. DOI: 10.1210/er.2008-003.

LODISH, Harvey F., 2008. *Molecular cell biology.* 6th ed. New York: W.H. Freeman. ISBN 978-0-7167-7601-7.

- MA, Dengke K et al., 2009. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Research*. **19**(6), pp. 672-682. DOI: 10.1038/cr.2009.56.
- MACHADO, Carolina B. a Roland FLECK, 2010. *Embryonic Stem Cells Morphology: Cryo-SEM and Light Microscopy Evaluation of STEM Cells*.
- MAGDELDIN, Sameh, 2012. Gel Electrophoresis – Principles and Basic. 1. Croatia: In-Tech. ISBN 978-953-51-0458-2.
- MARTÍNEZ, E et al., 2009. Stem cell differentiation by functionalized micro- and nano-structured surfaces. *Nanomedicine*. **4**(1), pp. 65-82. DOI: 10.2217/17435889.4.1.65
- MedTech Europe: from diagnosis to cure. Dostupné z: <http://www.medtecheurope.org/node/10>
- Morrison, S. J aj. Kimble, J., 2006“Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer”, *Nature*, 441, pp. 1068–1074.
- MURNAGHAN, Ian, 2015. Classifying Stem Cells. In: *Explore Stem Cells*. Dostupné z: <http://www.explorestemcells.co.uk/ClassifyingStemCellsCategory.html>
- MURPHY, Ciara M. et al., 2012. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen–glycosaminoglycan scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **11**, pp. 53-62. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.11.009.
- Nature Biotechnology*, 2000. **18**(Supp), pp, 56-58. DOI: 10.1038/80103.
- OH, S. et al., 2009. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**(7), pp. 2130-2135. DOI: 10.1073/pnas.0813200106.
- OH, Se Heang et al., 2010. Investigation of Pore Size Effect on Chondrogenic Differentiation of Adipose Stem Cells Using a Pore Size Gradient Scaffold. *Biomacromolecules*. **11**(8), pp. 1948-1955. DOI: 10.1021/bm100199m.
- OHNUKI, Yoshitsugu a Hiroshi KUROSAWA, 2013. Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: Optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **115**(5), pp. 571-574. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.016.

- OLSON, Jennifer L et al., 2011. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Medical Journal*. **47**(1), 1-. DOI: 10.4068/cmj.2011.47.1.1.
- OTT, Harald C et al., 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. **14**(2), pp. 213-221. DOI: 10.1038/nm1684. ISSN 1078-8956.
- PEI, M et al., 2011. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *European Cells and Materials*. **22**, pp. 333-343. DOI: 10.22203/eCM.v022a25
- PONCE, M. L. et al., 1999. Identification of Endothelial Cell Binding Sites on the Laminin 1 Chain. *Circulation Research*. **84**(6), pp. 688-694. DOI: 10.1161/01.RES.84.6.688.
- Prockop DJ et al., 2001. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 3, pp. 393–396.
- RAIMONDO, Stefania et al., 2006. *Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells*. pp. 3-12.
- ROZARIO, Tania a Douglas W. DESIMONE, 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology*. Chichester, UK: John Wiley, **341**(1), pp. 126-140. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
- Real-time PCR handbook, 2012. Dostupné z: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- SAHA, Krishanu et al., 2008. Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior. *Biophysical Journal*. **95**(9), pp. 4426-4438. DOI: 10.1529/biophysj.108.132217.
- SALASZNYK, Roman M. et al., 2004. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: A dynamic view. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2004**(1), pp. 24-34. DOI: 10.1155/S1110724304306017.
- Sigma-Aldrich: Product Information, Lipid (Oil Red O) Staining Kit, 2014. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak194bul.pdf>

SINGH, Purva et al., 2010. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **26**(1), pp. 397-419. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104020

SINGH, P. et al., 2012. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *Journal of Cell Science*. **125**(16), pp. 3703-3712. DOI: 10.1242/jcs.095786.

TSIMBOURI, Penelope et al., 2014. Nanotopographical Effects on Mesenchymal Stem Cell Morphology and Phenotype. *Journal of Cellular Biochemistry*. **115**(2), pp. 380-390. DOI: 10.1002/jcb.24673.

Types of Adult Stem Cells, 2017. In: *Stem cell institute*. Dostupné z: <https://www.cellmedicine.com/types-of-stem-cells/>

What is PCR (polymerase chain reaction)?, 2016. In: *Yourgenome*. Dostupné z: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>

What is gel electrophoresis?, 2016. In: *Yourgenome*. Dostupné z: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>

WOBUS, Anna M., 2001. Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine*. **22**(3), pp. 149-164. DOI: 10.1016/S0098-2997(01)00006-1.

WRZECIONKO, Erik et al., 2017. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *ACS Applied Materials*. **9**(7), pp. 6472-6481. DOI: 10.1021/acsami.6b15774.

Wu GD et al., 2003. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*. **75**, pp. 679– 685.

WU, Yuqiong et al., 2013. Effect of mechanical stretch on the proliferation and differentiation of BMSCs from ovariectomized rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **382**(1-2), pp. 273-282. DOI: 10.1007/s11010-013-1744-1.

XU, Kui et al., 2016. Nanosheet-pore topographical titanium substrates: a biophysical regulator of the fate of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B*. **4**(10), pp. 1797-1810. DOI: 10.1039/C5TB02391B.

YANG, Yan et al., 1999. *Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape*. Great Britain: The Company of Biologists Limited, pp. 3027-3033.

YOUREK, Gregory et al., 2010. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*. **5**(5), pp. 713-724. DOI: 10.2217/rme.10.60.

YU, Haiyang et al., 2010. Mechanical behavior of human mesenchymal stem cells during adipogenic and osteogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **393**(1), pp. 150-155. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.107.

Zákon č. 296/2008 Sb.: Zákon o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (zákon o lidských tkáních a buňkách), 2008. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-296>

ZOHAR, RonA.G et al., 1997. Characterization of Stromal Progenitor Cells Enriched by Flow Cytometry. *Blood*, **90**(9)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ASC	Adultní kmenové buňky
ALP	Alkalická fosfatáza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EB	Embryoid bodies
ECM	Extracelulární matrix
ESC	Embryonální kmenové buňky
FGR	Fibroblastový růstový faktor
GAG	Glykosaminoglykany
HSC	Hematopoetické kmenové buňky
MSC	Mezenchymální kmenové buňky
NGF	Nervový růstový faktor
NIH/3T3	Linie myších fibroblastů
NSC	Nervové kmenové buňky
qRT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
PCL	Polykaprolanton
PES	Polyethersulfon
PMMA	Polymethylmetakrylát
PUR	Polyuretan
SC	Kmenové buňky
SCN	Niche kmenových buněk

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Bizarní snímek myši s lidským uchem (Vacanti, 2006)	13
Obrázek 2 Fotky MSC vytvořené pomocí elektronového mikroskopu: N - nepravidelné jádro, šipky ukazují na výskyt pseudopodií na obvodu (Raimondo et al., 2006).....	19
Obrázek 3 Struktura niche kmenových buněk. Upraveno dle Jhala a Vasita, 2015.....	21
Obrázek 4 Dělení kmenových buněk v SCN: a) symetrické b) asymetrické; červené a žluté tečky - růstové faktory (Jhala a Vasita, 2015).....	22
Obrázek 5 Nanopilary (Johnson, 2011).	26
Obrázek 6 Snímky aktinových vláken buněk pořízené fluorescenčním mikroskopem pro jednotlivé vzdálenosti nanopilar. Graf závislosti produkce F-actinu pro jednotlivé typy substrátu. Upraveno dle Ahn et al., 2013.	27
Obrázek 7 (A) Hodnoty elasticit jednotlivých tkání. (B) Zobrazení morfologie buněk na jednotlivých substrátech s odlišnou elasticitou po 4, 24 a 96 hodinové kultivaci. Upraveno dle Engler et al., 2006.	29
Obrázek 8 Schéma bioreaktoru pro mechanické zatěžování. Upraveno dle Huang et al., 2004.....	33
Obrázek 9 Graf závislosti intenzity fluorescence na počtu cyklů (Bustin, 2005).	36
Obrázek 10 Obrázek znázorňující DNA fragmenty oddělené pomocí gelové ELFO. Délka fragmentů DNA se porovná s markerem obsahujícím fragmenty známé délky. (What is gel electrophoresis?, 2016).	37
Obrázek 11 Mikrofotografie MSC pěstovaných na referenčních miskách pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.....	45
Obrázek 12 Mikrofotografie MSC (povrch 1) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.	46
Obrázek 13 Mikrofotografie MSC (povrch 2) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.	47
Obrázek 14 Mikrofotografie MSC (povrch 3) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. A), C) zachycují aktinová vlákna; B), D) zobrazují jádra buněk. Zvětšení mikrofotografií je 100x.....	48
Obrázek 15 Mikrofotografie MSC (povrch 4) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.	49

Obrázek 16 Mikrofotografie MSC (povrch 5) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.	50
Obrázek 17 Mikrofotografie MSC (povrch 6) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení mikrofotografií je 100x.	51
Obrázek 18 Mikrofotografie MSC pořízené pomocí elektronového mikroskopu. A) Reference, B) Povrch 5, C) Povrch 7.	52
Obrázek 19 Mikrofotografie NIH/3T3 pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu. A), B) Reference; C), D) Povrch 4; E), F) Povrch 5; G), H) Povrch 6; I), J) Povrch 7. Zvětšení mikrofotografií je 100x.	54
Obrázek 20 Mikrofotografie NIH/3T3 pořízené pomocí elektronového mikroskopu. A) Reference, B) Povrch 4, C) Povrch 5, D) Povrch 6, E) Povrch 7.	56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Shrnutí vlivu tuhosti substrátu na kmenové buňky, 31