

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Moderní biomateriály pro regeneraci pojivových tkání
Smart biomaterials for connective tissues regeneration

Veronika Hefka Blahnová

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská biofyzika na Ústavu biofyziky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Školitel: **Mgr. Eva Filová, Ph.D.**

Konzultant:

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady
dne v odhod.
Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:
prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.

Děkan fakulty:
prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAUK 448218, MŠMT NPU LO1508, LO1309 a LO1605, GAČR 16-14758S) a EU Horizon 2020 MSCA-RISE-2018 (č. 824007).

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

Obsah

1.	Úvod do problematiky	7
2.	Hypotézy a cíle disertační práce	8
3.	Materiál a metodika	8
3.1.	Příprava nosičů	8
3.2.	Určení morfologie nosičů	9
3.3.	Určení kmenovosti lidských MSC	9
3.4.	Kultivace buněk	9
3.5.	Vizualizace buněk skenovací elektronovou mikroskopií	9
3.6.	Stanovení metabolické aktivity buněk	10
3.7.	Kvantifikace obsahu dsDNA	10
3.8.	Sledování aktivity alkalické fosfatázy	10
3.9.	Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie	10
3.10.	qPCR	10
3.11.	Kvantifikace extracelulárních proteinů	11
3.12.	Hodnocení angiogenních vlastností nosiče	11
3.13.	Péče o zvířata, implantace nosiče	11
3.14.	Odběr vzorků a histologické zpracování	12
3.15.	Statistické vyhodnocení dat	12
4.	Výsledky	12
4.1.	Xenogenní kostní štěp funkcionalizovaný biomimetickými peptidy	12
4.1.1.	Expanze buněk na nosiči	12
4.1.2.	Aktivita alkalické fosfatázy	13
4.1.3.	Vizualizace osteokalcinu	13
4.1.4.	Relativní exprese mRNA osteogenních markerů	13
4.1.5.	Kvantifikace specifických extracelulárních proteinů	14
4.2.	Ti36Nb6Ta nanostrukturovaný anodickou oxidací	14
4.2.1.	Aktivita alkalické fosfatázy	14
4.2.2.	Relativní exprese mRNA osteogenních markerů	15
4.2.3.	Vizualizace kolagenu typu I a osteokalcinu	15
4.3.	Pěnový nosič z kolagenu typu I a biokeramiky	16
4.3.1.	Exprese mRNA osteogenních markerů	16
4.3.2.	Imunohistochemická vizualizace osteokalcinu	16
4.3.3.	Vizualizace počtu buněk na nosičích	17

4.4.	Kolagenový nosič obohacený hyaluronanem/ β -TCP, PCL a růstovými faktory pro regeneraci osteochondrálního defektu <i>in vivo</i>	17
4.4.1.	Buněčná proliferace.....	17
4.4.2.	Imunohistochemické barvení kolagenu II	17
4.4.3.	Histologické hodnocení a imunohistochemie	18
4.5.	Vliv Coll/Chit nosiče s FGF2-STAB ® na angiogenezi a hojení kožního defektu ...	19
4.5.1.	Vliv FGF2-STAB ® na viabilitu a proliferaci buněk.....	19
4.5.2.	Exprese mRNA kolagenu typu I	19
4.5.3.	Vliv přídatku FGF2-STAB ® na angiogenezi.....	19
4.5.4.	Vliv přídatku FGF2-STAB ® na biokompatibilitu <i>in vivo</i>	20
4.5.5.	Vliv přídatku FGF2-STAB ® na genovou expresi v tkáni.....	20
5.	Diskuse	20
6.	Závěry	23
7.	Souhrn	24
8.	Summary	25
9.	Použitá literatura	26

Moderní biomateriály pro regeneraci pojivových tkání

Abstrakt

Pojivové tkáně se typicky vyznačují velkým objemem mezibuněčné hmoty. Jejich hlavní funkcí je poskytovat mechanickou oporu a ochranu ostatním tělním orgánům. Tato práce je zaměřena na regeneraci tkáně kosti a chrupavky, potažmo osteochondrální defektu. V rámci provedených experimentů byla sledována viabilita a diferenciací lidských kmenových buněk. V *in vitro* podmínkách byl testován PCL nosič s příměsí růstových faktorů, kolagenová pěna s biokeramikami, xenogenní kostní štěp s biomimetickými peptidy a titanový nosič s nanostrukturovaným povrchem. Vybraný bezbuněčný nosič byl následně implantován do osteochondrálního defektu králičího modelu, kde byla sledována míra regenerace poškozených tkání. *In vivo* byl hodnocen kolagenový nosič s příměsí PCL nanovláken a biokeramik obohacený o růstové faktory IGF-1, bFGF, TGFβ1 a BMP-2. Právě přídavek růstových faktorů se *in vivo* jevil jako ne příliš vhodný především z důvodu indukce patologické zánětlivé odpovědi. a to navzdory tomu, že v *in vitro* podmínkách vykazoval spíše pozitivní efekt. Rovněž biomimetické peptidové sekvence stimulovaly osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk. V případě různých typů biokeramik kombinovaných s kolagenem i buňky reagovaly spíše na konkrétní kalcium fosfát, respektive hydroxyapatit, než na povrchové charakteristiky nosiče. Oproti tomu povrchová modifikace titanových nosičů anodickou oxidací ukázala, že viabilita a osteogeneze buněk byla stimulována nanotrubičkami o vnitřním průměru kolem 36 nm.

Smart biomaterials for connective tissues regeneration

Abstract

Connective tissues are characterized by significant volume of extracellular matrix. Their main role is to provide a mechanical support and protection to other body organs. This thesis is focused on regeneration of bone, cartilage and osteochondral defect. In the experimental part we observed viability and differentiation of human mesenchymal stem cells. *In vitro* we evaluated the potential of PCL scaffold with addition of growth factors, bone xenograft with biomimetic peptides, collagen I composite with bioceramics and a titanium alloy with nanostructured surface. During following *in vivo* experiment we implanted a cell-free scaffold made of PCL, calciumphosphate and IGF-1, bFGF, TGF β 1 and BMP-2 to osteochondral deffect. Unfortunately, addition of growth factors resulted in pathological inflammatory process despite clear beneficial effect *in vitro*. Likewise, the biomimetic peptide sequences promoted osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Addition of certain bioceramics influenced the scaffold morphology in the manner of pore size. However, we did not observe any effect of the surface characteristics on cell behavior. The cells were influenced rather by certain material. On the other hand, surface modification of titanium scaffold by anodic oxidation revealed that the most suitable for both viability and differentiation were nanotubes with diameter around 36 nm.

1. Úvod do problematiky

Tkáňové inženýrství je několik desítek let starý obor, v němž se propojují znalosti z přírodních věd a technických odvětví. Hledá alternativní přístupy pro případy, kdy selhává konvenční terapie a nestačí vlastní regenerační kapacita organismu. Hlavním cílem oboru je vyvinout plnohodnotné tkáňové náhrady nebo nalézt konstrukt, jehož aplikací by bylo možné urychlit hojení poškozených tkání. K tomu je třeba do detailu znát morfologii cílové tkáně, její biomechanické vlastnosti a buněčné složení, relevantní biologicky aktivní molekuly a rovněž molekulárně-biologické pozadí procesů probíhajících v rámci formace nové tkáně. Tato data jsou následně využita k výběru vhodné strategie. Základními nástroji, které kombinujeme jsou buňky, nosič a bioaktivní molekuly, přičemž v rámci tkáňového inženýrství jsou rozlišovány dva základní směry. Jednak to je buněčná terapie založená na odběru/aplikaci buněk nebo výrazně komplexnější bezbuněčný přístup, který zahrnuje mnoho faktorů působících v synergii. V závislosti na aplikaci mohou být použity diferencované buňky nebo naopak naivní buňky kmenové. Co se týká chondrálních defektů, je poměrně běžným postupem izolace chondrocytů, jejich expanze v *in vitro* podmínkách a implantace do místa poškození. Výhodou aplikace autologních buněk je, že jsou organismem bez komplikací přijímány a nevyvolávají nežádoucí reakci imunitního systému. Na druhou stranu vzniká v místě odběru nová léze a jejich počet je velmi omezen. Navíc kondice buněk závisí na věku, životním stylu a případné medikaci pacienta. Autologní transplantát tedy není vždy tím nejlepším řešením. Aplikaci alogenních buněk je obvykle třeba doplnit podáním preparátů modulujících imunitní odpověď, aby nedošlo k odmítnutí a odhojení implantátu. To stejné platí pro přírodní i syntetické materiály, které nemusí být organismem plně tolerovány a mohou tak vyvolávat zánětlivé reakce. Je tedy zřejmé, že vzhledem k různorodosti pacientů, jejich diagnóze a množství možných přístupů je velmi obtížné určit univerzální terapeutický postup, byť by se jednalo jen o jeden druh defektu. Na druhou stranu právě multidisciplinární přístup v tkáňovém inženýrství umožňuje vyvinout léčbu každému z pacientů na míru.

Nejdelší historii má výzkum kožních krytů a náhradl využitelných v popáleninové medicíně. Postupně se však záběr rozšířil na pojivové tkáně, krevní cévy, nervovou soustavu a některé tělní orgány^{2,3,4,5}. V současnosti má však tkáňové inženýrství jen malou roli v péči o pacienta. Stále jde především o experimentální přístup, který je velmi nákladný, poměrně komplikovaný, a tedy s nejistým výsledkem a nízkou reprodukcibilitou výstupů. Kromě přímých medicínských aplikací mají poznatky potenciální využití v přípravě modelů tkání nahrazujících zvířecí modely pro účely testování léčiv a dalších toxických látek, což může celý proces zefektivnit a zrychlit. Důležitost výzkumů v oblasti tkáňového inženýrství je tedy bez diskuze.

Tato práce je zaměřena na výzkum v oblasti pojivových tkání, především těch patřících do pohybového aparátu – kosti a chrupavky.

2. Hypotézy a cíle disertační práce

- design a *in vitro* testování osteogenního potenciálu nosiče s využitím mezenchymálních kmenových buněk
- design a *in vitro* testování chondrogenního potenciálu nosiče s využitím mezenchymálních kmenových buněk
- design a *in vitro*, *ex ovo* a *in vivo* testování vaskulogenního potenciálu nosiče
- vytvoření kompozitního nosiče a jeho implantace *in vivo* do zvířecího modelu

3. Materiál a metodika

3.1. Příprava nosičů

Hybridní xenogenní (hovězí) kostní štěp SmartBone R byl vyroben firmou I.B.I. SA (Mezzovico-Vira, Švýcarsko). Během přípravy nosičů byly do povrchových polymerů vmíseny dva druhy biomimetických peptidů P2 a P6, jejichž sekvence je následující P2: PLVPSQPLVPSQPLVPSQPQPPLPP a P6: PHQPMQPQPPVHPMQPLPPQPPLPP.

Sloučenina titanu Ti-36Nb-6Ta ve tvaru disků byla nejprve za mokra broušena a vyleštěna. Proces sestával z poklesu napětí na zvolený koncový potenciál (10V, 20V, 30V). Pokles potenciálu na konci procesu anodizace vedl k tvorbě kompaktní 100 nm vrstvy oxidu na povrchu kovu.

Kolagen typu I (Collado, Česká republika) byl opakovaně lyofilizován. Byl kombinován s hydroxyapatitem (HAP, Reicke), kalcinovaným a nekalcinovaným hydroxyapatitem (Riedel-de-Haen, Německo), α -trikalciumfosfátem (Premier Biomaterials, Irsko), β -trikalciumfosfátem (Fluka, Švýcarsko) a kalciumfosfátem (Merck, Česká republika). Obě složky (kolagen a kalciumfosfát) byly smíchány v poměru hmotností 1:1.

Roztok polymeru PCL byl připraven smícháním chloroformu, ethanolu a PCL 45.000. Roztok synperonicu byl připraven smícháním synperonicu se 75% ethanolem. Dále byly k roztoku PCL přidány následující složky: hyaluronan, respektive PBS, synperonic, respektive 75% ethanol, růstový faktor, respektive PBS. TGF- β 1 byl ředěn v 10 mM kyselině citronové (5 μ g/0,2 ml), bFGF byl ředěn v 5 mM TRIS (150 μ g/0,2 ml) a IGF-1 byl ředěn v deionizované vodě (500 μ g/0,2 ml). Nosiče pro *in vivo* experiment měly dvě části – kostní a chrupavkovou. Část s kolagenem I a β -TCP byla připravena dle protokolu z předchozí studie, PCL s růstovými faktory byl připraven shodně s *in vitro* částí této studie. Do kosti byl vložen nosič

z kolagenu I/ β -TCP/PCL/BMP-2, do chrupavky kolagen I/hyaluronan sodný/bFGF, IGF-1 a TGF β 1.

Kolagen typu I byl opakovaně lyofilizován. Chitosan byl použit ve formě od výrobce bez další purifikace. ColI/Chit nosiče byly připraveny sušením mrazem z 0,5% wt kolagenové vodné suspenze. Odpovídající objem FGF2-STAB® byl přidán k nosičům tak, aby bylo dosaženo následujících koncentrací: 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50, 100 μ g/ml.

3.2. Určení morfologie nosičů

Morfologie nosičů byla určena skenovací elektronovou mikroskopií (Tescan MIRA3, Česká republika). Nosiče byly před měření potaženy 10 nm vrstvičkou zlata. Velikost a distribuce pórů byla určena ze snímků pomocí programu ImageJ.

3.3. Určení kmenovosti lidských MSC

Kmenovost MSC z kostní dřeně byla ověřena analýzou buněk na FACS. Analyzována byla pozitivní exprese povrchových markerů CD105, CD73, CD90 a negativní exprese CD45, CD34, CD14, CD19 a HLA-DR. Výsledky byly zpracovány v programu BD FACSDiva 8.

3.4. Kultivace buněk

Lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně byly zakoupeny (ScienCell CA). Během expanze jim bylo dodáváno růstové medium Alpha MEM (22571020, Gibco), 10% FBS (A4766801, Gibco), 1% antibiotika (15140-122, Life Technologies). Buňky byly nasazeny maximálně v páté pasáži. Doplněno bylo osteogenní medium (kyselina L-askorbová, β -glycerolfosfát, dexamethason).

Prasečí mezenchymální kmenové buňky byly izolovány z kostní dřeně miniprasete. Během expanze byly kultivovány v Minimum Essential Medium (Gibco, 15188319), L-glutaminu (Gibco, 25030081) a 1% antibiotiku (15140-122, Life Technologies). Nasazeny byly ve třetí pasáži.

Linie myších fibroblastů 3T3-A31 (Sigma-Aldrich) byla rozpěstována v DMEM (D6429, Sigma-Aldrich) s 10 % FBS (Sigma-Aldrich) a 1 % antibiotik (Sigma-Aldrich). Buňky byly nasazeny v pasáži 5/14.

3.5. Vizualizace buněk skenovací elektronovou mikroskopií

Vzorky byly 24 hodin po nasazení fixovány 2,5% glutaraldehydem (Sigma Aldrich) a dehydratovány ethanolovou řadou. Po odsátí poslední dávky ethanolu byl na 24 hodin přidán hexamethyldisilazan (Sigma Aldrich). Před snímáním byly vzorky potaženy 3 nm vrstvou zlata. Ke snímání byl použit Vega 3 SBU.

3.6. Stanovení metabolické aktivity buněk

K hodnocení úrovně buněčného metabolismu byl použit MTS test. K buněčné kultuře byl v poměru 1:5 s kultivačním médiem přidán MTS substrát (CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, WI, USA). V určené experimentální dny byly nosiče přeneseny do nové kultivační destičky a 1 – 2 h inkubovány se substrátem. Poté byla měřena absorbance produktu (Infinite®M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při 490 nm.

3.7. Kvantifikace obsahu dsDNA

Nosiče byly přeneseny do zkumavek s lyzačním pufrem (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2% v/v Triton X-100). Jako detekční kit byl použit QuantiT™ High Sensitivity dsDNA Assay Kit (Invitrogen). Fluorescence byla měřena (Infinite® M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při $\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=528$ nm.

3.8. Sledování aktivity alkalické fosfatázy

Inkubace s ALP substrátem (OneStep PNPP, Thermo Scientific) probíhala po dobu 10 – 30 minut. Absorbance produktu byla měřena (Infinite® M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm.

3.9. Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie

Nosiče s buňkami byly fixovány mraženým methanolem. Vizualizována byla buněčná jádra (propidium jodid, P4864, Sigma Aldrich), membrána (DiOC6(3), D273, Life Technologies) a extracelulární proteiny. Vzorky byly snímány na mikroskopech Zeiss LSM 510 DUO nebo Zeiss LSM880 Airyscan.

Pro imunohistochemické barvení byla použita primární protilátka (rabbit anti-osteocalcin T4743, Penninsula Laboratories; mouse anti-collagen I M-38c, DSHB, USA; mouse anti-collagen II II6B3c, DSHB, USA), se kterou byly vzorky inkubovány přes noc a sekundární protilátka (Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG A21070, Life Technologies; Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody A10667, Life Technologies). Toto barvení bylo doplněno vizualizací buněčných jader pomocí Hoechst34580 (H21486, Life Technologies) nebo propidium jodidu. Cytoskelet byl vizualizován phalloidinem značeným AF488, jádra byla barvena DAPI.

3.10. qPCR

RNA byla izolována RNeasy Mini Kitem (74106, Qiagen). Pro syntézu cDNA byl použit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1632, Life Technologies). Jako housekeeping gen pro qPCR byl použit EEF1 (Hs00265885_g1). Jako geny zájmu byly použity RunX2 (Hs01047973_m1), kolagen I (Hs00164004_m1) a osteocalcin (Hs01587814_g1, vše

ThermoFisher Scientific. Pro reakci byl použit LightCycler® 480 Instrument II (Roche Life Science). Získaná data byla relativně kvantifikována použitím metody $2^{-\Delta C_p}$.

3.11. Kvantifikace extracelulárních proteinů

Při výměně kultivačního media bylo toto odebíráno a skladováno. Na přístroji Luminex 200 system (Luminex, Austin, TX, USA) byly kvantifikovány osteokalcin, osteopontin, osteoprotegerin, dickkopf-příbuzný protein 1, sklerostin, interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor- α za použití xMAP technologie s Bone Metabolism Multiplex esejí (Human Bone Magnetic Bead Panel, MILLIPLEX, Německo). Získaná data byla analyzována xPONENT 3.1 programem (Luminex, Austin, TX, USA).

3.12. Hodnocení angiogenních vlastností nosiče

Oplozená slepičí vejce (Henry Steward and Co., UK) byla umístěna do inkubátoru. Sedmý den byl navlhčený nosič přenesen na chorioalantoidní membránu. Snímky nosiče a okolní počínající vaskularizace byly pořízeny za 7 a 10 – 13 dní mikroskopem Motorola USB. Hodnoceny byly krevní cévy rostoucí kolmo na nosič až do úhlu $\pm 45^\circ$.

3.13. Péče o zvířata, implantace nosiče

Hojení osteochondrálního defektu bylo sledováno na dvouměsíčních Novozélandských králících (firma Velaz s.r.o., Praha). Studie byla provedena v souladu s etickými zásadami a směrnicemi pro experimenty na zvířatech. Se zvířaty bylo zacházeno dle nařízení směrnice Rady EU 86/609 EHS. Studie byla schválena Odbornou komisí Fyziologického ústavu AV ČR, Praha (38/2017) a byla v souladu se Zákonem na ochranu zvířat 246/92. Před zákrokem byl zvířatům podán subkutánně Narketan, Xylapan a Marbocyl. Defekt byl vytvořen v laterálním kondylu femuru. Chrupavka byla vyříznuta Biopsy punchem (Kruuse, 4 mm), defekt v kosti byl vyvrtán na průměr 5 mm a zasahoval do kostní dřeně. Nosiče byly vloženy orientovaně, do oblasti kosti část s β -TCP, do chrupavkové části kolagen, respektive kolagen se suplementy. Studie byla ukončena po 12 týdnech.

Studie na tříměsíčních králících byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a schválena revizní komisí Veterinárního výzkumného ústavu (kód 12/2016, schváleno dne 21. dubna 2016) a Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek zvířat Ministerstva zemědělství ČR (povolení č. 34715/2016-MZE-17214 z 15. června 2016). Před operačním výkonem byla zvířata uvedena do anestezie (Medetomidin, Propofol). Na depilovaném a desinfikovaném hřbetě králíka bylo způsobeno šest ran v plné tloušťce. Testovány byly skupiny ColI, ColI/Chit a ColI/Chit_0,1FGF2. Nosiče byly překryty kožním štěpem odebraným z rány. Jako kontrolní skupina byla použita rána překrytá kožním štěpem.

3.14. Odběr vzorků a histologické zpracování

In vivo experiment zaměřený na osteochondrální defekt byl ukončen po šesti týdnech od implantace nosičů, experiment zaměřený na hojení kůže po třech týdnech. Vzorky byly fixovány ve formalínu. Barvení haematoxylinem-eosinem, zeleným trichromem a Verhoeffovým barvením bylo použito pro základní přehlednou histologii. Další řezy byly barveny CD31 protilátkou (clone J70A, DakoCytomation) za účelem vizualizace endotelu a cév. Neutrální a kyselé glykosaminoglykany byly barveny Alcianem Blue (101647 Alcian Blue, Merck) a PAS reakcí (109033 Schiff's reagent, Merck). Kolagen typu II byl vizualizován použitím primární protilátky (clone II-II6B3-c, Developmental Studies Hybridoma Bank) a diaminobenzidinu (ImmPRESS antimouse Ig peroxidase detection kit, Vector Laboratories). Picosirius červení (Direct Red 80, Sigma Aldrich) byl značen kolagen typu I. Kostní extracelulární protein osteokalcin byl barven OCG4 (ThermoFisher) a diaminobenzidinem.

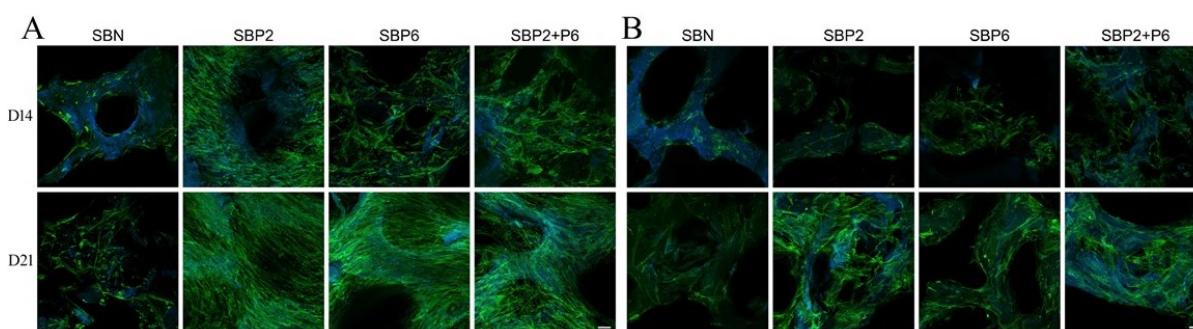
3.15. Statistické vyhodnocení dat

Naměřená data byla statisticky hodnocena v programu SigmaStat 3.5 (Systat, San Jose, CA, USA) metodou One Way ANOVA. Statistická významnost byla stanovena na hladině 0,001 a 0,05. Histologická data byla hodnocena v programu Statistica Base 10. Pro testování byly použity Kruskal-Wallis a Mann Whitney U testy. Náhodnost rozložení kostní tkáně v jednotlivých kompartmentech byla hodnocena χ^2 rozdělením.

4. Výsledky

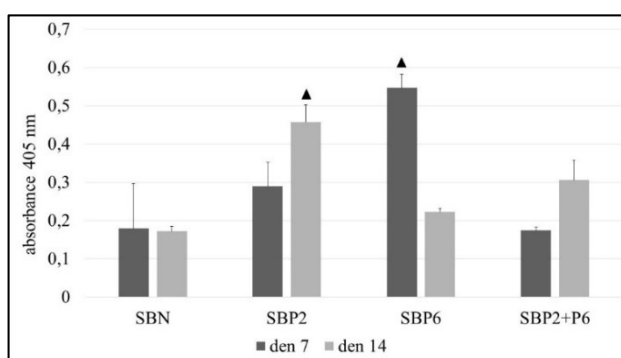
4.1. Xenogenní kostní štěp funkcionalizovaný biomimetickými peptidy

4.1.1. Expanze buněk na nosiči



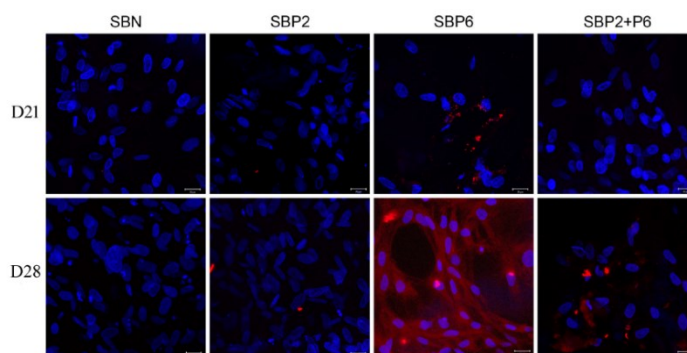
Obrázek 1: Kolonizace nosičů buňkami. Snímky ze dnů 14 a 21. (A) Buňky v růstovém mediu. (B) Buňky v osteogenním mediu. Velikost měřky 100 μm . Pozorován byl pozitivní vliv peptidů na růst buněk a kolonizaci nosiče při kultivaci v osteogenním i růstovém mediu.

4.1.2. Aktivita alkalické fosfatázy



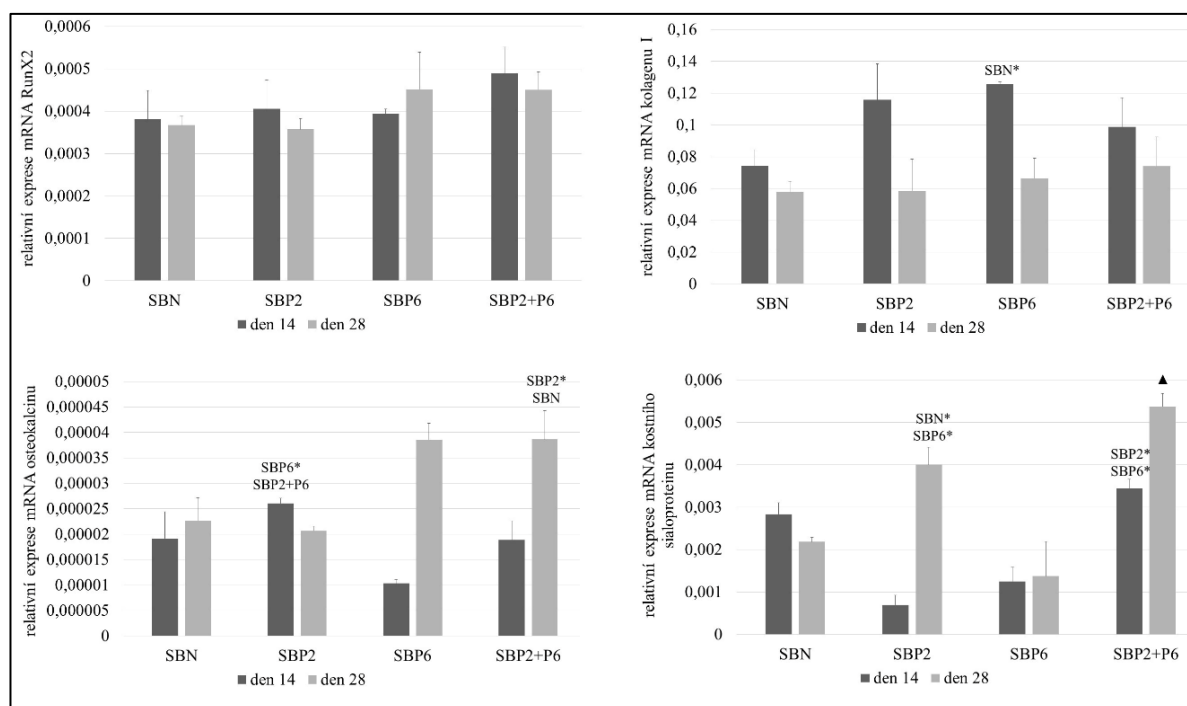
Obrázek 2: Aktivita enzymu alkalické fosfatázy. Absorbance produktu měřena při 405 nm. Statistická významnost $p < 0,001$ značena trojúhelníkem nad nejvyššími hodnotami. ALP ve skupině s P6 tedy dosáhla vrcholu aktivity již 7. den, zatímco v ostatních skupinách s peptidy nebyl peak zaznamenán.

4.1.3. Vizualizace osteokalcinu



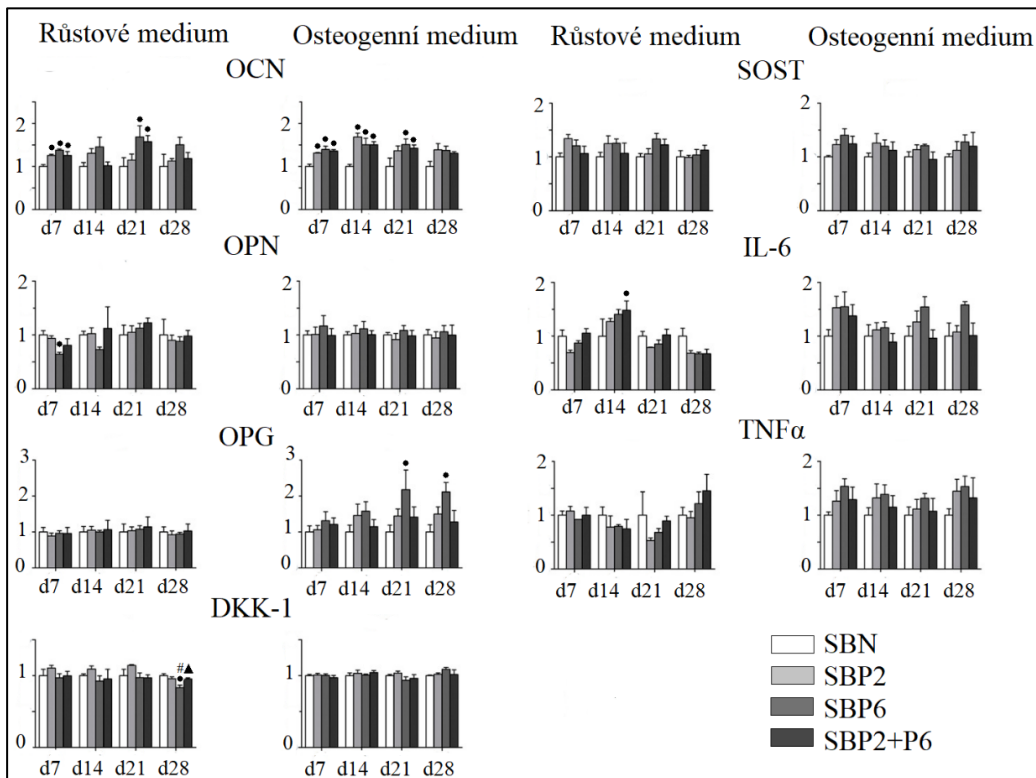
Obrázek 3: Specifické barvení extracelulárního proteinu osteokalcinu (červený signál). Jádra barvena Hoechstem (modrý signál). Velikost měřky 20 μm . Nejvýraznější exprese byla zaznamenána na nosiči s peptidem P6.

4.1.4. Relativní exprese mRNA osteogenních markerů



Obrázek 4: Relativní exprese mRNA osteogenních markerů RunX2 (raný), kolagenu I (střednědobý), osteokalcinu (pozdní) a kostního sialoproteinu (pozdní). Vztaheno k housekeepingovému genu EEF1. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$ a názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

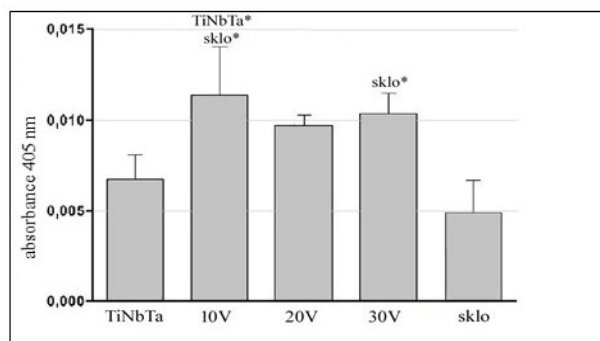
4.1.5. Kvantifikace specifických extracelulárních proteinů



Obrázek 5: Relativní exprese extracelulárních proteinů. Vzaženo k expresi v kontrolní skupině SBN. Statisticky vyšší hodnoty než ve skupině SBN značeny hvězdičkou pro $p < 0,05$, # statistický rozdíl oproti SBP2, ▲ statistický rozdíl oproti SBP6.

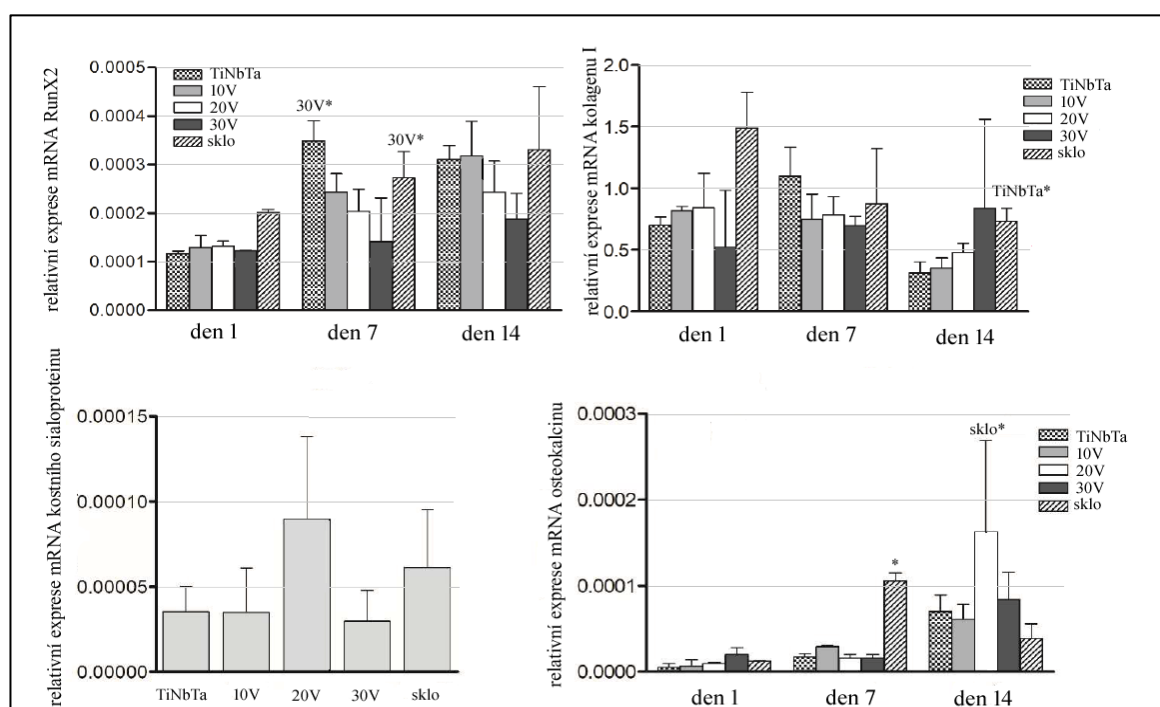
4.2. Ti36Nb6Ta nanostrukturovaný anodickou oxidací

4.2.1. Aktivita alkalické fosfatázy



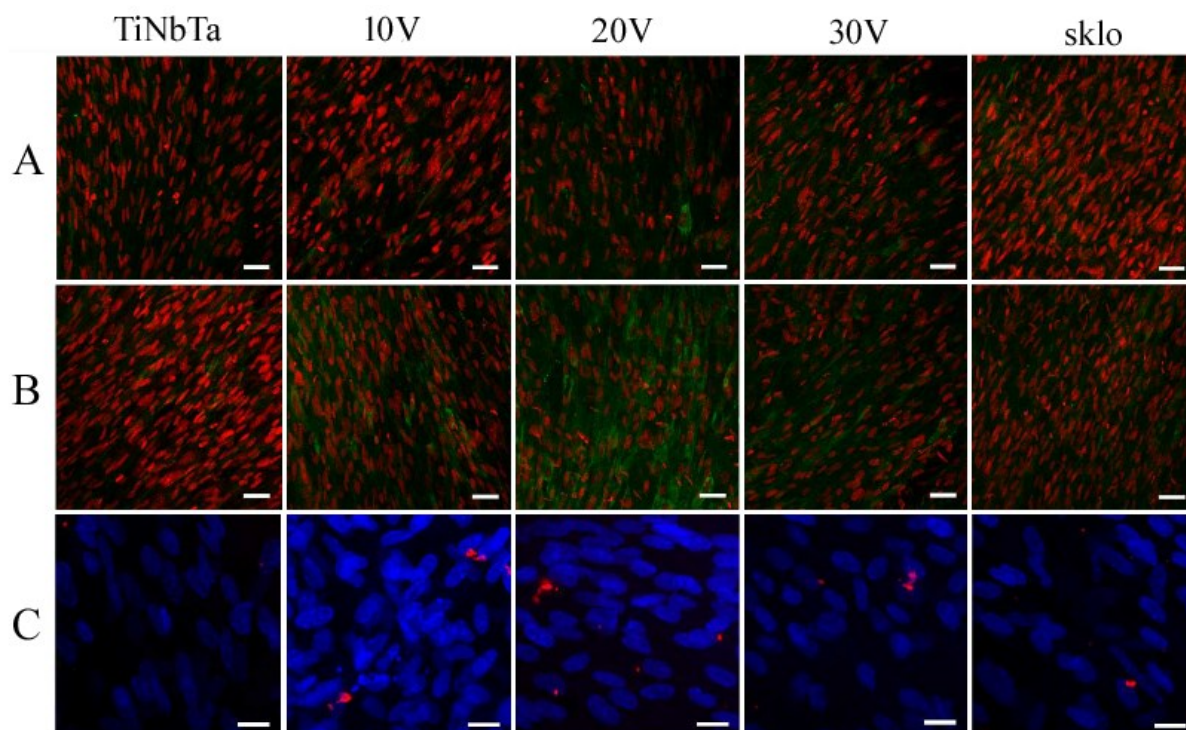
Obrázek 6: Aktivita enzymu alkalické fosfatázy. Absorbance produktu měřena při vlnové délce 405 nm. Statistické rozdíly značeny názvem skupiny se symbolem hvězdičky pro $p < 0,001$.

4.2.2. Relativní exprese mRNA osteogenních markerů



Obrázek 7: Relativní exprese mRNA osteogenních markerů RunX2 (raný), kolagenu I (střednědobý), IBSP (pozdní) a osteokalcinu (pozdní). Vztaženo k housekeepingovému genu EEF1. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

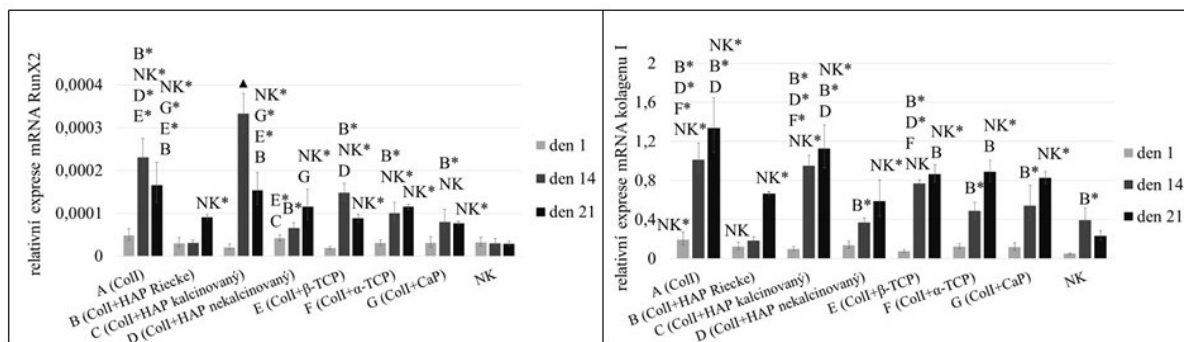
4.2.3. Vizualizace kolagenu typu I a osteokalcinu



Obrázek 8: Snímky z konfokální mikroskopie. Imunohistochemické barvení kolagenu typu I 14. a 21. den experimentu. Kolagen I má zelený signál, jádra červený. Velikost měřky 50 μm . Imunohistochemické barvení osteokalcinu (červený signál) 21. den experimentu, jádra (modrý signál). Velikost měřky 20 μm .

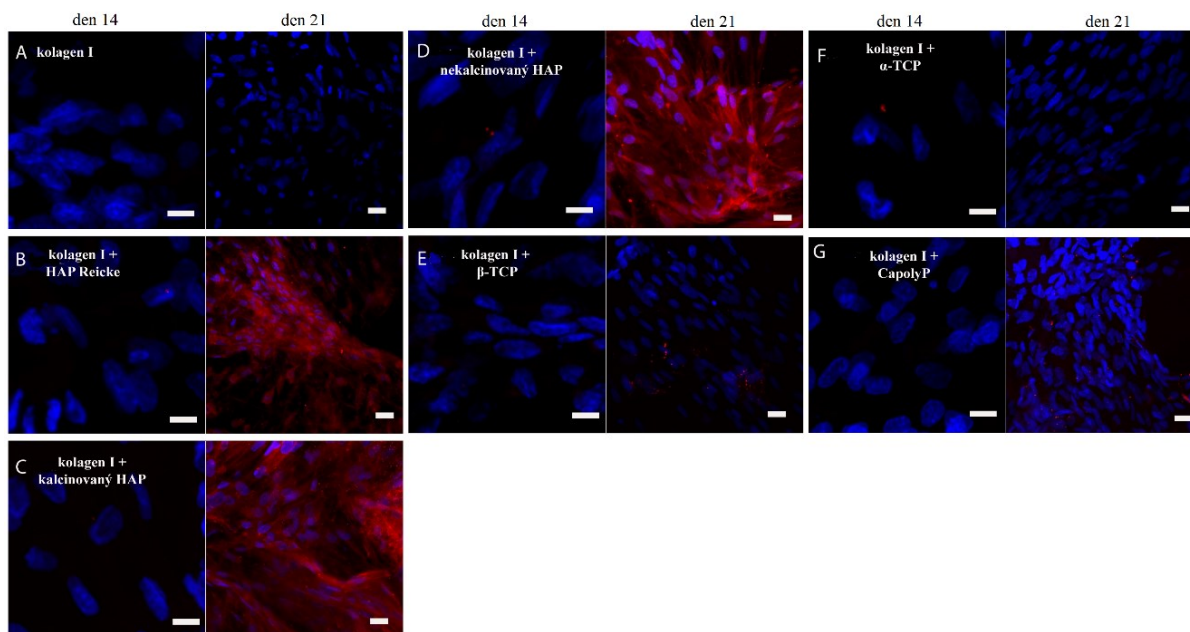
4.3. Pěnový nosič z kolagenu typu I a biokeramiky

4.3.1. Expresa mRNA osteogenních markerů



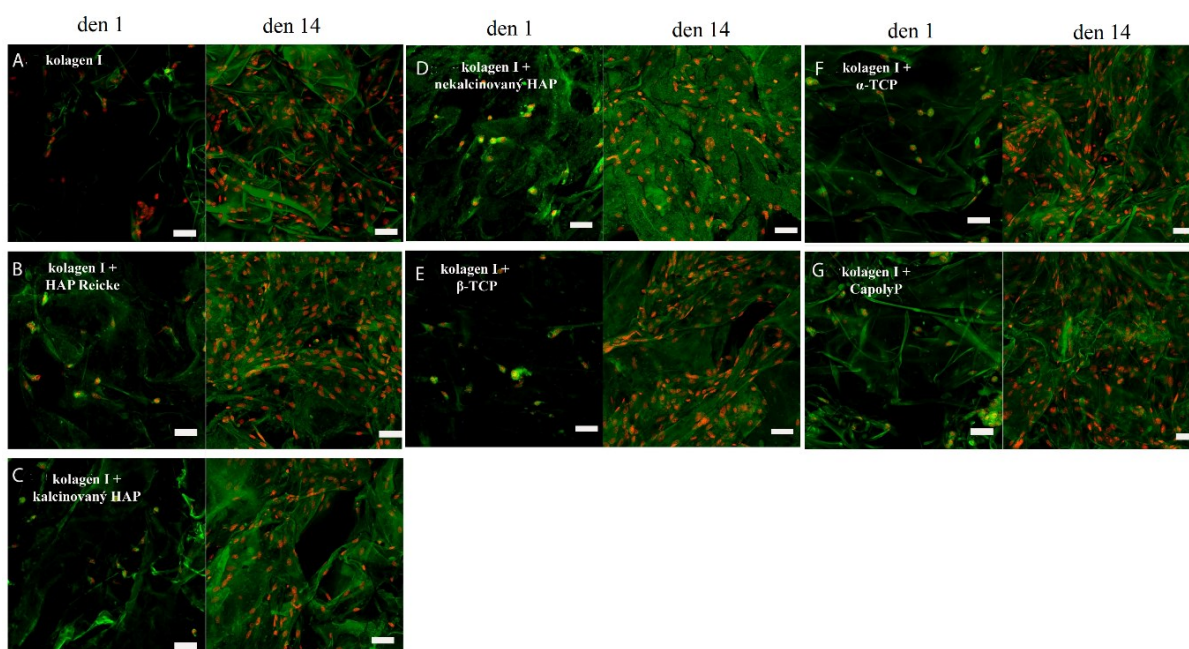
Obrázek 9: Relativní exprese mRNA transkripčního faktoru RunX2 a extracelulárního proteinu kolagenu I, vztážno k EEF1. Signifikantní rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$, názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$ a trojúhelníkem pro statisticky nejvyšší hodnotu s $p < 0,001$.

4.3.2. Imunohistochemická vizualizace osteokalcinu



Obrázek 10: Snímky z konfokálního mikroskopu. Imunohistochemické barvení extracelulárního proteinu osteokalcinu (červený signál) a jader (modrý signál) 21. a 35. experimentální den. Velikost měřky 21. den 10 μm , 35. den 20 μm .

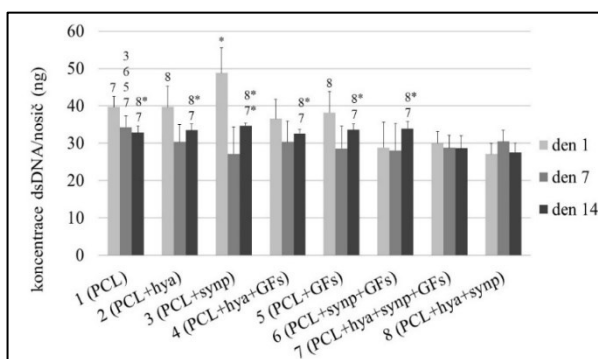
4.3.3. Vizualizace počtu buněk na nosičích



Obrázek 11: Snímky z konfokálního mikroskopu. Vizualizace jader propidium jodidem (červený signál) a buněčných membrán (zelený signál) 1. a 14. experimentální den. Je patrná autofluorescence nosiče v zeleném spektru. Velikost měřky 50 μm .

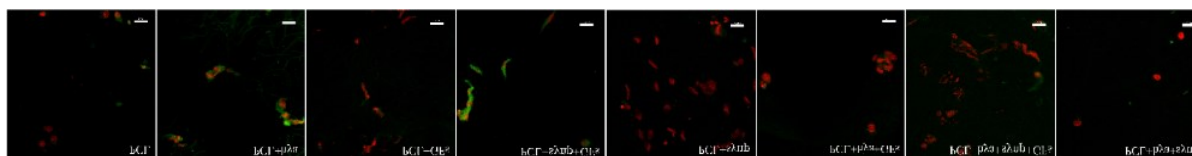
4.4. Kolagenový nosič obohacený hyaluronanem/ β -TCP, PCL a růstovými faktory pro regeneraci osteochondrálního defektu *in vivo*

4.4.1. Buněčná proliferace



Obrázek 12: Kvantifikace množství buněčné dsDNA. Uvedeno v ng/nosič. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$, názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$ a pouze hvězdičkou je značena skupina se signifikantně vyšší hodnotou než všechny ostatní v daný experimentální den ($p < 0,001$). Byly použity růstové faktory TGF β 1, bFGF, IGF-1.

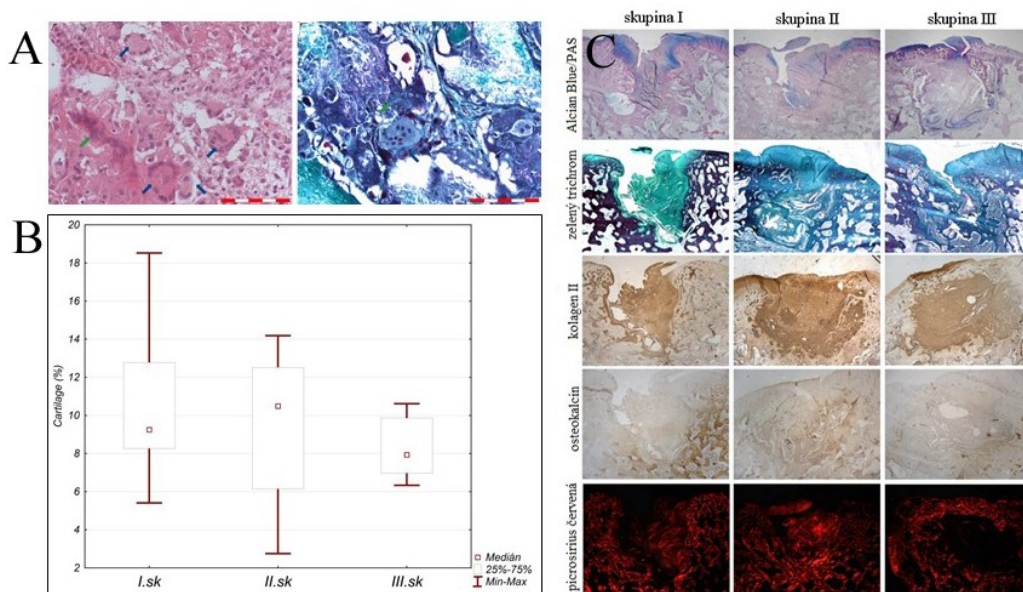
4.4.2. Imunohistochemické barvení kolagenu II



Obrázek 13: Snímky z konfokálního mikroskopu. Imunohistochemické barvení kolagenu typu II (zelený signál) a jader (červený signál) 7. den experimentu. Velikost měřky 20 μm . Byly použity růstové faktory TGF β 1, bFGF, IGF-1. Skupiny zleva doprava: PCL, PCL+hya, PCL+GFs, PCL+synp+GFs, PCL+synp, PCL+hya+GFs, PCL+hya+synp+GFs, PCL+hya+synp.

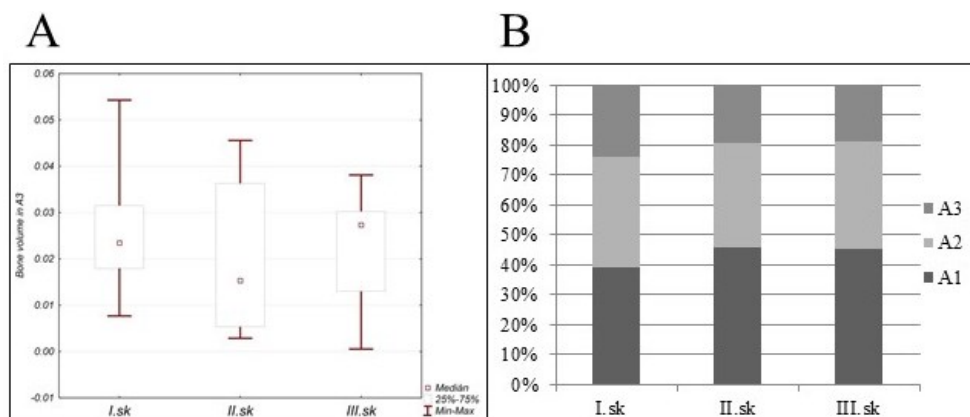
4.4.3. Histologické hodnocení a imunohistochemie

4.4.3.1. Hodnocení hojení chrupavky v defektu



Obrázek 14: Infiltrace nově vznikající tkáně ve skupině III mnohojadernými obrovskými buňkami (MNGCs) s heterogenně uloženými jádry (zelené šipky). Langhansovy buňky s periferně orientovanými jádry (modré šipky). Velikost měřky 100 μ m. B) Kvantifikace přítomnosti hyalinní chrupavky. Bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami. C) Repräsentativní histologické řezy z jednotlivých experimentálních skupin. Alcian Blue/PAS barvení ukazuje modře značené kyselé glykosaminoglykany. Zelený trichrom odlišuje vazivovou tkáň. Hnědé oblasti v řádcích s kolagenem II a osteocalcinem značí pozitivní reakci primární protilátky s diaminobenzidinem. Červený signál po použití picosirius červeně a při pozorování v polarizovaném světle značí přítomnost molekul kolagenu. Velikost měřky 1000 μ m. Skupina I: kolagen I, kyselina hyaluronová, β -TCP. Skupina II: kolagen I, kyselina hyaluronová, β -TCP, PCL. Skupina III: kolagen I, kyselina hyaluronová, β -TCP, PCL, bFGF, TGF- β 1, IGF-1, BMP-2.

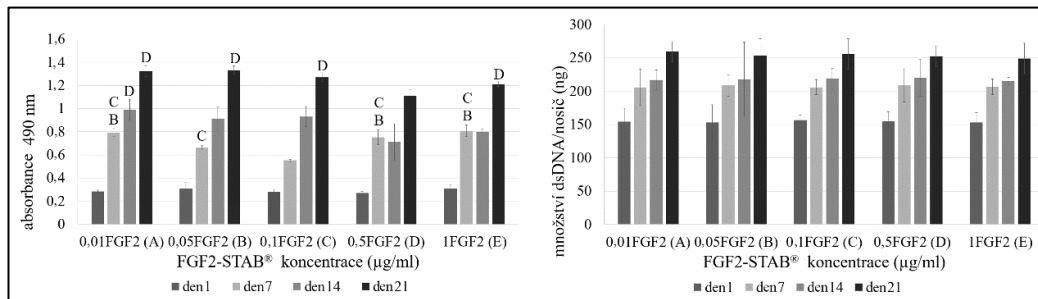
4.4.3.2. Hodnocení hojení kosti v defektu



Obrázek 15: Kvantifikace množství kosti v defektu. Bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami. B) Distribuce nové kostní tkáně v jednotlivých kompartmentech. Skupina I: kolagen I, kyselina hyaluronová, β -TCP. Skupina II: kolagen I, kyselina hyaluronová, β -TCP, PCL. Skupina III: kolagen I, kyselina hyaluronová, β -TCP, PCL, bFGF, TGF- β 1, IGF-1, BMP-2.

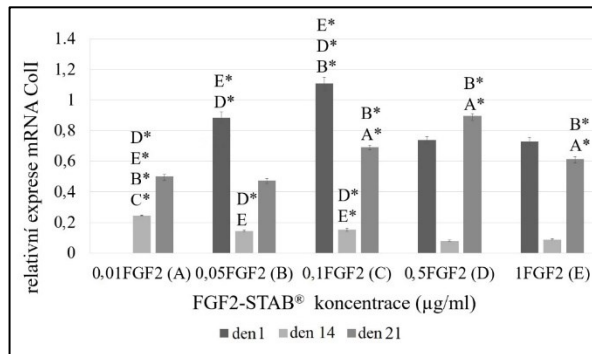
4.5. Vliv Coll/Chit nosiče s FGF2-STAB® na angiogenezi a hojení kožního defektu

4.5.1. Vliv FGF2-STAB® na viabilitu a proliferaci buněk



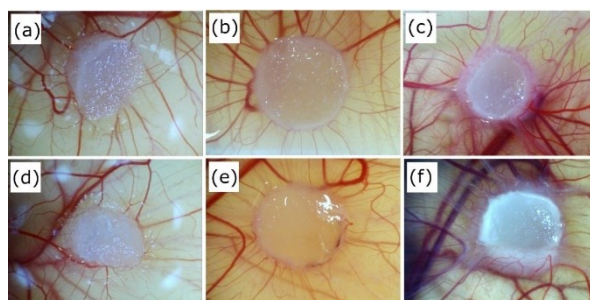
Obrázek 16: Metabolická aktivita fibroblastů na nosičích obohacených FGF2-STAB. Statisticky významné rozdíly značeny pro $p < 0,05$ názvem skupiny. Množství buněčné dsDNA vypovídající o míře proliferace buněk na jednotlivých nosičích. Bez statisticky významných rozdíků. Buňky byly viabilní po celou dobu experimentu a proliferovaly.

4.5.2. Expres mRNA kolagenu typu I



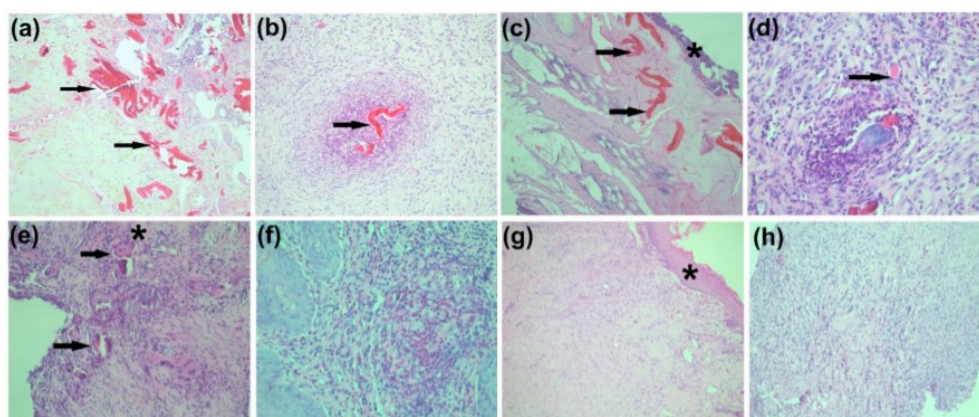
Obrázek 17: Relativní exprese mRNA kolagenu typu I v myších 3T3-A31 fibroblastech. Statisticky významné rozdíly značeny skupinou s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

4.5.3. Vliv přídatku FGF2-STAB® na angiogenezi



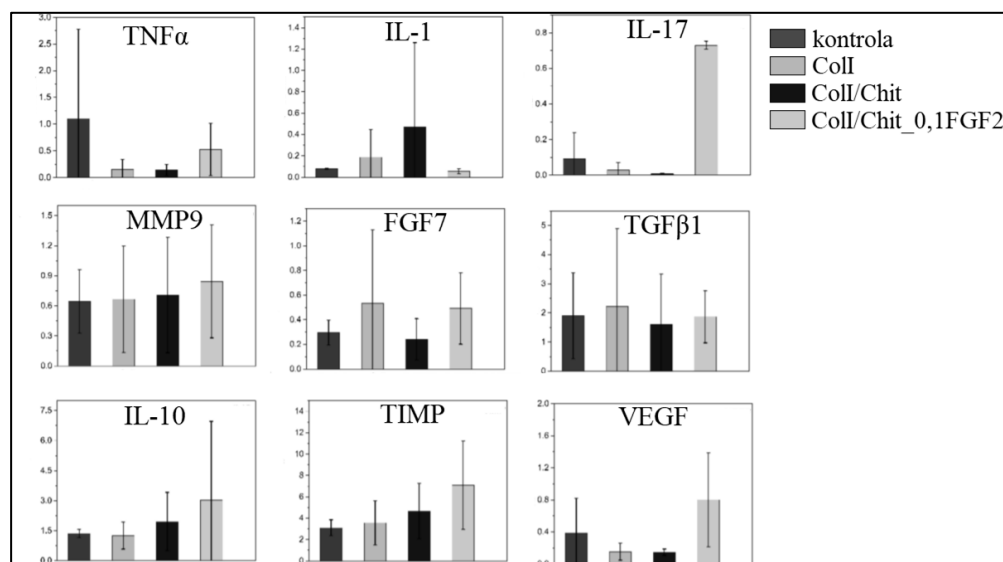
Obrázek 18: Snímky zachycující CAM esej po implantaci Coll/Chit (a-c) a Coll/Chit_0.1FGF2 (d-f) nosičů, den 7 (a, d), 10 (b, e) a 13 (c, f). Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.

4.5.4. Vliv přídavku FGF2-STAB® na biokompatibilitu *in vivo*



Obrázek 19: Přehledné histologické barvení haematoxylinem/eosinem, vzorky odebrané 7 dní po implantaci Coll/Chit nosiče bez FGF2 (a), 14 dní po implantaci (c) a 21 dní po implantaci (e). A 21 dní po implantaci dermo-epidermálního štěpu (h). (a) Rezidua Coll/Chit materiálu s infiltrací zánětlivých buněk v hlubších vrstvách tkáně. (c) Přítomnost Coll/Chit reziduí s infiltrací zánětlivých buněk. Na povrchu je přítomna vrstva epitelu. (e) Rezidua Coll/Chit nosiče v defektu, infiltrace zánětlivých buněk, granulační tkáň. Četné obrovské mnohояaderné buňky indukované přítomností cizího tělesa *. (h) Tkáň nově vznikající v místě defektu s výraznými znaky zánětu. Přehledné histologické barvení haematoxylinem/eosinem, vzorky odebrané 7 dní po implantaci Coll/Chit_0,1FGF2 (b), 14 dní po implantaci (d) a 21 dní po implantaci (f,g). (b) Rezidua Coll/Chit nosiče s infiltrací zánětlivými buňkami. (d) Rezidua Coll/Chit nosiče s infiltrací zánětlivými buňkami a granulační tkání. Přítomné jsou obrovské mnohояaderné buňky indukované přítomností cizích těles. (f) Místo implantace nosiče po plné resorpci chitosanové složky, přítomny jsou zánětlivé buňky a granulační tkáň. (g) Nově vzniklá tkáň v místě původního defektu, bez výrazných známek zánětu. Přítomna povrchová vrstva epitelu *, zvětšení 200×. Ostatní snímky zvětšeny 100×.

4.5.5. Vliv přídavku FGF2-STAB® na genovou expresi v tkáni



Obrázek 20: Expresie mRNA cytokinů ($TNF\alpha$, IL-1, IL-17, MMP9), molekul spojených s hojením (FGF7, $TGF\beta 1$), protizánětlivého IL-10, inhibitoru tkáňových metaloproteináz TIMP-1 a VEGF v místě defektu 21. den po implantaci nosiče. Výsledky jsou prezentovány se směrodatnou odchylkou, relativně k housekeepingovému genu hydroxymethylbilan syntáze. Bez statisticky významných rozdílů.

5. Diskuse

Použité materiály byly všechny již v předchozích studiích hodnoceny jako biokompatibilní a vhodné pro aplikace v tkáňovém inženýrství^{6,7} a jejich cytocompatibilitu jsme potvrdili provedenými testy. Velkou výhodou poskytuje možnost přípravy kompozitů, v nichž jsou

kombinovány přínosné vlastnosti obou materiálů. Modifikovány mohou být fyzikální a chemické faktory, struktura, rozpustnost a je zde také možnost přidání bioaktivní látek⁸⁻¹⁰.

V provedených studiích bylo ukázáno, že různou odezvou v buněčném chování mají nejen jednotlivé materiály ale i jejich morfologické charakteristiky. Imunohistochemické barvení buněk na nanostrukturované slitině Ti-36Nb-6Ta (s vnitřním průměrem trubiček 18, 36 a 46 nm) odhalilo drobné shluky talinu v buněčné cytoplazmě, což vypovídá a podpoře iniciální adheze na materiál. V souladu s naším zjištěním byla publikována data ukazující lepší adhezi na nanostrukturovaných slitinách titanu. Bello et al. popsali snazší tvorbu a maturaci fokálních adhezí na titanových nosičích s průměrem pórů 20 nm¹¹. Z dlouhodobého hlediska však nanostruktury oproti hladkému povrchu nepodporovaly proliferaci. Buněčné dělení naopak bylo podpořeno na kolagenové pěně s α -TCP a póry se středním průměrem 460 nm, což je v souladu se studii naznačujícími vhodnost velkých pórů pro buněčný růst a expanzi. Na vzorcích s jemnější povrchovou morfologií jsme očekávali efektivnější buněčnou adhezi – jako tomu bylo v případě titanového nosiče nebo studie Kuboki et al.¹², což však nebylo pozorováno. Z hlediska porozity je rovněž vhodné mít na paměti přiměřené rozpětí velikosti pórů, aby byl dodržen koncept strukturního gradientu, který lépe napodobuje kostní ECM. Pozitivní vliv různých velikostí pórů byl potvrzen ve studii s xenogenním kostním štěpem, kdy byla kromě proliferace podpořena i diferenciační aktivita.

Z hlediska materiálového složení nosičů je třeba zmínit biologickou aktivitu iontů uvolňovaných z biokeramik. Jedná se typicky o vápník a fosfor^{13,14}, které se procesů na úrovni buněk účastní jako důležité signální molekuly, případně jako kofaktory reakcí. Ca^{2+} je často využívaným sekundárním poslem, kofaktorem například syntézy kolagenů a reguluje činnost kalmulinu¹⁵. Fosfor je rovněž molekula se silnou biologickou aktivitou. Je obsažen v celé řadě látek včetně proteinů, nukleových kyselin, adenosin trifosfátu a ovlivňuje fyziologické procesy v organismu¹⁶. Kromě uvolňování iontů je u biokeramik velmi častým jevem i opačný proces – adsorpce iontů z okolí, což způsobuje výrazné lokální změny pH^{17,18}. V *in vitro* prostředí je třeba na tyto změny reagovat, v *in vivo* podmínkách je však udržování pH zabezpečeno cirkulací tělních tekutin. Pro potenciální *in vivo* aplikaci jsou bezpodmínečně nutné materiály, jejichž degradace probíhá bez toxických vedlejších produktů a které nevyvolávají reakce imunitního systému. Jak se potvrdilo v naší studii osteochondrálního defektu králičího modelu, PCL není z tohoto hlediska optimální. Má poměrně vysokou stabilitu a může tak vést k nežádoucí reakci imunitního systému a blokovat tak procesy hojení. Po jeho implantaci byly v defektu přítomny MNGC, které jsou spojovány právě s patologickou imunitní reakcí¹⁹. Oproti tomu kolagenový nosič s chitosanem v ráně degradoval a obzvlášť, když byl použit FGF-STAB, nebyla v ráně nalezena rezidua nosiče a převažovaly procesy spojené s hojením.

Navázání biomolekul na nosiče obvykle vede ke zlepšení biologických charakteristik nosiče. Obvyklými látkami jsou růstové faktory, jejichž použití je však spojeno s rizikem uvolnění suprafyziologické koncentrace krátce po aplikaci a následná ztráta aktivity. Stabilita růstových faktorů v kultivačním mediu ve 37°C se pohybuje v řádech hodin²⁰. Ve studii regenerace osteochondrálního defektu na králičím modelu byly použity bFGF, TGF-β1, IGF-1 a BMP-2. Navzdory tomu, že jejich pozitivní efekt *in vitro* je dobře zdokumentován^{21,22,23}, v *in vivo* studii jsme pozorovali spíše komplikace spojené s indukcí imunitní reakce a prodlouženým hojením. Izolované ostrůvky hyalinní chrupavky byly zaznamenány v oblasti kolem zdravé kosti. Deaktivace růstových faktorů mohla být způsobena denaturací ethanolem při přípravě nosiče. Limitaci spojené s nízkou stabilitou proteinů se lze vyhnout určitými modifikacemi, které protein stabilizují na dobu až tří týdnů umožní tak aplikaci nižších dávek vyvolávajících méně nežádoucích účinků. Jak bylo ukázáno v naší studii, při použití lidského rekombinantního FGF-STAB byla metabolická aktivita buněk stimulována již při koncentraci 0,01 µg/ml, což vypovídá o vysoké účinnosti stabilizovaného růstového faktoru. Vyšší koncentrace FGF-STAB stimulovaly syntézu kolagenu I, což je nežádoucí efekt vedoucí k tvorbě jizvy. Pro *in vivo* studii byla tedy zvolena koncentrace 0,1 µg/ml, která signifikantně nesnižovala viabilitu buněk a zároveň nepodporovala transkripci mRNA ColI. Nežádoucím efektům se lze vyhnout také použitím krátkých peptidových sekvencí odvozených od fyziologicky přítomných biomolekul²⁴. V naší studii jsme použili biomimetické peptidy P2 a P6, deriváty amelogeninu, které jsou vysoce specifické, pro aplikace tedy bezpečné. Jejich přidávkem byla významně zvýšena biologická aktivita komerčního kostního štěpu. Za klíčový efekt považujeme stimulaci exprese osteokalcinu na úrovni mRNA i proteinu. Osteokalcin vede k mineralizaci nově vznikající kostní hmoty a vzhledem k tomu, že je syntetizován téměř výlučně diferencovanými osteoblasty²⁵, usuzujeme že u MSC na nosičích byla zahájena osteogeneze. P2 a P6 však nepůsobily synergicky a pokud byly kombinovány, jejich efekty se, v porovnání se samostatnou aplikací, rušily.

Velmi důležitým faktorem rozhodujícím o možnosti použití určitého materiálu v praxi je způsob a rychlost jeho degradace. Pokud bude materiál v defektu přítomen po dlouhou dobu, může vést k rozvoji nežádoucí imunitní odpovědi, která bude zpomalovat hojení. Což se pravděpodobně stalo v případě aplikace nosičů obsahujících PCL. V ráně byly detekovány Langhansovy buňky a MNGCs, které bývají spojovány s patologickou reakcí imunitního systému na cizí tělesa. Oproti tomu kolagenová pěna s chitosanem se rozkládala způsobem odpovídajícím rychlosti hojení tkáně. Po třech týdnech od zákroku tak v kožním defektu nebyla nalezena žádná rezidua nosiče, ani známky zánětu a byl přítomen nově vznikající epitel.

6. Závěry

Cílem práce bylo navrhnout a otestovat vhodný bezbuněčný nosič pro regeneraci defektu chrupavky a kosti. Experimenty proběhly v *in vitro* podmínkách, následně byly vybrány nejvhodnější varianty a byl z nich vytvořen bifazický nosič pro implantaci do osteochondrálního defektu *in vivo*. Ze získaných dat vyplývá, že lidské MSC citlivě reagují jak na strukturální charakteristiky nosiče, tak i na použitý materiál. S ohledem na osteogenní diferenciaci je v morfologii nosiče zjevně přínosem přítomnost strukturálního gradientu, který lépe napodobuje přirozenou strukturu kosti a efektivněji tak stimuluje buňky k žádaným procesům. Chondrogenese byla podpořena přidavkem hyaluronanu sodného, a také přidáním chondrogenních růstových faktorů. V *in vivo* studii však kompozitní nosiče s čistými nebo modifikovanými částicemi PCL nezlepšily hojení osteochondrálního defektu podle našeho předpokladu a nosič proto vyžaduje optimalizaci. Vaskularizace byla úspěšně navozena implantací nosiče z kolagenu a chitosanu. V něm obsažený stabilizovaný FGF2 vedl k lepšímu hojení kožního defektu v oblasti dermis, a to už ve velmi nízké koncentraci 0,1 µg/ml.

7. Souhrn

Cílem práce bylo navrhnout a otestovat vhodný bezbuněčný nosič pro regeneraci defektu chrupavky a kosti. Experimenty proběhly v *in vitro* a *ex ovo* podmínkách, následně byly vybrány nejvhodnější varianty a byl z nich vytvořen bifazický nosič pro implantaci do osteochondrálního defektu *in vivo*.

Testován byl osteogenní potenciál xenogenního kostního štěpu s biomimetickými peptidy dvojího typu, titanové slitiny s povrchem upraveným anodickou oxidací a kompozitu kolagenové pěny s biokeramikami. To vše za využití lidských a prasečích mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřene, jakožto buněčného typu, který se primárně podílí na reparačních procesech. Dále byla kolagenová pěna se stabilizovaným FGF2-STAB® hodnocena z pohledu schopnosti podpořit tvorbu nových krevních cév a hojení kožních defektů. Králičímu modelu byl vytvořen osteochondrální defekt na laterálním kondylu femuru, který byl následně vyplněn bifazickým nosičem na bázi lyofilizované kolagenové pěny. S přidaným PCL byly stále pozorovatelné počátky syntézy hyalinní chrupavky, stejně jako u nejjednoduššího nosiče, avšak její přítomnost byla patrná i na povrchu defektu. Zároveň však byla patrná infiltrace defektu neutrofilů a velkými mnohояadernými buňkami, což je spojováno s patologickou zánětlivou reakcí. Obohacení růstovými faktory vedlo k výraznější formaci granulační tkáně a také ke vzniku Langhansových buněk fúzí makrofágů. Pozitivní vliv bFGF, TGF- β 1, IGF-1 na chondrogenní procesy nebyl pozorován, stejně tak v případě BMP-2 a osteogenních procesů.

Ze získaných dat vyplývá, že lidské MSC citlivě reagují jak na strukturní charakteristiky nosiče, tak i na použitý materiál. S ohledem na osteogenní diferenciaci je v morfologii nosiče zjevně přínosem přítomnost strukturního gradientu, který lépe napodobuje přirozenou strukturu kosti a efektivněji tak stimuluje buňky k žádaným procesům. Chondrogenese byla podpořena přidáním hyaluronanu sodného, a také přidáním chondrogenních růstových faktorů. V *in vivo* studii však kompozitní nosiče s čistými nebo modifikovanými částicemi PCLHA nezlepšily hojení osteochondrálního defektu podle našeho předpokladu a nosič proto vyžaduje optimalizaci. Vaskularizace byla úspěšně navozena implantací nosiče z kolagenu a chitosanu. V něm obsažený stabilizovaný FGF2 vedl k lepšímu hojení kožního defektu v oblasti dermis, a to už ve velmi nízké koncentraci 0,1 μ g/ml.

8. Summary

The aim of the work was to design and test a cell-free scaffold made of suitable biomaterial suited for bone and cartilage tissue regeneration. At first, experiments were performed in *in vitro* and *ex ovo* environment. Based on the results obtained a biphasic scaffold was built and implanted to osteochondral defect *in vivo*.

We investigated an osteogenic potential of bone xeno-graft with two types of biomimetic peptides, titanium alloy with nanostructured surface and composite of collagen with bioceramics. For all experiments we used human mesenchymal stem cells from bone marrow as a cell type primarily responsible for tissues regeneration. In the rabbit model we created an osteochondral defect and implanted a biphasic scaffold based on collagen I foam. After PCL addition to the scaffold we could still observe initial phases of hyaline cartilage formation – same as for collagen I/hyaluronan/tricalciumphosphate scaffold. However, we also spotted infiltration of the defect with neutrophils and multinucleated giant cells which is linked with pathological inflammatory reaction. Further enrichment with growth factors led to more significant formation of granulation tissue and macrophages fusion into Langhans giant cells. We did not observe positive effect of bFGF, TGF β 1 and IGF-1 on chondrogenic processes and same for BMP-2 and osteogenic processes.

According to our data we assume that MSC respond sensitively to both structural features of the scaffold and material used. With respect to osteogenic differentiation, the presence of structural gradient is obviously beneficial as it mimics natural bone structure and effectively stimulates cells to desired action. Chondrogenesis was supported by addition of sodium hyaluronan and also by chondrogenic growth factors. Though, in *in vivo* study we did not improve osteochondral regeneration using composite scaffold with pure or modified PCLHA microparticles, thus the scaffold has to be optimized. Vascularization of defect site was supported after implantation of ColII/chitosan scaffold. Stabilized FGF2-STAB[®] (0,1 μ g/mL) lead to more effective full thickness skin defect healing, especial in the dermal area.

9. Použitá literatura

1. Tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **18**, IT56–IT58 (2000).
2. Spira, M., Fissette, J., Hall, W., Hardy, S. B. & Gerow, F. J. Evaluation of synthetic fabrics as artificial skin grafts to experimental burn wounds. *J. Biomed. Mater. Res.* **3**, 213–34 (1969).
3. Jung, Y. *et al.* Scaffold-free, Human Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Engineered Blood Vessels. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
4. Boni, R., Ali, A., Shavandi, A. & Clarkson, A. N. Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *Journal of Biomedical Science* **25**, 1–21 (2018).
5. Adamowicz, J., Pokrywczynska, M., Van Breda, S. V., Kloskowski, T. & Drewa, T. Concise Review: Tissue Engineering of Urinary Bladder; We Still Have a Long Way to Go? *Stem Cells Translational Medicine* **6**, 2033–2043 (2017).
6. Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F. & Perale, G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J. Clin. Periodontol.* **46**, 92–102 (2019).
7. Cordeiro, J. M. & Barão, V. A. R. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Materials Science and Engineering C* **71**, 1201–1215 (2017).
8. Prosecká, E. *et al.* Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **99 A**, 307–315 (2011).
9. J, Z. *et al.* Accurate micro-computed tomography imaging of pore spaces in collagen-based scaffold. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, (2016).
10. Bočková, J., Vojtová, L., Příkryl, R., Čechal, J. & Jančář, J. Collagen-grafted ultra-high molecular weight polyethylene for biomedical applications. *Chem. Pap. 2008 626* **62**, 580–588 (2008).
11. Guadarrama Bello, D., Fouillen, A., Badia, A. & Nanci, A. A nanoporous titanium surface promotes the maturation of focal adhesions and formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions by osteogenic cells. *Acta Biomater.* **60**, 339–349 (2017).
12. Kuboki, Y., Jin, Q. & Takita, H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83 A Suppl 1**, (2001).
13. Akahane, M. *et al.* Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Discov.* **02**, 133–140 (2012).
14. Wang, H. *et al.* Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 3338–3348 (2007).
15. Zayzafoon, M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**, 56–70 (2006).
16. Penido, M. G. M. G. & Alon, U. S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatric Nephrology* **27**, 2039–2048 (2012).
17. Klimek, K. *et al.* ‘false’ cytotoxicity of ions-adsorbing hydroxyapatite - Corrected method of cytotoxicity evaluation for ceramics of high specific surface area. *Mater. Sci. Eng. C* **65**, 70–79 (2016).
18. Šupová, M. *et al.* The comprehensive in vitro evaluation of eight different calcium phosphates: Significant parameters for cell behavior. *J. Am. Ceram. Soc.* **102**, jace.16110 (2018).
19. Al-Maawi, S., Orłowska, A., Sader, R., James Kirkpatrick, C. & Ghanaati, S. In vivo cellular reactions to different biomaterials—Physiological and pathological aspects and their consequences. *Seminars in Immunology* **29**, 49–61 (2017).
20. Andreopoulos, F. & Persaud, I. Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. *Biomaterials* **27**, 2468–2476 (2006).
21. Bai, L. *et al.* Differential effect of hydroxyapatite nano-particle versus nano-rod decorated titanium micro-surface on osseointegration. *Acta Biomater.* **76**, 344–358 (2018).
22. Graham, H. K., Holmes, D. F., Watson, R. B. & Kadler, K. E. Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. *J. Mol. Biol.* **295**, 891–902 (2000).
23. Goldring, M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **4**, 269–85 (2012).
24. Vera, L. *et al.* Osteoinductive 3D scaffolds prepared by blend centrifugal spinning for long-term delivery of osteogenic supplements. *RSC Adv.* **8**, 21889–21904 (2018).

25. Murphy, C. M., Haugh, M. G. & O'Brien, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 461–466 (2010).

Přehled publikační činnosti autora v následující struktuře:

1. Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace.

a) s impakt faktorem (uvést hodnotu IF)

Zhu H.*, **Hefka Blahnová V.***, Perale G., Xiao J., Betge F., Boniolo F., Filova E., Lyngstadaas S. P., Haugen H. J., Xeno-Hybrid bone graft releasing biomimetic proteins promotes osteogenic differentiation of hMSCs. *Front Cell Dev Biol.* 2020. *sdílené prvoautorství, IF 6,684

Vojtová L., Pavlišáková V., Muchová J., Kacvinská K., Brtníková J., Knoz M., Lipový B., Faldyna M., Göpfert E., Holoubek J., Pavlovský Z., Vícenová M., **Hefka Blahnová V.**, Hearnden V., Filová E., Healing and Angiogenic Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds Enriched with Hyperstable FGF2-STAB® Protein: In Vitro, Ex Ovo and In Vivo Comprehensive Evaluation. *Biomedicines.* 2021, IF 4,757

Voltrova B., Jarolimova P., Hybasek V., **Hefka Blahnová V.**, Sepitka J., Sovkova V., Matejka R., Daniel M., Fojt J., Filova E., In vitro evaluation of a novel nanostructured Ti36Nb6Ta alloy for orthopedic applications. *Nanomedicine (London)* 2020, IF 5,307

b) bez IF

2. Původní vědecké práce in extenso bez vztahu k tématu disertace (především publikace přehledové, metodické, kazuistické).

a) s impakt faktorem (uvést hodnotu IF)

Sovkova V., Vocetkova K., Hedvicakova V., **Hefka Blahnová V.**, Buzgo M., Amler E., Filova E., Cellular response to individual components of the platelet concentrate. *Int J Mol Sci.* 2021, IF 5,923

Hefka Blahnová V., Dankova J., Rampichova M., Filova E., Combinations of growth factors for human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Bone and Joint Research* 2020. IF 5,853

Jarolimova P., Voltrova B., Blahnová V., Sovkova V., Pruchova E., Hybasek V., Fojt J., Filova E., Mesenchymal stem cell interaction with Ti6Al4V alloy pre-exposed to simulated body fluid. *RSC Advances* 2019, IF 3,361

Voltrova B., Hybasek V., **Blahnová V.**, Sepitka J., Lukasova V., Vocetkova K., Sovkova V., Matejka R., Fojt J., Joska L., Daniel M. and Filova E., Different diameters of titanium dioxide nanotubes modulate Saos-2 osteoblast-like cell adhesion and osteogenic differentiation and nanomechanical properties of the surface. *RSC Advances* 2019, IF 3,361

Gregor A., Filova E., Novak M., Kronek J., Chlup H., Buzgo M., **Blahnová V.**, Lukasova V., Bartos M., Necas A., Hosek J., Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng.* 2017 Oct 16;11:31. doi: 10.1186/s13036-017-0074-3. eCollection 2017. IF 4,355

3. Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních.

- 2020: Biomateriály a jejich povrchy XIII.
 - **Veronika Hefka Blahnová**, Karolína Vocetková, Andrej Litvinec, Lucie Wolfová, Eva Filová: Dediferenciace chondrocytů z aurikulární chrupavky králíka
- 2019: 14th Multinational Congress on Microscopy
 - **Veronika Hefka Blahnová**, Katarína Kacvinská, Lucy Vojtová, Eva Filová: Collagen type I scaffold coated with nature inspired polymer
- 2019: XLII. Dny lékařské biofyziky
 - **Veronika Hefka Blahnová**, Lucy Vojtová, Eva Filová: Kolagenový scaffold funkcionalizovaný přírodním polymerem
- 2019: Bioimplantologie 2019
 - **Veronika Blahnová**, Karolína Vocetková, Jana Hlinková, Radek Divín, Evžen Amler, Eva Filová: PCL nosič pro regeneraci osteochondrálního defektu

- 2018: The NYSCF Conference
 - **Veronika Blahnová**, Věra Sovková, Barbora Voltrová, Petra Jarolímová, Eva Filová: Nanotubes created on titanium alloys as a suitable material for mesenchymal stem cell growth and differentiation
- 2018: Bioimplantologie 2018
 - **Veronika Blahnová**, Lucy Vojtová, Nikola Klieštková, Eva Filová: Kolagenový scaffold pro navození osteogeneze lidských mezenchymálních kmenových buněk
- 2017: Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference
 - **Veronika Blahnová**, Eva Filová, Veronika Švachová, Martin Trunec, Lucy Vojtová, Evžen Amler: Collagen type I based foamed Scaffold for Bone Defects Therapy
- 2017: 13th Multinational Congress of Microscopy
 - **Veronika Blahnová**, Eva Filová, Veronika Švachová, Martin Trunec, Lucy Vojtová, Evžen Amler: Collagen scaffold for human mesenchymal stem cells osteogenesis induction
 - **first place in PhD students poster presentations, section Life Sciences**
- 2017: XXXX. Dny lékařské biofyziky
 - **Veronika Blahnová**, Eva Filová, Veronika Švachová, Martin Trunec, Lucy Vojtová, Evžen Amler: Kolagenový scaffold pro indukci osteogeneze lidských mezenchymálních kmenových buněk
- 2017: Bioimplantologie 2017
 - **Veronika Blahnová**, Eva Filová, Veronika Švachová, Martin Trunec, Lucy Vojtová, Evžen Amler: Pěnový nosič pro indukci osteogeneze lidských mezenchymálních kmenových buněk