



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  
**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
Katedra biomedicínské techniky

---

**Porovnání multipotentních  
mezenchymálních stromálních buněk z  
lidské tukové tkáně a Whartonova želé pro  
rekonstrukci měkkých tkání**

**Comparison of multipotent mesenchymal  
stromal cells from human adipose tissue and  
Wharton's jelly for soft tissue reconstruction**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Autorka diplomové práce: Bc. Simona Stuchlíková  
Vedoucí diplomové práce: Dr. Yuriy Petrenko, Ph.D  
Konzultantka: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

---

**Kladno 2020**



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Stuchlíková** Jméno: **Simona** Osobní číslo: **456566**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra přírodovědných oborů**  
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**  
Studijní obor: **Přístroje a metody pro biomedicínu**

## II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

**Porovnání multipotentních mezenchymálních stromálních buněk z lidské tukové tkáně a Whartonova žele pro rekonstrukci měkkých tkání**

Název diplomové práce anglicky:

**Comparison of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and Wharton's jelly for soft tissue reconstruction**

Pokyny pro vypracování:

Tkáňové inženýrství a přístupy k buněčné terapii v obnovení měkkých tkání po vážném poškození způsobeném různými faktory. Multipotentní mezenchymální stromální buňky (MMSB) jsou snadno přístupné buněčné typy s jedinečným regeneračním potenciálem. Pro vyplnění zadání diplomové práce je nutné teoreticky a prakticky se seznámit s metodami kultivace MMSB z různých zdrojů a stanovení jejich proliferační aktivity, potenciálu tvorby kolonií, diferenciační účinnosti a zvládnout základní metody biomedicínského výzkumu v laboratoři buněčné biologie. Studentka v rámci diplomové práce: 1. vypracuje literární rešerši o biologii MMSB z různých zdrojů, popíše schopnost rekonstrukce měkké tkáně a různé typy buněčných a tkáňových kultur; 2. seznámí se a zvládne práci se sofistikovaným přístrojovým vybavením nutným pro osvojení metod tkáňového inženýrství; V experimentální části studentka: 3. stanoví proliferační aktivitu a potenciál tvorby kolonií MMSB kultivovaných z lidské adipózní tkáně a Whartonova žele během expanze a stanoví účinnost adipogenní diferenciace těchto buněk; 4. vyhledá a otestuje různé přístupy ke zvýšení adipogenní kapacity MMSB

Seznam doporučené literatury:

- [1] Andrzejewska, A., Lukomska, B. & Janowski, M., Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost, Stem Cells, číslo 37, 209, 855-864 s., doi:10.1002/stem.3016
- [2] Kalaszczynska, I. & Ferdyn, K., Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance, Biomed Res Int, 2015, doi:Artn 430847
- [3] Stosich, M. S. & Mao, J. J., Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery, Plastic and reconstructive surgery, číslo 119, 2007, doi:10.1097/01.prs.0000244840.80661.e7

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

**Mgr. Yury Petrenko, Ph.D.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

**RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.**

Datum zadání diplomové práce: **17.02.2020**

Platnost zadání diplomové práce: **19.09.2021**

doc. Ing. Lenka Lhotská, CSc.  
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.  
podpis ořkána(ky)

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Porovnání multipotentních mezenchymálních stromálních buněk z lidské tukové tkáně a Whartonova želé pro rekonstrukci měkkých tkání“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 20. 5. 2020

.....

Bc. Simona Stuchlíková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Dr. Yuriymu Petrenkovi, Ph.D za cenné rady a ochotu při vedení jak teoretické, tak praktické části diplomové práce, Ústavu Experimentální Medicíny Akademie věd a Biotechnologickému a biomedicínskému centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci, za umožnění provedení praktických pokusů v laboratořích. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Taťáně Jarošíkové, CSc. za realizaci a průběžné konzultace k této práci a vedoucí oddělení biomateriálů a biofyzikálních metod Ústavu Experimentální Medicíny Akademie věd PharmDr. Šárce Kubinové, Ph.D., která podpořila zpracováváný projekt. Práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR: BIOCEV (CZ.1.05 / 1.1.00 / 02.0109) a Národním programem udržitelnosti II (LQ1604) (projekt BIOCEV-FAR).

## **ABSTRAKT**

### **Porovnání multipotentních mezenchymálních stromálních buněk z lidské tukové tkáně a Whartonova želé pro rekonstrukci měkkých tkání**

Inženýrství tukové tkáně, založené na aplikaci multipotentních mezenchymálních stromálních buněk (MSC) představuje slibnou strategii pro obnovení defektů měkkých tkání. Vždy musíme určit správný zdroj MSC pro použití při rekonstrukci v inženýrství tukové tkáně. Jedním z kritérií definujících buňky podobné fibroblastům na MSC je schopnost odlišení od adipogenní linie. Účinnost diferenciací v závislosti na zdroji buněčné izolace není však vždy stejná a k nalezení optimálního zdroje MSC jsou nutné srovnávací studie pro rekonstrukce tukové tkáně / měkké tkáně. Cílem studie bylo zhodnotit potenciál MSC odvozený z tukové tkáně (AT) a Whartonova želé (WJ). Zjistili jsme, že účinnost adipogenní diferenciací *in vitro* je vyšší u MSC odvozených z lidské tukové tkáně, ve srovnání s Whartonovým želém. Posoudili jsme účinek koncentrace glukózy a přítomnost séra v adipogenním diferenciacím médiu a zjistili jsme, že absence glukózy a séra zcela zabránila adipogenezi MSC. Zvýšení koncentrace glukózy zvýšilo hromadění intracelulárních lipidů v AT-MSC, neovlivnilo však adipogenní diferenciaci WJ-MSC. Zjistili jsme, že účinnost tvorby kolonií je vyšší u AT-MSC ve srovnání s WJ-MSC, avšak proliferativní aktivita buněk tvořících kolonie byla vyšší v kulturách WJ-MSC. Bylo také prokázáno, že ačkoli aplikace destičkového lyzátu jako doplňku kultivačního média stimulovala buněčnou proliferaci během expanzní fáze, oslabilo adipogenní diferenciaci AT-MSC během buněčné diferenciací. Použití lidského sérového albuminu v buněčném diferenciacím médiu podpořilo adipogenezi AT-MSC a může být použito jako náhrada xenogenního séra v klinickém inženýrství tukové tkáně. Zhodnotili jsme také možnost využití zavedených kultivačních a diferenciacích podmínek pro inženýrství tukové tkáně ve 3D kolagenových scaffoldech a potvrdili jsme potenciál použití uzavřeného oscilačního perfuzního bioreaktorového systému. Tato studie tedy poskytuje cenné informace pro další vývoj štěpů vytvořených pomocí tukové tkáně pro aplikace regenerativní medicíny.

### **Klíčová slova**

multipotentní mezenchymální stromální buňky, tukové tkáňové inženýrství, rekonstrukce měkkých tkání, lidský destičkový lyzát, oscilační perfuzní bioreaktor, 3D lešení

## **ABSTRACT**

### **Comparison of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and Wharton's jelly for soft tissue reconstruction**

Adipose tissue engineering, based on the application of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) represents a promising strategy to restore soft tissue defects. The source of MSCs for the application in adipose tissue engineering may determine the efficiency of reconstruction strategy. The capacity to differentiate towards adipogenic lineage is one of the criteria defining fibroblast-like cells to MSC. However, the efficiency of the differentiation depending on the source of cell isolation is not determined as a standard and comparative studies are needed to find the optimal source of MSC for adipose / soft tissue reconstruction. The aim of the study was to evaluate the potential of MSCs derived from adipose tissue (AT) and Wharton's jelly (WJ) for adipose tissue engineering and soft tissue reconstruction. We found that the efficiency of adipogenic differentiation *in vitro* is higher in MSCs derived from human adipose tissue, compared to Wharton's jelly. We assessed the effect of glucose concentration and the presence of serum in the adipogenic differentiation medium and found that the absence of glucose and serum completely prevented the adipogenesis of MSCs. The increase of glucose concentration enhanced the accumulation of intracellular lipids in AT-MSC, however did not affect the adipogenic differentiation of WJ-MSCs. We determined that the colony-forming efficiency is higher in AT-MSCs compared to WJ-MSCs, however the proliferation activity of colony-forming cells was higher in WJ-MSC cultures. It was also detected that although the application of human platelet lysate as a supplement of culture medium stimulated cell proliferation during expansion stage, it attenuated adipogenic differentiation of AT-MSCs during cell differentiation. At the same time, the use of human serum albumin in cell differentiation medium supported the adipogenesis of AT-MSCs and can be used as a replacement of xenogeneic serum in clinical adipose tissue engineering. Finally, we assessed the possibility of using established culture and differentiation conditions for the adipose tissue engineering in 3D collagen scaffolds and confirmed the potential of using closed oscillating perfusion bioreactor system for adipose tissue engineering. Overall, the study provides valuable information for the further development of adipose tissue-engineered grafts for regenerative medicine applications.

### **Keywords**

multipotent mesenchymal stromal cells, adipose tissue engineering, soft tissue reconstruction, human platelet lysate, oscillating perfusion bioreactor, 3D scaffolds

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1 Rekonstrukce měkkých tkání .....	12
1.2 Lipotransfer .....	13
1.3 Výplně .....	13
1.3.1 Syntetické výplně .....	13
1.3.2 Přírodní plniva .....	14
1.4 Tkáňové inženýrství .....	15
1.4.1 Zdroje buněk tukového tkáňového inženýrství .....	16
1.5 Kmenové buňky .....	17
1.5.1 Multipotentní mezenchymální stromální buňky .....	18
1.6 Média a doplňky pro kultivaci MSC .....	19
1.6.1 Fetální hovězí sérum .....	19
1.6.2 Destičkový lyzát (PL) .....	20
1.7 Minimální kritéria multipotentních mezenchymálních stromálních buněk .....	21
1.8 Imunofenotypizace a diferenciaci .....	21
1.9 Multipotentní mezenchymální stromální buňky z lidské tukové tkáně a Whartonova žele v regenerativní medicíně .....	22
1.10 Scaffold .....	24
1.11 Bioreaktory .....	27
1.11.1 Typy bioreaktorů .....	27
1.12 Cíle práce .....	29
<b>2 Metody</b> .....	<b>30</b>
2.1 Izolace buněk .....	30
2.2 Buněčná kultura .....	31
2.3 Stanovení účinnosti tvorby kolonií .....	31
2.4 Stanovení metabolické a proliferační aktivity MSC během kultivace .....	31
2.5 Adipogenní diferenciaci .....	32
2.5.1 Indukce adipogenní diferenciaci .....	32
2.5.2 Stanovení účinnosti adipogenní diferenciaci .....	33

2.6	Výsev MSC do kolagenových nosičů .....	34
2.7	Oscilační perfuzní bioreaktor .....	34
2.8	Morfologie a životaschopnost buněk ve 3D želatinových nosičích.....	35
2.9	Statistická analýza .....	36
<b>3</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>37</b>
3.1	Porovnání proliferačního, samoobnovovacího a adipogenního diferenciačního potenciálu MSC odvozených z lidské tukové tkáně a pupečníkové šňůry Whartonovy želé. ....	37
3.1.1	Účinnost adipogenní diferenciace AT- a WJ-MSC.....	37
3.1.2	Vliv složení kultivačního média na adipogenní diferenciaci AT-MSC a WJ-MSC .....	38
3.1.3	Kolonotvorná aktivita AT- a WJ-MSC .....	42
3.2	Klinicky relevantní podmínky adipogenní diferenciace AT-MSC .....	45
3.2.1	Proliferace AT-MSC v přítomnosti FBS nebo lidského PL.....	45
3.2.2	Adipogenní diferenciace AT-MSC v médiu obsahujícím doplňky lidského původu.....	46
3.3	Adipózní tkáňové inženýrství ve 3D prostředí s využitím oscilačního perfuzního bioreaktorového systému a porézního kolagenu.....	49
<b>4</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>55</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>56</b>
	<b>Příloha A: Obsah příloženého CD.....</b>	<b>68</b>



## Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AFG	Autologní vštěpení tuků ( <i>autologous fat grafting</i> )
AT –MSC	Multipotentní mezenchymální stromální buňky z lidské tukové tkáně ( <i>multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue</i> )
BAT	Hnědá tuková tkáň ( <i>brown adipose tissue</i> )
bFGF	Základní fibroblastový růstový faktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BM-MSC	Stromální kmenové buňky kostní dřeně ( <i>bone marrow stromal stem cells</i> )
BMP	Kostní morfogenetický protein ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
BVD	Virus průjmu hovězího dobytka ( <i>bovine virus diarrhoea</i> )
CaHA	hydroxyapatit vápenatý ( <i>calcium hydroxyapatite</i> )
CD	Označení klastru ( <i>cluster designation</i> )
CFU-F	Kolonie tvořící jednotky – fibroblasty ( <i>colony forming units-fibroblast</i> )
DAT	Decelularizovaná tuková tkáň ( <i>decellularized adipose tissue</i> )
DMEM	Dulbecovo modifikované orlí médium ( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
ECM	Extracelulární matice ( <i>extracellular matrix</i> )
EDC	Vývozní rozvoj Kanady ( <i>export development Canada</i> )
EGF	Epidermální růstový faktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
FBS	Fetální hovězí sérum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FGF	Fibroblastový růstový faktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
HA	Hydroxyapatit
HGF	Faktor růstu hepatocytů ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HSA	Lidský sérový albumin ( <i>human serum albumin</i> )
IBR	Infekční bovinní rinotracheitida ( <i>infectious bovine rhinotracheitis</i> )
IGF	Růstový faktor podobný inzulinu ( <i>insuline-like growth factor</i> )
IGFBP2	Vazebný protein podobný růstovému faktoru inzulinu 2 ( <i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2</i> )
ISCT	Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii ( <i>International Society for Cellular Therapy</i> )
KKM	Kompletním kultivačním médiu ( <i>complete culture medium</i> )
MMSB	Rada pro správu více materiálů ( <i>multi-materials stewardship board</i> )
MSC	Mezenchymální kmenové buňky ( <i>mesenchymal stromal/stem cells</i> )
NAD	Nikotinamidadenin dinukleotid
NADH	Nikotinamidadenin dinukleotid redukovaný
P-TCP	P-trikalciumfosfát
PCL	Poly (ε-kaprolakton)
PDGF	Růstový faktor odvozený z krevních destiček ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
PEG	Poly (ethylenglykol)
PI3	Hovězí parainfluenza-3 ( <i>bovine parainfluenza-3</i> )
PL	Destičkový lyzát ( <i>platelet lysate</i> )
PLA	Kyselina polymléčná ( <i>polylactic acid</i> )
PLC	Certifikované ( <i>post leaving certificate</i> )
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PLL	Poly(L-lysin)
PLLA	Kyselina poly-L-mléčná ( <i>poly-L-lactic acid</i> )
PMMA	Polymethylmethakrylát
PRP	Plazma bohatá na destičky ( <i>platelet rich plasma</i> )

TGF	Transformující růstový faktor ( <i>transforming growth factor</i> )
TPP	Transpacifické partnerství ( <i>trans-pacific partnership</i> )
UC	Pupeční šňůra ( <i>umbilical cord</i> )
UMC	Matrice pupeční šňůry ( <i>umbilical cord matrix</i> )
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
WAT	Bílá tuková tkáň ( <i>white adipose tissue</i> )
WJ-MSC	Multipotentní mezenchymální stromální buňky z Whartonova želé ( <i>multipotent mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly</i> )

---

# 1 Úvod

Mnoho různých vědních oborů jako například medicína, buněčná a molekulární biologie, technické obory, zejména materiálové vědy a biotechnologie se spojily v obor nazvaný tkáňové inženýrství. Jeho úkolem je získávání kmenových buněk z lidské tkáně, jejich úprava za pomoci scaffoldů a bioreaktorů a následná implantace, aby bylo dosaženo co nejlepšího a nejkvalitnějšího života od mládí až do pozdního věku.

Tématem této diplomové práce je porovnání multipotentních mezenchymálních stromálních buněk (MSC) z lidské tukové tkáně a Whartonova želé pro rekonstrukci měkkých tkání. Základem je dokonalé poznání lidského organismu a všech složek, se kterými budeme pracovat. Popsány budou možnosti odběru jednotlivých typů kmenových buněk, práce s nimi i jednotlivé zákroky a defekty, při kterých je možno tyto buňky využít. Zaměřím se na možnosti využití syntetických materiálů i biomateriálů, na média a doplňky pro kultivaci MSC. Představím scaffoldy - nosiče, jako podpůrné struktury pro růst buněk a bioreaktory, které bývají při práci hojně využívány.

V praktické části představím metodiku všech částí postupů: izolaci buněk, buněčnou kulturu, stanovení účinnosti tvorby kolonií, stanovení metabolické a proliferační aktivity MSC během kultivace, indukci adipogenní diferenciaci a její účinnosti, výsev MSC do kolagenových nosičů, oscilační perfuzní bioreaktor a morfologii a životaschopnost buněk ve 3D kolagenových nosičích zakončené statistickou analýzou.

Jako poslední budou popsány výsledky všech provedených praktických experimentů, bude uskutečněn jejich porovnání a zjištění vhodnosti či nevhodnosti pro daný zákrok.

Vývoj nových technologií a terapeutických strategií jde v této oblasti velice rychle kupředu a možnosti léčby kmenovými buňkami jsou zdaleka nevyčerpané. Bezpochyby i další generace budou pokračovat v bádání, a to jistě přinese novinky, o kterých dnes ještě nemáme ani tušení.

## 1.1 Rekonstrukce měkkých tkání

Rekonstrukce měkkých tkání se provádí především v plastické chirurgii, kde se díky přenosu tukové tkáně dá provést řada zákroků, jako je například: zvětšování poprsí, omlazení obličejové části, nápravy kůže po deformaci způsobené úrazy (popáleniny, omrzliny, úrazy elektrickým proudem, poleptání, radiační poškození, nemoc z ozáření, celková intoxikace), či terapie nádorů. Dále sem spadá oprava poprsí po částečné, nebo radikální modifikované mastektomii a náprava vpáčeného hrudního koše. [1] Tuková tkáň je sofistikovaná a dynamická sada heterogenních populací, které jsou schopny tvorby a reakce na hormony, vytváření vaskulatury, ukládání energií a přeměňování neaktivních prekurzorových buněk na buňky zralé a na stimuly [2].

V lidském organismu se nacházejí dva hlavní typy tukové tkáně (hnědá (BAT - brown adipose tissue) a bílá (WAT - white adipose tissue)) [3].

BAT je odpovědná za vytváření tepla, neboť při porodu nastává rychlý pokles teploty a k přežití stresu spojeného právě s poklesem tohoto tepla. Nastává termogeneze, kde se rozkládají triglyceridy, vytvářejí teplo, které se přenáší přes tkáňovou vaskulaturu a teplo dodává. Při narození je BAT přenášena do celého těla a je možno ji najít i v malých skladech v rámci WAT. V průběhu vývoje se obsah hnědé tukové tkáně snižuje a zvyšuje se obsah tukové tkáně bílé, která funguje nejen jako zdroj energie, ale je považována i za endokrinní orgán zapojený do metabolismu. V některých případech při vysokém nadbytku WAT může způsobit i některé patologické stavy. [3]

WAT se vyskytuje v celém těle. Je složena převážně ze zralých adipocytů, které obsahují velké lipidové kapičky, stromální cévní buňky a rozsáhlý systém krevních cév, lymfatických uzlin a nervů – přítomných v extracelulární matrici složené z kolagenů a proteinů. WAT je převládající formou tukové tkáně u lidí, proto se strategie tkáňového inženýrství a rekonstrukce ubírá ve svém výzkumu právě tímto směrem. [2][3]

V posledních letech se začalo využívat mnoho různých technik a materiálů pro augmentaci měkkých tkání [4]. Standardně se využívalo autologního štěpení tuku (AFG - autologous fat grafting), které nebylo příliš spolehlivé. V současné době se vyvíjí nové technologie, které se zaměřují na nejnovější terapeutické strategie pro léčbu defektů tukové tkáně pomocí formulací, dodávání biomolekul a konkrétně vytvořených biomateriálů. [5]

## 1.2 Lipotransfer

Lipotransfer je plastická operace, kde se podstupují dva zákroky najednou, a využívá se vlastního tuku pacienta [6]. Tímto způsobem se může provádět nejen omlazování, výplně vrásek, zvětšování rtů, kde vlastní tuk již chybí, tak i doplnění tuku na místech kde již je, například prsa, hýždě a podobně [3][6]. Odběr tkáně se provádí speciální liposukční kanylou, stejně jako u klasické liposukce, ale měl by být šetrný. Následně se tuková tkáň čistí, aby byl získán stejnorodý štěp. I čištění tukové tkáně může být prováděno různými způsoby, například: nechat pouze odstát a poté odpustit přebytečnou tekutinu, nebo použít sáček Puregraft se speciální membránou, která propustí krev, volný tuk a tumescenční tekutinu [1]. Nejčastěji se však využívá centrifugace při 3000 otáčkách po dobu 3 minut, kde se po odstředění vytvoří vrstvy lehčích a těžších komponent [1][5]. Nejdůležitějším momentem procesu fatgraftingu je aplikace získané výplně. Za použití tupé aplikační kanyly a dodržení příslušné techniky aplikujeme štěp. [1] Ačkoliv je přenos štěpů klinicky velice využíván, má své nevýhody. Dochází zde k nepředvídatelné resorpci a ztrátě objemu s mírou přežití štěpu 20-90%. Tato vysoká míra reabsorpce a nízká míra přežití transplantovaného tuku způsobují nízkou účinnost této techniky. V současné době je výzkum zaměřen na přidání růstových faktorů (inzulín, vaskulární endoteliální růstový faktor a další). [7] Tímto obohacením je očekáván lepší výsledek přežití štěpu. Proto dnešní techniky využívají přenosu zralé tukové tkáně, i když v praxi autologního přenosu tuků je stále ještě mnoho nepředvídatelných výsledků. [2][7] Lipotransfer se nedoporučuje provádět při virových onemocněních jako je angína, chřipka a jiné. Na závalu je i pokožka spálená nadměrným vystavováním slunečnímu záření, zvýšená tělesná teplota, čerstvé úrazy, odřeniny, jizvy, pooperační stavy a rovněž chronická onemocnění kůže a hnisavé rány. V těchto případech by lipotransfer mohl způsobit více škody, než užitku. [8]

## 1.3 Výplně

Nežádoucími jevy vyskytujícími se v obličeji jsou poúrazové jizvy, jizvy po akné, vrásky jako projevy stárnutí a podobně. Dnes je již možné použít různých dermálních plniv, kterými lze zjizvení výrazně zlepšit, nebo i odstranit. [9]

### 1.3.1 Syntetické výplně

Polymethylmethakrylát (PMMA) je syntetický výplňový materiál, který je využitelný pro kosmetické účely. 20% mikrokuliček PMMA se rozpustí ve vodném roztoku bovinního kolagenu a lidokainu [10]. Při vyplnění tkáně tímto přípravkem dochází k vysokému a dlouhodobému účinku, neboť dochází ke stimulaci kolagenu a tím i zlepšení kvality pokožky [10][11]. Avšak i tento materiál může mít v dlouhodobém horizontu, vzhledem ke své povaze, nežádoucí účinky [10].

Mezi další syntetická plniva patří hydroxylapatit vápenatý (CaHA), který je biologicky rozložitelný, semipermanentní a biostimulační. Obsahuje 30% mikročástic rozpuštěných v karboxy-methylcelulózovém gelu. Vylepšení jizvy je dosaženo pomocí chirurgického zákroku a CaHA. Působí pomalu, zvětšení měkkých tkání trvá až jeden a půl roku. [10][12]

Kyselina poly-1-mléčná (PLLA) je komerčně dostupný produkt, je biodegradabilní, semipermanentní a biostimulační. Skládá se z PLL mikročástic, sodné karboxy-methylcelulózy a mannitolu. Hojně se využívá při zlepšování atrofického akné, kde zvětšení měkkých tkání může trvat dva až čtyři roky. [10] Léčebný postup obsahuje několik sezení s šestitýdenními odstupy. Bezprostředně po injekci může nastat přechodný nežádoucí účinek, jako je otok, zarudnutí a modřiny v místě vpichu, které časem spontánně vymizí. [13] Při aplikaci je třeba dodržovat předepsané postupy, neboť povrchní injekcí, nebo nevhodným ředěním mohou vznikat uzly [10][13].

Polyakrylamid je vyráběn polymerací akrylamidových monomerů a zesíťováním s N, N'- methylenbisakrylamidem. Je to nevstřebatelný hydrogel, který je složen 2,5% zesíťovaného polyakrylamidu a 97,5% vody[10]. Jde o bezbarvý, průhledný gel. [14] I zde jsou uváděny kromě míry spokojenosti některé nežádoucí účinky, jako je otok, hrudkovitost a tvorba abscesů [10][14].

Silikon se už dlouho používá jako plnivo při augmentaci měkkých tkání. Zastánci tvrdí, že produkt je stabilní, relativně levný a má antimikrobiální aktivitu, avšak žádný z těchto výrobků není jako plnivo měkkých tkání schválen. Bylo zaznamenáno mnoho nežádoucích účinků, jako je infekce, pneumonitída, kalcifikace, plicní embolie, selhání ledvin a někdy i smrt. Velkým problémem je také nežádoucí migrace silikonu. [10][15]

Některé syntetické štěpy nemají vlastně žádnou funkčnost, zajišťují pouze strukturu a formu v místě implantátu. Náhrady umělé mají pouze omezenou životnost, při jejich i nepatrném posunu může imunitní systém spustit obranou reakci a způsobit hlubkový zánět, který vzniká nejen v místě implantátu, ale postupně se šíří celým tělem. Také se může stát, že umělou náhradu tělo vůbec nepřijme. Právě tato negativa vyvolala zájem o nové a lepší technologie [16].

### **1.3.2 Přírodní plniva**

Dále se využívá i některých přírodních výplní, jako je například upřednostněná kyselina hyaluronová (HA) [4]. Je to dermální plnivo, které může být použito jako objemový gel [17]. HA má v mladém organismu vysoké hydratační účinky, stárnutím jí ubývá, a proto musí být do organismu doplňována. Dalším přírodním plnivem je kolagen, který byl využíván jako první při modelaci povrchových linií obličeje [4]. Kyselina hyaluronová je nejvšestrannějším plnivem měkkých tkání, ale její nevýhodou je, že se resorbuje v době od tří měsíců do jednoho roku [4][9]. Pro tuto její krátkou trvanlivost byly podniknuty další studie, které ukázaly, že HA může být kombinována

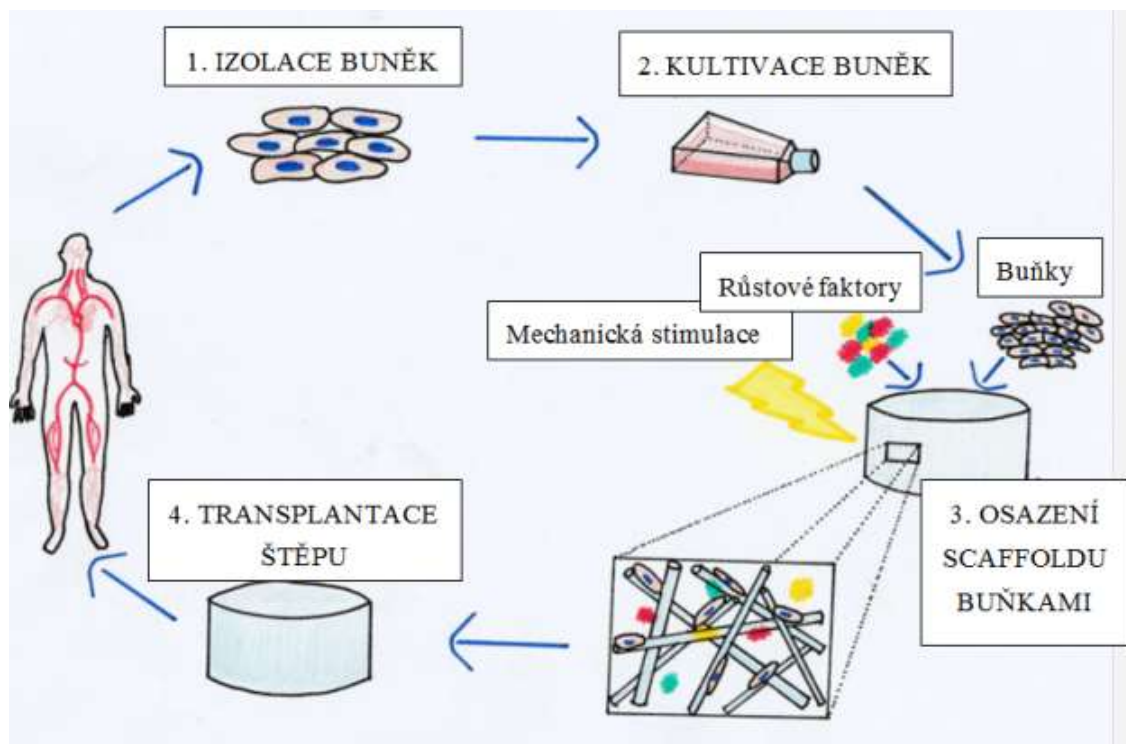
s růstovými faktory a buňkami, což prodlouží její proces vstřebávání [4]. Kolagen je nerozpustná bílkovina, která tvoří základ pojivových tkání. Dnes je známo 27 typů kolagenů. Jako dočasná jsou využívána plniva prasečího, hovězího a rekombinantního lidského původu. Nejvíce kolagenu bývá obsaženo v kůži, kde je zajištěno plynulé vlhčení buněk a tím správná pružnost a pevnost. Při použití kolagenových plniv trvá zvětšení měkkých tkání obvykle šest měsíců, ale v některých případech vydrží účinek až dvanáct měsíců. Nevýhodou je, že nemohou být použita u pacientů, kteří jsou na kolagen přecitlivělý, anebo mají autoimunitní choroby. [9][10]

## 1.4 Tkáňové inženýrství

Rekonstrukcí měkkých tkání se zabývá tukové tkáňové inženýrství, kde je nutné komplexně porozumět fyziologii tkáně *in vivo*. Tato znalost umožní, aby se konstruované komponenty integrovaly tak, aby tkáň, která je regenerována byla svou strukturou mechanicky i funkčně vhodná pro místo implantace. [3]

Tkáňové inženýrství je obor, ve kterém jsou spojeny různé oblasti – medicína, buněčná a molekulární biologie, technické obory, zejména materiálové vědy a biotechnologie. Toto inženýrství využívá stejnou měrou jak buněk a biomateriálů, tak i inženýrských přístupů. [16][18] Díky těmto postupům se provádí 2D a 3D konstrukce porézních substrátů, na kterých je možnost optimálního růstu buněk, které pak vytvoří podklad pro vývoj nové tkáně [2]. Tato nová tkáň potom může sloužit k obnově, zachování, nebo zlepšení funkce. Takto by bylo možno obnovit, nebo nahradit poraněné části těla, nebo různé defekty způsobené stárnutím. [16][18]

Pro názornost je uvedeno schéma tkáňového inženýrství na obrázku 1.1 níže. Prvotní odběr buněk (1) provádí chirurgickým zákrokem lékař a následně se práci s tkání *in vitro* věnují laboratorní zaměstnanci různých oborů. Odebrané buňky se kultivují ve speciálních lahvích k tomu určených (2). Po době potřebné k získání jejich určitého počtu se aplikují na scaffoldy, kde opět následuje kultivace (3D) za použití určitých médií, která byla vyhodnocena jako nejlepší pro danou práci s rostoucí tkání (3). Závěrem probíhá implantace na určené místo v lidském organismu (4) a po stanovené době se prováděný zákrok vyhodnotí. Konečné výsledky jsou zaznamenány, uchovávány pro další rozvoj a zlepšení metod postupů v daném oboru. [16][18]



**Obr. 1.1:** Schéma tkáňového inženýrství [vlastní tvorba]

### 1.4.1 Zdroje buněk tukového tkáňového inženýrství

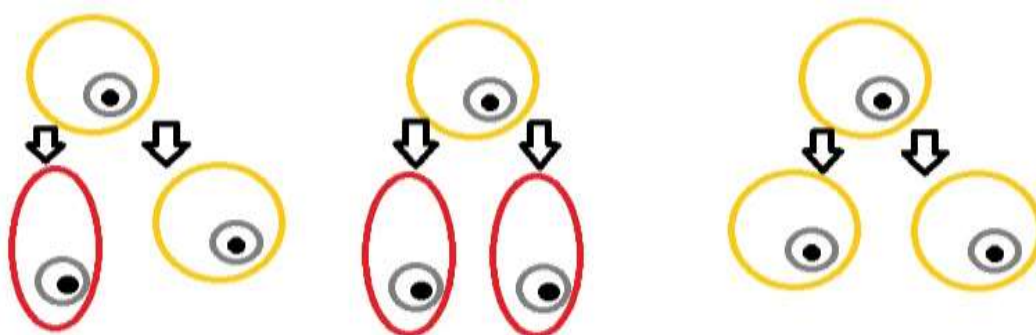
Buňky lze považovat za hlavní součást tkáňového inženýrství. Výběr správného typu buněk s vysokou adipogenní diferenciací kapacitou je klíčovým faktorem pro rekonstrukci tukové tkáně. [20]

Ke zkoumání buněk tkáňového tukového inženýrství pro proces adipogeneze se používají různé buněčné linie, které jsou schopny diferenciací na tuk. Tyto stabilní buněčné linie se mohou snadno zvětšovat a je možné u nich dosáhnout velkého objemu [20]. Preadipocytární linie, které se používají pro výzkum, jsou komerčně dostupné myší linie 3T3-F442A, 3T3-L1 a Ob17. Výhodou každé z nich je jejich homogenita, dobrá definovatelnost a schopnost rozšíření kultury. *In vitro* se buněčné linie v přítomnosti séra diferencují na adipocyty a zastaví svůj růst. Také *in vivo* byla prokázána adipogeneze, a to subkutánní implantací prekurzorových buněk do imunokompromitovaných myší. Chování těchto buněčných linií preadipocytů ne vždy odráží skutečné buněčné chování *in vivo*, a proto probíhají rozsáhlé studie primárních buněk (hlavně kmenové / progenitorové buňky) pro de novo adipózní tkáňové inženýrství. [2][21][22]



## 1.5 Kmenové buňky

Biologie kmenových buněk je poměrně mladé odvětví, ale má své opodstatnění, neboť přináší moderní medicíně velké naděje, ale zároveň před ni staví i velké úkoly. Vývoj tohoto odvětví lze jen těžko předvídat, ale zcela jistě bude během tohoto století otevřeno mnoho nových možností. Kmenové buňky jsou takové, které mají schopnost obnovovat poškozené a opotřebené části organismu. Jejich schopnost sebeobnovy je časově neomezená. Schopnost diference je důležitá při opravě poškozených částí těla a to zejména tam, kde jsou poškozené orgány tvořené buňkami, které se dělit nemohou. S každým novým dělením takovéto buňky vzniká několik variant výsledného dělení. Může nastat rovnovážný stav tzv. asymetrické dělení, kdy z jedné kmenové buňky mateřské vznikne jedna buňka totožná a druhá buňka, která je schopná se diferenciovat (Obrázek 1.2). [23]



**Obr. 1.2:** Kinetika kmenových buněk (zleva: asymetrické dělení - rovnovážný stav, symetrické dělení - diferenciacní stav a proliferativní stav) [vlastní tvorba]

Toto dělení zajišťuje neustálou obnovu kmenových buněk a zároveň diferenciaci ve speciální potřebné buňky. Dalším typem je dělení symetrické. Může nastat diferenciacní stav, kdy se z kmenové buňky stanou dvě buňky speciální a tím zaniká sebeobnova kmenových buněk. Poslední možností je proliferativní stav, kdy z každé kmenové buňky vzniknou dvě tyto totožné buňky a nenastane žádná diferenciaci do speciálních potřebných buněk. [23]

Buňky lze rozdělit do několika kategorií. Podle schopnosti diferenciaci, (ne všechny z kmenových buněk jsou schopny diferenciaci ve stejném rozsahu). Rozlišení: Totipotentní kmenové buňky – možnost vzniku kompletního nového organismu, vznik placenty, lidská zygota a blastomery. Pluripotentní kmenové buňky - vznik buněk jakéhokoliv buněčného typu organismu, tedy kterékoliv ze tří zárodečných buněk listů embrya, vznik placenty, není možný vznik nového organismu. Multipotentní kmenové buňky – diferenciací vzniká několik buněčných typů např.: tkáň, nebo orgán. Zde je produkován omezený počet buněk v rámci jednoho zárodečného listu. Multipotentní jsou kmenové buňky kůže, krvetvorné, které se dále

dělí na krvinky, erytrocyty, lymfocyty atd. Unipotentní kmenové buňky - ty se přeměňují pouze na jediný buněčný typ. Z kmenových buněk kůže vznikají keratinocyty a ze spermatogoniálních kmenových buněk vznikají spermie. [23]

Dále můžeme kmenové buňky (SC) dělit dle původu a vlastností. Dělí se na: Embryonální kmenové buňky – je možno je získat z vyvíjejícího se lidského embrya ve stádiu blastocysty. Tyto buňky jsou vzhledem ke svému původu z lidských embryí nejkontroverznějším druhem kmenových buněk. Indukované pluripotentní kmenové buňky – odebrání diferenciováných buněk z těla, aby posléze bylo možné jejich umělé navrácení a přeměna na chtěný typ buňky. Nijak nepoškozuje lidský život a je eticky vysoce přijatelný. Adultní kmenové buňky – izolace je prováděna z dospělého člověka, z tkání plodu a pupečnickové krve. Buňky jsou multipotentní, omezeny pouze na specializovaný okruh buněk. V současné době jsou dospělé kmenové buňky nejpoužívanějším typem buněk v klinickém tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. [23]

### **1.5.1 Multipotentní mezenchymální stromální buňky**

Multipotentní mezenchymální stromální buňky (MMSC – Multipotent mesenchymal stromal cells) jsou adultní progenitorové buňky se schopností obnovit mezenchymální či krvetvorné tkáně, která je poškozená [24]. Řadí se mezi nejpoužívanější kmenové buňky regenerativní medicíny, které se snadno získávají a kultivují [25]. Buňky se mohou diferenciovat dle zevních podmínek na různé mezenchymové buněčné populace. Jde například o přeměnu v osteocyt, osteoblast, myocyt, kardiomyocyt, chondrocyt, neuron a další [24][26]. Tyto kmenové buňky mají využití při kardiovaskulárních onemocněních, osteoartritidě, diabetes, Crohnově chorobě, otorhinolaryngologických patologiích, při transplantacích kostní dřeně rakovin krve a podobně. [25]. Mezenchymální buňky jsou díky schopnosti takovýchto přeměn vhodné pro práci v buněčné terapii a regenerativní medicíně. Jako mezenchymové kmenové buňky se často označují stromální kmenové buňky kostní dřeně (BM-MSC - bone marrow stromal stem cells). [24]

Již v roce 1867 vypořádal patolog Cohnheim, že se v kostní dřeni (BM – bone marrow) vyskytují nehematopoetické kmenové buňky, které by mohly být zdrojem fibroblastů, které napomáhají hojení ran. Izolovat a kultivovat tyto buňky *in vitro* se však podařilo teprve o století později Friedensteinovi a jeho kolegům. V roce 1988 Owen navrhl stromální systém se stromální buňkou u základů hierarchie. Stále se však pracovalo pouze se zvířecími modely, ale potenciál lidské dřeně nebyl ještě prozkoumán. Teprve v roce 1992 se podařilo Haynesworthovi a spol. obohatit dosud známé buňky v kultuře o osteochondrogenní potenciál pocházející z lidské dřeně. Počátkem 90. let objevil Kaplan izolaci z lidské kostní dřeně progenitorové buňky a označil je za MSC. [27] Tyto MSC získaly velkou popularitu a byly postupně nacházeny nejen v kostní dřeni, dlouhých kostech, ale také v tukové tkáni, pupeční žíle,

pupečníkové krvi, synoviální membráně, periferní krvi plic a v zubní vláknině. Postupem času bylo zjištěno, že progenitorové buňky se vyskytují *in vivo* kolem krevních cév (tepny, žíly, kapiláry) a jsou perivaskulárního původu. [26][27] Vlastnosti buněk všech jmenovaných zdrojů byly srovnatelné s buňkami MSC získanými z BM. Jako první byly klinicky použity MSC pro léčbu pacientů s rakovinou a osteogenezí imperfekta, a to v letech 1995 – 2000. [27]

## **1.6 Média a doplňky pro kultivaci MSC.**

K základním médiím patří komplexní a definovaná. Komplexní média obsahují organický zdroj živin například kvasnice, výtažky masa, či proteinové hydrolyzátory. U definovaných médií je vždy známo složení, jsou to například čisté esenciální složky, minerální soli, nebo zdroje uhlíku a energie. [28]

Aby mohlo být dobře navrženo složení média, je důležité vědět o účelu kultivace a její biochemii, která bude mít vliv na metabolismus a fyziologii buněčné populace. Cena jednotlivých složek média je poměrně vysoká, proto se vždy hledá přijatelné východisko mezi dostupností složek, cenou a případných doplňkových experimentů, které by bylo možno provést. Živiny v médiu slouží jako zdroj stavebního materiálu, zdroj energie a mají vliv na složení výsledných buněk. Základními prvky pro zdárný vývoj je uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor a síra. [28]

### **1.6.1 Fetální hovězí sérum**

Fetální hovězí sérum (FBS - Fetal Bovine Serum) se získává ze zvířat nejen českého ale i evropského původu. Tato zvířata musí být v souladu s evropským nařízením číslo 999/2001 testována na nemoc šílených krav (BSE - Bovinní spongiformní encefalopatie) a toto testování musí být negativní. Odběr FBS je prováděn z koagulované plné krve odebrané srdeční punkcí z plodu. [29] Následně je zbavena buněk fibrinu a srážecích faktorů. V tekutině ale zůstává mnoho nutričních a makromolekulárních faktorů, které jsou nezbytné pro vývoj a růst buněk. Hlavní složkou FBS je hovězí sérový albumin. [30] Ve FBS jsou též obsaženy hormony, cukry, tuky a AMK (aminokyseliny) [31]. Je důležité vědět, že lidské buňky kultivované z FBS se chovají jinak, než lidské buňky kultivované s lidským sérem. FBS má též své využití při výzkumu, výrobě a kontrole humánních a veterinárních vakcín a biotechnologických léčiv. [30]

### **ZPRACOVÁNÍ**

Nabíraná krev je neprodleně odstředěná a vzniklé sérum zmrazeno pro transport do potřebných léčebných zařízení [29]. Poté probíhá další zpracování rozmrazením a zahřátím na teplotu 56 °C po dobu 30 minut ve vodní lázni a průběžného promíchání [30]. Zahřáté médium se následně testuje na přijatelnost pro následnou práci, dále

probíhá sérum dalšími třemi sterilizačními filtry (100 nm) a po procesu aseptického plnění se slijí do lahví. Během celého procesu výroby a zpracování je každá šarže sledována až do konečného balení. Všechny lahve jsou označeny šarží a všechny dodávky FBS jsou taktéž označeny zeměpisným původem a osvědčením o analýze. [29] Nejlepšího uchování FBS lze dosáhnout ve zmrazeném stavu mezi -5 °C a -20 °C a rozmrazování před použitím by mělo probíhat při teplotách 2 °C – 8 °C. Zmrazené sérum by se mělo vždy odebírat v menších dávkách (50ml), aby bylo zabráněno neustálému rozmrazování a zmrazování produktu. [30]

Séra jsou také důkladně testována na sterilitu, viry (BVD - Bovine virus diarrhoea, IBR - Infectious bovine rhinotracheitis a PI3 - Bovine parainfluenza-3 ) a mykoplazmy. Každá šarže musí být odolná vůči buněčnému růstu *in vitro*. Certifikovaná a speciálně certifikovaná séra prochází další spoustou testů na endotoxiny, ELFO proteinů, chemické složky a radiální imunodifúze. [29] Mezi hlavní země, které poskytují FBS patří, kromě zemí evropské unie také Austrálie, Kanada, USA, Nový Zéland a několik zemí ve Střední a Jižní Americe. Produkce FBS je regulována vládními agenturami jednotlivých zemí s označením USDA – Grade, nebo European – Grade. [30]

### 1.6.2 Destičkový lyzát (PL)

Destičkový lyzát (PL - Platelet Lysate) je využit hlavně pro vývoj a výzkum v regenerativní medicíně. Je zařazen mezi nutriční suplementy do médií, která slouží pro kultivaci kmenových buněk a některých specifických typů buněk lidských. Destičkový lyzát je přídavná látka, která po promíchání se základními složkami média vytvoří velice hodnotné kultivační médium. Je to vlastně proteinový doplněk pro kultivaci různých lidských buněk včetně kmenových. Na růst lidských buněk má tato biologicky aktivní látka významný proliferační účinek. Nejvýznamnější růstové faktory zde jsou například VEGF - vascular endothelial growth factor, TGF -transforming growth factor, IGF - insuline-like growth factor a další. Destičkový lyzát je získán z výchozí plazmy bohaté na destičky (PRP – platelet rich plasma) mražením. Na štítku každého takového produktu musí být uvedeno množství výchozích trombocytů. Před přípravou kultivačního média je doporučeno provést filtraci. [32]

Souběžně s rozšířením *in vivo* použití přípravků získaných z destiček bylo v 80. letech minulého století započato s využitím destičkových lyzátů pro proliferaci buněk *in vitro*. Lyzáty byly účinně použity pro kultivaci fibroblastů, endoteliálních buněk nebo nádorových buněčných linií. Novými studiemi od roku 2005 byla popsána příprava a efektivní využití HPL pro rozšíření MSC. Bylo také prokázáno, že jak alogenní tak autologní HPL jsou pro stimulaci buněčné proliferace lepší než FBS. Tato vysoce účinná stimulace buněčné proliferace umožnila rozsáhlou expanzi MSC pro klinické použití. [33]

## 1.7 Minimální kritéria multipotentních mezenchymálních stromálních buněk

Pro možnost posouzení identity MSC by bylo třeba dodržovat minimálně tři kritéria navržená ISCT (International Society for Cellular Therapy - Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii), a to diferenciaci tří linií, adheze k plastu a exprese specifického povrchového antigenu (viz Tabulka 1). Cílem by bylo vyřešit nejasnosti, které se týkají funkce a identifikace MSC. Tento podnět je zásadním krokem ke sjednocení výsledků všech světových laboratoří. Neboť v době, kdy se buněčné přípravky MSC stanou komerčně dostupnými, nemohou mít jednotlivé laboratoře vlastní kritéria, aby nedocházelo k různým výsledkům, které by nemohly být porovnatelné. [26][27][34]

## 1.8 Imunofenotypizace a diferenciaci

Imunofenotypizace je proces, ve kterém se třídí buňky imunitního systému a to na základě funkčních a strukturálních rozdílů [35][36]. Běžně je použit k rozboru a třídění buněk do podskupin na základě CD (cluster designation) antigenů s využitím techniky průtokové cytometrie. CD antigeny jsou velice specifické pro jednotlivé typy daných buněk a jsou velice dobře využitelné k přesnému vyhledání a označení buněk. [26][35][36]

Diferenciaci je proces, ve kterém se MSC buňky schopné sebezáchovy přeměňují *in vitro* do jiných typů buněk (Tabulka 1.1). Probíhá u vícebuněčných organismů ve fázi G<sub>0</sub> buněčného cyklu. Další vývoj buňky závisí na specifickém transkripčním faktoru, který je v daný okamžik přítomen. [27][34]

Markery slouží k identifikaci diferencovaných kmenových buněk. K osteogenním markerům patří: exprese alkalické fosfatázy, mineralizace ECM, kolagenI, kolagenII, CD146, osteokalcin, fibronectin, BAP 1, biglycan, SPARC; k adipogenním markerům řadíme: akumulaci intracelulárních lipidů, glut4, galectin-12, FATP1, CIDEA, CD 137, ZIC 1 a chondrogenní diferenciaci (produkce ECM) označují markery: kolagen, CD44, CD151, ITM2A [19].

MSC se vyskytují v různých tkáních. Jde například o kostní dřev, tukovou tkáň, pupečnickovou krev, tkáň pupečnickové šňůry a Whartonovo želé [38]. K pozoruhodným rozdílům v expresi několika markerů došlo i přes to, že většina buněčných linií měla imunofenotypický profil, který odpovídá MSC. Rozdíly tedy budou nejspíše spojené se zvláštnostmi původních zdrojových tkání. [37] Práce se ubírá směrem především k buňkám z lidské tukové tkáně a buňkám z Whartonova želé.

**Tabulka 1.1:** Přesná kritéria - značek CD a diferenciacie. [37]

Diferenciace	Proteiny
pozitivní exprese < 90% (nezávisle na tkáni původu)	CD10, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC
exprese > 5-7% (závisle na tkáni původu)	CD271, HLA-DR
žádné významné rozdíly v expresi (z různých zdrojů)	CD14, CD45, CD235a, VEGFR2
nalezené rozdíly v expresi	CD133 (v BM a AT - MSC)
vyšší exprese	CD34 (v AT-MSC), CD146 (v WJ-MSC)
výrazný rozdíl v expresi	MSCA-1 (90+% v BM a AT – MSC; bez exprese v WJ-MSC)
střední rozdíl v expresi	SSEA-4 (50+% v BM a WJ – MSC; 10,7 ± 1,7 % v AT – MSC)

## 1.9 Multipotentní mezenchymální stromální buňky z lidské tukové tkáně a Whartonova želé v regenerativní medicíně

Tuková tkáň je zdrojem dospělých MSC (AT-MSC - adipose tissue MSC) s vysokou plasticitou [24]. Využití AT jako zdroje MSC je velice výhodné, neboť se v hojném počtu vyskytují v celém těle a dají se snadno izolovat [26][39][40][41]. Získávají se liposukcí, kde z jednoho gramu tukové tkáně je možno získat až dvě stě tisíc diferencovaných buněk, jejichž životaschopnost je 98% – 100% [24][39][40][41]. Svými morfológickými, fenotypickými a funkčními vlastnostmi jsou AT-MSC velice podobné BM-MSC [39][41]. AT-MSC jsou nejen stabilní v dlouhodobých buněčných kulturách, ale také se efektivně rozšiřují *in vitro* a mají tedy velký potenciál několikanásobné diferenciacie [39][41][42]. Oproti BM je praktickým autologním zdrojem pro tkáňové inženýrství AT [39][41]. Expanzi a diferenciaci AT-MSC na osteogenní a chondrogenní linie může ovlivnit věk, adipogenní linie však ovlivněna není [39][41]. Tyto buňky kromě schopnosti se diferenciovat a sebeobnovovat vylučují cytokiny a růstové faktory, které mají protizánětlivé antiapoptotické a imunomodulační vlastnosti. Příkladem je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF - vascular endothelial growth factor), růstový faktor podobný inzulinu (IGF - Insulin-like growth factor) a růstový faktor hepatocytů (HGF - Hepatocyte Growth Factor), které mají podíl na angiogenezi a opravě tkáně. [26][39][40][43] Vzhledem k těmto vlastnostem je autologní AT-MSC mohou být použity pro léčbu ischemických chorob, protože je zde minimální riziko odmítnutí [39][40][43]. Tyto buňky mají vysokou schopnost obnovovat různé poškozené tkáně, a též produkují řadu látek, které jsou schopny

ovlivnit imunitní systém [44]. Původně se tyto buňky využívaly hlavně v dermatologické a kosmetické medicíně (při vylepšení poprsí, redukce vrásek, podpora růstu vlasů, bělení kůže a hojení ran díky sekreci kolagenu typu I.) [39][45][44]. AT-MSK je také možno využít k vylepšení uspořádání šlach a k léčbě poraněných rotátorových manžet [39][46].

Velkým potencionálním zdrojem MSC, který si získal pozornost v nedávné době, jsou Whartonova želé (WJ - Wharton's jelly) [39]. Z pupečnickové šňůry, která je při narození dítěte vyřazena jako odpadní se provádí odběr buněk typu MSC, protože je snazší a levnější, než jsou jiné odběry (např. z kostní dřeně) a nemá zdravotní dopad na matku ani novorozence [47][48]. Práce je zaměřena na buňky lidské pupeční šňůry (UC - umbilical cord), neboť buňky jsou z WJ izolovány ve značně velkém počtu. Laboratoře, kde byl výzkum prováděn, zjistily, že lidské UCM buňky jsou robustní, snadno izolovatelné, dají se zmrazit a rozmrazit, mohou klonálně expandovat a exprimovat exogenní proteiny a snadno expandovat v kultuře. Aniž by byly vystaveny diferenciacním signálům exprimují marker neutrálních prekurzorů nestinů. Pokud diferenciacním signálům vystaveny jsou, mohou UC buňky diferencovat na katecholaminergní neurony, exprimující tyrosinhydroxylázu. [48]

Lidské buňky UMC tedy splňují základní kritéria, která jsou stanovena pro MSC. Podobně se chovají buňky podobné MSC, které jsou odvozeny z jiných tkání pupeční šňůry, například subendotelu pupeční žíly, amnionu, placenty, pupečnickové krve a plodové vody [48]. Pro MSC odvozené z pupeční šňůry platí tři charakteristické definice. 1. Jsou-li udržovány ve standartních kultivačních podmínkách, jsou plasticky přilnavé. 2. Exprimují buněčné povrchové markery (CD73, CD90 a CD105 a postrádají expresi CD14, CD34, CD45, nebo CD11b, CD79 nebo CD19 a HLA-DR). 3. *In vitro* se liší od adipocytů, chondroblastů a osteoblastů [47][48].

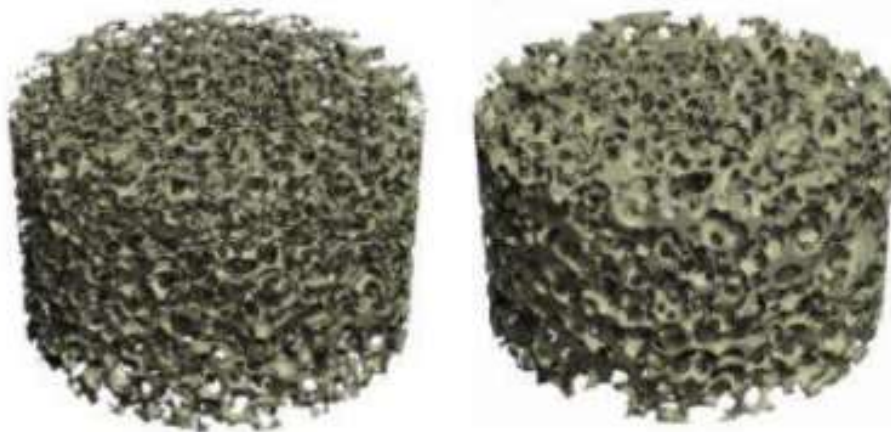
V dnešní době se vědci snaží léčit i dříve nevléčitelné nemoci a k tomu přispívá regenerativní medicína. Principy regenerativní medicíny se dnes používají při onemocnění srdce, jater, mozku, plic, zažívacího traktu, ledvin, kloubů, svalů a šlach stejně jako při rekonstrukci měkkých a tukových tkání [24]. Buňky ze stromálně vaskulární frakce tukové tkáně obsahující AT-MSK se používají při přenosu tuku druhé generace ke zvýšení přežití štěpu [6][49]. V tomto případě je odsátý tuk rozdělen na dvě poloviny, první se podrobuje mimotělnímu zpracování, kde se čistí a druhá část lipoaspirátu je podrobena enzymatickému štěpení a centrifugaci, aby byly odděleny regenerační buňky a posléze opět přidány do první poloviny lipoaspirátu [2][5][49]. Při experimentech *in vitro* a *in vivo* byl zjištěn v autologním lipotransferu podpůrný účinek AT-MSK na ostatní buňky [2][49]. Sérií těchto procesů se tuková tkáň upraví na výplňový materiál nejvyšší kvality, který je tělu přirozený. Při tomto postupu není pacient zatížen celkovou anestezií, protože zákrok je bezbolestný, trvá asi dvě až tři hodiny a dotyčný má možnost reagovat na to, jak plastický chirurg pracuje. [8][49] Při lipotransferu není organismus zatížen žádným umělým materiálem (silikon,

botulotoxin) a nevzniká žádná antigenní reakce. Díky vlastnímu tuku a kmenovým buňkám je výsledek přirozený a trvalý [8]. Lidské AT-MSK mají schopnost za přítomnosti séra, rosiglitazonu a kyseliny askorbové se *in vitro* samoorganizovat. Takovýmto způsobem vznikají husté buněčné listy, ve kterých jsou obsaženy adipocyty s organizovanou extracelulární matricí. MSC tedy fungují nejen jako progenitorové buňky pro homeostázu přirozené tukové tkáně, ale indukují i *de novo* adipogenezi. Díky tomuto vzniká pozitivní přístup ke generování autologních náhrad tuků pro mnoho různých defektů měkkých tkání [2]. Je potvrzeno, že lidské i krysí MSC podléhá adipogenní diferenciaci při kultivaci *ex vivo* s fibroblastovým růstovým faktorem-2 (FGF-2 - fibroblast growth factor ) na poly(laktid-ko-glykolid)u nebo želatinovém scaffoldu. V tomto směru je dosahováno výborných výsledků pro vytváření nových konstruktů *in vivo*. [2][21][22]

## 1.10 Scaffold

Při aplikaci tkáňového inženýrství je za potřebí vytvořit takzvané tkáňové nosiče, které poskytnou buňkám podobné prostředí, aby mohla být podpořena buněčná proliferace, diferenciaci a regenerace tkáně. Pro napodobení nativních tkání se používají četné techniky a biomateriály. Nejzajímavější jsou hydrogely vytvořené z biopolymerních sítí. Používají se hydrogely na bázi proteinů s důležitými složkami jako je například hedvábí, keratin, elastin, nebo resilinové proteiny. Tyto hydrogely vykazují největší podobnost s lidskou tkání a velkou biologickou kompatibilitu. To jsou důvody, proč vláknité proteinové hydrogely tvoří univerzální materiály pro tkáňové inženýrství [50]. Významným vývojem prošly v posledních letech tkáňové inženýrské scaffoldy pro obnovu a opravu tuků. Tyto scaffoldy se využívají při rekonstrukci měkkých tkání, kde je třeba různými biomateriály obnovit prázdný objem s novou funkční tkání. [2] Scaffold - takzvaný nosič je ve skutečnosti podpůrná struktura, ve které rostou a množí se buňky, popřípadě se vyvíjí tkáň. Vyrábí se ze syntetických či biologických materiálů, musí se dobře rozkládat dle toho, jak se formuje tkáň (jedná se o měsíce), musí být porézní, aby bylo možno buňky usadit, vyživovat je a odvádět odpadní tekutiny (Obrázek 1.3). [51] Tyto scaffoldy by měly být neimunogenní, podporovat přilnutí a růst buněk během kultivace [3][51]. Použité materiály se po čase rozkládají na netoxické produkty a jsou z lidského organismu vylučovány přirozenou cestou. Nevýhodou je malá mechanická pevnost a nedostatečná reprodukovatelnost. [51]





**Obr. 1.3:** Struktura podpůrné struktury pro růst buněk ve 3D [52]

Kolagen je hlavním strukturálním proteinem většiny tvrdých a měkkých tkání [53]. Je jedním z přírodních materiálů pro výrobu scaffoldu. Poskytuje biologickou rozložitelnost, biokompatibilitu a slabou antigenicitu. Porézní kolagenové mikrokuličky byly hodnoceny jako injektovatelné nosiče pro MSC. [3][5][54] Bylo prokázáno, že při použití odstředivé baňky *in vitro* se MSC v kultuře připojují a naočkují se do kolagenových mikrokuliček. Byla potvrzena i proliferace a diferenciace a potenciál pro regeneraci tukové tkáně [5]. Negativem při využití kolagenových nosičů jsou špatné mechanické vlastnosti (malá pevnost a strukturální stabilita, ve vodním prostředí bobtná). Aby mohly být překonány, musí být tento nosič zesíťován fyzikálními, nebo chemickými metodami, nebo modifikován přírodními syntetickými polymery, nebo anorganickými materiály. Kolagen je nejhojnějším proteinem v ECM a může být využit na opravu u chrupavek, kostí, nervů, šlach, vazů, krevních cév a kůže. Jeho důležitou rolí je jeho strukturální a biologická integrita a fyzická podpora tkání. Ve tkáňovém inženýrství se využívá čistý kolagenový nosič (kolagen je hlavním vláknitým strukturálním proteinem), nosič z kolagenu a přírodního polymeru (hedvábný fibroin, chitosan, kyselina hyaluronová, alginát apod.), nosič z kolagenu a syntetického polymeru (poly (ε-kaprolaktam)) (PCL), kyselina polylactonová (PLA), poly (ethylenglykol) (PEG) apod.), kolagenové a anorganické hybridní nosiče (hydroxyapatit ( $\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), křemičitan a P-trikalciumfosfát (P-TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )) a kolagenový nosič modifikovaný růstovými faktory (kostní morfogenetický protein (BMP), transformující růstový faktor beta (TGF-β), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a růstový faktor odvozený z destiček (PDGF)). Nosiče na bázi kolagenu mají široké uplatnění, ale musí být vždy konkrétně definovány pro každý záměr. [53]

Druhým nejčastějším přírodně získaným biomateriálem je kyselina hyaluronová, která je enzymaticky odbouratelná a skládá se z několika opakujících

se disacharidových jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a D kyseliny-glukuronové. Je hlavní složkou extracelulární matrice a zastává významnou roli v buněčném chování. Nosič na bázi HA se využívají v současné době pro různé chirurgické postupy. [5] HA se vyskytuje i v lidském těle, kde je součástí vaziva a je obsažena i v oku. Zajišťuje též hydrataci pokožky, v nejhojnější míře se vyskytuje u novorozenců, s přibývajícím věkem množství této kyseliny v kůži klesá, neboť organismus ji produkuje méně. [51] Kyselina hyaluronová má vysokou přilnavost k vodě a proto jsou její hydratační účinky dokonalé [17][51]. Použije-li se do místa kožního defektu, je toto dostatečně vyživované, hydratované a hojí se bez vystouplých jizev [51]. Díky svým jedinečným hydratačním a elastickým vlastnostem má kyselina velkou řadu uplatnění: oční chirurgie, léčba kloubů, některé druhy rakoviny. Využití nachází i v kosmetice. [17][51] Výkonnost jednotlivých složek kolagenu a HA byla původně analyzována jednotlivě, ale bylo zjištěno, že kombinace těchto přírodních biomateriálů bude využita jako vícesložkový nosič [5].

Dalšími biomateriály jsou například chitosan (CS) - dobře rozložitelný přírodní materiál a hedvábí, které je široce zkoumaným biomateriálem ve tkáňovém inženýrství pro různé aplikace a opravu měkkých tkání [3][5][55][56]. Decelularizovaná tuková tkáň (DAT - decellularized adipose tissue) je velice užitečná jako substrát ve tkáňovém inženýrství, protože má vysokou schopnost napodobovat architekturu, mechanické a biochemické vlastnosti nativní extracelulární matrix tukové tkáně [2].

Syntetické materiály se vyznačují vysokou mechanickou pevností a odolností, možností přizpůsobení tvaru a díky složení zajištění stupně rozkladu, požadovaného pro danou úlohu. [3][51][57] Nevýhodou syntetických materiálů je hydrofobní povrch, díky čemuž nejsou buňky schopny dobře přilnout. Velikou většinu syntetických materiálů, které se v současné době využívají a testují, jako základní materiál pro výrobu podpůrných struktur, tvoří skupiny polyesterů. [51] Ve tkáňovém inženýrství je dnes běžně používaný kopolymer PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)). Prováděny byly práce *in vitro* i *in vivo* zacílené na podporu adipogeneze kopolymeru. PLGA může být použit jako 3D scaffold, do kterého jsou začleněny adipocyty z lidských buněčných zdrojů a rovněž i faktory jako je bFGF (basic fibroblast growth factor) neboť bylo zjištěno, že indukuje vaskularizaci *in vivo*. [3][55][58] Výzkum se prováděl i s jinými syntetickými materiály a je zřejmé, že i některé další vytvoří náhradu měkkých tkání [3].

Při návrhu konstruktů pro tukové buňky je důležité důkladné pochopení místa zájmu, musí být charakterizovány mechanické vlastnosti a degradace implantovaného biomateriálu [3][57]. V momentě, kdy se nová tkáň mění je nutno, aby se biomateriál rozkládal. Biologická aktivita nové regenerované tukové tkáně musí důsledně kopírovat biologickou aktivitu nativní tukové tkáně. Je nutné, aby byla totožná jak ve struktuře, tak ve funkci a musí se začlenit do funkční vaskulatury, tzn. krevní cévy, nervy a zásobu lymfy. [3][59] Pro dokonalou obnovu funkce nativní tkáně je důležité

začlenění transplantovaného konstruktů s minimální morbiditou po dobu měsíců a let [3][60].

Porézní nosič je možno připravit několika známými technikami. Výroba porézního nosiče může probíhat za použití plynu jako porogenu. Pomocí lisování polymeru ve vyhřívané vaně se vytvoří disky, které jsou umístěny do komory a po dobu několika dnů vystaveny vysokému tlaku CO<sub>2</sub>. Molekuly oxidu uhličitého vytvářejí různě velké póry a vzniká houbovitá struktura. Nevýhodou je, že póry tvoří vzájemně propojenou strukturu. [61]

Připravit strukturu s pravidelnou porézitou, ale omezenou tloušťkou je možné také tak, že je polymer rozpuštěn v organickém rozpouštědle, roztok je odlit do formy naplněné částicemi (např. anorganická sůl, krystaly sacharózy, parafínové kuličky, želatinové kuličky, apod.) a necháme odpařit. Pak je forma ponořena do lázně vhodné pro rozpuštění porogenu a jakmile je zcela rozpuštěn je získána porézní struktura. Nevýhoda spočívá v tom, že použitá organická rozpouštědla musí být důkladně odstraněna, aby bylo zabráněno poškození buněk vysetých na takovémto nosiči. [61]

Další technika výroby nevyžaduje použití pevného porogenu. Syntetický polymer se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, přidá se voda a smícháním vznikne emulze. Ta se odlévá do formy a zmrazuje ponořením do kapalného dusíku. Následně se lyofilizací odstraní voda a rozpouštědlo a zůstane ztuhlá porézní struktura. Tento postup je ve srovnání s SCPL rychlejší a přesto, že vyžaduje použití rozpouštědel, odpadá časově náročné louhování. Velikost pórů je zde malá a často nepravidelná. [61]

Dále je možno použít elektrostatické zvlákňování, tepelně indukované separace fází, textilní technologie, vlastní nanovláknennou montáž, atd. Každá ze jmenovaných metod má své výhody, ale žádná není bez nedostatků. [61]

## 1.11 Bioreaktory

Jedná se o zařízení, které v tkáňovém inženýrství používá mechanických prostředků k ovlivnění biologických procesů. Při vývoji nové tkáně *in vitro* podporují pomocí biochemických a fyzikálních regulačních signálů buňky, aby je podnítily k diferenciaci, nebo k tvorbě extracelulární matrice před implantací *in vivo*. [62]

### 1.11.1 Typy bioreaktorů

Vzhledem k tomu, že konvenční kultivace buněk se stala nedostatečnou, byly vyvinuty různé typy bioreaktorů, které dokáží zajistit klinicky významné množství buněk [27].

**Míchaný tankový bioreaktor** – k dobrému promíchávání se využívá oběžných kol a to potom vede k homogennímu kultivačnímu systému, kde je umožněno stálé monitorování, kontrola parametrů a průběžné odstraňování vzorků. V míchaných

bioreaktorech je nutno použít mikro nosiče, které se snadno pohybují v suspenzi a svůj povrch poskytnou pro připojení a růst buněk. Výhodou je, že v jediné nádobě lze produkovat vysoké množství buněk a je tak zabráněno variabilitě mezi vícero nádobami. Nevýhodou je, že při vznikajícím smykovém napětí se některé buňky poškodí a též tvorba aglomerátů buněčných mikro nosičů zabraňuje přísunu živin do buněk uvnitř aglomerátu, a tím je sníženo množství zdravých narostlých buněk. [27][63]

**Houpací bioreaktor** – je spolehlivý pro ty buněčné kultury, kde je vyžadován správný výrobní postup. Bioreaktor je složen z jednorázového plastového sáčku, který je umístěn na plošině. Pohybem tekutiny v sáčku nastává vlnění, které spolehlivě rozvádí živiny a výborně přenáší kyslík. Je tak zajištěno ideální prostředí pro růst buněk. Vzhledem k tomu, že celý systém je uzavřený nenastává riziko kontaminace. [27][64]

**Bioreaktor s dutými vlákny** - je velice výhodnou možností pro rozšíření MSC. Buňky jsou zachyceny uvnitř dutých vláken, ke kterým přilnou a nejsou zde ohroženy smykovým napětím. Prostor mezi válcem a porézními, dutými vlákny je vyplněn proudícím, kultivačním médiem, které přes póry vláken dodává výživu buňkám. [65][66][67] Tento jednorázový bioreaktor je dobře dostupný, a také využitelný pro expanzi *ex vivo* [27].

**Bioreaktor s pevným ložem** – je sestaven z pevné kolony, kde je zachyceno imobilizovaný nosič na který jsou inokulovány buňky. Pro chemickou stabilitu a růst buněk je třeba, aby nosiče měly dostatečně velkou plochu. Výhodou tohoto systému je nízké smykové napětí v prostředí, lepší napodobení podmínek *in vivo* a umožnění 3D růstu. Nevýhodou zde je jemný pohyb plošiny a tím špatné rozvádění živin do celé kolony. Tím je snížena účinnost nasbíraného množství buněk. [27][68][69]

V praktické části této práce byl využit princip podobný **bioreaktoru U-CUP**, který je uživatelsky vhodný k vytváření a kontrole 3D kultur jak buněčných, tak tkáňových [70].

Princip bioreaktoru je založen na řízené perfuzi buněčných suspenzí a kultivačního média pomocí 3D nosiče s tokem oscilační tekutiny. Ukázalo se, že očkování buněk pomocí tohoto zařízení ve srovnání s konvenčními technikami statické baňky s rozprašovačem podporuje nejúčinnější buněčnou sterilizaci a nejrovnoměrnější distribuci buněk v pórech polyaktivních pěn. Navíc bylo potvrzeno, že takový bioreaktorový systém je vysoce účinný pro rozmanitost nosičů a stavbu pórů. [70]

## 1.12 Cíle práce

Cílem studie bylo zhodnotit potenciál multipotentních mezenchymálních stromálních buněk odvozených z tukové tkáně a Whartonova želé pro inženýrství tukové tkáně a rekonstrukci měkkých tkání. Praktická část práce byla prováděna v Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci, kde se nachází potřebné přístrojové vybavení pro zadané experimenty.

### **Pro tuto práci byly stanoveny následující úkoly:**

1. Porovnat proliferační a kolonotvornou aktivitu MSC z tukové tkáně a Whartonova želé.
2. Vyhodnotit účinnost adipogenní diferenciaci multipotentních mezenchymálních stromálních buněk získaných z lidské tukové tkáně a Whartonova želé za obvyklých kultivačních podmínek.
3. Posoudit účinek koncentrace glukózy a přítomnosti séra v kultivačním médiu na adipogenní diferenciaci MSC u tukové tkáně a Whartonova želé.
4. Odhalit účinek destičkového lyzátu a lidského sérového albuminu na účinnost adipogenní diferenciaci MSC.
5. Vyzkoušet možnost použití uzavřeného oscilačního perfuzního bioreaktorového systému pro 3D kultivaci a adipogenní diferenciaci MSC v porézních kolagenových nosičích.

## 2 Metody

V této kapitole jsou popsány všechny části postupů ke splnění zadaných cílů diplomové práce. Nejprve je popsána izolace buněk, schopnost vytvářet kolonie a následná metabolická a proliferační aktivita buněk během kultivace. Dále je popsána aplikace MSC na scaffoldy s jejich životaschopností v oscilačním perfuzním bioreaktoru se závěrečnou statistickou analýzou. Chronologické řazení odpovídá reálnému postupu práce.

### 2.1 Izolace buněk

Všichni dárci lidské tkáně poskytli svůj písemný informovaný souhlas před jakýmkoli zásahem. Všechny studie týkající se lidských tkání nebo buněk byly schváleny Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR, Praha. Všechny metody byly provedeny v Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR v souladu s příslušnými směrnici a předpisy.

V naší studii jsme pracovali s buňkami izolovanými z tukové tkáně a pupeční šňůry (Whartonova želé), které byly již odebrány z lidských tkání v Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR a kryokonzervovány.

**Stručný popis izolačního procesu, připraveného dříve, je uveden níže.**

Používané vzorky tukové tkáně (AT) byly získány od zdravých dobrovolníků (N = 3), kteří podstoupili liposukční procedury z estetických důvodů a byly zpracovány, jak bylo popsáno výše v kapitole „Lipotransfer“. Stručně řečeno, lipoaspirát byl opakovaně promyt ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátů (PBS; IKEM, Praha, Česká republika) a enzymaticky štěpen kolagenázou (0,3 PzU / ml, kolagenáza NB 6 GMP; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) při 37° C po dobu 2 hodin za stálého třepání. Po centrifugaci při 200 x g po dobu 10 minut byla stromální vaskulární frakce dvakrát promyta PBS a kultivována.

Vyřazené lidské pupeční šňůry (UC - umbilical cords) byly získány ze zdravých novorozenců (N = 3) po spontánním porodu. Asi 10 cm UC bylo asepticky uloženo ve sterilním PBS (IKEM) s antibioticko-antimykotickým roztokem (AA) při 4° C a transportováno do laboratoře do 24 hodin. Po promytí několikrát v PBS-AA a krátkém promytí v 10% betadinu (EGIS Pharmaceuticals PLC, Budapešť, Maďarsko) byly odstraněny krevní cévy a zbývající Whartonova želé tkáň (WJ) byla nasekána na malé fragmenty (1–2 mm<sup>3</sup>) a zvážena. WJ-MSC byly izolovány z fragmentů (1 g) štěpením v roztoku PBS-AA obsahujícím 0,26 U / ml Liberase™ (Roche Custom Biotech, Mannheim, Německo) 62 a 1 mg / ml hyaluronidázy při 37° C za stálého třepání po dobu 2 hodin. Po odstranění nestrávených fragmentů pomocí 40 µm

buněčných filtrů byly buňky podrobeny centrifugaci (450 x g, 10 minut), zředěny v kompletním kultivačním médiu a kultivovány.

## **2.2 Buněčná kultura**

Buňky byly kultivovány v kompletním kultivačním médiu (KKM) obsahujícím  $\alpha$ -MEM (LONZA, Basilej, Švýcarsko), 10% fetální hovězí sérum (FBS) nebo 5% destičkový lysát (platelet lysate - PL) (Bioinova, Ltd.) a 10  $\mu$ g/ml gentamicinu (Sandoz, Holzkirchen, Německo) při 37° C, ve vlhké atmosféře, obsahující 5% CO<sub>2</sub> s pravidelnými změnami média dvakrát týdně.

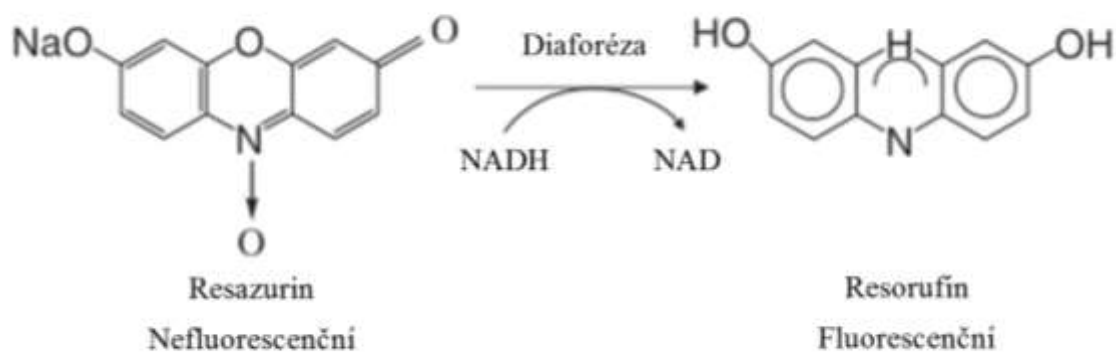
Po dosažení téměř úplné konfluence byly buňky sklizeny pomocí 0,05% roztoku Trypsinu / EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a znovu nasazeny na čerstvý plastový povrch (Nunc, Roskilde, Dánsko) o hustotě 5 × 10<sup>3</sup> buněk / cm<sup>2</sup>. Buňky odvozené v pasáži 3 byly použity pro následující studie.

## **2.3 Stanovení účinnosti tvorby kolonií**

Pro stanovení potenciálu tvorby kolonií byly MSC vysety s koncentrací 1 000 buněk na 100 mm velkou misku pro kultivaci buněk (TPP, Švýcarsko) a kultivovány po dobu 14 dnů v  $\alpha$ -MEM, doplněném 20% FBS. Médium bylo měněno jednou po 7 dnech kultivace. Po 14 dnech kultivace byly buňky fixovány 70% ethanolem a obarveny Giemsou za použití standardního postupu. Počet a velikost kolonií byly hodnoceny vizuálně. Účinnost tvorby kolonií (CFU-F účinnost) byla stanovena jako poměr mezi počtem generovaných kolonií k celkovému počtu naočkovaných buněk.

## **2.4 Stanovení metabolické a proliferační aktivity MSC během kultivace**

Metabolická aktivita MSC byla stanovena s použitím Alamar Blue (AB). Test alamarBlue® je navržen tak, aby kvantitativně měřil proliferaci různých lidských a zvířecích buněčných linií, bakterií a hub. AB je intergrální indikátor oxidačně-redukčních reakcí, ke kterým dochází v živých buňkách. Hlavní složkou AB je resazurin, který se metabolicky aktivními buňkami redukuje na resorufin a nefluorescenční tmavě modrá barva se stává fluoreskující růžovou s červenými fluorescenčními vlastnostmi (Obrázek 2.1.)



**Obr. 2.1:** Princip redukce resazurinu [vlastní tvorba]

Pro tento experiment byl použit Alamar Blue (AB), aby se dosáhlo 10% koncentrace. Po 3 hodinách další inkubace byla stanovena úroveň fluorescence sníženého AB pomocí čtečky mikroděstiček TECAN GENios (Tecan) s excitační vlnovou délkou 550 nm a emisní vlnovou délkou 590 nm [37]. Jako hodnota AB byl použit poměr mezi fluorescencí experimentálního a slepého vzorku (stejné médium bez buněk). Data byla prezentována jako relativní fluorescenční jednotky (RFU).

V několika experimentech, které odhalily účinek podmínek hladovění séra (PL) na metabolickou aktivitu MSC, byly buňky z různých zdrojů ( $N = 3$  ve dvou duplikátech pro každý ze zdrojů izolace MSC) expandovány po dobu 5 dnů v KKM a ošetřeny po dobu 2 hodin chemoterapeutickým činidlem mitomycinem C ( $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) při  $37^\circ \text{C}$  k zastavení buněčné proliferace. Po rozsáhlém promytí KKM bylo médium změněno na médium bez doplňků, nebo z PL. Metabolická aktivita MSC byla hodnocena po 24 hodinách kultivace za podmínek, jak bylo popsáno dříve.

Index proliferace (PI) MSC kultivovaných na různých površích byl stanoven poměrem AB fluorescence získaného čtvrtý den kultury k hodnotám AB stejné skupiny získaným první den kultury.

## 2.5 Adipogenní diferenciaci

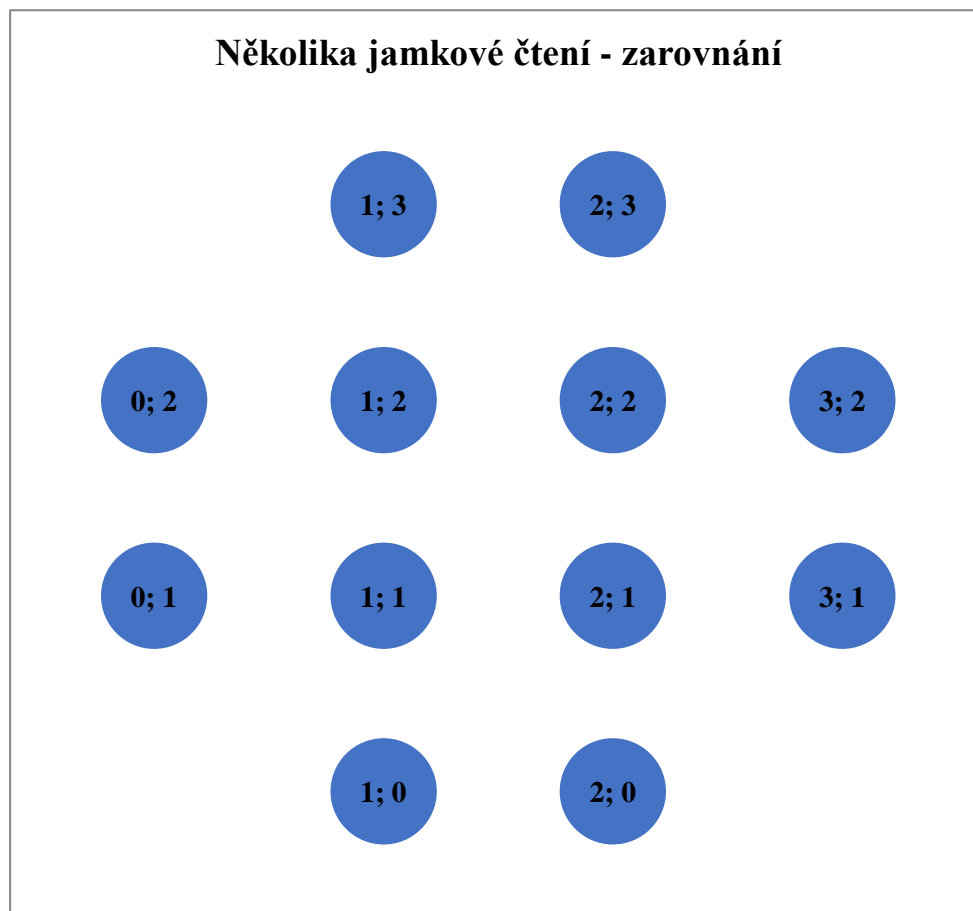
### 2.5.1 Indukce adipogenní diferenciaci

Adipogenní diferenciaci médium se skládalo z DMEM bez glukózy (Gibco), doplněného o ITS (inzulin, transferrin a směs selenu) (Gibco), glukózy (0; 5,5 nebo 25 mM), 10% fetálního hovězího séra (FBS) nebo 5% destičkového lyzátu (PL) nebo 5% lidského sérového albuminu (HSA) a následujících adipogenních stimulátorů 0,5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthinu, 1  $\mu\text{M}$  dexamethasonu a 100  $\mu\text{M}$  indometacinu (vše od Sigma-Aldrich, USA). Kompletní výměny média byly prováděny každé 3–4 dny.



## 2.5.2 Stanovení účinnosti adipogenní diferenciacce

Po 14 dnech kultivace s adipogenními doplňky byly MSC fixovány ve 4% pufovaném formalinu po dobu 30 minut při 4° C a barveny roztokem Nile red (1 µg / ml v PBS), (Sigma-Aldrich, USA) podle pokynů výrobce. Buňky byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (Nikon, Japonsko). Kvantitativní hodnocení intenzity fluorescence Nile red ve zkoumaných skupinách bylo připraveno ve čtečce mikrotitračních destiček (Tecan Genios; Tecan, Rakousko) při vlnových délkách 488 nm / 530 nm, s použitím vícebodového režimu čtení (12 bodů čtení na jamku), (Obrázek 2.2).



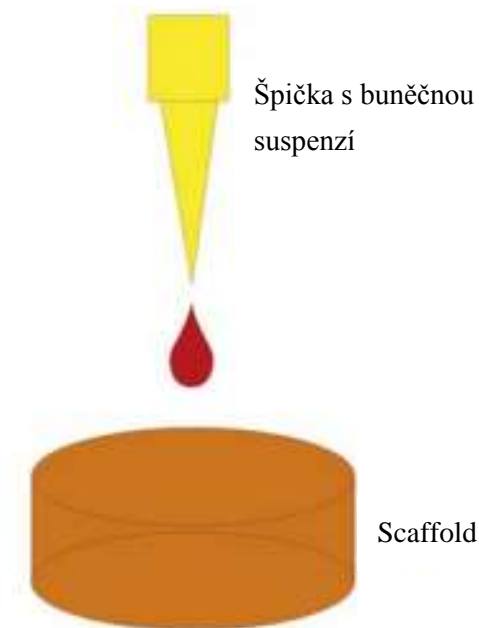
**Obr. 2.2:** Pozice čtení fluorescence Nile red v každé jamce s kulturou [vlastní tvorba]

Data byla prezentována jako průměrná intenzita fluorescence Nile red pro každou podmínku, po odečtení hodnot negativní kontroly (získaných z neindukovaných buněk). Pozitivní barvení Nile red bylo potvrzeno fluorescenční mikroskopií (Nikon, Japonsko) nebo laserovou konfokální mikroskopií (Zeiss, LSM 710, Německo).

## 2.6 Výsev MSC do kolagenových nosičů

V naší práci jsme použili komerčně dostupný kolagenový nosič (VUP medical, Czech Republic). Charakteristika lyofilizovaného kolagenu: sušina min. 80 %, nasákavost: min 45x navýšení původní hmotnosti, rozpustnost: mísitelný s vodou, rozpustný v kyselině citrónové, kyselině octové, kyselině chlorovodíkové.

Výsev MSC do kolagenových scaffoldů byl proveden statickou metodou [71] (Obrázek 2.3).

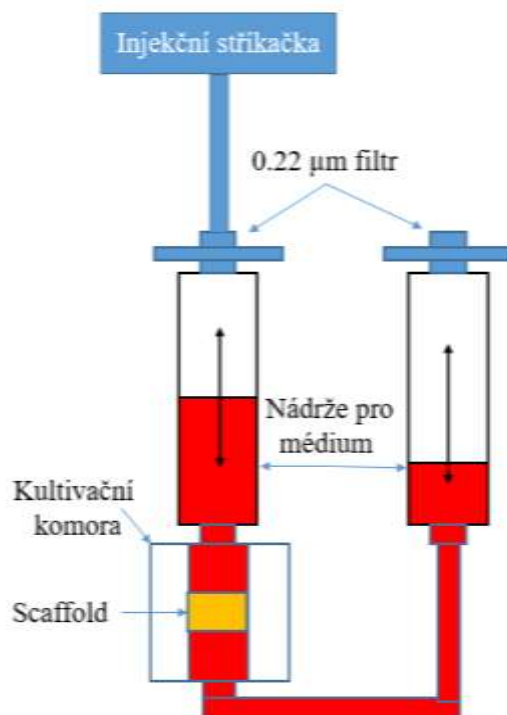


**Obr. 2.3:** Výsev MSC do kolagenových scaffoldů [vlastní tvorba]

Metoda spočívala v aplikaci minimálního objemu (20  $\mu$ l) koncentrované buněčné suspenze ( $3 \times 10^5$  buněk / ml) na povrch 3D nosiče pomocí automatizované pipety. Nosič s buňkami byl inkubován po dobu 3 hodin při 37 ° C a poté přenesen do zkumavky o objemu 50 ml (s filtrem) obsahujícím 10 ml média nebo umístěn do oscilačního perfuzního bioreaktoru. Buňky byly kultivovány v KKM, doplněné 5% PL během 3-5 dnů před adipogenní diferenciací.

## 2.7 Oscilační perfuzní bioreaktor.

V této studii zhodnotíme možnost použití oscilačních perfuzních bioreaktorů pro 3D kulturu a adipogenní diferenciaci MSC v kolagenu. Princip bioreaktoru je znázorněn na obrázku 2.4.



**Obr. 2.4:** Schéma oscilačního perfuzního bioreaktoru [vlastní tvorba]

Prostřednictvím stříkačky je médium perfundováno kontrolovaným způsobem přímo přes póry nosiče v alternativních směrech. Aplikovali jsme průtok 0,4 ml za minutu s 5 minutami pauzy každé 2 ml. Konečný objem média v bioreaktorovém systému obsahoval 10 ml. Změna média byla připravována každé 4 dny.

## 2.8 Morfologie a životaschopnost buněk ve 3D želatinových nosičích

Morfologie buněk byla hodnocena po 24 hodinách 3D kultury za použití dvojitého fluorescenčního barvení pomocí soupravy LIVE / DEAD® Vability / Cytotoxicity Kit (2  $\mu$ M Calcein AM a 5  $\mu$ M Ethidium homodimer-1; Invitrogen).

Barvicí roztok testu Live Dead je směs dvou fluorescenčních barviv, která odlišně označují živé a mrtvé buňky. Živé buněčné barvivo značí neporušené, životaschopné buňky zelené. Je membránově permeabilní a nefluorescenční, dokud všudypřítomné intracelulární esterázy neodstraní esterové skupiny a nezpůsobí fluorescenci molekuly. Excitace (max) a emise (max) jsou 494nm a 515nm (podobné FITC). Barviva mrtvých buněk značí buňky kompromitovanými plazmatickými membránami červeně. Je membránově nepropustný a váže se na DNA s vysokou afinitou. Po navázání na DNA se fluorescence zvyšuje > 30krát. Excitace (max) a emise (max) jsou 528 nm a 617 nm.

## 2.9 Statistická analýza

Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  standardní chyba. Každý experiment byl připraven v duplikátech, s alespoň dvěma opakováními. Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM. Statistická analýza byla připravena za použití Mann-Whitneyho neparametrického testu a považována za významnou s  $p < 0,05$ .

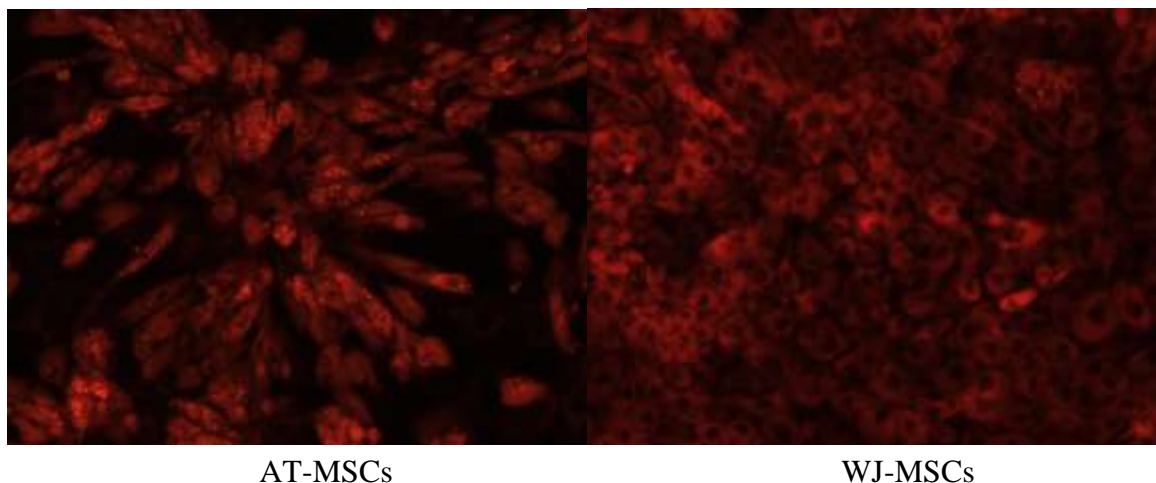
## 3 Výsledky

### 3.1 Porovnání proliferačního, samoobnovovacího a adipogenního diferenciačního potenciálu MSC odvozených z lidské tukové tkáně a pupečnickové šňůry Whartonovy želé.

Důležitým bodem v inženýrství tukové tkáně byl výběr vhodného zdroje MSC. V této části byla porovnána kapacita a účinnost adipogenní diferenciace v závislosti na zdroji buněčné izolace. Potom byl proveden pokus modifikovat podmínky buněčné diferenciace, aby byla zvýšena účinnost diferenciace. Následovala analýza změny v morfologii a chování buněk v odezvě na indukční faktory, a také proběhlo porovnání proliferace a aktivity kolonotvorných buněk, aby byl vybrán nejvhodnější zdroj MSC pro další studie.

#### 3.1.1 Účinnost adipogenní diferenciace AT- a WJ-MSC.

Na začátku výzkumu byla porovnána diferenciační kapacita AT-MSC a WJ-MSC ve standardních podmínkách. Za použití kultivačního média doplněného o IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), dexamethason, inzulín, indometacin a 10% FBS. 3 týdnech kultivace byly buňky obarveny Nile Red, aby byla odhalena akumulace intracelulárních lipidových kapiček (Obr. 3.1).



**Obr. 3.1:** Adipogenní diferenciace AT-MSC a WJ-MSC (barvení Nile red)

Byly zjištěny významné rozdíly v morfologii MSC po diferenciaci v závislosti na zdroji buněčné izolace. V kulturách AT-MSC byla akumulace lipidů jasně viditelná, kapičky byly distribuovány v celém buněčném povrchu. Naopak ve WJ-MSC nedošlo k žádné významné akumulaci lipidů. Ačkoli byly buňky pozitivně obarveny Nile red, intenzita fluorescence Nile red byla významně nižší a nebyly detekovány žádné

intracelulární lipidové kapičky. Za předpokladu, že rozdíly v adipogenní diferenciaci mezi AT- a WJ-MSK mohou být spojeny s předem více vyzrálým stavem WJ-MSK ve srovnání s AT-MSK, spojenými s perinatálním původem těchto buněk a prodloužením doby trvání buněčné indukce.

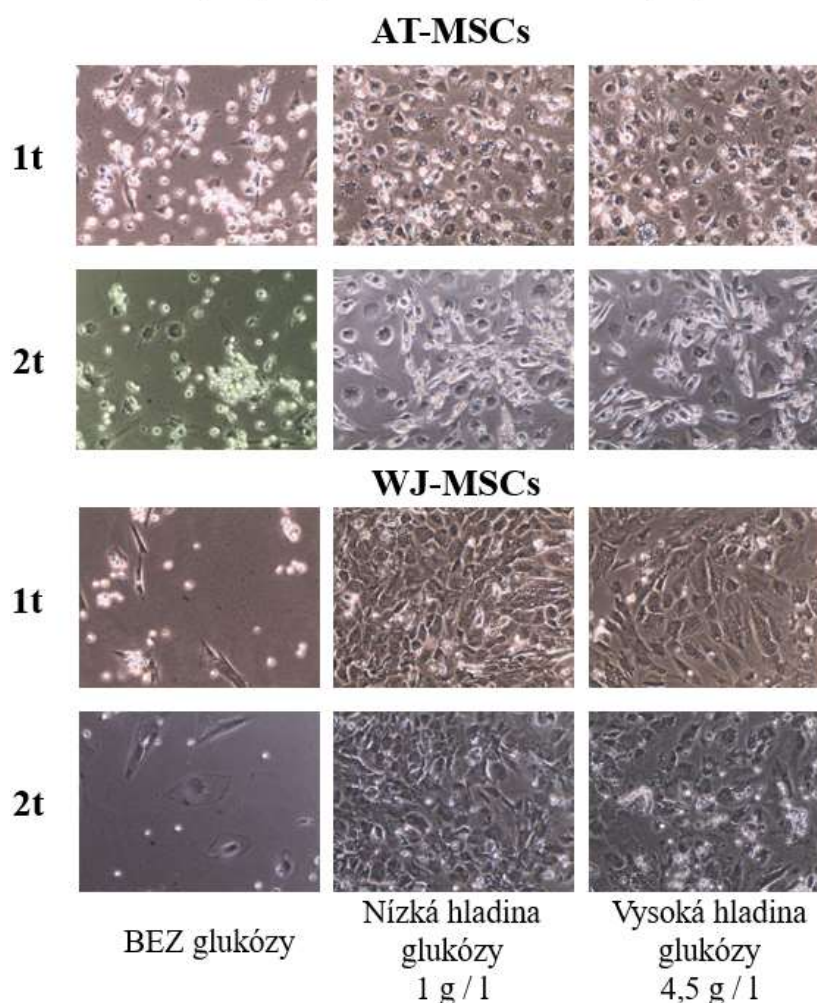
Dále byl proveden pokus modifikace podmínek buněčné diferenciace změnou složení kultivačního média.

### **3.1.2 Vliv složení kultivačního média na adipogenní diferenciaci AT-MSK a WJ-MSK**

Cílem této části studie bylo zhodnotit vliv koncentrace glukózy na realizaci adipogenní diferenciací kapacity pomocí AT- a WJ-MSK. Glukóza jako hlavní zdroj energie pro buňky a její přítomnost v diferenciacním médiu by měla být rozhodující pro realizaci specifických vlastností MSC. Kromě toho může koncentrace glukózy řídit účinnost diferenciace adipogenních buněk [75][87][88]. Bylo nalezeno médium s vysokým obsahem glukózy, které zvyšuje hladinu akumulace lipidů a velikost jednotlivých kapiček [75]. V naší studii byla porovnávána diferenciace MSC v médiu obsahujícím 0, 5 (1 g / l) a 25 mM (4,5 g / l) glukózy, aby bylo možno vyhodnotit, zda přítomnost a koncentrace glukózy ovlivní hromadění lipidových kapiček v buňkách, během dvou týdnů, zobrazeno na obrázku 3.2. Využito bylo podmínek bez přidání FBS, aby byl omezen účinek živin přítomných v séru.

Bylo zjištěno, že v podmínkách při nedostatku glukózy a séra byla detekována významná buněčná smrt, která nastala po přibližně 48 hodinách kultivace, nezávisle na zdroji MSC. Nepřítomností FBS v diferenciacním médiu nastal významný pokles účinnosti adipogenní diferenciace AT- a WJ-MSK. Suplementace kultivačního média glukózou vedla již během dvou týdnů ke vzniku akumulace lipidových kapiček u AT MSC. Tato akumulace však byla viditelná pouze u poloviny buněčné populace. U WJ-MSK nebyla detekována, nezávisle na koncentraci glukózy, žádná akumulace intracelulárních lipidů. Data ukazují, že ačkoli je glukóza hlavním zdrojem energie, přítomnost živin obsažených v séru je nezbytná pro adipogenní diferenciaci.

## Vývoj za podmínek bez séra (SF)



**Obr. 3.2:** Změna morfologie AT- a WJ-MSC během adipogenní diferenciace v nepřítomnosti FBS a o třech různých koncentracích glukózy (fázově kontrastní mikroskopie).

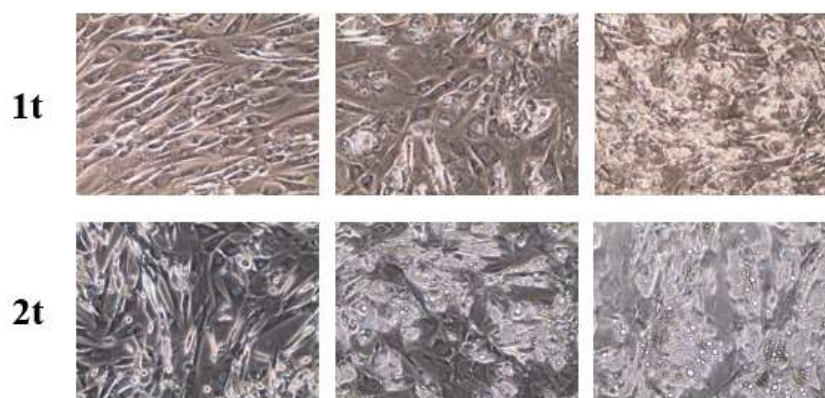
Dále bylo médium doplněno 10% FBS a hodnocena akumulace lipidů v MSC během kultivace (Obrázek 3.3).

Bylo prokázáno, že životaschopnost MSC bez glukózy, ale v přítomnosti FBS byla významně vyšší ve srovnání s podmínkami bez séra (ukázáno viz obrázek 3.2 výše). Znamená to, že přítomnost glukózy (nebo jiného nezbytného zdroje energie) ve FBS je stěžejní pro udržení životaschopnosti buněk.

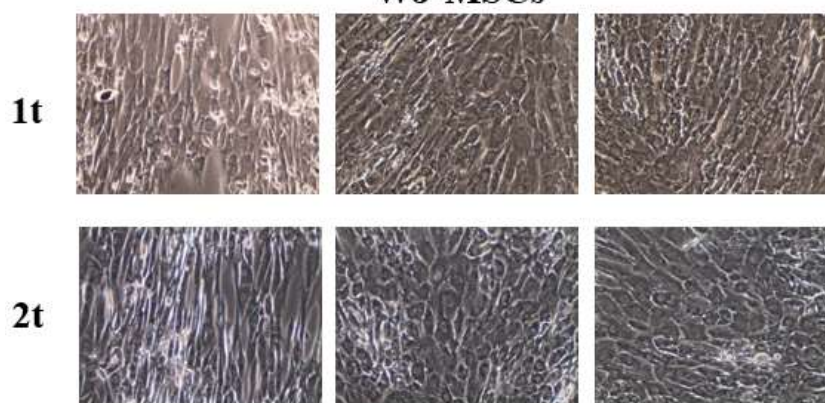
Avšak i za podmínek založených na FBS byla přítomnost další glukózy nezbytná pro realizaci adipogenní diferenciace pomocí AT-MSC. Absence glukózy v diferenciálním médiu zcela zabránila akumulaci intracelulárních lipidů. Současně zvýšená koncentrace glukózy (25 mM) v kultivačním médiu podporovala rychlejší iniciaci akumulace lipidů, která byla detekována již po 1 týdnu kultivace (Obrázek 3.3). U kultur WJ-MSC nebyla ve studii pozorována žádná pozitivní odpověď na koncentraci

## Vývoj za podmínek v přítomnosti FBS

### AT-MSCs



### WJ-MSCs



BEZ glukózy

Nízká hladina  
glukózy  
1 g / l

Vysoká hladina  
glukózy  
4,5 g / l

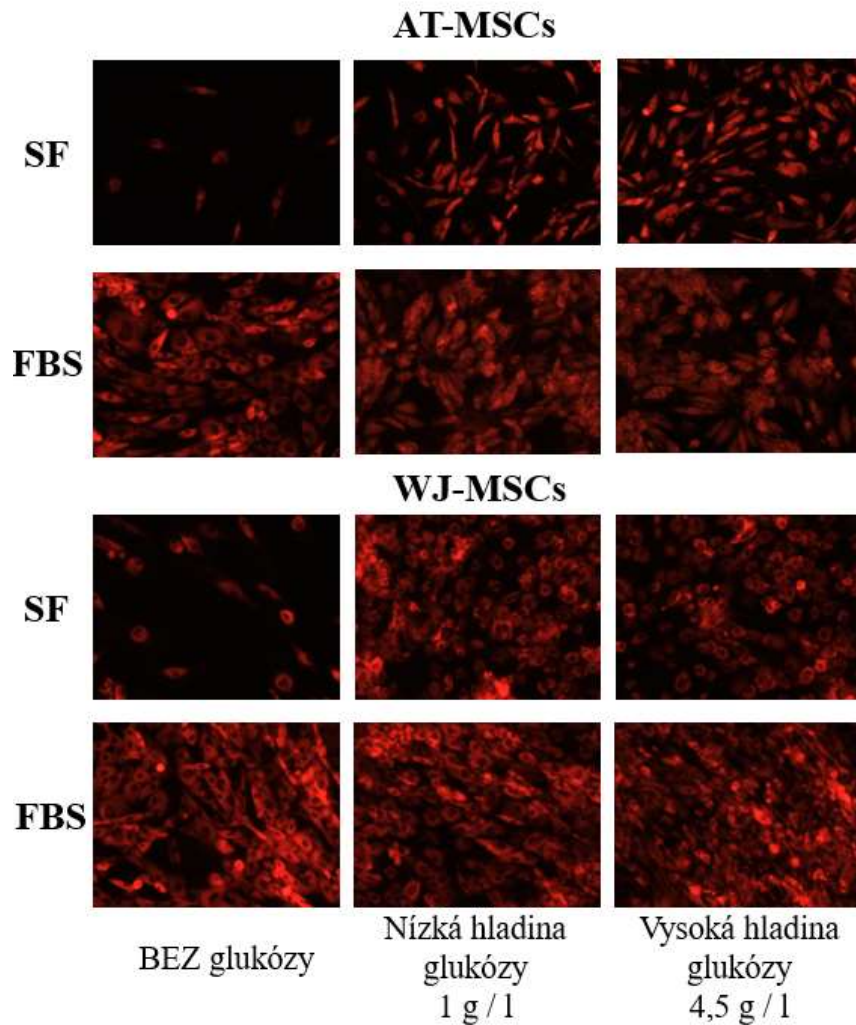
**Obr. 3.3:** Změna morfologie AT- a WJ-MSC během adipogenní diferenciaci v přítomnosti FBS a různých koncentrací glukózy (fázově kontrastní mikroskopie).

glukózy, ani nebyla objevena žádná akumulace lipidů, nezávisle na kultivačních podmínkách (Obr. 3.3).

Pro kvantitativní vyhodnocení dat bylo provedeno barvení Nile red a analýza akumulace lipidových kapiček v jednotlivých podmínkách fluorescenční mikroskopie (Obrázek 3.4). Měřením intenzity fluorescence Nile red ve čtečce mikrodestiček byla zjištěna účinnost adipogenní diferenciaci (Obrázek 3.5).

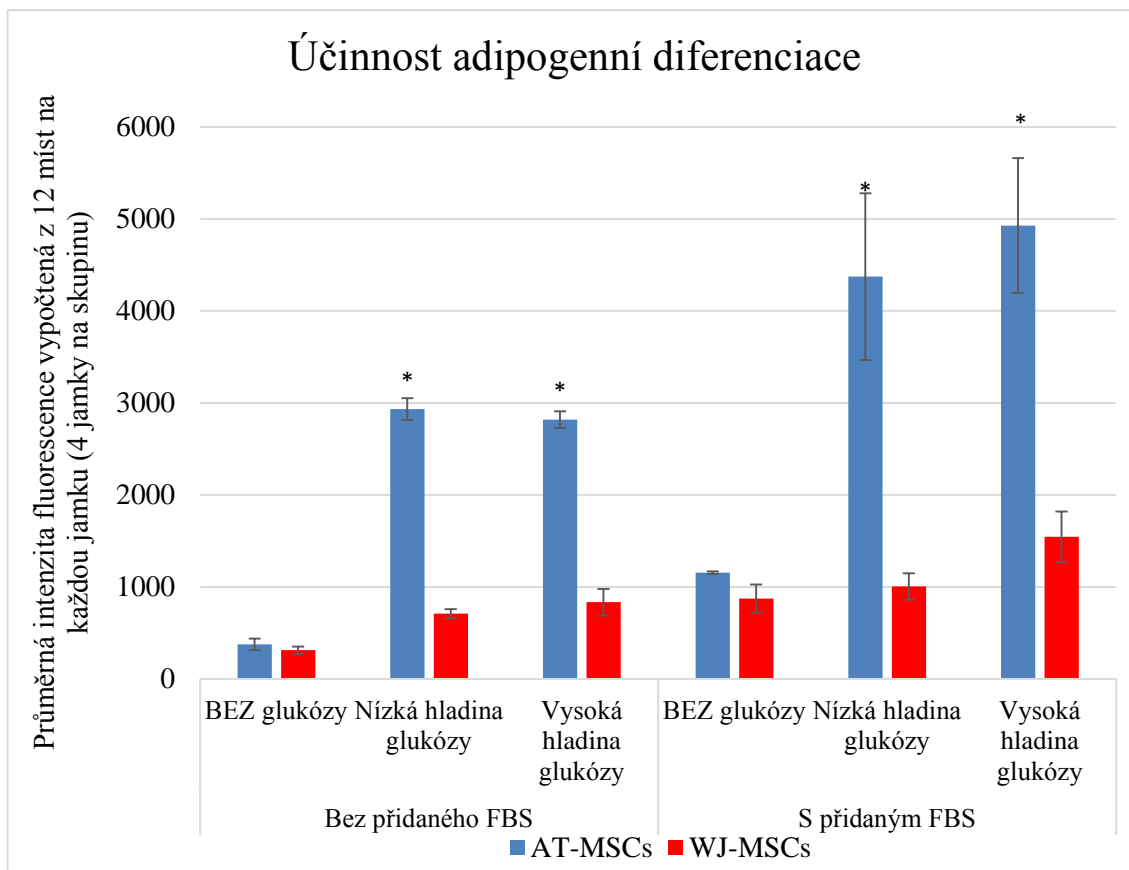


## Barvení Nile red (druhý týden diferenciace)



**Obr. 3.4:** Hromadění intracelulárních lipidů v AT- a WJ-MSC po dvoutýdenní diferenciaci, za různých podmínek. Barvení Nil red.

K provedení měření fluorescence Nile red a zvážení heterogenity diferencovaných buněk v monovrstvě byla vypracována vícebodová analýza - tj. v každé jamce bylo změřeno 12 různých polí, obsahujících 48 polí pro každou linii MSC (dárce). Výsledky jsou uvedeny na obrázku 3.5.



**Obr. 3.5:** Účinnost adipogenní diferenciace AT-MSC a WJ-MSC v různých médiích (\* - hodnoty jsou významně ( $p < 0.05$ ) vyšší ve srovnání s WJ-MSC)

Kvantitativní analýza fluorescence Nile red potvrdila dříve popsaná data. Kromě podmínek deprivace glukózy, které poškozují buňky z obou zdrojů, byla diferenciace AT-MSC ve všech studovaných diferenciálních médiích výrazně účinnější, než WJ-MSC. Nejučinnější adipogenní diferenciace AT-MSC byla pozorována v médiu obsahujícím FBS, doplněné 5mM a 25mM glukózy. Přestože se výsledky významně nelišily, v závislosti na koncentraci glukózy byla zjištěna dřívější iniciace akumulace lipidů a větší kapičky lipidů v AT-MSC, diferencovaných v přítomnosti 25mM glukózy. Tyto podmínky byly tedy vybrány pro následující studie.

Nižší kapacita adipogenního rozdílu WJ-MSC ve srovnání s AT-MSC detekovaná ve stejných kultivačních podmínkách vyvolala několik otázek o rozdílech v charakteristikách počátečních buněčných populací. Ve snaze charakterizovat tyto dva buněčné zdroje byla uskutečněna analýza účinnosti tvorby kolonií AT-MSC a WJ-MSC.

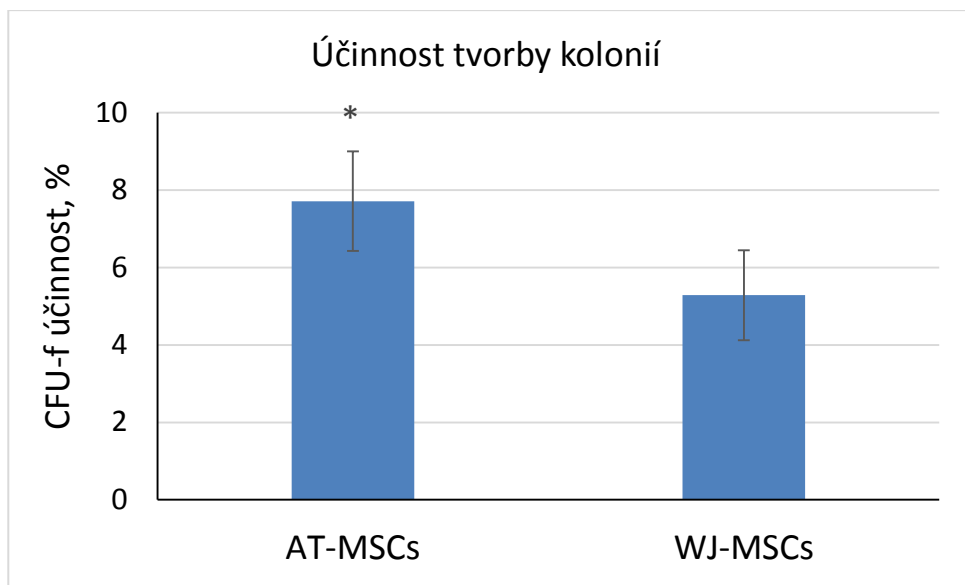
### 3.1.3 Kolonotvorná aktivita AT- a WJ-MSC

Schopnost MSC vytvářet kolonie buněk podobných fibroblastům *in vitro* je jednou z vlastností raných progenitorových buněk, v rámci funkčně heterogenní populace MSC. Stanovení kolonotvorné jednotky (CFU-f) může být provedeno za účelem charakterizace schopnosti sebeobnovy a stádia zapojení progenitorů v celkové populaci

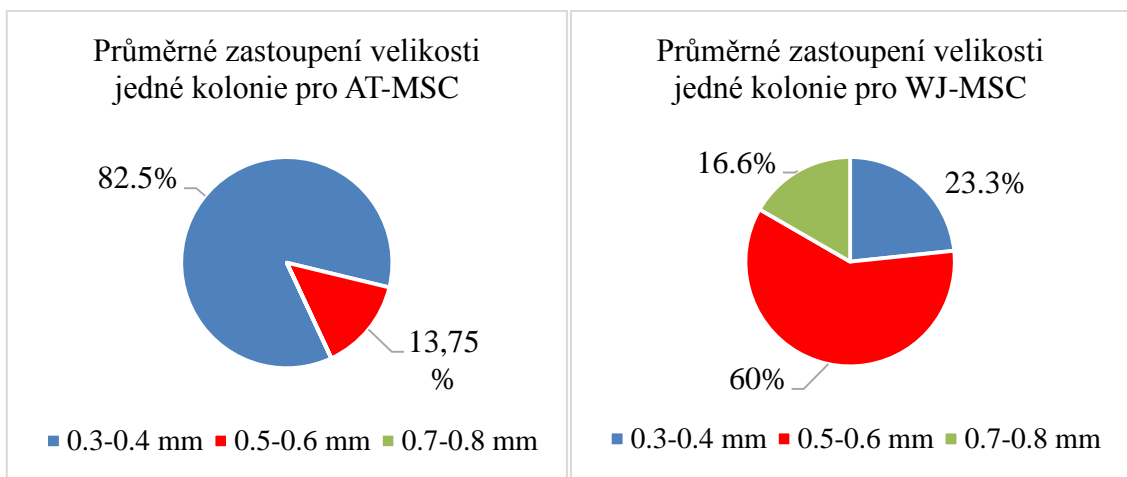
MSC. V naší studii se pro hodnocení aktivity tvorby kolonií buňky naočkowały s hustotou 40 buněk na  $\text{cm}^2$ , aby se zajistila distribuce jednotlivých buněk na povrchu tkáňové kultury. Po 14 dnech kultivace byly buňky fixovány, obarveny Giemsou, a vizuálně za pomoci pravítka bez přístrojového vybavení stanoven počet a velikost vytvořených kolonií (Obrázek 3.6).



**Obr. 3.6:** Zafixované a obarvené kolonie buněk MSC z tukové tkáně a Whartonova želé v kultivačních nádobách



**Obr. 3.7:** Účinnost tvorby kolonií po 14 dnech (\* - hodnoty u AT-MSC jsou významně ( $p < 0.05$ ) vyšší ve srovnání s WJ-MSC)



**Obr. 3.8:** Velikost kolonií generovaných AT-MSC a WJ-MSC.

Po 14 dnech kultivace byl projev účinnosti CFU-f na AT-MSC významně vyšší než, na WJ-MSC, což odpovídá  $7,7 \pm 1,3$  a  $5,3 \pm 1,2$  (Obrázek 3.7). Kromě tohoto, bylo po zhodnocení distribuce kolonií nalezeno dalších rozdílů mezi zdroji MSC ve velikostech. V AT-MSC bylo více než 80% kolonií s průměrem kolem 0,3 - 0,4 mm a pouze asi 14% kolonií bylo větších (0,5 - 0,6 mm). Naproti tomu pouze 23% kolonií vytvořených WJ-MSC bylo malých (0,3 - 0,4 mm), počet středně velkých kolonií obsahoval 60% a více než 16% generovaných kolonií mělo průměr větší než 0,8 mm (Obrázek 3.8).

Tato data ukazují, že ačkoli počet progenitorů, které jsou schopny se samostatně obnovit (tvorbou kolonií), je vyšší v kulturách AT-MSC, proliferační aktivita časných

progenitorů je výrazně vyšší v populaci WJ-MSC. Předpokladem bylo, že vysoká proliferační kapacita CFU-f buněk vedle omezené adipogenní diferenciaci WJ-MSC ukázaných dříve, může být spojena s přítomností CFU-f progenitorů fibroblastické linie. To by však mělo být dodatečně potvrzeno v dalších studiích.

Proto byly na základě údajů přítomných v této části práce vybrány AT-MSC jako vhodnější zdroj MSC pro inženýrství tukové tkáně a další studie.

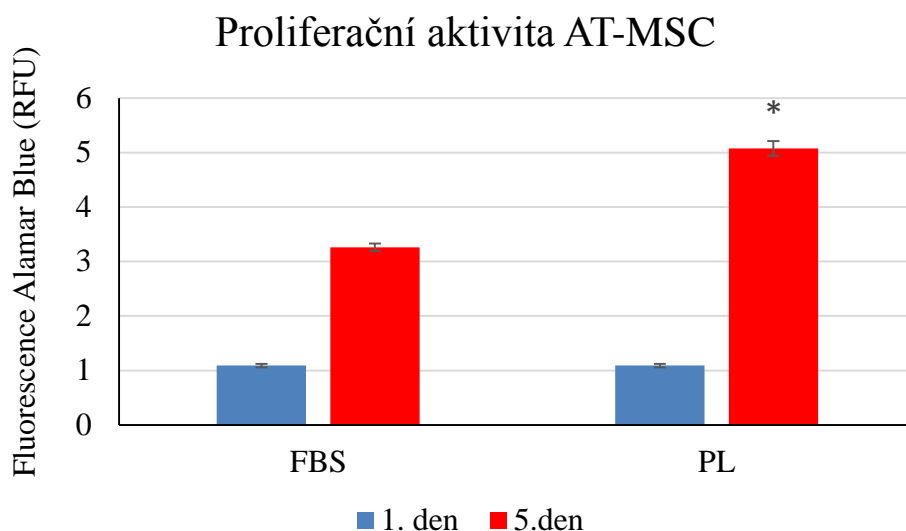
## **3.2 Klinicky relevantní podmínky adipogenní diferenciaci AT-MSC**

### **3.2.1 Proliferace AT-MSC v přítomnosti FBS nebo lidského PL**

Z hlediska regenerativní medicíny byla nutná adaptace procesu výroby buněk (izolace, expanze a uchování v genetických bankách) na standardy správné výrobní praxe (cGMP) klinického stupně. MSC byly obvykle kultivovány v přítomnosti FBS. Kvůli xenogennímu původu však FS představuje riziko virových, prionových, zoonóзовých kontaminací a může způsobit injekční imunitu organismu po injekci [80], což vyžaduje vyloučení aplikace FBS ze všech fází procesu buněčné kultury. V současné době představuje destičkový lyzát (PL) nejslibnější přirozenou alternativu k FBS při podpoře rozšiřování MSC a udržování jejich potenciálu pro další multilineární diferenciaci [37][89]. PL obsahuje široké spektrum koagulačních a růstových faktorů, adhezních molekul, inhibitorů proteázy a proteoglykanů, které mohou být uvolněny z a-granulí po aktivaci destiček fyzikálními nebo fyziologickými metodami [89]. Růst podporující aktivita PL vůči MSC byla vysvětlena komplexním účinkem cytokinů, zejména růstového faktoru odvozeného od destiček-AB / BB (PDGF-AB / BB), základního fibroblastového růstového faktoru (bFGF) a transformace růstového faktoru beta1 ( TGF- $\beta$ ). Kromě těchto tří základních složek byl v PL obsažen také epidermální růstový faktor (EGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), hepatocytový růstový faktor-1 (HGF-1) a nervový růstový faktor-p (NGF- $\beta$ ), u kterých je velmi důležité zajistit jejich celkovou biologickou aktivitu.

V této části studie byla hodnocena proliferační kapacita a účinnost adipogenní diferenciaci AT-MSC v přítomnosti 5% PL, a snahou bylo dosáhnout požadavků na překlad tohoto základního výzkumu směrem ke klinickému použití.

Potvrzováním dříve publikovaných zpráv bylo zjištěno, že došlo ke zlepšení proliferační kapacity AT-MSC v přítomnosti PL ve srovnání s FBS (Obrázek 3.9).



**Obr. 3.9:** Proliferační aktivita AT-MSC během kultivace v kultivačním médiu doplněném FBS nebo PL. (\* - hodnoty jsou významně ( $p < 0.05$ ) vyšší ve srovnání se skupinou FBS)

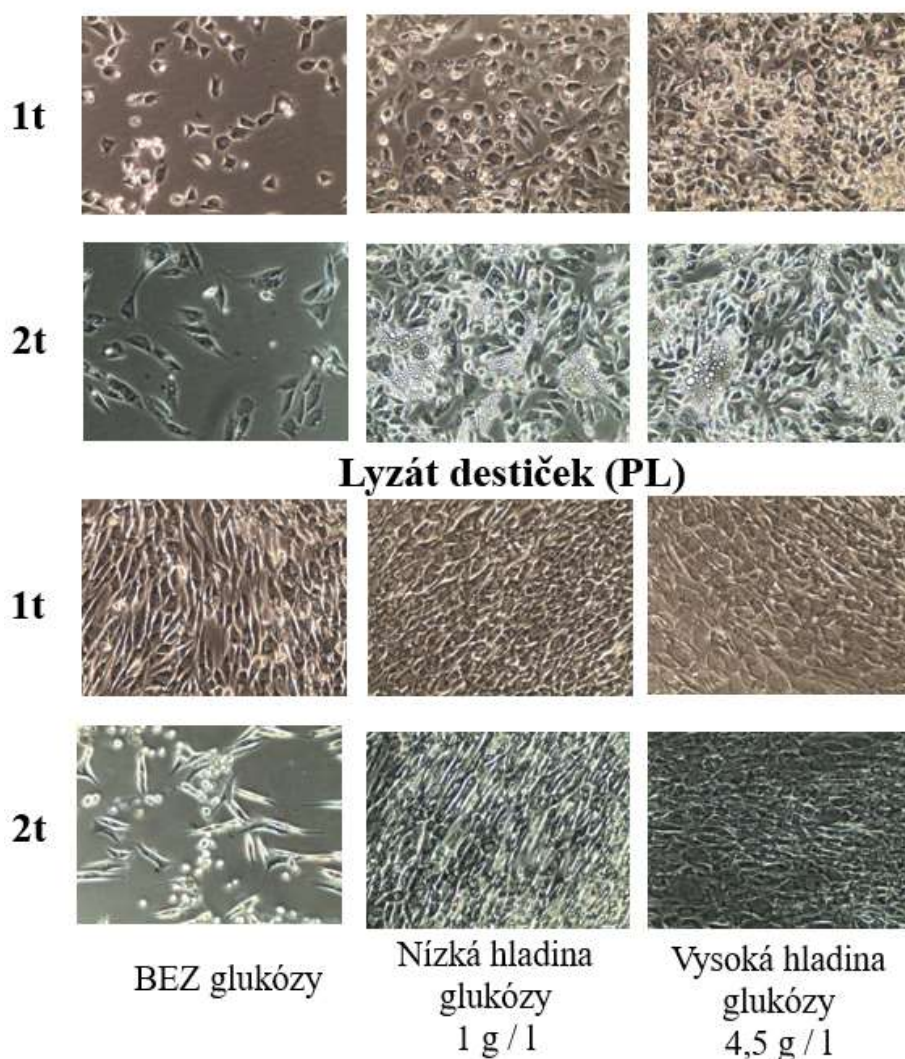
Bylo zde potvrzeno, více než pětinasobné zvýšení AB redukční rychlosti buněk kultivovaných PL, zatímco ve skupině FBS činil koeficient takového zvýšení 3,1 (Obrázek 3.9). Objevením silného mitogenního účinku lidské PL se stalo příslibem možnosti použít ho jako doplňku kultury pro expanzi AT-MSC.

### **3.2.2 Adipogenní diferenciaci AT-MSC v médiu obsahujícím doplňky lidského původu.**

K odhalení vlivu PL na adipogenní diferenciaci, byly použity stejné podmínky popsané výše v 3.1.2. V následující skupině bylo nahrazeno FBS 5% PL a v další skupině, vzhledem k vysoké aktivitě PL, byl aplikován lidský sérový albumin (5%) jako méně aktivní doplněk, který je široce dostupný a používaný v klinických aplikacích (Obrázek 3.10).

## V přítomnosti HSA nebo PL

### Lidský sérový albumin (HSA)

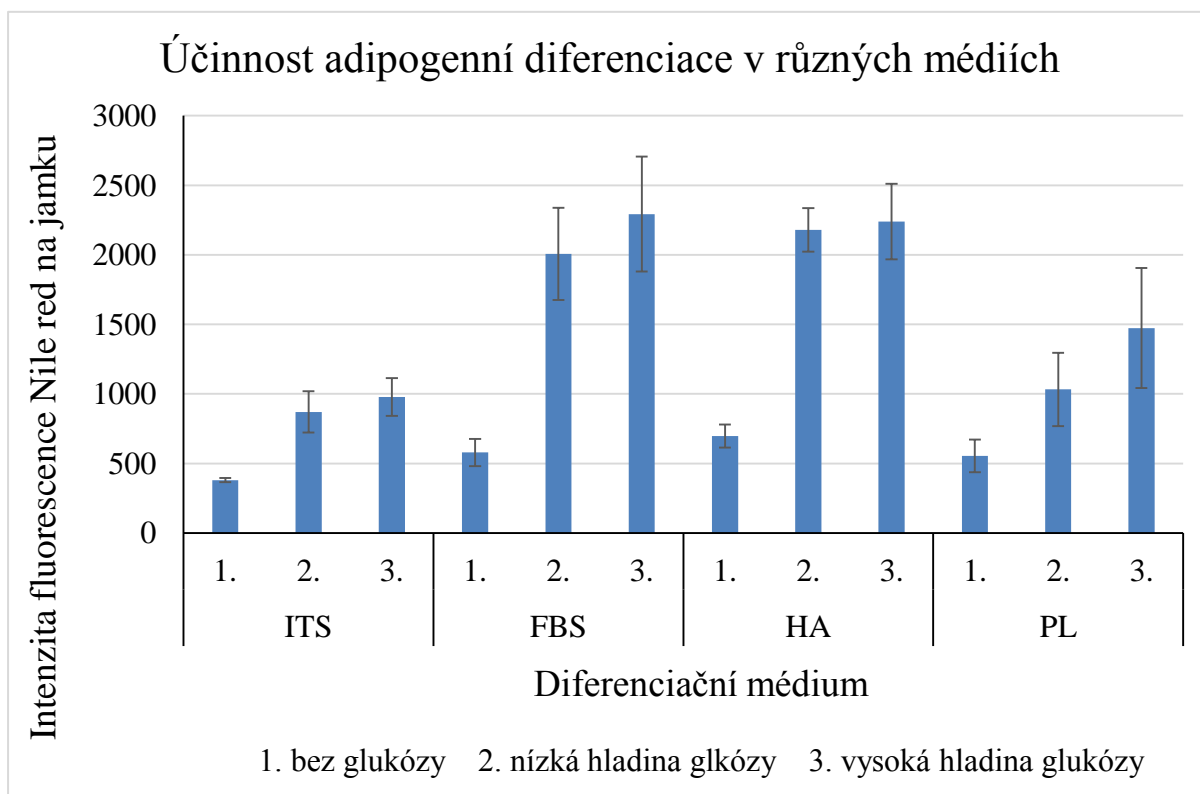


**Obr. 3.10:** Morfologie buněk během 2 týdnů adipogenní diferenciace v různých médiích (mikroskopie fázového kontrastu).

Stejně jako dříve bylo zjištěno, že nepřítomnost glukózy v médiu zcela zabránila adipogenní diferenciaci AT-MSC. Již po 1 týdnu indukce byla detekována významná ztráta buněk v médiu doplněném HSA v nepřítomnosti glukózy. V médiu založeném na PL se buňky jeví odolnější a taková ztráta byla detekována až po 2 týdnech kultivace (Obrázek 3.9). Zajímavostí bylo, že po jednom až dvou týdnech kultivace nebyly pozorovány žádné známky adipogenní diferenciace v médiu doplněném PL. Naproti tomu akumulace intracelulárních lipidů byla účinná v médiu doplněném HSA. Po jednom týdnu indukce byla v médiu detekována viditelně nejvyšší akumulace lipidů, která obsahovala 4,5 g / l glukózy a HSA (Obrázek 3.10). Po dvou týdnech indukované

diferenciace nebyly pozorovány žádné viditelné rozdíly v adipogenní diferenciaci v médiích s vysokým nebo nízkým obsahem glukózy v albuminu.

Po dvou týdnech diferenciace byly buňky obarveny Nile red a účinnost diferenciace byla stanovena pomocí intenzity fluorescence v čtečce mikroděstiček (Obr. 3.11).



**Obr. 3.11:** Účinnost adipogenní diferenciace AT-MSC vyhodnocená intenzitou fluorescence Nile red. (\* - hodnoty jsou významně ( $p < 0.05$ ) vyšší ve srovnání s podmínkami ITS a PL)

Hodnoty intenzity fluorescence Nile red potvrdily předchozí pozorování. Nejúčinnější adipogenní diferenciace byla detekována v kulturách založených na FBS a HSA (nebyly pozorovány žádné významné rozdíly). Avšak v nepřítomnosti doplňků, nebo v přítomnosti PL byla účinnost adipogenní diferenciace výrazně nižší (Obr. 3.11).

Je známo, že indukce adipogenní diferenciace je spojena s částečným zastavením buněčné proliferace. Avšak v našich studiích na rozdíl od AT-MSC bylo vizuálně pozorováno zvýšení buněčné hustoty AT-MSC v kultivačních podmínkách doplněných PL. Předpokladem bylo, že zvýšená proliferace AT-MSC v přítomnosti lidské PL může ovlivnit účinnost adipogenní diferenciace, ale je však třeba ji dále studovat.

Proto zde byla posouzena možnost nahradit xenogenní FBS lidským derivátem PL expanzí a adipogenní diferenciací AT-MSC. Potvrdilo se, že silný mitogenní účinek PL vysoce podporuje proliferační kapacitu buněk. Zmírňuje však adipogenní diferenciaci AT-MSC, což nebylo dříve prokázáno. Také bylo zjištěno, že HSA může být použit jako doplněk odvozený z lidské tkáně během adipogenní diferenciace.

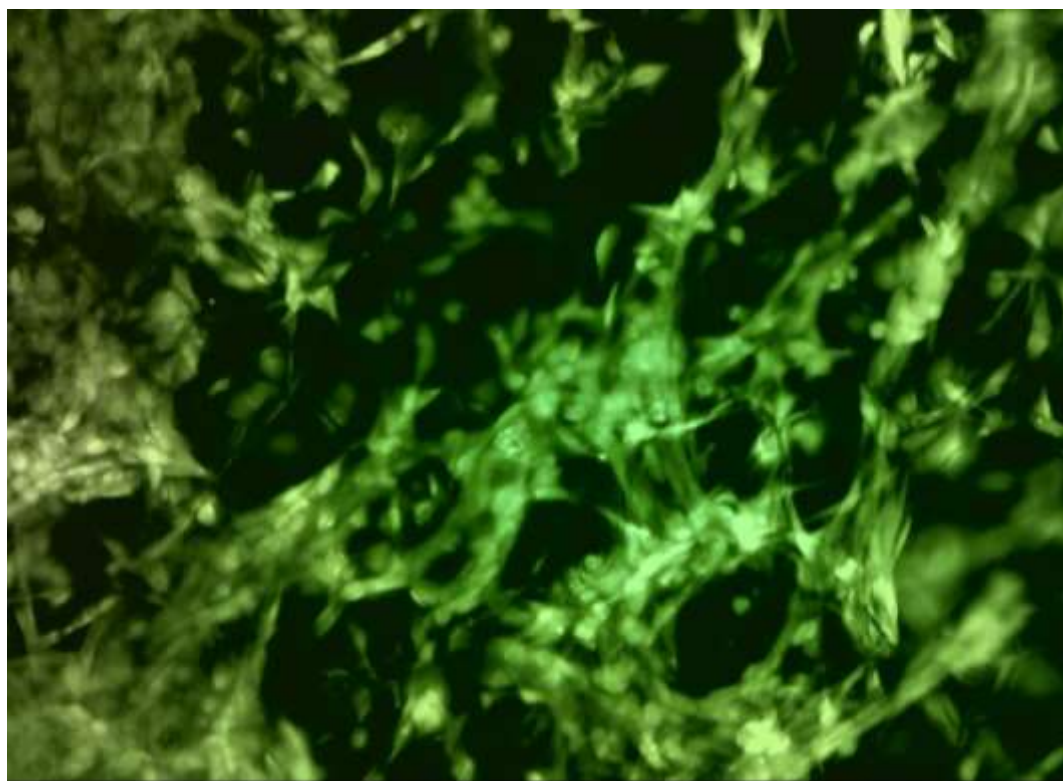


V dalších studiích ve 3D prostředí, za použití selektivního přístupu byla buněčná expanze připravena v médiu doplněném o PL, avšak buněčná diferenciací byla připravena v médiu obsahujícím HSA.

### **3.3 Adipózní tkáňové inženýrství ve 3D prostředí s využitím oscilačního perfuzního bioreaktorového systému a porézního kolagenu**

V této části byl učiněn pokus aplikovat principy tkáňového inženýrství pro vývoj 3D adipogenního konstruktů založeného na AT-MSC a kolagenových nosičích. Byla použita komerčně dostupná porézní lyofilizovaná kolagenová pěna (VUP Medical, Česká republika).

Přibližně  $5 \times 10^5$  AT-MSC bylo naočkováno do nosičů pomalým pipetováním a nasycením. Po jedné hodině inkubace v minimálním objemu kultivačního média (potřebného pro adhezi buněk) byly buňky kultivovány během jednoho týdne v médiu doplněném 5% PL. Morfologie a životaschopnost buněk 24 hodin po očkování byla stanovena testem Live / Dead pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 3.12).



**Obr. 3.12:** Morfologie a životaschopnost AT-MSC ve 3D kolagenových nosičích (test Live / Dead, fluorescenční mikroskopie).

Z obrázku 3.12 je vidět, že během 24 hodin buňky dosáhly své specifické morfolgie podobné fibroblastům a dobře se distribuovaly do pórů nosičů. Vysoká životaschopnost buněk byla potvrzena intenzivní zelenou fluorescencí Calcein-AM, jedné ze složek soupravy Live / Dead. Tyto výsledky potvrdily vhodnost použití navrhovaných nosičů pro 3D kulturu AT-MSC.

V následujících experimentech byly použity dvě podmínky:

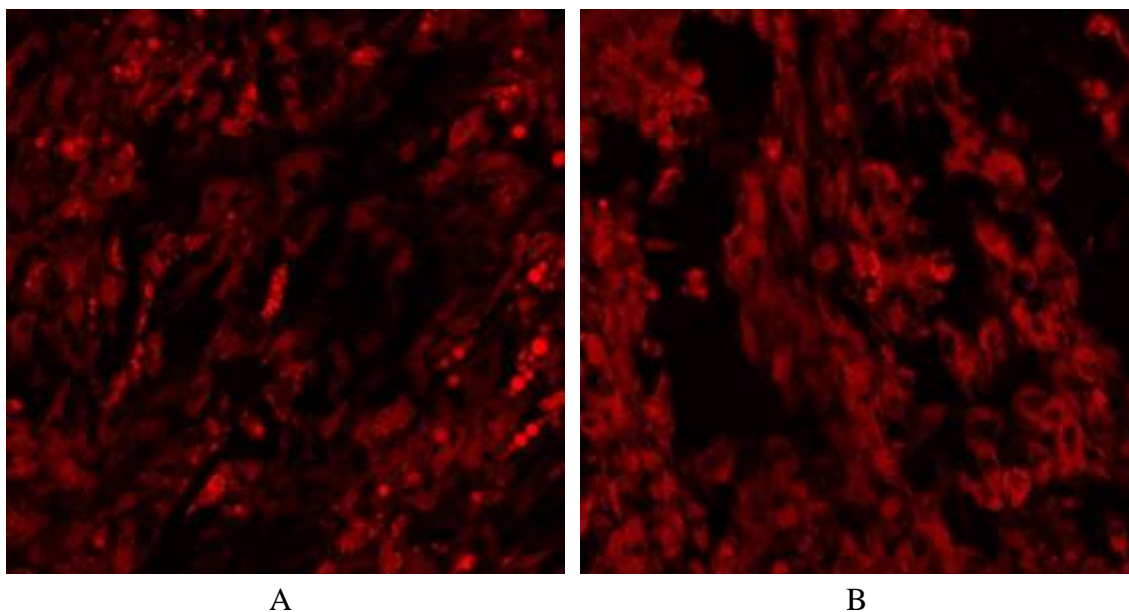
- a) Statická kultura nosičů naočkovaných MSC v konvenčních neadherentních odstředivkových zkumavkách (s předem otevřeným víčkem pro umožnění výměny plynu);
- b) Oscilační perfuzní bioreaktorový systém navržený dříve [70] a upravený pro naši studii.

Každý bioreaktor obsahoval speciálně navrženou 3D tiskovou komoru s umístěným nosičem, dvěma nádobami s kultivačními médii, uzavřenými navrženými uzávěry, spojujícími 2 filtry stříkačky, aby byla umožněna volná výměna plynu, což zajišťuje sterilitu systému. Médium bylo infundováno infuzním portem bez jehly, připojeným ke komoře pomocí trojcestného uzavíracího kohoutu. Dvě části systému byly spojeny pomocí adaptéru „Luer-Lock“ s PVC trubkou. Průtok média byl zajištěn injekční pumpou. Návrh a fotografie bioreaktoru jsou uvedeny na obrázku 3.13.



**Obr. 3.13:** Oscilační perfuzní bioreaktorový systém, používaný pro inženýrství tukové tkáně ve 3D porézních kolagenových nosičích (modifikovaný systém [70]).

Průtoková rychlost byla 0,4 ml / min, každých 15 minut byla zastavena, s ohledem na snížení smykového napětí. Objem média obsahoval 10 ml na bioreaktor. Stejný objem byl použit pro statickou kultivaci a diferenciaci buněk. Pro vývoj 3D adipogenních konstruktů byly kolagenové skelety naočkovány MSC, kultivovány 7 dní v expanzním médiu (na bázi PL) a poté 14 dní v adipogenním diferenciacním médiu obsahujícím lidský sérový albumin. Po dvou týdnech diferenciacce byly nosiče fixovány paraformaldehydem, obarveny Nile red a hodnoceny konfokální mikroskopií (Obrázek 3.14).



**Obr. 3.14:** Adipogenní diferenciacce AT-MSC uvnitř 3D kolagenových nosičů pomocí: A - statické podmínky; B - Bioreaktorový systém. Konfokální mikroskopie Nile red.

V obou podmínkách jsme detekovali hromadění intracelulárních lipidových kapiček, které byly pozitivně obarveny Nile red (obr. 3.14). To potvrzuje vhodnost dříve stanovených kultivačních podmínek pro inženýrství tukové tkáně v 3D prostředí.

## 4 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo řešení defektů měkkých tkání. V rámci inženýrství tukové tkáně představují slibnou strategii pro řešení těchto defektů multipotentní mezenchymální stromální buňky. Účinnost způsobu dosažení cíle ve tkáňovém inženýrství může ovlivnit zdroj použitých MSC. Schopnost rozlišovat směrem k adipogenní linii je jedním z kritérií definujících fibroblastové buňky na MSC [34]. Účinnost diferenciaci v závislosti na zdroji buněčné izolace není však vždy stejná a k nalezení optimálního zdroje MSC jsou nutné srovnávací studie pro rekonstrukce tukové tkáně / měkké tkáně.

V této práci jsme porovnali účinnost adipogenní diferenciaci MSC odvozených z lidské tukové tkáně a Whartonova želé. WJ-MSC lze považovat za teoreticky ideální zdroj pro inženýrství tukové tkáně vzhledem k jejich hojnosti, bezpečnostnímu profilu a dostupnosti. Jejich adipogenní potenciál je však protichůdný. Zjistili jsme, že účinnost adipogenní diferenciaci v běžně používaných podmínkách a médiích byla významně slabší v kulturách WJ-MSC ve srovnání s AT-MSC. Po 2 týdnech indukce nebyla u WJ-MSC pozorována žádná akumulace lipidů. Tyto výsledky souhlasí s dalšími dříve publikovanými údaji, které ukazují sníženou adipogenní diferenciaci WJ-MSC [72]. Autoři se domnívali, že je odpovědná snížená exprese IGFBP2 ve WJ-MSC [73]. Seungok Lee a kolektiv prokázali nižší diferenciací kapacitu WJ-MSC oproti MSC z kostní dřeně [74]. V naší studii jsme se pokusili modifikovat podmínky adipogenní diferenciaci zvýšením nebo snížením obsahu glukózy v kultivačním médiu. Již dříve bylo prokázáno [75], že médium s vysokou glukózou zvyšuje hladinu akumulace lipidů AT-MSC. Chao Deng a kolektiv, také prokázali, že vysoce glukózové médium zvyšuje adipogenezi buněk periodontálních vazů a současně snižuje jejich osteogenní diferenciací kapacitu [76].

O účinku koncentrace glukózy na adipogenní kapacitu WJ-MSC je však málo známo. V naší studii jsme připravili několik médií pro diferenciaci buněk, měnící se obsah glukózy (0, 5 a 25 mM). Všechna média byla doplněna inzulinem, transferrinem a směsí selenu. K polovině těchto médií jsme přidali fetální hovězí sérum a polovina kultur byla indukována v podmínkách bez séra, aby se odhalila potřeba séra v kultivačním médiu. Významná buněčná smrt byla pozorována bez přidání glukózy a séra již po 3 dnech kultivace. Přidání séra do média bez glukózy podporovalo životaschopnost buněk, avšak v kulturách AT-MSC nebo WJ-MSC nebyla pozorována žádná adipogenní diferenciaci. Doplnění média 5 mM a 25 mM glukózy zvýšilo adipogenezi AT-MSC, dokonce i v médiu bez séra. Avšak maximální účinnost diferenciaci byla detekována v přítomnosti glukózy a séra. Zvýšená koncentrace glukózy na 25 mM vizuálně podporovala diferenciaci AT-MSC během prvního týdne zavedení. Naopak u WJ-MSC nebyl pozorován žádný pozitivní účinek vysoce

glukózového média. Je známo, že MSC jsou heterogenní populace s různým obsahem dřívějších progenitorů, v závislosti na zdroji a podmínkách kultivace.

Vzhledem k tomu, že diferenciační kapacitu lze označit jako progenitorovou vlastnost buněk, pokusili jsme se analyzovat obsah dřívějších progenitorových buněk v kulturách AT-MSC a WJ-MSC stanovením jejich potenciálu tvorby kolonií. Zjistili jsme, že účinnost tvorby kolonií AT-MSC byla ve srovnání s WJ-MSC kapacitně vyšší. Avšak proliferační kapacita jednotek tvořících kolonie byla v kulturách WJ-MSC větší, ale s menší četností. Je známo, že adipogenní diferenciace *in vitro* je doprovázena významnou inhibicí proliferace buněk [77]. Předpokládali jsme, že proliferace AT - a WJ-MSC při adipogenní indukci se může lišit a ovlivnit úplnost diferenciace ve WJ-MSC. I když jsme přímo nehodnotili proliferaci buněk během zavedení, vizuálně jsme zjistili významnou převahu počtu buněk v kulturách WJ-MSC ve srovnání s AT-MSC. Zvýšenou proliferaci WJ-MSC potvrzuje také Linli Li a kolektiv [78]. To může být také jeden z faktorů ovlivňujících adipogenní diferenciaci WJ-MSC *in vitro*. Proto jsme pro naše další studie vybrali AT-MSC jako typ buňky s reprodukovatelně vyšším adipogenním potenciálem ve srovnání s WJ-MSC

Pokyny pro zpracování MSC pro klinické aplikace vyžadují, aby se během celého postupu nepoužívaly xenogenní složky (od sběru tkáně, izolace buněk až po transplantaci buněk). To se také týká i konstruktů tkáňového inženýrství. V naší studii jsme zjistili, že přítomnost séra je nezbytná pro dosažení účinné adipogeneze pomocí AT-MSC. Proto je pro regenerativní medicínu velmi důležitý výběr doplňků pro nahrazení xenogenního séra s ohledem na lidské zdraví. Existuje mnoho zpráv, které ukazují, že velkým příslibem doplňku kultivačního média pro expanzi MSC je destičkový lyzát, který působí jako silný mitogen a zachovává funkční vlastnosti MSC [37][79]. Potvrdili jsme zvýšenou míru proliferace AT-MSC během kultivace v médiu doplněném PL ve srovnání s FBS. O účinku PL během adipogenní diferenciace buněk je však málo známo. V naší studii jsme během adipogenní indukce použili lidský PL jako střední doplněk. Ve výsledku jsme zjistili, že na rozdíl od média založeného na FBS nebyla za těchto podmínek pozorována žádná akumulace intracelulárních lipidových kapiček. Tyto výsledky souhlasí s jedinou studií, která ukazuje, že PL ovlivňuje adipogenní diferenciaci MSC [80][81]. Autoři naznačují, že PL potlačuje expresi syntézy prostaglandinů D2 [81]. Současně nebyl v jiné zprávě uveden žádný negativní účinek PL [82]. Je třeba poznamenat, že v naší studii PL snížila účinnost adipogenní diferenciace nezávisle na koncentraci glukózy v médiu. Účinky PL na biologii MSC nejsou dosud dostatečně známy a vyžadují další studium. Abychom překonali problém snížené adipogenní diferenciace, který je kritický pro inženýrství tukové tkáně, nahradili jsme PL a FBS lidským sérovým albuminem, který je široce používán v klinických aplikacích. V důsledku toho byla adipogenní diferenciace AT-MSC v přítomnosti lidského sérového albuminu na stejných hladinách jako v médiu doplněném FBS. Pro další implementaci našich výsledků do 3D prostředí jsme tedy

vybrali PL jako doplněk pro nasazení a kultivaci buněk a lidský sérový albumin jako doplněk do diferenciačního média.

Vývoj 3D náhrady pro rekonstrukci měkkých tkání vyžaduje přístupy, které zajišťují kontrolované prostředí pro adhezi a rozptření buněk, zlepšenou migraci buněk celým scaffoldem a penetraci média v celém jeho objemu. Pro tyto účely jsme použili modifikovaný, uzavřený, oscilační, perfuzní bioreaktorový systém [70]. Tento systém byl dříve používán pro rozšíření MSC [83], pro generování kostních nebo chrupavkových štěpů [84][85], nebo kryokonzervaci MSC v kolagenu [86]. V našem výzkumu koncepční studie jsme se zaměřili na posouzení možnosti využití tohoto bioreaktorového systému pro inženýrství tukové tkáně, konkrétně zda navržené 3D kultivační podmínky mohou zachovat adipogenní kapacitu MSC. Jako 3D nosič pro MSC jsme použili komerčně dostupné lyofilizované kolagenové rohože. Výsledkem bylo zjištění, že adipogenní diferenciace AT-MSK byla zachována, což se jeví slibným při použití bioreaktoru pro inženýrství tukové tkáně. Další výhodou navrhovaného systému bioreaktorů v klinickém inženýrství tukové tkáně je jeho uzavřený systém. Minimalizace lidského přínosu do procesu může zajistit vyšší bezpečnost a reprodukovatelnost vývoje konstruktů bioinženýrů. Celkově tato studie poskytuje cenné informace pro další vývoj štěpů vytvořených pomocí tukové tkáně pro aplikace regenerativní medicíny.

## 5 Závěr

V této práci jsme studovali potenciál multipotentních mezenchymálních stromálních buněk odvozených z tukové tkáně a Whartonova želé pro inženýrství tukové tkáně a rekonstrukci měkkých tkání.

Bylo zjištěno, že účinnost adipogenní diferenciaci *in vitro* je vyšší u MSC odvozených z lidské tukové tkáně, ve srovnání s Whartonovým želé.

Absence glukózy a séra v diferenciacním médiu zcela zabránila adipogenezi MSC. Zvýšení koncentrace glukózy zvýšilo hromadění intracelulárních lipidů v AT-MSC, neovlivnilo však adipogenní diferenciaci WJ-MSC.

Účinnost tvorby kolonií byla vyšší u AT-MSC ve srovnání s WJ-MSC, avšak proliferační aktivita buněk tvořících kolonie byla vyšší v kulturách WJ-MSC.

Aplikace destičkového lyzátu jako doplňku kultivačního média stimulovala buněčnou proliferaci během expanzního stadia, avšak oslabila adipogenní diferenciaci AT-MSC. Současně použití lidského sérového albuminu v buněčném diferenciacním médiu podpořilo adipogenezi AT-MSC a může být použito jako náhrada xenogenního séra v klinickém inženýrství tukové tkáně.

Posoudili jsme možnost využití zavedených kultur a podmínek diferenciaci pro inženýrství tukové tkáně ve 3D kolagenových nosičích a potvrdili jsme potenciál použití uzavřeného oscilačního perfuzního bioreaktorového systému pro inženýrství tukové tkáně.

Prezentovaná data budou využita pro zlepšení současných laboratorních (experimentálních) postupů pro rekonstrukce měkkých tkání pomocí metod inženýrství tukové tkáně.

## Seznam použité literatury

- [1] MĚŠŤÁK, Jan, Martin MOLITOR, Ondřej MĚŠŤÁK a Lucie KALINOVÁ. *Základy plastické chirurgie*. Vydání druhé. V Praze. ISBN 978-80-246-2839-4.
- [2] BRETT, Elizabeth, Natalie CHUNG, William Tripp LEAVITT, Arash MOMENI, Michael T. LONGAKER a Derrick C. WAN. A Review of Cell-Based Strategies for Soft Tissue Reconstruction. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2017, **23**(4), 336-346 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1089/ten.teb.2016.0455. ISSN 1937-3368. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2016.0455>
- [3] CHOI, Jennifer H., Jeffrey M. GIMBLE, Kyongbum LEE, Kacey G. MARRA, J. Peter RUBIN, James J. YOO, Gordana VUNJAK-NOVAKOVIC a David L. KAPLAN. Adipose Tissue Engineering for Soft Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2010, **16**(4), 413-426 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1089/ten.teb.2009.0544. ISSN 1937-3368. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2009.0544>
- [4] LEE, Su Yeon, Yongdoo PARK a Soon Jung HWANG. Effect of bFGF and fibroblasts combined with hyaluronic acid-based hydrogels on soft tissue augmentation. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2019, **41**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1186/s40902-019-0234-0. ISSN 2288-8586. Dostupné z: <https://jkamprs.springeropen.com/articles/10.1186/s40902-019-0234-0>
- [5] MAHONEY, Christopher M., Cayla IMBARLINA, Cecelia C. YATES a Kacey G. MARRA. Current Therapeutic Strategies for Adipose Tissue Defects/Repair Using Engineered Biomaterials and Biomolecule Formulations. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2018, **9** [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.3389/fphar.2018.00507. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00507/full>
- [6] ARSHAD, Zeeshaan, Lindsey KARMEN, Rajan CHOUDHARY, James A. SMITH, Olivier A. BRANFORD, David A. BRINDLEY, David PETTITT a Benjamin M. DAVIES. Cell assisted lipotransfer in breast augmentation and reconstruction: A systematic review of safety, efficacy, use of patient reported outcomes and study quality. *JPRAS Open* [online]. 2016, **10**, 5-20 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.jpra.2016.08.004. ISSN 23525878. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352587816300171>
- [7] TOYSERKANI, Navid Mohamadpour, Marlene Louise QUADE a Jens Ahm SØRENSEN. Cell-Assisted Lipotransfer: A Systematic Review of Its Efficacy. *Aesthetic Plastic Surgery* [online]. 2016, **40**(2), 309-318 [cit. 2020-04-



- 30]. DOI: 10.1007/s00266-016-0613-1. ISSN 0364-216X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00266-016-0613-1>
- [8] SONG, Mei, Yi LIU, Ping LIU a Xianying ZHANG. *A promising tool for surgical lipotransfer: a constant pressure and quantity injection device in facial fat grafting* [online]. 2017, **5**, s41038-017-0077-9 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1186/s41038-017-0077-9. ISSN 2321-3876. Dostupné z: <https://academic.oup.com/burnstrauma/article/doi/10.1186/s41038-017-0077-9/5680321>
- [9] KIM, Jong Hwan, Tae-Rin KWON, Sung Eun LEE, Yoo Na JANG, Hye Sung HAN, Seog Kyun MUN a Beom Joon KIM. Comparative Evaluation of the Effectiveness of Novel Hyaluronic Acid-Polynucleotide Complex Dermal Filler. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1038/s41598-020-61952-w. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-61952-w>
- [10] WOLLINA, Uwe a Alberto GOLDMAN. Fillers for the improvement in acne scars. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.2147/CCID.S86478. ISSN 1178-7015. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/fillers-for-the-improvement-in-acne-scars-peer-reviewed-article-CCID>
- [11] CHACUR, Roberto, Honório Sampaio MENEZES, Nívea Maria Bordin da Silva CHACUR, Danuza Dias ALVES, Rodrigo Cadore MAFALDO, Leandro Dias GOMES, Gina MATZENBACHER a Renata BATAIOLLI. Replacement of gluteal implants by polymethyl methacrylate filler: case report. *Case Reports in Plastic Surgery and Hand Surgery* [online]. 2019, **6**(1), 20-24 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1080/23320885.2018.1549946. ISSN 2332-0885. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23320885.2018.1549946>
- [12] JACOVELLA, Patricio F. *Use of calcium hydroxylapatite (Radiesse®) for facial augmentation* [online]. [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.2147/cia.s2065. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2544361/>
- [13] SADOVE, Richard. Injectable Poly-L-Lactic Acid: A Novel Sculpting Agent for the Treatment of Dermal Fat Atrophy After Severe Acne. *Aesthetic Plastic Surgery* [online]. 2009, **33**(1), 113-116 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1007/s00266-008-9242-7. ISSN 0364-216X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00266-008-9242-7>
- [14] YAMAUCHI, Paul. Emerging permanent filler technologies: focus on Aquamid. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.2147/CCID.S46650. ISSN 1178-7015. Dostupné z:

<http://www.dovepress.com/emerging-permanent-filler-technologies-focus-on-aquamid-peer-reviewed-article-CCID>

- [15] WOLLINA, Uwe. *Silicone Injections* [online]. 2012 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3483578/>
- [16] EHLICH, Ji. Tkáňové inženýrství – od teorie k praxi. In: *Science & Technology Club* [online]. 2016 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://science-technology.club/tkanove-inzenyrstvi-od-teorie-k-praxi/>
- [17] LA GATTA, Annalisa, Rosanna SALZILLO, Claudia CATALANO, Antonella D'AGOSTINO, Anna Virginia Adriana PIROZZI, Mario DE ROSA, Chiara SCHIRALDI a Bing XU. Hyaluronan-based hydrogels as dermal fillers: The biophysical properties that translate into a “volumetric” effect. *PLOS ONE* [online]. 2019, **14**(6) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1371/journal.pone.0218287. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0218287>
- [18] AMLER, Evžen a Lucie KOLÁČNÁ. *Tkáňové inženýrství* [online]. In: . [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: [https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/1557/mod\\_resource/content/0/Tkáňové inženýrství.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/1557/mod_resource/content/0/Tkáňové_inženýrství.pdf)
- [19] Osteogenesis Markers. *R&D Systems a biotechne brand* [online]. 2020 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/research-area/osteogenesis-markers>
- [20] BÜSSOW, Konrad, Olga KUTEN, Christoph STOTTER, Karina KRAMER, Andrea DE LUNA, Thomas MUELLNER, Zsombor LACZA a Stefan NEHRER. Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2015, **32**, 81-90 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.sbi.2015.03.002. ISSN 0959440X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X15000299>
- [21] ETO, Hitomi, Harunosuke KATO, Hirotaka SUGA, Noriyuki AOI, Kentaro DOI, Shinichiro KUNO a Kotaro YOSHIMURA. The Fate of Adipocytes after Nonvascularized Fat Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2012, **129**(5), 1081-1092 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31824a2b19. ISSN 0032-1052. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00006534-201205000-00010>
- [22] DOI, Kentaro, Fusa OGATA, Hitomi ETO, et al. Differential Contributions of Graft-Derived and Host-Derived Cells in Tissue Regeneration/Remodeling after Fat Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2015, **135**(6), 1607-1617 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001292. ISSN 0032-1052
- [23] ŠOLC, Martin. *Právo, etika a kmenové buňky*. Wolters Kluwer. ČR, 2018. ISBN 978-80-75552-978-7.

- [24] FILIP, Stanislav, Jaroslav MOKRÝ a Ivan HRUŠKA. *Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie*. Praha: Galén, c2006. Makropulos. ISBN 80-726-2401-6.
- [25] BRANISTE, Tudor, Vitalie COBZAC, Polina ABABII, et al. Mesenchymal stem cells proliferation and remote manipulation upon exposure to magnetic semiconductor nanoparticles. *Biotechnology Reports* [online]. 2020, **25** [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00435. ISSN 2215017X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215017X19304710>
- [26] SAMSONRAJ, Rebekah M., Michael RAGHUNATH, Victor NURCOMBE, James H. HUI, Andre J. VAN WIJNEN a Simon M. COOL. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *STEM CELLS Translational Medicine* [online]. 2017, **6**(12), 2173-2185 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1002/sctm.17-0129. ISSN 21576564. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sctm.17-0129>
- [27] MIZUKAMI, Amanda a Kamilla SWIECH. Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem Cells International* [online]. 2018, **2018**, 1-13 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1155/2018/4083921. ISSN 1687-966X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4083921/>
- [28] PRELL, Aleš. *Moderní způsoby kultivace* [online]. In: . [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/2871592/>
- [29] Fetal bovine serum. In: *Biosera* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.biosera.com/home/products/fetal-bovine-serum-and-other-sera/>
- [30] JOHNSON, Mary. Fetal Bovine Serum. *Materials and Methods* [online]. 2012, **2** [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.13070/mm.en.2.117. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html>
- [31] LANER-PLAMBERGER, Sandra, Michaela OELLER, Cornelia MRAZEK, Arnulf HARTL, Alina SONDEREGGER, Eva ROHDE, Dirk STRUNK a Katharina SCHALLMOSER. Upregulation of mitotic bookmarking factors during enhanced proliferation of human stromal cells in human platelet lysate. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2019, **17**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1186/s12967-019-02183-0. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-02183-0>
- [32] PILÁT, Martin. *Destičkový lyzát* [online]. In: . [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.vabios.com/portfolio-item/destickovy-lyzat/>
- [33] BURNOUF, Thierry, Dirk STRUNK, Mickey B.C. KOH a Katharina SCHALLMOSER. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* [online]. 2016, **76**, 371-387 [cit.

- 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215008753>
- [34] DOMINICI, M., K. LE BLANC, I. MUELLER, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [online]. 2006, **8**(4), 315-317 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1080/14653240600855905. ISSN 14653249. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324906708817>
- [35] Imunofenotypizace. *Symptomy* [online]. 2020 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.symptomy.cz/mesh/kod?id=D016130>
- [36] Buněčná imunita a imunofenotypizace. *Fakultní nemocnice Hradec Králové* [online]. Hradec Králové, 2020 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/ukia/seznam-metod/vysetreni-bunecne-imunity>
- [37] PETRENKO, Yuriy, Irena VACKOVA, Kristyna KEKULOVA, et al. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1038/s41598-020-61167-z. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-61167-z>
- [38] NEUBAUER, Markus, Olga KUTEN, Christoph STOTTER, Karina KRAMER, Andrea DE LUNA, Thomas MUELLNER, Zsombor LACZA a Stefan NEHRER. The Effect of Blood-Derived Products on the Chondrogenic and Osteogenic Differentiation Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Originated from Three Different Locations. *Stem Cells International* [online]. 2019, **2019**, 1-20 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1155/2019/1358267. ISSN 1687-966X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/1358267/>
- [39] BEREICHEZ-FRIDMAN, Roberto a Pablo R. MONTERO-OLVERA. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal [SQUMJ]* [online]. 2018, **18**(3), 264-277 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.18295/squmj.2018.18.03.002. ISSN 2075-0528. Dostupné z: <https://journals.squ.edu.om/index.php/squmj/article/view/2845>
- [40] LIRAS, Antonio. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2010, **8**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1186/1479-5876-8-131. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-8-131>
- [41] CHOUDHERY, Mahmood S, Michael BADOWSKI, Angela MUISE, John PIERCE a David T HARRIS. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational*

- Medicine* [online]. 2014, **12**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1186/1479-5876-12-8. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-12-8>
- [42] INATANI, Hiroyuki, Norio YAMAMOTO, Katsuhiro HAYASHI, et al. Do Mesenchymal Stem Cells Derived From Atypical Lipomatous Tumors Have Greater Differentiation Potency Than Cells From Normal Adipose Tissues? *Clinical Orthopaedics and Related Research*® [online]. 2017, **475**(6), 1693-1701 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1007/s11999-017-5259-z. ISSN 0009-921X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11999-017-5259-z>
- [43] L.R. RILO, Horacio, Joaquin CAGLIANI, Daniel GRANDE, Ernesto P MOLMENTI a Edmund J. MILLER. *Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications* [online]. 2017, **3**(2), 1-14 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.15436/2471-0598.17.022. ISSN 24710598. Dostupné z: <http://www.omegaonline.org/article-details/Immunomodulation-by-Mesenchymal-Stromal-Cells-and-Their-Clinical-Applications/1446>
- [44] BORA, Pablo. *Buňky z tukové tkáně v regenerativní medicíně* [online]. In: . 2017 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.prf.jcu.cz/veda/nase-objevy/bunky-z-tukove-tkane-v-regenerativni-medicine.html>
- [45] YANG, Jin-Ah, Hyung-Min CHUNG, Chong-Hyun WON a Jong-Hyuk SUNG. Potential application of adipose-derived stem cells and their secretory factors to skin: discussion from both clinical and industrial viewpoints. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2010, **10**(4), 495-503 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1517/14712591003610598. ISSN 1471-2598. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712591003610598>
- [46] BEREICHEZ-FRIDMAN, Roberto, Ricardo GÓMEZ-GARCÍA, Julio GRANADOS-MONTIEL, Enrique BEREICHEZ-FASTLICHT, Anell OLIVOS-MEZA, Julio GRANADOS, Cristina VELASQUILLO a Clemente IBARRA. The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells—Their Current Uses and Potential Applications. *Stem Cells International* [online]. 2017, **2017**, 1-14 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1155/2017/2638305. ISSN 1687-966X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/2638305/>
- [47] SUZDALTSEVA, Yulia, Sergey ZHIDKIH, Sergey L. KISELEV a Victor STUPIN. Locally Delivered Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Chronic Inflammation in Long-Term Nonhealing Wounds: A Randomized Study. *Stem Cells International* [online]. 2020, **2020**, 1-11 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1155/2020/5308609. ISSN 1687-966X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2020/5308609/>

- [48] WEISS, Mark L. a Deryl L. TROYER. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews* [online]. 2006, **2**(2), 155-162 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1007/s12015-006-0022-y. ISSN 1550-8943. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12015-006-0022-y>
- [49] GRABIN, Soraya, Gerd ANTES, G. Björn STARK, Edith MOTSCHALL, Sabine BUROH a Florian M. LAMPERT. Cell-Assisted Lipotransfer. *Deutsches Arzteblatt Online* [online]. 2015 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.3238/arztebl.2015.0255. ISSN 1866-0452. Dostupné z: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2015.0255>
- [50] *Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease* [online]. 2016 [cit. 2020-04-30]. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00701-0>
- [51] *Materiály pro tkáňové inženýrství* [online]. In: . [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: [https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5374/mod\\_resource/content/1/MTI\\_2\\_ZS2015\\_2016\\_materialy\\_1.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5374/mod_resource/content/1/MTI_2_ZS2015_2016_materialy_1.pdf)
- [52] *Nosná konstrukce pro pěstování buněk a tkání* [online]. In: . [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: [https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5376/mod\\_resource/content/1/MTI\\_3\\_ZS2015\\_2016\\_materialy%203.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5376/mod_resource/content/1/MTI_3_ZS2015_2016_materialy%203.pdf)
- [53] DONG, Chanjuan a Yonggang LV. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers* [online]. 2016, **8**(2) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.3390/polym8020042. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/2/42>
- [54] VASHI, Aditya V., Keren M. ABBERTON, Gregory P. THOMAS, Wayne A. MORRISON, Andrea J. O'CONNOR, Justin J. COOPER-WHITE a Erik W. THOMPSON. Adipose Tissue Engineering Based on the Controlled Release of Fibroblast Growth Factor-2 in a Collagen Matrix. *Tissue Engineering* [online]. 2006, **12**(11), 3035-3043 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1089/ten.2006.12.3035. ISSN 1076-3279. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.2006.12.3035>
- [55] LOVETT, Michael, Christopher CANNIZZARO, Laurence DAHERON, Brady MESSMER, Gordana VUNJAK-NOVAKOVIC a David L. KAPLAN. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(35), 5271-5279 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.008. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207006126>
- [56] MEINEL, Lorenz, Vassilis KARAGEORGIU, Sandra HOFMANN, et al. Engineering bone-like tissue *in vitro* using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2004, **71A**(1), 25-34 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1002/jbm.a.30117. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30117>

- [57] LAVIK, E. a R. LANGER. Tissue engineering: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, **65**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1007/s00253-004-1580-z. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1580-z>
- [58] KANG, Sun-Woong, Sang-Woo SEO, Cha Yong CHOI a Byung-Soo KIM. Porous Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microsphere as Cell Culture Substrate and Cell Transplantation Vehicle for Adipose Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods* [online]. 2008, **14**(1), 25-34 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1089/tec.2007.0290. ISSN 1937-3384. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/tec.2007.0290>
- [59] HAUSMAN, D. B., M. DIGIROLAMO, T. J. BARTNESS, G. J. HAUSMAN a R. J. MARTIN. The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity Reviews* [online]. 2001, **2**(4), 239-254 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1046/j.1467-789X.2001.00042.x. ISSN 1467-7881. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1467-789X.2001.00042.x>
- [60] URIEL, Shiri, Jung-Ju HUANG, Monica L. MOYA, Megan E. FRANCIS, Rui WANG, Shu-ying CHANG, Ming-Huei CHENG a Eric M. BREY. The role of adipose protein derived hydrogels in adipogenesis. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(27), 3712-3719 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.028. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208003888>
- [61] Tkáňové inženýrství - Tissue engineering. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: [https://cs.qwe.wiki/wiki/Tissue\\_Engineering](https://cs.qwe.wiki/wiki/Tissue_Engineering)
- [62] PLUNKETT, Niamh a Fergal J. O'BRIEN. Bioreactors in tissue engineering. *Technology and Health Care* [online]. 2011, **19**(1), 55-69 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.3233/THC-2011-0605. ISSN 09287329.
- [63] LEBER, Jasmin, Jan BAREKZAI, Miriam BLUMENSTOCK, Björn POSPISIL, Denise SALZIG a Peter CZERMAK. Microcarrier choice and bead-to-bead transfer for human mesenchymal stem cells in serum-containing and chemically defined media. *Process Biochemistry* [online]. 2017, **59**, 255-265 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.03.017. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511317304750>
- [64] TIMMINS, N.E., M. KIEL, M. GÜNTHER, C. HEAZLEWOOD, M.R. DORAN, G. BROOKE a K. ATKINSON. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2012, **109**(7), 1817-1826 [cit. 2020-04-30]. DOI:

10.1002/bit.24425. ISSN 00063592. Dostupné z:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24425>

- [65] LECHANTEUR, Chantal. *Large-Scale Clinical Expansion of Mesenchymal Stem Cells in the GMP-Compliant, Closed Automated Quantum® Cell Expansion System: Comparison with Expansion in Traditional T-Flasks* [online]. 2014, **04**(08) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.4172/2157-7633.1000222. ISSN 21577633. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/open-access/largescale-clinical-expansion-of-mesenchymal-stem-cells-in-the-gmpcompliant-closed-automated-quantum-cell-expansion-system-comparison-with-expansion-in-traditional-tflasks-2157-7633.1000222.php?aid=29997>
- [66] HAACK-SØRENSEN, Mandana, Bjarke FOLLIN, Morten JUHL, Sonja K. BRORSEN, Rebekka H. SØNDERGAARD, Jens KASTRUP a Annette EKBLOND. Culture expansion of adipose derived stromal cells. A closed automated Quantum Cell Expansion System compared with manual flask-based culture. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2016, **14**(1) [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1186/s12967-016-1080-9. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-1080-9>
- [67] LAMBRECHTS, Toon, Ioannis PAPANTONIOU, Brent RICE, Jan SCHROOTEN, Frank P. LUYTEN a Jean-Marie AERTS. Large-scale progenitor cell expansion for multiple donors in a monitored hollow fibre bioreactor. *Cytotherapy* [online]. 2016, **18**(9), 1219-1233 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.05.013. ISSN 14653249. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324916304017>
- [68] RODRIGUES, Carlos A.V., Tiago G. FERNANDES, Maria Margarida DIOGO, Cláudia Lobato DA SILVA a Joaquim M.S. CABRAL. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, **29**(6), 815-829 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.009. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000851>
- [69] MIZUKAMI, Amanda, Maristela D. ORELLANA, Sâmia R. CARUSO, Karen DE LIMA PRATA, Dimas T. COVAS a Kamilla SWIECH. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells in a disposable fixed bed culture system. *Biotechnology Progress* [online]. 2013, **29**(2), 568-572 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1002/btpr.1707. ISSN 87567938. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.1707>
- [70] WENDT, D., A. MARSANO, M. JAKOB, M. HEBERER a I. MARTIN. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2003, **84**(2), 205-214 [cit. 2020-04-30]. DOI:



10.1002/bit.10759. ISSN 0006-3592. Dostupné z:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.10759>

- [71] PETRENKO, Yu. A., R. V. IVANOV, V. I. LOZINSKY a A. Yu. PETRENKO. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* [online]. 2011, **150**(4), 543-546 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1007/s10517-011-1185-3. ISSN 0007-4888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-011-1185-3>
- [72] YU, Shi, Jie LONG, Jinhua YU, Juan DU, Ping MA, Yushi MA, Dongmei YANG a Zhipeng FAN. Analysis of Differentiation Potentials and Gene Expression Profiles of Mesenchymal Stem Cells Derived from Periodontal Ligament and Wharton's Jelly of the Umbilical Cord. *Cells Tissues Organs* [online]. 2013, **197**(3), 209-223 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1159/000343740. ISSN 1422-6405. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/343740>
- [73] WANG, Yuejun, Yunsong LIU, Zhipeng FAN, Dayong LIU, Fu WANG, Yongsheng ZHOU a Joshua M. HARE. IGFBP2 enhances adipogenic differentiation potentials of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the umbilical cord via JNK and Akt signaling pathways. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(8) [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0184182. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0184182>
- [74] LEE, Seungok, Byung-Joon PARK, Ji Yeon KIM, et al. The effect of fibroblast growth factor on distinct differentiation potential of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Cytotherapy* [online]. 2015, **17**(12), 1723-1731 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.09.007. ISSN 14653249. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324915010634>
- [75] KOŁODZIEJ, Michaela, Sarah STRAUSS, Andrea LAZARIDIS, Vesna BUCAN, Jörn W. KUHBIER, Peter M. VOGT a Sören KÖNNEKER. Influence of glucose and insulin in human adipogenic differentiation models with adipose-derived stem cells. *Adipocyte* [online]. 2019, **8**(1), 254-264 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1080/21623945.2019.1636626. ISSN 2162-3945. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21623945.2019.1636626>
- [76] DENG, Chao, Yi SUN, Hai LIU, Wei WANG, Jingmen WANG, Feimin ZHANG a Gianpaolo PAPACCIO. Selective adipogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells stimulated with high doses of glucose. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(7) [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0199603. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0199603>

- [77] MARQUEZ, Maribel P., Frances, Alma MADRIGAL, et al. *Stem Cells and Development* [online]. 2017, **26**(21), 1578-1595 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1089/scd.2017.0071. ISSN 1547-3287. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2017.0071>
- [78] LI, Linli, Jian DONG, Yiqun HE, Wei MAO, Han TANG, Youhai DONG a Feizhou LYU. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells derived from rabbit bone marrow and Wharton's jelly for adipose tissue engineering. *Connective Tissue Research* [online]. 2019, , 1-9 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1080/03008207.2019.1631297. ISSN 0300-8207. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008207.2019.1631297>
- [79] COWPER, Mathew, Trivia FRAZIER, Xiyang WU, et al. Human Platelet Lysate as a Functional Substitute for Fetal Bovine Serum in the Culture of Human Adipose Derived Stromal/Stem Cells. *Cells* [online]. 2019, **8**(7) [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.3390/cells8070724. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/724>
- [80] LANGE, Claudia, Figen CAKIROGLU, Andrej-Nikolai SPIESS, Heike CAPPALLO-OBBERMANN, Judith DIERLAMM a Axel R. ZANDER. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2007, **213**(1), 18-26 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1002/jcp.21081. ISSN 00219541. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21081>
- [81] LANGE, Claudia, Bärbel BRUNSWIG-SPICKENHEIER, Leah EISSING a Ludger SCHEJA. Platelet lysate suppresses the expression of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase that positively controls adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research* [online]. 2012, **318**(18), 2284-2296 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.06.004. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482712002832>
- [82] SHANSKY, Yaroslav D., Natalia S. SERGEEVA, Irina K. SVIRIDOVA, et al. Human Platelet Lysate Sustains the Osteogenic/Adipogenic Differentiation Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Maintains Their DNA Integrity *in vitro*. *Cells Tissues Organs* [online]. 2020, **207**(3-4), 149-164 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1159/000502813. ISSN 1422-6405. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/502813>
- [83] PAPADIMITROPOULOS, Adam, Elia PICCININI, Sophie BRACHAT, et al. Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells from Fresh Bone Marrow in a 3D Scaffold-Based System under Direct Perfusion. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(7)

- [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0102359. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0102359>
- [84] VUKASOVIC, Andreja, Maria Adelaide ASNAGHI, Petar KOSTESIC, et al. Bioreactor-manufactured cartilage grafts repair acute and chronic osteochondral defects in large animal studies. *Cell Proliferation* [online]. 2019, **52**(6) [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1111/cpr.12653. ISSN 0960-7722. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cpr.12653>
- [85] DING, Ming, Susan S. HENRIKSEN, David WENDT a Søren OVERGAARD. An automated perfusion bioreactor for the streamlined production of engineered osteogenic grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2016, **104**(3), 532-537 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1002/jbm.b.33407. ISSN 15524973. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33407>
- [86] PETRENKO, Y.A., A.Y. PETRENKO, I. MARTIN a D. WENDT. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology* [online]. 2017, **76**, 150-153 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001. ISSN 00112240. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224017300755>
- [87] JACKSON, Robert M., Beth A. GRIESEL, Jami M. GURLEY, Luke I. SZWEDA a Ann Louise OLSON. Glucose availability controls adipogenesis in mouse 3T3-L1 adipocytes via up-regulation of nicotinamide metabolism. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2017, **292**(45), 18556-18564 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1074/jbc.M117.791970. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M117.791970>
- [88] HANKAMOLSIRI, Weerawan, Sirikul MANOCHANTR, Chairat TANTRAWATPAN, Duangrat TANTIKANLAYAPORN, Pairath TAPANADECHOPONE a Pakpoom KHEOLAMAI. The Effects of High Glucose on Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Gestational Tissue-Derived MSCs. *Stem Cells International* [online]. 2016, **2016**, 1-15 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1155/2016/9674614. ISSN 1687-966X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2016/9674614/>
- [89] ASTORI, Giuseppe, Eliana AMATI, Franco BAMBI, Martina BERNARDI, Katia CHEREGATO, Richard SCHÄFER, Sabrina SELLA a Francesco RODEGHIERO. *Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future* [online]. 2016, **7**(1) [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1186/s13287-016-0352-x. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0352-x>

## **Příloha A: Obsah přiloženého CD**

- Klíčová slova
- Abstrakt česky
- Abstrakt anglicky
- Zadání diplomové práce
- Kompletní diplomová práce