

ABSTRAKT

Dermální fibroblasty hrají důležitou roli regulaci procesu hojení. Migrují do místa poranění, množí se a produkují řadu signálních molekul (např. prozánětlivé interleukiny IL6 a IL8) a složky mimobuněčné hmoty (např. kolagen typu I, hyaluronan, fibronectin). Narušení rovnováhy a načasování syntézy a odbourávání těchto molekul může vést k abnormálnímu hojení. Pro rány je typické současné působení několika stresových faktorů např. snížený přísun živin, zánět, bakteriální kontaminace, oxidační stres atd. Dosavadní *in vitro* výzkumy dermálních fibroblastů v procesu hojení simulovaly a popisovaly vliv vždy pouze jednoho z těchto faktorů. Tato dizertační práce se jako první zabývá chováním dermálních fibroblastů v prostředí dvou současně působících klíčových stresových faktorů rány v 2D *in vitro* kultuře a v 3D kolagenových hydrogelech, které byly připravovány v naší laboratoři.

V první části této práce je popsáno chování dermálních fibroblastů v podmínkách rány tvořené dvěma stresovými faktory – nízkým množstvím živin (2% FBS) a prozánětlivou složkou ve formě bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). Studované parametry chování buněk zahrnují metabolickou aktivitu, proliferaci, morfologii, migraci, produkci IL6 a IL8, syntézu kolagenu typu I a produkci matrix metalloproteináz (MMPs) 2 a 9. Byla prokázána zvýšená metabolická aktivita v prostředí nízkých živin a LPS, zatímco proliferace v obou podmínkách byla v čase konstantní. Dále byla prokázána zvýšená migrace buněk v přítomnosti LPS. Produkce prozánětlivých IL6 a IL8 bylo potencováno LPS. Prostředí nízkých živin zmírňovalo změnu fibroblastů v myofibroblasty a tento efekt byl přítomností LPS umocněn. Remodelační schopnost buněk projevující se zvýšením produkce MMP2 byla ovlivněna v prostředí nízkých živin. Produkce kolagenu nebyla ovlivněna ani jedním stresovým faktorem.

V druhé části této práce je model rozšířen o přítomnost rozpustných faktorů produkovaných bakteriemi běžně se vyskytujícími v ranách (*Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*). Změny chování dermálních fibroblastů jsou studovány 1) v jednodruhových podmínkách (v prostředí jednoho bakteriálního druhu) a 2) ve třech tzv. polybakteriálních podmínkách (působení obou bakteriálních druhů současně), které se liší způsobem přípravy. Studované parametry buněk zahrnují proliferaci, morfologii, migraci, produkci IL6 a IL8 a syntézu kolagenu typu I. Proliferace buněk byla snížena rozpustnými faktory z *P. aeruginosa* a směsí rozpustných faktorů obou použitých bakteriálních druhů. Morfologie byla výrazně narušena rozpustnými faktory z *P. aeruginosa* a *S. aureus* kultivovanými společně. Pouze směs rozpustných faktorů potlačila migraci buněk. Dále byl

prokázán prozánětlivý účinek *P. aeruginosa* na dermální fibroblasty projevující se zvýšenou produkcí IL6 a IL8. Syntéza kolagenu ovlivněna rozpustnými faktory nebyla. Rozpustné faktory z *S. aureus* neměly na fibroblasty žádný vliv.

Třetí část této dizertační práce porovnává chování dermálních fibroblastů v 2D a 3D kultuře. Obdobně jako v první části je i v 3D kultuře studován vliv nízkých živin a přítomnosti LPS na chování buněk. Studované parametry zahrnují schopnost kontrakce kolagenového hydrogelu, metabolickou aktivitu, proliferaci a změny v morfologii. Typ kultivace metabolickou aktivitu neovlivňoval. Metabolická aktivita v čase vzrůstala v 2D i 3D kultuře. Podmínky rány – nízké živiny a přítomnost LPS – na metabolickou aktivitu buněk v 2D a 3D kultuře vliv také neměly. Zatímco proliferace buněk v 2D kultuře mírně vzrůstala, v 3D kultuře buňky neproliferovaly. V podmínkách rány byla proliferace buněk v 2D i 3D kultuře konstantní. Dále byla prokázána narušená schopnost kontrakce v prostředí nízkých živin a LPS. Morfologie buněk se v 2D a 3D kultuře lišila. V 2D kultuře byly buňky zploštělé a vřetékovité, v 3D kultuře měly buňky tvar hvězdicovitý.

V poslední části předkládané práce je popsána optimalizace metod pro stanovení absolutního počtu buněk v 2D a 3D kulturách. Metody pro stanovení absolutního počtu buněk se dosud nepoužívá a jejich popis tak tvoří významnou část této práce. Metoda pro stanovení absolutního počtu buněk v 2D kultuře je zde použita pro stanovení buněčné proliferace v čase a pro vztažení dat získaných jinými metodami na počet buněk v daném čase.

Tato dizertační práce objasňuje chování dermálních fibroblastů v podmínkách rány v 2D a 3D *in vitro* kulturách a optimalizuje metody pro stanovení absolutního počtu buněk. Největšími přínosy této práce shledáváme 1) ve vytvoření dvoufaktorového *in vitro* modelu rány a rozsáhlém studiu chování dermálních fibroblastů v tomto prostředí a 2) v možnosti využití unikátních metod pro stanovení absolutního počtu buněk v dalším výzkumu nejen dermálních fibroblastů.