

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Adéla Chmelíková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Adéla Chmelíková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**TESTOVÁNÍ BIODROPATIBILITY 3D MATERIÁLU PRO
KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Jana Dvořáková, Ph.D.

PLZEŇ 2024

POZOR! Místo tohoto listu bude vloženo **zadání bakalářské práce** s razítkem.

POZOR! Místo tohoto listu bude vloženo **zadání bakalářské práce** s razítkem.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2024

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Chmelíková Adéla

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Testování biokompatibility 3D materiálu pro kostní tkáňové inženýrství

Vedoucí práce: Mgr. Jana Dvořáková, Ph.D.

Počet stran – číslované: 32

Počet stran – nečíslované: 18

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: kost, kostní tkáň, tkáňové inženýrství, skafold, CCK-8, laktátdehydrogenáza

Souhrn:

Tato bakalářská práce se věnuje analýze skafoldů v tkáňovém inženýrství, které by měly být použity jako kostní náhrada. Regenerace kostí po poškození vlivem úrazu nebo v souvislosti s onemocněním je celosvětově často řešeným lékařským problémem. Pro možnost náhrady chybějící kosti v případě, že nelze použít autologní tkáň, se testuje řada materiálů, které by měly přirozené prostředí kosti co nejlépe napodobovat.

Abstract

Surname and name: Chmelíková Adéla

Department: Department of paramedical science, medical diagnostics studies and public health

Title of thesis: Biocompatibility testing of 3D material for bone tissue engineering

Consultant: Mgr. Jana Dvořáková, Ph.D.

Number of pages – numbered: 32

Number of pages – unnumbered: 18

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 24

Keywords: bone, bone tissue, tissue engineering, scaffold, CCK-8, lactate dehydrogenase

Summary:

This bachelor thesis focuses on the analysis of scaffolds in tissue engineering to be used as bone substitutes. Bone regeneration after damage due to trauma or disease is a frequently addressed medical problem worldwide. A number of materials are being tested to replace missing bone when autologous tissue cannot be used, in order to imitate the natural environment of the bone as closely as possible.

Předmluva

V této práci jsem hodnotila biokompatibilitu sklokeramického skafoldu s buňkami MG-63 *in vitro*. Cílem práce bylo otestovat adhezi a proliferaci buněk na tomto materiálu a zároveň jeho cytotoxicitu.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Dvořákové, Ph.D. za přijetí, odborné vedení bakalářské práce, poskytnutí cenných rad se zpracováním, materiálních podkladů a za čas, který mi věnovala. Také děkuji doc. Ing. Tomáši Kovaříkovi, PhD., NTC ZČU v Plzni za poskytnutí sklokeramických kompozitních skafoldů pro testování. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1 KOST.....	16
1.1 Kostní tkáň.....	16
1.2 Stavba kostní tkáně.....	17
1.3 Kostní buňky	17
1.3.1 Osteoblasty	17
1.3.2 Osteocyty	18
1.3.3 Osteoklasty	19
1.4 Vznik a vývoj kostní tkáně	20
1.4.1 Desmogenní osifikace.....	20
1.4.2 Endochondrální osifikace	20
1.5 Přestavba a hojení kosti	21
2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	23
2.1 Kostní tkáňové inženýrství	23
2.1.1 Biomateriály	24
2.1.2 Historie tkáňového inženýrství.....	25
2.2 Buňky používané pro testování biokompatibility skafoldů.....	26
2.2.1 Lidské maligní buněčné linie.....	26
2.2.2 Lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSC)	28
2.2.3 Lidské osteoblasty	30
PRAKTICKÁ ČÁST	32
3 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	32
3.1 Hlavní cíl	32
3.2 Dílčí cíle	32
4 VÝZKUMNÉ OTÁZKY	32
5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	33
6 MATERIÁL A METODIKA	34
6.1 Skafoldy.....	34
6.2 Buněčná kultivace.....	34
6.3 Adheze a proliferace buněk	35

6.4	Cytotoxická aktivita materiálu	36
6.5	Barvení krystalovou violetí	36
6.6	Fluorescenční barvení.....	37
6.7	Statistická analýza	37
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	38
7.1	Adheze a proliferace buněk	38
7.2	Cytotoxicita materiálu	39
7.3	Barvení – krystalová violet’	40
7.4	Fluorescenční barvení.....	42
	DISKUZE	43
	ZÁVĚR.....	46
	SEZNAM LITERATURY.....	47

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Adheze a proliferace buněk MG-63 na testovaných skafoldech měřená kitem CCK-8	38
Graf 2: Cytotoxicita skafoldů testovaných kitem CyQUANT™LDH Cytotoxicity Assay	39

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stavba kosti	17
Obrázek 2: Buňky kostní tkáně	20
Obrázek 3: Přestavba kosti	22
Obrázek 4: Schéma kostního tkáňového inženýrství	24
Obrázek 5: Zdroje hMSC	29
Obrázek 6: Skafoldy T1, T2, T3.....	34
Obrázek 7: Adherující buňky MG-63 na kultivační lahvi	35
Obrázek 8: Buňky obarvené krystalovou violetí	41
Obrázek 9: Detail buněk obarvených krystalovou violetí na skafoldu T1	42
Obrázek 10: Buňky obarvené barvivem CellTracker™ Green SMFDA	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Osteosarkomové buňky nejčastěji používané pro testování biomateriálů.....	27
Tabulka 2: Mezenchymální buňky	29
Tabulka 3: Osteoblastické buňky	31

SEZNAM ZKRATEK

% – procenta

°C – stupně Celsia

3D – trojrozměrný

ALP – alkalická fosfatáza

ECM – extracelulární matrix

HA – kyselina hyaluronová

hMSC – lidské mezenchymální kmenové buňky

hOB – lidské osteoblasty

IL – interleukin

LDH – laktátdehydrogenáza

mg/ml – miligram na mililitr

mm – milimetr

mM – milimolární

nm – nanometr

PDT – doba zdvojnásobení populace

PTH – parathormon

TI – tkáňové inženýrství

TRAP – tartrát rezidentní kyselé fosfatázy

U/ml – jednotka na mililitr

wt% – hmotnostní procenta

μl – mikrolitr

μM – mikrometr

ÚVOD

Lidská kostra je pojivovou tkání, která tvoří oporu, chrání měkké orgány v lební dutině a dutině hrudní, umožňuje nám pohyb. Kost obsahuje kostní dřev, která je zodpovědná za krvetvorbu. Po celou dobu našeho života dochází k stálému procesu výstavby a odbourávání kosti, tímto si kost udržuje stálou funkčnost i ve stáří. V dnešní době se setkáváme s rostoucím počtem případů, kdy je potřeba léčit kostní tkáň z různých důvodů. Transplantace kostní dřevě je druhá nejčastější a je stále obtížnější najít správného dárce, aby nenastávaly potransplantační reakce.

Tkáňové inženýrství je rychle se vyvíjející vědní odvětví, které se zaměřuje na regeneraci kostní tkáň. Stále roste potřeba léčby kostních defektů, a proto představuje TI perspektivní přístup k vývoji a použití biologických materiálů. Získání vhodných skafoldů má zásadní význam a dopad na adhezi a proliferaci buněk k následné regeneraci tkáň.

Cílem této bakalářské práce je otestování nově vyvíjených 3D skafoldů určených pro kostní tkáňové inženýrství. Tyto skafoldy jsou navrženy pro poskytnutí podpory růstu kostních buněk a mohly by přispět k efektivní regeneraci kostní tkáň.

TEORETICKÁ ČÁST

1 KOST

1.1 Kostní tkáň

Kost je mineralizovaná pojivová tkáň, která je pevnou oporou těla, chrání životně důležité měkké orgány v lební dutině a hrudním koši. (3, 11, 13) Kost obklopuje celou kostní dřeň, která tvoří krevní buňky. (3) Vnitřní povrch kosti vystýlá endost, což je vazivová tkáň s osteogenními buňkami a vnější povrch okolo kostní dřene je pokryt periostem. (1, 3)

Kostní tkáň je tvořena třemi hlavními typy buněk a kalcifikovanou mezibuněčnou hmotou. Z chemického hlediska je tvořena 45 % minerálních látek, 30 % organické hmoty a 25 % vody. (2) V makrostruktuře odlišujeme dvě kosti, jako spongiózní a kompaktní kost. Spongiózní kost je složena z mnoha propojených drobných trámčů, které vytvářejí dutiny. (1)

Mezi buňky kostní tkáně se řadí osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Osteoblasty tvoří kostní matrix a dále dozrávají v osteocyty. Osteocyty jsou uzavřeny v mineralizované kostní matrix a osteoklasty plní funkci buňky odbourávající kost. (1) Celý náš život dochází ke stálé přestavbě kostní tkáně, kterou provádějí osteoklasty a osteoblasty, pokud je kostní tkáň zdravá a má schopnost přirozeně opravit její poranění. (11)

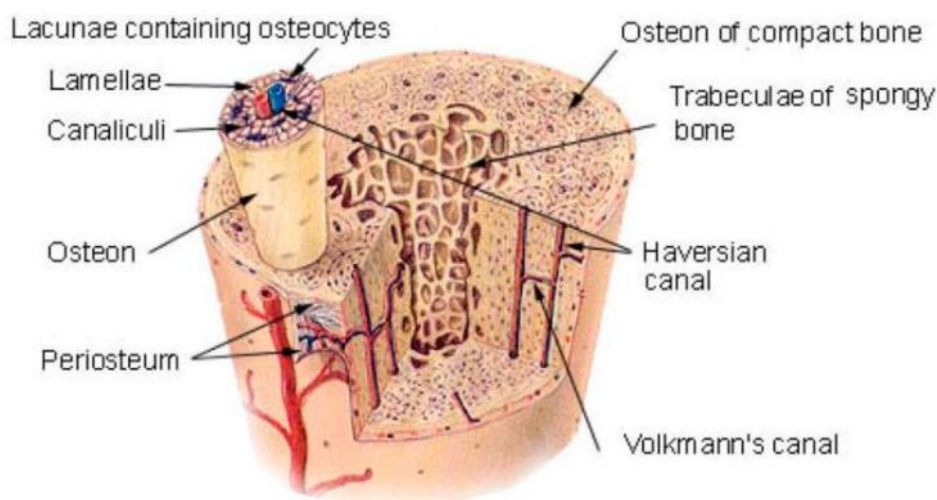
Kost je metabolicky aktivní tkáň, která podléhá neustálé přestavbě. To jí umožňuje zdokonalovat svou stavbu ve směru mechanické zátěže. Díky bohatému cévnímu zásobení a přítomnosti nediferencovaných buněk má kost vysokou schopnost hojení a regenerace. Za nejvýhodnějších podmínek je možné její zhojení a přestavba až do stavu téměř rovnocenného situaci před poškozením. (6)

Kostní tkáň je regulována řadou hormonů, které jsou rozhodující pro optimální růst skeletu a hustotu kostí. Hlavní hormonální regulátory procesu kostní remodelace zahrnují kalcitriol, parathormon (PTH), kalcitonin, estrogen a androgeny; glukokortikoidy, hormony štítné žlázy a růstový hormon také ovlivňují kostní remodelaci. (11) Její tvorba je buď desmogenní osifikací z vazivového podkladu nebo endochondrální osifikací z chrupavčitého podkladu. V obou procesech je primární nezralá kost brzy nahrazena kostí lamelózní, proces probíhá nejen v rostoucí fázi kosti, ale i během celého života. (1)

1.2 Stavba kostní tkáně

Kostra dospělého člověka se skládá z 80 % kompaktní kosti a 20 % spongiózní kosti, různé kosti v těle mají různý poměr těchto dvou částí. Kompaktní kost je hustá a pevná, obklopuje celý prostor kostní dřeně, zatímco spongiózní kost vytváří síť, kterou vyplňuje kostní dřeň. Oba typy kostí se skládají z osteonů. (21)

Kompaktní osteony nazýváme Haversovy systémy, jejich tvar je dlouhý rozvětvený válec. (3, 21) Stěny Haversových systémů jsou tvořeny 5–20 koncentrickými lamelami kolem Haversova kanálku. Haversovy kanálky jsou mezi sebou navzájem propojené příčnými Volkmannovými kanálky, které poskytují spojení s krevním oběhem. Spongiózní kost je tvořena propojením drobných trámců, které mají pevnou a odolnou, avšak lehkou strukturu. (3) (Obr. 1)



Obrázek 1: Stavba kosti (převzato z [22])

1.3 Kostní buňky

1.3.1 Osteoblasty

Osteoblasty se vyvíjejí z pluripotentních mezenchymových progenitorových buněk, které mají schopnost se diferencovat také v adipocyty, chondrocyty a osteocyty. Progenitorové buňky diferenciaci regulují tkáňově specifickými transkripčními faktory. Osteoblasty přežívají mezi 1-10 týdny, po dokončení tohoto období dojde k jejich zániku nebo se mohou přeměnit v osteocyty, ve které se dokáže přeměnit zhruba 15 % osteoblastů. Vývojovou linii prochází každý osteoblast třemi stádii: proliferací, diferenciací a mineralizací. Jejich tvorba probíhá neustále jak během embryogeneze, tak i v průběhu fyziologické remodelace nebo reparace kosti. (1)

Osteoblasty jsou tvořeny bohatým granulárním endoplazmatickým retikulem a zcela bazofilní cytoplazmou. Patří mezi velmi metabolicky aktivní buňky z kostní tkáně, najdeme je na povrchu kosti, kde jsou lokalizované přesně vedle sebe podobně jako epitely. (Obr. 2) Aktivní osteoblasty secernují matrix, mají kubický tvar s bazofilní cytoplazmou a zvýšenou aktivitu alkalické fosfatázy (ALP). Když nastane stádium, kdy jsou osteoblasty ve snížené metabolické aktivitě jejich tvar se oplošťuje, sníží se bazofilní zabarvení cytoplazmy i ALP. (1)

Osteoblasty tvoří organickou složku mezibuněčné kostní hmoty a sekreci signálních molekul: kostních morfologických proteinů (BMP), transkripčního faktoru (TGF-beta), růstového faktoru podobného inzulinu typu I a II (IGF I a II), interleukinu-1 (IL-1), růstového faktoru odvozeného z trombocytů (PDGF). Hlavním produktem sekrece osteoblastů je kolagen typu I a i další, nekolagenní proteiny, např. osteopontin, osteokalcin a kostní sialoproteiny. Při proliferační fázi dojde k maximální sekreci kolagenu typu I, v diferenciační fázi je maximum ALP během tvorby matrix a osteopontinu a osteokalcinu v průběhu mineralizační fáze. U osteoblastů je jejich diferenciační fáze nejvíce obtížnou, protože během ní dochází ke komunikaci mezi buňkami osteoblastů a osteocytů díky výběžkům na jejich povrchu přes „gap junctions“. (1)

1.3.2 Osteocyty

Osteoblasty postupně vytvářejí materiál, který je obklopuje, a tak vyžívají v osteocyty. Posléze jsou samostatně uzavřeny v lakunách s mezibuněčnou mineralizovanou hmotou. Mají tvar mandle a jsou nejhojnější skupinou buněk kostní tkáně. V cytoplazmě obsahují menší množství drsného endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu a jaderný chromatin je daleko více kondenzovaný. (3) Jedná se o neaktivní osteoblasty, které uvízly v kostní matrix. (16) (Obr. 2) Při samotné přeměně z osteoblastu na osteocyt dojde k vysání dlouhých cytoplazmatických výběžků postupně obklopených mineralizovanou mezibuněčnou hmotou. Tyto výběžky buňkám vycházejí z lakun a vyplňují kostní kanálky, které mají průměr cca 300 nm. Buňky s výběžky a mezibuněčnou hmotou nevyplňují všechna místa. V těchto volných prostorech proudí malé množství intersticiální tekutiny, která pomáhá k difuzi metabolitů mezi osteocyty a cévami. Ke komunikaci dochází jak mezi osteocyty navzájem, tak i mezi osteoblasty prostřednictvím „gap junctions“. Osteocyty jsou důležité pro udržení funkčního složení kalcifikované matrix, jejich životnost je řadu let. Když dojde k jejich smrti, následuje resorpce kostní matrix osteoklasty. Osteocyty mají schopnost detekovat poškození kostní tkáně, kdy reagují pomocí svých výběžků. Těmito

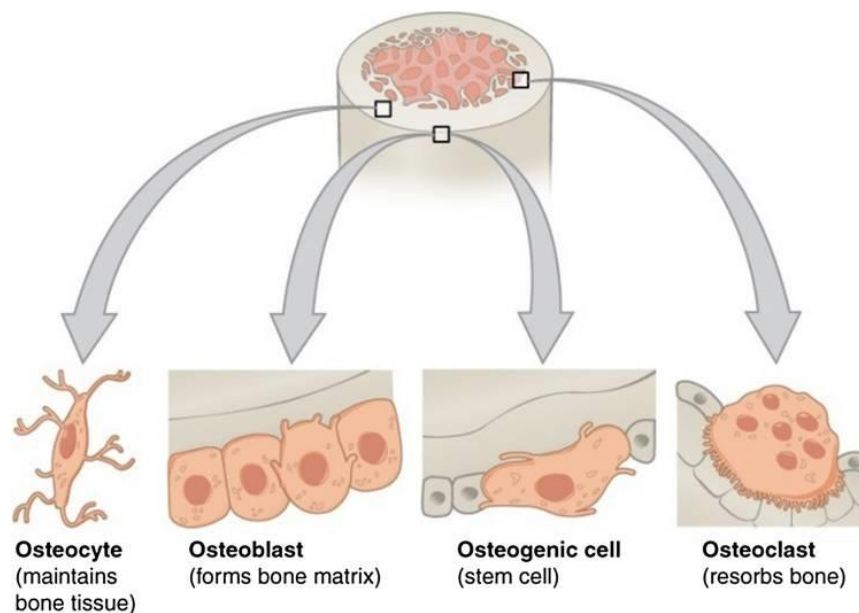
výběžky společně komunikují osteocyty s osteoblasty a osteoklasty. Když dojde u osteocytů k detekování poškození tkáně, spustí se procesy obnovy. (3, 2) Poruchy v růstu buněk osteocytů vedou ke křehkosti kostí a mohou mít za následek vznik osteoporózy. (16)

1.3.3 Osteoklasty

Osteoklasty jsou velké pohyblivé mnohjaderné buňky, obvykle mají acidofilní cytoplazmu, ve které jsou četně volné polysomy a mitochondrie, drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a znatelně velké množství lysozomů. Vznikají fúzí většího počtu monocytů, proto v průměru osteoklasty mohou obsahovat 10-12 jader. (Obr. 2) Jejich hlavním úkolem je odbourávat mineralizovanou kostní matrix při přestavbě kosti. (1, 2, 3) Osteoklasty jsou ke vzniku indukovány dvěma polypeptidy, které produkují osteoblasty, a to cytokinem stimulujícím makrofágy (M-CSF) a membránovým proteinem označovaným jako nukleární faktor kappa beta ligand (RANKL). (3) Aktivní osteoklasty naléhají těsně na mineralizovanou kostní matrix, hloubí jamky v povrchu trámečků a navrtávají kanálky do kompakty. Vyhloubené dutinky jsou znovu vyplněny kostními lamelami činností osteoblastů. Takováto přestavba kosti, probíhá po celý život. (2)

Důležitou součástí diferenciací osteoklastů jsou interleukiny IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, ale také TNF-alfa, transkripční faktor alfa (TGF-alfa). Hlavním řídicím faktorem jejich diferenciací bude s největší pravděpodobností IL-11. Pro osteoklasty je charakteristická tvorba tartrát rezistentní kyselé fosfatázy (TRAP), kterou najdeme v lysozomech a Golgiho aparátu. (1)

U aktivovaných osteoklastů se ve směru ke kostní matrix na povrchu tvoří hrubý kartáčový lem, který zvětšuje aktivní resorpční plochu podílející se na enzymatické destrukci přilehlé kosti. Enzymy, které se zapojují do této činnosti, jsou především TRAP, arylsulfatáza, beta-glukuronidáza, beta-glycerolfosfatáza, metaloproteázy, kolagenázy, katepsin K a stromelyzin. Osteoklastickou aktivitu regulují osteoklasty po navázání parathormonu (PTH) a vitamínu D3 na receptor, který má buňka na svém povrchu. (1) Aktivita osteoklastů je hlídána okolními kostními buňkami, které produkují regulační faktory. (3)



Obrázek 2: Buňky kostní tkáně (převzato z [16])

1.4 Vznik a vývoj kostní tkáně

Kostní tkáň má dvě cesty vzniku, a to buď desmogenní osifikací na podkladě vaziva nebo endochondrální osifikací remodelací chrupavky. Během obou procesů začíná vznik kosti zahuštěním mezenchymu a vzniká nezralá kost, která je v nejbližší době změněna na lamelózní kost. Proces probíhá jak v rostoucích kostech, tak i u kostí zcela vyvinutých, ale o poznání pomaleji. (1, 2, 3)

1.4.1 Desmogenní osifikace

Většina plochých kostí vzniká desmogenní osifikací, jako kosti lebky, lopatky, klíční kosti. Osifikace probíhá v místě kondenzované mezenchymové vrstvy, kde vznikají primární osifikační centra pro diferenciaci osteoprogenitorových buněk, které proliferují a tvoří vrstvy osteoblastů kolem vznikajících sítí kapilár. Osteoblasty jsou schopné syntetizovat kostní matrix, která kalcifikuje a dochází k zachycení buněk do lakun. Osteoblasty v lakunách už dále nemohou tvořit další kostní matrix a dochází k jejich změně na osteocyty. Vzniklé ostrůvky mají podobu trabekul a po jejich splynutí vzniká spongiózní kost ve vazivové tkáni do které pronikají krevní cévy. (3) Zároveň dochází k odbourávání přebytečné vzniklé kosti osteoklasty. Dalším růstem kosti vzniká kompakta, do které také pronikají kapiláry. (2)

1.4.2 Endochondrální osifikace

Tímto typem osifikace vznikají krátké i dlouhé kosti těla. Endochondrální osifikace probíhá uvnitř hyalinní chrupavky v průběhu chondrogenese, kdy chrupavka se změnila na kost. Před a během procesu se tvoří transkripční faktor SOX-9, který napomáhá

k diferenciaci chondrocytů. (1) Během endochondrální osifikace vzniká na povrchu chrupavky perichondrium, kde se diferencují osteoblasty. Tak se vytvoří kostní manžeta, která se následně prodlužuje. Původní perichondrium se změní na periost, vnější povrch kosti. Vzniklá kostní manžeta okolo chrupavky zabraňuje průchodu živin a kyslíku dovnitř chrupavky. Dochází ke zvětšování chondrocytů, které tlačí na mezibuněčnou hmotu a tento tlak spustí kalcifikaci a postupné uvolňování osteokalcinu a ALP, což vede k tvorbě kostní tkáně. Chondrocyty zanikají a vytváří se prázdné prostory obklopené kalcifikovanou mezibuněčnou hmotou. Přes kostní manžetu pronikají cévy, které s sebou přinášejí osteoprogenitorové buňky. Do vzniklých volných prostor se usazují osteoblasty, které produkují kostní matrix a na místě, kde byla dřív chrupavka, vzniká kostní tkáň. (3, 1) Transkripční faktor RUNX2 je důležitý pro přeměnu chondroblastů na osteoblasty. Růst kosti je kontrolován celou řadou růstových faktorů. (1)

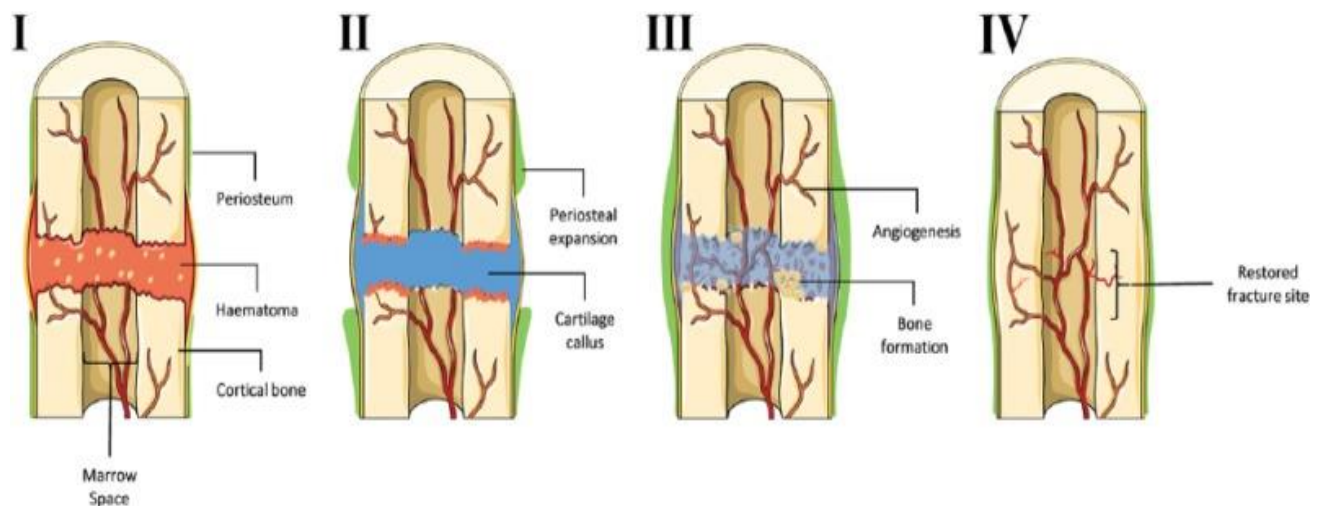
1.5 Přestavba a hojení kostí

Růst a přestavba kosti probíhá neustále po celý život. (3) Mezi odbouráváním a tvorbou kostní tkáně pozorujeme rovnováhu, která je ovlivňována výživovými a hormonálními faktory. Podle mechanického namáhání je kost schopná se adaptovat na přestavbu. V dospělosti dochází k pozvolnému úbytku kostní hmoty, proto přiměřená zátěž k věku podporuje dobrý stav kosti. (6)

Během poranění dochází jak k narušení stavby, tak k chemickému poškození kostní tkáně. Při poranění kosti dojde k celým řadám biochemických, fyziologických a buněčných reakcí, které následně vedou ke spuštění koagulační kaskády. Rozvíjí se zánět, aktivace angiogeneze, epitelizace, fibroplazie a uložení nové mezibuněčné matrix. Buňky účastnící se a umožňující tuto reakci jsou trombocyty, leukocyty, fibroblasty, buňky cévních endotelií a epitelie. Všechny tyto procesy jsou řízeny růstovými faktory a cytokiny, a hodně se podobají těm, které probíhají během embryogeneze. Pozůstatkem embryogeneze je regenerace, během které se kost dokáže hojit bez vzniku jizvy, kdy samozřejmě tato funkce je limitována rozsahem svého poškození. Kostní defekty většího rozsahu jsou nahrazovány kostními štěpy. (1)

Remodelace kostí je proces, při kterém dochází k obnově za účelem udržení pevnosti a homeostázy minerálů. Dochází k resorpci staré kosti a vytváření nové, aby se zabránilo nahromadění kostního mikropoškození, provádějí to skupinky osteoklastů a osteoblastů, které postupně provádějí resorpci a vytvářejí novou kost. (21) Obnova kosti má tři vzájemně

se prolínající postupy: zánět, tvorba kosti a remodelace kosti. Po zlomení kosti se okamžitě začíná rozvíjet zánět, který trvá několik dní. Jakmile je kost zlomená, dochází ke krvácení do oblasti zlomeniny, což má za následek zánět a tvorbu koagula v místě zlomu. Tvorba kosti začíná, jakmile je koagulovaná krev nahrazena vláknitou tkání a chrupavkou – označovanou jako měkký kalus. Jak regenerace kosti postupuje, měkký kalus se vymění za tvrdou kost – označovanou jako tvrdý kalus, což můžeme pozorovat na rentgenových snímcích několik týdnů po úrazu. Remodelace kosti je konečnou fází hojení kosti, která pokračuje ještě několik měsíců. (12) (Obr. 3)



Obrázek 3: Přestavba kosti (převzato z [18])

2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

2.1 Kostní tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je velmi slibně se rozvíjející multidisciplinární vědní oblastí založenou na nejnovějších poznatcích z medicíny, chirurgie, molekulární biologie i buněčné biologie, chemie polymerů a fyziologie. Úplně původní náplní byla kultivace buněčných kultur a biologických mediátorů v syntetických nebo biologických půdách. Pacientům byly podávány tyto mediátory za účelem usnadněné regenerace. (1) Hlavním cílem tkáňového inženýrství je obnovit a zlepšit funkci tkání přípravou porézních trojrozměrných skafoldů a jejich osazení buňkami a růstovými faktory. (19) Dodnes se definice rozšířila o jakýkoliv pokus regenerace tkáně jak *in vivo*, tak *in vitro*. (1)

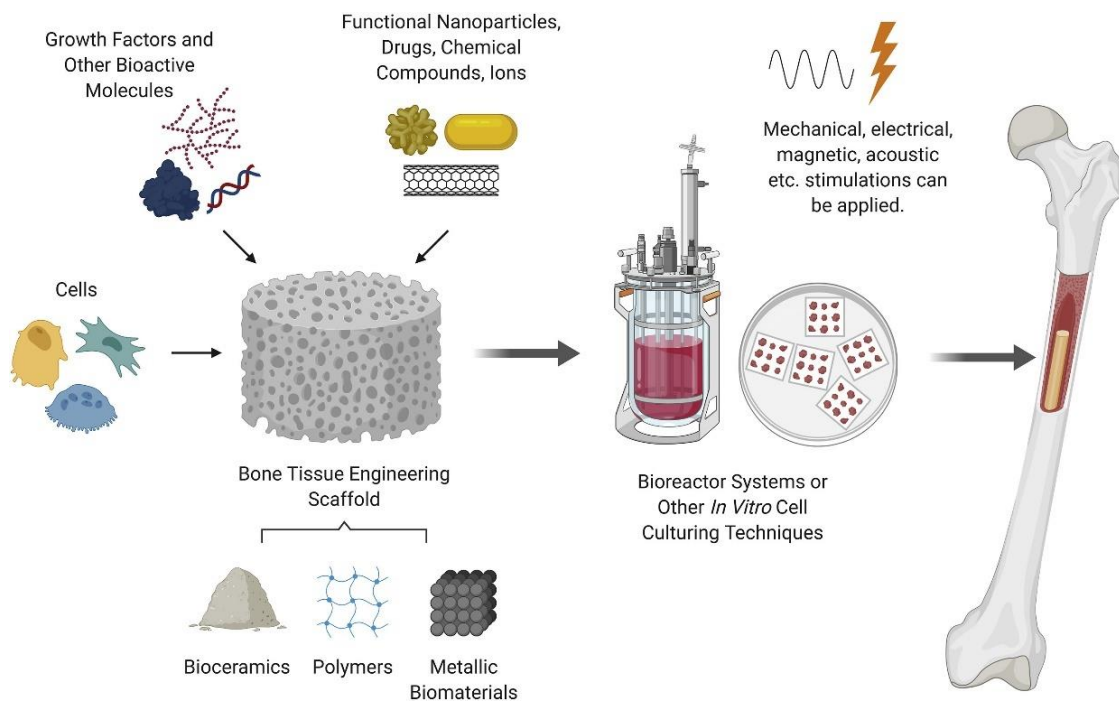
Kostní tkáňové inženýrství by mohlo být způsobem, jak opravit defekty kostí vzniklé z různých příčin. Tento obor zahrnuje tři hlavní části *in vivo* nebo *in vitro* – výsev buněk, růstové faktory a skafoldové materiály. (20) Dochází k využívání tří základních složek uplatňujících se v živých tkáních: matrix, různé typy buněk a signálních molekul. U TI máme nové možnosti léčby kostních defektů. (1) (Obr. 4)

Velká výhoda kostní tkáně je její přirozená samoobnova, remodelace a regenerace. Cílem je vytvořit nosiče, které budou schopné poskytovat regenerační signály a velmi dobře napodobovat přirozené prostředí. (19) TI zesiluje v našem organismu proces reparace i regenerace tkání. Pro tvorbu kosti je velmi důležitá přítomnost kostních buněk, růstových i diferenciačních faktorů, dostatečné krevní zásobení a tvorba kosti může být podpořena užitím biomimetických osteokonduktivních mediátorů. Ke správné regeneraci dosahujeme pomocí růstových faktorů. (1)

Celosvětový výskyt poruch a patologických stavů kostí prudce stoupá zejména v populacích, kde je stárnutí spojeno se zvýšenou obezitou a špatnou fyzickou aktivitou. (4) Každý rok potřebuje mnoho pacientů kostní náhrady, z důvodů poškození kostní tkáně, vrozených chorob nebo rakoviny. Kost je druhá nejvíce transplantovaná tkáň, její plná obnova může být obtížná a nemusí být vždy funkční. Transplantace kostní tkáně je omezená nedostatkem kompatibilních dárců, imunitní reakcí nebo přenosem nemocí na pacienta. (10, 17) Při těžkých, rozsáhlých defektech dochází k aplikaci kostních náhrad, štěpů. Jestliže kostní štěp pro transplantaci pochází od stejného pacienta, nazývá se autologní štěp. Tento zákrok, ale může být limitován pro dostupnost kostní tkáně a nese s sebou riziko zatížení

pacienta další operací. Alogenní (štěp z jiného člověka) a xenogenní štěpy (štěp z jiného druhu organismu) nejsou doporučované z možné imunitní reakce, kdy dojde k odmítnutí štěpu organismem pacienta. (5) TI je proto alternativou, kdy jeho cílem je pouze regenerovat poškozenou tkáň namísto jejího nahrazování. (10, 17)

V kostním TI hrají klíčovou roli skafoldy. Tento termín se používá pro 3D biomateriál, který buňkám poskytne vhodné prostředí pro regeneraci tkání a orgánů. (19) Na jejich výrobu se používá celá řada materiálů, rozdělujeme je do tří skupin na kovové, keramické a polymerní. (5) Jejich účelem je napodobit strukturu a funkci přirozené kostní extracelulární matrix (ECM), která může poskytnout trojrozměrné prostředí pro podporu adheze, proliferace a diferenciaci, a mít adekvátní fyzikální vlastnosti pro opravu kosti. Ideální skafoldy by měly být biologicky odbouratelné, biokompatibilní, bioaktivní, osteokonduktivní a osteoinduktivní. (7) Implantovaný skafold by měl mít dostatečnou mechanickou integritu, aby dokázal fungovat od okamžiku implantace až do dokončení procesu remodelace, což závisí na věku a zdravotním stavu pacienta. (10)



Obrázek 4: Schéma kostního tkáňového inženýrství (převzato z [17])

2.1.1 Biomateriály

Materiály v TI jsou buď přírodní nebo syntetické. Tyto materiály nesmějí mít škodlivý vliv na organismus a vyvolávat imunitní reakci, proto musíme vybírat biokompatibilní materiály. V TI jsou biomateriály používány jako matrice k osídlení živými

buňkami a následně vloženy do živých organismů za účelem regenerace poškozené tkáně. Matricí prostupují cévy z okolních tkání a zajišťují buňkám výživu. Při jejich výrobě je snaha, aby se matrice co nejvíce podobaly stavbě a funkci mezibuněčné hmoty. Jejich strukturální uspořádání bývá 3D a povrch je upraven tak, aby došlo ke správné adhezi a proliferaci buněk. Matrice by měly zajišťovat dostatečně vhodné prostředí pro transport buněk a růstových faktorů na místo implantace, protože buňky se musejí na svém novém místě správně uchytit a plnit svoji funkci. (9) Ideální skafold by měl být schopen napodobit mechanické a biologické vlastnosti přirozené kostní tkáně. (12)

2.1.2 Historie tkáňového inženýrství

V dlouhé historii lidského vývoje se tkáně a orgány vyvíjely s ohledem na funkci po miliony let, ale lidé používají umělé náhražky k opravě poškozených tkání teprve po desetiletí. (7) Lidé hledali tisíce let způsob, jak nahradit a vyléčit ztracenou, poškozenou kost. Archeologové v Peru objevili pozůstatek lebky, která zřejmě patřila náčelníkovi kmene z období 2000 let př. n. l., kdy v čelní části byl defekt překrytý plátem tepaného zlata o tloušťce 1 mm. U Inků byly nalezené trepanované lebky s překrývanými pláty stříbra a zlata nebo mušlemi. Lebka, která byla nalezena v centru středověké Arménie z doby 2000 př. n. l., měla 7 mm defekt nahrazený zvířecí kostí. Snahy nebyly pouze v náhradách lebečních kostí. Ve středověkém Egyptě měli dobré znalosti v ortopedických a traumatologických postupech, kdy dokázali nahradit kolenní kloub železnou protézou již 600 let př. n. l., což je dokázané díky dochovaným mumiím. (8) U egyptských mumií byly rovněž nalezeny umělé oči, uši, nosy i zuby. (5)

Nahrazením měkkých i tvrdých tkání tedy není zcela novou vědní disciplínou, jak by se mohlo zdát. Také ve starověké Indii a Číně docházelo k pokusům o odstraňování tělesných defektů pomocí různých lepidel, tmelů i vlastních tkání. (5)

Historie tkáňového inženýrství by mohla být datována zhruba od 16. století, kdy profesor chirurgie a anatomie Gasparo Tagliacozzi na univerzitě v Bologni nahradil nos, který dokázal vytvořit z předloktí. Jeho práce byla publikována roku 1597 pod názvem „De Custorum Chirurgia per Institutionem“. (10) V roce 1820 popsal německý chirurg Phillips von Walters první klinické použití kostního autotransplantátu k rekonstrukci defektů lebky u pacientů po trepanaci. Walters úspěšně opravil trepanační otvory po operaci ke zmírnění nitrolebního tlaku pomocí kousků kosti odebraných z lebky pacienta. V roce 1881 popsal skotský chirurg William MacEwen první postup transplantace alogenního kostního štěpu. K

rekonstrukci infikované pažní kosti u tříletého dítěte použil klíny holenní kosti od tří dárců, kteří podstoupili operaci pro korekci deformity skeletu (způsobené křivicí). (8)

Moderní biomateriálové inženýrství je novou vědeckou disciplínou vyvíjející se zhruba od padesátých let 20. století. (5) První biomateriály byly připraveny v 60. letech minulého století. Mezi první biomateriály patřily kovy, syntetické polymery a keramika. Termín tkáňové inženýrství byl poprvé použit v roce 1987, ale zaveden byl v roce 1988 na semináři Národní vědecké nadace. (7, 19) Langer a Vacanti použili tento termín v přehledovém článku publikovaném v časopise Science v roce 1993. (19)

Syntetické náhrady kostních štěpů byly vyvinuty během posledních desetiletí a trh s náhradami kostí se v roce 2013 zařadil mezi špičkové produkty v ortopedickém průmyslu s příjmem přibližně 2 miliard dolarů s trendem preferovat syntetické produkty před přírodními. (17)

2.2 Buňky používané pro testování biokompatibility skafoldů

Pro *in vitro* testování biokompatibility materiálů se používají lidské buněčné kultury různého původu, od maligních buněk, přes mezenchymální kmenové buňky až po primární osteoblasty.

2.2.1 Lidské maligní buněčné linie

Díky snadnější kultivaci se k prvotním testům cytokompatibility biomateriálů používají osteosarkomové buňky. Osteosarkomové buňky jsou dostupné ve velké řadě buněčných linií, které se liší mutantními geny, lze jich získat velké množství, což je jejich výhoda, ale nevýhodou by mohl být patologický fenotyp. Buněčné linie, které jsou odvozené od osteosarkomů, mají charakteristické rysy osteoblastů, jako jsou specifické receptory pro vitamín D3 a PTH, vykazují aktivitu ALP a produkují proteiny kostní matrix. Nádorový původ osteosarkomů se ale může od primárních osteoblastů zcela lišit svou morfologií, mitotickou rychlostí, expresí cytokinů, růstovými faktory, matrixovými proteiny a mineralizační aktivitou. Buňky osteosarkomu se také liší svou velikostí, kdy průměrná velikost je přibližně 1/6 velikosti osteoblastů. Jejich doba zdvojnásobení populace (PDT) je 2-3 rychlejší než u osteoblastů. (11) (Tabulka 1)

Velmi často se k testování používá buněčná linie MG-63 podobná lidským osteoblastům (ATCC, Manassas, VA, USA), která byla získána z osteosarkomu 14letého chlapce. Tyto buňky mají vřetenovitou morfologii fibroblastů s adherentní schopností. Jsou

menší, než buňky osteoblastů (hOB). (11) Buňky MG-63 mají fenotyp nezralých osteoblastů, běžně jsou používány *in vitro* k posuzování 3D skafoldů jako materiálu pro TI nebo ke zkoumání cytokompatibility kovových implantátů s různou povrchovou úpravou. (12, 13) Tato linie buněk produkuje velké množství interferonu, což je protein nespecifické imunity s antivirovým účinkem. (15)

MG-63 buňky vykazují rychlý buněčný růst bez kontaktní inhibice, což vede k tvorbě agregátů. Jejich hormonální profil je podobný jako u hOB, ale nevýhodou je, že zůstávají ve stádiu preosteoblastu a mají poměrně nízkou mineralizaci buněk. Aktivita ALP se zvyšuje až 15. den a poté klesá na základní úroveň. K akumulaci vápníku dochází až po 28. dni kultivace. U exprese kolagenu I je hodnota vyšší 7. a 15. den než 29. den. Exprese osteokalcinu a osteonektinu byla pozorována mezi 15. a 29. dnem, zatímco RUNX2, kostní sialoprotein a osteopontin nebyly detekovány. Buňky MG-63 mají rovněž nižší expresi genu Sp-7, který směřuje diferenciaci mezenchymálních buněk do osteoblastů a osteocytů, než buňky Saos-2 a hOB. (11)

Buňky MG-63 vykazují znaky buněk spíše prosteoblastických nebo fibroblastických než osteoblastů. Mají rychlou proliferaci a díky snadné kultivaci slouží jako dobrá modelová buněčná linie *in vitro* pro počáteční testy cytokompatibility a adheze. Nicméně mají malou schopnost ukládat vápník, nedostatečné osteoblastické funkce, rozdílnou proliferaci, aktivitu ALP a tvorbu ECM. (11)

Tabulka 1: Osteosarkomové buňky nejčastěji používané pro testování biomateriálů (převzato a upraveno z [11])

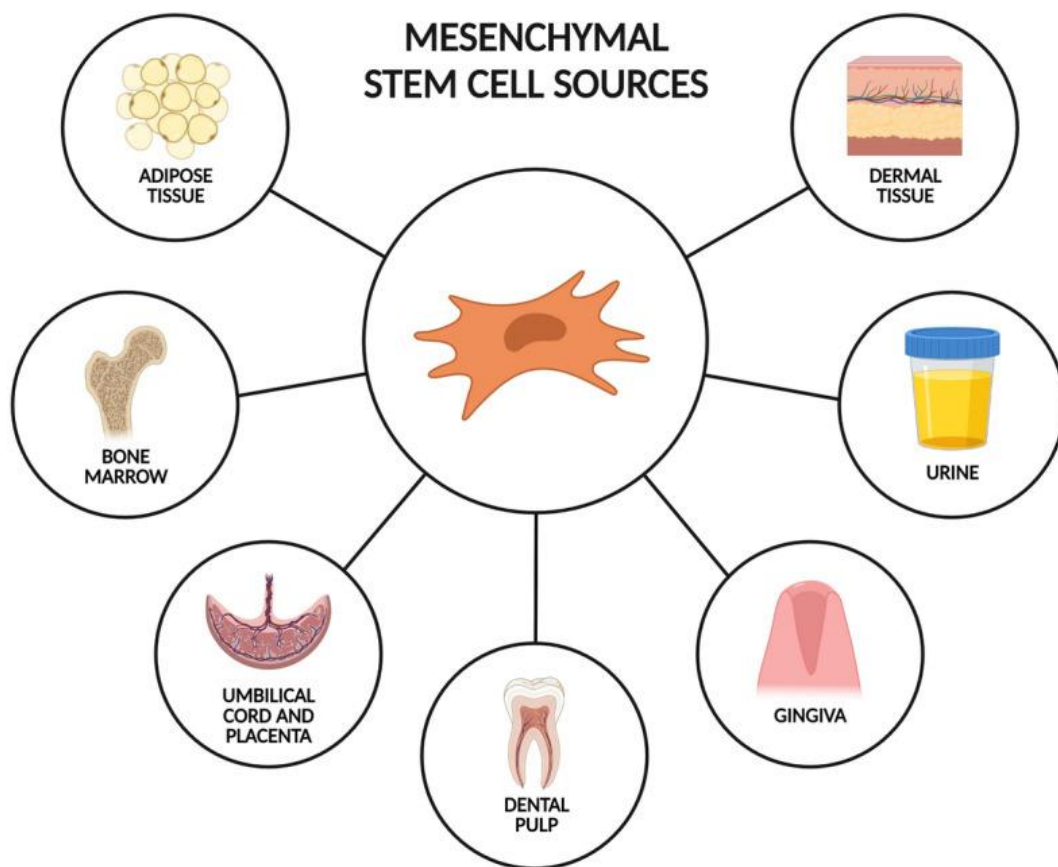
Buňky	Použití v TI	Výhody	Nevýhody
MG-63	k testování adheze a cytotoxicity	rychlý růst a snadná kultivace	patologický fenotyp, nízká mineralizace
Saos-2	testy adheze, biokompatibility, osteodiferenciace	rychlý růst, snadná kultivace, vysoká aktivita ALP	patologický fenotyp

2.2.2 Lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSC)

Buňky hMSC jsou multipotentního adherentního typu fibroblastů s potenciálem se diferencovat do různých typů buněk, jako jsou osteoblasty, chondrocyty a adipocyty, za specifických podnětů z kultivačních médií nebo biomateriálů. Tyto buňky mají jedinečnou schopnost reparace a používají se v široké škále buněčných ošetření, převážně ve spojení se skafoldy, kdy testujeme kompatibilitu skafoldů s implantáty *in vitro*. Umožní nám tak lépe hodnotit vliv biomateriálů na buněčnou linii. (11) (Tabulka 2)

Mezi nejvíce prozkoumané zdroje hMSC patří kostní dřev (BM-MSC), tuková tkáň (AD-MSC) a pupečnicková krev (HUC-MSC). Z nedávných studií vyplývá, že slibný potenciál mají také kmenové buňky zubní dřevě (G-MSC), jako jsou kmenové buňky z lidských exfoliovaných mléčných zubů, gingivální mezenchymální kmenové buňky (DPSC), kmenové buňky získané z moči (USC) a dermální mezenchymální kmenové buňky (D-MSC). (11) (Obr. 5)

Výtěžek hMSC z odebrané tkáně je však obvykle velmi nízký. V kostní dřevě tvoří hMSC méně než 1 % buněčné frakce a ve stromální vaskulární frakci získané z tukové tkáně asi 1,4 %. To zdůrazňuje potřebu dosáhnout zvýšeného počtu hMSC kultivací *in vitro*, aby bylo možné získat potřebný počet buněk pro implantaci nebo výzkum. (14) Abychom dosáhli správné osteogenní diferenciaci, tak se do růstového média nejčastěji přidávají osteogenní doplňky jako β -glycerolfosfát, kyselina askorbová, dexamethason. (11)



Obrázek 5: Zdroje hMSC (převzato z [11])

Tabulka 2: Mezenchymální buňky (převzato a upraveno [11])

Buňky	Použití v TI	Výhody	Nevýhody
AD- MSC	testy cytokompatibility, použití pro terapeutické aplikace	snazší odběr než BM- MSC	nižší diferenační potenciál pro osteogenezi než BM-MSC
BM- MSC	testy cytokompatibility, použití pro terapeutické aplikace	vysoký diferenační potenciál pro osteogenezi	invazivní odběr, nádorový potenciál imortalizovaných BM- MSC; pro přístup k primárním buňkám je nutné schválení etickou komisí a informovaný souhlas pacienta

HUC- MSC	lepší pro regenerativní medicínu a terapii nervového systému, jater a cukrovky	neinvazivní odběr, příznivá proliferační kapacita, nízká imunogenicitá	opožděná a nedostatečná osteogeneze
DPSC	testování zubních implantátů	snadný odběr z mléčných zubů a zubů moudrosti, rychlejší PDT ve srovnání s BM-MSC a AD-MSC	slabá kalcifikace, diferenciaci především v odontoblasty
G-MSC	osteointegrace zubních implantátů, testování skafoldů pro regeneraci kostí, aplikace v regenerativní stomatologii	snadný odběr z dásní, žádný nádorový potenciál, rychlejší PDT ve srovnání s BM-MSC a AD-MSC,	snížený osteogenní diferenciacní potenciál ve srovnání s BM-MSC
USC	možnost použití pro regeneraci chrupavek a kostí	snadný, levný odběr moči	použití v kostním inženýrství zatím není běžný, spíše pro rekonstrukční operace močových a pohlavních cest
D-MSC	léčba osteoartrózy	snadná dostupnost kůže s vysokou regenerační schopností	použití v TI zatím není zcela běžné

2.2.3 Lidské osteoblasty

Hlavní výhodou použití primárních lidských osteoblastů je jejich klinická použitelnost a absence potřeby řešit mezidruhové rozdíly. Nevýhodou je omezená dostupnost a fenotypová heterogenita. Modely založené na primárních osteoblastech poskytující vysoce citlivé odpovědi na hodnocení cytokompatibility materiálu.

Tabulka 3: Osteoblastické buňky (převzato a upraveno z [11])

Buňky	Použití v TI	Výhody	Nevýhody
hFOB 1.19	využití pro studium vlivu cytokinů a růstových faktorů pro fyziologii a diferenciaci osteoblastů	daleko snadnější opakování pokusů než u hOB, spontánní diferenciacie	transfekovaná buněčná linie
hOB	studium mechanismu tvorby kosti, regulace diferenciacie, pro sledování potenciálních testování biokompatibility kostních náhrad	fyziologický fenotyp diferenciacie osteoblastu na osteocyt	omezené zdroje hOB, dlouhodobá kultivace vede k fenotypovému driftu, pro přístup k primárním buňkám je nutný souhlas etické komise a informovaný souhlas pacienta

PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

3.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem práce bylo otestovat *in vitro* biokompatibilitu nově vyvíjeného 3D skafoldu, který by měl sloužit jako náhrada kosti. Pro tento pokus bude použit sklokeramický skafold a zakoupená linie osteogenních buněk MG-63.

3.2 Dílčí cíle

1. Testování adheze a proliferace buněk MG-63 pomocí kitu Cell Counting Kit-8
2. Měření cytotoxicity materiálu testem CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay
3. Barvení buněk na materiálu krystalovou violetí
4. Fluorescenční barvení buněk na materiálu

4 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

1. Na kterém z testovaných materiálů adherují a proliferují buňky nejlépe?
2. Je nějaký z testovaných materiálů cytotoxický?
3. Který z těchto testovaných materiálů by byl pro kostní TI nejvhodnější?

5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Experiment byl proveden na Ústavu lékařské chemie a biochemie na LF UK v Plzni za použití zakoupené lidské buněčné osteosarkomové linie MG-63 na sklokeramických kompozitních skafoldech připravených doc. Ing. Tomášem Kovaříkem, PhD., NTC ZČU v Plzni.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Skafoldy

Testovali jsme 3 typy skafoldů, zde označené jako T1, T2, T3. Jednalo se o sklokeramický kompozit modifikovaný práškovým fosforečnanem vápenatým a amorfni silikou. Vzorky byly připraveny unikátním způsobem rozpouštění jemného metakaolinu a hydroxyapatitu ve vodném roztoku křemičitanu sodného. K napěnění kuliček dochází při teplotě 150 °C a k sintrování při teplotě 900 °C. Výsledným krystalickým fázím dominují fosforečnan vápenatý a křemičitan vápenatý. Jednotlivé vzorky T1, T2 a T3 se lišily vzrůstajícím podílem CaO a P₂O₅ u vzorku T1 = 9 wt%, T2 = 11 wt%, T3 = 14 wt%. Zbytek je Na₂O. Přesná metodika přípravy těchto skafoldů je vlastnictvím NTC ZČU Plzeň (doc. Ing. Tomáš Kovářík, PhD.), odkud byly v rámci spolupráce předány k otestování na LF UK Plzeň.

Průměr skafoldů byl cca 14 mm a jejich výška asi 4 mm. (Obr. 6)

Před začátkem pokusu byly skafoldy dezinfikovány 2 hodiny 70% etylalkoholem, který byl připraven z absolutního etylalkoholu a deionizované vody. Následně byly skafoldy opláchnuty deionizovanou vodou a vysušeny již ve sterilním prostředí v laminárním boxu. Před vlastním nasazením buněk na skafoldy bylo nutné namočení do kompletního kultivačního média, aby se podpořila adheze buněk.

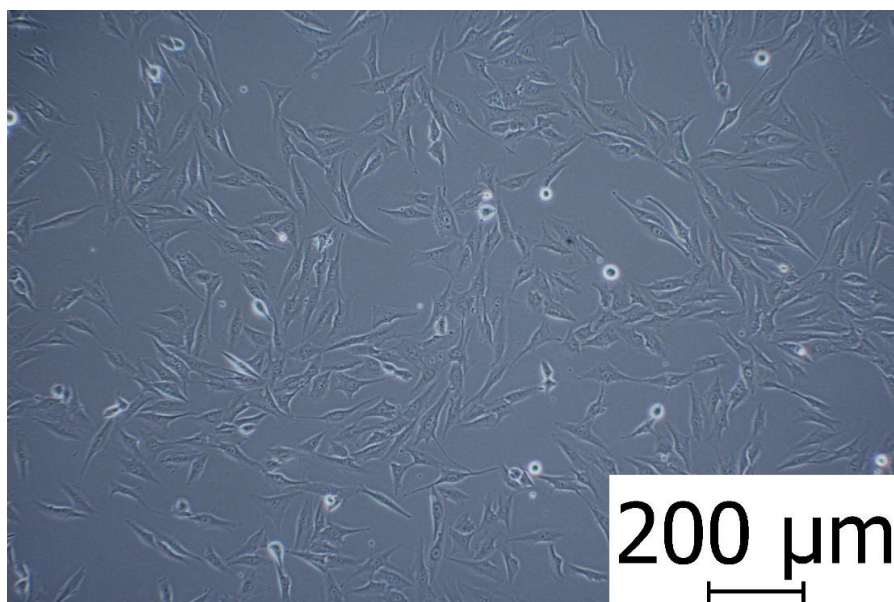


Obrázek 6: Skafoldy T1, T2, T3 (vlastní zdroj)

6.2 Buněčná kultivace

Lidská buněčná linie podobná osteoblastům MG-63 (ECACC 86051601) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), byla kultivována v Dulbeccově modifikovaném médiu

Eagle's Medium (DMEM, Biosera Europe, Nuaille, Francie) doplněném 10 % (v/v) fetálního hovězího séra (FBS, Biosera Europe, Nuaille, Francie), 100 U/ml penicilinu a 100 mg/ml streptomycinu (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a 2,5 mM stabilního glutaminu (Diagnostum GmbH, Ebsdorfergrund, Německo) při 37 °C a 5 % CO₂ v inkubátoru se zvlhčenou atmosférou. Hustota výsevu byla 1 000 000 buněk/ml. To odpovídá 50 000 buněk v 50 µl na 1 skafold. (Obr. 7)



Obrázek 7: Adherující buňky MG-63 na kultivační lahvi, vyfoceno na mikroskopu Olympus CKX41, objektiv 10x) (vlastní zdroj)

6.3 Adheze a proliferace buněk

Adheze buněk byla hodnocena po 24 hodinách a proliferace 7., 14. a 21. den od nasazení buněk na skafoldy pomocí kitu Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Bimake, Mnichov, Německo). Roztok CCK-8 byl přidán do každé jamky podle návodu k použité soupravě a následovala inkubace při 37 °C. Hodnota absorbance byla měřena ve čtyřech opakováních z každého implantátu při 450 nm pomocí destičkového readeru Cytation 5 (BioTek, Winooski, VT, USA). Pro měření adheze a proliferace trvala inkubace s CCK-8 1 hodinu a bylo použito 5 vzorků z každého typu skafoldu.

Princip metody Cell Counting Kit-8:

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) umožňuje pohodlné testy ve vodě pomocí rozpustné tetrazoliové soli WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazoliová, monosodná sůl). Reakce je založena na redukci rozpustné soli enzymy v živých buňkách na oranžově zbarvené formanové barvivo. Množství produkovaného

formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk. Protože je roztok CCK-8 velmi stabilní a má malou cytotoxicitu, je možná delší inkubace, například 24 až 48 hodin.

Cell Counting Kit-8 umožňuje citlivé kolorimetrické testy pro stanovení počtu životaschopných buněk v testech proliferace a cytotoxicity. Absorpční spektrum formazanu WST-8 je při 460 nm úměrné hodnotě počtu životaschopných buněk v médiu.

6.4 Cytotoxická aktivita materiálu

K měření cytotoxicity materiálu byl použit test CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA). Supernatanty byly odebrány 24 hodin po nasazení buněk a smíchány v poměru 1:1 s reakční směsí v 96-jamkové destičce, inkubovány ve tmě po dobu 30 minut při pokojové teplotě, poté byl přidán Stop Solution. Intenzita zabarvení byla měřena při 490 nm a 680 nm pomocí destičkového readeru Cyation 5 (BioTek, Winooski, VT, USA). Pro stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) byla hodnota absorbance 680 nm (signál pozadí přístroje) odečtena od absorbance 490 nm.

Princip metody CyQUANT™LDH Cytotoxicity Assay Kit:

LDH je cytosolový enzym přítomný v mnoha různých typech buněk a je dobře zavedeným a spolehlivým indikátorem toxicity. Poškození plazmatické membrány má za následek uvolnění LDH do okolního buněčného kultivačního média. Tato extracelulární LDH může být kvantifikována sdruženou enzymatickou reakcí, ve které LDH katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát prostřednictvím redukce NAD⁺ na NADH. Oxidace NADH diaforázou pak vede k redukci tetrazoliové soli (INT) na červený formazanový produkt, který lze měřit při 490 nm. Úroveň tvorby formazanu je přímo úměrná množství LDH uvolněného do média.

6.5 Barvení krystalovou violetí

Barvení krystalovou violetí bylo použito k analýze základního tvaru buněk a populační hustoty jednotlivých skafoldů 24 hodin a 14 dní po nasazení buněk. Skafoldy s buňkami byly promyty fosfátovým pufrem (PBS) a fixovány 2,5% glutaraldehydem v PBS (pH = 6,7-7,1) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po fixaci byly skafoldy opět promyty PBS a obarveny 0,5% roztokem krystalové violeti po dobu 20 min při pokojové teplotě. Poté byl barvicí roztok odstraněn a skafoldy byly podle potřeby oplachovány deionizovanou vodou, dokud neuvolnily nadbytečné barvivo. Po zaschnutí byly buňky na skafoldech

pozorovány a fotografovány digitálním mikroskopem Keyence VHX-7000 (Keyence, Japonsko).

6.6 Fluorescenční barvení

Pro vizualizaci populační hustoty byly kultivované buňky na skafoldech obarveny barvivem CellTracker™ Green CMFDA 4 μ M (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA), které zvýrazňuje cytoplazmu buněk. Při barvení bylo postupováno podle pokynů výrobce. Po promytí buněk PBS byl přidán premix skládající se z kultivačního média DMEM bez suplementů a 4 μ M roztoku CellTracker™ Green CMFDA. Po 30minutové inkubaci při 37 °C byly buňky promyty opět PBS. Po přidání média Live Cell Imaging Solution (LCIS) byly živé buňky pozorovány a fotografovány pomocí fluorescenčního stereomikroskopu Leica M205 FCA (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo).

6.7 Statistická analýza

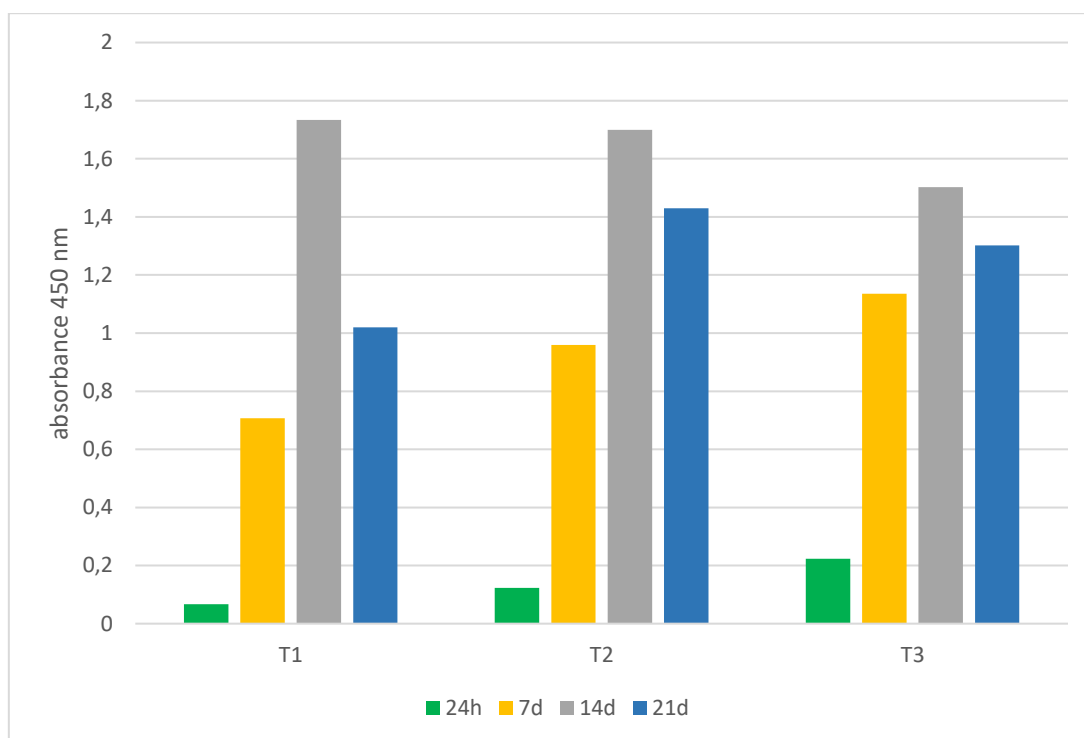
Ke statistickému vyhodnocení byl použit Studentův t-test ($p \leq 0,05$).

7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

7.1 Adheze a proliferace buněk

Po 24hodinové kultivaci se adheze buněk MG-63 na skafoldech statisticky lišila u T1 od T2, T1 od T3, a T2 od T3 – tzn. že všechny se mezi sebou lišily. Prvotní adheze buněk MG-63 je nejlepší u skafoldů T3.

Po dalších 7 dnech kultivace se skafold T1 lišil od T3 a skafold T2 se lišil od T3. Mezi skafoldy T1 a T2 není velký rozdíl v proliferaci buněk.



Graf 1: Adheze a proliferace buněk MG-63 na testovaných skafoldech měřená kitem CCK-8 (vlastní zdroj)

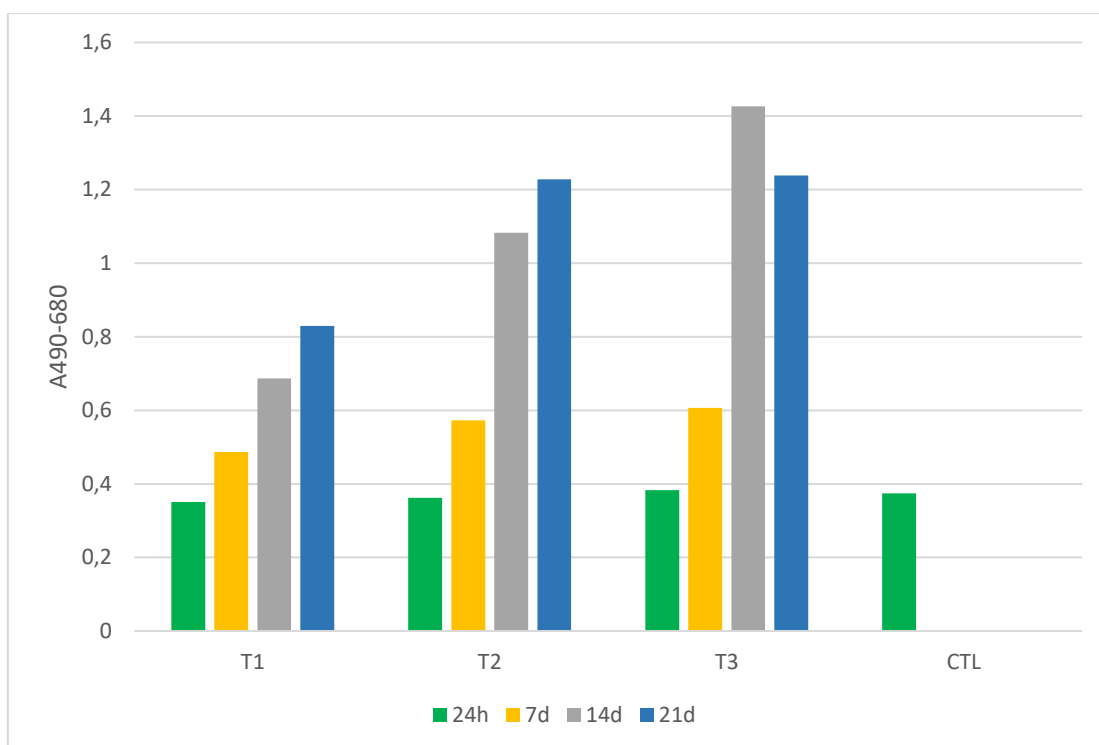
14. den kultivace se proliferace lišila jen u skafoldů T1 a T3. Nejlepší osídlení buněk bylo zjištěno u skafoldů T1 a T2. Proliferace buněk se zvyšovala jen do 14. dne kultivace.

Proliferace po 21. dnu kultivace se lišila u skafoldů T1 od T2 a T1 od T3. Na skafoldu T2 byla zachycena největší hustota buněk, ale 21. den kultivace již docházelo k jejich úbytku, buňky byly už na materiálu zřejmě přerostlé. Maximální počet buněk na materiálu byl tedy zjištěn 14. den kultivace. (Graf 1)

Měřením bylo zjištěno, že prvotní adheze buněk MG-63 byla lepší u skafoldů T3, ale po 21denní kultivaci byla největší hustota buněk na skafoldu T2. Tento materiál se tedy jevil jako vhodnější pro kostní TI.

7.2 Cytotoxicita materiálu

Po 24hodinové kultivaci byla prvotní cytotoxicita u všech skafoldů porovnatelná s kontrolou, která byla kultivovaná na plastu určeném pro buněčné kultury. Statisticky se od sebe lišily skafoldy T1 od T3. U skafoldu T3 byla zjištěna největší cytotoxicita.



Graf 2: Cytotoxicita skafoldů testovaných kitem CyQUANT™LDH Cytotoxicity Assay (vlastní zdroj)

Po 7. dnech kultivace se materiály mezi sebou statisticky nelišily.

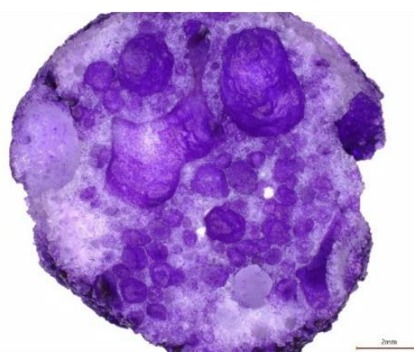
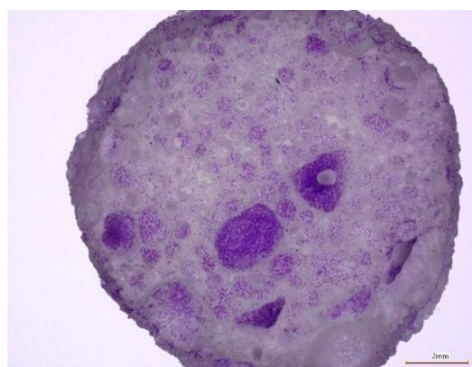
Zjevný rozdíl mezi materiály se ukázal 14. den kultivace, kdy se všechny materiály mezi sebou statisticky lišily. Vyšší cytotoxicita mohla souviset s větším počtem buněk na skafoldech. Přestože na skafoldu T3 bylo 14. den pomocí testu CCK-8 naměřeno méně buněk než na skafoldech T1 a T2, byla zde zjištěna nejvyšší cytotoxicita. Test cytotoxicity vyšel nejlépe u materiálu skafoldu T1.

Při další kultivaci se 21. den lišily skafoldy T1 od T2 a T1 od T3. Tyto výsledky však již nemůžeme považovat za validní, protože buňky byly na materiálu už zřejmě přerostlé a docházelo tak k jejich úbytku. (Graf 2)

Měření cytotoxicity u skafoldů T1, T2 a T3 pomocí testu CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay bylo zjištěno, že cytotoxicita při prvotním kontaktu s materiálem byla nejvyšší u skafoldu T3. Rovněž byla také cytotoxicita 14. den kultivace naměřená největší u T3. Nejmenší cytotoxicita byla naměřena u T1 a T2, přičemž na T2 bylo po 21. dnu kultivace nejvíce buněk. Z našeho testování vyplývá, že pro kultivaci buněk měl nejpříznivější vlastnosti skafoldů T2, který by tak z těchto materiálů byl pro kostní TI nejvhodnější.

7.3 Barvení – krystalová violet'

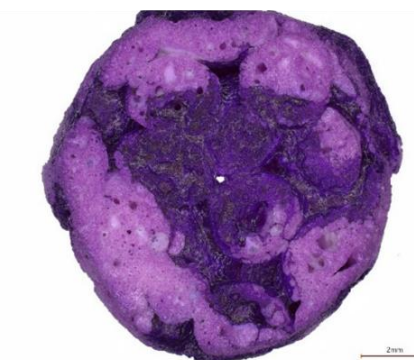
Buňky MG-63 fibroblastového tvaru byly na skafoldech obarveny krystalovou violetí, a tak vizualizovány. Je patrný přírůstek mezi dobou kultivace 24 hodin (24 h) a 14 dní (14 D). (Obr. 8) Detail buněk obarvených krystalovou violetí na skafoldu T1 po 24 hodinách kultivace je zachycen na dalším obrázku. (Obr. 9)



T1: 24 h a 14 D

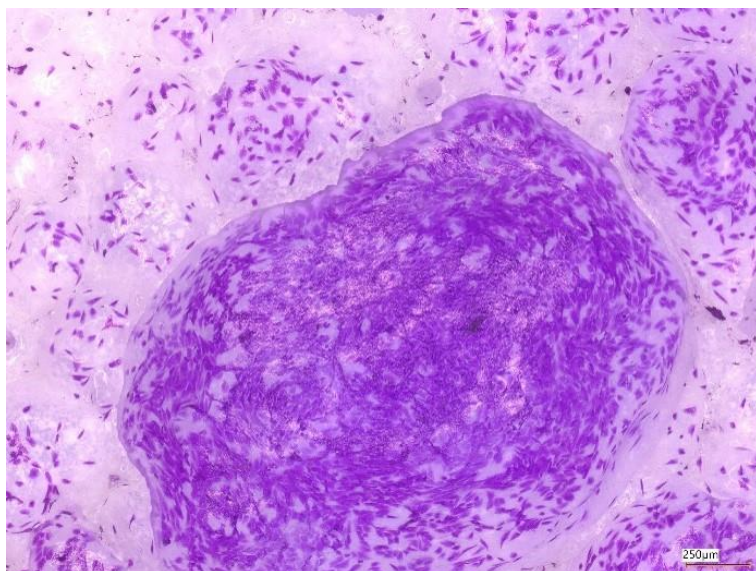


T2: 24 h a 14 D



T3: 24 h a 14 D

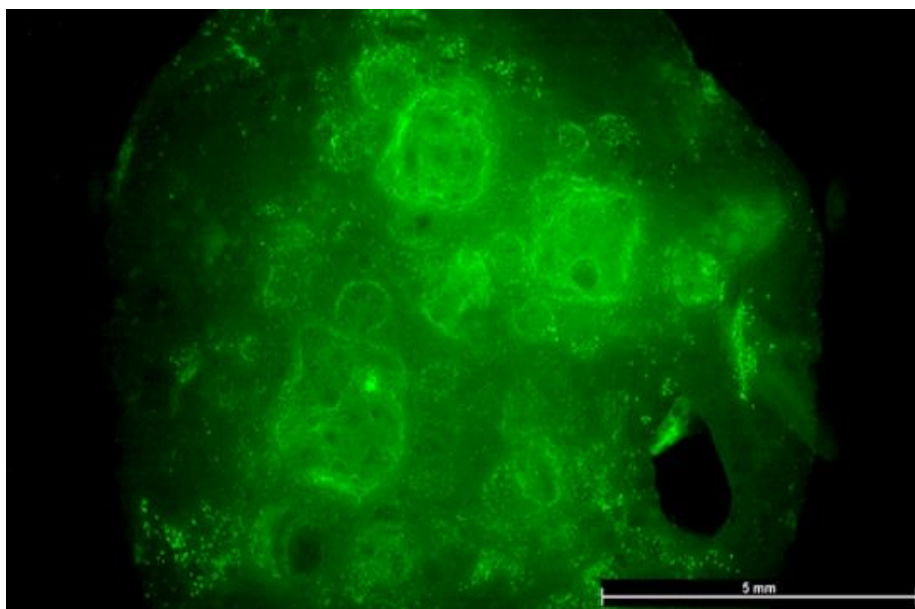
Obrázek 8: Buňky obarvené krystalovou violetí. Foceno digitálním mikroskopem Keyence VHX-7000, měřítko = 2 mm. (vlastní zdroj)



Obrázek 9: Detail buněk obarvených krystalovou violetí na skafoldu T1 po 24 hodinách kultivace. Foceno digitálním mikroskopem Keyence VHX-7000, měřítko =250 μm. (vlastní zdroj)

7.4 Fluorescenční barvení

Buňky byly vyfoceny s cytoplazmou zvýrazněnou barvivem CellTracker™ Green CMFDA. Byly zachyceny kolonie, které buňky vytvářely v prohlubních skafoldu. (Obr.10)



Obrázek 10: Buňky obarvené barvivem CellTracker™ Green SMFDA na skafoldu po 24hodinové kultivaci. Foceno fluorescenčním stereomikroskopem Leica M205 FCA. Měřítko = 5 mm. (vlastní zdroj)

DISKUZE

Na kterém z testovaných materiálů adherují a prolifерují buňky nejlépe?

Buňky MG-63 jsme testovali na 3 typech skafoldů označených jako T1, T2, T3. Vyrobeny byly ze sklokeramického kompozitu modifikovaného práškovým fosforečnanem vápenatým a amorfni silikou. Adheze buněk byla hodnocena po 24hodinové kultivaci a prolifерace po 7, 14, 21 dnech pomocí kitu Cell Counting Kit-8. Adheze po 24 hodinách byla nejlépe vyhodnocena u skafoldu T3, který měl nejvyšší podíl CaO a P₂O₅, a to 14 wt%. Prolifерace se zvyšovala do 14. dne, a nejvyšší prolifерace byla zaznamenaná na skafoldech T1 a T2. Materiál T1 obsahoval 9 wt% CaO a P₂O₅ a materiál T2 11 wt%. Po 21denní kultivaci byla největší prolifерace buněk zjištěna u skafoldů T2.

Je nějaký z testovaných materiálů cytotoxický?

Cytotoxicita testovaných skafoldů T1, T2, T3 byla měřena testem CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay. Měřili jsme LDH v kultivačním médiu, protože tento enzym se uvolňuje z buněk do okolí po rozpadu jejich membrány vlivem toxicity. Z výsledků vyplývá, že skafold T3 po prvotním setkání buněk s materiálem i po 14 dnech vykazoval největší cytotoxicitu.

Který z těchto testovaných materiálů by byl pro kostní TI nejvhodnější?

Testováním cytotoxicity pomocí testu CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay byla zjištěna nejmenší cytotoxicita u skafoldu T1 a pak u T2. Vzhledem k tomu, že měřením pomocí kitu Cell Counting Kit-8 bylo zjištěno, že po 21denní kultivaci byla největší hustota buněk na skafoldu T2, nepřekračovala jeho toxicita, která byla o něco vyšší než u skafoldu T1, zřejmě hodnotu, která by buňkám bránila v prolifерaci. Jako materiál nejvhodnější pro kostní TI tak byl z testovaných vzorků vyhodnocen skafold T2.

Hojení kosti se řeší novými implantovanými biomateriály, které mají regenerační schopnosti. Zkoumá se např. potažení 3D porézních sklokeramických skafoldů kyselinou hyaluronovou (HA) a komjugátem z HA-mastné kyseliny. HA je široce používaná v regenerační medicíně, proto by mohla mít dobré vlastnosti pro zvýšení tvorby kosti. Potažení by mělo být rovnoměrné, aby nedošlo k ucpání 3D makroporézní struktury materiálu. Zkoumá se perzistence povlaku při kontaktu s vodivými roztoky, jako jsou tělesné tekutiny. Výsledky výzkumu naznačují, že povlak konjugátu HA-mastné kyseliny neměl žádný negativní vliv na skafoldy v tvorbě hydroxyapatitu. Tvorba fáze podobné hydroxyapatitu na povrchu biomateriálů je klíčem k podpoře silné fixace s živými tkáněmi *in vivo*, protože osteoblasty se přednostně přichytí a proliferují na této kalcium-fosfátové vrstvě a začínají vytvářet novou kost. Tyto nové multifunkční biomateriály jsou slibné pro obnovu kostí díky schopnosti tvořit hydroxyapatit a regeneračnímu potenciálu základního skafoldu v kombinaci s dobře známými vlastnostmi kyseliny hyaluronové při hojení ran a antibakteriálním účinkem přírodních mastných kyselin. (23)

Sklokeramické materiály mají celou řadu výhod a nevýhod při jejich použití v kostním tkáňovém inženýrství. (24)

Výhody obnášejí biodegradaci, mechanickou pevnost, struktura, možnost jejich tvarování a osteokonduktivitu. Biodegradace znamená, že dochází k postupnému rozkládání materiálu v těle a k nahrazování kostní tkáně. Mechanická pevnost dodává dostatečnou pevnost pro udržení stability v procesu remodelace kostní tkáně. Porézní struktura je ideální pro růst buněk, vaskularizaci. Možnost tvarování materiálu je důležitá při přizpůsobování nepravidelným tvarům kostních defektů. Osteokonduktivita sklokeramických materiálů podporuje přichycení buněk a tvorbu nové tkáně. (24)

Nevýhodami je biodegradace, mechanické vlastnosti, kompatibilita a výroba. Při biodegradaci může být její nevýhodou rychlost, kdy je biodegradace příliš rychlá nebo pomalá a dochází ke špatné regeneraci tkáně. Mechanické vlastnosti materiálů ukazují na jejich nedostatečnou pevnost a vysokou pórovitost, která může snížit stabilitu a narušení funkčnosti. Kompatibilita mezi tkáněmi a materiálem může ovlivnit regeneraci tkáně. Pro výrobu nemusí být jednoduché vyrobit zcela dokonalý skafold, který nebude finančně nákladný, technicky náročný. Na skafoldy v kostním TI jsou kladeny požadavky, které se musí brát v úvahu při správném výběru materiálu pro výrobu. Těmito požadavky jsou porozita, biokompatibilita, biodegradace a mechanické vlastnosti. (24)

Uvolňování iontů, zejména křemičitých a vápenatých, ze skolo keramických skafoldů při rozpouštění degradujícího bioaktivního skla vede ke zvýšenému růstu nové kosti. Řízeným uvolňováním iontů je zvyšována osteogeneze regulující proliferaci, diferenciaci a genovou expresi osteoblastů. Pro regeneraci kosti je nezbytné, aby osteoprogenitorové buňky prošly buněčným dělením a přijímaly z prostředí správné chemické stimuly, které jim dávají pokyn ke vstupu do buněčného cyklu. Některé studie naznačují, že nízké koncentrace produktů rozpouštění iontů mohou podporovat angiogenezi, což je důležité pro vývoj vaskularizace, která bývá v umělých kostních implantátech problémem, a tak zlepšovat regeneraci kosti. (24)

Angiogeneze hraje klíčovou roli ve vývoji skeletu a regeneraci kostí. Kost je hojně vaskularizovaná tkáň a angiogeneze je velmi důležitá pro její hojení. Uměle vytvořené skafoldy postrádají cévní zásobení, což bývá hlavním problémem a může to způsobit jejich následné selhání. V nedávných studiích bylo prokázáno, že bioaktivní sklo stimuluje sekreci angiogenních a osteogenních faktorů a může tak podporovat hojení a regeneraci kostí. Vyvíjení nových skafoldů z bioaktivního skla s řízeným uvolňováním iontů z biologicky odbouratelných materiálů může přinést další možnosti v oblasti výzkumu tkáňového inženýrství při opravách kostních defektů kritické velikosti. (24)

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala analýzou 3D biomateriálů pro kostní tkáňové inženýrství. Hlavním cílem bylo otestovat *in vitro* skafold, který by měl sloužit jako náhrada kosti. Teoretická část se ve své první části zabývala především kostní tkání, kostními buňkami a remodelací kostní tkáně. Druhá část popisovala kostní tkáňové inženýrství a historii kostního tkáňového inženýrství. V praktické části jsem zkoumala adhezi a proliferaci buněk na biomateriálech ze sklokeramického kompozitu. Zároveň byla testována cytotoxicita, která hraje důležitou roli v biokompatibilitě materiálu.

Z výsledků vyplývá, že skafoldy vyrobené ze sklokeramického kompozitu s různým složením materiálu měly rozdílný vliv na adhezi a proliferaci buněk MG-63. Nejlepší adheze byla pozorována u skafoldů T3, který obsahoval 14 wt% CaO a P₂O₅. Proliferace byla naopak jako nejlepší naměřena u skafoldů T1 a T2, kdy T1 obsahoval 9 wt% CaO a P₂O₅, T2 obsahuje 11 wt% CaO a P₂O₅. Cytotoxicita na testovaných skafoldech se zvláště projevila na skafoldu T3, již při prvotním setkání buněk s materiálem a i po 14 dnech. Podle výsledků by se dalo říct, že složení skafoldů ovlivnilo jak adhezi, proliferaci tak i cytotoxicitu materiálu, a jako materiál nejvhodnější pro kostní TI byl z testovaných vzorků vyhodnocen skafold T2.

Všech dílčích cílů práce bylo dosaženo a domnívám se, že výsledky z našeho testování by mohly pomoci k dalšímu výzkumu skafoldů v kostním tkáňovém inženýrství.

SEZNAM LITERATURY

1. FASSMANN, Antonín; IZAKOVIČOVÁ HOLLÁ, Lydie a SLAPNIČKA, Jan. *Kostní tkáňové inženýrství v orofaciální oblasti*. 1. Edice zubního lékařství (Nucleus HK). Hradec Králové: Nucleus HK, 2006. ISBN 80-862-2582-8.
2. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 3. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
3. MESCHER, Anthony L. *Junqueirovy základy histologie*. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-324-1.
4. AMINI, Ami R., Cato T. LAURENCIN a Syam P. NUKAVARAPU. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* [online]. 2012, **40**(5), 363-408 [cit. 2024-02-21]. ISSN 0278-940X. Dostupné z: doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10
5. BALÍK, Karel a Tomáš SUCHÝ. *Biokompozitní náhrady kostní tkáně*. Praha: Středisko společných činností AV ČR, v.v.i., pro Ústav struktury a mechaniky hornin Akademie věd ČR, 2015. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-0112-5.
6. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-874-1.
7. QU, Huawei; FU, Hongya; HAN, Zhenyu a SUN, Yang. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. Online. *RSC Advances*. 2019, roč. 9, č. 45, s. 26252-26262. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9RA05214C>. [cit. 2024-02-22].
8. HENKEL, Jan, Maria A. WOODRUFF, Devakara R. EPARI, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Research* [online]. 2013, 2013-9-25, **1**(3), 216-248 [cit. 2024-02-22]. ISSN 2095-4700. Dostupné z: doi:10.4248/BR201303002
9. OSTRÓ, Alexander a František LEŠNÍK. *Biologické aspekty regenerační medicíny*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2008. ISBN 978-80-7182-250-9.

10. O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88-95 [cit. 2024-02-23]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
11. DVORAKOVA, Jana, Lucie WIESNEROVA, Petra CHOCHOLATA, et al. Human cells with osteogenic potential in bone tissue research. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. 2023, **22**(1) [cit. 2024-02-14]. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/s12938-023-01096-w
12. SON, So-Ra, Nguyen-Thuy Ba LINH, Hun-Mo YANG a Byong-Taek LEE. In vitro and in vivo evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2013, 2013-02-21, **14**(1) [cit. 2024-02-24]. ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/14/1/015009
13. BABUSKA, Vaclav, Jan PALAN, Jana KOLAJA DOBRA, Vlastimil KULDA, Michal DUCHEK, Jan CERNY a Daniel HRUSAK. Proliferation of Osteoblasts on Laser-Modified Nanostructured Titanium Surfaces. *Materials* [online]. 2018, **11**(10) [cit. 2024-02-24]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma11101827
14. SHANBHAG, Siddharth, Samih MOHAMED-AHMED, Turid Helen Felli LUNDE, Salwa SULIMAN, Anne Isine BOLSTAD, Tor HERVIG a Kamal MUSTAFA. *Influence of platelet storage time on human platelet lysates and platelet lysate-expanded mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering* [online]. 2020, **11**(1) [cit. 2024-02-26]. ISSN 1757-6512. Dostupné z: doi:10.1186/s13287-020-01863-9
15. BILLIAU, A., V. G. EDY, Hubertine HEREMANS, J. VAN DAMME, J. DESMYTER, J. A. GEORGIADES a P. DE SOMER. Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1977, **12**(1), 11-15 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.12.1.11

16. ANSARI, Mojtaba. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials* [online]. 2019, **8**(4), 223-237 [cit. 2024-02-09]. ISSN 2194-0509. Dostupné z: doi:10.1007/s40204-019-00125-z
17. JODATI, Hossein, Bengi YILMAZ a Zafer EVIS. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceramics International* [online]. 2020, **46**(10), 15725-15739 [cit. 2024-03-11]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2020.03.192
18. VAS, Wollis J, Mittal SHAH, Rawiya AL HOSNI, Helen C OWEN a Scott J ROBERTS. Biomimetic strategies for fracture repair: Engineering the cell microenvironment for directed tissue formation. *Journal of Tissue Engineering* [online]. 2017, 2017-01-01, **8** [cit. 2024-02-29]. ISSN 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731417704791
19. CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA a Vaclav BABUSKA. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* [online]. 2019, **12**(4) [cit. 2024-03-09]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12040568
20. YU, Juhong, Hong XIA a Qing-Qing NI. A three-dimensional porous hydroxyapatite nanocomposite scaffold with shape memory effect for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science* [online]. 2018, **53**(7), 4734-4744 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-017-1807-x
21. CLARKE, Bart. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 2008, **3**(Supplement_3), S131-S139 [cit. 2024-03-11]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.04151206
22. KHALAF, Ahmad Taha, Yuanyuan WEI, Jun WAN, et al. Bone Tissue Engineering through 3D Bioprinting of Bioceramic Scaffolds: A Review and Update. *Life* [online]. 2022, **12**(6) [cit. 2024-03-12]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life12060903

23. DE LUCA, Stefania, Valentina VERDOLIVA, Saeid KARGOZAR a Francesco BAINO. Bioactive Glass-Ceramic Scaffolds Coated with Hyaluronic Acid-Fatty Acid Conjugates: A Feasibility Study. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2023, **14**(1) [cit. 2024-03-18]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb14010026
24. GERHARDT, Lutz-Christian a Aldo R. BOCCACCINI. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* [online]. 2010, **3**(7), 3867-3910 [cit. 2024-03-25]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma3073867