

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Lékařská biofyzika



Mgr. Veronika Hefka Blahnová

Moderní biomateriály pro regeneraci pojivových tkání

Smart biomaterials for connective tissues regeneration

Disertační práce

Školitel: Mgr. Eva Filová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Praha 9. 12. 2021

Veronika Hefka Blahnová

.....

Podpis autorky

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Evě Filové, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky při tvorbě disertace a při experimentální práci. Dále děkuji kolegyním z Oddělení tkáňového inženýrství za skvělé pracovní prostředí. A v neposlední řadě děkuji své rodině za pozitivní přístup a podporu.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant č. 448218), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy národními programy udržitelnosti (granty č. LO1508, LO1309, LO1605), Grantovou agenturou České republiky (grant č. 16-14758S) a EU Horizon 2020 MSCA-RISE-2018 (grant č. 824007).

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 osteochondrálního defektu. V rámci provedených experimentů byla sledována viabilita a diferenciaci 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 přidavek 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.

Klíčová slova

kostní štěp, PCL, kolagenový nosič, titanový nosič, růstové faktory, osteogeneze, chondrogenese, mezenchymální kmenové buňky, regenerace, tkáňové inženýrství

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* study, we implanted a cell-free scaffold made of PCL, calcium phosphate and IGF-1, bFGF, TGF β 1 and BMP-2 to osteochondral defect. 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.

Keywords

bone graft, PCL, collagen scaffold, titanium scaffold, growth factors, osteogenesis, chondrogenesis, mesenchymal stem cells, regeneration, tissue engineering

Seznam zkratek

| | |
|---------------|--|
| 2D | dvojměrné |
| 3D | trojměrné |
| α -TCP | α trikalcium fosfát |
| β -TCP | β trikalcium fosfát |
| ALP | alkalická fosfatáza |
| ARS | Alizarin Red S barvení |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BCECF-AM | 2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5(6)-karboxyfluorescein, acetoxyethyl ester |
| BMP-2 | kostní morfogenetický protein 2 |
| BMP-3 | kostní morfogenetický protein 3 |
| BMP-4 | kostní morfogenetický protein 4 |
| BMP-6 | kostní morfogenetický protein 6 |
| BMP-7 | kostní morfogenetický protein 7 |
| BMP-13 | kostní morfogenetický protein 13 |
| BMP-14 | kostní morfogenetický protein 14 |
| CAM | chorioalantoidní membrána |
| CapolyP/CaP | kalcium polyfosfát |
| CD | diferenciační znaky |
| cDNA | komplementární DNA |
| COL2A1 | kolagen II alfa 1 řetězec |
| ColI | kolagen typu I |
| COMP | oligomerní protein chrupavky |
| cpTi | komerčně čistý titan |
| DAMP | molekulární vzory asociované s poškozením |
| DDR-2 | receptor obsahující diskoidinovou doménu 2 |
| DKK-1 | dickkopf příbuzný protein 1 |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dsDNA | dvouřetězcová DNA |
| ECM | mezibuněčná hmota |
| EDC | 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-karbodiimid hydrochlorid |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EEF1 | eukaryotický elongační faktor 1 |
| Elk-1 | ETS příbuzný protein 1 |

| | |
|----------------|---|
| ERK | extracelulární signálem regulovaná kináza |
| FACIT | s vlákny asociované kolageny s přerušenu trojitou šroubovicí |
| FACS | fluorescencí aktivované třídění buněk |
| FBS | fetální bovinní sérum |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv |
| FGF-2 | fibroblastový růstový faktor 2 |
| FGF-7 | fibroblastový růstový faktor 7 |
| FGF-8 | fibroblastový růstový faktor 8 |
| FGF-9 | fibroblastový růstový faktor 9 |
| FGF-10 | fibroblastový růstový faktor 10 |
| FGF-18 | fibroblastový růstový faktor 18 |
| GF | růstový faktor |
| GTP | guanosintrifosfát |
| HAP | hydroxyapatit |
| HIF-1 α | hypoxií indukovaný faktor 1 α |
| IBSP | kostní sialoprotein |
| IDP | vnitřně neuspořádaný protein |
| IGF-1 | inzulinu podobný růstový faktor 1 |
| IGF-2 | inzulinu podobný růstový faktor 2 |
| IL-1 α | interleukin 1 α |
| IL-1 β | interleukin 1 β |
| IL-6 | interleukin 6 |
| IL-10 | interleukin 10 |
| IL-17 | interleukin 17 |
| JNK | Janusova kináza |
| MACIT | s membránou asociované kolageny s přerušenu trojitou šroubovicí |
| MAP | mitogenem aktivovaná protein kináza |
| M-CSF | faktor stimulující kolonie makrofágů |
| MEK1/2 | kináza MAP kinázy |
| miRNA | mikro RNA |
| MMP-9 | matrixová metaloproteináza 9 |
| MNGC | mnohojaderné obrovské buňky |
| mRNA | RNA „posel“ |
| MSC | mezenchymální kmenové buňky |

| | |
|----------------|---|
| NF- κ B | jaderný faktor kappa B |
| NHS | N-hydroxysukcinimid |
| OCN | osteokalcin |
| OPG | osteoprotegerin |
| OPN | osteopontin |
| PBS | fosfátový pufr |
| PBT | polybutylen tereftalát |
| PCL | poly- ϵ -kaprolakton |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PDGF | od destiček odvozený růstový faktor |
| PEG | polyethylenglykol |
| PET | polyethylen tereftalát |
| PGA | kyselina polyglykolová |
| PI3K | fosfatidylinositol 3 kináza |
| PLA | kyselina polymléčná |
| PLGA | kopolymer kyseliny mléčné a glykolové |
| PUR | polyuretan |
| PVA | polyvinylalkohol |
| RANK | receptorový aktivátor jaderného faktoru kappa B |
| RANKL | receptorový aktivátor jaderného faktoru kappa B ligandu |
| rhBMP-2 | lidský rekombinantní BMP-2 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RunX2 | Runt příbuzný transkripční faktor 2 |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| SOST | sklerostin |
| Sox9 | SRY-box 9 |
| TCP | kultivační plastik |
| TGF- β 1 | transformující růstový faktor β 1 |
| TGF- β 2 | transformující růstový faktor β 2 |
| TIMP-1 | tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 |
| TNF α | tumor nekrotizující faktor α |
| VEGF | vaskulární endotelový růstový faktor |
| VEGF-A | vaskulární endotelový růstový faktor A |
| VEGFR-1 | receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru 1 |

VEGFR-2 receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru 2
VEGFR-3 receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru 3

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod | 12 |
| 2 | Literární přehled | 14 |
| 2.1 | Pojivové tkáně | 14 |
| 2.1.1 | Tuková tkáň..... | 15 |
| 2.1.2 | Retikulární vazivo | 15 |
| 2.1.3 | Řídké vazivo..... | 16 |
| 2.1.4 | Husté vazivo..... | 16 |
| 2.1.5 | Krev..... | 16 |
| 2.1.6 | Chrupavka | 16 |
| 2.1.7 | Kost..... | 32 |
| 3 | Cíle práce | 50 |
| 4 | Experimentální část | 51 |
| 5 | Materiál a metody | 52 |
| 5.1 | Příprava nosičů | 52 |
| 5.2 | Určení morfologie nosičů | 55 |
| 5.3 | Botnání nosiče | 55 |
| 5.4 | Hydrolytická degradace | 55 |
| 5.5 | Enzymatická degradace | 55 |
| 5.6 | Mechanické testování | 56 |
| 5.7 | Určení kmenovosti lidských MSC..... | 56 |
| 5.8 | Kultivace buněk..... | 56 |
| 5.9 | Vizualizace buněk skenovací elektronovou mikroskopií | 57 |
| 5.10 | Stanovení metabolické aktivity buněk..... | 57 |
| 5.11 | Kvantifikace obsahu dsDNA..... | 58 |
| 5.12 | Sledování aktivity alkalické fosfatázy | 58 |
| 5.13 | Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie..... | 59 |
| 5.14 | DAPI/phalloidin | 60 |
| 5.15 | qPCR | 60 |
| 5.16 | Kvantifikace extracelulárních proteinů..... | 61 |
| 5.17 | Hodnocení angiogenních vlastností nosiče..... | 61 |
| 5.18 | Péče o zvířata, implantace nosiče | 61 |
| 5.19 | Odběr vzorků a histologické zpracování | 62 |
| 5.20 | Statistické vyhodnocení dat | 64 |
| 6 | Výsledky | 65 |
| 6.1 | Xenogenní kostní štěp funkcionalizovaný biomimetickými peptidy..... | 65 |
| 6.1.1 | Cytotoxicita, metabolická aktivita a míra proliferace | 65 |
| 6.1.2 | Expanze buněk na nosiči | 66 |
| 6.1.3 | Aktivita alkalické fosfatázy..... | 67 |
| 6.1.4 | Vizualizace osteokalcinu..... | 68 |
| 6.1.5 | Relativní exprese mRNA osteogenních markerů | 69 |
| 6.1.6 | Kvantifikace specifických extracelulárních proteinů | 69 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.1.7 | Diskuze..... | 70 |
| 6.1.8 | Shrnutí..... | 73 |
| 6.2 | Ti36Nb6Ta nanostrukturovaný anodickou oxidací | 73 |
| 6.2.1 | Charakterizace vzorků..... | 73 |
| 6.2.2 | Adheze a morfologie buněk | 74 |
| 6.2.3 | Metabolická aktivita a proliferace buněk | 75 |
| 6.2.4 | Aktivita alkalické fosfatázy..... | 76 |
| 6.2.5 | Relativní exprese mRNA osteogenních markerů | 77 |
| 6.2.6 | Vizualizace kolagenu typu I a osteokalcinu | 78 |
| 6.2.7 | Diskuze..... | 79 |
| 6.2.8 | Shrnutí..... | 82 |
| 6.3 | Pěnový nosič z kolagenu typu I a biokeramiky | 83 |
| 6.3.1 | Struktura a morfologie nosiče | 83 |
| 6.3.2 | Metabolická aktivita..... | 85 |
| 6.3.3 | Kvantifikace obsahu buněčné dsDNA | 85 |
| 6.3.4 | Expresa mRNA osteogenních markerů | 86 |
| 6.3.5 | Imunohistochemická vizualizace osteokalcinu | 87 |
| 6.3.6 | Vizualizace počtu buněk na nosičích | 88 |
| 6.3.7 | Diskuze..... | 89 |
| 6.3.8 | Shrnutí..... | 93 |
| 6.4 | Vliv Coll/Chit nosiče s FGF2-STAB ® na angiogenezi a hojení kožního defektu | 93 |
| 6.4.1 | Vliv přídavku chitosanu na enzymatickou degradaci..... | 93 |
| 6.4.2 | Vliv přídavku chitosanu na pevnost nosiče | 94 |
| 6.4.3 | Vliv přídavku FGF2-STAB ® na strukturu nosiče | 94 |
| 6.4.4 | Vliv FGF2-STAB ® na biologické vlastnosti nosiče | 95 |
| 6.4.5 | Expresa mRNA kolagenu typu I | 96 |
| 6.4.6 | Vizualizace živých a mrtvých buněk a jejich penetrace do nosiče..... | 97 |
| 6.4.7 | Vliv přídavku FGF2-STAB ® na angiogenezi..... | 98 |
| 6.4.8 | Vliv přídavku FGF2-STAB ® na biokompatibilitu <i>in vivo</i> | 99 |
| 6.4.9 | Vliv přídavku FGF2-STAB ® na genovou expresi v tkáni..... | 99 |
| 6.4.10 | Diskuze..... | 100 |
| 6.4.11 | Shrnutí..... | 103 |
| 6.5 | Kolagenový nosič obohacený hyaluronanem/ β -TCP, PCL a růstovými faktory pro regeneraci osteochondrálního defektu <i>in vivo</i> | 104 |
| 6.5.1 | Morfologie nanovláken | 104 |
| 6.5.2 | Kvantifikace dsDNA | 105 |
| 6.5.3 | Růst buněk na nosiči | 106 |
| 6.5.4 | Imunohistochemické barvení kolagenu II | 107 |
| 6.5.5 | Histologické hodnocení a imunohistochemie..... | 107 |
| 6.5.6 | Diskuze..... | 111 |
| 6.5.7 | Shrnutí..... | 114 |
| 7 | Souhrn | 115 |
| 8 | Summary | 116 |
| 9 | Literatura | 117 |
| 10 | Publikace, které jsou podkladem disertace | 149 |
| 11 | Ostatní publikace autorky | 150 |

1 Úvod

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 náhrad¹ 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 Literární přehled

2.1 Pojivové tkáně

Pojivové tkáně jsou původem z embryonálního mezenchymu, rosolovité hmoty s řídkými kolagenovými vlákny vyplňující prostor mezi entodermem a ektodermem. Jejich hlavní funkcí je fyzicky spojit tělní orgány a poskytnout jim mechanickou oporu. Intersticiální tekutiny pojivových tkání zároveň slouží jako medium pro difuzi živin a metabolismus buněk. Na rozdíl od tkání jiného typu (například epitelů nebo nervové tkáně) je hlavní komponentou amorfní mezibuněčná hmota a buňky tvoří jen menšinu obsahu. Extracelulární hmota má organickou a anorganickou složku. Organickou složku představují zejména kolagenová a elastinová vlákna, v menší míře adhezivní proteiny, například fibronektin, glykosaminoglykany a proteoglykany. Z anorganických látek to je hlavně voda a minerály, které spolu s organickými složkami tvoří gelovitou amorfní hmotu^{6,7}.

Kolagen je nejhojněji zastoupený protein v savčím organismu. i díky tomu se běžně využívá v mnoha medicínských aplikacích, například v kardiologii, estetické medicíně, ortopedii, rekonstrukční chirurgii i v základním výzkumu⁸. V současnosti je známo 27 různých typů kolagenů lišících se lokalizací v organismu i strukturou. V závislosti na typu tkáně nalézáme kolagen ve formě vláken (typ I) nebo fibril (typ II, III, V, XI), asociovaný s vlákny s přerušenou trojitou šroubovicí (anglicky fibril-associated collagens with interrupted triple helices FACITs) a s membránou asociované kolageny s přerušenou trojitou šroubovicí (anglicky membrane-associated collagens with interrupted triple helices MACITs). Významným rysem kolagenů je možnost síťování, při kterém dochází k tvorbě kovalentních vazeb a zlepšení mechanických charakteristik^{8,9,10,11}.

Elastinová vlákna jsou nejčteněji zastoupena v tkáních, které musí odolávat velkému mechanickému tlaku, například ve šlachách nebo krevních cévách. Převážně hydrofobní aminokyseliny tvoří molekuly ve vodě rozpustného tropoelastinu, jejichž agregací vzniká nerozpustný elastin^{12,13}.

Proteiny buněčné adheze, např. talin, vinkulin, vibronektin, kadherin, selektiny, Ig-superrodina buněčných adhezivních molekul se přes povrchové integrinové receptory váží na okolní buňky a na proteiny mezibuněčné hmoty. Zajišťují tak základní buněčnou signalizaci rozhodující o přežití, proliferaci i diferenciaci buňky. Nedostatek těsných mezibuněčných kontaktů způsobený například poruchou exprese adhezivních proteinů je natolik závažnou okolností, že vede k letalitě již během embryonálního vývoje^{12,14}.

Proteoglykany vznikají kovalentní vazbou minimálně jednoho glykosaminoglykanového řetězce na protein tvořící jádro. Typickým zástupcem proteoglykanů je agrekan, molekula specifická pro extracelulární hmotu chrupavky. Proteoglykany i glykosaminoglykany mají kromě modulace mechanických a strukturních vlastností důležitou roli také v regulačních mechanismech pojivové tkáně^{15,7}.

Buňky a mezibuněčná hmota jsou v pojivových tkáních zastoupeny v různých poměrech, což se projevuje morfologickými a funkčními odlišnostmi konkrétního pojiva. Obecně se pojivové tkáně dělí na pravé a se speciální funkcí. Mezi pojivové tkáně pravé se řadí tkáň tuková, vazivo retikulární, řídké a husté. Pravé pojivové tkáně si jsou velmi podobné a často se jejich funkce i stavba prolínají. V této práci budou jednotlivé typy popsány každý zvlášť. Pojivové tkáně speciální jsou krev, chrupavka a kost. Vzhledem k tomu, že experimentální část práce je zaměřena na defekty kosti a chrupavky, bude kladen důraz především na tyto dvě tkáně.

2.1.1 Tuková tkáň

Tuková tkáň je tvořena především tukovými buňkami - adipocyty, v menší míře mezenchymálními kmenovými buňkami a imunitními buňkami¹⁶. Buňky jsou obklopeny membránou z kolagenů, lamininu a proteoglykanů. V organismu je tuková tkáň lokalizována především v podkoží a kostní dřeni, s nimiž jsou spjaty i její hlavní funkce. Velkou měrou se podílí na termoregulaci a hojení poranění, slouží jako zásobárna energie a roli hraje také v rovnováze imunitního a endokrinního systému¹⁷.

Savci mají dvojí typ tukové tkáně – bílou a hnědou. Bílá, neboli unilokulární, slouží jako zásoba energie a izolační vrstva. V případě nedostatku energie uvolňují buňky signální molekuly, které se váží na membránové receptory adipocytů. Tato signalizace vede k odstartování lipolýzy a uvolnění energeticky bohatých mastných kyselin a glycerolu. Hnědá, multilokulární, tuková tkáň je velmi bohatá na mitochondrie a nalézá se především u novorozenců savců, s věkem jí obvykle výrazně ubývá. Má speciální metabolickou funkci, kdy za spotřeby energie generuje teplo, jedná se o tzv. netřesovou termogenezi¹⁸.

2.1.2 Retikulární vazivo

Retikulární pojivová tkáň převažuje v místech s vysokou koncentrací buněk, například v jaterní tkáni nebo endokrinních žlázách. Vlákna z kolagenu typu III jsou syntetizována speciálním typem fibroblastů (retikulárními buňkami) a tvoří síť. Právě tento typ vaziva vzniká jako časná podpůrná kostra pro buňky nově formované tkáně při hojení poranění⁶.

2.1.3 Řídké vazivo

Řídké neboli areolární vazivo je z hlediska obsahu buněk velmi různorodé a bohaté. Hlavní složkou mezibuněčné matrix je amorfní hmota doplněná kolagenními a elastinovými vlákny. Stejně jako ostatní druhy pravých pojivových tkání není příliš mechanicky odolné, zajišťuje však určitou míru fixace vnitřních orgánů a tvoří prostředí pro difuzi plynů a metabolitů mezi buňkami. Lokalizováno je v lamina propria, pod dermis, pod epitelu všech tělních soustav, které mají vnější vývody a v mezenteriu obklopujícím střeva. Řídké vazivo má bohaté cévní zásobení a vzhledem ke své lokalizaci je prvním místem kontaktu buněk imunitního systému s patogenem, sehrává tedy důležitou roli v imunitní reakci^{19,20}.

2.1.4 Husté vazivo

Husté vazivo může být pravidelně nebo nepravidelně uspořádané. Kolagenová vlákna jsou tedy orientována do rovnoběžných svazků a vyskytují se v místech, kde síla působí pouze v jednom směru nebo jsou vzájemně propletena a lokalizována tam, kde musí tkáň odolávat tahu v různých směrech. Uspořádaná vlákna jsou vazy a šlachy. Neuspořádaná vlákna jsou především v dermis, tvoří bělimu oka a fibrózní obaly vnitřních orgánů^{20,7}.

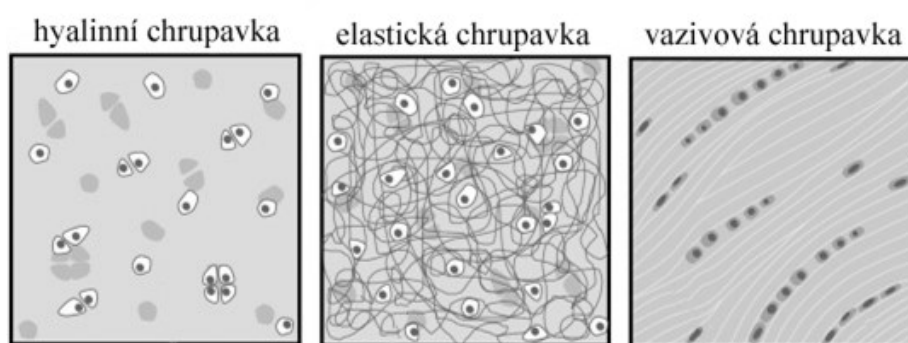
2.1.5 Krev

Krev je považována za tkáň, protože se skládá z určitého množství buněk, které mají specializovanou funkci a zároveň jsou obklopeny mezibuněčnou hmotou – plazmou obsahující krevní bílkoviny. Majoritní krevní bílkovinou je sérový albumin. Moduluje onkotický tlak bílkovin a zajišťuje rovnováhu ve výměně kapalin mezi krevními kapilárami a tkáněmi. Krevní buňky představují asi 45 % objemu krve. Jsou to erytrocyty, leukocyty a krevní destičky. Dohromady tvoří obě složky krve viskózní kapalinu, jejíž hlavní funkcí je transport dýchacích plynů a živin ostatním tělním buňkám a udržení homeostáze⁶.

2.1.6 Chrupavka

Chrupavka je viskoelastická pojivová tkáň, která v embryonálním vývoji předchází kost. Její funkcí je zajišťovat pohyblivé spojení kostí, snižovat tření v kloubu a tlumit mechanické namáhání kostních epifýz. Lokalizována je typicky v kloubech, dále v místě napojení žeber na páteř a hrudní kost, tvoří meziobratlové ploténky, vyztužuje průdušnici. Vzhledem k chybějícímu krevnímu zásobení a velmi nízkému počtu chondrocytů s omezenou proliferační kapacitou má chrupavka nízký regenerační potenciál. Léze vzniklé traumatem tak obvykle vedou i k degeneraci subchondrální kosti a rozvoji artrózy^{21,22}.

V závislosti na biomechanických a strukturních vlastnostech lze chrupavku dělit do tří skupin na hyalinní, elastickou a vazivovou²³ (Obrázek 1). Hyalinní chrupavka se nachází v kloubech – v loktech, ramenou, kolenech, kyčlích a je tedy běžně označována jako chrupavka kloubní. Chondrocyty jsou v extracelulární hmotě uloženy v lakunách. Většinová složka je ze 70 – 80 % představována vodou, která se váže na extracelulární proteoglykany a na kolagenní proteiny (15 - 25 %)^{24,25}. Elastickou chrupavkou je tvořen ušní boltec, části průdušnice a hrtanová přiklopka. Hlavní složkou jsou náhodně orientovaná elastinová vlákna, díky kterým jsou tyto struktury pružné a zároveň tvarově stálé²⁶ a kolagen typu II. Chondrocyty jsou, v rámci typů chrupavky, poměrně četné a tvoří pravidelně rozptýlené izogenetické skupiny. Vazivová chrupavka je nejužším typem chrupavky. Obsahuje převážně kolagen typu I, který v kombinaci s kolagenem typu II tvoří hustou síť vláken, v níž jsou uzavřeny izolované chondrocyty. Tento typ chrupavky se vyskytuje v meziobratlových ploténkách a v menisku²⁷.



Obrázek 1: V hyalinní chrupavce jsou chondrocyty uzavřeny po málo početných skupinách v lakunách. Elastická chrupavka obsahuje náhodně rozptýlené chondrocyty a četná neorganizovaná elastinová a kolagenová vlákna. Ve vazivové chrupavce jsou vlákna kolagenu II uspořádána do husté sítě. Převzato a upraveno podle ²⁷.

2.1.6.1 Formace

Chrupavka, stejně jako ostatní pojivové tkáně, je mezodermálního původu. Vzniká během embryonálního vývoje agregací mezenchymálních kmenových buněk, které nejprve vytváří těsné spoje a následně začnou proliferovat a zvyšovat tak hustotu buněk v nově vznikající tkáni. Prekuzory dále diferencují do dvou linií. Jednak do perzistujících chondrocytů, které produkují velké objemy mezibuněčné hmoty a vytváří hyalinní chrupavku a dále do chondrocytů zachovávajících si schopnost proliferace, které následně ustanovují růstovou ploténku²⁸. V dalším vývoji proliferující chondrocyty terminálně diferencují a hypertrofují. Okraje budoucí chrupavky kolonizují osteoblasty, které začínají mineralizovat extracelulární hmotu a tvoří tak první osifikační centrum a primární spongiózu²⁹. Druhé osifikační centrum se formuje na opačném konci základu chrupavky.

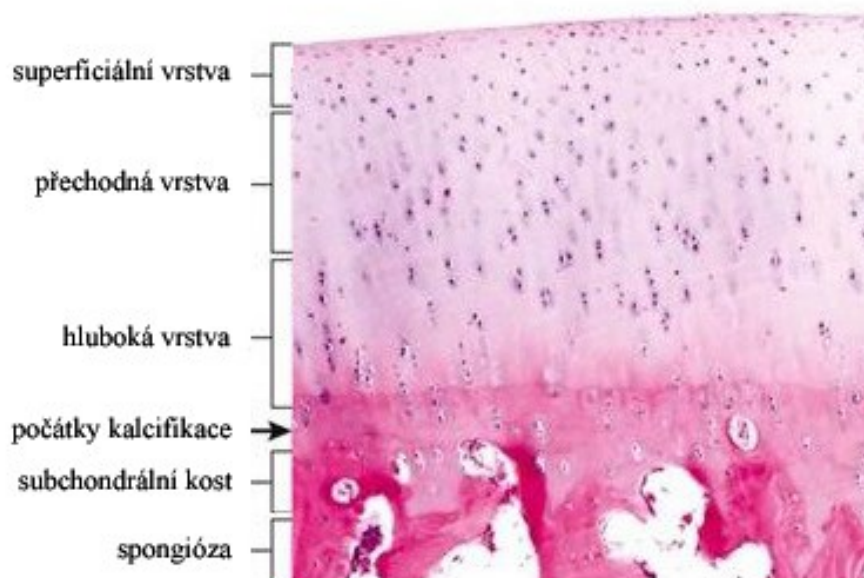
Chrupavková tkáň je u člověka plně zralá ve věku 18 – 21 let. Do té doby průběžně prochází změnami na úrovni buněčného fenotypu i strukturální a biochemickou přestavbou mezibuněčné hmoty. Na počátku ontogeneze je pro chrupavku typická vysoká hustota buněk s malým objemem extracelulární matrix. V průběhu diferenciaci se vrstva chrupavky ztenčuje, buňky hypertrofují a jsou apoptoticky aktivní. V dospělé chrupavce jich zůstává pouze 1 – 5 % objemu tkáně^{25,24}. Hlavní změny v ECM jsou způsobeny ukládáním vláken kolagenu v různých směrech řízené působícími silami. Míra síťování kolagenu klesá s věkem²². Stejně jako zastoupení kolagenu typu XI, což je způsobeno zpomalením přeměny chrupavky v kost³⁰. S věkem jedince rovněž dochází k neenzymatické glykaci proteinů, kdy volné aminokyseliny reagují s karbonylovými skupinami cukrů, a to bez činnosti enzymů. Následkem toho se některé tělní struktury stávají rigidními a dochází k ovlivnění jejich funkce. Týká se to nejen chrupavky ale také oční čočky nebo kardiovaskulárního systému³¹.

Ve fázi plné diferenciaci pozbývají chondrocyty proliferací kapacitu a žijí uzavřené v mezibuněčné hmotě bez přísunu živin krevními cévami. Maturované chondrocyty navíc mají sníženou schopnost odpovídat na signalizaci růstovými faktory a produkovat ECM. Proto má chrupavka téměř nulovou kapacitu regenerovat. Živiny jsou získávány pouze ze synoviální tekutiny obklopující kloub a difuzí ze subchondrální kosti²².

2.1.6.2 Buňky a struktura tkáně

Jediné buňky chrupavky se nazývají chondrocyty. Jejich charakteristickou vlastností je kulovitá nebo polygonální morfologie. Obvykle nevytvářejí mezibuněčné spoje³². Po maturaci jsou chondrocyty senescentní a postrádají mitotickou aktivitu. I ve stadiu senescence je však zachována schopnost transportu iontů vně a dovnitř buňky. Metabolická aktivita je modulována růstovými faktory, piezoelektrickými silami a především mechanickou stimulací chondrocytů^{33,34}. Vzhledem k charakteristikám tkáně chrupavky je její metabolický aparát uzpůsoben k fungování v hypoxii. V porovnání například s tkání ledvin spotřebuje maximálně 5 % kyslíku a zároveň produkuje srovnatelné množství laktátu. Nízká koncentrace kyslíku má v chrupavce důležitou signalizační funkci. Indukuje produkci molekuly HIF-1 α , která kromě stimulace syntézy Sox9, kolagenu typu II a proteoglykanů vede ke zvýšené expresi glukozových transportérů. Zároveň klesá počet mitochondrií a energetický metabolismus se tak stává anabolickým a závislým především na přísunu glukózy³⁵. Kromě zdroje energie je glukóza prekurzorem pro syntézu glykosaminoglykanů, esenciální složky chrupavkové ECM. Tvar, metabolická aktivita i počet buněk se zásadně odvíjí od lokalizace buněk v konkrétní vrstvě chrupavky (Obrázek 2).

V tenké superficiální, kluzné, zóně jsou chondrocyty spíše vřetenovitého charakteru a jsou přítomny ve vysoké hustotě. Orientovány jsou paralelně s povrchem, podél hustě uspořádaných vláken kolagenu typu II a IX. Díky své vysoké integritě chrání povrchová zóna další vrstvy před mechanickým namáháním třením. Ve střední, přechodné, zóně se buňky zvětšují a jsou obléjší. V mezibuněčné hmotě jsou rozptýleny náhodně, stejně tak kolagenová vlákna jsou výrazně méně orientována. Střední vrstva představuje 40-60 % objemu chrupavky. V nejhlubších vrstvách jsou chondrocyty orientovány podél silných kolagenových vláken. Střední i hluboká vrstva jsou bohaté na proteoglykany a stojí za odolností chrupavčité tkáně k působení tlakových sil. Pod nejhlubší vrstvou je zóna kalcifikované chrupavky, která zajišťuje připojení chrupavky na kost přes kolagenová vlákna prostupující až do subchondrální kosti. V této vrstvě jsou buňky vzácné a hypertrofované^{36,34,37}.



Obrázek 2: Morfologie a rozložení chondrocytů závisí na tom, v jaké vrstvě chrupavky jsou přítomny. Převzato a upraveno podle ³⁸.

2.1.6.3 Mezibuněčná hmota

V chrupavce se fyziologicky nachází až 80 hmotnostních procent vody³³, která je vázána jednak v proteinech mezibuněčné hmoty, v menší míře v mezibuněčných prostorech a v pórech matrix³⁹. Koncentrace vody se v rámci chrupavky liší i v závislosti na zóně. V hlubokých vrstvách klesá až na 65 %. Jsou v ní rozpuštěny anorganické ionty a další živiny, které jsou difuzí předávány do okolní tkáně. Voda navíc napomáhá snížení tření na plochách kloubu a zajišťuje biomechanické vlastnosti chrupavky³⁹.

Nejdominantnější organickou složkou chrupavkové mezibuněčné hmoty je kolagen typu II, u fibrózní chrupavky kolagen typu I. Je doplněn dalšími až osmi typy kolagenu

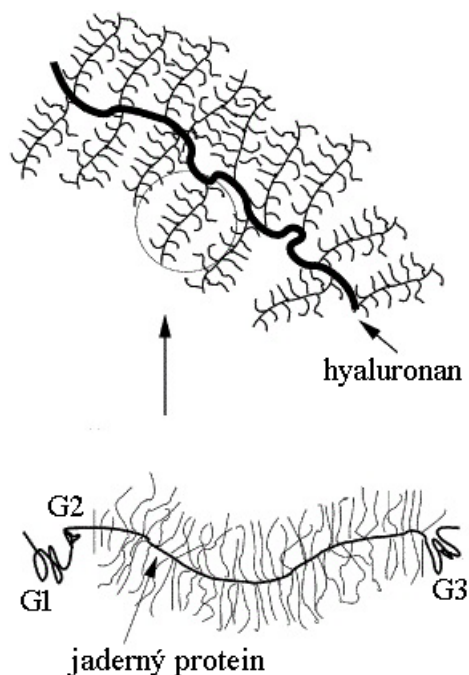
(například III, IV, V, VI, IX, XI a XII), které se minoritně podílí na stabilizaci struktury kolagenové sítě²². Obecně jsou kolageny zodpovědné za pružnost tkáně a vytvářejí síť, ve které mohou během dalšího vývoje botnat proteoglykany³⁴. Poruchy exprese kolagenních proteinů jsou spjaty s různorodými patologickými stavy, například se vznikem časně artrózy⁴⁰.

Kolagen typu II má sekundární strukturu α -helixu složeného ze tří totožných α řetězců. Je syntetizován chondrocyty především z glycinu, prolinu a hydroxyprolinu²². Nejprve je zahájena transkripce genu *COL2A1*, na níž navazuje translace řetězce pre-prokolagenu, který podstupuje postranlační modifikace na endoplazmatickém retikulu. Během nich je odstřižen signální peptid na N-terminální doméně, dochází k hydroxylaci lysinových a prolinových zbytků, jejímž kofaktorem je vitamín C a rovněž probíhá glykosylace hydroxylových skupin lysinu. Po těchto úpravách je prokolagen transportován do Golgiho aparátu, uzavřen do vezikulu a sekretován ven z buňky. V extracelulární matrix je dále upravován peptidázami a lysyl oxidázami a za vzniku řetězců tropokolagenu, které prostřednictvím kovalentních vazeb tvoří kolagenová vlákna, mezi kterými následně dochází k síťování⁴¹. Syntéza ostatních typů kolagenu probíhá obdobně. Kolagen X je typicky přítomen v hlubokých vrstvách, je asociován s přítomností hypertrofických chondrocytů a pravděpodobně se účastní mineralizace tkáně^{42,43}. Ostatní typy kolagenu jsou v tkáni rovněž přítomny, nicméně jak již bylo uvedeno, jen v nízkých koncentracích.

Druhou největší skupinou makromolekul chrupavkové ECM jsou glykosylované proteiny proteoglykany a glykosaminoglykany. Základní stavební jednotkou proteoglykanu je centrální protein, na nějž jsou navázány řetězce monosacharidů. Vzájemně se odpuzují stejným nábojem a vytvářejí tak kartáčovitou strukturu. Glykosaminoglykan je tvořen nevětvenými polysacharidovými podjednotkami spojenými glykosidovou vazbou. Proteoglykan je ke glykosaminoglykanu připojen vazbou serinového zbytku centrálního proteinu na tetrasacharid (GlcA-Gal-Gal-Xyl)⁴⁴. Kloubní chrupavka obsahuje glykosaminoglykany hyaluronan, keratan sulfát a chondroitin sulfáty a proteoglykany agrekan, dekorin, biglykan a fibromodulin⁴⁵. Nejvýznamnější i největší z proteoglykanů je agrekan. Přes vazebný protein má schopnost interakce s kyselinou hyaluronovou. Jedná se o velmi silnou vazbu, která za fyziologických podmínek nedisociuje a umožňuje vznik velkých agregátů obsahujících až 100 monomerů. N-terminální (G1 a G2) a C-terminální (G3) globulární domény agrekanu se od sebe liší svou funkcí (Obrázek 3). V dospělé kloubní chrupavce dochází pravděpodobně následkem proteolytického štěpení při přestavbě matrix až k 50% úbytku G3 domén⁴⁶. Malé neagregující proteoglykany jsou charakterizovány svou

schopností interakce s kolageny. Strukturou proteinů se velmi podobají agrekanu, namísto kyseliny hyaluronové však obsahují například dermatan sulfát (dekorin, biglykan) nebo keratan sulfát (fibromodulin)³⁴.

Minoritní zastoupení v ECM chrupavky mají nekolagenní proteiny, jejichž funkce je ne vždy plně charakterizována. Obecně se podílí na zachování makromolekulární struktury mezibuněčné hmoty a na jejich interakcích s buňkami^{44,34}. Do této skupiny patří fibronektin, tenascin, COMP (z anglického cartilage oligomeric protein).



Obrázek 3: Struktura agrekanu. Glykosaminoglykany navázané na jaderný protein spolu tvoří molekulu agrekanu. Přes G1 doménu se agrekan váže na hyaluronan a vytváří tak typickou kartáčovitou strukturu. Převzato a upraveno podle ⁴⁷.

2.1.6.4 Biomechanika

Ve vodném prostředí mají proteoglykany díky svým karboxylovým a sulfátovým skupinám záporný náboj. Vzájemně se odpuzují a rozprostírají se tak do velkého objemu. V mezibuněčné hmotě chrupavky jsou však prostorově limitovány kolagenovými vlákny, která jim kladou odpor. Pokud je tkáň stlačena, jsou negativně nabitě komponenty agrekanu tisknuty k sobě, což zvyšuje jejich vzájemné odpudivé síly a přispívá to tak k tuhosti tkáně v tlaku⁴⁸. Pokud je kolagenová síť porušena, například následkem traumatu, agrekan je uvolněn a při kompresi tedy nemůže správně reagovat. Ze stejného důvodu by v tomto směru nebyly stejně efektivní neagregované proteoglykany - nemohou být v ECM tak snadno imobilizovány a tudíž by takovou měrou nepřispívaly k její pružnosti. Je tedy zřejmé, že biomechanické vlastnosti chrupavky přímo závisí na její kompozici. Pevnost v tlaku je

lineární funkcí celkového obsahu glukosaminoglykanů⁴⁹. Na druhou stranu nijak nekoreluje s obsahem kolagenů.

Mechanické vlastnosti chrupavky jsou velmi těsně vázány i na průchod vody tkání. ECM se chová jako houba – při mechanickém zatížení z ní je voda vytlačována, při uvolnění je naopak nasávána zpět. Tento poznatek vedl k vytvoření tzv. bifazického modelu chrupavky, kdy je na tkáň nahlíženo jako na směs buněk, proteinů a lipidů v kapalině, která kolem nich může volně proudit. Čím více kapaliny je v tkáni, tím má nižší tuhost a je více permeabilní⁵⁰. Pokud by totiž permeabilita zůstávala konstantní nezávisle na míře deformace, pevná fáze tkáně by po vytlačení kapaliny byla velmi náchylná poranění.

Vztahy mezi mechanickými vlastnostmi a obsahem vody pomáhají vysvětlit změny v tkáni chrupavky, ke kterým dochází v průběhu artrózy. V degradující chrupavce se nejprve začne snižovat koncentrace proteoglykanů, čímž vznikají nové prostory usnadňující proudění vody. Voda je tak z ECM snadněji vytlačena, pevná fáze se tedy poškozuje při výrazně nižším zatížení a rychleji než za fyziologických podmínek. Zvýšená permeabilita navíc negativně ovlivňuje syntetickou aktivitu chondrocytů⁵¹.

2.1.6.5 Patologie

Hlavními patologiemi chrupavky jsou artróza a následky traumatických stavů. Charakteristickým rysem artrózy je rozpraskání hladkého povrchu kloubní chrupavky a její celkové rozrušení. Degenerativní procesy začínají v superficiální zóně a postupně se šíří až k subchondrální kosti. V dalších fázích dochází ke vzniku osteofytů, zánětu kloubního obalu, degeneraci menisku a ztenčování subchondrální kosti⁵². Všechny tyto projevy jsou důsledkem postupné degenerace a mechanického opotřebení tkáně. Přičemž se zdá, že tahové a smykové napětí mají ve vzniku artrózy různou roli. Tahové napětí způsobuje podélné praskliny, zatímco smykové napětí vede k formaci vláknitých defektů⁵³. Jak již bylo zmíněno výše, typické je snížení koncentrace kolagenu a proteoglykanů v ECM a zvýšení obsahu vody. Chondrocyty během degenerace tkáně procházejí fází proliferace, katabolismu a na závěr buněčnou smrtí. Chondron se remodeluje a pericelulárně se snižuje koncentrace kolagenu. Následně buňky proliferují, aby zaplnily nově vzniklé prostory v matrix⁵⁴. Apoptická aktivita je indukována pravděpodobně kombinací reaktivních kyslíkových radikálů, mechanickým poškozením buňky a působením cytokinů uvolňovaných jako reakce na předchozí faktory⁵⁵. Klinicky se artróza projevuje především bolestí, snížením pohyblivosti, loupáním v kloubech a ztuhlostí. Jedná se tedy o stav, který významně snižuje kvalitu života pacientů. Rizikovými faktory vzniku jsou věk, ženské pohlaví, úrazy kloubu, abnormální biomechanika kloubu, genetické predispozice a obezita⁵³. Světová zdravotnická

organizace odhadla, že symptomatickou artrózou trpí až 9,6 % mužů a 18 % žen nad 60 let. Z nich je až 80 % pohybově limitováno. Aktuálně neexistuje žádný preparát pro prevenci ani léčbu, který by řešil přímo příčinu vzniku artrózy.

Úrazy chrupavky jsou obvykle úzce spjaty s následným rozvojem artrózy. Jedná se o různě závažná poranění od mikrofraktur až po osteochondrální defekty. Mikrofraktury zahrnují pouze poškození kolagenové sítě a zhoršení biomechanických vlastností chrupavky, vzhledem k absenci nervových zakončení je takový úraz nebolestivý. Osteochondrální defekt oproti tomu zasahuje až do inervované kosti. Často při něm dochází i k narušení krevních cév a tzv. krvácení chrupavky.

2.1.6.6 Regenerace

V relativně nedávné době panovalo přesvědčení, že savčí chrupavka má nulovou regenerační kapacitu. Bylo však ukázáno, že u myši je míra schopnosti regenerovat kloubní chrupavku dědičná a závislá na aktivitě specifických genů⁵⁶. Obecně vzato je však spontánní regenerace chrupavky velmi problematická vzhledem k jejím fyziologickým vlastnostem. Především postrádá zásobení krevními cévami, jejichž vrůstání do tkáně se aktivně brání produkcí anti-angiogenních molekul. Patří mezi ně například trombospondin-1 a chondromodulin-1⁵⁷. Expanzi cév navíc brání i kalcifikované vrstvy na hranici chrupavky a kosti, kterých s rozvojem artrózy přibývá.

Regenerační procesy zajišťuje souhra buněk a mezibuněčné hmoty. Nejprve dochází k aktivaci chondrocytů jejich uvolněním z ECM. Aktivované buňky začnou produkovat kyslíkové radikály, které dále rozrušují mezibuněčnou hmotu⁵⁸ a následně migrují do oblastí uvolněných chondrocyty se zachovanou proliferační kapacitou, kde započnou proces regenerace⁵⁹. Nejsnadněji chrupavka regeneruje v povrchové zóně. Čím hlouběji zasahuje poškození, tím komplikovanější je jeho reparace. Experimentální zvířecí modely ukazují, že po akutním traumatu jsou spuštěny obdobné molekulární mechanismy jako ve všech ostatních tkáních – aktivace proteáz a sekrece růstových faktorů⁶⁰.

V případě chrupavky je odpovídající signalizace započata změnami v mechanickém působení na chondrocyty, které pak reagují aktivací povrchových integrinových receptorů a iontových kanálů^{61,62}. Následkem narušení ECM jsou rovněž uvolněny růstové faktory, které v ní jsou za fyziologických podmínek vázány na proteoglykany. Jedná se především o FGF, IGF, TGF- β a BMP rodinu⁶².

2.1.6.7 Růstové faktory v chondrogenezi

Růstové faktory jsou obecně molekuly stimulující proliferaci, hojení a diferenciaci. Obvykle se jedná o peptidy, které se specificky váží na povrchové receptory buněk a spouštějí tak intracelulární signalizační dráhy. V souvislosti s chondrogenní diferenciací jich byla identifikována celá řada. Mezi nejintenzivněji zkoumané patří TGF- β , rodina BMP, FGF, IGF-1 a proteiny hedgehog a wingless²². V následujících podkapitolách budou popsány jednotlivé rodiny včetně základního popisu molekulárně-biologického principu signalizačních kaskád.

TGF- β rodina obsahuje samotný TGF- β , BMP, aktiviny a inhibiny. Za fyziologických podmínek je TGF- β 1, 2 a 3 přítomen ve velmi nízkých koncentracích. Všechny tři typy jsou nicméně považovány v primárních chondrocytech za významné stimulační biomolekuly s ohledem na syntézu proteoglykanů a kolagenu typu II^{25,63}. *In vitro* byla u všech prokázána schopnost stimulovat chondrogenezi mezenchymálních kmenových buněk⁶⁴. Po použití TGF- β 1 MSC exprimovaly transkripční faktor Sox9, syntetizovaly kolagen typu II a byla pozorována jejich kondenzace^{65,66}. Stejně tak *in vivo* výsledky potvrzují, že aplikace TGF- β 1 a TGF- β 3 může být nadějným přístupem v terapii kloubních defektů⁶⁷. Na druhou stranu byla zaznamenána i tvorba osteofytů a hyperplazie kloubu⁶⁸. BMP, ačkoli se primárně účastní vývoje kosti a jsou s ní i častěji spojovány, modulují expresi molekul chrupavkové extracelulární hmoty. BMP-2, -4 a -7 v *in vivo* aplikaci vedly k výrazně lepšímu hojení defektů kloubní chrupavky^{69,70}. Vzhledem k ontogenezi kosti, jejíž formaci předchází chrupavka, je zřejmé že BMP je zásadní i pro osteogenezi.

Růstové faktory rodiny TGF se váží na dimerický receptor skládající se ze dvou podjednotek. Komplex signálních molekul, který vzniká aktivací translokuje do jádra, kde interaguje s DNA a reguluje transkripci specifických genů. V případě chrupavky se pak jedná především o transkripční faktor Sox9, na jehož aktivitě závisí exprese všech downstream genů⁷¹.

FGF rodina obsahuje proteiny považované především za parakrinní regulátory zapojené do organogeneze a vývoje končetin během embryonálního vývoje. Jejich efekty byly potvrzeny poměrně nízkým počtem prací. Z hlediska chondrogeneze je nejvýznamnějším zástupcem FGF-2, který funguje pro buňky původem z mezenchymu rovněž jako mitogen. Kromě toho byl ukázán jeho pozitivní efekt na chondrogenezi lidských MSC, i když přesný mechanismus tohoto procesu není plně objasněn⁷². Dalším ukazatelem důležitosti FGF-2 v chondrogenních procesech jsou data získaná na myších modelech⁷³.

Bylo ukázáno, že aplikace FGF-2 oddaluje degradaci chrupavky a nástup artrózy. Zároveň u myši, kde byl gen pro tento růstový faktor deletován, byl výrazně urychlen spontánní rozvoj artrózy.

Fibroblastové růstové faktory se mohou vázat na čtyři typy buněčných receptorů, přičemž do následné signalizace jsou zapojeny kinázy ERK, MAP a JNK i komplex Ras s GTPázovou aktivitou. Kromě Sox9 pak dochází k transkripci RunX2 a Elk-1, což je osteogenní transkripční faktor, respektive obecný aktivátor transkripce^{74,75}.

IGF rodina obsahuje dva ligandy IGF-1 a IGF-2. IGF-1 zvyšuje expresi chondrogenních markerů a tím směřuje diferenciaci MSC do chrupavky^{76,77}. Zároveň je považován za zásadní molekulu pro udržení homeostáze chrupavky prostřednictvím stimulace syntézy proteoglykanů a viability chondrocytů⁷⁸. Při použití v terapii chondrálního defektu kritické velikosti byl IGF-1 s úspěchem aplikován u koní, kdy došlo k vyplnění defektu chondrocyty a ECM obsahující především kolagen typu II⁷⁹.

IGF receptor je exprimován na povrchu chondrocytů, osteoblastů a osteoklastů a má tyrosin kinázovou aktivitu. Navázání ligandu spouští intracelulární signální kaskády, které zahrnují MAP kinázu, MEK1/2 kinázu, ERK1/2 kinázu a PI3 kinázu⁸⁰ a vzájemně spolu interagují. V závislosti na zapojených intracelulárních molekulách je buňka buď směřována k apoptóze, expresi proteinů nebo aktivování transkripčních faktorů.

Hedgehog signalizace třemi typy vysoce konzervovaných proteinů – sonic, indian a desert hedgehog je známá především organizací tělního plánu během embryogeneze. V souvislosti s chondrogenní diferenciací se uplatňuje hlavně indian hedgehog. Spolu s dalšími molekulami koordinuje proliferaci a diferenciaci chondrocytů a osifikaci perichondria⁸¹.

Wnt/ β -katenin signalizace je poslední, která se v homeostázi chrupavky uplatňuje. Na myším modelu bylo ukázáno, že nekanonická dráha zajišťuje organizaci chondrocytů v růstové ploténce do sloupců, zatímco kanonická dráha může inhibovat počáteční fáze vývoje chrupavky⁸². Na základě analýzy lidského genomu se zdá, že Wnt signalizace je rizikovým faktorem rozvoje artrózy a mohla by tak být terapeutickým cílem⁸³.

2.1.6.8 Tkáňové inženýrství chrupavky

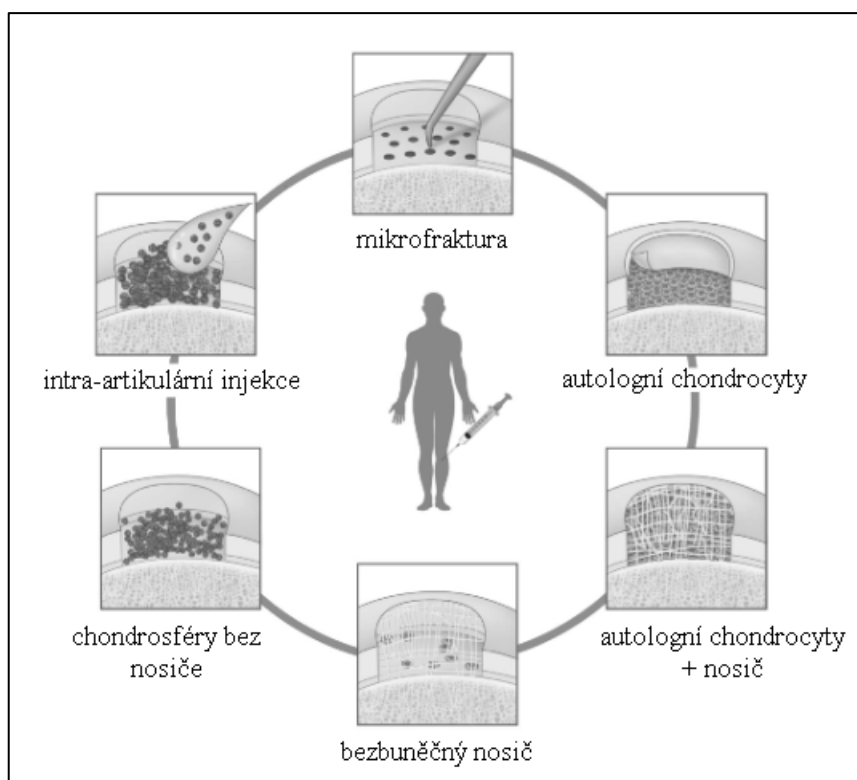
V tkáňovém inženýrství lze obecně uplatnit přístup založený na aplikaci buněk nebo bezbuněčnou terapii (shrnutí v Obrázek 4). Výraznou limitací a častým důvodem selhání implantace buněk do defektu je jejich neschopnost integrace do okolní tkáně. Buněčná

terapie zahrnuje využití dřev-stimulujících technik, tkáňové štěpy a implantaci buněk s chondrogenní kapacitou - chondrocytů nebo mezenchymálních kmenových buněk⁸¹. Kostní dřev-stimulující techniky jsou založeny na působení endogenních MSC a používá se pro léze menších rozměrů do 15 mm v průměru⁸⁴. Tyto artroskopické techniky zahrnují penetraci subchondrální kosti, čímž je umožněna infiltrace defektu buňkami a růstovými faktory z kostní dřevě. Po mikrofraktuře však často vzniká namísto hyalinní chrupavky vazivová chrupavka a navíc angiogenní faktory z kostní dřevě vedou spíše k indukci osteogeneze než chondrogenese⁸⁵. V devadesátých letech se jako tkáňový štěp využívaly pásy perichondria⁸⁶. Klinické výsledky však byly podobné mikrofrakturám a z dlouhodobého hlediska docházelo ke kalcifikaci implantátu⁸⁷. Mozaiková plastika kloubní chrupavky, kdy jsou z nezátěžové části kloubu přeneseny autologní osteochondrální štěpy do místa defektu, je naopak využívána poměrně hojně a má dobré subjektivní i klinické výsledky. Použití samotných autologních chondrocytů bylo zdokumentováno poprvé v roce 1984⁸⁸. Implantované chondrocyty však často postrádají syntetickou aktivitu a nejsou schopny se uspořádat do zón typických pro zdravou chrupavku⁸⁹. Zralé chondrocyty se podařilo izolovat kromě kloubní chrupavky i z nosní přepážky, ušního boltce nebo žeber⁹⁰. Chondrocyty však následně tvoří chrupavku se stejnou charakteristiku jako byla jejich zdrojová tkáň, nelze tedy použít buňky z boltce k implantaci do kloubní chrupavky, protože by nová tkáň nesplňovala biomechanické nároky⁹¹. Významnou komplikací aplikace buněk je nutnost jejich expanze na dostatečný počet. Chondrocyty jsou ve 2D kultuře velmi nestabilní a rychle dediferencují do fibrochondrocytárního fenotypu. Tento proces je spojen se ztrátou exprese mRNA chondrogenních markerů, například kolagenu typu II⁹². Dediferenciace však je reverzibilní přidáním chondrogenních suplementů do kultivačního media nebo kultivací v trojrozměrném prostředí^{92,93}. To se nicméně netýká chondrocytů od pacientů s artrózou. Zdá se, že kvůli změnám v metabolismu mají tyto buňky sníženou schopnost reagovat na induktivní chondrogenní signalizaci, a tudíž jsou pro transplantaci nevhodné⁹⁴. Izolace buněk z chrupavky je však zákrok, který s sebou nese morbiditu zdrojového místa a není tedy ideálním řešením ani pro zdravé dárce. Dediferenciaci chondrocytů ve 2D prostředí se dá předcházet i kondenzací buněk do chondrosfér⁹⁵, které jsou implantovány podobně jako tkáňový štěp. Na zvířecích modelech byla ověřena funkčnost tohoto přístupu a probíhají klinické studie⁸⁸. V porovnání s chondrocyty jsou mezenchymální kmenové buňky snadno dostupné i kultivovatelné. Nejvyšší výtěžnost je z kostní dřevě nebo tukové tkáně, v nižších počtech je možné je izolovat například z periferní krve⁹⁶. Jsou to buňky s potenciálem diferencovat do mezodermální linie, jejichž

funkcí v organismu je obnova poškozených tkání a regulace imunitních odpovědí. Jejich velkou výhodou je žádná nebo velmi nízká exprese MHC I a II a tedy absence odmítavé reakce imunitního systému⁹⁷. MSC původem z tukové tkáně byly v alginátovém konstruktu nejprve kultivovány v chondrogenním mediu a následně implantovány myším⁹⁸. Po dvanácti týdnech *in vivo* podmínkách buňky exprimovaly signifikantní množství molekul chrupavkové matrix. Stejně tak byly s úspěchem využity autologní MSC z kostní dřene u pacientů. Byly inkorporovány do kolagenového gelu a vloženy do defektu chrupavky. Defekty byly po 12-27 měsících vyplněny vazivovou chrupavkou a pacienti udávali zlepšení klinických příznaků, schopnosti pohybu i úlevu od bolesti⁹⁹.

Buňky obojího typu mohou být aplikovány v suspenzi nebo na nosiči. V obou případech jsou však manipulovány mimo tělo pacienta a existuje tak riziko narušení regulačních mechanismů a vzniku nekontrolovaného dělení. Proto je buněčná terapie poměrně riskantní a měla by podléhat přísně nastaveným pravidlům. Navzdory pozitivním výsledkům není ideálním řešením. Nese s sebou vedlejší efekt invazivního odběru buněk – v případě autologního transplantátu, nebo riziko odmítavé reakce imunitního systému – při použití buněk dárce.

Stejně tak byly zaznamenány negativní i pozitivní výsledky při bezbuněčné terapii. Ta spočívá v aplikaci nosiče do místa defektu. Mezi používané přírodní materiály patří kolagen, fibrin, alginát, agaróza, kyselina hyaluronová, chitosan a celulóza⁸¹. Ze syntetických polymerů jde o kyselinu poly-mléčnou, poly-glykolovou a jejich kopolymer, poly-ε-kaprolakton, polyvinylacetát, polyuretany, teflon a dakron^{81,100}. Obvykle se jedná o materiály schopné tvořit hydrogel, který je biomechanicky velmi podobný fyziologickým vlastnostem chrupavkové ECM. Významné omezení při vkládání bezbuněčného nosiče do defektu vychází z přirozených vlastností chondrocytů. a to z jejich velmi nízké kapacity proliferovat a migrovat. Aby byl nosič osídlen dostatečným počtem buněk, je třeba narušit chrupavku až na subchondrální kost, která je vaskularizovaná. Tím se sice do rány vyplaví i kmenové buňky a dostatek růstových faktorů pro zahájení regenerace, ale zároveň se často rozvíjí patologická zánětlivá reakce, která může vést k artritickým změnám.



Obrázek 4: V tkáňovém inženýrství chrupavky lze uplatnit bezbuněčný přístup i buněčnou terapii. Mikrofraktura zahrnuje rozrušení chrupavky až na subchondrální kost. Poté může být vložen samotný nosič, nosič obsahující buňky nebo mohou být implantovány buňky bez nosiče. Převzato a upraveno podle¹⁰¹.

Nosiče z kolagenu patří mezi nejčastěji používané. Jednak proto, že kolageny se přirozeně vyskytují v pojivových tkání a vytváří tedy buňkám blízké prostředí a také proto, že kolagenový nosič je degradovatelný buněčnými enzymy a postupem času může být plně nahrazen novou tkání. Bezbuněčná kolagenová matrice implantovaná do osteochondrálního defektu u králíka významně zlepšila spontánní regenerační procesy tkáně a indukovala formaci hyalinní chrupavky¹⁰². Kolagenové nosiče jsou biokompatibilní a mohou být tedy před implantací osazeny chondrocyty nebo ~~mezenchymálním~~ kmenovými buňkami^{103,104}. Úspěšnost aplikace takového nosiče se odvíjí i od velikosti pórů. Proces regenerace byl *in vivo* v myším modelu lépe navozen relativně malými póry nepřesahujícími 250 μm . Nasazené chondrocyty osm týdnů po implantaci osídlily celý objem nosiče a syntetizovaly kolagen typu II a agrekan¹⁰⁵. Důležitou vlastností nosiče je i schopnost kontrakce a agregace buněk. Právě přítomnost těsných mezibuněčných spojů totiž je jeden z faktorů navození chondrogenese. Vzhledem k tomu, že vyšší míra agregace buněk byla dosažena u nedenaturovaného proteinu, je třeba dbát na zachování přirozené helikální struktury kolagenu. o vhodnosti kolagenových nosičů pro aplikaci v regenerativní medicíně svědčí i fakt, že na trhu je celá řada komerčních materiálů využívaných v klinické praxi¹⁰⁶.

Buňky s vlákny kolagenů typu I a II interagují buď $\alpha_{10}\beta_1$ integriny přes GFOGER a GROGER vazebné sekvence, neintegrinovým receptorem DDR-2 nebo přes annexin V^{107,108}. Integrinová vazba stimuluje proliferační aktivitu chondrocytů, aniž by výrazně ovlivnila jejich chondrogení aktivitu. Interakce s kolagenem přes annexin zvyšuje příjem kalciových iontů buňkou, což naznačuje roli této signalizace v endochondrální osifikaci¹⁰⁹. Zapojení neintegrinové signalizace přes DDR-2 spouští expresi metaloproteináz a prozánětlivých cytokinů, což jsou molekuly účastníci se remodelace chrupavkové ECM¹¹⁰. Benefity kultivace chondrocytů v kolagenovém gelu jsou obzvlášť patrné při srovnání s vlastnostmi stejných buněk ve 2D kultuře na plastu. Při 3D kultivaci si buňky zachovávají kulovitou morfolonii i schopnost sekrece proteoglykanů a kolagenu typu II. Diskutován je možný vliv kolagenu typu I na destabilizaci chondrocytárního fenotypu. Tento efekt je však pozorován hlavně u gelů o koncentracích nad 1 g/ml¹⁰⁶. Při použití mezenchymálních kmenových buněk stimuloval kolagen typu I i II adhezi i chondrogenezi. Interakce s kolagenem typu II však vedla k vyšší expresi mRNA chondrogeních markerů a rovněž k sekreci většího množství složek extracelulární hmoty¹¹¹.

Kyselina hyaluronová je rovněž makromolekula, která se fyziologicky vyskytuje v extracelulární matrix chrupavky¹¹². Aby byla biokompatibilní, je třeba ji modifikovat síťováním¹¹³. Je přirozeně odbourávána hyaluronidázami, nicméně její metabolity mohou v chrupavce spustit degradační mechanismy¹¹⁴. MSC v hyaluronanovém nosiči výrazně zlepšily hojení defektu a formaci chrupavky u psů¹¹⁵. Pokud byla kyselina hyaluronová aplikována pacientům s artrózou, byl zaznamenán antioxidační a protizánětlivý efekt a tlumila expresi mediátorů bolesti¹¹⁶. Do klinické praxe je uveden Hyalograft® C, tkáňový štěp založený na kyselině hyaluronové kombinované s autologními chondrocyty, po jehož aplikaci udávalo až 97 % pacientů výrazné subjektivní zlepšení hybnosti kolene a kvality života¹¹⁷.

Fibrinové nosiče vznikají polymerací fibrinogenu za přítomnosti trombinu¹¹⁸. Obě molekuly jsou fyziologicky přítomny v organismu a účastní se přirozených reparačních procesů, po jejichž ukončení je fibrin degradován extracelulárními enzymy. Fibrin má konzistenci gelu a podporuje spontánní hojení chrupavky, je tak dalším vhodným materiálem pro výplň jejích defektů. Při aplikaci fibrinového lepidla *in vivo* se však často objevují komplikace spojené s jeho nízkou mechanickou stabilitou a se ztrátou objemu výplně defektu¹¹⁹. Navzdory tomu byly po aplikaci fibrinu zaznamenány i pozitivní výsledky, a to především pokud byl kombinován s buňkami^{120,121}. Docházelo k formaci nové

chrupavkové tkáně s vysokým obsahem proteoglykanů a kolagenu II a ke snížení bolestivosti při pohybu¹²².

Agaróza a alginát jsou biokompatibilní polysacharidy, nejsou imunogenní a vzhledem ke své tuhosti a funkčním skupinám podporují buněčnou adhezi a proliferaci¹²³. Použitím různých koncentrací lze také snadno upravovat Youngův modul[1] tak, aby odpovídal fyziologické chrupavce. Obě látky jsou však vhodné především pro *in vitro* testování nosičů v trojrozměrné matici, a to vzhledem k problematickému odbourávání v organismu. V *in vitro* podmínkách indukují chondrogenní diferenciaci u mezenchymálních kmenových buněk^{124,125}. Přestože agaróza i alginát *in vivo* inhibují spontánní reparační mechanismy¹²⁶, po enkapsulaci autologních lidských chondrocytů do kombinovaného nosiče a implantaci do defektu došlo u pacientů ke zlepšení klinických příznaků a zhojení hyalinní chrupavkou¹²⁷.

Chitosan je lineární polysacharid tvořený částečně deacetylovanými podjednotkami chitinu¹²⁸, který je získáván z kutikuly členovců nebo z buněčných stěn hub. Chitosanové nosiče jsou běžně využívány pro enkapsulaci a kultivaci buněk¹²⁹. Mají strukturu velmi podobnou chrupavkovým glykosaminoglykanům a jsou tak vhodné pro podporu proliferace chondrocytů a syntézy složek ECM^{130,131,132}. *In vivo* je však chitosan často kombinován s dalším biomateriálem – například s alginátem, kolagenem nebo kyselinou hyaluronovou^{133,134}, za účelem zlepšení biokompatibility a podpoření jeho chondrogenních schopností. Pro aplikace v humánní medicíně se však chitosan zatím nevyužívá.

Celulóza je ve vodě nerozpustná látka tvořená podjednotkami glukózy. Má četné hydroxylové skupiny, díky nimž je snadno modifikovatelná a může tvořit biokompatibilní hydrogely s různou strukturou a vlastnostmi. V organismu navíc nejsou přítomny enzymy, které by ji degradovaly a odpadá tak možnost indukce sekrece prozánětlivých cytokinů jejími metabolity. Chondrocyty po nasazení na celulóзовou membránu proliferovaly a byly stimulovány k syntéze kolagenu typu II¹³⁵. Stejně tak byl zaznamenán pozitivní efekt na chondrogenezi lidských mezenchymálních kmenových buněk, které exprimovaly mRNA chondrogenních markerů Sox9, kolagenu II a agrekanu¹³⁶. Celulóza je běžně používána v *in vitro* podmínkách. Nicméně jak bylo zmíněno výše, *in vivo* je neodbouratelná, a tudíž prakticky nepoužitelná. Materiály přírodního původu jsou často kombinovány se

1 Youngův modul udává poměr mechanického napětí v tahu a prodloužení na základě působícího napětí, $E = \delta/\epsilon$. Podrobněji bude vysvětlen v kapitole zabývající se biomechanickými vlastnostmi kosti.

syntetickými polymery. Vzájemně si tak modulují své vlastnosti, aby byly co nejbližší přirozené chrupavce. Injikovatelný hydrogel tvořený kombinací oxidované karboxymethyl celulózy a želatiny se dobře integroval do chrupavky v kožím modelu a podporoval migraci a proliferaci chondrocytů nasazených na jeho povrchu¹³⁷.

Poly-ε-kaprolakton (PCL) je biokompatibilní a biodegradabilní syntetický polymer. Jeho viskoelastické vlastnosti, nenáročná příprava a možnost funkcionalizace bioaktivními látkami z PCL činí biomateriál s velkým potenciálem využití v tkáňovém inženýrství. Bezpečnost použití tohoto polymeru v mnoha oblastech biomedicíny byla potvrzena četnými studiemi¹³⁸. Lidské mezenchymální kmenové buňky byly na PCL nosiči schopné exprimovat chondrogenní geny a při histologickém hodnocení byly vzorky pozitivní na kolageny I a II^{139,140}. Nosiče s obsahem PCL podporovaly udržení fenotypu i proliferační aktivitu primárních prasečích chondrocytů¹⁴¹. PCL je sám o sobě biokompatibilní a vhodný pro růst buněk. Nicméně s ohledem na diferenciaci lze dosáhnout lepších výsledků při kombinaci s jiným syntetickým nebo i přírodním polymerem. Například s PVA, PLA, chitosanem, želatinou, kyselinou hyaluronovou nebo kolagenem¹⁴².

Kyselina poly-mléčná je alifatický polyester, který je v organismu hydrolyticky degradován za vzniku částečně cytotoxických metabolitů¹⁴³, které indukují imunitní odpověď. PLA nosiče se submikronovou morfologií připravené metodou 3D tisku byly osazeny lidskými chondrocyty¹⁴⁴. Po dvou týdnech *in vitro* kultivace měly buňky stále kulovitou morfologii, což svědčí i o zachování syntetické aktivity a schopnosti formovat novou tkáň chrupavky. PLA se běžně kombinuje s kyselinou poly-glykolovou PGA. PGA je nejjednodušší lineární polyester a stejně jako PLA je degradována hydrolýzou, je ještě o něco hydrofilnější a tedy méně stabilní. PGA sama o sobě vykazuje pozitivní efekty na chondrogenезi *in vitro*, kdy v rámci dynamické kultivace bylo dosaženo významné syntézy kolagenu II¹⁴⁵, a *in vivo* především na králičím modelu při terapii defektu kloubní chrupavky¹⁴⁶. Bezbuňkový nosič z kopolymeru PLA a PGA byl implantován do osteochondrálního defektu u králíka¹⁴⁷. Byla zaznamenána vyšší depozice glykosaminoglykanů a hyalinní chrupavky než u kontrolní skupiny – prázdného defektu. Pro aplikaci v humánní medicíně se využívá BioSeed®-C, jenž kombinuje polymery s autologními chondrocyty z kloubu¹⁴⁸. Po implantaci byla indukována syntéza hyalinní chrupavky a signifikantně zlepšeno klinické hodnocení pacientů.

Polyethylenglykol PEG je relativně inertní polyether, který po zesíťování tvoří hydrogel. Stejně jako ostatní syntetické polymery může být snadno biologicky modifikován,

například přídavky TGF- β 1 nebo BMP-2¹⁴⁹, a mechanické vlastnosti kontrolovány množstvím síťovacího činidla i koncentrací samotného PEG¹⁵⁰.

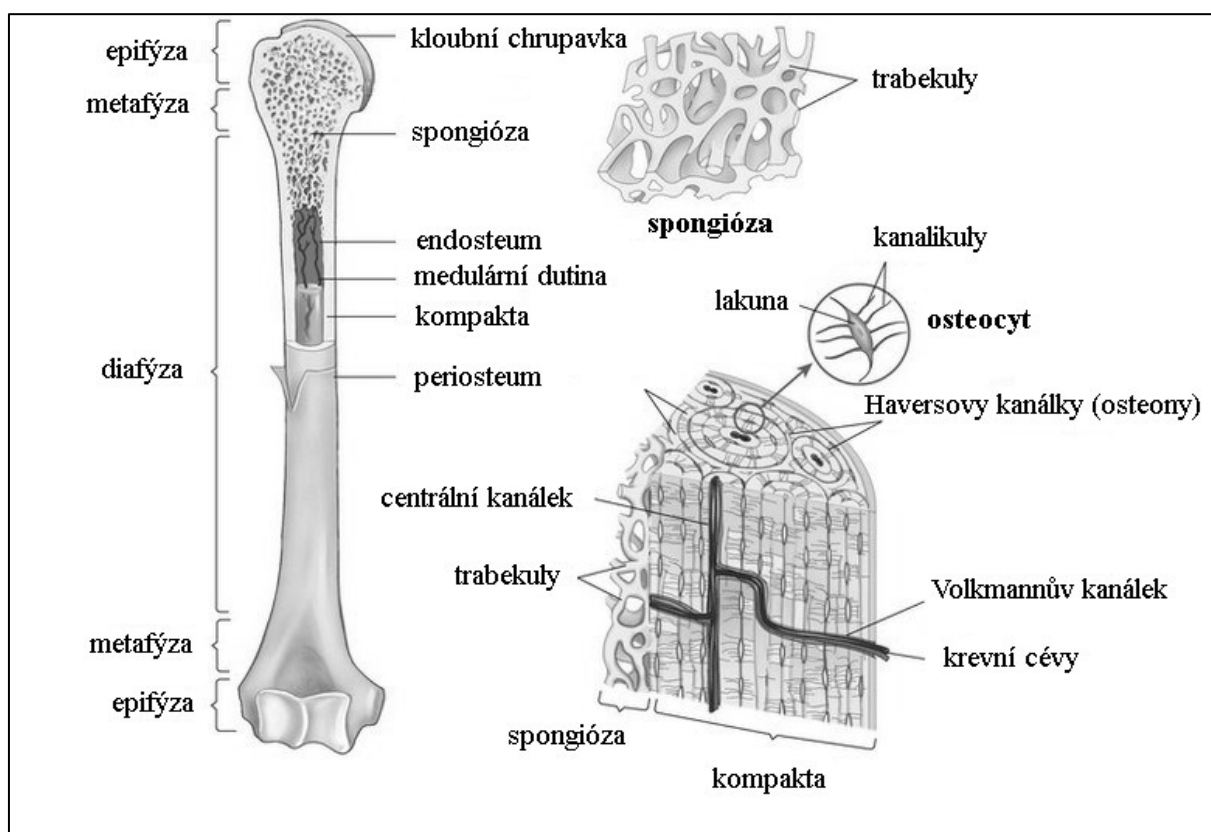
Polyvinylalkohol vzniká hydrolytickým odštěpením acetylových skupin z polyvinylacetátu a je rozpustný ve vodě, nikoli v organických rozpouštědlech. Vzhledem ke snadné degradovatelnosti je třeba PVA nosiče před biologickou aplikací určitými způsoby stabilizovat. Lze použít mnohá chemická síťovací činidla, síťování mražením nebo přídavky dalších polymerů. Po inkorporaci suspenze chondrocytů do PVA hydrogelu si buňky zachovaly schopnost syntézy chondrogenních markerů, což bylo ověřeno rt-PCR, a nově syntetizovaná extracelulární hmota byla pozitivní na proteoglykany¹⁵¹. Implantace tohoto nosiče s autologními chondrocyty do kloubní chrupavky králíka vedla k formaci hyalinní chrupavky. Kombinace PVA pěny s PEG a chondroitin sulfátem nebo kyselinou hyaluronovou zabránila dediferenciaci chondrocytů při *in vitro* kultivaci včetně zachování exprese chondrogenních genů¹⁵².

Hybridní nosiče jsou částečným řešením omezujících vlastností jednotlivých biomateriálů. Kombinují v sobě výhody syntetických i přírodních materiálů a mají tedy velmi dobré mechanické i biologické vlastnosti. Výsledky v *in vivo* experimentech byly u některých typů nosičů natolik pozitivní, že se přistoupilo k testování v klinických studiích a případně ke komerčnímu použití. Chondrotissue (Biotissue) na bázi PGA a kyseliny hyaluronové^{153,154} je vstřebatelná membrána, která je před aplikací obohacena o autologní plasmu s destičkami. Byla zaznamenána regenerace kloubní chrupavky, která se klinicky projevila zlepšenou pohyblivostí a úlevou od bolesti. Porézní nosič z PLGA a kolagenu se vyznačuje vysokou mírou vnitřní propojenosti pórů a mechanickými vlastnostmi blízkými chrupavce. Po osazení kloubními chondrocyty a implantací do myšího modelu podporoval chondrogenní procesy v defektu od genové exprese po syntézu nové chrupavkové tkáně s odpovídající biomechanikou¹⁵⁵. Pomocí lidských mezenchymálních kmenových buněk z tukové tkáně byl testován hybridní nosič ze želatiny a PCEC (PCL-PEG-PCL), jednalo se o pěnu obohacenou o TGF- β 1 připravenou lyofilizací. Buňky vykazovaly zvýšenou expresi mRNA chondrogenních markerů agrekanu a kolagenu typu II a jejich extracelulární hmota byla pozitivní na glykosaminoglykany¹⁵⁶.

2.1.7 Kost

Kost, neboli osifikovaná tkáň, má dvě hlavní složky extracelulární hmoty, organickou a anorganickou. Organická složka je tvořena, stejně jako u ostatních pojivových

tkání, především kolagenovými a elastinovými vlákny a dává kostem flexibilitu. Anorganickou složku tvoří minerální látky, především soli vápníku, a díky ní je tkáň tvrdá a křehká¹⁵⁷. Hlavní funkcí kostry je mechanická opora těla, upínají se na ni svaly a umožňuje tak pohyb, chrání vnitřní orgány, je místem tvorby krve a zajišťuje udržení rovnováhy minerálů v organismu prostřednictvím depozice vápníku a fosforu. Jedná se o funkčně i strukturně velmi dynamickou tkáň, do jejíhož metabolismu jsou zapojeny jak interní vlivy tkáně, tak i vnější signály organismu. Buňky kostní tkáně jsou trojího typu - osteoblasty a osteocyty, které se účastní syntézy kostní matrix a v pozdějším vývoji jsou v ní uzavřeny, a osteoklasty zajišťující odbourávání kosti a přítomné především v povrchových vrstvách¹⁵⁸. Kostní tkáň může být spongiózní (trabekulární) nebo kompaktní (kortikální). Liší se od sebe morfologií, mechanickými vlastnostmi a lokalizací v rámci kostí (Obrázek 5). Kompakta je v diafýzách dlouhých kostí a na povrchu plochých kostí. Spongióza oproti tomu vyplňuje epifýzy¹⁵⁹.



Obrázek 5: Kostní hmota je dvojího typu, spongióza nebo kompakta. V rámci dlouhých kostí je spongióza lokalizována v epifýzách a kompakta v diafýzách. Spongiózní tkáň je tvořena trabekulami, kompaktní tkáň Haversovými systémy. Převzato a upraveno podle ¹⁶⁰.

2.1.7.1 Formace

Kostra je mezodermálního původu. Začíná se vyvíjet mezi šestým a sedmým týdnem embryonální fáze a její formování je ukončeno po dvacátém roce života. Růst kostí obecně

závisí na genetických predispozicích, výživě, hormonálních hladinách a mechanické námaze tkáně. Jeho rychlost není v celém objemu kosti konstantní. Záleží na směru působení mechanických sil. Do délky kosti rostou v růstové ploténce na hranici mezi epifýzou a diafýzou, kde je zachovaná proliferační aktivita chondrocytů. Do šířky pak v povrchových vrstvách pod periosteem¹⁶¹. Z hlediska vývoje lze kosti dělit na vznikající enchondrální osifikací a intramembranózní osifikací. Enchondrální osifikací vzniká většina kostí kromě horní a spodní čelisti a kostí lebky, které se formují intramembranózní osifikací. Při enchondrální osifikaci mezenchymální kmenové buňky nejprve kondenzují a diferencují v chondrocyty syntetizující chrupavkovou ECM, která je následně mineralizována a nahrazena kostí. Při intramembranózní osifikaci kmenové buňky nejprve diferencují přímo do osteoblastů, které syntetizují kolagenová vlákna, v nichž se později ukládá mineralizace¹⁶².

Enchondrální osifikace zahrnuje stadium rychlé proliferace chondrocytů a tvorbu chrupavkového templátu ve tvaru budoucí kosti, který je na ni v dalším vývoji přestavěn. Chondrocyty v centru templátu hypertrofují a začnou syntetizovat kolagen typu X a fibronektin, což je krok umožňující počátek mineralizace. Depozice minerálních látek v extracelulární hmotě brání difuzi živin k buňkám, které tak započnou apoptózu. Uvolňování stresových biomolekul a nové volné prostory v matrix indukují, respektive umožňují, vrůstání krevních cév. Krevním řečištěm mohou do vzniklých dutinek migrovat progenitory kostních buněk, osidlovat je a po obvodu nově formovaného periosteua vytvářet vrstvičku kompaktní kosti. V diafýzách vzniká primární osifikační centrum a po narození se stejný proces opakuje v epifýzách, čímž se formuje centrum sekundární. Jak již bylo zmíněno, na hranici epifýz se nachází růstové ploténky. Jsou to oblasti, kde dochází k proliferaci chondrocytů a prodlužování kostí. Na základě funkčních charakteristik lze odlišit několik zón. Nejbližší epifýzám je proliferační zóna, kde dochází k rychlému dělení chondrocytů, které dále dozrávají a vytvářejí oblast hypertrofie. Během dozrávání chondrocyty začnou produkovat složky extracelulární hmoty, v nichž se může ukládat kalcifikace a vzniká primární spongióza. Na hranici s diafýzou je osifikační zóna, kde nově diferencované osteoblasty tvoří osteoid – dočasnou kostní tkáň, která je rychle plně mineralizována^{161,162,163}.

Intramembranózní osifikace obnáší přímou diferenciaci kostních buněk z mezenchymálních progenitorů. Osteoblasty následně klastrují do osifikačního centra a tvoří osteoid, jehož mineralizace vede k uzavření buněk do ECM a terminální diferenciaci do osteocytů. Rozrůstáním osteoidu jsou do mezibuněčné hmoty uzavřeny také krevní cévy,

kteře se vyvíjejí do červené kostní dřene. Naopak na povrchu nově vznikající kosti syntetizují mezenchymální kmenové buňky periosteum. Pod ním je kostní tkáň postupně ukládána do vrstev a vzniká tak kompakta^{162,163}.

2.1.7.2 Buňky a struktura tkáňe

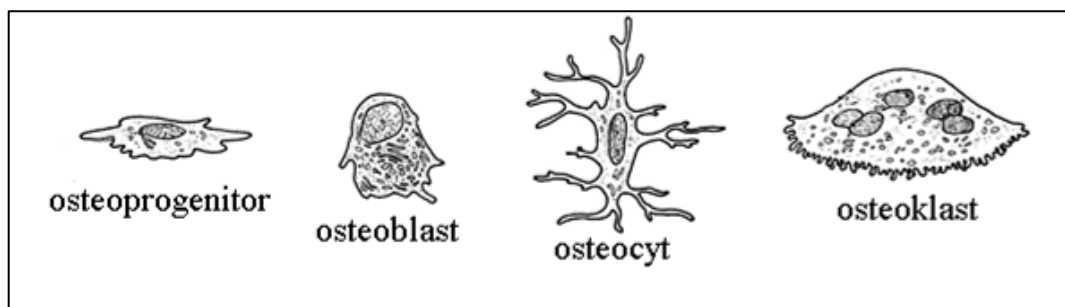
Základní stavební jednotkou kompaktní tkáňe je osteon neboli Haversův systém. Skládá se z lamel kostní matrix koncentricky uspořádaných kolem Haversova kanálku, jímž procházejí krevní a lymfatické cévy a nervy. Mezi jednotlivými lamelami jsou v lakunách uloženy osteocyty, jejichž výběžky zasahují do centrálního kanálku a mohou tak být zásobovány živinami a kyslíkem¹⁵⁹.

Pravděpodobně nejdůležitějším buněčným typem jsou osteoblasty (buněčné typy znázorněny v Obrázek 6). Fyziologicky jsou lokalizovány podél povrchu kostí a mají zásadní syntetickou funkci – produkci osteoidu¹⁶⁴. Jejich morfologické vlastnosti odpovídají vysoké syntetické aktivitě. Mají drsné endoplazmatické retikulum, výrazný Golgiho aparát a četne sekreční váčky. Osteoblasty jsou derivované z mezenchymálních kmenových buněk. Diferenciace je závislá na transkripčním faktoru RunX2. Pouze na základě jeho aktivity mohou být syntetizovány další osteogenní proteiny (například kolagen I, osteokalcin, alkalická fosfatáza, osteonektin) a dokončena maturace kostní tkáňe. Myši s delecí *RunX2* zcela postrádaly osteoblasty¹⁶⁵, což ilustruje důležitost fungování tohoto transkripčního faktoru. Poté co osteoprogenitorové buňky začnou syntetizovat alkalickou fosfatázu, stávají se z nich preosteoblasty¹⁶⁴. Zralé osteoblasty jsou charakterizovány expresí osterixu a sekrecí extracelulárních proteinů osteokalcinu, sialoproteinu a kolagenu typu I¹⁶⁵. Kromě toho dochází ke změnám morfologie. Buňky původně fibroblastoidního charakteru nabývají kuboidální tvar.

Některé osteoblasty v určité fázi vývoje začnou maturovat v osteocyty. Klesá počet organel a zvyšuje se poměr objemu jádra k cytoplazmě, což koresponduje s poklesem syntetické a sekreční aktivity¹⁶⁶. Jakmile je dokončena maturace osteocytů, klesá exprese osteoblastových markerů a je naopak zvýšena transkripce markerů osteocytů sklerostinu a proteinu dentinové matrix I¹⁶⁷. Osteocyty tvoří až 95 % celkového počtu kostních buněk¹⁶⁸. Jejich morfologie se liší v závislosti na tom, v jakém typu kosti jsou uzavřeny. V trabekulární kosti jsou osteocyty spíš kulaté, zatímco v kortikální kosti jsou podélně protáhlé¹⁶². Vzhledem k tomu, že jsou lakuny těsně obklopeny kostní matrix, mezibuněčné kontakty jsou realizovány tenkými výběžky skrz kanálky propojující jednotlivé lakuny. Vodivými spoji jsou transportovány malé signální molekuly, živiny a kyslík¹⁶⁹. Díky tomuto systému mohou osteocyty sloužit i jako mechanoreceptory¹⁷⁰ a umožňovat tak reakci

okolních buněk na změny v mechanickém zatížení. Za signály pro remodelaci tkáně jsou tedy do určité míry zodpovědné osteocyty, které na základě mechanické stimulace produkují řadu sekundárních posílů, například ATP, oxid dusný, kalciové ionty nebo prostaglandiny¹⁷¹.

Posledním buněčným typem jsou osteoklasty. Jejich nejvýraznějším rysem je mnohoadernost. Vyvíjí se z mononukleárních hematopoetických prekurzorů vlivem faktorů M-CSF a RANK ligandu sekretovaných především osteoblasty a osteoprogenitorovými buňkami^{172,173}. M-CSF se váže na povrchový receptor prekurzorů osteoklastů, stimuluje jejich proliferaci a inhibuje apoptózu. Vazba RANKL na RANK receptor spouští osteoklastogenezi¹⁷². Antagonistou vazby RANKL na receptor je osteoprotegerin produkovaný osteoblasty, stromálními buňkami a periodontálními fibroblasty^{173,174}. OPG se váže na RANKL a brání interakci s RANK receptorem, čímž inhibuje osteoklastogenezi. Markery diferencovaných osteoklastů jsou TRAP a katepsin K, molekuly zásadní pro jejich funkci¹⁷⁵. V rámci polarizace během remodelace kosti dochází k přestavbám aktinového cytoskeletu a formaci typického F-aktinového prstence po obvodu celé buňky¹⁷⁶. Tato vrstva umožňuje pevnou adhezi ke kosti, která je následně degradována katepsinem a metaloproteázami¹⁷⁷. Disregulace systému RANKL/RANK/OPG vede k patologickým stavům. Na jedné straně je to nadbytečná degradační aktivita vedoucí k osteoporóze, na straně druhé osteopetróza, při které se kostní hmota resorbuje naopak pomaleji a akumuluje se^{175,178}.



Obrázek 6: Buněčné typy přítomné v kostní tkáni – osteoprogenitory, osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Osteoprogenitorové buňky jsou prekurzory pro osteoblasty a osteocyty. Osteoklasty vznikají z hematopoetické linie. Syntetická aktivita je zabezpečena osteoblasty. Nejpočetnějším buněčným typem v kostní tkáni jsou osteocyty. Převzato a upraveno podle ¹⁷⁹

2.1.7.3 Mezibuněčná hmota

Extracelulární matrix kosti má organickou a anorganickou složku. Organická složka je sekretována osteoblasty a až z 90 % tvořena kolagenem typu I, dále kolageny III a V, výrazně méně zastoupeny jsou nekolagenní proteiny osteokalcin, osteopontin, osteonektin, fibronektin, kostní sialoprotein a růstové faktory¹⁸⁰. Kolagen tvoří typickou helikální strukturu, stejně jako u chrupavky. Kolageny typu III a V mají spíše regulační funkce¹⁸¹. Kontrolují tvorbu nových vláken kolagenu I a jejich průměr, což jsou faktory zásadní pro

zachování pevnosti kosti¹⁸². Nedostatečná tvorba kolagenu I nebo mutace v jeho struktuře vedou k patologickým změnám v ECM a potažmo ke zlomeninám. V kostní mezibuněčné hmotě jsou přítomny rovněž malé proteoglykany bohaté na leucin - dekorin, biglykan, lumikan, keratokan. Proteoglykany byly z hlediska struktury podrobně popsány v kapitole zabývající se chrupavkou (2.1.6.3), na tomto místě tedy bude popsán spíše jejich význam pro kostní tkáň. Váží se na povrchové receptory buněk a během vývoje kosti ovlivňují proliferaci, osteogenezi, ukládání minerálních látek a remodelaci¹⁸³. Nejběžnější glykosaminoglykanové řetězce v proteoglykanové molekule jsou dermatan a chondroitin sulfáty. Významnou skupinou jsou molekuly obsahující kyselinu γ -karboxyglutamovou, mezi něž patří osteokalcin, periostin a matrixový Gla protein¹⁸⁴. Kofaktorem syntézy těchto proteinů je vitamin K. Osteokalcin je sekretován osteoblasty a prostřednictvím vazebných domén pro hydroxyapatit reguluje metabolismus vápníku v organismu. Cirkulující osteokalcin může být jednak využit jako marker formace kostí a navíc funguje i jako hormon regulující energetický metabolismus¹⁸⁵.

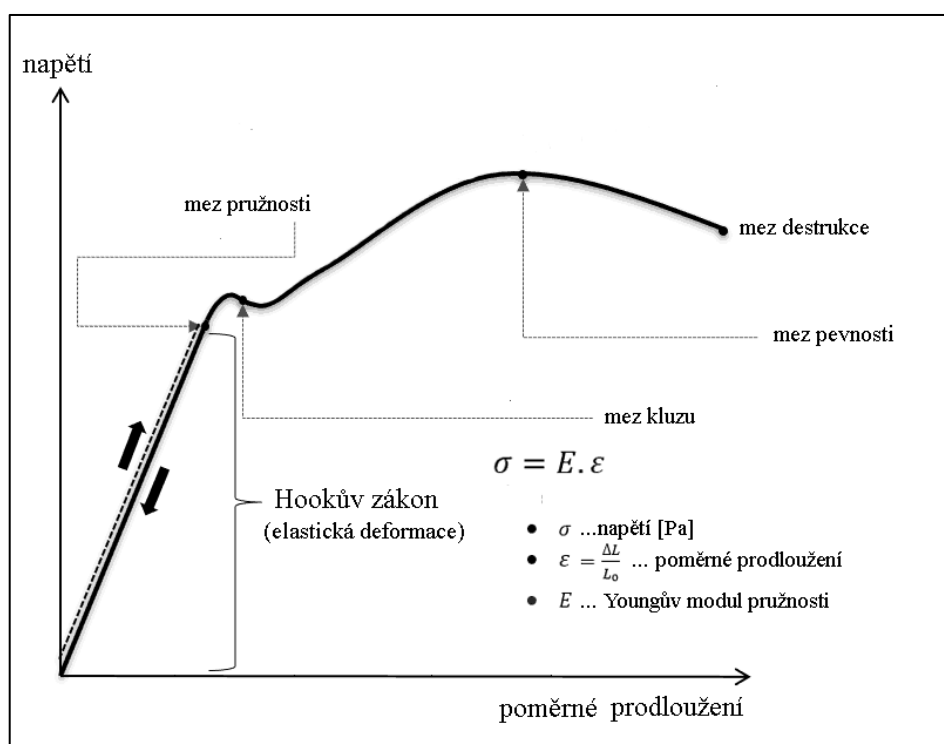
Anorganická složka je představována hlavně ionty kalcia a fosforu, nicméně přítomny jsou i hydrogenuhličitany, sodík, draslík, hořčík nebo zinek¹⁸⁶. Vápník a fosfor spolu reagují a v procesu biomineralizace tvoří krystaly hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Síť tvořená proteiny mezibuněčné hmoty funguje jako lešení pro krystalizaci a ukládání hydroxyapatitu, což zajišťuje typickou odolnost kostní hmoty¹⁸⁷. Mineralizace probíhá ve dvou fázích – vezikulární a fibrilární¹⁸⁸. Matrixové váčky obsahující kalciové ionty se odškrcují z cytoplazmatické membrány a díky zápornému náboji funkčních skupin proteoglykanů jsou následně imobilizovány v mezibuněčné hmotě. Po naštěpení proteoglykanů osteoblastovými enzymy mohou být tyto zásoby vápníku opět uvolněny a vstoupit do buněk anexinovými kanálky. Ionty fosforu jsou získávány štěpením fosfátových sloučenin alkalickou fosfatázou. ALP je enzym syntetizovaný osteoblasty a transportovaný do mezibuněčné hmoty rovněž ve váčkách¹⁸⁹. Tvorba hydroxyapatitových krystalů tedy probíhá ve vezikulech. Ve chvíli, kdy dojde k saturaci matrixových váček krystaly minerálů, nastává fibrilární fáze biomineralizace, během níž jsou krystaly uvolněny do okolní matrix¹⁹⁰.

Jak bylo zmíněno výše, interakce kostních buněk s mezibuněčnou hmotou je jedním z hlavních regulačních mechanismů jejich aktivity. Běžnou adhezivní molekulou jsou $\alpha\beta$ integriny a RGD vazebný motiv. Osteoblasty jsou touto cestou organizovány během syntézy osteoidu¹⁹¹. Signalizační funkce osteocytů je rovněž závislá na těsných interakcích

pomocí těchto proteinů, a to jak v lakunách, tak i v kanálcích matrix¹⁹². Osteoklasty vyžadují vazbu přes integriny pro zahájení resorpce kosti i pro terminální diferenciaci¹⁹³.

2.1.7.4 Biomechanika

Na kost je v každodenním životě kladeno široké spektrum biomechanických nároků. Kost je deformována tlakem, tahem i smykovým napětím. Její chování tedy musí být v tomto směru velmi komplexní. O míře napětí vznikajícího působením mechanického stresu vypovídá elastický, nebo také Youngův, modul popisující tuhost materiálu (Obrázek 7). Vzhledem ke složení a struktuře má většina kompaktních kostí anizotropní viskoelastické vlastnosti, které záleží na směru působení síly. Oproti tomu spongióza má Youngův modul ve všech směrech stejný. Nejtypičtějším příkladem je ortotropie, kdy se modul elasticity liší ve třech na sebe kolmých směrech^{194,195}. Pokud bude například na femur působit síla ve vertikální ose, může být výrazně vyšší, než kdyby působila v horizontální ose, aniž by došlo k deformaci a zlomenině kosti.



Obrázek 7: Až po dosažení hodnoty meze pružnosti se daný materiál chová při působení napětí elasticky. Po dosažení meze kluzu se materiál stává plastickým, deformace se zvyšuje, aniž by rostlo napětí. Po překročení meze pevnosti napětí začne klesat a zároveň se zvětšuje deformace až k bodu destrukce, ve kterém dochází k fraktuře.

Specifickou vlastností kostní tkáně je schopnost reagovat na zatížení přestavbou kolagenové sítě a tvorbou mikroprasklin¹⁹⁵. Osteocyty zaznamenávají napětí v tkáni a indukují odpověď, která chrání kost před poškozením při dlouhodobém namáhání. Reparačními procesy po polevení tlakové síly může dojít až k 94% obnově poškozené

tkáně¹⁹⁶. Vzhledem k nárokům na kostní tkáň je zásadní také její viskoelasticita. Díky tomu se kost při nízkém napětí chová spíše jako viskózní kapalina a nevykazuje žádnou výraznou deformaci. Naopak při vysokých hodnotách působících sil se tkáň mechanicky stává křehkou pevnou látkou. Při postupné demineralizaci kortikální kosti bylo ukázáno, že právě minerální složka kostí je určující pro hodnotu Youngova modulu¹⁹⁷. Pevnost kosti je dána kombinací minerálních látek a struktury kolagenních vláken, přičemž závisí i na konkrétní organizaci krystalů hydroxyapatitu v tkáni¹⁹⁸. Experimenty na myších s expresí defektního kolagenu I vedly ke zjištění, že správná struktura a organizace vláken se výrazně podílí na pevnosti a odolnosti tkáně. Proto je pravděpodobné, že zvýšená křehkost kostí během stárnutí je zapříčiněna kvalitativními odlišnostmi kolagenu. Vliv mají i abnormality ve velikosti a struktuře krystalů anorganické složky. Všechny tyto okolnosti jsou následkem opotřebení tkáně a změnou hormonálních hladin¹⁹⁵.

Faktorem, který se podílí na udržení biomechanických vlastností je homeostáze buněčné aktivity. Neustále by měla panovat rovnováha mezi resorpcí a dostavbou kosti, aby nedocházelo ke vzniku dutinek, které by průběžně nebyly doplňovány osteoblasty. U patologických stavů, které zahrnují disregulace v přestavbě kosti tedy hrozí, že mechanická odolnost bude snížena důsledkem akcelerovaného odbourávání. Patří mezi ně například Pagetova choroba nebo hyperparatyreóza¹⁹⁹.

2.1.7.5 Patologie

Patologické stavy mohou být zapříčiněny genetickým onemocněním nebo získané při vývoji. Pravděpodobně nejběžnější patologií kostní tkáně jsou fraktury. Jedná se o porušení struktury a integrity kosti jako reakce na působící mechanické síly, které překročily mez únosnosti. Míra deformace závisí na obsahu kostní hmoty v namáhaném místě a na směru a velikosti působící síly. Většina dlouhých kostí se zlomí následkem kombinace sil působících ve směru osy kosti, ohýbání a zkroucení. Poněkud odlišným případem, než akutní jsou zlomeniny únavové. Vznikají obvykle při opakovaném zatížení a mohou být způsobené napětím i kompresí. Vzhledem k tomu že kost je pevnější při kompresi než při napětí, únavová zlomenina jejíž příčinou je napětí je větší komplikací, protože může rychle vyústit ve frakturu celé kosti²⁰⁰. Únavové zlomeniny kompresí kosti obvykle vznikají v delším časovém horizontu. Je tedy více času na aktivaci reparačních procesů a mikropraskliny jsou průběžně opravovány, aniž by došlo ke zlomení celé kosti²⁰¹. Většina všech druhů zlomenin je zhojena prakticky bez trvalých následků. V určitém procentu případů je však trauma tak rozsáhlé, že přirozená regenerační kapacita organismu nestačí. Jedná se o defekty kritické velikosti, které jsou definovány jednak neschopností

spontánního zhojení a nutností chirurgického zásahu²⁰² a pak také svou velikostí. V literatuře jsou často zmiňovány rozměry defektu na délku přesahující 2 cm a minimálně 50% ztrátu obvodu dané kosti²⁰³. Defekt kritické velikosti vzniká nejenom komplikovanou frakturou, ale i resekcí tumorů. Buňkám pak chybí podklad, k němuž by mohly adherovat a začít obnovovat poškozenou tkáň. Standardním terapeutickým přístupem jsou kostní štěpy.

Další kostní patologií s vysokou incidencí v populaci je osteoporóza. Dochází při ní k řidnutí kostní hmoty, zvýšení křehkosti kostí i rizika zlomenin. Může postihovat celou kostru nebo mít pouze izolovaná ohniska, která vznikají následkem snížení napětí svalů upínaných na kost¹⁹⁹. Podle etiologie se osteoporóza dělí na primární a sekundární. K primárnímu řidnutí kostí dochází bez přičinění dalších poruch. Typicky jde o kumulaci změn spojených se stárnutím a opotřebením kostní tkáně. Nicméně vlivy jako pohlaví, věk nebo úrazy jsou jen rizikovými faktory, konkrétní příčina vzniku není známa. Jedinci postižení sekundární osteoporózou vykazují vyšší ztrátu kostní hmoty, než je průměr pro jejich věk, pohlaví a rasu. Nejčastěji je způsobena medikací nebo určitým onemocněním²⁰⁴. Typickým příkladem je cystická fibróza, při níž dochází k poruchám vstřebávání vápníku a vitamínu D. Velmi rizikové jsou také onemocnění zahrnující nerovnováhu pohlavních hormonů během dospívání – například anorexie, Turnerův syndrom a Klinefelterův syndrom. Mezi medikací vedoucí k osteoporóze jsou na prvním místě glukokortikoidy²⁰⁵.

Výrazně méně běžná je Pagetova choroba, nicméně po osteoporóze to je druhé nejběžnější onemocnění kostí. Jedná se o progresivní poruchu remodelace kosti, kdy výrazně převažuje resorpce nad syntézou. Nově vznikající kost je navíc mechanicky neplnohodnotná a neorganizovaná, což vede ke zlomeninám²⁰⁶.

Poslední významnou kostní patologií je osteogenesis imperfecta neboli nemoc křehkých kostí. Klinickým obrazem jsou zlomeniny během prenatálního vývoje, při narození a v útlém dětství, diagnóza je potvrzena genetickým testem. Nemocí je ovlivňována exprese, posttranslační úpravy a sekrece kolagenu typu I²⁰⁷.

2.1.7.6 Regenerace

Při regeneraci kostní tkáně jsou rekapitulovány procesy z vývoje kosti a defekt tak může být kompletně zhojen, aniž by se vytvořila jizva²⁰⁸. Hojení má tři fáze – zánět, syntézu kosti a remodelaci²⁰⁹. Bezprostředně po traumatu vzniká následkem porušení krevních cév hematom a sraženina, zároveň je indukována zánětlivá reakce spojená s expresí signálních molekul, které regulují formaci nové kosti²¹⁰. Patří mezi ně interleukiny, BMP, FGF, TNF, PDGF, VEGF a další. Produkovanými biomolekulami jsou k migraci do místa defektu přitahovány progenitorové a kmenové buňky, osidlují ho a zahajují syntézu komponent

mezibuněčné hmoty. V oblasti koagulované krve se ukládá granulační tkáň a chrupavka a formují měkký kalus s obsahem prokolagenu II a proteoglykanů. Měkký kalus je následně intramembránově osifikován a vzniká tvrdý kalus. K této přeměně dochází v průběhu několika týdnů po fraktuře. Poslední fáze hojení kosti – remodelace, trvá několik měsíců a výsledkem je strukturně i funkčně plnohodnotná kostní tkáň²¹¹ s vrostlými cévami. Během procesu regenerace je důležitým faktorem rozumná míra mechanického zatěžování kosti, aby byly buňky řádně stimulovány k aktivitě a zároveň aby nedošlo k posunu jednotlivých fragmentů vůči sobě.

2.1.7.7 Růstové faktory v osteogenezi

Jak již bylo uvedeno, růstové faktory jsou krátké peptidy, které specifickou vazbou na extracelulární receptory spouští signální kaskády vedoucí k různým odpovědím. Pro optimální fungování je třeba, aby byl růstový faktor přítomen v určité koncentraci, která bude dostatečná pro indukcii signálu a zároveň nebude suprafyziologická. Tento požadavek je třeba respektovat především v *in vitro* experimentech, kdy nemohou být nedostatky fyziologicky doplněny a přebytky naopak odplaveny nebo degradovány.

Nejvýznamnější skupinou je rodina TGF. Její členové a mechanismy fungování byli popsáni v kapitole zabývající se růstovými faktory v chondrogenезi (2.1.6.7). Vazba ligandu na receptor i aktivace intracelulární poslů probíhá stejně jako v případě chrupavky. Směrování buněk k osteogenezi je však zajištěno dalšími regulačními molekulami. Například ubiquitin-proteazomálním systémem, epigenetickými faktory, nebo miRNA. V prekurzorech může být aktivována buď chondrogenезe (aktivací transkripčního faktoru Sox9), která předchází osteogenezi, nebo rovnou diferenciaci do kosti. Pro osteogenní diferenciaci je zásadní exprese transkripčního faktoru RunX2 a především jeho aktivita, která je závislá na fosforylaci MAP kinázou aktivovanou vazbou TGF- β na receptor. Pokud je RunX2 aktivní, stimuluje transkripci dalších osteogenních transkripčních faktorů – například osterixu nebo Dlx5. TGF- β signalizace stimuluje proliferaci, chemotaxi a časné fáze diferenciaci osteoprogenitorů. Nicméně brání maturaci osteoblastů, depozici minerálních látek a vzniku osteocytů a osteoklastů. Všechny isoformy TGF- β jsou exprimovány v perichondriu, periosteu a v růstové ploténce^{212,213}. Nicméně pouze TGF β -2 deficientní myši vykazovaly závažné deformace kostí a chrupavky, proto je TGF β -2 považován za zásadní ve vývoji opěrné soustavy²¹⁴. TGF mají ve formaci kostní tkáně často rozporuplné role. TGF- β 1 na jedné straně vede přes MAP-kinázovou kaskádu k aktivaci RunX2 a k expresi kolagenu typu I²¹⁵. Zároveň však, v závislosti na koncentraci, indukuje migraci makrofágů a diferenciaci osteoklastů v oblastech resorpce kosti²¹⁶. TGF- β 1 však

především podporuje vznik shluků osteoprogenitorových buněk indukci proliferace a chemotaxe²¹⁷. Ze skupiny BMP ligandů jsou v souvislosti s osteogenezi nejvíce studovány BMP-2 a BMP-7, jejichž aplikace byla sledována i v klinických studiích v oblasti hojení zlomenin a spinální fúze²¹⁸. BMP-2 výrazně zvyšuje syntézu osteokalcinu a navozuje formaci kostí²¹⁹. BMP-7 aktivuje expresi alkalické fosfatázy a vede tak k mineralizaci extracelulární hmoty²²⁰.

V rámci rodiny fibroblastových růstových faktorů jsou jako možní kandidáti k využití v regenerativní medicíně kostní tkáň uvažovány především FGF-2, -9 a -18. Vazba ligandu na receptor a následná intracelulární signalizace byla popsána v kapitole zabývající se růstovými faktory v chondrogenezi (2.1.6.7), zde tedy bude uveden pouze konkrétní vliv FGF na průběh osteogeneze. Nejčastěji využívaný je FGF-2. Pokud byl u myši deletován, vedlo to k významně nižšímu množství kostní hmoty, poklesu diferenciaci osteoblastů a k růstovým abnormalitám²²¹. V *in vitro* studii bylo ukázáno, že nízké koncentrace (50 ng/ml) vedly k expresi mRNA alkalické fosfatázy a k její následné aktivaci výrazně lépe než koncentrace vysoké (200 ng/ml)²²². Stejně jako u BMP zde tedy záleží na koncentraci, již jsou buňky vystaveny. Příliš vysoké hodnoty FGF-2 v organismu vedou k nedostatečné mineralizaci ECM a osteopenii²²³. V *in vivo* experimentech byl ukázán pozitivní efekt FGF-2 na urychlení regenerace kosti po zlomeninách^{224,225}. FGF-9 deficientní myši vykazují zpožděný vývoj kostry a krátké končetiny²²⁶. Nicméně se zdá, že efekt FGF-9 je spíše angiogenní než přímo osteogenní^{227,226}. Po jeho aplikaci byla pozorována indukce exprese VEGF. Během hojení kostí je však formace nových krevních cév zásadním faktorem, je tak zcela na místě uvažovat o zahrnutí i tohoto růstového faktoru. V *in vivo* studii bylo ukázáno, že aplikace FGF-9 urychluje hojení zlomenin u diabetického myšního modelu²²⁸. FGF-18 oproti tomu pravděpodobně ovlivňuje dozrávání a proliferaci osteoblastů a naopak tlumí chondrogenní procesy²²⁹. Pro indukci osteogeneze je třeba, aby se růstový faktor vázal na receptor typu 1 nebo 2, vazba na receptor typu 3 vede naopak k chondrogenezi²³⁰. *In vivo* experimenty ukázaly zvýšení exprese osteoblastových diferenciacních markerů a mineralizace²³¹.

Molekulární podstata IGF-1 signalizace je popsána v kapitole zabývající se růstovými faktory v chondrogenezi (2.1.6.7). Tento růstový faktor podporuje terminální diferenciaci osteoprogenitorů²³² a zároveň zajišťuje udržení správných funkcí zralých osteoblastů²³³. Vzhledem k tomu, že IGF-1 se podílí i na udržení kompaktní kostní hmoty,

jeho nízká koncentrace je jedním z rizikových faktorů pro rozvoj osteoporózy a vznik fraktur²³⁴.

VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) rodina má šest izoform značených A – E, z nichž nejběžnější je VEGF-A. Tento růstový faktor je základním regulátorem angiogeneze, pro vývoj bohatě vaskularizované kosti je tedy jeho aktivita zásadní. Důležitou roli hraje i v pozdějším životě při hojení zlomenin, regeneraci a remodelaci kosti. Uplatňuje se především jako regulátor zánětlivých mediátorů v prvních fázích hojení. Interaguje s cytokiny TNF- α , IL-1 α a IL-1 β , které podporují revaskularizaci v místě defektu²³⁵ a působí chemotakticky na monocyty²³⁶. V prekurzorech osteoblastů je pomocí intracelulární hladiny VEGF kontrolována rovnováha v diferenciaci²³⁷.

Vazba ligandu na buňku je zajišťována pěti typy receptorů – VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Neuropilin 1 a Neuropilin 2²³⁸. Ligandy se nemohou vázat na libovolné receptory, interagují spolu pouze konkrétní dvojicemi jejichž aktivaci je závislá exprese angiogenních a osteogenních markerů²³⁹.

Stejně jako při chondrogenézi se i v procesu osteogeneze uplatňuje signalizace přes hedgehog a Wnt/ β -katenin.

2.1.7.8 Tkáňové inženýrství kosti

V případě inženýrství kostní tkáň jsou materiály vyvíjeny s ohledem na to, že mají poskytovat dočasnou podporu migrujícím buňkám a tvořit vhodné prostředí pro jejich proliferaci a diferenciaci. Zlatým standardem pro terapii kostních defektů jsou autologní kostní štěpy. Jejich nevýhody jsou však tak velké, že výzkum je zaměřen na hledání alternativních řešení. Jako první se nabízí xenogenní štěp, který ušetří pacientovu zdravou kostní tkáň, ze které by byl odebírán autologní štěp. U xenogenních implantátů je třeba dbát na pečlivé ošetření štěpu tak, aby nedošlo k přenosu chorob nebo aby nebyla indukována odmítavá reakce imunitního systému. Těmto rizikům se lze vyhnout, pokud bude použit vyhovující biomateriál, který splňuje následující nároky. Nosič musí být stejně jako v případě jakékoli jiné tkáň biokompatibilní, musí splňovat na něj kladené mechanické nároky a vyhovovat i z hlediska struktury především co se týká porozity, velikosti pórů a povrchových vlastností. V ideálním případě bude navíc materiál v organismu postupně odbouráván a zároveň rovnou nahrazován novou tkání. Biologickou aktivitu xenogenního kostního štěpu lze zajistit například navázáním bioaktivních molekul na jeho povrch. Ať už se jedná o růstové faktory nebo jen o krátké peptidové sekvence odvozené od přirozených kostních biomolekul^{240,241}. Uměle připravené biomateriály lze na základě jejich bioaktivity

dělit do tří generací. První generace byla uvedena v šedesátých letech a biologicky byla téměř inertní, s okolním prostředím prakticky neinteragovala. Byly to kovové implantáty především na bázi titanu, syntetické polymery a keramiky. Druhá generace je charakterizována určitou úrovní bioaktivity a degradovatelností *in vivo*. Patří sem kolageny, kalcium fosfáty a bioaktivní skla. Třetí generace materiálů je založena na druhé generaci, která byla obohacena o bioaktivní molekuly²⁴². Základní dělení kostních nosičů může být na kompozitní a připravené z jednoho materiálu, případně lze dělit materiály na syntetické a přírodní. Pouze jeden materiál bez příměsí není používán příliš často. Hlavním důvodem je, že nalezení materiálu, který by splňoval mechanické i strukturní nároky a zároveň byl snadno manipulovatelný, je velmi obtížné. Limitací přírodních materiálů je navíc nedostatečná mechanická odolnost a pevnost. Syntetické materiály obvykle postrádají bioaktivní vlastnosti. Proto je výhodné materiály kombinovat a připravit tak směs, v níž se budou jednotlivé složky doplňovat a tvořit ideální implantát. Resorbovatelná složka biokompozitu je obvykle tvořena přírodním materiálem, například kolagenem, syntetickým polymerem (PCL, PLA) nebo biokeramikou jako je hydroxyapatit nebo trikalcium fosfáty. Oproti tomu velmi stabilní, a to i v *in vivo* podmínkách, jsou kovy a jejich sloučeniny, které jsou zároveň vysoce biokompatibilní, termostabilní a nekorodují. Pro aplikaci v kostním tkáňovém inženýrství jsou využívány především nosiče z titanu a tantalu, které jsou však velmi nákladné na výrobu. V následujícím textu budou materiály rozděleny do tří podskupin.

Základní dělení používaných biomateriálů je na biokeramiky, polymery a kovy²⁴³. Biokeramiky se obecně vyznačují vysokou křehkostí a nízkou odolností lomu. Biomechanické vlastnosti keramik jsou tedy v porovnání s kompaktní kostí výrazně horší, což limituje jejich aplikaci do zátěžových částí kosti. Jsou tedy často kombinovány s biokompatibilními polymery. I tak jsou tyto kompozity používány spíše jako výplně nebo implantáty do spongiózy než v místech s vysokými nároky na mechanickou odolnost. Do zátěžových oblastí jsou tedy vhodnější kovové implantáty, které však postrádají elasticitu. Navíc nejběžněji používané sloučeniny titanu bez povrchové modifikace a nerezová ocel jsou sice biokompatibilní zároveň však i téměř bioinertní a permanentní. Do tkáně jsou integrovány pouze mechanicky, což vede k jejímu opotřebení v místě kontaktu. Mnoho studií je tedy zaměřeno na nalezení biodegradovatelných materiálů obecně, a to jak kovů, tak polymerů a keramik.

Biokeramiky obecně mají složení velmi podobné přirozeným vlastnostem kostní mezibuněčné hmoty. Vedle velmi dobré biokompatibility a osteokonduktivních vlastností mají i schopnost integrace do kostní tkáně. Kromě toho se jimi uvolňované ionty

a degradační produkty mohou podílet na tkáňové signalizaci a metabolismu a ovlivňovat tak buněčnou aktivitu i hojení. Stejně jako jakýkoli jiný biomateriál mají však i řadu nevýhod. S ohledem na aplikaci v kostním tkáňovém inženýrství to je především nedostatečná mechanická odolnost a nízká tuhost. Tyto nedostatky se ještě násobí, když je materiál použit ve formě s póry. Biokeramiky tedy bývají doplněny druhou fází zlepšující jejich mechanické vlastnosti – na úrovni mikro i nanostruktury. Často jsou to nanočástice, které mají velký povrch a specifické chemické vlastnosti, jimiž zvyšují efektivitu biokeramických nosičů²⁴⁴.

Nejběžnější jsou různé druhy kalcium fosfátů a hydroxyapatit. Hydroxyapatit je hlavní minerální složkou kostní matrix, využití coby materiálu na přípravu nosiče se tedy přímo nabízí. Jeho hydroxylové skupiny fungují přes vodíkové můstky jako vazebná místa pro aminokyseliny a potažmo proteiny²⁴⁵. Po implantaci působí hydroxyapatit osteoinduktivně a stimuluje formaci nové kostní tkáně²⁴⁶. Zároveň je však *in vivo* velmi stabilní a obtížně degradovatelný²⁴⁷. V porovnání s ním jsou další sloučeniny obsahující vápníkové a fosfátové ionty řádově méně stabilní a svými degradačními produkty mohou působit bioaktivně. Bylo ukázáno, že trikalciium fosfáty interagují s kostí, aniž by na rozhraní vznikala fibrózní pojivová tkáň a po třech měsících od implantace vedly ke zhojení kostního defektu²⁴⁸.

Méně často používanými biokeramikami jsou ty s obsahem křemíku. Vápník, coby minoritní složka anorganické kostní hmoty zůstal, a fosfor byl nahrazen křemíkem, který je jedním z nejdůležitějších stopových prvků v organismu²⁴⁹. Přítomen je jak v kostech, tak i v ostatních pojivových tkáních. Křemík se účastní kalcifikace kostní matrix, zvyšuje hustotu kostní hmoty a působí tedy preventivně proti vzniku osteoporózy²⁴⁹.

Z hlediska rychlosti degradace vychází křemičité keramiky výrazně lépe i z porovnání s bioskly. Určitá míra biodegradability je žádoucí, musí však korelovat s rychlostí dostavby nové kosti, aby implantát nové tkáni „nepřekážel“ a zároveň, aby jako mechanická opora fungoval dostatečně dlouho. Po dvou týdnech v simulované tělní tekutině došlo k redukci pevnosti v tlaku u křemičitých keramik o 30 %, zatímco u bioskel to bylo až o 54 %²⁵⁰. Bioskla jsou tvořena především oxidy křemičitým, fosforečným a vápenatým. Co se týká dalších vlastností, jeví se bioskla vhodná pro využití v tkáňovém inženýrství kosti. Vynikají svou biokompatibilitou a schopností tvořit v krátkém čase pevné chemické vazby s okolní kostní tkání. V *in vivo* podmínkách uvolňují prostřednictvím výměny iontů kalcium, křemík a fosfor a na povrchu materiálu tak vzniká vrstva umožňující vysokou adsorpci široké škály proteinů. Díky této vlastnosti jsou bioskla jedinou biokeramikou, která dokáže tvořit vazby s měkkými i tvrdými tkáněmi²⁵¹.

Biodegradovatelné polymery obvykle degradují enzymaticky nebo mechanicky. Dochází během toho k odštěpování jednotlivých podjednotek s nižší molekulovou hmotností, které jsou v organismu absorbovány nebo vyloučeny. Základní dělení polymerů je na přírodní a syntetické. Hlavní nevýhodou polymerních materiálů jsou jejich nedostatečné mechanické vlastnosti, především co se týká pevnosti a tvrdosti, a další charakteristiky vycházející z jejich původu. Přírodní materiály jsou velmi obtížně zpracovatelné a málo termostabilní. Syntetické polymery mají nedostatečné biokompatibilní vlastnosti, pro buněčnou adhezi jsou vhodné jen v omezené míře a jejich degradační produkty mají obvykle mírně kyselé pH a v místě defektu tedy mohou způsobovat nespecifické zánětlivé reakce. V praxi jsou proto běžně kombinovány jak polymery obojího původu, tak i polymer s jiným materiálem, například biokeramikou.

Přírodní polymery jsou izolovány z rostlin nebo živočichů a typicky se jedná o kolageny, chitosan, celulózu, alginát a hedvábní^{252,253,254}. Hlavní výhodou přírodních polymerů je jejich výborná biokompatibilita a povrchové vlastnosti vhodné k adhezi buněk, degradačními produkty jsou látky organismu vlastní, které mohou být rovnou vstřebávány, přírodní polymery nejsou toxické a v neposlední řadě jsou jejich zdroje snadno dostupné²⁵⁴. Kolagenové nosiče mají velmi dobré výsledky v buněčné adhezi a proliferaci MSC²⁵⁵ i osteoblastů²⁵⁶. Jako hlavní proteinová složka mezibuněčné hmoty je kolagen buňkami bez problémů tolerován a nevyvolává nežádoucí reakce imunitního systému. Kolageny mohou být elektrostaticky zvláknovány nebo upraveny do podoby gelu, jehož vlastnosti lze ovlivnit podmínkami při polymeraci. Při přípravě nosiče je možné jej obohatit o suplementy, které zlepšují jeho osteogenní vlastnosti, například BMP-2 a dexametason²⁵⁷. Rovněž je možné připravit kompozitní s přísadkou biokeramiky, která pomáhá lépe simulovat přirozené vnitřní prostředí kosti a podporovat tak osteoinduktivní vlastnosti nosiče²⁵⁴. Za účelem zlepšení mechanických, strukturních a osteogenních vlastností mohou být přidávány i méně obvyklé materiály, jako například uhlíkové nanotrubičky²⁵⁸. S kolagenem souvisí želatina, tvořená krátkými peptidovými řetězci, jež vznikají jeho denaturací. Želatina je ve srovnání s kolagenem snáze rozložitelná, lépe rozpustná ve vodě a vyvolává méně výraznou odpověď imunitního systému²⁵⁹. Dalším přírodním polymerem je chitosan, polysacharid vzniklý deacetylací chitinu²⁶⁰. Svou strukturou je podobný polysacharidům v ECM pojivových tkání. Zároveň má na svém povrchu velké množství funkčních skupin, které mohou být podle potřeby modifikovány. Chitosan je však ve vodě nerozpustný, *in vivo* velmi rychle degraduje a způsobuje agregaci krevních destiček²⁶¹. Samotný chitosan má antibakteriální účinky²⁶², je osteoinduktivní, nicméně je velmi málo osteoinduktivní²⁶³ a podporuje proliferaci

osteoblastů i mezenchymálních kmenových buněk. Pro ortopedické aplikace je velmi výhodnou vlastností možnost získat nosič ve formě pěny, vláken i filmu a upravit ho do jakéhokoli tvaru. Stejně jako v případě kolagenu jsou i k chitosanu přidávány další látky za účelem posílení nebo doplnění jeho pozitivních vlastností.^{264,265,266} Zcela výjimečně se lze setkat s testováním proteinů hedvábí. Ty jsou fibrilárního charakteru, mechanicky odolné, stabilní a byla u nich prokázána schopnost indukovat osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk. Lze je modifikovat přísadami růstových faktorů, hydroxyapatitu nebo dalších proteinů²⁵⁴.

Mezi syntetické polymery využívané v inženýrství kostní tkáně řadíme polykaprolakton PCL, polyvinylalkohol PVA, kyseliny polyglykolovou PGA a polymléčnou PLA a kopolymer kyseliny mléčné a glykolové PLGA. V menší míře také polyethylenglykol PEG, polyuretan PUR, polybutylen tereftalát PBT, polyethylen tereftalát PET. Vzájemně se liší strukturou, mechanickými vlastnostmi a stabilitou. PCL je jedním z nejběžněji používaných syntetických polymerů a má z nich také nejlepší mechanické vlastnosti. Je však poměrně stabilní, což není univerzálně vhodné. V organismu způsobuje záněty, a navíc neumožňuje plnou náhradu nosiče nově vznikající tkání. V *in vitro* podmínkách dosahuje tento materiál s ohledem na osteogenní diferenciaci velmi dobrých výsledků. Mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně nasazené na 3D nosiči z PCL vykazovaly po čtyřtydenní kultivaci mineralizaci mezibuněčné hmoty detekovanou ARS barvením²⁶⁷. Rovněž kombinace PCL s biokeramikou²⁶⁸ nebo některým z přírodních polymerů²⁶⁹ vede k posílení pozitivního vlivu na osteogenní diferenciaci *in vitro* i *in vivo*. Porézní PCL nosič indukoval *in vitro* diferenciaci osteoblastů a formaci struktur kostní tkáně²⁷⁰. Dalším velmi často používaným polymerem je kyselina polymléčná. Je velmi dobře biokompatibilní a biodegradovatelná, její metabolity nejsou toxické a v těle jsou bez problémů odbourávány. PLA má dobrou zpracovatelnost a je tedy možné připravit nosiče elektrostatickým zvlákňováním ve formě vrstvy vláken, napěněním plynem nebo litím do formy^{271,272}. Pro osteogenní diferenciaci se kyselina polymléčná často kombinuje s dalšími organickými nebo anorganickými látkami. Na králičím modelu bylo ukázáno, že implantáty z PLA s nano-hydroxyapatitem urychlují hojení kostních defektů a mají osteokonduktivní vlastnosti²⁷³. Nosiče, ve kterých byla PLA obohacena kolagenem, indukovaly osteogenezi mezenchymálních kmenových buněk, které byly pozitivní na expresi mRNA osteogenních markerů RunX2, osterixu a osteokalcinu²⁷⁴. Buňky také akumulovaly mineralizaci v extracelulární hmotě. Velmi podobné vlastnosti jako PLA má z hlediska biokompatibility a biodegradovatelnosti kyselina polyglykolová. Je to semikrystalická látka, během

degradace je kyselina glykolová odbourávána v organismu a krystalická složka se mění na vodu a oxid uhličitý. Samostatně se v kostním tkáňovém inženýrství téměř nepoužívá, slouží spíše jako materiál pro výrobu vláken na sutury. Nicméně s kyselinou mléčnou tvoří kopolymer, který je FDA schválen k využití v klinických aplikacích, a především v regenerativní medicíně kostní tkáně²⁷⁵. PLGA je biodegradabilní v závislosti na poměru monomerů kyselin a velmi vhodná pro buněčnou adhezi. Na druhou stranu má výrazné nedostatky v mechanických vlastnostech, které však je možné ovlivnit přidávkou dalších biokompatibilních látek, například kyseliny hyaluronové, diamantových nanočástic nebo kolagenu²⁷⁶.

Posledním typem biomateriálů využívaných v tkáňovém inženýrství kosti jsou kovy. Do skupiny odbouratelných kovů se řadí hořčík, zinek, železo a jejich slitiny. V porovnání s výše popisovanými materiály mají vyšší mechanickou odolnost a tuhost. Ze všech odbouratelných kovů je nejvíce zkoumán hořčík, který se svými mechanickými parametry blíží k přirozeným vlastnostem kompaktní kosti. Během degradace jsou do okolního prostředí uvolňovány jednotlivé kationty, které jsou vstřebávány a dále zpracovávány v rámci metabolismu, kde se jako kofaktory podílí na aktivaci a činnosti mnoha enzymů²⁷⁷. Právě bezproblémová degradace v *in vivo* podmínkách se zdála být výhodnou vlastností pro terapeutické aplikace. Nicméně v prostředí s vysokou koncentrací iontů vápníku dochází k velmi rychlému odbourávání implantátu²⁷⁸, což není žádoucí. Jednak důsledkem uvolnění velkého množství vodíku vznikají na povrchu implantátu bublinky narušující proces regenerace okolní tkáně²⁷⁹, dochází ke snižování pH a především je urychlená degradace spojena s výraznou ztrátou mechanické integrity a nově vznikající kost tak nemá dostatečnou mechanickou oporu²⁸⁰. Slitina hořčíku, zinku a vápníku vedla k lepšímu zhojení kostního defektu na myším modelu²⁸¹. Implantát působil chemotakticky na osteoprogenitorové buňky a následně stimuloval angiogenní a potažmo osteogenní procesy.

Hlavním neodbouratelným kovem je titan a jeho slitiny. Titan je v organismu velmi dobře tolerován, je však téměř inertní a jeho schopnost integrace do kosti je tedy omezená²⁸². Za účelem zefektivnění osteointegrace byla vyvinuta řada přístupů, jimiž lze modifikovat povrch nosiče. S upravenou povrchovou strukturou nosičů se pojí i modulace pružnosti nosiče a jeho biologické chování^{283,284}. Na povrchu se typicky formuje tenká vrstvička oxidu titaničitého, která dále zvyšuje biokompatibilitu materiálu a zároveň brání korozi. Čistý titan má některé limitující vlastnosti, díky nimž není příliš dobře využitelný pro medicínské aplikace, pozornost je tedy zaměřena spíše na jeho slitiny. Hojně zkoumanou slitinou titanu je Ti-6Al-4V²⁸³. Dlouhodobé působení vanadu a hliníku je však považováno za potenciálně

rizikové a pozornost tak byla zaměřena spíše na nové β titanové slitiny s obsahem tantalu, niobu a zirkonia²⁸². Přidáním dalších prvků vznikly titanové slitiny tzv. druhé generace, které se vyznačují vylepšenými bioaktivními vlastnostmi a snížením Youngova modulu pružnosti²⁸⁵. V klinické praxi jsou používány kombinace například s molybdenem, zirkoniem nebo niobem²⁸⁶. Biologická aktivita jednotlivých slitin se od sebe může zásadně lišit. Buněčné chování není v tomto případě ovlivňováno pouze složením nosiče, ale výraznou měrou také porozitou, velikostí pórů a případnou přítomností dalších struktur na povrchu nosiče.

3 Cíle 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 testování nosiče podporujícího vaskularizaci
- vytvoření kompozitního nosiče a jeho implantace *in vivo* do zvířecího modelu

4 Experimentální část

V následujících kapitolách budou shrnuty výsledky získané ve třech *in vitro* studiích, jedné studii kombinující *in vitro*, *ex ovo* a *in vivo* získaná data a jedné *in vivo* studii. Hodnocení *in vitro* byl xenogenní kostní štěp s biomimetickými peptidy (Obrázek 9), titanová sloučenina Ti36Nb6Ta (Obrázek 17), pěnový nosič z kolagenu typu I a biokeramik (Obrázek 27) a pěnový nosič z kolagenu I a chitosanu s přidavkem růstových faktorů, jehož angiogenní vlastnosti byly dále hodnoceny *ex ovo* a podpora hojení *in vivo* na králičím modelu (Obrázek 35). Na králičím modelu byl testován také nosič z kolagenu typu I kombinovaný s PCL a růstovými faktory při hojení osteochondrálního defektu (Obrázek 47).

5 Materiál a metody

5.1 Příprava nosičů

Hybridní xenogenní kostní štěp SmartBone R byl vyroben firmou I.B.I. SA (Mezzovico-Vira, Švýcarsko). Jeho základem je decelularizovaná hovězí kostní matrix s povrchem pokrytým kopolymerem L-laktidu s ϵ -kaprolaktonem a fragmenty kolagenu odhalujícími RGD vazebné motivy (D'Alessandro et al., 2017). Během přípravy nosičů byly do povrchových polymerů vmíseny dva druhy biomimetických peptidů P2 a P6, jejichž sekvence je následující P2: PLVPSQPLVPSQPLVPSQPQPPLPP a P6: PHQPMQPQPPVHPMQPLPPQPPLPP, oba se sedmi polárními aminokyselinami. Nominální koncentrace obou peptidů byla nastavena tak, že docházelo k postupnému uvolňování $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ za den. Oba druhy peptidů byly vyvinuty ve společnosti Corticalis (Oslo, Norsko) ve spolupráci s PepmicCo (Jiangsu, Čína). Zásobní koncentrace P2 i P6 byla stanovena na 4 mM v 0,1% kyselině octové, skladovány byly v -20°C . Vznikly tedy čtyři skupiny značené SBN (samotný štěp), SBP2 (štěp s P2), SBP6 (štěp s P6) a SBP2+P6 (štěp s P2 a P6).

Sloučenina titanu Ti-36Nb-6Ta (TiNbTa) ve tvaru disků o průměru 1,5 cm byla nejprve za mokra broušena a vyleštěna. K tvorbě nanostrukturovaného povrchu byl použit Potentiostat-Galvanostat IMP 88 PC-200V s PGU-AUTO Extern kontrolní jednotkou (Jaisle). Elektroda ze stříbra/chloridu stříbrného s 3 mol/l KCl (SSCE) byla použita jako referenční vzorek. Jako elektrolyt pro nanostrukturování byla použita voda s obsahem 1 mol/l H_3PO_4 a 0,6% wt NaF. Proces sestával z poklesu z potenciálu obvodu na zvolený koncový potenciál (10V, 20V, 30V). Pokles potenciálu na konci procesu anodizace vedl k tvorbě kompaktní vrstvy oxidu na povrchu kovu o tloušťce asi 100 nm. Po dokončení modifikace povrchu byly vzorky sonikovány v ethanolu a deionizované vodě a poté sušeny v proudu vzduchu.

Kolagen typu I (Collado, Česká republika) prošel několika cykly mražení a sušení, aby byla získána pěna ze 100% kolagenu. Bylo k němu přidáno celkem šest různých typů biokeramik, konkrétně následující: hydroxyapatit (HAP, Reicke), kalcinovaný a nekalcinovaný hydroxyapatit (Riedel-de-Haen, Německo), alfa trikalciemfosfát (Premier Biomaterials, Irsko), beta trikalciemfosfát (Fluka, Švýcarsko) a kalciumfosfát (Merck, Česká republika). V Tabulka 1 je popsáno složení jednotlivých nosičů a velikost částic. Obě složky (kolagen a biokeramika) byly smíchány v poměru hmotností 1:1, nosiče byly

připraveny lyofilizací. Odpovídající množství biokeramiky bylo pomalu přidáváno do vodného roztoku kolagenu (0,5 wt%) o teplotě 4°C. Směsi byly dále homogenizovány a lyofilizovány v přístroji Martin Christ Epsilon 2-10D při -35°C a tlaku 1 mBar po dobu 15 hodin, následovala fáze sušení při 25°C a tlaku 0,01 mBar. K zesíťování kolagenu byl použit karbodiimidový systém v 96% ethanolu (Penta, Česká republika). Po dvou hodinách byly nosiče promyty nejprve dvakrát 0,1 M Na₂HPO₄ a poté ještě třikrát ultračistou vodou k odstranění vedlejších produktů.

Tabulka 1: Složení jednotlivých nosičů, střední velikost částic v μm a chemický vzorec biokeramiky.

| | označení vzorku | druh kolagenu/HAP | střední velikost částic [μm] | vzorec |
|---|-------------------------------|---|------------------------------|--|
| A | Coll | bovinní kolagen I | | |
| B | Coll+HAP Reicke | hydroxyapatit | 30 | Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ |
| C | Coll+HAP kalcinovaný | nano-hydroxyapatit kalcinovaný při 1000°C, 1h | 0,130 | Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ |
| D | Coll+HAP nekalcinovaný | nano-hydroxyapati nekalcinovaný | 0.029 | Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ |
| E | Coll+β-TCP | β-trikalcium fosfát β-TCP | 4,21 | 89 wt% Ca ₃ (PO ₄) ₂ 11 wt% Ca ₂ P ₂ O ₇ |
| F | Coll+α-TCP | α-trikalcium fosfát α-TCP | 11,01 | 92 wt% α-TCP Ca ₃ (PO ₄) ₂ 8 wt% HAP Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ |
| G | Coll+CapolyP | Polyfosfát vápenatý připravený reakcí polyfosfátu sodného s CaCl ₂ | 8,26 | Ca(PO ₃) _n n = 25 |

Roztok PCL pro výrobu nanovláken byl připraven smísením 333 ml chloroform, 37 ml ethanol a 89 g PCL 45000 Da. Roztok Synperonicu PE/P 105 byl připraven smícháním 1 g synperonicu s 1 ml 75% ethanolu v deionizované vodě. Dále byly k 50 ml roztoku PCL přidány následující složky: 1 ml hyaluronanu, respektive 1 ml PBS (ve skupinách bez hyaluronanu), 1,8 ml synperonicu, respektive 1,8 ml 75% ethanolu (ve skupinách bez synperonicu), 0,2 ml roztoku růstového faktoru, respektive 0,2 ml PBS (ve

skupinách bez růstových faktorů). TGF- β 1 byl ředěn v 10 mM kyselině citronové (5 μ g), bFGF v 5 mM TRIS (150 μ g) a IGF-1 v deionizované vodě (500 μ g). Složení nosičů pro *in vitro* experiment je uvedeno v tabulce 2. Nosiče pro *in vivo* experiment měly dvě části, kostní a chrupavkovou. Kolagenová pěna s biokeramikou byla připravena lyofilizací podle protokolu použitého v předchozím *in vitro* experimentu. Část s PCL nanovláknky a růstovými faktory byla vytvořena dle protokolu v *in vitro* části této studie, nanovláknka s růstovými faktory byla namleta do kolagenu před lyofilizací. Do chrupavkové části byl přidán hyaluronan sodný 10% w/w, 2000000 Da a do kostní části β -TCP. Kostní část měla na výšku cca 0,7 mm, chrupavková cca 0,5 mm, složení každé z částí je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 2: Složení nosičů pro *in vitro* hodnocení potenciálu indukovat chondrogenezi.

| | | |
|---|-------------------------------|------------------|
| 1 | PCL | PCL |
| 2 | PCL+hyaluronan | PCL+hya |
| 3 | PCL+synperonic | PCL+synp |
| 4 | PCL+hyaluronan+GFs | PCL+hya+GFs |
| 5 | PCL+GFs | PCL+GFs |
| 6 | PCL+synperonic+GFs | PCL+synp+GFs |
| 7 | PCL+hyaluronan+synperonic+GFs | PCL+hya+synp+GFs |
| 8 | PCL+hyaluronan+synperonic | PCL+hya+synp |

Tabulka 3: Složení nosičů pro *in vivo* experiment - hojení osteochondrálního defektu.

| | kostní část | chrupavková část |
|-------------|---|--|
| skupina I | kolagen I + β -TCP | kolagen I + hyaluronan |
| skupina II | kolagen I + β -TCP + PCL | kolagen I + hyaluronan + PCL |
| skupina III | kolagen I + β -TCP + PCL + BMP-2 | kolagen I + hyaluronan + PCL + bFGF + IGF-1 + TGF β 1 |

Kolagen typu I (8% vodný roztok, Collado s. r. o., Brno) pro poslední studii byl sušen mrazem až do získání 100% kolagenové pěny. Chitosan (Sigma-Aldrich) byl použit ve formě od výrobce bez další purifikace. ColI/Chit nosiče byly připraveny sušením mrazem z 0,5% wt kolagenové vodné suspenze (Milli-Q, Merck, v souladu s ISO 3696) podle dříve publikované práce²⁸⁷. Odpovídající objem FGF2-STAB® (Enantis s. r. o., Brno) 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. Po 10 minutách adheze růstového faktoru byly nosiče opět sušeny mrazem.

5.2 Určení morfologie nosičů

Morfologie nosičů byla určena skenovací elektronovou mikroskopií (Tescan MIRA3, Česká republika). Všechna měření proběhla v módu sekundární emise elektronů při vysokém napětí 10 kV. Nosiče byly před měření potaženy 10 nm vrstvičkou zlata. Velikost a distribuce pórů byla určena ze snímků pomocí programu ImageJ.

K charakterizaci nanostruktur na povrchu nosičů byl použit elektronový skenovací mikroskop Tescan Vega 3 LMU. Délka a vnitřní průměr nanotrubiček byly určeny pomocí programu ImageJ z mikrofotografií z pohledu svrchu a na příčném řezu. K výpočtům byla použita data nejméně ze čtyř různých snímků pro každou z podmínek anodizace. Kontaktní úhel byl určen pomocí SeeSystem 6.3 (Advex Instruments, Česká republika). K měření byla použita kapka o objemu 10 μ l a pro každý vzorek proběhlo desetkrát.

5.3 Botnání nosiče

Materiál byl nastříhán na proužky o rozměru 1 \times 2 cm a ponořen do ultračisté vody. Každý kus byl zvážen nejprve v suchém stavu a následně také v několika intervalech v průběhu 3 hodin. Pro výpočet parametru botnání byla použita následující rovnice, kde M_b je hmotnost nosiče v mokřem stavu a M_i počáteční hmotnost.

$$Pb = Mb/Mi$$

5.4 Hydrolytická degradace

Po měření parametru botnání byly vzorky přeneseny do zkumavek s ultračistou vodou a umístěny do inkubátoru při 37°C, kde tak byla simulována hydrolytická degradace nosiče. V průběhu prvního týdne byly vzorky váženy každý den a poté po jednom měsíci. Voda byla po každém měření vyměněna za čerstvou. Míra degradace byla určena podle následující rovnice, kde M_d je hmotnost nosiče v odpovídající den a M je hmotnost nosiče první den vážení po 60 minutách ve vodě.

$$[\%] = 100 - (Md \times 100/M)$$

5.5 Enzymatická degradace

Enzymatická degradace byla hodnocena *in vitro* v roztoku kolagenázy z *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) nebo lysozymu (Sigma-Aldrich) v PBS v pH 7,4 a 37°C. Odpovídající množství enzymu bylo rozpuštěno v PBS tak, abychom získali roztok o koncentraci 2,2 mg/dm³. Nosiče byly ponořeny do PBS na dobu 10 min při 37°C, zbaveny přebytečné vody a zváženy. Následně byl na nosič nalit připravený roztok kolagenázy. Každý vzorek byl po 2, 4, 8, 24, 48, 72 a 144 hodinách zvážen. Hmotnostní úbytek byl určen

pomocí následující rovnice, kde M_z značí úbytek hmotnosti, m_i počáteční hmotnost a m_d hmotnost po určitém počtu hodin inkubace s enzymem.

$$M_z [\%] = (m_i - m_d)/m_i \times 100$$

5.6 Mechanické testování

Vzorky byly nastříhány na proužky o délce 4 cm, šířce 1 cm a přibližné tloušťce 3 mm a byly podrobeny dynamické mechanické analýze (DMA) na rheometru RSAG2 (TA Instruments Inc., USA). První měření proběhlo za pokojové teploty, druhé v komoře za konstantního navlhčování a při 37°C. Vzhledem k tomu, že napětí v obou směrech kolmo na osu vzorku bylo nulové, byl modul pružnosti stanoven poměrem napětí k deformaci pomocí programu Electro Force DMA Data Analysis (TA Instruments Inc., USA).

5.7 Určení kmenovosti lidských MSC

Kmenovost MSC z kostní dřeně byla ověřena analýzou buněk na průtokovém cytometru. 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. Na základě procenta buněk vyhovujících daným kritériím byla určena míra zachování kmenového fenotypu.

5.8 Kultivace buněk

Pro experiment s xenogenním kostním štěpem byly zakoupeny lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně od společnosti ScienCell (CA USA). Nejprve byly kultivovány v lahvích za účelem expanze v 5% atmosféře CO₂. Po tu dobu jim bylo dodáváno růstové medium o složení Alpha MEM (22571020, Gibco; BE02-002F Lonza), 10% FBS (A4766801, Gibco), 1% antibiotika (15140-122, Life Technologies). Buňky byly pasážovány před dosažením 80% konfluence. Nasazovány byly v páté pasáži v hustotě 80000 buněk/nosič (kruhový tvar, průměr 1,2 cm, výška 0,3 cm) ve 200 µl. Následovala 1 hodina pro adhezi buněk, po které bylo medium doplněno do plného objemu. Doplněno bylo základní medium obohacené osteogenními suplementy 100 µM kyselinou L-askorbovou (A8960, Sigma Aldrich), 10 mM β-glycerolfosfátem (50020, Sigma Aldrich) a 100 nm dexamethasonem (Dexamed 8 mg/2 ml, Medochemie, Ltd.).

Pro experiment s titanovými nosiči byly lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně rovněž zakoupeny u společnosti ScienCell (CA, USA). Za účelem expanze byly aplikovány stejné podmínky jako v předchozím experimentu. Nasazeny byly v hustotě

12000 buněk/cm², jako kontrola byla použita skla. Po třech dnech v růstovém mediu bylo toto nahrazeno osteogenním mediem se složením popsáním výše.

Pro experiment s pěnovými nosiči na bázi kolagenu byly lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně rovněž zakoupeny od společnosti ScienCell (CA, USA). Za účelem expanze byly aplikovány stejné podmínky jako v předchozích experimentech. Nasazovány byly ve třetí pasáži v hustotě 70000 buněk/nosič ve 100 µl. Následovala 1 hodina pro adhezi buněk, po které bylo medium doplněno do plného objemu. Doplněno bylo základní medium s osteogenními suplementy, popsáno výše.

Linie myších fibroblastů 3T3-A31 (Sigma-Aldrich) byla rozpěstována v DMEM (D6429, Sigma-Aldrich) s 10% FBS (Sigma-Aldrich) a 1% penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich). Na nosiče (mrazem sušené kolagenové pěny, průměr 11 mm, výška 8 mm) byly buňky nasazeny v denzitě 60000/nosič.

Pro experiment s nosičem z PCL s růstovými faktory byly izolovány mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně miniprasete. Během expanze byly kultivovány v Minimum Essential Medium (Gibco, 15188319), 5% FBS (A4766801, Gibco), L-glutaminu (Gibco, 25030081) a 1% penicillin/streptomycin (15140-122, Life Technologies) v 37°C a 5% CO₂ atmosféře. Nasazeny byly ve třetí pasáži v denzitě 62000 buněk/nosič (193750/cm²) v objemu 20 µl. Po dvou hodinách adheze bylo doplněno medium o stejném složení na plný objem. Obsah FBS byl snížen na 1 %, aby nebyl zakryt vliv růstových faktorů v nosiči.

5.9 Vizualizace buněk skenovací elektronovou mikroskopií

Snímky byly pořízeny ze vzorků fixovaných 24 h po nasazení buněk. Vzorky byly opláchnuty PBS, fixovány 2,5% glutaraldehydem (Sigma Aldrich) po dobu 2 h ve 4°C a dehydratovány ethanolovou řadou (35, 48, 70, 96% po dobu 5 min a 100% 2x5 min). Po odsátí poslední dávky ethanolu byl přidán hexamethyldisilazan (440191, Sigma Aldrich) a vzorky byly přes noc ponechány v otevřené destičce v zapnuté digestoři. Před snímáním byly vzorky potaženy zlatem (Quorum Q150R ES, Quorum Technologies Ltd, UK) ve vrstvě 3 nm. Ke snímání byl použit Vega 3 SBU skenovací elektronový mikroskop (Tescan, Česká republika).

5.10 Stanovení metabolické aktivity buněk

K hodnocení úrovně buněčného metabolismu byl použit MTS test. K buněčné kultuře byl v poměru 1:5 s kultivačním mediem přidán MTS substrát (CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, WI, USA) obsahující (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli

um) tak, aby byl nosič ponořen. Během inkubace dochází k přeměně žluté tetrazoliové soli v MTS substrátu na nerozpustný tmavě fialový formazan činností mitochondriální sukcinát dehydrogenázy. V určené experimentální dny byly nosiče přeneseny do nové kultivační destičky a byl přidán substrát, následovala inkubace trvající 1 h (xenogenní kostní štěp) – 2 h (ostatní experimenty) v 37°C a 5% nebo 10% CO₂ atmosféře. Poté bylo 100 µl produktu pipetováno do nové destičky, kde byla spektrofotometricky (Infinite®M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) měřena absorbance při 490 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Od výsledných hodnot byla odečtena absorbance blanku – kultivační medium s MTS substrátem.

5.11 Kvantifikace obsahu dsDNA

Stanovení obsahu jaderné dsDNA je používáno k hodnocení míry proliferační aktivity buněk. Po MTS testu byly nosiče, případně buňky na TCP, opláchnuty sterilním PBS. Následně byly nosiče přeneseny do zkumavek s lyzačním pufrům (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2% v/v Triton X-100). Objem pufru byl obvykle stanoven na 200 µl pro nosiče z 96jamkové destičky a 600 µl pro větší nosiče. Během celkem tří cyklů zmražení, rozmražení a vortexování vzorků došlo k popraskání buněčných membrán a uvolnění dsDNA do pufru. Jako detekční kit byl použit QuantiT™ High Sensitivity dsDNA Assay Kit (Invitrogen), jehož součástí jsou standardy o známé koncentraci DNA. Podle protokolu výrobce byl připraven pracovní roztok obsahující pufr a světlocitlivou fluorescenční sondu, která se specificky váže na dvouřetězcovou DNA a pouze poté začne vydávat signál. Z každého vzorku i standardu bylo pipetováno 10 µl do černé destičky s průhledným dnem. Poté byla ve tmě přidána směs pufru a sondy, se vzorkem byla inkubována 20 min ve tmě na třepače. Fluorescence byla měřena (Infinite® M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při excitační vlnové délce 485 nm a emisní 528 nm. Z hodnot fluorescence standardů byla vytvořena kalibrační křivka, podle které byl následně určován obsah dsDNA ve vzorcích.

5.12 Sledování aktivity alkalické fosfatázy

Vzorky byly v určené experimentální dny přeneseny do nové destičky a opláchnuty sterilním PBS. Byl přidán ALP substrát (OneStep PNPP, Thermo Scientific) v objemu 100 µl ke vzorkům z 96jamkové destičky, k větším vzorkům tak, aby byly dostatečně pokryty. Inkubace se substrátem probíhala ve tmě a pokojové teplotě po dobu 10 – 30 minut. Během inkubace byl bezbarvý p-nitrofenylfosfát alkalickou fosfatázou přeměněn na žlutý p-nitrofenol. 100 µl produktu bylo přeneseno do nové destičky a smícháno s 50 µl 2M NaOH. Absorbance této směsi byla spektrofotometricky měřena (Infinite® M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm.

5.13 Vizualizace buněk pomocí konfokální mikroskopie

Nosiče s buňkami byly v určené experimentální dny přeneseny do nové destičky, 2× opláchnuty PBS a fixovány mraženým methanolem. Ke každému z nosičů byl přidán methanol a následně byly vzorky uskladněny při -20°C . Na takto fixovaných vzorcích byl prováděn dvojitý typ barvení – vizualizace buněčných jader a membrán a imunohistochemické barvení extracelulárního proteinu osteokalcinu a kolagenu typu I.

Pro vizualizaci membrán byl použit DiOC6(3) (D273, Life Technologies) v ředění 1:1000 v PBS. Toto barvení bylo doplněno vizualizací buněčných jader propidium jodidem (P4864, Sigma Aldrich) v ředění 1:200 v PBS. Po vyjmutí z mrazáku byly vzorky 3× opláchnuty PBS, následně byl přidán na 30 minut DiOC6(3) a poté propidium jodid na 10 minut. Inkubace probíhala při pokojové teplotě a ve tmě. Na závěr byly vzorky opět 3× opláchnuty PBS a snímány na konfokálních mikroskopech Zeiss LSM 510 DUO nebo Zeiss LSM880 Airyscan, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}545 \text{ nm}$, DiOC6(3) a $\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} > 575 \text{ nm}$ pro propidium jodid. K odlišení živých a mrtvých buněk pomocí konfokálního mikroskopu bylo využito barvení pomocí BCECF-AM (B8806, Sigma-Aldrich) a propidium jodidu (P4846, Sigma-Aldrich). Následně byly buňky snímány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 510DUO při $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 - 545 \text{ nm}$ pro BCECF a $\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ pro propidium jodid. Pro imunohistochemické barvení byly vzorky po vyjmutí z mrazáku nejprve 3× opláchnuty PBS. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 30 minut v PBS s 1% TritonX-100 a 1% BSA, oplach PBS, inkubace 20 minut při pokojové teplotě v 1% Tween20, 3× oplach PBS a přidání primární protilátky (barvení osteokalcinu: rabbit anti-osteocalcin (T4743, Peninsula Laboratories, 1:100; barvení kolagenu I: mouse M-38c, DSHB, USA, 1:100; barvení kolagenu II: mouse II-II6B3c v ředění 1:20 v PBS), se kterou byly vzorky inkubovány přes noc ve 4°C . Další den následoval oplach PBS a inkubace po dobu 3, 5 a 10 minut s 0,05% Tween20. Poté byla pro vizualizaci osteokalcinu přidána sekundární, fluorescenčně značená, protilátka (Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG A21070, Life Technologies) v ředění 1:400 v PBS. Pro vizualizaci kolagenu typu II i kolagenu typu I byla přidána sekundární protilátka Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibody (A10667, Life Technologies, 1:300 v PBS). Vzorky se sekundární protilátkou byly vždy inkubovány při pokojové teplotě po dobu 45 minut. Toto barvení bylo doplněno vizualizací buněčných jader pomocí Hoechst 34580 (H21486, Life Technologies) v ředění 1:5000 v PBS. Vzorky byly inkubovány 15 minut, při pokojové teplotě. Všechny kroky po přidání sekundární protilátky probíhaly ve tmě. Vzorky byly snímány na konfokálních mikroskopech Zeiss LSM 510

DUO nebo Zeiss LSM880 Airyscan, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 505\text{-}545 \text{ nm}$ pro Alexa Fluor™ 488 nm a $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$ pro propidium jodid, $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} > 650 \text{ nm}$ pro Alexa Fluor™ 633, $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 420\text{-}470 \text{ nm}$ pro Hoechst 34580.

5.14 DAPI/phalloidin

V dané experimentální dny byly vzorky 3× opláchnuty PBS a následně fixovány v 4% paraformaldehydu po dobu 12 minut. Poté byly opět opláchnuty PBS. Byl přidán phalloidin značený Alexa-488, s nímž byly vzorky inkubovány po dobu 1 hodiny a DAPI s časem inkubace 20 minut a snímání konfokálním mikroskopem.

5.15 qPCR

V určené experimentální dny byla ze vzorků izolována RNA. K tomu účelu byl použit RNeasy Mini Kit (74106, Qiagen), postup dle protokolu výrobce. Absorbance izolované RNA byla spektrofotometricky měřena (Infinite® M200 PRO; Tecan, Švýcarsko) při 260 nm a 280 nm. Z poměru těchto dvou hodnot byl přístrojem určen poměr, ze kterého lze usuzovat na čistotu nukleové kyseliny a rovněž byla určena její koncentrace. Pro syntézu cDNA byl použit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1632, Life Technologies). RNA byla před dalším zpracováním naředěna tak, aby její koncentrace byla ve všech vzorcích stejná. Syntetizovaná cDNA byla následně využita pro qPCR. Jako housekeeping gen byl použit *EEF1* (Hs00265885_g1, ThermoFisher Scientific). Jako geny zájmu byly použity *RunX2* (Hs01047973_m1, ThermoFisher Scientific), *kolagen I* (Hs00164004_m1, ThermoFisher Scientific) a *osteokalcin* (Hs01587814_g1, ThermoFisher Scientific). Do každé reakce bylo přidáno 1,25 μl cDNA, 1 μl odpovídající směsi sondy a primeru, 10 μl TaqMan MasterMix (4369016, ThermoFisher Scientific) a 7,75 μl vody (129114, Qiagen). Pro reakci byl použit LightCycler® 480 Instrument II (Roche Life Science) a její parametry byly nastaveny následovně: v prvním kroku proběhla aktivace při 95°C po dobu 10 minut; dále amplifikace při 95°C po dobu 10 sekund, následně 40 – 50 cyklů při 60°C po dobu 10 sekund a na závěr terminace při 40°C po dobu 1 minuty. Během jednotlivých kroků je cDNA denaturována, aby na ni mohly nasednout primery a DNA-polymeráza začne syntetizovat komplementární řetězce k danému segmentu. Během jednotlivých cyklů postupně dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu kopií sekvence genu zájmu, což se díky mechanismu fungování TaqMan projeví rostoucí fluorescencí. Fluorescence je detekována ve chvíli, kdy překročí nastavenou prahovou hodnotu a je zaznamenáno číslo cyklu, kdy se tak stalo. S touto hodnotou jsme dále pracovali jako s C_p . Získaná data byla relativně

kvantifikována použitím metody $2^{-\Delta C_p}$. C_p hodnotou housekeeping genu byla normalizována C_p hodnota genu zájmu a rozdíl byl použit jako exponent do výše uvedeného vzorce.

5.16 Kvantifikace extracelulárních proteinů

Při výměně kultivačního media bylo toto v určené experimentální dny odebíráno do zkumavek, zamraženo a skladováno v -80°C . Ke kvantifikaci byly vybrány následující proteiny: osteokalcin, osteopontin, osteoprotegerin, dickkopf-příbuzný protein 1, sklerostin, interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor- α . Určení koncentrace proteinů proběhlo na přístroji Luminex 200 system (Luminex, Austin, TX, USA) 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).

5.17 Hodnocení angiogenních vlastností nosiče

Oplozená slepičí vejce (Henry Steward and Co., UK) byla umístěna do R-Com King Suro 20 digitálního inkubátoru při $37,5^\circ\text{C}$. Po třech dnech byla embrya vyjmuta ze skořápek a přenesena do 100 ml váženek s 2 ml PBS a 1% pen/strep. Váženky byly uzavřeny do Petriho misek s destilovanou vodou za účelem udržení vlhkosti. Sedmý den byl navlhčený (0,2 ml PBS) nosič přenesen na chorioalantoidní membránu a vzorky byly ponechány v inkubátoru. 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 $\pm 45^\circ$.

5.18 Péče o zvířata, implantace nosiče

Hojení osteochondrálního defektu bylo sledováno na tříměsíčních Novozélandských králících (firma Velaz s. r. o., Praha). Zvířata byla ustájena v nerezových klecích bez podestýlky. 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 ketamin v dávce 50 mg/kg tělesné váhy, xylazin v dávce 4 mg/kg tělesné váhy a antibiotika marbofloxacin v dávce 5 mg/kg tělesné váhy. Pooperačně byl subkutánně podán meloxicam v dávce 5 mg/kg tělesné váhy. Defekt byl vytvořen na 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 část s hyaluronanem sodným. Do pátého dne po zákroku byla denně podávána subkutánně analgetika a antibiotika, viz výše. Pohyb zvířat nebyl omezen. Studie byla ukončena po 12 týdnech, vzorky na histologii byly odebrány do pufrovaného formaldehydu.

Hojení kožního defektu bylo sledováno na tříměsíčních Novozélandských králících (místní firma schválená MZ ČR, Brno) byli ustájeni v chovu Veterinárního výzkumného ústavu (Brno). Studie 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 intravenózní injekcí Medetomidinu v dávce 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti a Propofolu v dávce 8 – 15 mg/kg tělesné hmotnosti. Premedikace a analgezie během výkonu byla zajištěna podkožní injekcí Butomidoru v dávce 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti. Na depilovaném hřbetě králíka bylo skalpelem způsobeno celkem šest ran v plné tloušťce o rozměrech 3 × 3 cm, rozmístěny byly symetricky po stranách páteře. Testovány byly skupiny Coll, Coll/Chit a Coll/Chit_0,1FGF2. Aplikované nosiče měly tloušťku 1,5 mm a rozměry 3 × 3 cm a následně byly překryty kožním štěpem odebraným z rány. Jako kontrolní skupina byla použita rána překrytá kožním štěpem. Všechny defekty byly překryty gázou a zajištěny elastickou bandáží. Obvazy byly měněny pátý den po aplikaci nosičů. Pro post-operační analgezii byly použity subkutánní injekce Meloxicamu v dávce 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti, a to jednou denně po dobu prvních tří dnů po zákroku. Vzorky byly odebírány v den 7, 14 a 21 po operaci a byly hodnoceny histologicky. Odběr tkáně pro analýzu mRNA byl proveden 21. den po operaci.

5.19 Odběr vzorků a histologické zpracování

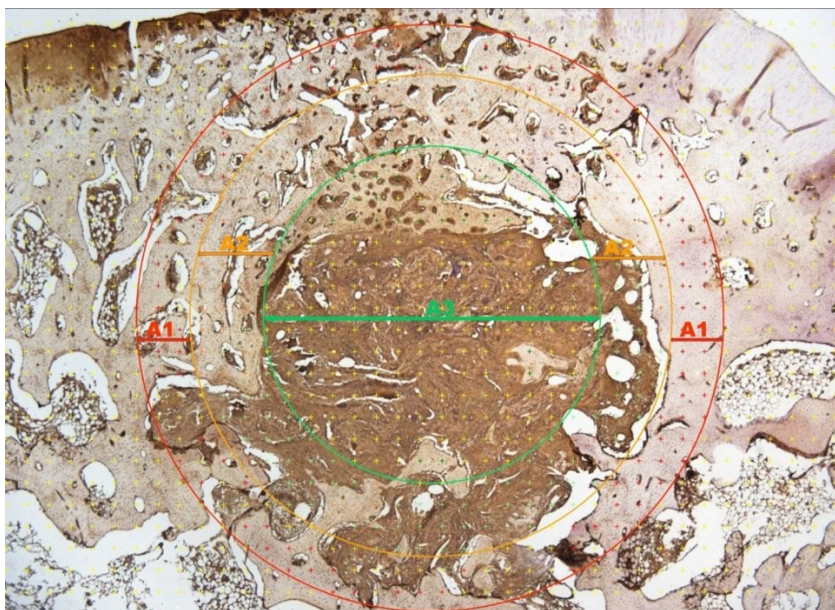
In vivo experiment zaměřený na osteochondrální defekt byl ukončen po dvanácti týdnech od implantace nosičů. Velikost defektu byla 5 mm v průměru a 9 mm do hloubky. Defekt se nacházel na laterálním kondylu femuru a byl vyplněn nosičem z jedné ze tří skupin. Vzorky byly dále po dobu osmi týdnů dekalifikovány v 12,5% roztoku EDTA (Komplexon III p.a., Penta) neutralizované na pH = 7 přidáním 1,25% (w/w) NaOH. Po osmi týdnech byla EDTA ze vzorků vymývána fyziologickým roztokem po dobu 24 hodin. Tkáň byla zalita do parafinových bločků, které byly dále rozděleny ve středu defektu na dvě stejné části, které byly zpracovány odděleně. Řezy o tloušťce 5 μ m byly barveny za použití různých histologických metod.

Řezy barvené haematoxylinem-eosinem, zeleným trichromem a Verhoeffovým barvením byly použito pro základní přehlednou histologii. Další řezy byly 20 minut při 96°C inkubovány v Dako Target Retrieval Solution a následně 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). Alcian Blue se váže na kyselé glykosaminoglykany při pH = 2,5 a barví je modře. PAS fialově vizualizuje neutrální hexózy a kyselinu sialovou. 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). Picrosirius červení (Direct Red 80, Sigma Aldrich) rozpuštěné v nasycené kyselině pikrové byl značen kolagen typu I a pozorován v polarizovaném světle. Za účelem snadnějšího rozpoznání hranice defektu byl barven kostní extracelulární protein osteokalcin (OCG4, ThermoFisher). a stejně jako u kolagenu II byl použit diaminobenzidin k jeho zviditelnění.

Řezy byly rozděleny na jednotlivé kompartmenty, v rámci nichž probíhalo kvantitativní hodnocení přítomnosti nové tkáně (Tabulka , Obrázek 56)²⁸⁸.

Tabulka 4: Geometrické charakteristiky vnějšího, středního a centrálního kompartmentu defektu.

| | kompartment | | |
|--------------------------------------|-------------|---------|-----------|
| | Vnější | střední | centrální |
| Lokalizace | | | |
| průměr kruhu (mm) | 3,46 | 2,83 | 2 |
| plocha/řez (mm ²) | 9,25 | 6,283 | 3,142 |
| Značení | A1 | A2 | A3 |
| plocha mezi kruhy (mm ²) | 3,14159 | 3,14159 | 3,14159 |
| objem/4 řezy (mm ³) | 62,832 | 62,832 | 62,832 |



Obrázek 8: Znárodnění lokalizace kompartmentů defektu.

In vivo experiment zaměřený na hojení kožního defektu byl ukončen po třech týdnech. Histologické řezy byly barveny haematoxylinem/eosinem. Hodnocena byla přítomnost reziduí použitých biomateriálů, zánětlivá reakce, granulační tkáň a fibrózní tkáň.

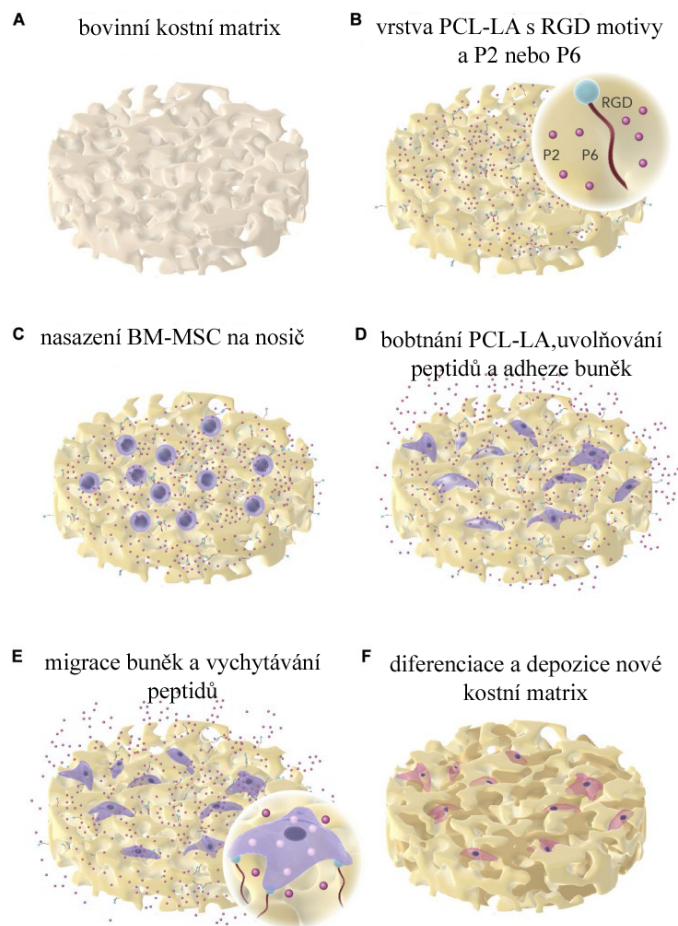
5.20 Statistické vyhodnocení dat

Naměřená data byla statisticky hodnocena v programu SigmaStat 3.5 (Systat, San Jose, CA, USA). Signifikantní rozdíly byly hodnoceny 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.

6 Výsledky

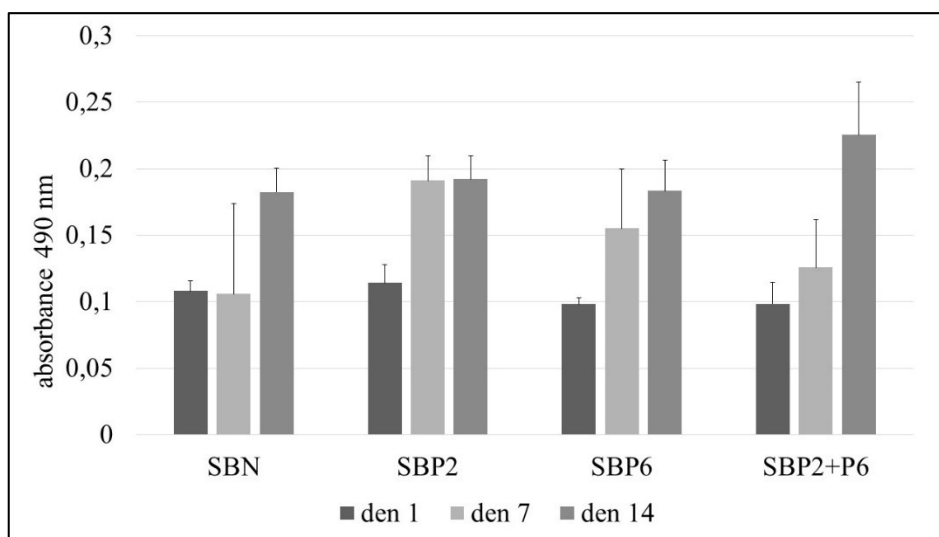
6.1 Xenogenní kostní štěp funkcionalizovaný biomimetickými peptidy



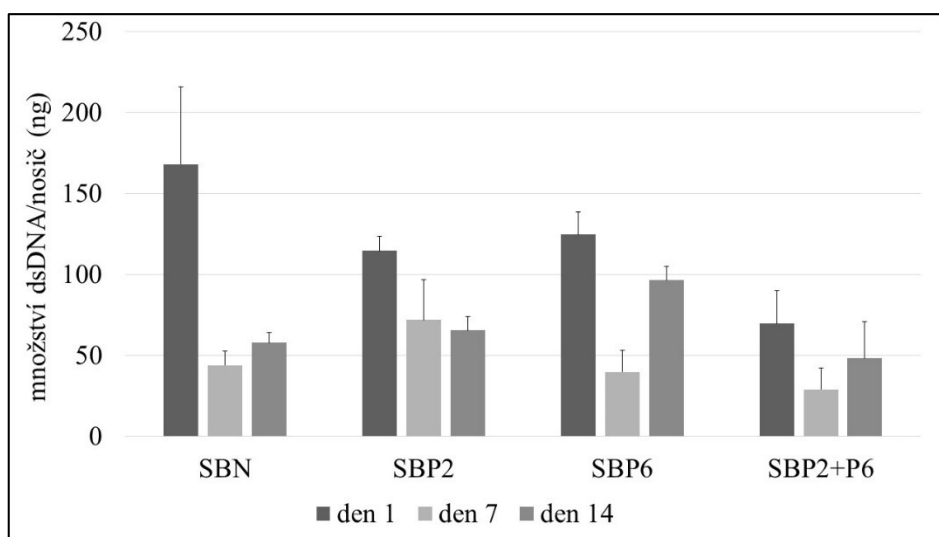
Obrázek 9: Bovinní kostní matrix funkcionalizovaná biomimetickými peptidy.

6.1.1 Cytotoxicita, metabolická aktivita a míra proliferace

U žádného z testovaných nosičů nebyl pozorován cytotoxický efekt v růstovém ani diferenciacním mediu. SBP2 (kostní matrix s adherovaným peptidem P2) vykazoval signifikantně nejnižší cytotoxicitu v růstovém mediu. K hodnocení metabolické aktivity byl použit MTS test (Obrázek 10). Metabolická aktivita ve všech skupinách rostla po celou dobu experimentu. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly. Kvantifikací obsahu dsDNA na všech vzorcích byla hodnocena míra proliferace nasazených MSC (Obrázek 11). Významný pokles byl zaznamenán 7. experimentální den ve všech skupinách. Nicméně 14. den byl ve všech skupinách kromě SBP2 pozorován nárůst množství dsDNA.



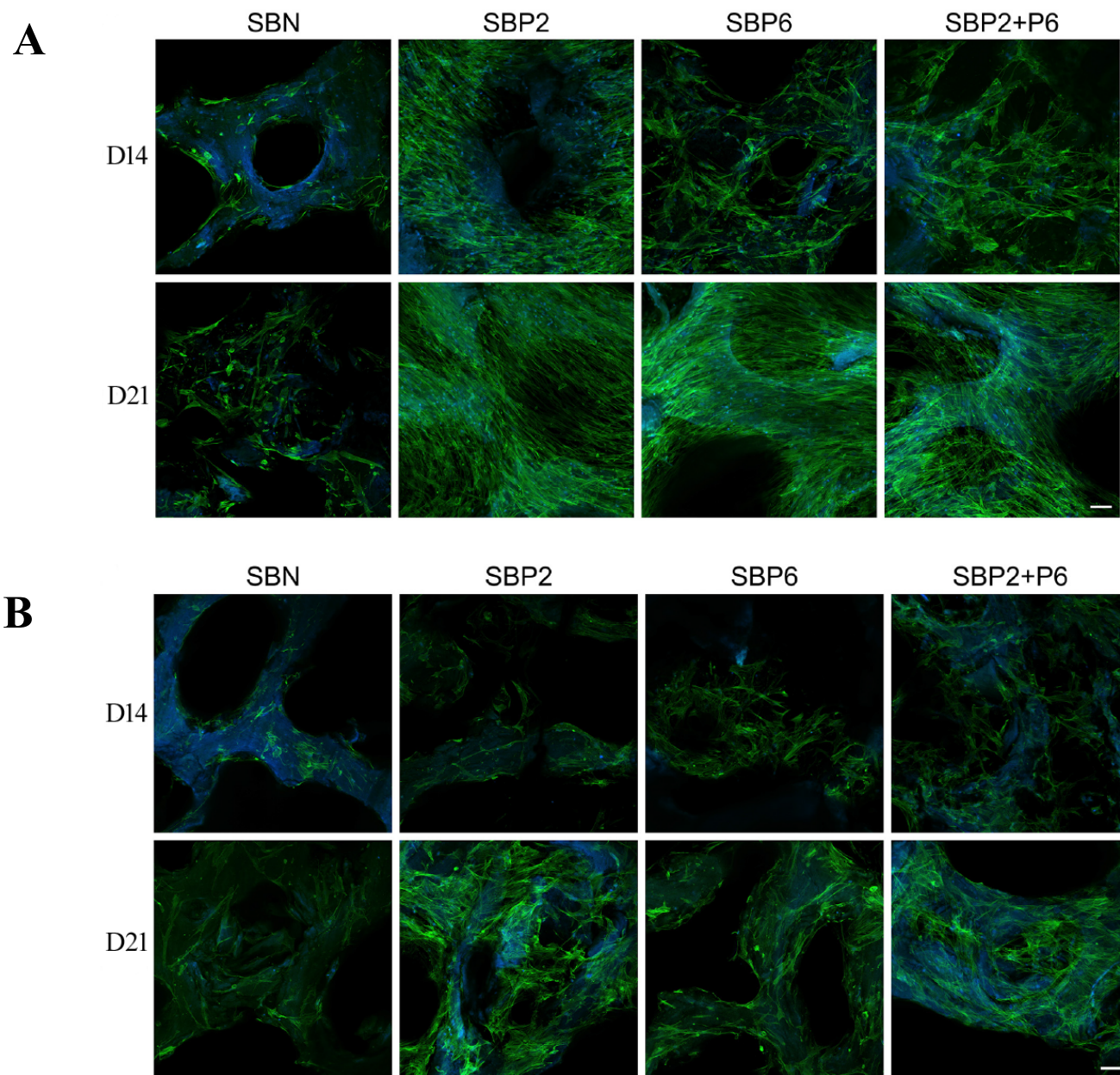
Obrázek 10: Hodnocení buněčné metabolické aktivity MTS testem. Absorbance produktu měřena při 490 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Bez statisticky významných rozdílů.



Obrázek 11: Kvantifikace obsahu dsDNA (ng/nosič). Bez statisticky významných rozdílů.

6.1.2 Expanze buněk na nosiči

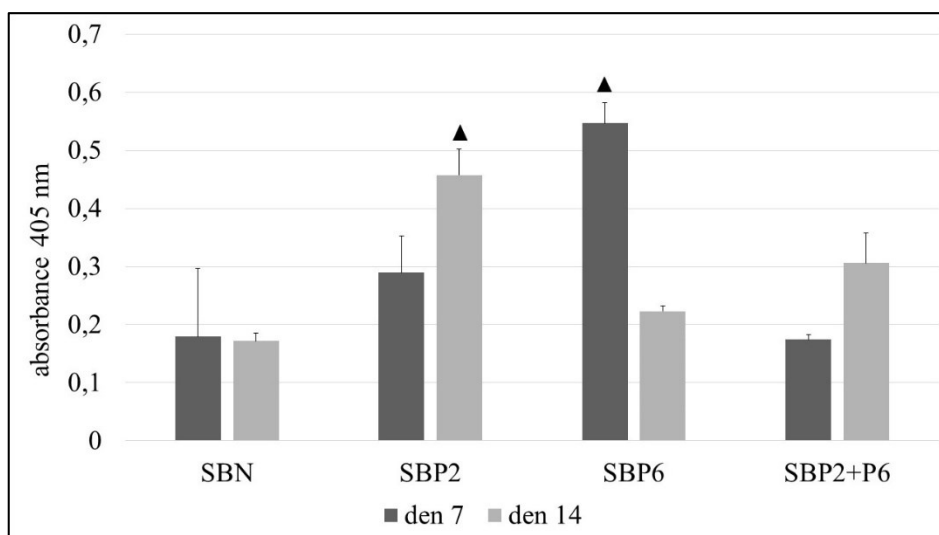
Snímky z konfokální mikroskopie, kde jsou aktinová vlákna značena phalloidinem s Alexou-488 a jádra DAPI ukazují kolonizaci nosiče buňkami 14. a 21. experimentální den (Obrázek 12). Na nosičích s peptidy (SBP2, SBP6, SBP2+P6) bylo 14. den přítomno více buněk než na kostním štěpu bez adherovaných peptidů (SBN). Velmi silná proliferační aktivita byla pozorována v růstovém mediu ve všech skupinách s peptidy, kde byly 21. experimentální den přítomny buňky v několika vrstvách. V diferenačním mediu buňky kolonizovaly nosič méně než v růstovém mediu. I zde však byl pozorován pozitivní vliv peptidů v porovnání s kontrolní skupinou SBN. V rámci skupin s peptidy byla nejsilnější proliferace pozorována ve skupině SBP2.



Obrázek 12: Kolonizace nosičů buňkami hMSC. Snímky ze dnů 14 a 21. (A) Buňky v růstovém mediu. (B) Buňky v osteogenním mediu. Velikost měřky 100 μm .

6.1.3 Aktivita alkalické fosfatázy

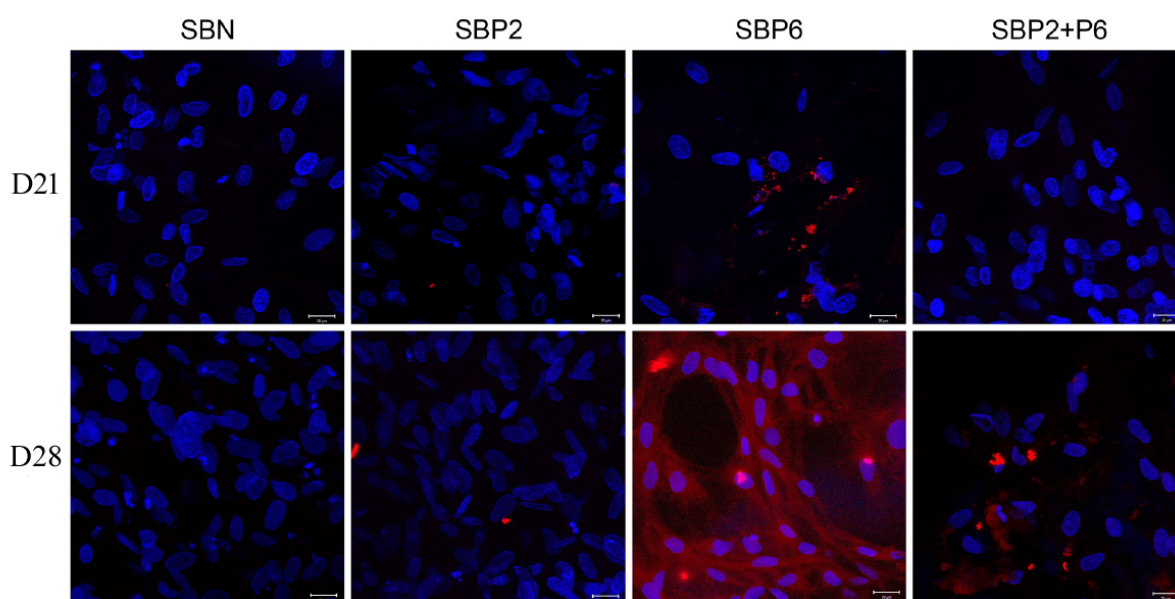
Aktivita ALP byla měřena 7. a 14. experimentální den (Obrázek 13). Aktivita enzymu je spojena s mineralizací extracelulární hmoty v kostní tkáni. Hodnoty byly 7. den signifikantně nejvyšší ve skupině SBP6. Ve skupině SBN nebyl 14. experimentální den naměřen růst hodnot. Ve skupinách SBP2 a SBP2+P6 hodnoty mírně vzrostly a ve skupině SBP6 byl po dvou týdnech kultivace pozorován výrazný pokles na hodnotu srovnatelnou se samotným kostním štěpem bez adherovaných peptidů. ALP ve skupině s P6 tedy dosáhla vrcholu aktivity již 7. den, zatímco v ostatních skupinách s peptidy nebyl peak zaznamenán.



Obrázek 13: Aktivita enzymu alkalické fosfatázy. Absorbance produktu měřena při 405 nm. Statistická významnost $p < 0,001$ značena trojúhelníkem nad nejvyššími hodnotami, signifikantní vůči ostatním skupinám ve stejném časovém intervalu.

6.1.4 Vizualizace osteokalcinu

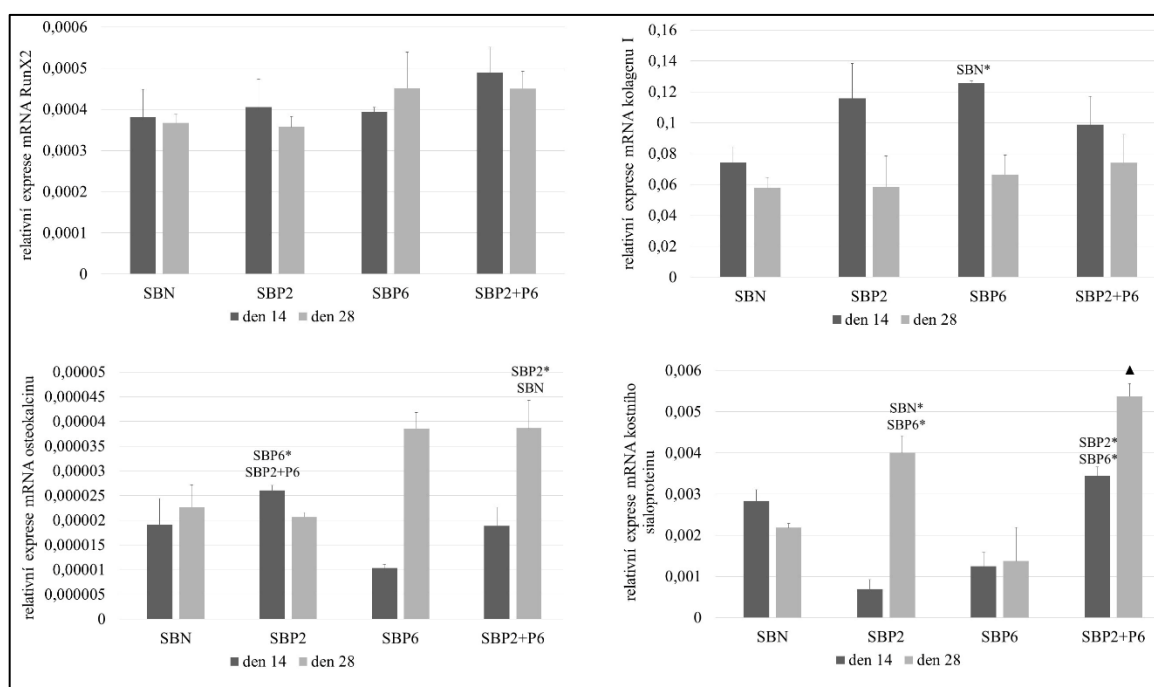
Expres extracelulárního proteinu osteokalcinu byla detekována specifickým imunohistochemickým barvením 21. a 28. experimentální den (Obrázek 14). 21. den byly pozorovány počáteční fáze depozice proteinu ve skupině SBP6 a ve velmi malé míře i v SBP2. 28. den byla vysoká úroveň exprese OCN přítomna ve skupině SBP6, méně v obou skupinách s adherovanými peptidy SBP2+P6 a SBP2. Díky negativním kontrolám lze vyloučit nespecifické interakce primární i sekundární protilátky s materiálem nosiče. Ze signálu emitovaného Hoechstem navázaným na jadernou DNA byla provedena analýza migrace buněk do hlubších vrstev nosiče.



Obrázek 14: Specifické barvení extracelulárního proteinu osteokalcinu (červený signál). Jádra barvena Hoechstem (modrý signál). Velikost měřky 20 μm .

6.1.5 Relativní exprese mRNA osteogenních markerů

Pomocí qPCR byla analyzována relativní exprese mRNA raného transkripčního faktoru RunX2, střednědobého kolagenu I a pozdních OCN a IBSP 14. a 21. experimentální den (Obrázek 15). mRNA transkripčního faktoru RunX2 byla oba experimentální dny transkribována bez statisticky významných rozdílů. mRNA pro kolagen I byla 14. den exprimována ve významně vyšším množství ve SBP6 a to v porovnání se samotným kostním štěpem SBN. Vrchol exprese byl dosažen 14. den a 21. následoval pokles relativních hodnot mRNA pro kolagen I. mRNA pozdního markeru OCN byla ve statisticky nejvyšší míře exprimována v obou skupinách obsahujících P6 (SBP6 a SBP2+P6). Oproti tomu mRNA pro IBSP byla nejsilněji transkribována ve skupinách s peptidem P2 (SBP2 a SBP2+P6).

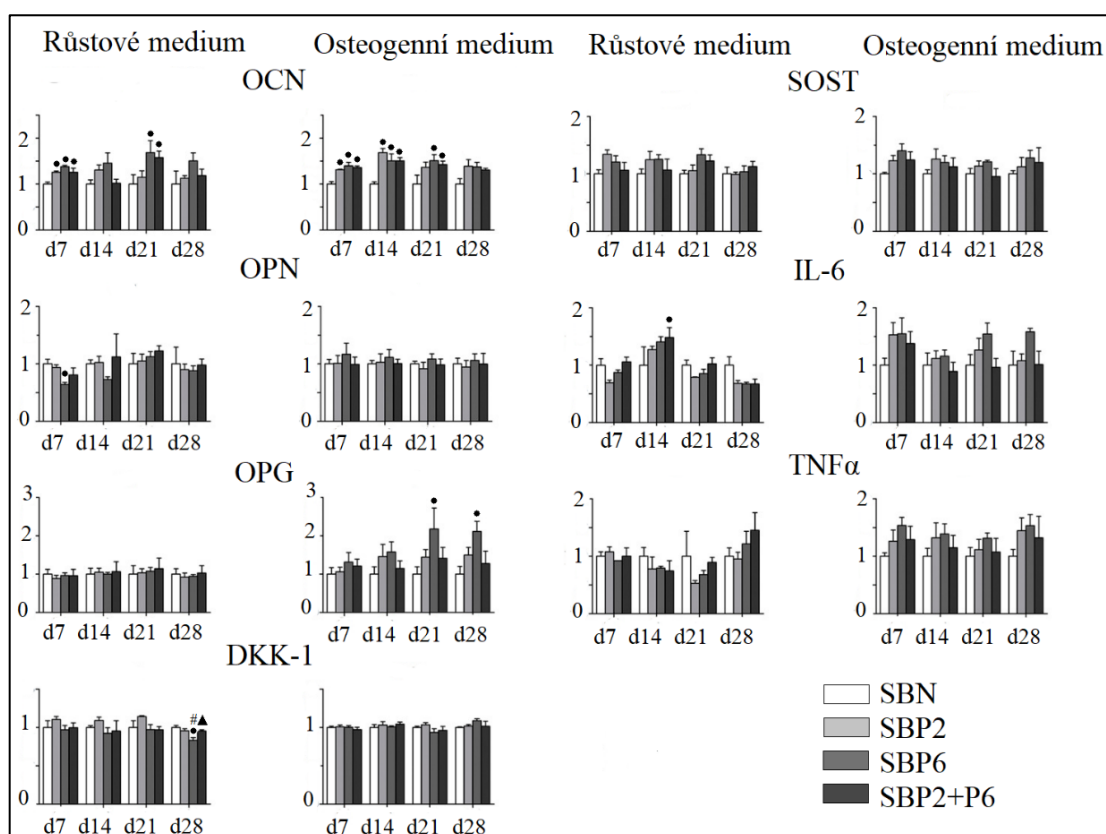


Obrázek 15: Relativní exprese mRNA osteogenních markerů RunX2, kolagenu I, osteokalcinu a kostního sialoproteinu (IBSP). Vztaženo k housekeepingovému genu EEF1. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$ a názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$, ▲ statistický rozdíl vůči všem ostatním skupinám.

6.1.6 Kvantifikace specifických extracelulárních proteinů

7., 14., 21. a 28. den experimentu bylo sbíráno kulturační medium a následně byl kvantifikován obsah markerů kostní diferenciace osteokalcin OCN, osteopontin OPN, osteoprotegerin OPG, dickkopf-related protein 1 DKK-1, SOST, IL- 6 a TNF α (**Chyba! N nalezen zdroj odkazů.**). Signifikantní rozdíly v expresi OCN byly pozorovány v růstovém i diferenciačním mediu. V růstovém mediu vykazovaly 7. den vyšší expresi buňky ve všech skupinách s peptidy, v porovnání s SBN. Vyšší hladiny exprese zůstaly zachovány i 21. den. V osteogenním mediu byly statisticky vyšší hladiny exprese pozorovány během celého

experimentu ve všech skupinách s peptidy. Jediný statisticky významný rozdíl v expresi OPN byl pozorován 7. den ve skupině SBP6 vzhledem k SBN v růstovém mediu. V případě OPG byla vyšší hladina zaznamenána 21. a 28. den v osteogenním mediu ve skupině SBP6 vzhledem k SBN. DKK-1 byl 21. den v růstovém mediu významně nejméně exprimován ve skupině SBP6, v porovnání se všemi ostatními skupinami. Exprese IL-6 byla 14. den v růstovém mediu statisticky vyšší ve skupině SBP2+P6 v porovnání se skupinou SBN. Pro SOST a TNF α nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.



Obrázek 16: Relativní koncentrace extracelulárních proteinů. Vztaženo k expresi v kontrolní skupině SBN. Statistické rozdíly oproti hodnotám ve skupině SBN značeny tečkou pro $p < 0,05$, # statistický rozdíl oproti SBP2, ▲ statistický rozdíl oproti SBP6.

6.1.7 Diskuze

V této studii byla za užití humánních mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně hodnocena biokompatibilita a biologické funkce xenogenního decelularizovaného kostního štěpu s adherovanými biomimetickými peptidy. Aktivita buněk byla sledována v růstovém i osteogenním mediu. Použity byly syntetické biomimetické peptidy odvozené z amelogeninu P2 a P6 náležící do skupiny peptidů s neuspořádanou vnitřní 3D strukturou (IDPs, intrinsically disordered peptides)^{289,290}, která je navíc bohatá na prolinové sekvence²⁹¹. IDPs mohou interagovat s mnoha ligandy a jsou součástí signalizačních kaskád

v mnoha biologických procesech. Mimo jiné se uplatňují během formace krystalů hydroxyapatitu v kostní mezibuněčné hmotě²⁹⁰. Základní myšlenkou práce tedy byla kombinace komerčního kostního štěpu SmartBone® s peptidy kontrolujícími mineralizaci kostní tkáně. Vzhledem ke stále složitějším klinickým případům roste poptávka po nových alternativních terapeutických přístupech, které by nastalé situace dokázaly řešit²⁹². Schopnost indukovat osteogenezi a osseointegraci byla rovněž prokázána i u dalších molekul, například u rekombinantních růstových faktorů, které jsou zároveň vhodné k obohacování různých druhů biomateriálů. Na rozdíl od IDPs jsou však růstové faktory spojeny s výrazně vyššími náklady a dosud nebyla dostatečně prokázána bezpečnost a efektivita jejich použití^{293, 294}. Například v práci Carragee et al. bylo riziko nežádoucích efektů rhBMP-2 hodnoceno jako až 50-násobně vyšší, než se původně uvádělo²⁹⁵. Kromě výše zmíněných výhod jsou navíc IDPs velmi stabilní i v silných organických rozpouštědlech, vhodné ke sterilizaci ethylen oxidem a výrazně levnější a bezpečnější než růstové faktory^{241, 296}. Peptidová sekvence odvozená od růstového faktoru BMP-2 (oblast interagující s receptorem) indukovala osteogenní diferenciaci prasečích MSC, aniž by, na úrovni transkripce, spouštěla chondrogenní procesy²⁹⁷.

Jak je patrné ze snímků z konfokální mikroskopie, v růstovém mediu měly peptidy výrazný pozitivní efekt na podporu proliferační aktivity MSC v porovnání se samotným štěpem. Tato data naznačují, že P2 a P6 mohou poskytovat vhodné podmínky pro expanzi buněk, a tedy pokrytí celého nosiče. Přestože v osteogenním mediu MSC pravděpodobně začaly diferencovat do osteoblastů, a tudíž se dá předpokládat utlumení proliferační aktivity, byl i zde patrný pozitivní vliv peptidů a nedošlo k zastavení dělení buněk.

Hlavní část práce byla věnována hodnocení míry osteogenní diferenciaci MSC nasazených na kostní štěpy s adherovanými peptidy. Jako časný marker osteogenní diferenciaci byla zvolena míra aktivity alkalické fosfatázy. Sedmý den experimentu byl pozorován výrazný pozitivní vliv P6 na aktivitu ALP, což naznačuje zapojení peptidu do iniciálních fází diferenciaci MSC do osteoblastů. Překvapivý fenomén byl pozorován při porovnání aktivity ALP na SBP2, SBP6 a SBP2+P6. Zatímco v počátku experimentu měl lepší výsledek P6, ve druhé fázi převažoval naopak P2. Nicméně při jejich kombinaci bylo v obou časových bodech dosaženo jen zlomku hodnot aktivity stimulované samotnými peptidy. P2 a P6 tedy nepůsobily synergicky, ale došlo naopak k utlumení jejich efektů. Na základě se lze domnívat, že P2 a P6 mohou kompetovat o stejný receptor případně že jimi spouštěné signální dráhy jsou antagonistické. Pomocí qPCR byla dále analyzována exprese mRNA osteogenních markerů RunX2, Col1, OCN a IBSP. Z výsledků vyplývá, že P6

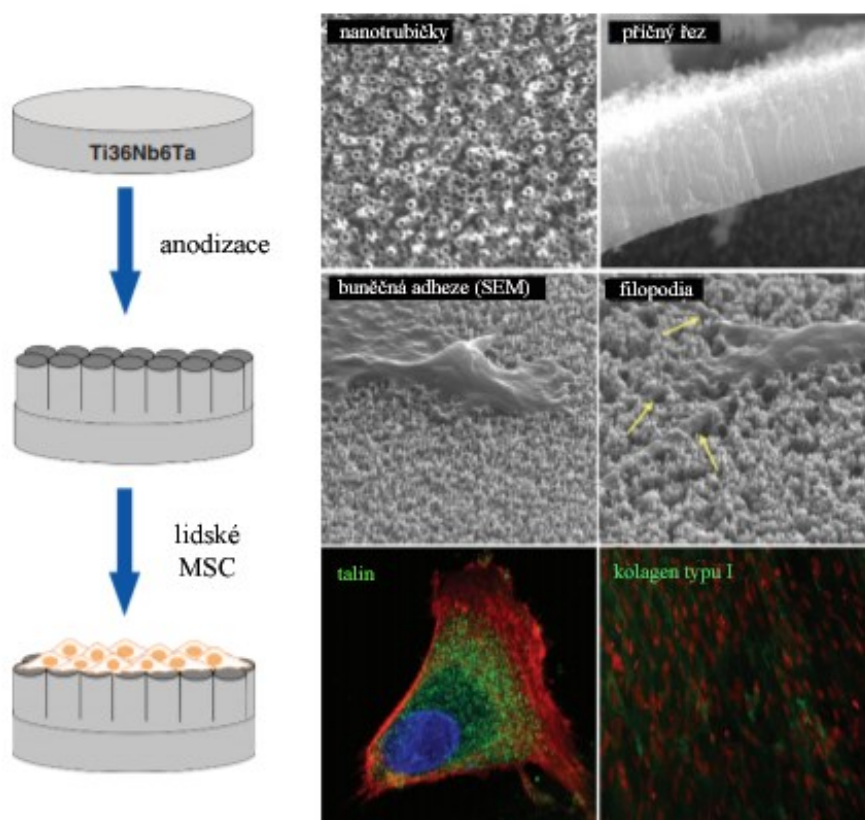
stimuloval expresi mRNA kolagenu I 14. den experimentu. mRNA pro osteokalcin byla silněji transkribována ve skupině SBP6 a SBP2+P6 28. experimentální den. P2 samotný a jeho kombinace s P6 stimuloval expresi mRNA kostního sialoproteinu v pozdních fázích experimentu. Stimulaci transkripce i translace osteokalcinu považujeme za klíčový efekt aplikace IDPs. Osteokalcin, nekolagenní kostní protein obsahující kyselinu γ -karboxyglutamovou, je sekretovaná molekula ovlivňující mineralizaci mezibuněčné hmoty a další metabolické pochody. Má schopnost vázat přes kalciové ionty vznikající krystaly hydroxyapatitu²⁹⁸. Předpokládáme tedy, že obohacení SmartBone® krátkými peptidy vede k mineralizaci nově vznikající kostní hmoty prostřednictvím stimulace syntézy osteokalcinu. Toto zvýšení exprese OCN bylo v závislosti na koncentraci rovněž pozorováno při aplikaci peptidů odvozených od kolagenu typu III, BMP-7 a především BMP-2²⁹⁷. Vzhledem k tomu, že osteokalcin je syntetizován téměř výlučně diferencovanými osteoblasty²⁹⁹, byla u MSC nasazených na nosiče s peptidy pravděpodobně zahájena diferenciace směrem k fenotypu osteoblastů. Pozitivní vliv na syntézu osteokalcinu byl pozorován rovněž u jedné z předchozích studií zabývajících se aktivitou lidských osteoblastů, jimiž byly SmartBone® nosiče s peptidy osazeny²⁴¹. Pomocí poslední metody Luminex byly analyzovány osteogenní markery na úrovni proteinů, tedy po translaci. DKK-1 a SOST se účastní procesů zabraňujících osteogenezi. Jejich hladiny byly v růstovém i osteogenním mediu bez statisticky významných rozdílů, což značí že ani jeden z peptidů nepůsobí na diferenciaci tlumivě. Co se týká exprese prozánětlivého cytokinu IL-6, byla oproti samotnému štěpu zvýšená ve skupině s oběma typy peptidů 14. experimentální den. Toto zjištění naznačuje, že stimulace P2 i P6 zároveň může vést k indukci zánětlivých procesů. Nejvýznamnějšího výsledku bylo dosaženo v syntéze osteokalcinu v osteogenním mediu. Jeho hladina byla v porovnání se skupinou SBN zvýšená ve všech skupinách obsahujících adherované peptidy ve všech časových bodech experimentu. V menší míře byl tento efekt pozorován i v růstovém kultivačním mediu. Tam byl však omezen jen na peptid P6, který je tedy zjevně schopen indukovat syntézu osteogenního markeru i bez přítomnosti suplementů pro kostní diferenciaci. Výrazný pozitivní efekt P6 na syntézu osteokalcinu byl potvrzen i snímky z konfokálního mikroskopu, kde byl tento protein specificky vizualizován. Buňky adherované na nosič SBP6 tvořily 28. experimentální den souvislou vrstvu osteokalcinu.

6.1.8 Shrnutí

Limitací této studie, kterou je třeba brát v potaz je fakt, že proběhla *in vitro*. Při klinických aplikacích mohou být výsledky odlišné. Je zapojeno výrazně více faktorů včetně

proudění krve a lymfy, což jsou podmínky, které nejsou v rámci statické kultivace simulovány. I tak jsou však *in vitro* experimenty zásadní a nepostradatelnou fází výzkumu. Zde byl jednoznačně prokázán pozitivní vliv peptidu P6 adherovaného na povrch SmartBone® na osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních buněk z kostní dřeně prostřednictvím stimulace syntézy osteokalcinu. Pro peptid P2 byla ukázána stimulace buněčné metabolické aktivity.

6.2 Ti36Nb6Ta nanostrukturovaný anodickou oxidací

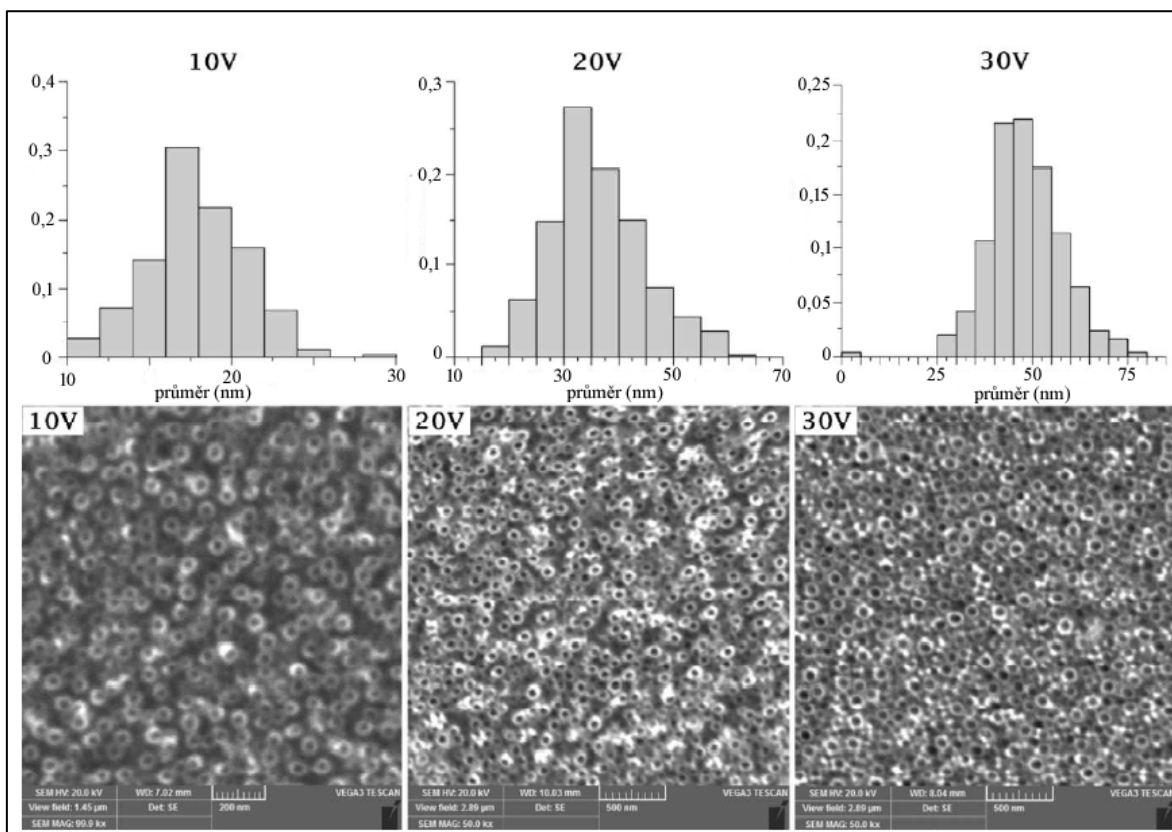


Obrázek 17: Titanová slitina Ti36Nb6Ta nanostrukturovaná anodickou oxidací

6.2.1 Charakterizace vzorků

Histogramy vnitřních průměrů nanotrubiček a snímky ze skenovací elektronové mikroskopie jsou sloučeny do Obrázek 18. Nanotrubičky vytvořené na Ti-36Nb-6Ta měly vnitřní průměr v rozsahu 18 – 46 nm a délku 433 – 3100 nm s tím, že nejdelší a nejširší trubičky byly vytvořeny po použití potenciálu 30 V. S klesajícím potenciálem se rozměry nanotrubiček zmenšovaly v obou ohledech. Kontaktní úhel na vzorcích klesal s rostoucím napětím, respektive s rostoucím vnitřním průměrem trubiček. Signifikantně vyšší smáčivost byla změřena u všech nanostrukturovaných vzorků v porovnání s kontrolním. Po použití 30 V vykazoval vzorek kompletní smáčivost, jejíž hodnota byla neměřitelná a byla tedy stanovena na 0°. Nejnižších hodnot modulu pružnosti dosahovaly trubičky vytvořené

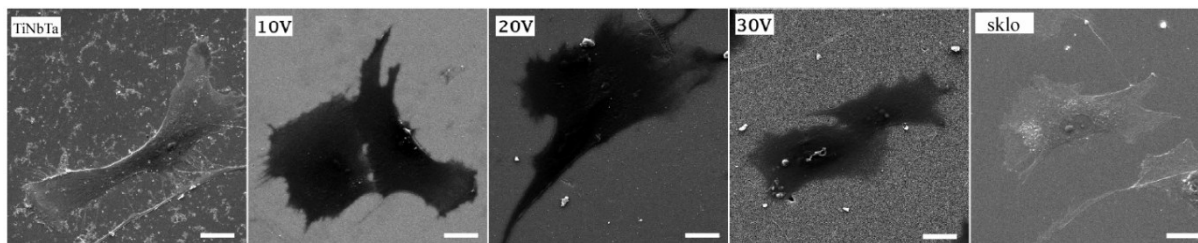
anodizací při 20 V napětí, $E_r = 29,68 \pm 2,68$ GPa, vlačovací tvrdost $HIT = 0,23 \pm 0,02$ GPa. Naopak nejvyšších hodnot bylo dosaženo na nosičích po užití 10 V napětí, $E_r = 48,32 \pm 3,52$ GPa, vlačovací tvrdost nanotrubiček byla $HIT = 0,44 \pm 0,03$ GPa. Při 30 V bylo dosaženo modulu pružnosti $E_r = 30,80 \pm 1,62$ GPa a vlačovací tvrdosti $HIT = 0,30 \pm 0,01$ GPa.



Obrázek 18: Histogramy vnitřních průměrů nanotrubiček vytvořených napětím 10V, 20V a 30V ve vrchní části obrázku. Ve spodní části snímky povrchových struktur ze SEM.

6.2.2 Adheze a morfologie buněk

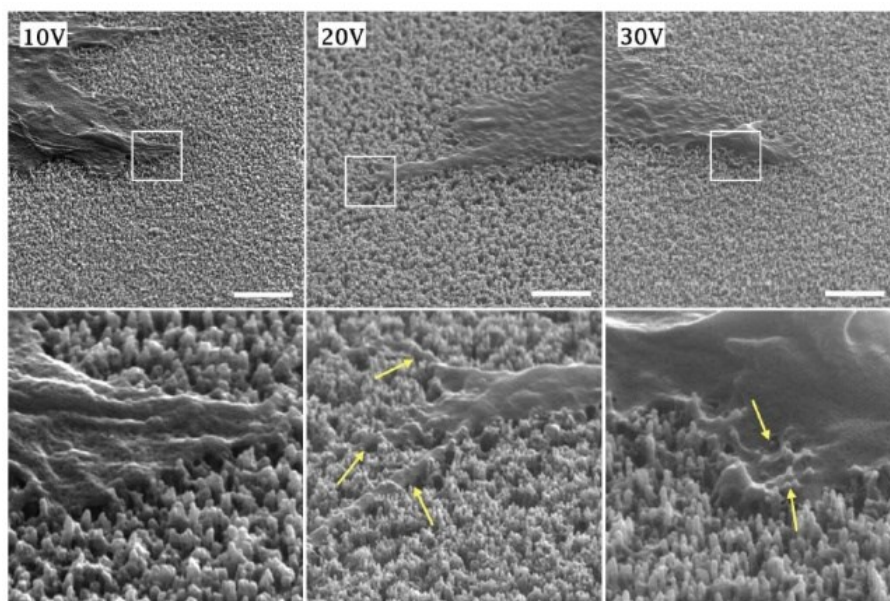
Jak je patrné ze snímků ze skenovací elektronové mikroskopie a z konfokálního mikroskopu, adheze MSC na nosič byla ovlivněna jeho povrchovými charakteristikami.



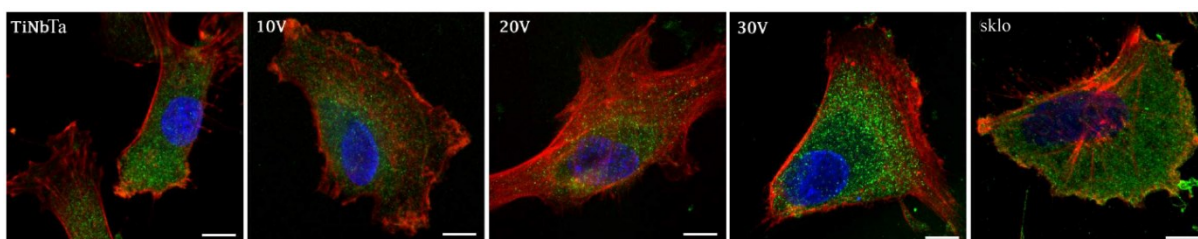
Obrázek 19: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie zobrazující adhezi MSC 24 hodin po nasazení. Velikost měřky 20 μm.

Hladký povrch Ti-36Nb-6Ta bez nanotrubiček a sklo podporovaly roztažené buňky s několika filopodii a se snadno viditelným povrchem. Ploché buňky s dlouhými drobnými

výběžky byly pozorovány na vzorcích po použití 20 V a 30 V napětí (Obrázek 19). Zdá se tedy, že buňky na nanostrukturovaný povrch adherovaly přes tenké výběžky ukotvené mezi trubičkami a v nich (Obrázek 20). Povrch buněk také často kopíroval nanostruktury. Pro kvantitativní hodnocení adheze byl imunohistochemicky vizualizován hlavní protein talin. Jak lze vidět na Obrázek 21, talin byl přítomen ve formě drobných výrazných klastrů na vzorcích 20V a 30V, zatímco na nemodifikovaném povrchu a na skle bylo detekováno spíše homogenní rozložení. Kromě toho rostla intenzita signálu talinu se zvyšujícím se průměrem nanotrubiček. Nejvyšších hodnot však bylo dosaženo na skle.



Obrázek 20: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie zobrazující detaily adheze buněk k nanostrukturovaným titanovým nosičům 24 hodin po nasazení. Velikost měřky 2 μm . Výřezy jsou zvětšeny dvojnásobně. Zobrazují kontakt buněčné membrány s nanotrubičkami a přizpůsobení membrány topografii povrchu nosiče.

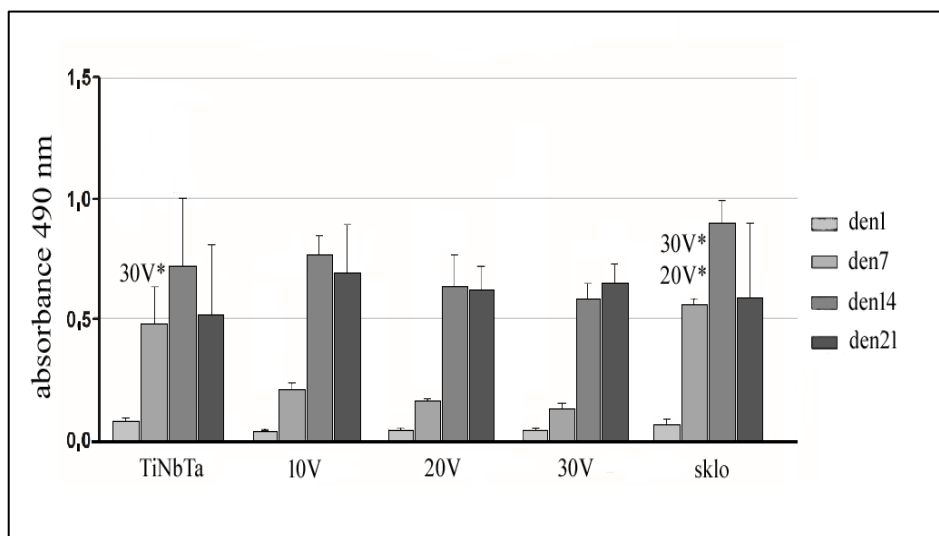


Obrázek 21: Snímky z konfokální mikroskopie zobrazující adhezivní molekuly talin (zelený signál), F-aktin (červený signál) a jádra (modrý signál) 48 hodin po nasazení. Velikost měřky 20 μm .

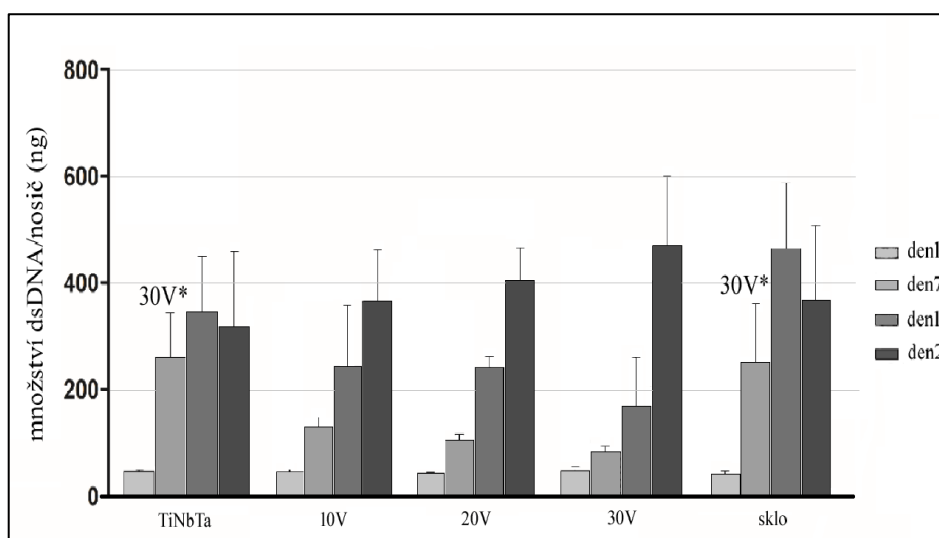
6.2.3 Metabolická aktivita a proliferace buněk

K měření metabolické aktivity buněk byl použit MTS test (Obrázek 22). Buňky nasazené na vzorcích 20V a 30V byly sedmý experimentální den výrazně méně metabolicky aktivní v porovnání s nemodifikovaným Ti-36Nb-6Ta a sklem. V následujících experimentálních dnech však statisticky významné rozdíly naměřeny nebyly. I množství

dsDNA bylo 7. den signifikantně nižší na 30V než na neupraveném nosiči a skle (Obrázek 23). V ostatní dny nebyly naměřeny rozdíly.



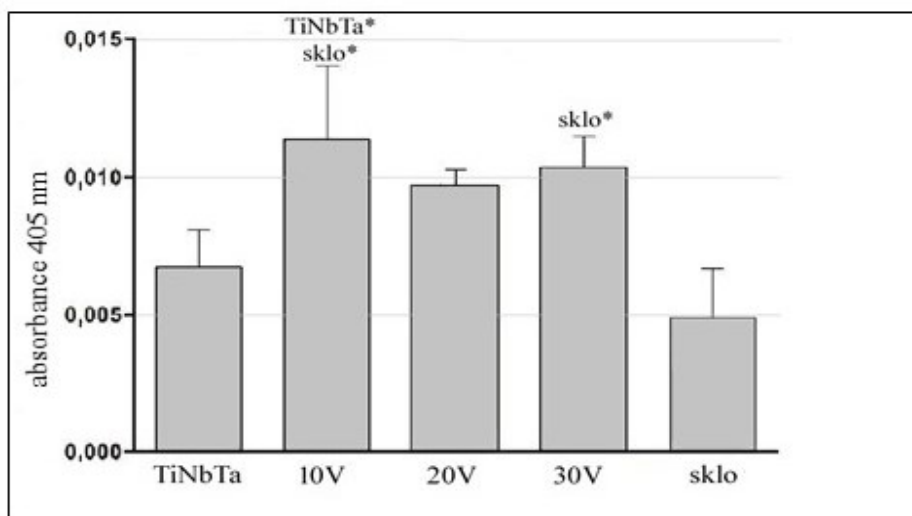
Obrázek 22: Metabolická aktivita buněk měřená MTS testem. Absorbance produktu byla měřena při vlnové délce 490 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$.



Obrázek 23: Kvantifikace množství buněčné dsDNA (ng/nosič). Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

6.2.4 Aktivita alkalické fosfatázy

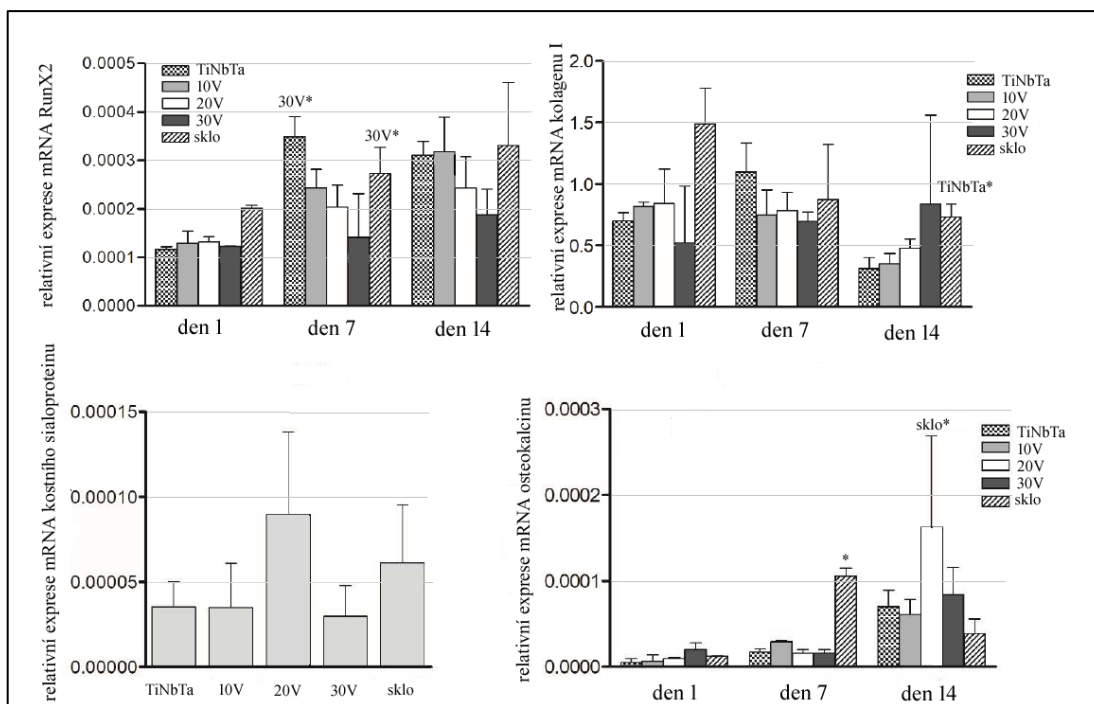
Raný marker osteogeneze – aktivita enzymu ALP, který zajišťuje mineralizaci kostní matrix, byla měřena 7. experimentální den (Obrázek 24). Buňky na 10V nosiči dosahovaly signifikantně vyšších hodnot než buňky na nemodifikovaném povrchu a na skle. Rovněž úprava povrchu titanového nosiče 30V napětím vedla ke stimulaci aktivity alkalické fosfatázy, opět v porovnání se sklem.



Obrázek 24: Aktivita enzymu alkalické fosfatázy. Absorbance produktu měřena při vlnové délce 405 nm. Statistické rozdíly značeny názvem skupiny se symbolem hvězdičky pro $p < 0,001$.

6.2.5 Relativní exprese mRNA osteogenních markerů

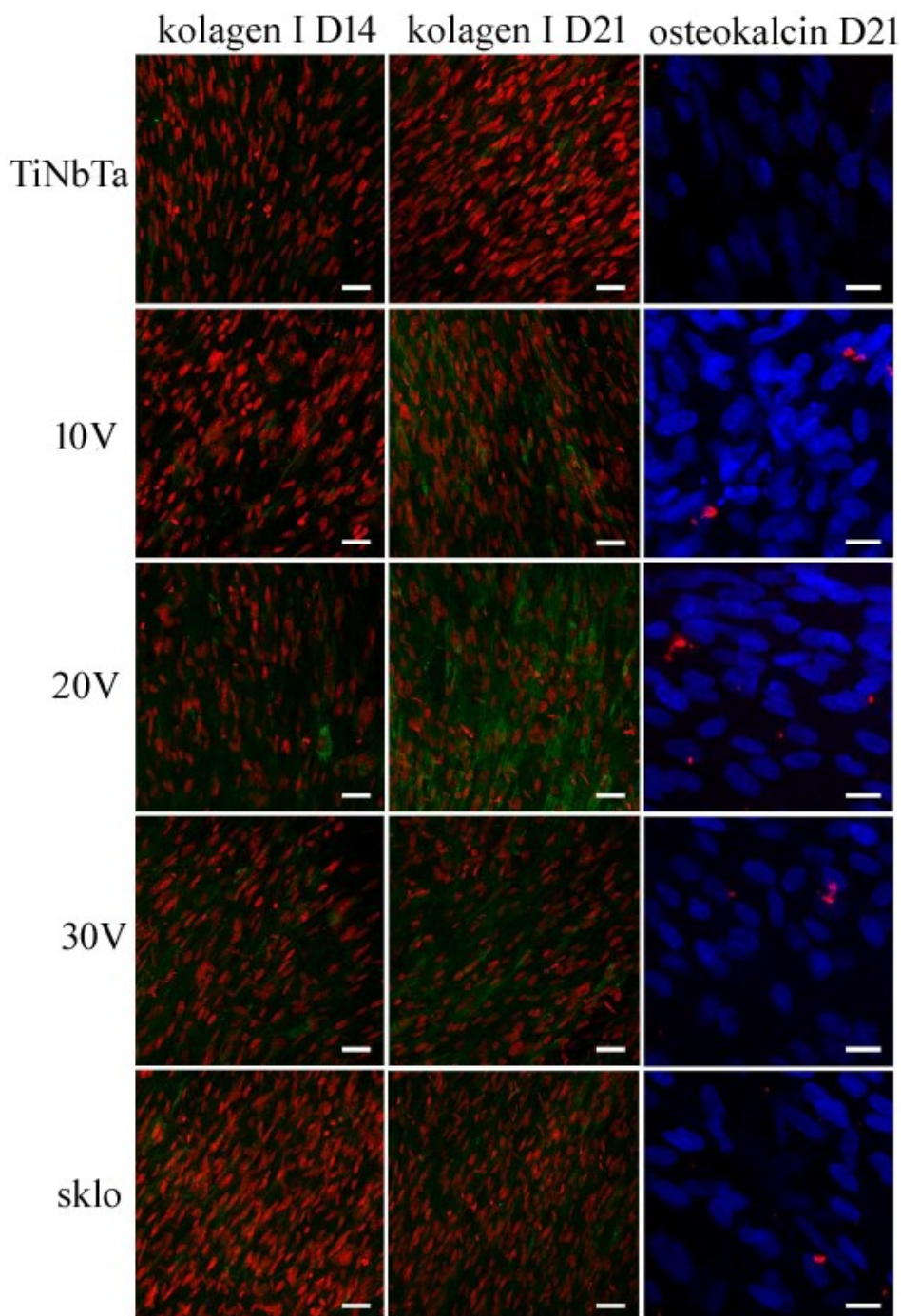
Metodou qPCR byla měřena exprese mRNA osteogenních markerů RunX2, kolagenu typu I, OCN a IBSP (Obrázek 25). Exprese mRNA pro raný marker RunX2 byla první den bez statisticky významných rozdílů. Na všech vzorcích kromě 30V do sedmého dne vzrostla. Signifikantního rozdílu bylo dosaženo mezi skupinami TiNbTa bez úprav a 30V, respektive sklo a 30V, kdy v obou případech byla exprese na vzorku 30V nižší. Po dalším týdnu experimentu zůstala transkripce mRNA pro RunX2 v podstatě bez rozdílů. V případě syntézy mRNA pro kolagen typu I byl jediný statisticky významný rozdíl naměřen 21. experimentální den mezi nemodifikovaným nosičem a sklem, kdy na skle byly naměřeny vyšší hodnoty. Poslední den experimentu navíc exprese mRNA klesla pod úroveň z prvního dne kromě skupiny 30V. mRNA pro IBSP byla 21. den přepisována bez statisticky významných rozdílů ve všech skupinách. Gen pro osteokalcin byl první den transkribován v malé míře a ve všech skupinách srovnatelně. 14. den bylo nejvyšších hodnot relativní exprese dosaženo u buněk kultivovaných na skle. Na skle byl po dvou týdnech zároveň pozorován vrchol transkripce osteokalcinu. Detekovaná hodnota byla signifikantně nižší než v případě 20V.



Obrázek 25: Relativní exprese mRNA osteogenních markerů. Vztaženo k housekeepingovému genu EEF1. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$. Exprese mRNA IBSP byla měřena 21. den experimentu.

6.2.6 Vizualizace kolagenu typu I a osteokalcinu

Pomocí imunohistochemického barvení byly vizualizovány proteiny kostní extracelulární hmoty kolagen I a osteokalcin (Obrázek 26). Jak je patrné ze snímků z konfokální mikroskopie 14. experimentální den byl kolagen typu I v nejvyšší míře přítomen na vzorcích s nejširšími a nejdelšími trubičkami, tedy 30V. Po dvou týdnech experimentu byla patrná přímá úměra mezi množstvím kolagenu I a rostoucími rozměry nanotrubiček. Tři týdny po nasazení se však tento trend změnil a nejvýraznější signál byl pozorován na vzorku strukturovaném napětím 20 V. V oba časové body však bylo nejméně kolagenu I detekováno na skle, což je výsledek v rozporu s hodnotami relativní exprese jeho mRNA. Tento nesoulad mohl být způsoben řadou posttranskripčních modifikací, které předcházejí translaci daného proteinu a rovněž tím, že primární protilátka je specifická pro prokolagen I, nikoli kolagen po posttranslačních modifikacích. Počátky syntézy osteokalcinu byly pozorovány na všech nanostrukturovaných vzorcích a v menší míře i na skle. Na přítomnost osteokalcinu zůstal 21. den negativní TiNbTa bez úprav anodizací.



Obrázek 26: Snímky z konfokální mikroskopie. Imunohistochemické barvení kolagenu typu I 14. a 21. den experimentu. Kolagen I má zelený signál, jádra červený. Zvětšení 40×. Velikost měrky 50 μm. Imunohistochemické barvení osteokalcinu (červený signál) 21. den experimentu, jádra (modrý signál). Zvětšení 63x, velikost měrky 20 μm.

6.2.7 Diskuze

V předkládané studii byla představena nová slitina titanu typu β Ti-36Nb-6Ta s nanostrukturovaným povrchem coby biokompatibilní materiál využitelný v regenerativní medicíně kosti. V posledních letech byl právě tento β -typ titanových slitin vyzdvihován

kvůli svým mechanickým vlastnostem. Biokompatibilita a potenciální biomedicínské aplikace byly podrobně shrnuty v předchozích pracích³⁰⁰. Slitiny již používané v klinické praxi jsou hlavně typu α , případně $(\alpha+\beta)$ a vyznačují se výrazně vyšším Youngovým modulem než námi testovaný β -typ³⁰¹ i než má přirozená kostní tkáň.

Slitina Ti-Nb-Ta byla jako materiál pro tkáňové inženýrství poprvé uvažována v práci Hussein et al., kteří ukázali velmi dobrou biokompatibilitu slitiny Ti-17Nb-6Ta na HeLa buňkách, desetkrát vyšší odolnost korozi a výrazně nižší Youngův modul než má Ti-6Al-4V²⁸⁵. Navíc vrstvička oxidů, která spontánně vzniká na povrchu nosiče zabraňuje uvolňování kovových iontů a funguje tak jako prevence koroze³⁰². Kromě toho slouží tato vrstva jako vhodný podklad pro formaci apatitových krystalů³⁰³.

Biokompatibilita slitiny Ti-36Nb6Ta byla prokázána v naší předchozí studii. V porovnání s běžně používaným cpTi nebo Ti-6Al-4V byly také zjištěny vhodnější biomechanické vlastnosti s ohledem na implantaci do kosti. Modul pružnosti dosáhl 60 GPa³⁰⁴, dále může být snižován anodickou oxidací za vzniku nanotrubiček. V této studii bylo nejnižšího Youngova modulu dosaženo ve skupině upravené napětím 20V, a to $E_r = 29,68 \pm 2,68$ GPa, což jsou hodnoty výrazně více srovnatelné s pružností přirozené kostní tkáně (10 – 30 GPa) a výrazně nižší než u slitiny Ti-35Nb-6Ta (50 – 75 GPa)³⁰⁴.

Anodická oxidace je efektivním postupem úpravy povrchu titanových slitin. Vznikají při ní nanotrubičky s definovaným průměrem a délkou, které zvyšují bioaktivitu nosičů³⁰⁵. Capellato et al. popsali pozitivní korelaci mezi viabilitou fibroblastů a přítomností nanotrubiček na povrchu slitiny Ti-30Ta³⁰⁶. V literatuře je jako kritické rozmezí pro adhezi a růst krysích MSC uváděno 30 a 50 nm³⁰⁷. V předchozí studii jsme ukázali, že pro růst a diferenciaci osteoblastů na povrchu cpTi byly optimální nanotrubičky o rozměru 66 nm vytvořené anodickou oxidací při 20V³⁰⁸. Pro tuto studii tedy byly pro tvorbu nanostruktur zvoleny hodnoty napětí 10, 20 a 30V se záměrem porovnat vliv povrchové úpravy na chování lidských MSC nasazených na povrch Ti-36Nb-6Ta.

Snímky získané skenovací elektronovou mikroskopií ukazují, že došlo k vytvoření nanotrubiček o průměrném vnitřním průměru 18, 36 a 46 nm a o průměrné délce 433, 2100 a 3100 nm. Detailní chemické složení slitiny Ti-36Nb-7Ta bylo již dříve popsáno ve studii Fojta et al., která popisuje, že podíl titanu v nanostrukturách klesá úměrně zvyšování podílu niobu a tantalu a že povrch nanotrubiček je tvořen oxidy titanu, niobu a tantalu (TiO_2 , Nb_2O_5 , Ta_2O_5)³⁰⁹. Právě přítomnost oxidů niobu na nanostrukturovaných titanových nosičích může být prospěšná pro interakci buněk s materiálem. Úprava povrchu nosiče z cpTi $\text{TiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ ve srovnání s úpravou pouze TiO_2 vedla k výrazně efektivnější adhezi

a proliferaci primárních lidských osteoblastů³¹⁰. Tyto výsledky jsou v souladu se zjištěním Qadir et al., kteří uvedli, že kombinace oxidů titanu, niobu a zirkonia pokrývajících nanotrubičky na povrchu Ti35Zr28Nb je vhodná pro zachycení a růst SaoS-2 buněk³¹¹.

Jak bylo zjištěno již dříve, chování buněk na nosiči je úzce spjato s jeho povrchovým napětím a morfologií, které mohou být snadno modifikovány³¹². Hrubé povrchy s vysokou povrchovou energií jsou velmi vhodné pro adsorpci proteinů z kultivačního media³¹³, což usnadňuje adhezi buněk a potenciálně také osseointegraci a stabilitu implantátu v kosti. Z tohoto důvodu jsme přistoupili k měření kontaktního úhlu na všech nanostrukturovaných nosičích i na kontrolním nosiči. Pozorovaný trend byl v souladu s dříve publikovanými poznatky a to, že se vzrůstajícím napětím při anodické oxidaci rostla i hydrofilita nosičů³¹⁴. S vyšším napětím klesal kontaktní úhel až k hodnotě blízké 0°. To přičítáme vtažení kapaliny do nanotrubiček, což znemožnilo odečíst hodnoty kontaktního úhlu.

Iniciální adheze buněk na povrch nosiče přímo ovlivňuje všechny další buněčné procesy jako je přežití, proliferace a diferenciací³¹⁵, je tedy zcela zásadní pro míru úspěšnosti implantátu. V naší studii byla pomocí detailních snímků ze skenovací elektronové mikroskopie sledována adheze na všechny nanostrukturované povrchy. Na SEM s vysokým rozlišením také byla zachycena filopodia v nanotrubičkách a mezi nimi. K objasnění efektu nanotrubiček na formaci fokálních adhezí byla použita specifická vizualizace důležité struktury v jejich komplexu - talinu³¹⁶. Imunohistochemické barvení odhalilo drobné shluky talinu v buněčné cytoplazmě. 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 nm³¹⁷.

Co se týká vlivu morfologie nanotrubiček na chování kmenových buněk nebyl, navzdory četným studiím, nalezen konzistentní závěr. Pro lidské mezenchymální buňky bylo zjištěno, že snadněji adherují na povrchy se strukturami pod 30 nm, které jsou vhodné pro tvorbu integrinových klastrů, zatímco rozměry nad 100 nm vedou k mechanickému stresu a indukují tak osteogenní procesy³⁰⁷. Oproti tomu Lv et al. označili za optimální rozměr pro osteogenezi lidských MSC z tukové tkáně průměr nanotrubiček okolo 70 nm³¹⁸. MSC z potkanů vykazovaly lepší adhezi a diferenciaci na nanotrubičkách TiO₂ s průměrem 15 – 30 nm³¹⁹. V naší předchozí studii jsme dospěli k závěru, že pro adhezi i osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk byly nejvhodnější struktury o rozměrech 50 – 80 nm, jejichž efekt byl ještě umocněn pre-expozicí simulované tělní tekutiny³²⁰. Současná práce ukazuje jako nejvhodnější pro adhezi a osteogenezi lidských MSC TiO₂ nanotrubičky s průměrem 15 nm³²¹.

Biokompatibilita nové slitiny titanu byla ukázána pomocí MTS testu a kvantifikace buněčné dsDNA, jejichž hodnoty rostly po celou dobu experimentu. Kromě toho byla sledována transkripce genů pro RunX2, kolagen I, kostní IBSP a OCN, čímž byly pokryté markery rané, střední i terminální fáze osteogenní diferenciaci³²². Hladké povrchy stimulovaly v počátcích experimentu buňky k syntéze mRNA RunX2. Oproti tomu nanotrubičky významně zvýšily expresi mRNA kolagenu typu I a to především ve skupině 20V s průměrem trubiček 36 nm. Stejně tak byla stimulována transkripce genů pro IBSP a OCN, což značí probíhající terminální diferenciaci do osteoblastů³²³. Přínos nanostruktur byl pozorován také na zvýšené aktivitě alkalické fosfatázy, kdy byl nejvíce patrný na 18 nm trubičkách na vzorku 10V. Tato data částečně korelují s předchozími experimenty, ve kterých byl zjištěn pozitivní efekt mikro a nanostruktur na povrchu β -titanu na osteogenezi lidských MSC. Povrch chemicky leptané slitiny Ti-40Nb rovněž stimuloval aktivitu ALP lidských MSC, přičemž modifikace povrchových struktur neovlivnila negativně buněčnou adhezi jako se stalo v případě Ti-6Al-4V a neupraveným Ti-40Nb³²⁴. Dalším zdrsněním mikrostrukturovaného povrchu Ti-32Nb2Sn bylo dosaženo stimulace tvorby fokálních adhezí, proliferace a diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk³²⁵. V *in vivo* studii na prasečím modelu byla po implantaci nosiče s TiO₂ nanotrubičkami o rozměru 15 – 30 nm zaznamenána zvýšená syntéza kolagenu typu I³²⁶.

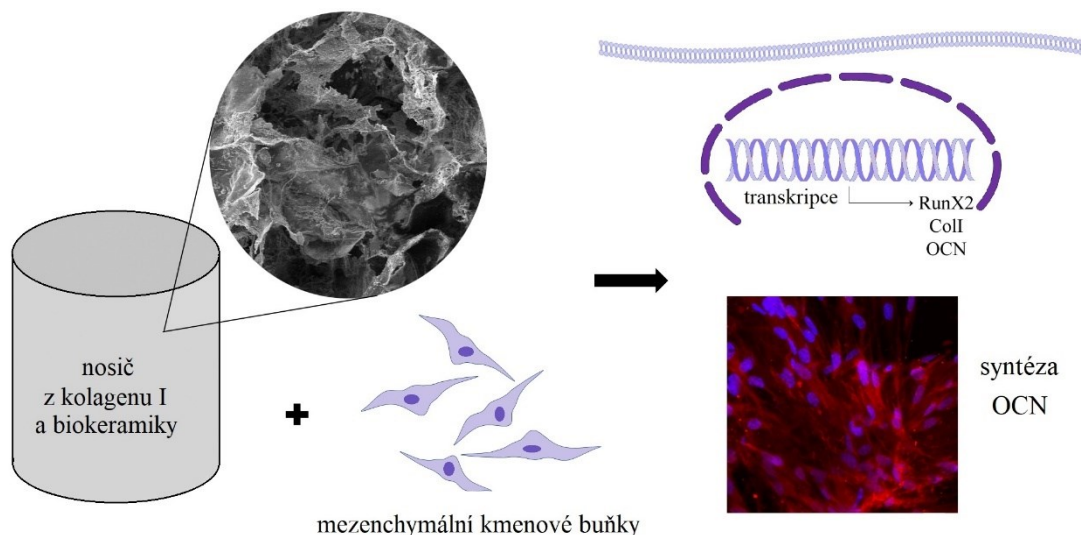
Je třeba zmínit, že aktuálně prováděné *in vivo* studie přinesly slibné výsledky použitých porézních β -titanových implantátů. Na MG63 linii osteoblastů byla potvrzena jeho výborná biokompatibilita a schopnost podporovat formaci apatitových krystalů *in vitro*, stejně jako růst nové kostní tkáně v okolí implantátu *in vivo* na králičím modelu³²⁷. Testována byla i porézní slitina Ta-15Nb se slibnými výsledky ohledně osteointegrace³²⁸.

6.2.8 Shrnutí

Na základě všech výše uvedených studií a námi získaných výsledků lze předpokládat, že nanostrukturovaná slitina Ti-36Nb-6Ta je vhodná k podpoře formace kostí *in vivo* a má potenciální využití v regenerativní medicíně. Nanostrukturované titanové slitiny tedy mohou být aplikovány při reoperacích kloubních náhrad po selhání implantátu, kde je třeba stimulovat stávající kostní tkáň. Kromě velkého povrchu vhodného pro buněčnou adhezi přinášejí nanostruktury také možnost využití jako nosného systému pro lokální dodávání léčiv, čímž by byl silněji podpořen proces hojení a regeneraci³²⁹. Nicméně vzhledem k tomu, že titanové sloučeniny jsou vhodné především k dlouhodobým aplikacím

a tkáňovým náhradám, je třeba v dalších studiích pečlivě ověřit jejich případnou imunogenicitu a chování v dlouhodobých zátěžových testech.

6.3 Pěnový nosič z kolagenu typu I a biokeramiky



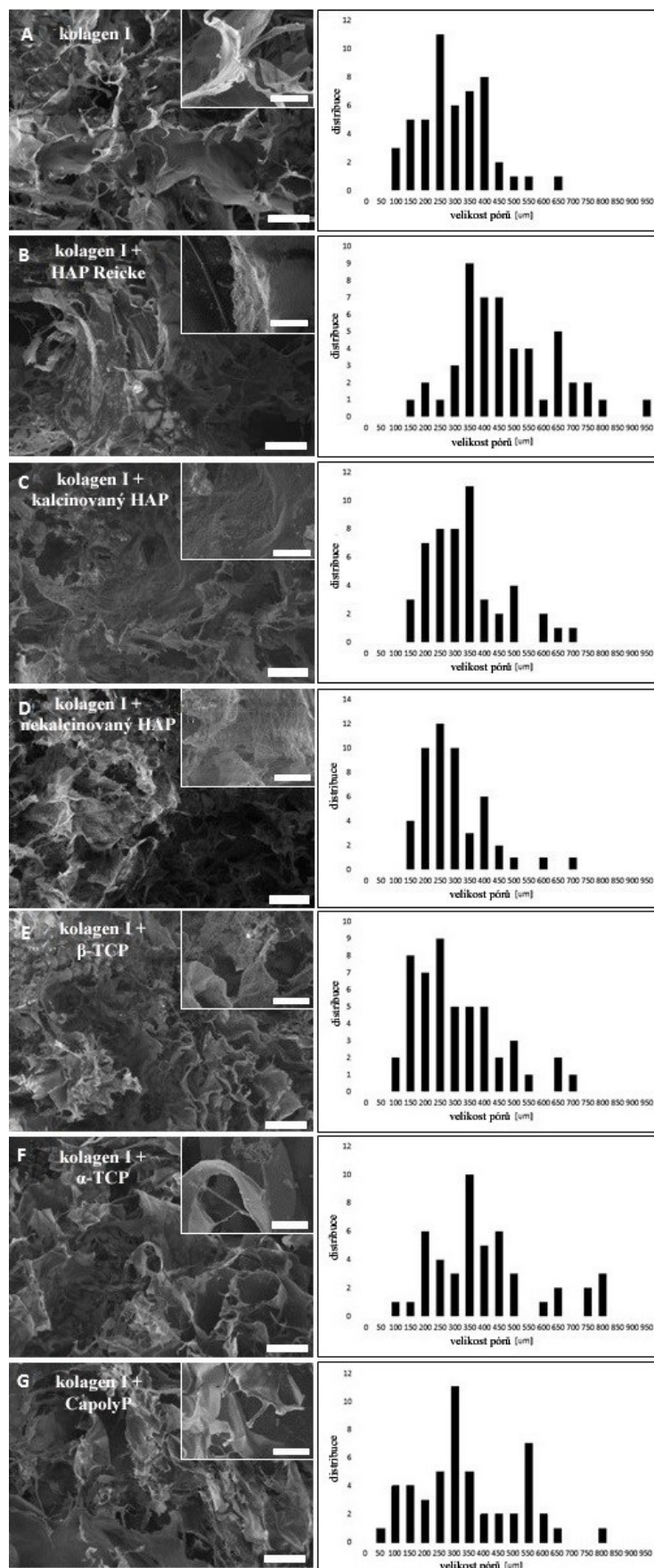
Obrázek 27: Kolagenová pěna obohacená kalcium fosfáty a hydroxyapatitem.

6.3.1 Struktura a morfologie nosiče

Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie ukazují povrch nosičů s rovnoměrně rozmístěnými póry (Obrázek 28). Nejmenší póry byly přítomny na nosiči z kolagenu I (skupina A) a na nosiči z kolagenu I s příměsí nekalcinovaného hydroxyapatitu ve skupině D ($320\pm 120\ \mu\text{m}$, respektive $320\pm 110\ \mu\text{m}$). Naopak nejvyšší hodnoty byly naměřeny na nosiči z kolagenu typu I s hydroxyapatitem Reicke (skupina B), a to $490\pm 170\ \mu\text{m}$. Je zřejmé, že každý druh hydroxyapatitu se v morfologii nosiče projevil ve zcela jiném směru. I trikalciumfosfáty ovlivnily velikost pórů rozdílně. Obecně však lze říci, že přidání biokeramiky do čisté kolagenové pěny vedlo ke strukturálním změnám nosiče.

Tabulka 5: Velikost pórů v jednotlivých nosičích, uvedeno v μm .

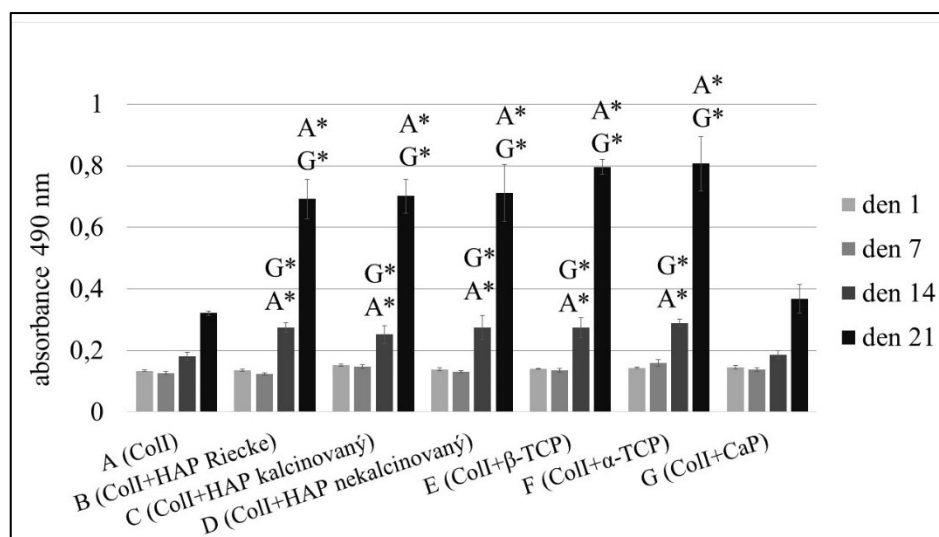
| Vzorek | Velikost pórů [μm] |
|----------------------------|---------------------------------|
| A (Coll) | 320 ± 120 |
| B (Coll+HAP Reicke) | 490 ± 170 |
| C (Coll+HAP kalcinovaný) | 360 ± 130 |
| D (Coll+HAP nekalcinovaný) | 320 ± 110 |
| E (Coll+ β -TCP) | 330 ± 150 |
| F (Coll+ α -TCP) | 460 ± 230 |
| G (Coll+CapolyP) | 370 ± 170 |



Obrázek 28: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie znázorňující povrchovou strukturu pěnových nosičů. Velikost měřky 200 μm , respektive 50 μm . V pravé části histogramy velikosti a distribuce pórů na nosičích.

6.3.2 Metabolická aktivita

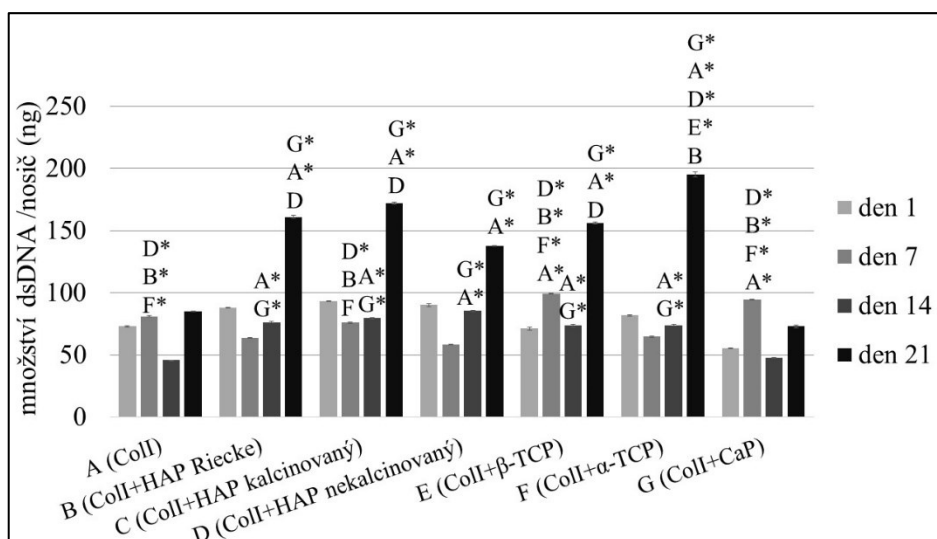
Během 21 dní trvajícího experimentu rostla viabilita buněk měřená MTS testem po celou dobu (Obrázek 29). Statisticky významné rozdíly byly naměřeny 14. a 21. den. Na nosičích z čistého kolagenu I a z kolagenu kombinovaného s CapolyP byly hodnoty signifikantně nižší než v ostatních experimentálních skupinách. Získané výsledky ukazují na vhodnou mechanickou stimulaci buněk okolním prostředím, a to po celé tři týdny.



Obrázek 29: Metabolická aktivita lidských MSC měřená MTS testem. Absorbance produktu měřena při vlnové délce 490 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Statisticky významné rozdíly značeny skupinou s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

6.3.3 Kvantifikace obsahu buněčné dsDNA

Celkový obsah buněčné dsDNA měřený Quant-iT dsDNA kitem (Obrázek 30) je naprosto v souladu s daty z MTS testu. Míra buněčné proliferace byla významně nižší na nosičích z čistého kolagenu I a z kolagenu kombinovaného s CapolyP. Na těchto dvou vzorcích zůstal počet buněk téměř neměnný po celou dobu experimentu. Zatímco v ostatních skupinách byl pozorován průběžný nárůst hodnot koncentrace dsDNA.

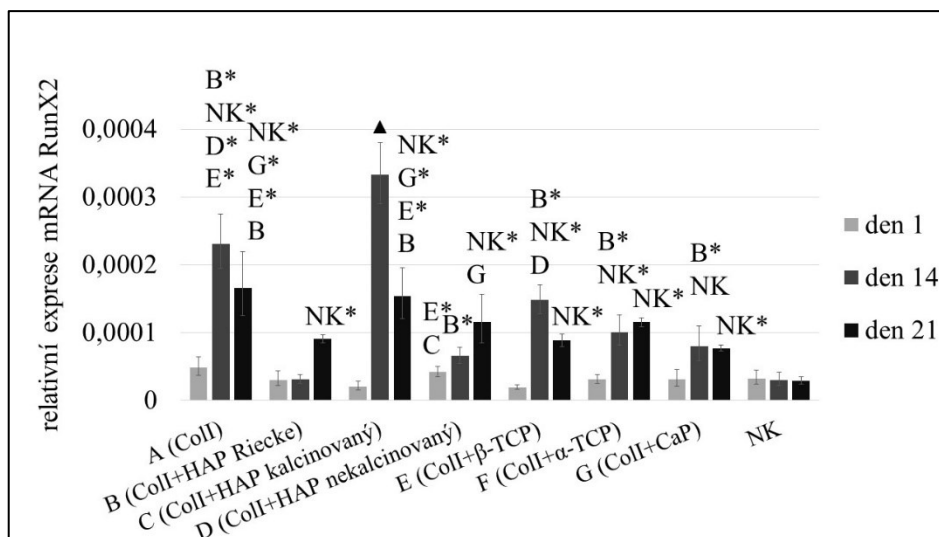


Obrázek 30: Kvantifikace obsahu buněčné dsDNA. Uvedena hodnota v ng/nosič. Statisticky významné rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$, s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

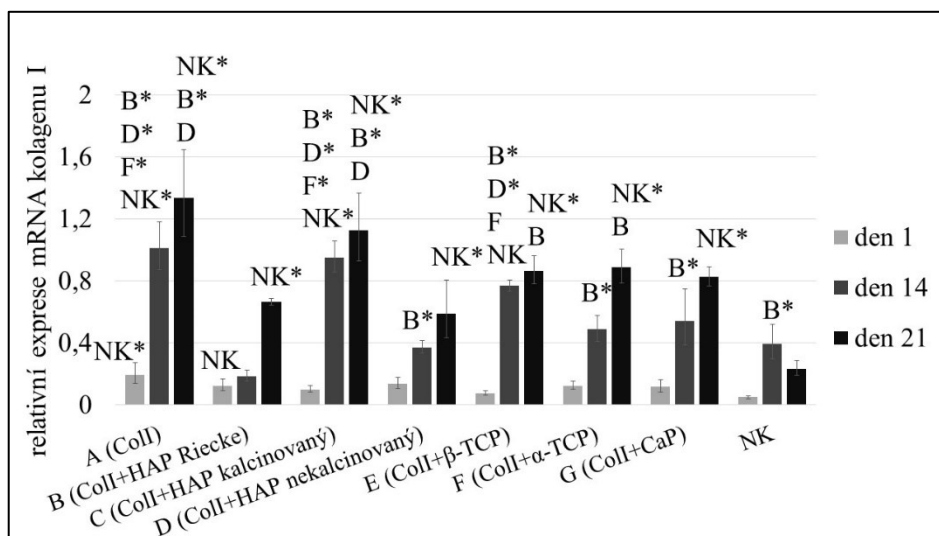
6.3.4 Exprese mRNA osteogenních markerů

Jako marker časně osteogenní diferenciace byl zvolen transkripční faktor RunX2, který je zásadní pro regulaci dalších kroků osteogeneze. Relativní hodnoty exprese byly měřeny 1., 14. a 21. experimentální den (Obrázek 31). Po dvou týdnech kultivace bylo dosaženo signifikantně vyšších hodnot na všech vzorcích než na negativní kontrole kultivované na plastu. Nejvyšší exprese byla naměřena na nosiči z kolagenu typu I s přidavkem kalcinovaného HAP. V poslední sledovaný den, po třech týdnech experimentu, byl zaznamenán pokles mRNA RunX2 ve skupinách A, C, E, F a G. Oproti tomu ve skupinách B a D (kolagen I+HAP Reicke, kolagen I+nekalcinovaný HAP) exprese dále rostla, což značí, že v těchto dvou skupinách byla osteogeneze opožděna oproti ostatním experimentálním skupinám.

Jako znak střední fáze osteogeneze byla zvolena exprese mRNA pro kolagen typu I. Jak je dále patrné z Obrázek 32 ve všech experimentálních skupinách relativní množství mRNA po celou dobu experimentu rostlo, s výjimkou negativní kontroly (buňky kultivované na plastiku), kde byl po 14. dnu zaznamenán pokles. 21. den byly hodnoty v negativní kontrole signifikantně nejnižší. Kontrolní skupina byla následována nosiči z kolagenu I+HAP a z kolagenu I+nekalcinovaný HAP. Naopak nejvyšší hodnoty relativní exprese byly naměřeny na vzorku a z čistého kolagenu I a na vzorku C (kolagen I+kalcinovaný HAP). Tyto výsledky jsou v souladu s expresí mRNA transkripčního faktoru RunX2, která byla rovněž nejvyšší ve skupinách A a C, což pravděpodobně vedlo ke stimulaci transkripce mRNA kolagenu I.



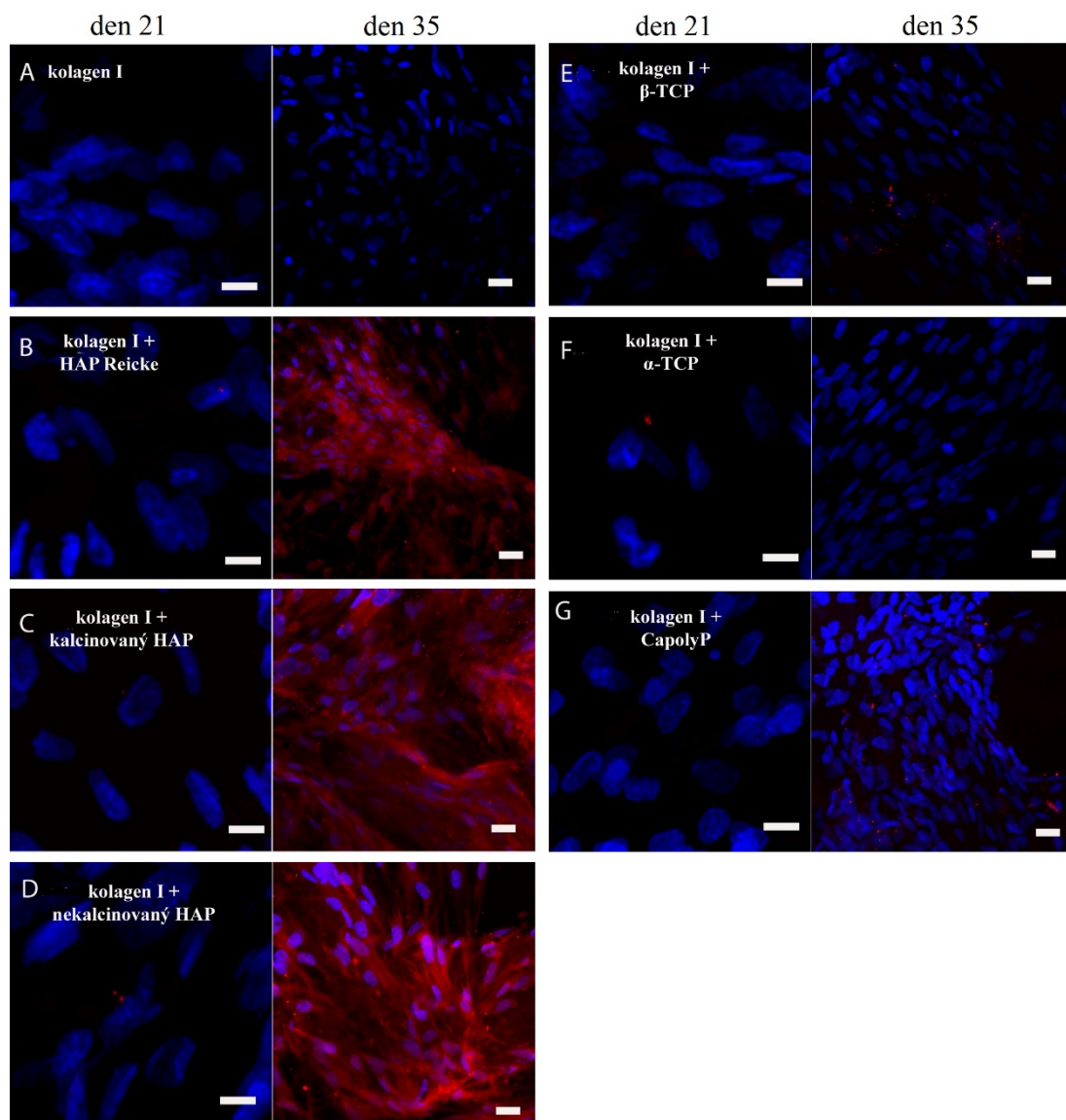
Obrázek 31: Relativní exprese mRNA transkripčního faktoru RunX2, vzaženo k EEF1. Signifikantní rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$, názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$ a trojúhelníkem pro statisticky nejvyšší hodnotu s $p < 0,001$.



Obrázek 32: Relativní exprese mRNA kolagenu typu I, vzaženo k EEF1. Signifikantní rozdíly značeny názvem skupiny pro $p < 0,05$ a názvem skupiny s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

6.3.5 Imunohistochemická vizualizace osteokalcinu

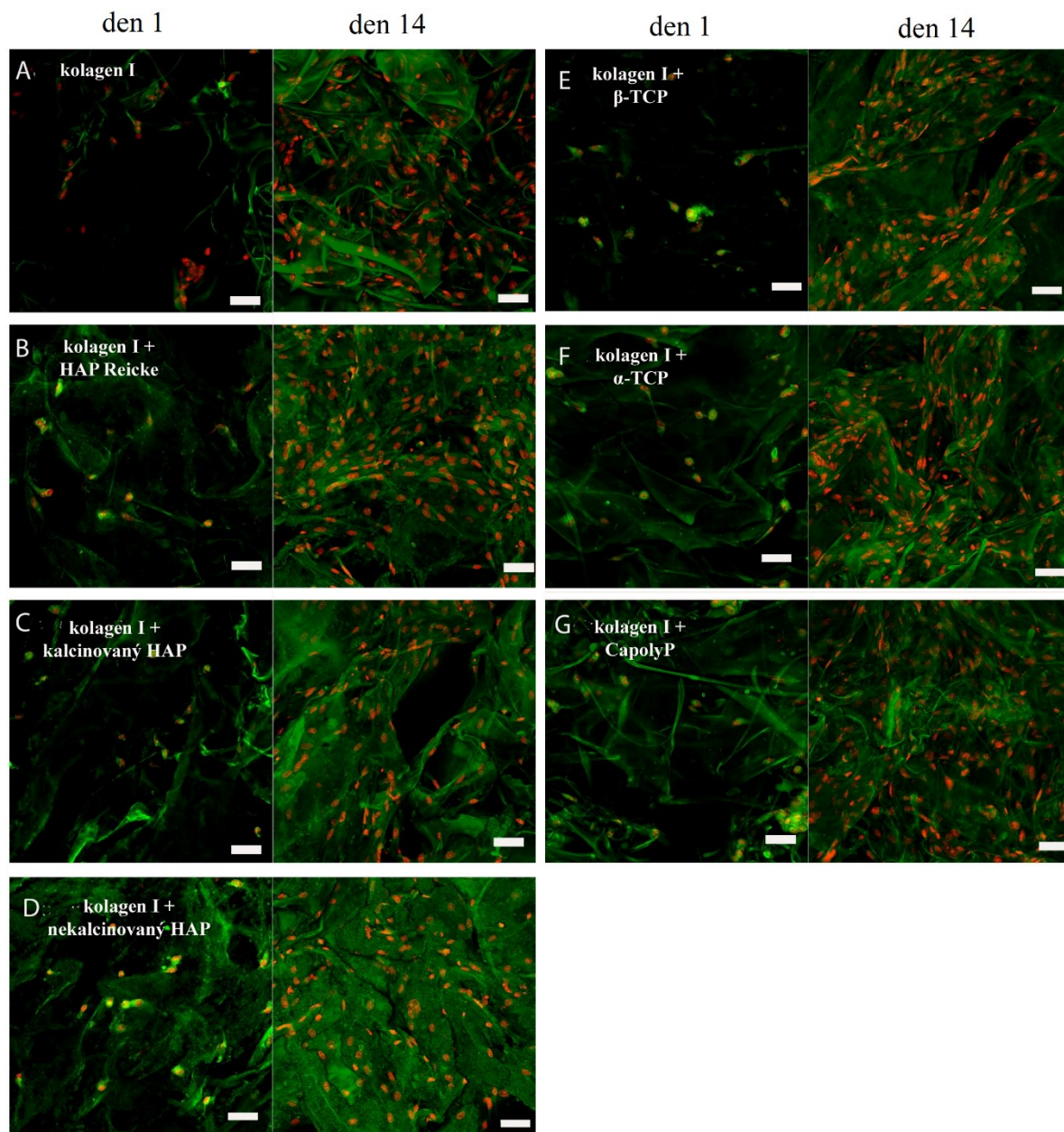
Syntéza extracelulárního proteinu osteokalcinu byla sledována 21. a 35. experimentální den (Obrázek 33). 21. den byly počáteční fáze syntézy zaznamenány ve všech skupinách kromě čistého kolagenu I a kolagenu I s CapolyP. Do 35. dne exprese tohoto proteinu výrazně zesílila ve všech skupinách s přísávkou hydroxyapatitu nezávisle na konkrétní chemické modifikaci – Reicke, kalcinovaný, nekalcinovaný. V těchto skupinách byly přítomny souvislé vrstvy osteokalcinu. Stopová množství byla zaznamenána ve skupinách E a G s nosičem z kolagenu typu I s přísávkou β -TCP, respektive CapolyP. Na základě hustoty jader poslední experimentální den lze navíc usuzovat na přítomnost konfluentních vrstev buněk 35. den experimentu ve všech skupinách



Obrázek 33: 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 (zvětšení 63 \times), 35. den 20 μm (zvětšení 40 \times).

6.3.6 Vizualizace počtu buněk na nosičích

Snímky z konfokálního mikroskopu ukazují, že první den po nasazení bylo na všech nosičích přítomno srovnatelné množství buněk, což naznačuje rovnoměrné nasazení (Obrázek 34). Během dvou týdnů byl zaznamenán nárůst počtu buněk ve všech skupinách, buňky byly rozprostřeny rovnoměrně. Kvůli poměrně silné autofluorescenci kolagenových nosičů nebylo možné odlišit signál cytoplazmy a nelze tedy říci nic o buněčné morfologii.



Obrázek 34: 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 , zvětšení 20 \times .

6.3.7 Diskuze

Vzhledem k tomu, že informace o morfologii okolí je do buněk přenášena pomocí integrinových receptorů, je právě jeho architektura zásadním faktorem ovlivňujícím buněčnou proliferaci a diferenciací³³⁰. Zcela bez diskuze je přínos porézní struktury s interkonektivitou pórů, které umožňují difuzi živin i dostatek prostoru pro migraci a proliferaci a zabraňují tak přerůstání buněk. Ve své studii Pamula et al. připravili biodegradabilní kopolymer kyseliny mléčné a glykolové s póry o velikosti 600, 200 a 40 μm . Póry o velikosti 600 μm byly ukázány jako nejvhodnější pro růst MG-63 buněčné

linie³³¹. V jiné práci buňky nejsilněji proliferovaly na nosičích s póry v rozsahu 250 a 500 μm ³³². Velikost pórů na nosičích testovaných v předkládané studii se pohybovala v neextrémním rozsahu 100 až 600 μm . Jak je patrné z výsledků sledování buněčné proliferace, nejvyšších hodnot bylo dosaženo na nosiči s největšími póry 460 ± 230 μm , což je tedy v souladu se studii naznačujícími vhodnost velkých pórů pro buněčný růst. Na vzorcích s póry kolem 200 μm byla míra proliferace signifikantně nižší. Na skupinách s malými póry však nebyla pozorována efektivnější adheze buněk, na rozdíl od studie Kuboki et al.³³³. Významnou morfologickou charakteristikou, jejíž vliv na chování buněk by měl být uvažován, je velikost částic použitých biomateriálů. Dosud byly provedeny především studie hodnotící růst buněk na částicích v řádech nanometrů, kdy bylo ukázáno, že přínosným je větší průměr^{334,335}. Částice o velikosti kolem 20 nm jsou pravděpodobně pohlcovány buňkami a působí v takovém případě cytotoxicky³³⁴. V naší studii jsme se však zabývali hodnocením částic o minimální velikosti 29 nm až po 30 μm (Tabulka) a tudíž jsme nezaznamenali žádnou statisticky významnou závislost proliferace na velikosti částic. Signifikantně nižší hodnoty byly zjištěny na čistém kolagenu I a na kolagenu I s přídavkem CapolyP. V tomto případě se však jednalo spíše o vliv materiálu než velikosti částic a pórů.

Jak bylo zmíněno výše, chování buněk na nosičích je závislé na metodě přípravy a na materiálu. Určité biomateriály, typicky keramiky, uvolňují během degradace kalciové a fosfátové ionty^{336,337}. Dochází k tomu jak *in vitro* – účinky vody, tak i *in vivo*, kdy se uplatňují osteoklasty. V první řadě způsobují volné ionty vápníku změny v pH³³⁸. Rovněž je známo, že Ca^{2+} funguje jako důležitý sekundární posel v signalizačních drahách, z nichž mnohé stimulují proliferační aktivitu buněk³³⁹. V neposlední řadě vápník reguluje konformační změny kalmodulinu a jako kofaktor se tak účastní specifických proteinových interakcí³⁴⁰. 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 organismu³⁴¹. Kromě uvolňování iontů je u biokeramik velmi častým jevem i opačný proces – adsorpce iontů z okolí, což způsobuje výrazné lokální změny pH^{342,343}. V *in vivo* podmínkách je tento efekt snadno maskován díky neustálé cirkulaci tělních tekutin, které s sebou přinášejí nové ionty. Při *in vitro* kultivaci může takový nosič vykazovat známky cytotoxicity. V naší studii jsme však komplikacím spojeným se změnami pH a výraznou adsorpcí iontů na nosiče nemuseli čelit. Buněčná viabilita měřená MTS testem rostla během celého experimentu (Obrázek 29). Signifikantně nižší hodnoty byly 14. a 21. den detekovány ve skupině na čistě kolagenovém nosiči a na nosiči s přídavkem CapolyP. Tyto dva nosiče se také zdají být méně vhodné pro buněčnou proliferaci, jak

vyplývá z grafu kvantifikace dsDNA. CapolyP má ze všech testovaných biokeramik nejnižší poměr Ca/P iontů a jeho rozpustnost je tedy nejvyšší³⁴⁴. Na druhou stranu to však byla jediná skupina, kde byl zaznamenán prudký, téměř dvojnásobný, nárůst počtu buněk mezi 1. a 7. dnem experimentu. Proliferační aktivita buněk tak mohla být stimulována iniciálním skokovým uvolněním iontů. Zatímco v následujících dvou týdnech kultivace byly biologicky aktivní ionty přítomny v nedostatečném množství na to, aby proliferaci dále podporovaly. Čistý kolagenový nosič byl dříve prokázán za vhodný pro buněčnou adhezi a růst³⁴⁵. Jak lze vidět v Obrázek 30, množství dsDNA však zůstávalo po celou dobu experimentu na téměř stejných hodnotách a podpora metabolické aktivity byla spíše mírná.

V mnoha studiích již byl ukázán potenciál samotných biokeramik fungovat jako kostní náhrada³⁴⁶. Bylo prokázáno, že porozita materiálu a velikost pórů hraje významnou roli v osteogenezi *in vitro* i *in vivo*. Při *in vitro* kultivaci nižší porozita tlumila proliferační aktivitu a vedla ke shlukování buněk, což jsou faktory pozitivně ovlivňující osteogenní procesy. Póry větší než 300 μm jsou považovány za vhodné pro podporu tvorby kapilár *in vivo*. Přístup kyslíku do místa hojícího se defektu pak umožňuje tvorbu kosti bez iniciální fáze chrupavky³⁴⁷. Stimulační efekt na aktivitu alkalické fosfatázy, a tedy osteogenezi lidských MSC z tukové tkáně byl zaznamenán i u velmi propojených pórů o velikosti kolem 1000 μm v PCL nosičích³⁴⁸. Stejně tak byl výrazný osteogenní efekt pozorován u titanových Ti6Al4V pěn s průměrnou velikostí pórů 178 μm ³⁴⁹. Na základě dat z výše zmíněných publikací lze udělat závěr, že buňky spíše, než velikost pórů ovlivňuje konkrétní materiál i další povrchové charakteristiky. Důležitost použitého materiálu byla potvrzena i v průběhu naší studie, kdy nebyl pozorován v podstatě žádný vliv velikosti pórů na buněčné chování. Co však považujeme za zásadní pro *in vitro* i *in vivo* osteogenní procesy je koncept strukturního gradientu³⁵⁰, který popisuje důležitost přítomnosti pórů o různých průměrech. Je tak lépe simulována přirozená struktura kostní extracelulární hmoty a buňky jsou efektivněji směřovány k osteogenezi. Menší póry poskytují velký povrch pro iniciální adhezi buněk, na druhou stranu však mohou být poměrně rychle vyplněny nově syntetizovanou mezibuněčnou hmotou a negativně tak ovlivnit přísun živin a kyslíku do hlubších vrstev nosiče. Oproti tomu větší póry umožňují růst konfluentní vrstvy buněk a dostatek prostoru pro ukládání mezibuněčné hmoty. Pro *in vivo* podmínky jsou navíc větší póry vhodnější i z hlediska možného prorůstání kapilár do nitra nosiče. Jak je patrné z Obrázek 34, morfologie všech testovaných nosičů byla z hlediska strukturního gradientu vhodná.

Jedním z hlavních důvodů silné bioaktivity keramických nosičů je pravděpodobně uvolňování iontů vápníku a fosforu během degradace³⁵¹. Experimentální data jasně ukázala

zásadní roli kalciových iontů v proliferaci, diferenciaci a aktivitě osteoblastů během fyziologické obnovy kostní tkáně³⁵². Ca^{2+} ovlivňují především růst buněk, zatímco ionty fosforu se uplatňují spíše v regulaci exprese osteogenních markerů³⁵³. Pokud byly Ca^{2+} a PO_3^{-4} kombinovány *in vitro*, aktivovaly stejné signální dráhy jako dexamethason a jeho receptor³⁵⁴.

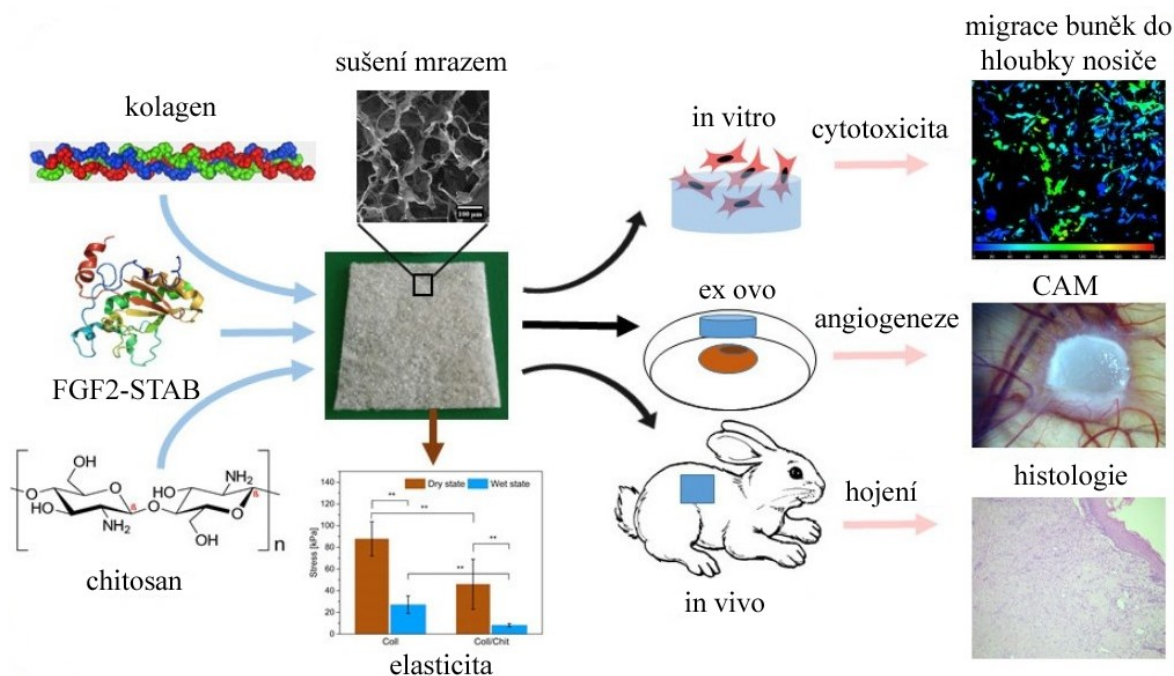
Navzdory tomu, že hydroxyapatit má nízkou míru rozpustnosti³⁴⁴ a nevolňuje tudíž významná množství bioaktivních iontů, byla zdokumentována jeho dobrá biokompatibilita a osteoinduktivní vlastnosti *in vitro* i *in vivo*^{355,356}. Tato data jsou ve shodě s našimi výsledky. Nejvýraznější transkripce osteogenních markerů RunX2 a kolagenu I byla pozorována na nosičích obsahujících jednu z forem HAP. Syntéza extracelulárního proteinu osteokalcinu byla nejsilnější rovněž na vzorcích s obsahem hydroxyapatitu. Na základě výsledků z qPCR měla pozitivní vliv na syntézu mRNA kolagenu typu I i čistá kolagenová pěna. Nicméně, jak vyplývá z imunohistochemického barvení, na tomto nosiči nevedla silná transkripce RunX2 k iniciaci translace osteokalcinu. Na základě těchto dat lze říci, že pouze kolagen I neposkytne buňkám natolik silnou stimulaci, aby na expresi raného transkripčního faktoru navázaly další fáze osteogeneze – na rozdíl od hydroxyapatitu. Pouze kolagen typu I tedy nepovažujeme za vhodný materiál pro vyplnění defektu kosti. Stejně tak trikalcium fosfáty nehodnotíme v tomto směru pozitivně. U nosičů s přísádky α - nebo β -TCP pravděpodobně docházelo k tak rychlé degradaci, že koncentrace volných iontů byla příliš vysoká pro indukci osteogeneze, ale zároveň nepůsobila cytotoxicky ani výrazné změny pH. Schopnost rozpouštět se tedy není univerzálně přínosem, je třeba degradaci kontrolovat a předejít tak nefyziologickým koncentracím iontů.

Velikost částic může, stejně jako porozita a velikost pórů, ovlivnit adhezi proteinů na povrch konkrétního materiálu, což dále ovlivňuje i iniciální adhezi buněk³⁵⁷. Bylo zjištěno, že částice menší než 100 nm zlepšují adhezi proteinů³⁵⁸. Rozměry částic jsou dále spojovány spíše s proliferační aktivitou než diferenciací. Vliv mají také na indukci imunitní odpovědi³⁵⁹, kdy je riziko nepřímo úměrné velikosti částic³⁶⁰. V práci Bai et al bylo zjištěno, že po implantaci částic hydroxyapatitu o nanorozměrech *in vivo* došlo ve zvýšené míře k formaci kostní tkáně a zároveň byla pozorována silnější interakce buněk s povrchem nosiče³⁶¹. V naší práci nebyl pozorován společný efekt podobné velikosti částic na chování lidských mezenchymálních kmenových buněk. Vzhledem k možné indukci patologické reakce imunitního systému by však bylo vhodné v dalším kroku hodnotit polarizaci makrofágů inkubovaných s testovanými materiály.

6.3.8 Shrnutí

Kompozity kolagenu typu I a biokeramik byly ukázány jako cytocompatibilní a vhodné pro růst lidských MSC v *in vitro* podmínkách. Kolagen kombinovaný s hydroxyapatitem vykazoval pozitivní efekt na syntézu extracelulárního proteinu osteokalcinu bez ohledu na konkrétní modifikaci HAP a morfologické charakteristiky. Kalcinovaný hydroxyapatit navíc stimuloval i transkripci mRNA RunX2 a kolagenu typu I. Tudiž považujeme kompozit kolagenu typu I a kalcinovaného hydroxyapatitu za slibný jednak pro další zkoumání i pro potenciální využití v praxi jako kostní náhrada.

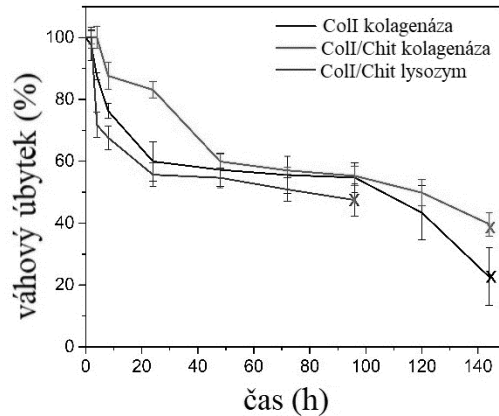
6.4 Vliv Coll/Chit nosiče s FGF2-STAB® na angiogenezi a hojení kožního defektu



Obrázek 35: Coll/Chit nosič s růstovým faktorem FGF2-STAB®.

6.4.1 Vliv přidavku chitosanu na enzymatickou degradaci

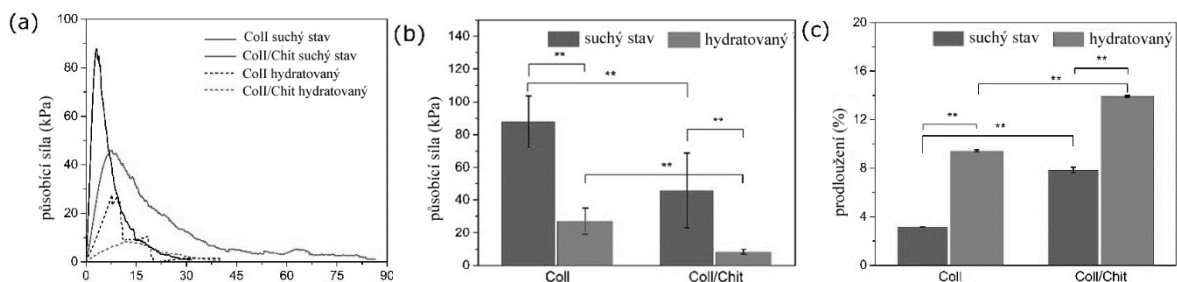
Sledována byla míra degradace nosiče po přidavku kolagenázy (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). V souladu s očekáváním byl nejvýraznější váhový úbytek zaznamenán u nosiče čistě z kolagenu typu I (77%). Navzdory tomu že kombinovaný scaffold byl z 50% tvořen chitosanem, byl úbytek jeho hmotnosti 60%, což znamená že minimálně 10 % chitosanu bylo kolagenázou také degradováno.



Obrázek 36: Váhový úbytek jednotlivých nosičů během procesu enzymatické degradace v roztoku PBS s kolagenázou nebo lysozymem.

6.4.2 Vliv přídavku chitosanu na pevnost nosiče

Biomechanické vlastnosti nosičů byly hodnoceny jak v suchém, tak hydratovaném stavu. V suchém stavu byla nejvyšší odolnost materiálu naměřena pro nosič z kolagenu I, kdy pevnost v tahu dosáhla hodnoty $87,8 \pm 15,8$ kPa. Nosič z kolagenu I a chitosanu dosáhl přibližně polovičních hodnot ($45,9 \pm 22,9$ kPa). Přídavek chitosanu způsobil významný pokles hodnot napětí, zároveň však vedl k více než dvojnásobnému prodloužení nosiče v porovnání s čistým kolagenem. Podobné trendy byly zaznamenány i u nosičů v hydratovaném stavu s tím, že ke vzniku stálé deformace byla zapotřebí nižší míra napětí (Obrázek 37).

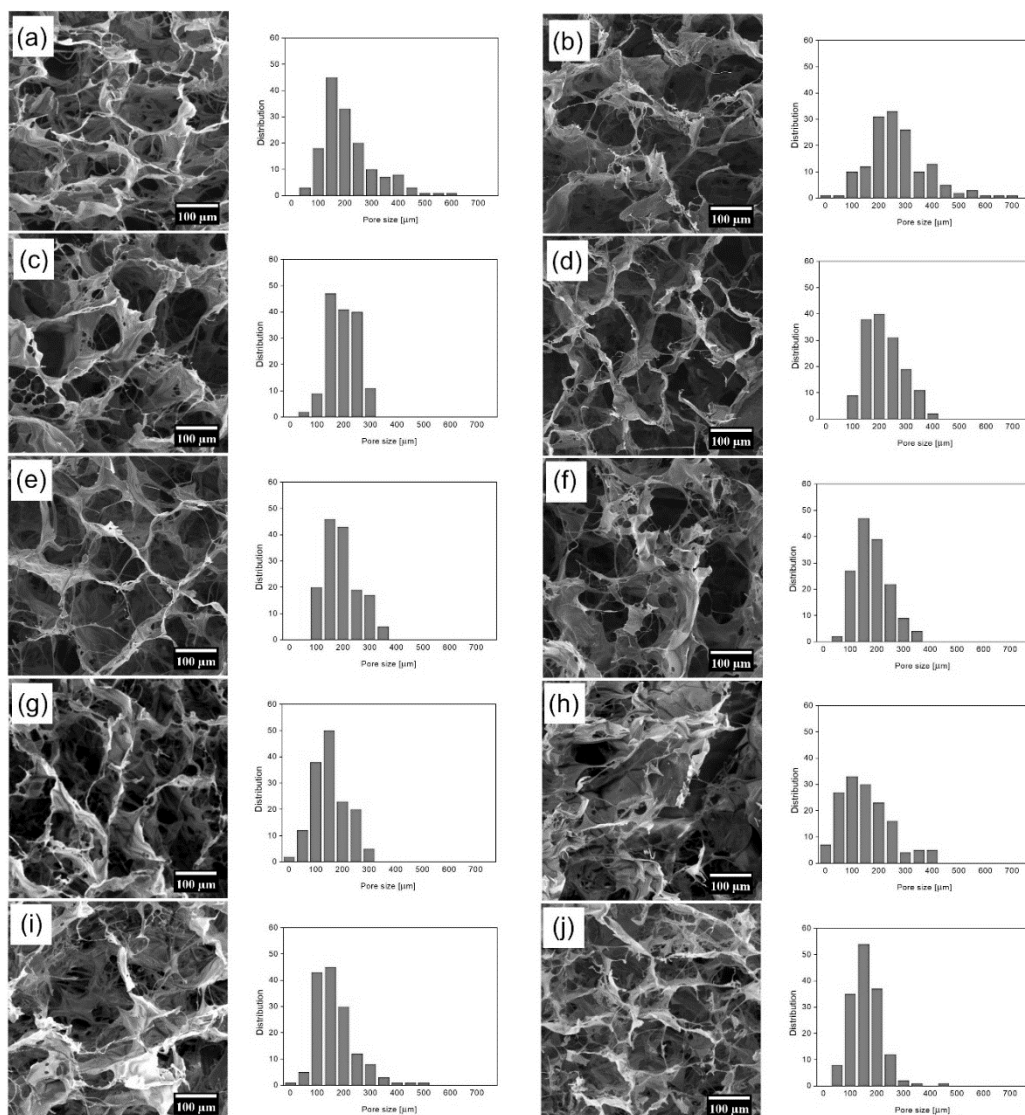


Obrázek 37: a) křivky napětí pro jednotlivé materiály v suchém stavu a hydratované, b) maximální pevnost v tahu u CoII a CoII/Chit nosičů v suchém a hydratovaném stavu, c) procentuální prodloužení nosičů, ** $p < 0,01$.

6.4.3 Vliv přídavku FGF2-STAB® na strukturu nosiče

Trojrozměrné porézní nosiče na bázi kolagenu I a chitosanu byly obohaceny přídavky FGF2-STAB® o různých koncentracích. Během lyofilizace byla vytvořena homogenní struktura s propojenými póry. Jak je patrné z Obrázek 38, vzrůstající koncentrace růstového faktoru vedla ke vzniku nepravidelných pórů s menším průměrem,

přičemž nejmenší póry byly zaznamenány ve skupině se 100 $\mu\text{g/ml}$ FGF2-STAB® (100 – 220 μm).



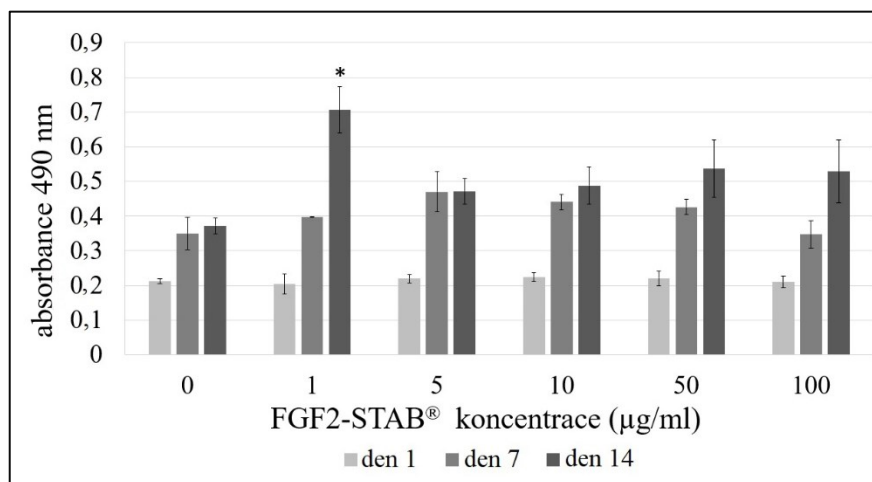
Obrázek 38: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie zachycující změny morfologie nosiče po přidavku rostoucí koncentrace FGF2-STAB®. (a) Coll/Chit; (b) Coll/Chit_0.01 FGF2; (c) Coll/Chit_0.05 FGF2; (d) Coll/Chit_0.1 FGF2; (e) Coll/Chit_0.5 FGF2; (f) Coll/Chit_1 FGF2; (g) Coll/Chit_5 FGF2; (h) Coll/Chit_10 FGF2; (i) Coll/Chit_50 FGF2; (j) Coll/Chit_100 FGF2) a distribuce velikosti pórů v připravených nosičích (vpravo).

6.4.4 Vliv FGF2-STAB® na biologické vlastnosti nosiče

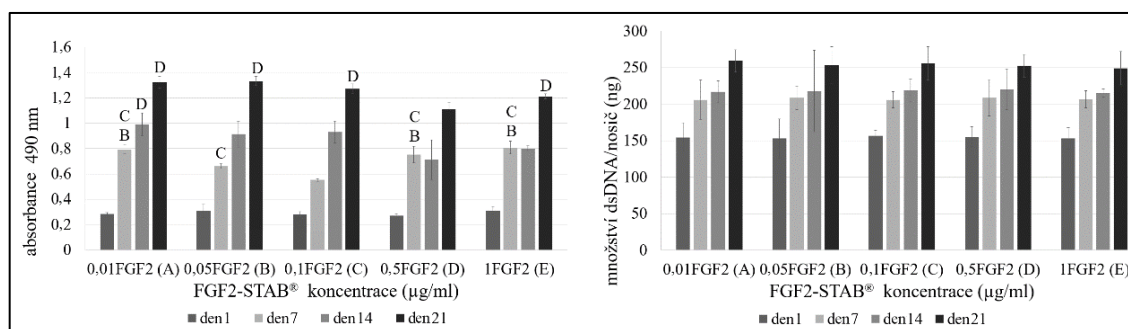
Za účelem určení optimální koncentrace růstového faktoru v Coll/Chit nosičích byly provedeny *in vitro* studie s myšimi dermálními fibroblasty 3T3-A31. Testovány byly nosiče s 0; 1; 5; 10; 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ FGF2-STAB® (Obrázek 39). Jediný statisticky významný rozdíl byl pozorován 14. experimentální den ve skupině s 1 $\mu\text{g/ml}$ FGF2-STAB®, kde buňky dosáhly nejvyšších hodnot metabolické aktivity. Vzhledem k tomu, že vyšší koncentrace růstového faktoru neměly za následek zvýšení metabolické aktivity, jejich další používání bylo vyhodnoceno jako zbytečné a v následující studii jsme se zaměřili na

koncentrace 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 40a). Efektivita nízkých koncentrací FGF2-STAB® může být způsobena hyper-stabilní strukturou molekuly zajišťující její plnou aktivitu i po 20 dnech při 37°C. Konstantně dobrých výsledků po celou dobu experimentu dosahoval nosič z kolagenu I a chitosanu s 0,1 $\mu\text{g/ml}$ FGF2-STAB®.

Při kvantifikaci obsahu buněčné dsDNA nebyly naměřeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami, což značí že na nosičích rostly buňky srovnatelnou rychlostí a byly přítomny v podobných počtech (Obrázek 40b).



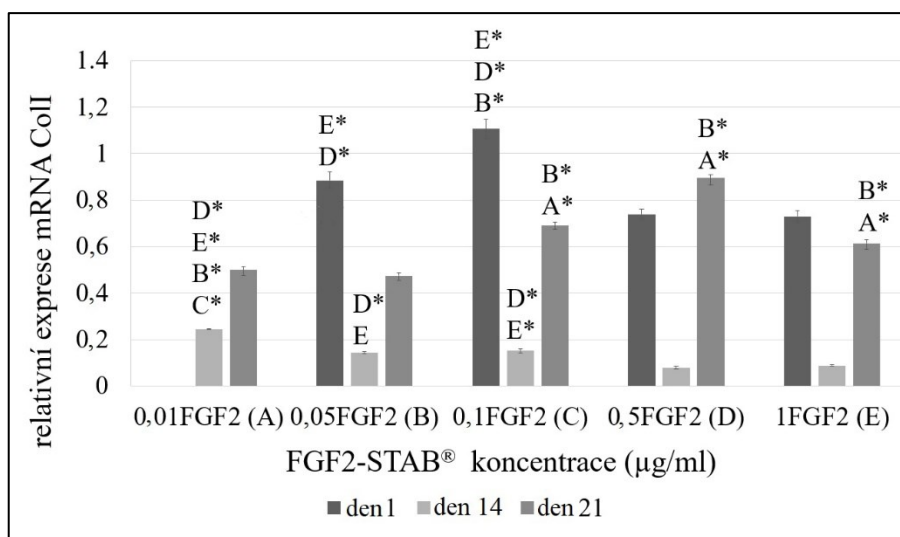
Obrázek 39: Metabolická aktivita myších 3T3-A31 měřená MTS testem. Absorbance produktu měřena při vlnové délce 490 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Statisticky nejvyšší hodnota značena hvězdičkou, pro $p < 0,001$.



Obrázek 40: a) Metabolická aktivita myších 3T3-A31 měřená MTS testem. Absorbance produktu měřena při vlnové délce 490 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Statisticky významné rozdíly značeny skupinou pro $p < 0,05$. b) Množství buněčné dsDNA vypovídající o míře proliferace buněk na jednotlivých nosičích. Bez statisticky významných rozdílů.

6.4.5 Exprese mRNA kolagenu typu I

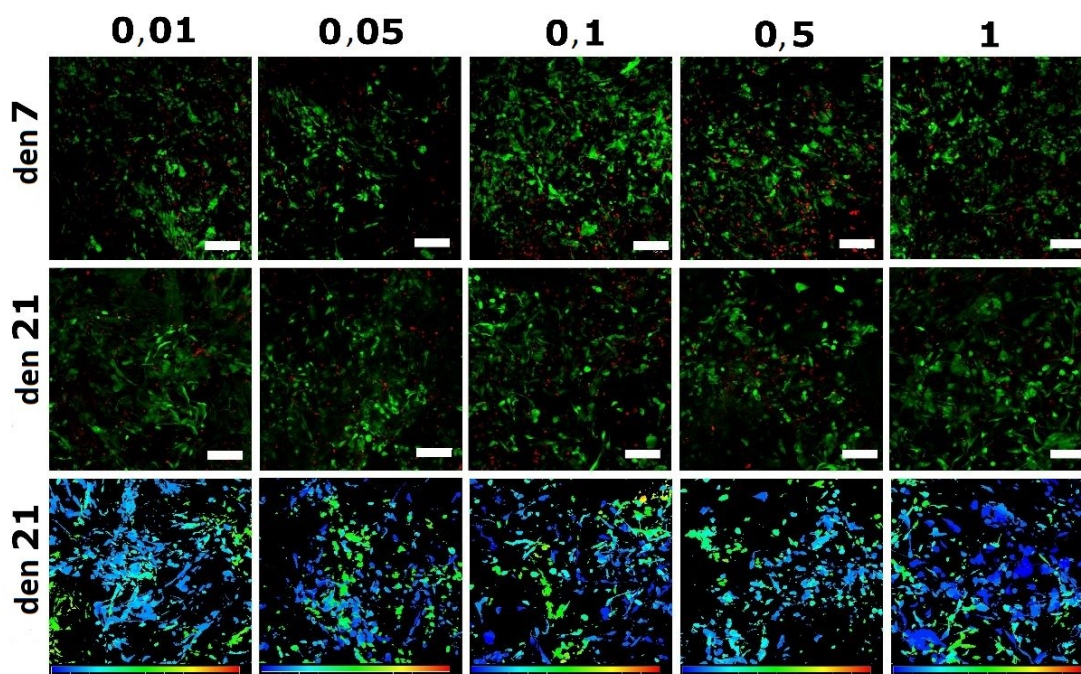
Byla sledována transkripce mRNA kolagenu I coby markeru diferencovaných kožních buněk (Obrázek 41). První den (24 hodin po nasazení) byly nejvyšší hodnoty naměřeny ve skupině s 0,1 $\mu\text{g/ml}$ FGF2-STAB®. Při sledování dlouhodobého efektu růstového faktoru 21. den byl přepis mRNA v nejmenší míře navozen ve skupinách se dvěma nejnižšími koncentracemi FGF2-STAB® (0,01 a 0,05 $\mu\text{g/ml}$).



Obrázek 41: Relativní exprese mRNA kolagenu typu I v myších 3T3-A31 fibroblastech. Statisticky významné rozdíly značeny skupinou s hvězdičkou pro $p < 0,001$.

6.4.6 Vizualizace živých a mrtvých buněk a jejich penetrace do nosiče

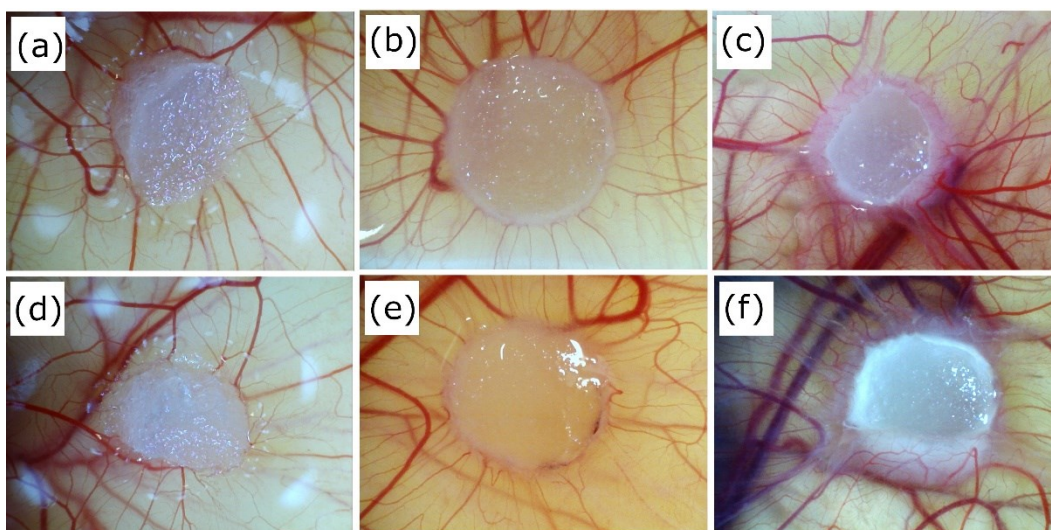
Viabilita buněk po třech týdnech kultivace na Coll/Chit nosičích dosahovala ve všech skupinách přibližně 70 %. Buňky byly na nosičích rozptýleny rovnoměrně a netvořily shluky (Obrázek 42). Z hloubkové projekce vytvořené z dat z 21. dne je patrné, že buňky penetrovaly do nosiče do hloubky kolem 100 µm a byly viabilní.



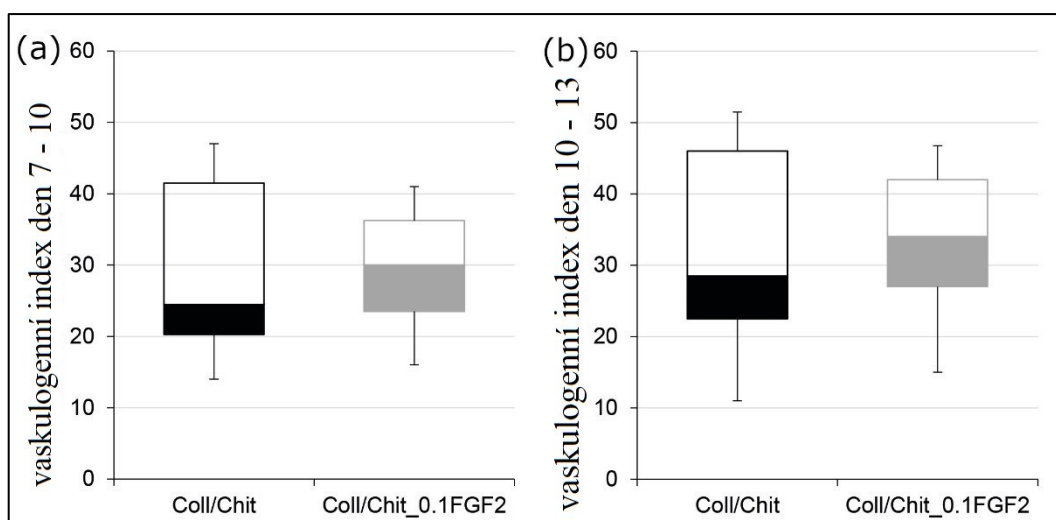
Obrázek 42: Snímky z konfokální mikroskopie. Živé buňky vizualizovány BCECF (zeleně) a jádra mrtvých buněk propidium jodidem (červeně). Snímky ze 7. a 21. experimentálního dne. Velikost měrky 100 µm. Ve spodním řádku hloubková projekce vypovídající o penetraci buněk do nosiče.

6.4.7 Vliv přídatku FGF2-STAB® na angiogenezi

Na základě *in vitro* hodnocení cytokompatibility byla pro další studie vybrána koncentrace 0,1 µg/ml FGF2-STAB®. Pomocí eseje na kuřecí chorioalantoidní membráně (CAM) byla hodnocena míra formace krevních cév *ex ovo*. Obrázek 43 ukazuje nárůst počtu cév v průběhu experimentu ve dnech 3, 10 a 14. Porovnání indexu vaskularizace Coll/Chit nosiče s FGF2-STAB® a bez něj neukázalo statisticky významný rozdíl (Obrázek 44). Samotný nosič vedl k výrazné podpoře formace cév a přidavek růstového faktoru se už tedy neprojevil.



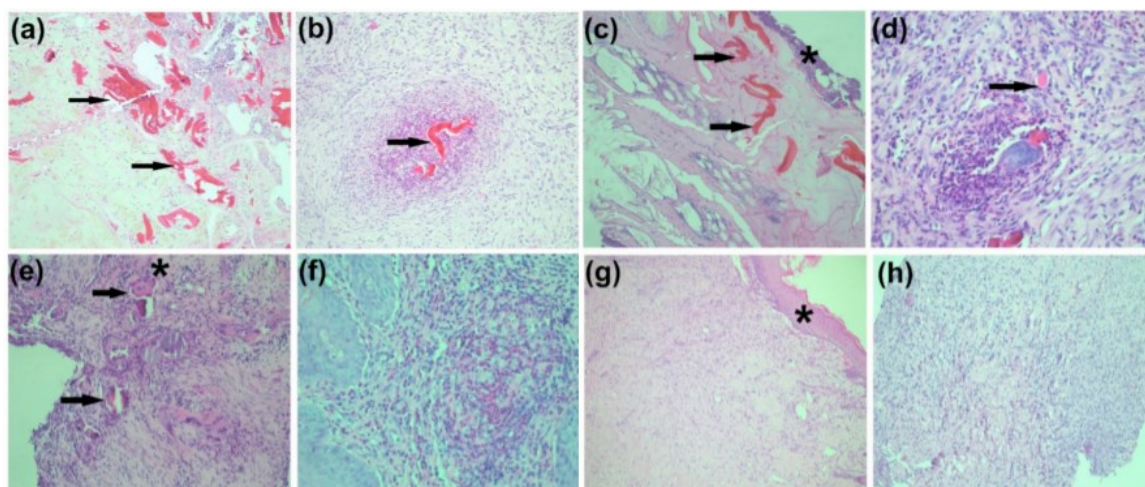
Obrázek 43: Snímky zachycující CAM esej po implantaci Coll/Chit (a-c) a Coll/Chit_0.1FGF2 (d-f) nosičů, den 7 (a, d), 10 (b, e) a 13 (c, f). Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.



Obrázek 44: Index vaskularizace v CAM eseji po implantaci nosičů z kolagenu I a kolagenu I s chitosanem buď bez FGF2-STAB® nebo s 0,1 µg/ml FGF2-STAB®. a) den 7 – 10, b) den 10 – 13.

6.4.8 Vliv přídavku FGF2-STAB® na biokompatibilitu *in vivo*

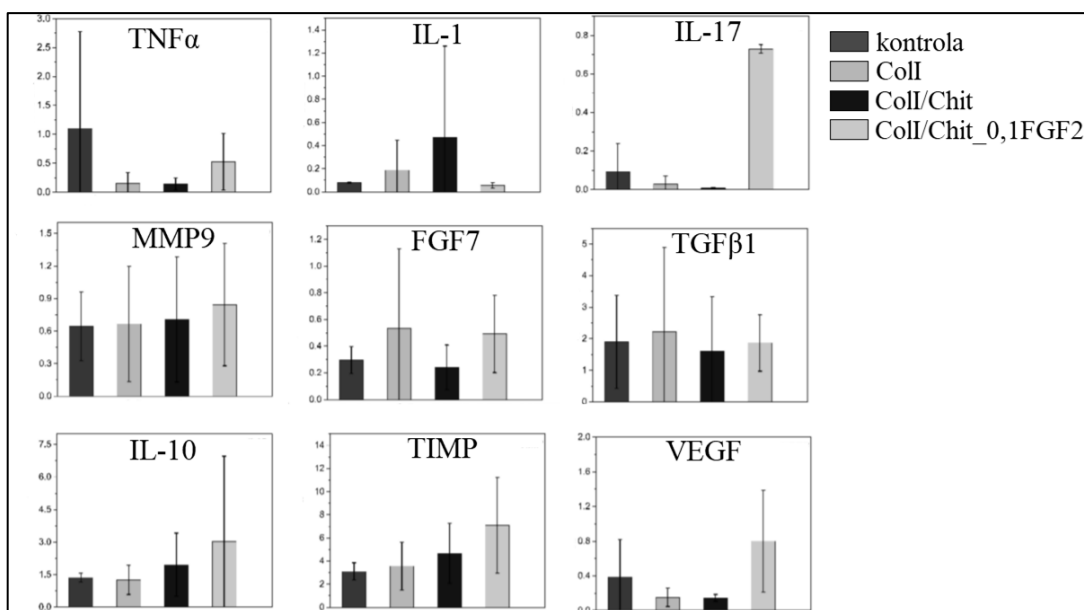
Jako zvířecí model pro hodnocení regenerace kožního defektu o plné tloušťce byli použiti novozélandští králci (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*). V souladu s *in vitro* studii byla ukázána vysoká biokompatibilita CollI, CollI/Chit a CollI/Chit_0,1FGF2. Na snímcích z histologického hodnocení jsou patrná nevstřebaná rezidua nosičů (Obrázek 45). Kontrolní skupina se zhojila i bez aplikace krytu a defekt byl vyplněn fibrózní tkání neodermis. Nebyla pozorována hypertrofie jizvy ani reakce indukovaná přítomností cizích těles.



Obrázek 45: Přehledné histologické barvení haematoxylinem/eosinem, vzorky odebrané 7 dní po implantaci CollI/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 CollI/Chit materiálu s infiltrací zánětlivých buněk v hlubších vrstvách tkáně. (c) Přítomnost CollI/Chit reziduí s infiltrací zánětlivých buněk. Na povrchu je přítomna vrstva epitelu. (e) Rezidua CollI/Chit nosiče v defektu, infiltrace zánětlivých buněk, granulační tkáň. Četné obrovské mnohojaderné 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 CollI/Chit_0,1FGF2 (b), 14 dní po implantaci (d) a 21 dní po implantaci (f,g). (b) Rezidua CollI/Chit nosiče s infiltrací zánětlivými buňkami. (d) Rezidua CollI/Chit nosiče s infiltrací zánětlivými buňkami a granulační tkání. Přítomné jsou obrovské mnohojaderné 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 200x. Ostatní snímky zvětšeny 100x.

6.4.9 Vliv přídavku FGF2-STAB® na genovou expresi v tkáni

21. den po zákroku nebyla exprese mRNA prozánětlivých molekuly TNF α , IL1 β , IL17 a MMP9 a protizánětlivých molekul IL10 a TIMP1, v porovnání se neléčenou kontrolou, ovlivněna aplikací žádného z nosičů (Obrázek 46). Stejně tak exprese mRNA proteinů asociovaných s hojením VEGF, TGF β 1 a FGF7 byla bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami.



Obrázek 46: Exprese mRNA cytokinů ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-17, MMP9), molekul spojených s hojením (FGF7, $\text{TGF}\beta$ 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.

6.4.10 Diskuze

Mezi výhody kompozitních nosičů patří možnost přizpůsobit mechanické a fyzikální vlastnosti, strukturu, povrchové charakteristiky, rychlost odbourávání a přidání bioaktivních látek^{362–364}. Modifikace nosičů růstovými faktory významně ovlivňuje buněčnou adhezi, migraci, dělení i diferenciaci. Systémy postupného dodávání léčiv založené na kombinaci degradabilních polymerů a růstových faktorů umožňují uvolňování bioaktivních molekul v delším časovém horizontu. Jejich koncentrace je však často velmi vysoká, a navíc kvůli rychlé degradaci proteinu není v kultivačním mediu molekula přítomna po dostatečně dlouhý čas³⁶⁵. Stabilita nemoifikovaných růstových faktorů je obvykle pouze několik hodin. Lidský nebo rybí (*Danio rerio*) FGF2 ztrácí aktivitu po 24hodinové inkubaci v 37°C. Stabilizace růstových faktorů je tedy žádoucí především s ohledem na dlouhodobé aplikace nižších koncentrací s menšími nežádoucími efekty. Zkoumány byly přístupy zahrnující konjugaci s heparinem, chemické modifikace, genetické inženýrství, uzavření do hydrogelů nebo adsorpci³⁶⁶. FGF2 se účastní embryonálního vývoje, udržení homeostáze, procesů hojení. Zapojení FGF2 v terapii plicních, nervových nebo cévních onemocnění, hojení ran a revaskularizaci bylo již dříve studováno^{367,368}.

FGF2-STAB® je lidský rekombinantní protein, jehož stabilita je při 37°C téměř tři týdny (20 dní)³⁶⁹. Zvýšení stability FGF2 snižuje jeho závislost na přídavku heparinu a umožňuje aplikaci nižších dávek růstového faktoru. Tento růstový faktor má pozitivní vliv

na pluripotenci embryonálních kmenových buněk až do koncentrace 100 ng/ml, zatímco nižší koncentrace v rozsahu 1-10 ng/ml jsou účinné spíše při použití s ostatními buněčnými typy³⁷⁰.

Kanematsu a kolektiv ve své studii ukázali, že FGF2 spontánně interaguje s roztoky kolagenu typu I a kolagenovými nosiči v *in vitro* i *in vivo* fyziologických podmínkách³⁷¹. Tyto komplexy tvořené na základě elektrostatických interakcí vykazovaly odolnost degradaci trypsinem a lze tedy usuzovat, že kolagen zabraňuje proteolytickému štěpení růstového faktoru. FGF2 v kolagenové pění byl v závislosti na rychlosti odbourávání nosiče uvolňován do podkoží myši, kde stimuloval angiogenezi úměrně použité koncentraci. Vazba FGF2 na kolagenový nosič a následné postupné uvolňování bylo pozorováno i v dalších studiích. Míru uvolňování růstového faktoru ovlivňuje i způsob přípravy nosiče (síťování, lyofilizace) i přídavky dalších činidel jako je například heparin, želatina nebo chitosan^{372,373}.

Uvolňování FGF2 z nosiče a jeho biologická aktivita byla testována *in vitro* na linii myších fibroblastů 3T3-A31 i *in vivo* na králičím modelu. Metabolická aktivita byla sledována po přídavku široké škály koncentrací FGF2-STAB (0 - 100 µg/ml). Koncentrace 1 µg/ml FGF2-STAB® vedla 14. experimentální den k významnému zvýšení metabolické aktivity buněk. Při následném testování byl statisticky významný nárůst buněčného metabolismu zaznamenán při použití nosiče s 0,01 a 0,05 µg/ml FGF2-STAB®. Účinnost těchto nízkých koncentrací mohla být způsobena vysokou stabilitou růstového faktoru. Míra proliferace však nebyla nijak ovlivněna. V trojrozměrných nosičích je buněčné dělení a diferenciaci ovlivněno také dostupností živin, respektive propustností nosiče. Expresí mRNA pro kolagen typu I byla zvýšena v nosičích s 0,1 a 0,5 µg/ml FGF2-STAB®. Tento výsledek je v rozporu s dříve provedenými studiemi, kdy FGF2 snižoval expresi kolagenu I a předcházet tak vzniku jizvy³⁶⁷. Nižší koncentrace růstového faktoru, které pozitivně ovlivňovaly metabolickou aktivitu buněk a zároveň neměly vliv na transkripci kolagenu I se tedy jeví jako vhodné pro využití v terapiích urychlujících hojení, což je v souladu se zjištěními dříve publikované studie³⁷⁰.

Při regeneraci jakéhokoli defektu je zásadním faktorem mikrovaskularizace hojícího se místa. Cévy zajišťují transport živin, okysličování i odvod odpadních látek a je tedy žádoucí, aby používané materiály měly i angiogenní potenciál. Vzhledem k tomu, že v testovaných nosičích bylo obsaženo několik bioaktivních složek, byla angiogeneze testována pomocí CAM eseje *ex ovo*. V naší předchozí *in vitro* studii³⁷⁴ kolagen I a chitosan vykazovaly synergický pozitivní vliv na fibroblasty. Jak jsme předpokládali, kompozitní nosič ColI/Chit stimuloval *ex ovo* angiogenní procesy sám o sobě a nezaznamenali jsme tedy

v tomto směru žádný výrazný efekt přídatku FGF2-STAB®. Použit byl purifikovaný a stabilní FGF2-STAB®, který je považován za růstový faktor podporující expresi VEGF a proangiogenních cytokinů³⁷⁵. Na modelu morčete byla po aplikaci kolagenového nosiče s FGF2 pozorována zvýšená reepitelizace rány 15 dní po excizi. Navíc ve skupině, kde byl použit kolagenový nosič, vykazovala nově vzniklá tkáň vyšší pevnost v tahu³⁷⁶. Za účelem podpory hojení kožního defektu byl do kolagenových a chitosanových nosičů uzavírán i PDGF. Kompozitní nosič výrazněji podporoval expresi kolagenu typu I v nově vznikající tkáni, v porovnání s čistým chitosanem. *In vivo* kompozitní nosiče s PDGF nevedly ke známým zánětům³⁷⁷. Podobně i v naší studii byla zaznamenána zvýšená exprese mRNA kolagenu I při testování Coll/Chit_0,1FGF2 nosiče. Během hojení nebyl v ráně zaznamenán zánět, a naopak byl pozorován vznikající epitel.

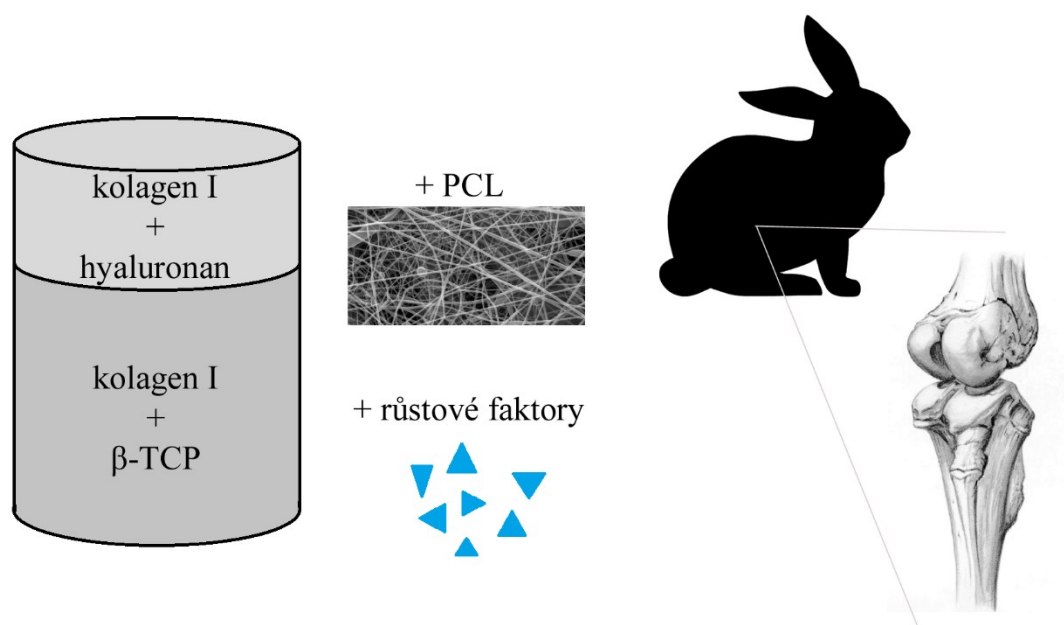
Poškození tkáně může vést k zánětlivým procesům, které jsou spouštěny uvolněním tzv. molekulárních vzorů asociovaných s poškozením (DAMP). Tyto molekuly jsou rozpoznávány povrchovými receptory buněk a spouští signální kaskády vedoucí k translokaci transkripčního faktoru NF- κ B do jádra a aktivaci exprese mRNA zánětlivých cytokinů, například IL1 β a IL17. Expese těchto genů téměř nebyla ovlivněna ani v jedné experimentální skupině. Další z výsledků aktivace NF- κ B TNF α je syntetizován hlavně aktivovanými makrofágy a stimuluje zánětlivé reakce. Transkripce tohoto cytokinu byla tlumena všemi použitými kombinacemi materiálů. Dalším důležitým regulačním mechanismem, který působí proti zánětu, je tlumení aktivity matrixových metaloproteináz navázáním specifických inhibitorových molekul přítomných v tkáni TIMP³⁷⁸. Jeden z členů této rodiny peptidů TIMP-1 zároveň podporuje proliferační aktivitu keratinocytů i dalších buněčných typů^{379,380}. Expese mRNA pro MMP i TIP-1 byla zvýšena ve skupině, kde byl Coll/Chit nosič obohacen přídatkem FGF2-STAB®. S procesem hojení je dále spojena expese růstových faktorů FGF, TGF a VEGF, jejíž míra byla v naší studii sledována. Transkripce mRNA FGF7 a TGF- β 1 nebyla působením FGF2-STAB® ovlivněna. V případě VEGF byl pozorován vzestupný trend. Je to růstový faktor, jehož syntéza je v buňkách indukována nedostatkem kyslíku, respektive molekulou HIF – hypoxií indukovatelným faktorem³⁸¹. Mimo stavy hypoxie je VEGF produkován také makrofágy, především polarizovanými M2³⁸². Je tedy na místě otázka, zda FGF2-STAB® má potenciál polarizovat makrofágy směrem k M2 stejně jako to bylo ukázáno pro FGF9³⁸³. V nedávné studii bylo zjištěno, že FGF2 může, alespoň v případě rozvoje nádorů, fungovat jako hlavní modulátor polarizace makrofágů³⁸⁴. Změny v expresi mRNA pro IL10, VEGF a TIMP způsobené kompozitním nosičem se stabilizovaným FGF2-STAB® jsou v souladu se zjištěním, že

během histologického hodnocení tkáně z 21. dne po zákroku nebyla nalezena rezidua nosiče a převažovaly procesy spojené s hojením. Oproti tomu tam, kde kompozitní nosič nebyl kombinován s růstovým faktorem, byly histologickou analýzou zjištěny zbytky nosiče v ráně. Chitosanová část nosiče byla obecně velmi dobře resorbována. Co se týká míry uzavírání rány nebyly nalezeny významné rozdíly mezi jednotlivými materiály. To však může být způsobeno velmi dobrou přirozenou schopností regenerace kůže u králičího modelu.

6.4.11 Shrnutí

V předkládané práci byl kolagenový nosič modifikován antibakteriálně působícím chitosanem a přísadkou hyperstabilního FGF2-STAB®. Jeho biologické vlastnosti byly hodnoceny *in vitro*, *ex ovo* i *in vivo*. Hlavním cílem bylo zjistit bezpečnost použití stabilizovaného FGF2 a ukázat jeho efektivitu při hojení kožního defektu plné tloušťky na králičím modelu. Na základě hodnocení adheze a proliferační aktivity buněk byla prokázána biokompatibilita materiálů. Kromě toho byla v CAM esejích pozorována neovaskularizace stimulovaná ColI/Chit nosičem. Studie *in vivo* odhalila pozitivní vliv FGF2-STAB® na bioresorpci nosiče, kontrolu zánětlivých procesů i na rekonstrukci poškozené tkáně. Genová exprese zánětlivých markerů (IL1 β , IL17, MMP9, TNF α), protizánětlivých molekul (IL10, TIMP1) a s hojením spojených molekul (TGF β , FGF7, VEGF) prokázala bezpečnost a pozitivní vliv ColI/Chit nosiče s FGF2-STAB® na regeneraci kůže - především v oblasti dermis. Naše studie poskytuje nezbytný základ pro další hodnocení nosiče v biomedicínských a klinických aplikacích v regenerativní medicíně.

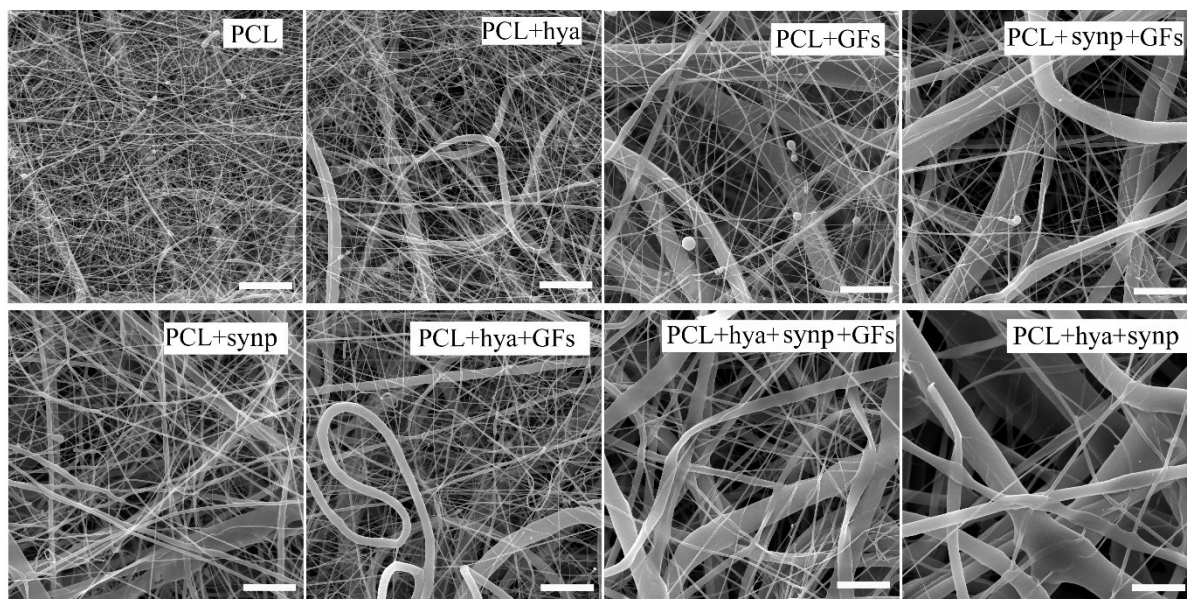
6.5 Kolagenový nosič obohacený hyaluronanem/ β -TCP, PCL a růstovými faktory pro regeneraci osteochondrálního defektu *in vivo*



Obrázek 47: Kompozit z kolagenu typu I a kyseliny hyaluronové/ β -trikalcium fosfátu obohacený PCL a růstovými faktory byl implantován do laterálního kondylu femuru králičího modelu.

6.5.1 Morfologie nanovláken

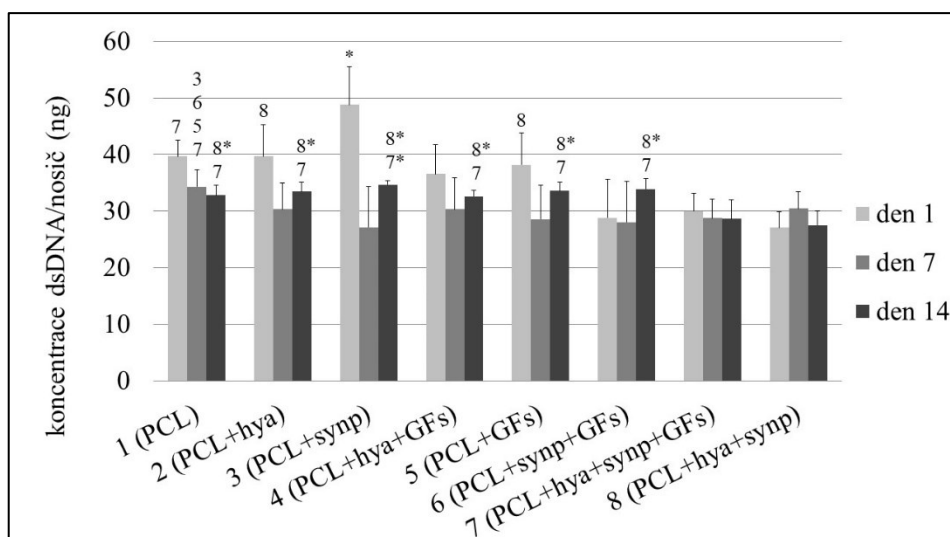
Jak je patrné ze snímků z elektronového mikroskopu, morfologie všech nosičů byla amorfní, vlákna byla přítomna v několika vrstvách a měly různou tloušťku (Obrázek 48). Jednotlivé skupiny se mezi sebou lišily právě tloušťkou nanovláken, která se odvíjela od použitého materiálu. Samotný PCL měl nejjemnější vlákna s poměrně uniformní tloušťkou. Po přidání Synperonicu byla syntetizována vlákna s větším průměrem, stejně tak po přidání hyaluronanu sodného.



Obrázek 48: Snímky z elektronového mikroskopu znázorňující morfologii PCL nosičů. Velikost měřky 10 μm . Byly použity růstové faktory TGF β 1, bFGF, IGF-1.

6.5.2 Kvantifikace dsDNA

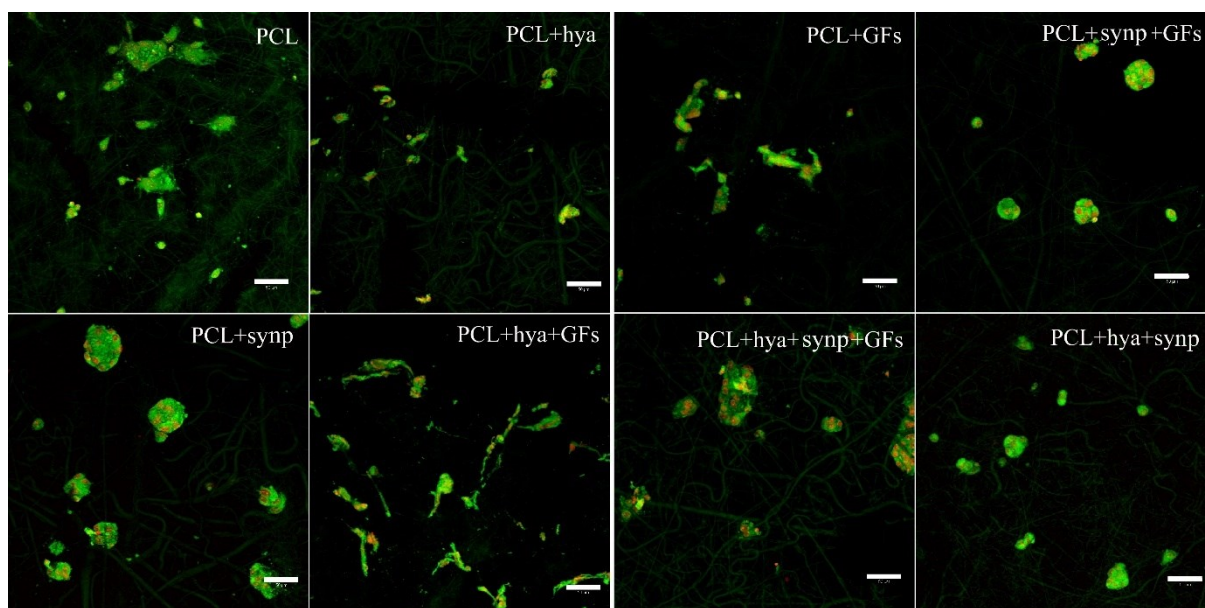
Koncentrace dvouřetězcové DNA je nástrojem ke stanovení množství buněk na jednotlivých nosičích a s její pomocí lze usuzovat na míru proliferace. První experimentální den bylo největší množství buněčné dsDNA naměřeno na nosiči z PCL s příměsí Synperonicu (Obrázek 49). Tato hodnota dosáhla 45,56 ng/nosič. Oproti tomu hodnot nižších než v kontrolní skupině (PCL) bylo dosaženo ve skupinách na PCL, hyaluronanu, Synperonicu a s přidavkem růstových faktorů. Data z prvního dne ukazují na rozdílné vlastnosti nosičů s ohledem na prvotní adhezi buněk. Sedmý den experimentu byl jediný statisticky významný rozdíl patrný v kontrolní skupině PCL. Míra proliferace zde byla vyšší než ve skupinách obsahujících Synperonic (PCL+synp, PCL+synp+GFs, PCL+hya+synp+GFs) a ve skupině PCL s přidavkem růstových faktorů. Poslední den experimentu (14.) bylo nejméně buněk detekováno na PCL nosičích s přidavkem hyaluronanu, synperonicu a růstových faktorů. V těchto dvou skupinách také po celou dobu experimentu nedošlo téměř k žádné změně v množství buněk. Na kontrolním PCL nosiči se koncentrace dsDNA spíše snižovala. Ve zbývajících skupinách byl patrný trend vyšších hodnot 1. den, poté byla zaznamenána určitá míra poklesnutí a do 14. dne proliferace stoupla.



Obrázek 49: 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.

6.5.3 Růst buněk na nosiči

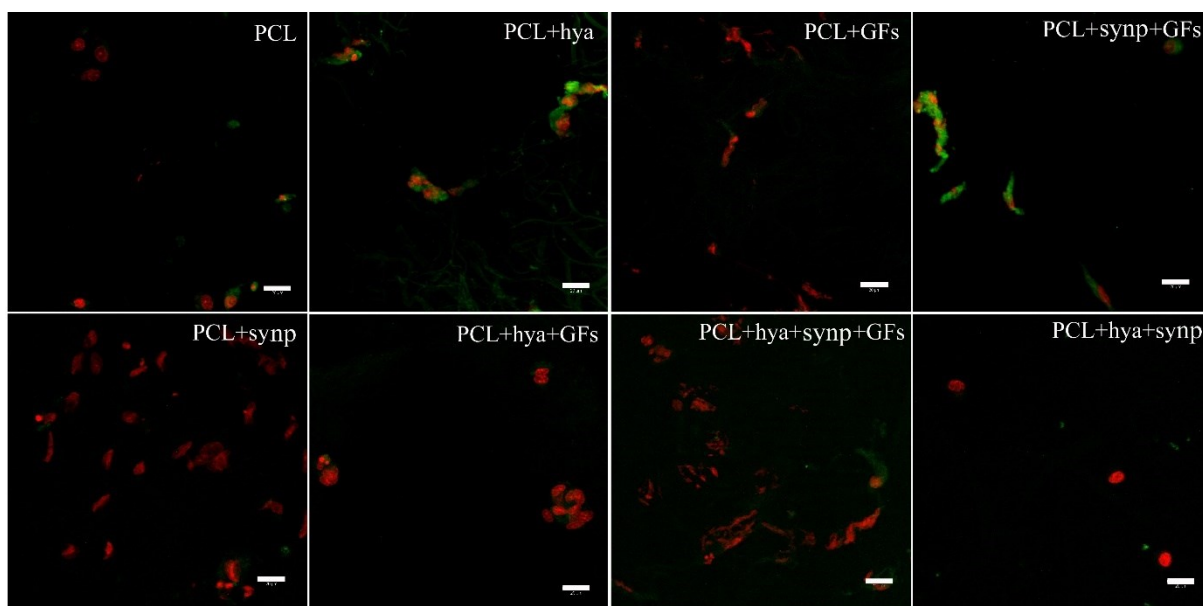
Buněčná jádra byla barvena propidium jodidem a cytoplazmatická membrána DiOC6(3) (Obrázek 50) 4. experimentální den. Prasečí mezenchymální kmenové buňky byly na PCL a všech nosičích s příměsí Synperonicu přítomny v malých agregátech s kulovitou morfologií, které byly po nosiči rovnoměrně rozmístěny. Cytoplazma buněk těsně obklopovala jádro. V ostatních skupinách byly buňky rozmístěny samostatně a jejich cytoplazma byla více rozprostřena. Ani na jednom nosiči nebyla vytvořena konfluentní vrstva a buňky tak měly dostatek prostoru k migraci a proliferaci.



Obrázek 50: Snímky z konfokální mikroskopie dokumentující rozložení buněk na nosiči. Jádra vydávají červený signál, buněčné membrány zelený. Velikost měřky 50 μ m. Byly použity růstové faktory TGF β 1, bFGF, IGF-1.

6.5.4 Imunohistochemické barvení kolagenu II

Exprese hlavního proteinu chrupavkové ECM kolagenu typu II byla 7. experimentální den detekována ve skupině na PCL+hyaluronan a PCL+synp+GFs (Obrázek 51). Nižší intenzita signálu byla přítomna na nosiči pouze z PCL a ve skupině s přidavkem kyseliny hyaluronové, Synperonicu a s růstovými faktory. Zbylé skupiny byly sedmý den na přítomnost kolagenu II negativní.



Obrázek 51: Snímky z konfokálního mikroskopu. Imunohistochemické barvení kolagenu typu II (zelený signál) a jader (červený signál) 7. den experimentu. Objektiv 20 \times , velikost měřky 20 μ m. Byly použity růstové faktory TGF β 1, bFGF, IGF-1.

6.5.5 Histologické hodnocení a imunohistochemie

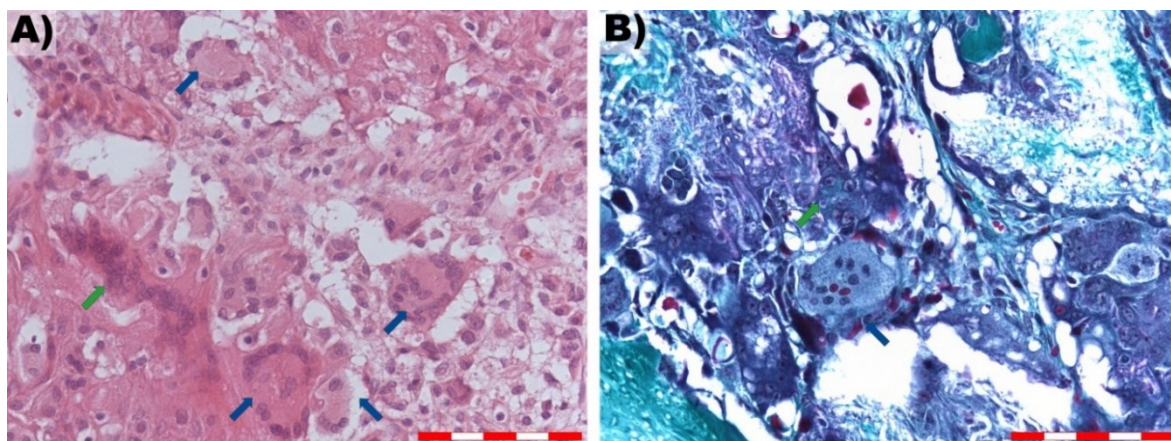
6.5.5.1 Kvantifikace hyalinní chrupavky v centru defektu

Při porovnání oblastí nově vytvořené chrupavky nebyly mezi skupinami nalezeny statisticky významné rozdíly ($p=0,68$) (Obrázek 53). V centrální oblasti defektu byly patrné náznaky efektivnější formace hyalinní chrupavky ve skupině I, kam byl do chrupavkové části vložen implantát z kolagenu I a kyseliny hyaluronové. Ve stejné skupině dosahoval vyšších hodnot také rozsah nově vzniklé hyalinní chrupavky.

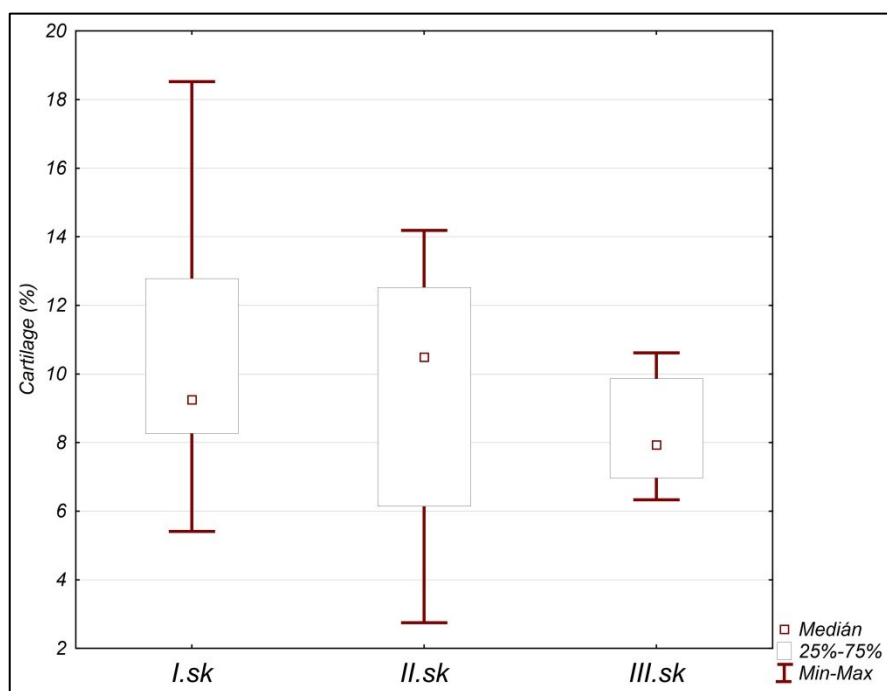
6.5.5.2 Distribuce a kvalitativní hodnocení hyalinní chrupavky

Většina objemu defektu byla po třinácti týdnech od implantace nosiče vyplněna pouze částečně, kdy převažujícím typem tkáně bylo pojivo s ostrůvky granulační tkáně (Obrázek 54). Infiltrace leukocyty byla pozorována ve všech vzorcích. Obrovské vícejaderné buňky MNGCs s periferně lokalizovanými jádry a postrádající fagocytické funkce byly častěji pozorovány v preparátech skupiny III, v níž byly do nosičů přidány růstové faktory

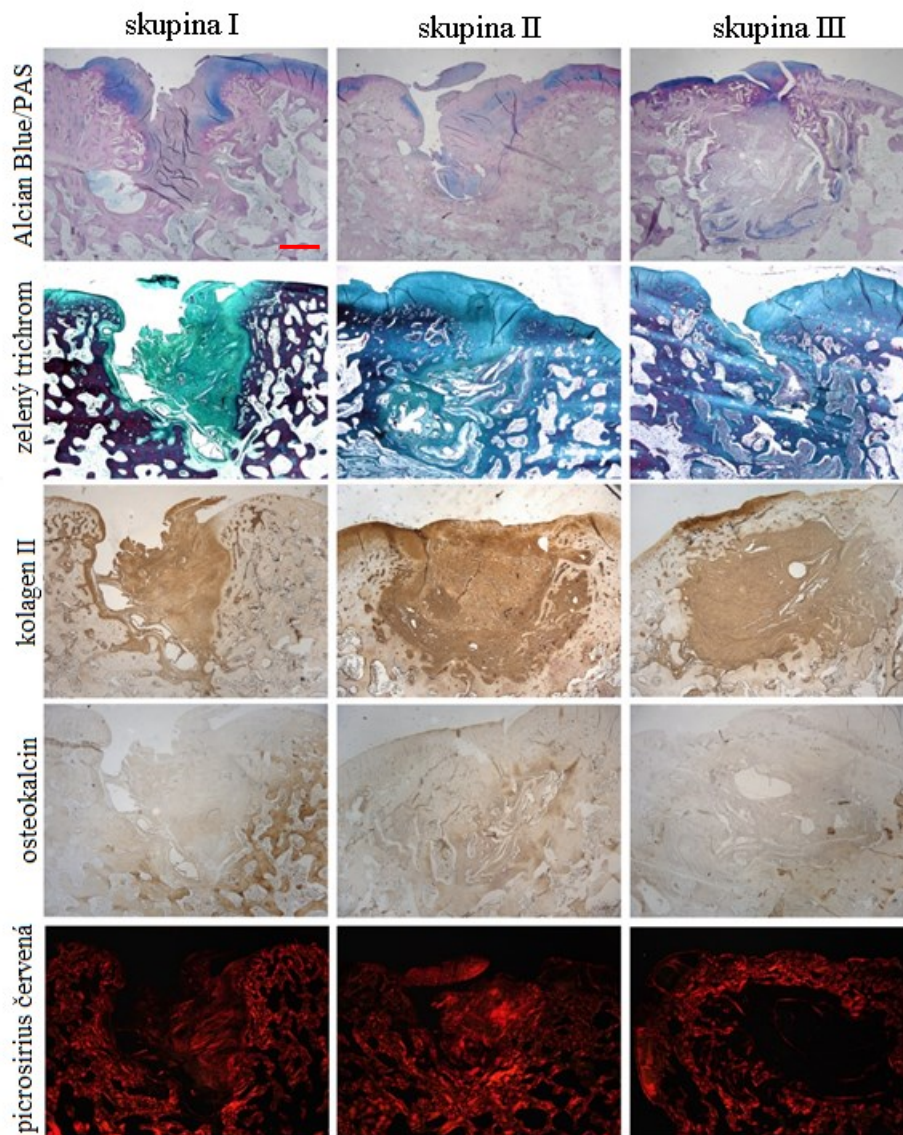
TGF- β 1, bFGF, IGF-1 a BMP2 (Obrázek 52). Hyalinní chrupavka byla přítomna v hlubokých vrstvách defektu podél kosti – na dně i po stranách. Rovněž bylo patrné vrůstání z okrajů defektu, respektive ze zachované kloubní chrupavky po obvodu defektu. V pojivové tkáni překrývající defekty ve skupinách II a III byly přítomny ostrůvky hyalinní chrupavky. Oblasti pozitivní na kolagen typu II byly přítomny ve všech vzorcích s náhodnou distribucí. Exprese osteokalcinu byla lokalizována v oblastech přilehlých ke kosti obklopující defekt, a to pouze ve skupině I bez přídavku PCL i růstových faktorů.



Obrázek 52: 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). Část (A) barvena haematoxylinem-eosinem, část (B) barvena zeleným trichromem a Verhoeffovým barvením. Velikost měřky 100 μ m.



Obrázek 53: Kvantifikace přítomnosti hyalinní chrupavky. Bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami.

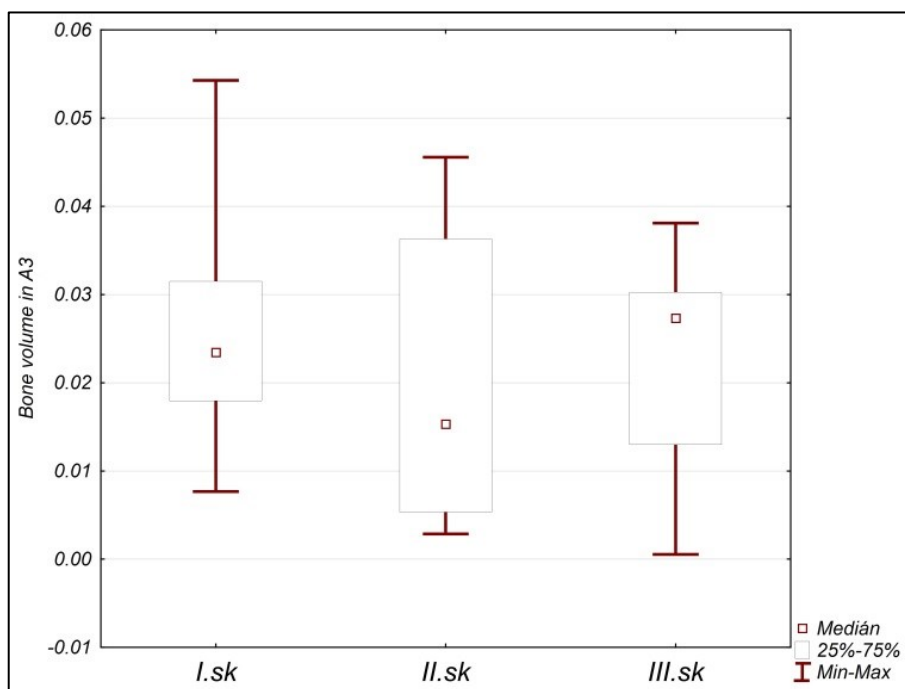


Obrázek 54: Reprezentativní histologické řezy z jednotlivých experimentálních skupin. Alcian Blue/PAS barvení ukazuje modře značené kyselé glykosaminoglykany. Zelený trichrom odlišuje vazivovou tkáň. Hnědé oblasti v řádcích s kolagenem II a osteokalcinem značí pozitivní reakci primární protilátky s diaminobenzidinem. Červený signál po použití picrosirius červeně a při pozorování v polarizovaném světle značí přítomnost molekul kolagenu. Velikost měřky 1000 μm .

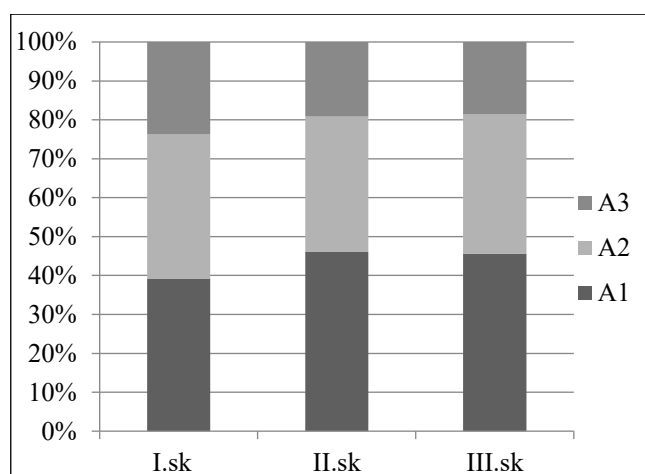
6.5.5.3 Hodnocení hojení kosti v defektu

Mezi skupinami nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly (Kruskal-Wallis test ukázal $p > 0,05$) (Obrázek 55). Během procesu hojení kosti nebyla distribuce nové tkáně v jednotlivých kompartmentech náhodná ($p < 0,001$) (Obrázek 56). Nejrovnoměrnější depozice tkáně byla pozorována ve skupině I (nosiče z kolagenu I, hyaluronanu a β -TCP). V této experimentální skupině byla pozorována i depozice kosti především v centrálním kompartmentu. Implantace nosičů obohacených o PCL i růstové faktory (skupiny II a III) vedla k lokalizaci kostní tkáně spíše ve vnější oblasti defektu.

Vzorky s implantovaným nosičem skupiny I vykazovaly mírnou infiltraci nescifickou granulační tkání, která byla obvykle v blízkosti zdravé kosti. Ve skupině II byla granulační tkáň rovněž přítomna, nicméně s rozdílnou lokalizací, a to difúzně v celém objemu defektu. Nejhojněji byla granulační tkáň přítomna v oblasti kostní části nosiče skupiny III.



Obrázek 55: Kvantifikace množství kosti v defektu. Bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami.



Obrázek 56: Distribuce nové kostní tkáně v jednotlivých kompartmentech.

Zbytky nosiče vyvolávají zánětlivou reakci v místě defektu, což brzdí vývoj nové hyalinní chrupavky. Aplikace nosiče ze skupin II (kolagen I, hyaluronan, β -TCP, PCL) a III (kolagen I, hyaluronan, β -TCP, PCL a růstové faktory) nevedla k efektivnější formaci chrupavky ani kosti. Kromě toho přítomnost růstových faktorů bFGF, TGF- β 1, IGF-1

a BMP-2 urychlovala dozrávání makrofágů v oblasti defektu, čímž mohlo dojít k negativnímu ovlivnění procesů hojení.

6.5.6 Diskuze

Aplikace autologních chondrocytů nebo mezenchymálních kmenových buněk má velký potenciál pro klinické využití. Nicméně proces získávání buněk obojího typu je vždy spojen s určitou mírou poškození zdravé tkáně, z níž jsou odebírány. Kromě toho je třeba uvažovat i omezené biologické zdroje a nedostatečně prokázanou efektivitu a účinnost buněčné terapie v regenerativní medicíně pojivových tkání^{385,386,387}. Navíc transplantace buněk často vede ke vzniku fibrózní chrupavky³⁸⁸. Je tedy třeba se touto oblastí ještě podrobně zabývat, než začne být buněčná terapie považována za univerzálně vhodný léčebný přístup.

V naší studii jsme se tedy rozhodli experimentálně ověřit alternativní přístup. Vytvořili jsme bezbuněčný nosič s potenciálním využitím pro řízenou regeneraci tkání. Nosiče byly založeny na kolagenu typu I, kyselině hyaluronové v chrupavkové části a β -TCP v kostní části (skupina I), který byl obohacen o PCL (skupina II) a následně i o růstové faktory bFGF, TGF- β 1 a IGF-1 v chrupavkové části a BMP-2 v kostní části. Kombinací více složek jsme se vyhnuli limitacím typickým pro každý materiál. Čistý kolagen I má sice výborné biologické vlastnosti a je snadno dostupný, na druhou stranu je však velmi málo stabilní i mechanicky odolný^{389,390,391,392}. Oproti tomu PCL vykazuje poměrně slabé bioaktivní vlastnosti, je však biokompatibilní, mechanicky odolný a navíc levný³⁹³. Smísením kolagenu I a PCL lze získat bioaktivitu kolagenu I a dobré mechanické vlastnosti syntetického polymeru v jednom nosiči³⁹⁴. Přidáním hydrogelové fáze se nosič stává vhodným k implantaci do chrupavky³⁹⁵ a obdobně bude kalcium fosfát v kostní části mechanicky podporovat kostní diferenciaci³⁹⁶. Se záměrem ještě lépe stimulovat žádané diferenační procesy byly přidány specifické růstové faktory podporující chondrogenezi (bFGF, TGF- β 1, IGF-1) a osteogenezi (BMP-2).

Během *in vitro* testování na žádném z nosičů nedošlo k poklesu počtu buněk a byly tak hodnoceny jako vhodné pro buněčnou adhezi a růst. Pomocí fluorescenční mikroskopie byly pozorovány buněčné agregáty na nosičích z PCL s přísadkou Synperonicu. Shlukování buněk do 3D struktur je považováno za účinnou metodu indukce chondrogenních procesů *in vitro*³⁹⁷, může však značit také nedostatečnou adhezi buněk k povrchu nosiče. Jako marker probíhající chondrogenese byla zvolena exprese kolagenu typu II³⁹⁸. Je to hlavní proteinová složka mezibuněčné hmoty kloubní chrupavky. Sedmý den byl detekován na nosiči z PCL

a kyseliny hyaluronové a na nosiči z PCL a Synperonicu s přidavkem růstových faktorů. Na základě dat z této a našich předešlých studií³⁹⁹ byly pro *in vivo* experiment zvoleny materiály a biomolekuly, z nichž byl vytvořen nový nebuněčný nosič.

Kompozitní nosič z kolagenu I, β -TCP a hyaluronanu (skupina I) vykazoval s ohledem na hojení osteochondrálního defektu nejlepší výsledky. V centrálním kompartmentu defektu bylo pozorováno nehomogennější uspořádání kostních trámců. V této skupině byla také detekována nejsilnější exprese osteokalcinu, hlavního nekolagenního proteinu kostní ECM⁴⁰⁰. Získané výsledky tedy naznačují, že po implantaci nosiče do defektu došlo k dozrání osteoblastů a byla započata syntéza nové kostní matrix⁴⁰¹. *In vivo* se osteoblasty z prekursorových buněk vyvíjejí během čtyř týdnů⁴⁰². Kromě známek kostní diferenciaci byly hlubší vrstvy defektu pozitivní na expresi markeru CD31 spjatého s počátky angiogeneze⁴⁰³, což je zásadní fáze regenerace tkáně. Kromě osteogenních procesů byly zaznamenány i známky chondrogenese. Především se jedná o syntézu hlavní složky mezibuněčné hmoty chrupavkové tkáně – kolagenu typu II³⁹⁸, který byl přítomen ve svrchní části nosiče obsahující přidavek hyaluronanu. Data tedy ukazují, že nový nebuněčný nosič skupiny I dokázal indukovat regeneraci v osteochondrálním defektu během třinácti týdnů po implantaci.

Obohacení základního nosiče o PCL vedlo k určitým změnám v biologické odpovědi králíčího modelu. V hlubších vrstvách centrálního kompartmentu defektu byly přítomny ostrůvky hyalinní chrupavky. Protože fáze chrupavky se přirozeně vyskytuje v daných fázích vzniku kosti endochondrální osifikací⁴⁰⁴, lze na tyto oblasti pohlížet jako na známky probíhající regenerace kostní tkáně. V povrchové vrstvě bylo pozorováno intenzivnější barvení kolagenu II (podobně i ve III. skupině), i když v celkovém objemu nebyly statisticky významné rozdíly. Stejně jako v případě skupiny I byly i zde oblasti pozitivní na endoteliální marker CD31. Nicméně přítomnost PCL se odrazila v infiltraci buněk imunitního systému (neutrofilů a mnohojaderných obrovských buněk MNGC) do místa defektu. Vzhledem k tomu, že přítomnost MNGC je obvykle spojována s patologickou reakcí buněčné imunity⁴⁰⁵ a k vysoké stabilitě poly- ϵ -kaprolaktonu v *in vivo* prostředí lze předpokládat po aplikaci nosiče rozvoj významných komplikací, které budou bránit procesům hojení. Mnohojaderné obrovské buňky jsou masou linie monocytů a makrofágů, jejichž fúze je reakcí na přítomnost cizího materiálu a je pod kontrolou IL-4. Narušení rovnováhy v procesu jejich formace může spouštět zánět a s ním související patologie^{406,407}. Přesto že jsou MNGC spojovány s odmítnutím cizího materiálu, jejich přesná role v tkáni stále není plně objasněna⁴⁰⁸. Druhý přítomný buněčný typ, neutrofil, se vyvíjí z mezenchymálních

kmenových buněk a jsou přítomny v akutní fázi zánětu způsobeného přírodními i syntetickými molekulami^{409,410}.

Po přidání růstových faktorů BMP-2, bFGF, IGF-1 a TGF- β 1 k nosiči skupiny II vznikla skupina III. V této skupině byly detekovány ostrůvky hyalinní chrupavky v oblastech kolem zdravé kosti i na povrchu chrupavky a v několika bodech také exprese molekuly CD31. Bohužel však byly tyto známky regenerace doprovázeny rozsáhlými oblastmi granulační tkáně a infiltrací Langhansových buněk, jež jsou podtypem MNGC vznikající fúzí makrofágů. Kromě toho nebyl pozorován žádný pozitivní efekt přidavku růstových faktorů ani na jeden z typů diferenciací. Příčinou mohlo být rozpouštědlo použité k vytvoření roztoku polymeru PCL, ethanol. Ethanol může způsobovat denaturaci peptidů, a tedy i úbytek nebo ztrátu jejich bioaktivity. V minulosti bylo ukázáno, že pouhou inkorporací rhBMP-2 do nosiče z PCL a kolagenu i došlo k poklesu jeho bioaktivních vlastností až na polovinu⁴¹¹. Možným přístupem je využití nosného proteinu, například BSA, které umožní zachování struktury a funkce peptidů i během procesu výroby nosiče. Na druhou stranu je však albumin známý svou schopností vyvolat zánětlivou odpověď imunitního systému⁴¹², což vylučuje jeho aplikaci *in vivo*. Obecně vzato tedy inkorporace jakéhokoli proteinu do nosiče může ovlivňovat jeho stabilitu a biologické účinky a v závislosti na zvolené interakci také profil uvolňování. Navzdory tomu že růstové faktory v naší studii pravděpodobně ztratily svou schopnost ovlivňovat buněčné chování, stále byly schopny indukovat patologickou imunitní reakci projevující se přítomností Langhansových buněk. Imunitní odpověď mohla být indukována také samotným PCL s hmotností 45000 Da, který se rozkládá až za několik měsíců od implantace. Poskytuje tak dostatek času k rozvoji reakce navzdory nízké použité koncentraci.

Jak již bylo zmíněno výše, MNGC pravděpodobně mají určitý podíl na fyziologických procesech regenerace. Patří k tomu sekrece růstového faktoru VEGF a fagocytická aktivita⁴¹³, kterou mohou urychlovat degradaci použitého biomateriálu. Nicméně zůstává otázka, v jakém rozsahu je jejich degradační aktivita ještě přínosem a kdy bude materiál odbouráván nepoměrně rychle k formaci nové tkáně. Na základě získaných dat považujeme za nejslibnější další zkoumání nejjednoduššího nosiče tvořeného kolagenem typu I a přidavky kyseliny hyaluronové a β -TCP. Tento kompozit vedl k určité míře regenerace jak kosti, tak i chrupavky a zároveň nebyla zaznamenána odmítavá imunitní reakce. Možností také je optimalizovat složení nanovláken tak, aby byla urychlena jejich degradace, použít stabilnější růstové faktory s nižší koncentrací, případně nahradit syntetické růstové faktory nativními z autologních trombocytů.

6.5.7 Shrnutí

Testování konkrétního materiálu *in vivo* je zásadním krokem ve vývoji jakéhokoli nosiče pro praktickou aplikaci v medicíně. V této studii bylo dobře patrné, že pozitivní *in vitro* data nezaručují úspěšné použití implantátu v organismu. V těle je kromě buněk, na něž chceme při léčbě cílit, přítomna řada dalších buněčných typů, které budou na biomateriál reagovat. V našem případě byla problematická především patologická reakce imunitního systému, kterou nebylo možné na základě *in vitro* výsledků předvídat. Výrazná podpora hojení defektu obou tkání byla zaznamenána po aplikaci základního typu nosiče skládajícího se z kolagenové pěny v chrupavkové části obohacené o hyaluronan a v kostní části o β -TCP. Ukázali jsme, že čím více materiálů a biomolekul bylo v nosiči přítomno, tím výraznější byla zánětlivá reakce organismu, což zároveň brzdilo hojení. Složení nosičů je třeba volit s opatrností jak s ohledem na použité materiály, a potažmo rychlost jejich degradace, tak i z pohledu použitých biomolekul.

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 dřevě, 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 přidáním 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 neutrofily 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. Chondrogeneze 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 ColI/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 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* vol. 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* vol. 6 2033–2043 (2017).
6. Wilkins, L. W. &. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States - Carol Porth - Knihy Google.
https://books.google.de/books/about/Essentials_of_Pathophysiology.html?id=FFg88IaReBwC&redir_esc=y.
7. Freedman, B. R. & Mooney, D. J. Biomaterials to Mimic and Heal Connective Tissues. *Advanced Materials* vol. 31 e1806695 (2019).
8. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry* vol. 78 929–958 (2009).
9. Ahmadzadeh, H., Freedman, B. R., Connizzo, B. K., Soslowsky, L. J. & Shenoy, V. B. Micromechanical poroelastic finite element and shear-lag models of tendon predict large strain dependent Poisson’s ratios and fluid expulsion under tensile loading. *Acta Biomater.* **22**, 83–91 (2015).
10. Szczesny, S. E., Fetchko, K. L., Dodge, G. R. & Elliott, D. M. Evidence that interfibrillar load transfer in tendon is supported by small diameter fibrils and not extrafibrillar tissue components. *J. Orthop. Res.* **35**, 2127–2134 (2017).
11. Tanzer, M. L. Cross-linking of collagen. *Science (80-)*. **180**, 561–566 (1973).
12. Pritchard, R. H., Shery Huang, Y. Y. & Terentjev, E. M. Mechanics of biological networks: From the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft Matter* vol. 10 1864–1884 (2014).

13. Daamen, W. F., Veerkamp, J. H., van Hest, J. C. M. & van Kuppevelt, T. H. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* vol. 28 4378–4398 (2007).
14. Pankov, R. & Yamada, K. M. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **115**, 3861–3863 (2002).
15. Iozzo, R. V. & Schaefer, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology* vol. 42 11–55 (2015).
16. Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V. & Plikus, M. V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism* vol. 27 68–83 (2018).
17. Ferrante, A. W. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes, Obesity and Metabolism* vol. 15 34–38 (2013).
18. Rosell, M. *et al.* Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **306**, 945–964 (2014).
19. Fawcett, D. W. connective tissue | Definition, Components, & Function | Britannica. <https://www.britannica.com/science/connective-tissue>.
20. Biga, L. M. *et al.* 4.3 Connective Tissue Supports and Protects.
21. Pacifici, M. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. in *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1068 74–86 (Blackwell Publishing Inc., 2006).
22. Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E. J. & Weder, C. Articular cartilage: From formation to tissue engineering. *Biomaterials Science* vol. 4 734–767 (2016).
23. Kelley’s Textbook of Rheumatology E-Book - Gary S. Firestein, Ralph C. Budd, Sherine E Gabriel, Iain B. McInnes, James R O’Dell - Knihy Google. https://books.google.de/books?hl=cs&lr=&id=R4ATV-17cv8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=G.+S.+Firestein+and+W.+N.+Kelley+,+Kelley%27s+Textbook+of+Rheumatology+,+Saunders+Elsevier&ots=Wy1IheGmil&sig=u7f2RvYNa_4491FoZY862_WCDKE#v=onepage&q=G. S. Firestein and W. N. Kelley %2C Kelley’s Textbook of Rheumatology %2C Saunders Elsevier&f=false
24. Williams, G. M., Klisch, S. M. & Sah, R. L. Bioengineering cartilage growth, maturation, and form. *Pediatric Research* vol. 63 527–534 (2008).
25. Athanasiou, K. A., Darling, E. M. & Hu, J. C. Articular Cartilage Tissue Engineering. *Synth. Lect. Tissue Eng.* **1**, 1–182 (2009).

26. Whitesides, T. E. Orthopaedic Basic Science. Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. 2nd ed. *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* **83**, 482 (2001).
27. Hu, M. Y. & Nukavarapu, S. Scaffolds for cartilage tissue engineering. in *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One* 211–244 (Elsevier, 2019).
doi:10.1016/B978-0-08-102563-5.00011-3.
28. M. Pacifici *et al.* *Skeletal Development and Remodeling in Health, Disease and Aging, Volume 1068 | Wiley.* (2006).
29. Thompson, T. J., Owens, P. D. A. & Wilsont, D. J. *Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo**. *J. Anat* vol. 166 (1989).
30. de Visser, S. K. *et al.* Anisotropy of collagen fibre alignment in bovine cartilage: comparison of polarised light microscopy and spatially resolved diffusion-tensor measurements. *Osteoarthr. Cartil.* **16**, 689–697 (2008).
31. L, R., AM, R. & T, F. Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* **9**, 119–133 (2008).
32. Alford, J. W. & Cole, B. J. Cartilage restoration, part 1: Basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *American Journal of Sports Medicine* vol. 33 295–306 (2005).
33. Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* **47**, 477–86 (1998).
34. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* **1**, 461–8 (2009).
35. Schipani, E. *et al.* Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* **15**, 2865–2876 (2001).
36. Guilak, F. & Mow, V. C. The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J. Biomech.* **33**, 1663–73 (2000).
37. Fujioka, R., Aoyama, T. & Takakuwa, T. The layered structure of the articular surface. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 1092–1098 (2013).
38. Moore, D. W. Articular Cartilage - Basic Science - Orthobullets.
<https://www.orthobullets.com/basic-science/9017/articular-cartilage> (2020).
39. Torzilli, P. A. Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition. *J. Orthop. Res.* **3**, 473–483 (1985).
40. Marinova-Mutafchieva, L., Gabay, C., Funari, K. & Williams, R. O. Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth

- factor- β expression in the joint. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 287–293 (2006).
41. Wu, M. & Crane, J. S. *Biochemistry, Collagen Synthesis. StatPearls* (2018).
 42. Maes, C., Carmeliet, G. & Schipani, E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 8 358–366 (2012).
 43. Yang, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-2 α is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat. Med.* **16**, 687–693 (2010).
 44. Goldring, M. B., Culley, K. L., Wondimu, E. & Otero, M. *Cartilage and Chondrocytes. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/b978-0-323-31696-5.00003-6.
 45. Becerra, J. *et al.* Articular cartilage: Structure and regeneration. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **16**, 617–627 (2010).
 46. Mariani, E., Pulsatelli, L. & Facchini, A. Signaling Pathways in Cartilage Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 8667–8698 (2014).
 47. Ng, L. *et al.* Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **143**, 242–257 (2003).
 48. Han, E., Chen, S. S., Klisch, S. M. & Sah, R. L. Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. *Biophys. J.* **101**, 916–924 (2011).
 49. Kempson, G. E., Muir, H., Swanson, S. A. V. & Freeman, M. A. R. Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. *BBA - Gen. Subj.* **215**, 70–77 (1970).
 50. Armstrong, C. G. & Mow, V. C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* **64**, 88–94 (1982).
 51. Wong, M., Wuethrich, P., Buschmann, M. D., Egli, P. & Hunziker, E. Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage. *J. Orthop. Res.* **15**, 189–196 (1997).
 52. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism* vol. 64 1697–1707 (2012).
 53. Felson, D. T. *et al.* Osteoarthritis: New insights - Part 1: The disease and its risk factors. in *Annals of Internal Medicine* vol. 133 635–646 (American College of

- Physicians, 2000).
54. Poole, C. A., Matsuoka, A. & Schofield, J. R. Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **34**, 22–35 (1991).
 55. Del Carlo, M. & Loeser, R. F. Cell death in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* vol. 10 37–42 (2008).
 56. Rai, M. F. & Sandell, L. J. Regeneration of articular cartilage in healer and non-healer mice. *Matrix Biology* vol. 39 50–55 (2014).
 57. Patra, D. & Sandell, L. J. Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage. *Expert reviews in molecular medicine* vol. 14 (2012).
 58. Tiku, M. L., Shah, R. & Allison, G. T. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation: Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J. Biol. Chem.* **275**, 20069–20076 (2000).
 59. Morales, T. I. Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 15 861–871 (2007).
 60. Wong, V. W., Gurtner, G. C. & Longaker, M. T. Wound healing: A paradigm for regeneration. in *Mayo Clinic Proceedings* vol. 88 1022–1031 (Elsevier Ltd, 2013).
 61. Burleigh, A. *et al.* Joint immobilization prevents murine osteoarthritis and reveals the highly mechanosensitive nature of protease expression in vivo. *Arthritis Rheum.* **64**, 2278–2288 (2012).
 62. Vincent, T. L. Targeting mechanotransduction pathways in osteoarthritis: A focus on the pericellular matrix. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 13 449–454 (2013).
 63. Benya, P. D. & Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**, 215–224 (1982).
 64. Szafranski, J. D. *et al.* Chondrocyte mechanotransduction: Effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 937–946 (2004).
 65. James, A. W., Xu, Y., Lee, J. K., Wang, R. & Longaker, M. T. Differential effects of TGF- β 1 and TGF- β 3 on chondrogenesis in posterofrontal cranial suture-derived mesenchymal cells in vitro. *Plast. Reconstr. Surg.* **123**, 31–43 (2009).
 66. Xia, P. *et al.* TGF- β 1-induced chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells is promoted by low-intensity pulsed ultrasound through the integrin-mTOR

- signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 281 (2017).
67. Schneider, M. C., Chu, S., Randolph, M. A. & Bryant, S. J. An in vitro and in vivo comparison of cartilage growth in chondrocyte-laden matrix metalloproteinase-sensitive poly(ethylene glycol) hydrogels with localized transforming growth factor β 3. *Acta Biomater.* **93**, 97–110 (2019).
 68. Fava, R. A. *et al.* Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: Implications for TGF- β -driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. Exp. Med.* **173**, 1121–1132 (1991).
 69. 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).
 70. Flannery, C. R. *et al.* Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 535–541 (1999).
 71. Lefebvre, V., Angelozzi, M. & Haseeb, A. SOX9 in cartilage development and disease. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 61 39–47 (2019).
 72. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 97 33–44 (2006).
 73. Chong, K. W. *et al.* Fibroblast growth factor 2 drives changes in gene expression following injury to murine cartilage in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* **65**, 2346–2355 (2013).
 74. Yan, D. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **13**, (2011).
 75. Yan, D., Chen, D. & Im, H. J. Fibroblast growth factor-2 promotes catabolism via FGFR1-Ras-Raf-MEK1/2- ERK1/2 axis that coordinates with the PKC δ pathway in human articular chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* **113**, 2856–2865 (2012).
 76. Choi, J. J. *et al.* Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **153**, 269–276 (2008).
 77. Uebersax, L., Merkle, H. P. & Meinel, L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem

- cells. *J. Control. Release* **127**, 12–21 (2008).
78. Davies, L. C., Blain, E. J., Gilbert, S. J., Caterson, B. & Duance, V. C. The potential of IGF-1 and TGF β 1 for promoting ‘adult’ articular cartilage repair: An in vitro study. *Tissue Eng. - Part A*. **14**, 1251–1261 (2008).
 79. Schmidt, M. B., Chen, E. H. & Lynch, S. E. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cartilage* vol. 14 403–412 (2006).
 80. Longobardi, L. *et al.* Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 626–36 (2006).
 81. Vinatier, C. *et al.* Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **4**, 318–29 (2009).
 82. Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S. & Stricker, S. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr. Patterns* **9**, 215–223 (2009).
 83. Usami, Y., Gunawardena, A. T., Iwamoto, M. & Enomoto-Iwamoto, M. Wnt signaling in cartilage development and diseases: Lessons from animal studies. *Lab. Invest.* **96**, 186–196 (2016).
 84. Rico, J. V. y, Dalmau, A., Chaqués, F. J. & Asunción, J. Treatment of Osteochondral Lesions of the Talus With Bone Marrow Stimulation and Chitosan–Glycerol Phosphate/Blood Implants (BST-CarGel). *Arthrosc. Tech.* **4**, e663 (2015).
 85. AH, G. & T, M. The quality of healing: articular cartilage. *Wound Repair Regen.* **22 Suppl 1**, 30–38 (2014).
 86. GN, H., SK, B., PS, B. & AJ, van der L. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* **72**, 1003–1007 (1990).
 87. AM, B. & JB, R. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* **87**, 77–95 (2008).
 88. Piñeiro-Ramil, M. *et al.* Cell Therapy and Tissue Engineering for Cartilage Repair. *Cartil. Repair Regen.* (2017) doi:10.5772/INTECHOPEN.70406.
 89. Klein, T. J. *et al.* Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthr. Cartil.* **11**, 595–602 (2003).
 90. Kafienah, W. *et al.* Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: Comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng.* **8**, 817–826

- (2002).
91. Isogai, N. *et al.* Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng.* **12**, 691–703 (2006).
 92. Caron, M. M. J. *et al.* Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: Comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 1170–1178 (2012).
 93. Malda, J. *et al.* Expansion of Bovine Chondrocytes on Microcarriers Enhances Redifferentiation. *Tissue Eng.* **9**, 939–948 (2003).
 94. Fukui, N., Purple, C. R. & Sandell, L. J. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Current rheumatology reports* vol. 3 496–505 (2001).
 95. EA, M., AH, G., KN, M., JC, H. & KA, A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 21–34 (2015).
 96. Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V. & Charwat, V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A* vol. 93 19–31 (2018).
 97. PK, G., AK, D., A, C. & AS, M. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* **3**, (2012).
 98. Erickson, G. R. *et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 763–769 (2002).
 99. Zhang, R., Ma, J., Han, J., Zhang, W. & Ma, J. Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 6275–6289 (2019).
 100. Frassica, M. T. & Grunlan, M. A. Perspectives on Synthetic Materials to Guide Tissue Regeneration for Osteochondral Defect Repair. *ACS Biomaterials Science and Engineering* vol. 6 4324–4336 (2020).
 101. Nam, Y., Rim, Y. A., Lee, J. & Ju, J. H. Current therapeutic strategies for stem cell-based cartilage regeneration. *Stem Cells International* vol. 2018 (2018).
 102. Lubiatuski, P., Kruczynski, J., Gradys, A., Trzeciak, T. & Jaroszewski, J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. in *Transplantation Proceedings* vol. 38 320–322 (Transplant Proc, 2006).
 103. Wakitani, S. *et al.* Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng.* **4**, 429–444 (1998).

104. Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., Hsu, H. P. & Spector, M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J. Orthop. Res.* **21**, 272–281 (2003).
105. Zhang, Q., Lu, H., Kawazoe, N. & Chen, G. Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. *Acta Biomater.* **10**, 2005–2013 (2014).
106. Irawan, V., Sung, T. C., Higuchi, A. & Ikoma, T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* vol. 15 673–697 (2018).
107. Hamaia, S. W. *et al.* Unique charge-dependent constraint on collagen recognition by integrin $\alpha 10\beta 1$. *Matrix Biol.* **59**, 80–94 (2017).
108. Farjanel, J., Schürmann, G. & Bruckner, P. Contacts with fibrils containing collagen I, but not collagens II, IX, and XI, can destabilize the cartilage phenotype of chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, (2001).
109. Von Der Mark, K. & Mollenhauer, J. Annexin V interactions with collagen. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 539–545 (1997).
110. Klatt, A. R. *et al.* A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: Collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPS in primary human chondrocytes. *J. Orthop. Res.* **27**, 65–70 (2009).
111. Matsiko, A., Gleeson, J. P. & O'Brien, F. J. Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition. *Tissue Eng. - Part A* **21**, 486–497 (2015).
112. Holmes, M. W. A., Bayliss, M. T. & Muir, H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J.* **250**, 435–441 (1988).
113. Bulpitt, P. & Aeschlimann, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **47**, 152–169 (1999).
114. Knudson, W. *et al.* Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum.* **43**, 1165–1174 (2000).
115. Li, L. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for Articular Cartilage Defects. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
116. Gupta, R. C., Lall, R., Srivastava, A. & Sinha, A. Hyaluronic acid: Molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Front. Vet. Sci.* **6**, (2019).

117. Pavesio, A. *et al.* Hyaluronan-Based Scaffolds (Hyalograft[®] C) in the Treatment of Knee Cartilage Defects: Preliminary Clinical Findings. in *Novartis Foundation Symposium* vol. 249 203–217 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
118. Sims, C. D. *et al.* Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast. Reconstr. Surg.* **101**, 1580–1585 (1998).
119. Peretti, G. M. *et al.* Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Engineering* vol. 12 1151–1168 (2006).
120. Fussenegger, M. *et al.* Stabilized Autologous Fibrin-Chondrocyte Constructs for Cartilage Repair in Vivo. *Ann. Plast. Surg.* **51**, 493–498 (2003).
121. Vinatier, C. *et al.* Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **89**, 176–185 (2009).
122. Wysocka, A., Mann, K., Bursig, H., Dec, J. & Gaździk, T. S. Chondrocyte suspension in fibrin glue. in *Cell and Tissue Banking* vol. 11 209–215 (Cell Tissue Bank, 2010).
123. Zarrintaj, P., Bakhshandeh, B., Rezaeian, I., Heshmatian, B. & Ganjali, M. R. A Novel Electroactive Agarose-Aniline Pentamer Platform as a Potential Candidate for Neural Tissue Engineering. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
124. Awad, H. A., Wickham, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M. & Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* **25**, 3211–3222 (2004).
125. Carossino, A. M. *et al.* Methodological models for in vitro amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology* **8**, 483–498 (2007).
126. Rahfoth, B. *et al.* Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthr. Cartil.* **6**, 50–65 (1998).
127. Selmi, T. A. S. *et al.* Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: Outcome at two years. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* **90**, 597–604 (2008).
128. Sultankulov, B., Berillo, D., Sultankulova, K., Tokay, T. & Saparov, A. Progress in the development of chitosan-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomolecules* vol. 9 (2019).
129. Montembault, A. *et al.* A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie* **88**, 551–564 (2006).

130. Nettles, D. L., Elder, S. H. & Gilbert, J. A. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* **8**, 1009–1016 (2002).
131. Jin, R. *et al.* Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 2544–2551 (2009).
132. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil.* **10**, 432–463 (2002).
133. Su, J. Y., Chen, S. H., Chen, Y. P. & Chen, W. C. Evaluation of magnetic nanoparticle-labeled chondrocytes cultivated on a type II collagen–chitosan/poly(Lactic-co-glycolic) acid biphasic scaffold. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
134. Oprenyeszk, F. *et al.* Chitosan Enriched Three-Dimensional Matrix Reduces Inflammatory and Catabolic Mediators Production by Human Chondrocytes. *PLoS One* **10**, e0128362 (2015).
135. Svensson, A. *et al.* Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* **26**, 419–431 (2005).
136. Yadav, V., Sun, L., Panilaitis, B. & Kaplan, D. L. In vitro chondrogenesis with lysozyme susceptible bacterial cellulose as a scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, E276–E288 (2015).
137. Balakrishnan, B., Joshi, N. & Banerjee, R. Borate aided Schiff's base formation yields in situ gelling hydrogels for cartilage regeneration. *J. Mater. Chem. B* **1**, 5564–5577 (2013).
138. Christen, M. O. & Vercesi, F. Polycaprolactone: How a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* vol. 13 31–48 (2020).
139. Alves Da Silva, M. L. *et al.* Cartilage tissue engineering using electrospun PCL nanofiber meshes and MSCs. *Biomacromolecules* **11**, 3228–3236 (2010).
140. Wise, J. K., Yarin, A. L., Megaridis, C. M. & Cho, M. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: Engineering the superficial zone of articular cartilage. *Tissue Eng. - Part A* **15**, 913–921 (2009).
141. Filová, E. *et al.* Polycaprolactone Foam Functionalized With Chitosan Microparticles-a Suitable Scaffold for Cartilage Regeneration. *Physiol. Res* **65**, 121–131 (2016).
142. Kazemnejad, S., Khanmohammadi, M., Baheiraei, N. & Arasteh, S. Current state of cartilage tissue engineering using nanofibrous scaffolds and stem cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* vol. 9 50–65 (2017).

143. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* vol. 24 4337–4351 (2003).
144. Kosik-Kozioł, A. *et al.* PLA short sub-micron fiber reinforcement of 3D bioprinted alginate constructs for cartilage regeneration. *Biofabrication* **9**, 044105 (2017).
145. Freed, L. E., Vunjak-Novakovic, G. & Langer, R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J. Cell. Biochem.* **51**, 257–264 (1993).
146. Freed, L. E. *et al.* Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 891–899 (1994).
147. Chang, N. J. *et al.* The combined effects of continuous passive motion treatment and acellular PLGA implants on osteochondral regeneration in the rabbit. *Biomaterials* **33**, 3153–3163 (2012).
148. Ossendorf, C. *et al.* Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res. Ther.* **9**, (2007).
149. Hwang, N. S. *et al.* Effects of Three-Dimensional Culture and Growth Factors on the Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **24**, 284–291 (2006).
150. Kudva, A. K., Luyten, F. P. & Patterson, J. In vitro screening of molecularly engineered polyethylene glycol hydrogels for cartilage tissue engineering using periosteum-derived and atdc5 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
151. Shokrgozar, M. A. *et al.* Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 2449–2460 (2013).
152. Kim, H., Lee, Y., Kim, Y., Hwang, Y. & Hwang, N. Biomimetically Reinforced Polyvinyl Alcohol-Based Hybrid Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **9**, 655 (2017).
153. He, Y. *et al.* A 3D-Printed PLCL Scaffold Coated with Collagen Type i and Its Biocompatibility. *Biomed Res. Int.* **2018**, (2018).
154. MC, T., KC, H., SC, H. & SH, H. Evaluation of biodegradable elastic scaffolds made of anionic polyurethane for cartilage tissue engineering. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **125**, 34–44 (2015).
155. Eviana Putri, N. R. *et al.* Preparation of PLGA-collagen hybrid scaffolds with controlled pore structures for cartilage tissue engineering. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **30**, 642–650 (2020).

156. Asadi, N. *et al.* Fabrication and in Vitro Evaluation of Nanocomposite Hydrogel Scaffolds Based on Gelatin/PCL–PEG–PCL for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Omega* **4**, 449–457 (2019).
157. Chiara, G. *et al.* Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 13 737–757 (2012).
158. Marks, S. C. & Odgren, P. R. Structure and Development of the Skeleton. in *Principles of Bone Biology* 3–15 (Elsevier, 2002). doi:10.1016/b978-012098652-1.50103-7.
159. Barrère, F., Mahmood, T. A., de Groot, K. & van Blitterswijk, C. A. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering R: Reports* vol. 59 38–71 (2008).
160. Bone Structure. <https://www.cliffsnotes.com/study-guides/anatomy-and-physiology/bones-and-skeletal-tissues/bone-structure>.
161. Dennis, S. C., Berkland, C. J., Bonewald, L. F. & Detamore, M. S. Endochondral Ossification for Enhancing Bone Regeneration: Converging Native Extracellular Matrix Biomaterials and Developmental Engineering in Vivo. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 21 247–266 (2015).
162. Setiawati, R. & Rahardjo, P. Bone Development and Growth. in *Osteogenesis and Bone Regeneration* (IntechOpen, 2019). doi:10.5772/intechopen.82452.
163. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* vol. 2015 (2015).
164. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 561 3–12 (2014).
165. Fakhry, M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J. Stem Cells* **5**, 136 (2013).
166. Schaffler, M. B., Cheung, W. Y., Majeska, R. & Kennedy, O. Osteocytes: Master orchestrators of bone. *Calcified Tissue International* vol. 94 5–24 (2014).
167. Bonewald, L. F. The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 229–238 (2011).
168. Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K. & Witten, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* **235**, 176–190 (2006).
169. Dallas, S. L., Prideaux, M. & Bonewald, L. F. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocrine Reviews* vol. 34 658–690 (2013).
170. Rochefort, G. Y., Pallu, S. & Benhamou, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of

- bone tissue. *Osteoporos. Int.* **21**, 1457–1469 (2010).
171. Burger, E. H. & Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone—role of the lacunocanalicular network. *FASEB J.* **13**, S101–S112 (1999).
 172. Sodek, J. & McKee, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol. 2000* **24**, 99–126 (2000).
 173. Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I. & Helfrich, M. H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis International* vol. 22 1–20 (2011).
 174. Longhini, R., de Oliveira, P. A., de Souza Faloni, A. P., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoeexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J. Anat.* **222**, 239–247 (2013).
 175. Matsumoto, M. *et al.* Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J. Biol. Chem.* **279**, 45969–45979 (2004).
 176. Matsubara, T. *et al.* Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **489**, 472–476 (2017).
 177. Mulari, M., Vääräniemi, J. & Väänänen, H. K. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 496–503 (2003).
 178. Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A. & Helfrich, M. H. Osteopetrosis: Genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 9 522–536 (2013).
 179. (No Title).
<https://www.zoology.ubc.ca/~lacombe/biomania/tutorial/bonets/bnts2ab1.htm>.
 180. Aszódi, A., Bateman, J. F., Gustafsson, E., Boot-Handford, R. & Fässler, R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: What can we learn from knockout mice? *Cell Struct. Funct.* **25**, 73–84 (2000).
 181. Garnero, P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif. Tissue Int.* **97**, 229–240 (2015).
 182. Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H. J. A. & Duarte, J. A. Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. *Sports Medicine* vol. 44 37–53 (2014).
 183. Kirby, D. J. & Young, M. F. Isolation, production, and analysis of small leucine-rich

- proteoglycans in bone. in *Methods in Cell Biology* vol. 143 281–296 (Academic Press Inc., 2018).
184. Wen, L., Chen, J., Duan, L. & Li, S. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review). *Molecular Medicine Reports* vol. 18 3–15 (2018).
 185. Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T. & Hirata, M. Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochemical Pharmacology* vol. 132 1–8 (2017).
 186. Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. & Recker, R. Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* vol. 77 1256–1275 (1995).
 187. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. & Varanasi, S. S. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* vol. 61 577–587 (2008).
 188. Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports* vol. 5 222–226 (2003).
 189. Glimcher, M. J. The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications. in *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders* 23-52e (Elsevier, 1998). doi:10.1016/b978-012068700-8/50003-7.
 190. Boivin, G. & Meunier, P. J. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif. Tissue Int.* **70**, 503–511 (2002).
 191. Zimmerman, D., Jin, F., Leboy, P., Hardy, S. & Damsky, C. Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev. Biol.* **220**, 2–15 (2000).
 192. McNamara, L. M., Majeska, R. J., Weinbaum, S., Friedrich, V. & Schaffler, M. B. Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix. *Anat. Rec.* **292**, 355–363 (2009).
 193. Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. & Jurdic, P. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5231–5241 (2004).
 194. Morgan, E. F., Barnes, G. L. & Einhorn, T. A. The Bone Organ System. Form and Function. in *Osteoporosis: Fourth Edition* 3–20 (Elsevier Inc., 2013). doi:10.1016/B978-0-12-415853-5.00001-7.
 195. Cullinane, D. M. & Einhorn, T. A. Biomechanics of Bone. in *Principles of Bone Biology* 17–32 (Elsevier, 2002). doi:10.1016/B978-012098652-1.50104-9.
 196. Fyhrie, D. P. & Carter, D. R. A unifying principle relating stress to trabecular bone

- morphology. *J. Orthop. Res.* **4**, 304–317 (1986).
197. Burstein, A. H., Zika, J. M., Heiple, K. G. & Kein, L. Contribution of collagen and mineral to the elastic plastic properties of bone. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* **57**, 956–961 (1975).
 198. Landis, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* **16**, 533–544 (1995).
 199. US Department of Health and Human Services. Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General. *US Heal. Hum. Serv.* 437 (2004).
 200. Burstein, A. H., Reilly, D. T. & Martens, M. Aging of bone tissue: mechanical properties. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* **58**, 82–86 (1976).
 201. Mizrahi, J., Verbitsky, O. & Isakov, E. Fatigue-related loading imbalance on the shank in running: a possible factor in stress fractures. *Ann. Biomed. Eng.* **28**, 463–469 (2000).
 202. Keating, J. F., Simpson, A. H. R. W. & Robinson, C. M. The management of fractures with bone loss. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* vol. 87 142–150 (2005).
 203. Schemitsch, E. H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J. Orthop. Trauma* **31**, S20–S22 (2017).
 204. L Wood, C., Stenson, C. & Embleton, N. The Developmental Origins of Osteoporosis. *Curr. Genomics* **16**, 411–418 (2015).
 205. Van Staa, T. P., Leufkens, H. G. M. & Cooper, C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: A meta-analysis. *Osteoporosis International* vol. 13 777–787 (2002).
 206. Shaker, J. L. Paget’s disease of bone: A review of epidemiology, pathophysiology and management. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* vol. 1 107–125 (2009).
 207. Van Dijk, F. S. *et al.* Osteogenesis imperfecta: A review with clinical examples. *Molecular Syndromology* vol. 2 1–20 (2011).
 208. Fazzalari, N. L. Bone Fracture and bone fracture repair. in *Osteoporosis International* vol. 22 2003–2006 (Osteoporos Int, 2011).
 209. Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. & Little, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 19 459–466 (2008).

210. Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* vol. 22 2581–2593 (2001).
211. Dimitriou, R., Tsiridis, E. & Giannoudis, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* **36**, 1392–404 (2005).
212. Wu, M., Chen, G. & Li, Y. P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* **4**, (2016).
213. Guo, X. & Wang, X. F. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Research* vol. 19 71–88 (2009).
214. Sanford, L. P. *et al.* TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* **124**, 2659–2670 (1997).
215. Kim, S. Il *et al.* TGF- β -activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF- β 1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **292**, (2007).
216. Crane, J. L., Xian, L. & Cao, X. Role of TGF- β Signaling in Coupling Bone Remodeling. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1344 287–300 (Humana Press Inc., 2016).
217. Wu, M., Chen, G. & Li, Y. P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* **4**, 1–21 (2016).
218. Gautschi, O. P., Frey, S. P. & Zellweger, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ Journal of Surgery* vol. 77 626–631 (2007).
219. Noël, D. *et al.* Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **22**, 74–85 (2004).
220. Gu, K., Zhang, L., Jin, T. & Rutherford, R. B. Identification of Potential Modifiers of Runx2/Cbfa1 Activity in C2C12 Cells in Response to Bone Morphogenetic Protein-7. in *Cells Tissues Organs* vol. 176 28–40 (Cells Tissues Organs, 2004).
221. Montero, A. *et al.* Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.* **105**, 1085–1093 (2000).
222. Moon, K. S., Choi, E. J., Oh, S. & Kim, S. The effect of covalently immobilized FGF-2 on biphasic calcium phosphate bone substitute on enhanced biological compatibility and activity. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
223. Coffin, J. D. *et al.* Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1861–

- 1873 (1995).
224. Kawaguchi, H. *et al.* Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 875–880 (2001).
 225. Yoshida, T. *et al.* Bone augmentation using a highly porous PLGA/ β -TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. *J. Periodontal Res.* **50**, 265–273 (2015).
 226. Hung, I. H., Yu, K., Lavine, K. J. & Ornitz, D. M. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev. Biol.* **307**, 300–313 (2007).
 227. White, A. C., Lavine, K. J. & Ornitz, D. M. FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network. *Development* **134**, 3743–3752 (2007).
 228. Wallner, C. *et al.* Application of VEGFA and FGF-9 Enhances Angiogenesis, Osteogenesis and Bone Remodeling in Type 2 Diabetic Long Bone Regeneration. *PLoS One* **10**, e0118823 (2015).
 229. Liu, Z., Xu, J., Colvin, J. S. & Ornitz, D. M. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* **16**, 859–869 (2002).
 230. Hamidouche, Z. *et al.* Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **224**, 509–515 (2010).
 231. Nagayama, T. *et al.* FGF18 accelerates osteoblast differentiation by upregulating Bmp2 expression. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. **53**, 83–88 (2013).
 232. Crane, J. L. *et al.* IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res.* **1**, 186–194 (2013).
 233. Zhao, G. *et al.* Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: Increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* **141**, 2674–2682 (2000).
 234. Giustina, A., Mazziotti, G. & Canalis, E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocrine Reviews* vol. 29 535–559 (2008).
 235. Hasegawa, T. *et al.* Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* **37**, 405–411 (2002).
 236. Barleon, B. *et al.* Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**, 3336–3343 (1996).

237. Liu, Y. *et al.* Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* **122**, 3101–3113 (2012).
238. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* vol. 9 669–676 (2003).
239. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal* vol. 437 169–183 (2011).
240. Wang, W. & Yeung, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials* vol. 2 224–247 (2017).
241. Zhu, H. *et al.* Xenohybrid Bone Graft Containing Intrinsically Disordered Proteins Shows Enhanced in Vitro Bone Formation. *ACS Appl. Bio Mater.* **3**, 2263–2274 (2020).
242. Henkel, J. *et al.* Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res.* **1**, 216–48 (2013).
243. Qu, H., Fu, H., Han, Z. & Sun, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances* vol. 9 26252–26262 (2019).
244. Bao-Feng, L. Design of sports field based on nanometer materials. in *Applied Mechanics and Materials* vol. 340 366–369 (Trans Tech Publications Ltd, 2013).
245. Xie, C. *et al.* Pulse Electrochemical Driven Rapid Layer-by-Layer Assembly of Polydopamine and Hydroxyapatite Nanofilms via Alternative Redox in Situ Synthesis for Bone Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2**, 920–928 (2016).
246. Abidi, S. S. A. & Murtaza, Q. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *J. Mater. Sci. Technol.* **30**, 307–310 (2014).
247. Shuai, C., Li, P., Liu, J. & Peng, S. Optimization of TCP/HAP ratio for better properties of calcium phosphate scaffold via selective laser sintering. *Mater. Charact.* **77**, 23–31 (2013).
248. He, F. *et al.* Fabrication of β -tricalcium phosphate composite ceramic sphere-based scaffolds with hierarchical pore structure for bone regeneration. *Biofabrication* **9**, 025005 (2017).
249. Zhou, X., Zhang, N., Mankoci, S. & Sahai, N. Silicates in orthopedics and bone tissue engineering materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* vol. 105 2090–2102 (2017).
250. Wu, C., Ramaswamy, Y. & Zreiqat, H. Porous diopside (CaMgSi₂O₆) scaffold: A

- promising bioactive material for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **6**, 2237–2245 (2010).
251. Jebahi, S. *et al.* Biological therapy of strontium-substituted bioglass for soft tissue wound-healing: Responses to oxidative stress in ovariectomised rats. *Ann. Pharm. Fr.* **71**, 234–242 (2013).
 252. Bezerra, C. S., De Farias Lemos, C. M. G., De Sousa, M. & Gonçalves, L. R. B. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 42125 (2015).
 253. Gao, C., Peng, S., Feng, P. & Shuai, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research* vol. 5 1–33 (2017).
 254. Filippi, M., Born, G., Chaaban, M. & Scherberich, A. Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 8 474 (2020).
 255. Lee, J. C. *et al.* Optimizing Collagen Scaffolds for Bone Engineering: Effects of Cross-linking and Mineral Content on Structural Contraction and Osteogenesis. *J. Craniofac. Surg.* **26**, 1992–1996 (2015).
 256. Keogh, M. B., O'Brien, F. J. & Daly, J. S. A novel collagen scaffold supports human osteogenesis - Applications for bone tissue engineering. *Cell Tissue Res.* **340**, 169–177 (2010).
 257. Su, Y. *et al.* Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **8**, 763–771 (2012).
 258. Baktur, R., Yoon, S. H. & Kwon, S. Effects of multiwalled carbon nanotube reinforced collagen scaffolds on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Nanomater.* **2013**, (2013).
 259. Echave, M. C., Burgo, L. S., Pedraz, J. L. & Orive, G. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Curr. Pharm. Des.* **23**, (2017).
 260. Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J. & Muniglia, L. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* vol. 112 25–39 (2015).
 261. Logithkumar, R. *et al.* A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* vol. 151 172–188 (2016).
 262. Khor, E. & Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **24**, 2339–2349 (2003).

263. Costa-Pinto, A. R. *et al.* Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 21–28 (2012).
264. Madhumathi, K. *et al.* Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 12–15 (2009).
265. Kumar, J. P. *et al.* Synthesis and characterization of diopside particles and their suitability along with chitosan matrix for bone tissue engineering in Vitro and in Vivo. *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 970–981 (2014).
266. Florczyk, S. J. *et al.* Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **101**, 2974–2983 (2013).
267. Caetano, G. F. *et al.* Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. in *Procedia Engineering* vol. 110 59–66 (Elsevier Ltd, 2015).
268. Kang, R. *et al.* Osteogenesis of human induced pluripotent stem cells derived mesenchymal stem cells on hydroxyapatite contained nanofibers. *RSC Adv.* **4**, 5734–5739 (2014).
269. Omidvar, N., Ganji, F. & Eslaminejad, M. B. In vitro osteogenic induction of human marrow-derived mesenchymal stem cells by PCL fibrous scaffolds containing dexamethazone-loaded chitosan microspheres. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **104**, 1657–1667 (2016).
270. Williams, J. M. *et al.* Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* **26**, 4817–4827 (2005).
271. Singla, R. & Mehta, R. Preparation and Characterization of Polylactic Acid-Based Biodegradable Blends Processed Under Microwave Radiation. *Polym. - Plast. Technol. Eng.* **51**, 1014–1017 (2012).
272. Zhou, C. *et al.* Electrospun bio-nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering by cellulose nanocrystals reinforcing maleic anhydride grafted PLA. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 3847–3854 (2013).
273. Chen, X. *et al.* 3D printed porous PLA/nHA composite scaffolds with enhanced osteogenesis and osteoconductivity in vivo for bone regeneration. *Biomed. Mater.* **14**, (2019).
274. Dewey, M. J., Johnson, E. M., Weisgerber, D. W., Wheeler, M. B. & Harley, B. A.

- C. Shape-fitting collagen-PLA composite promotes osteogenic differentiation of porcine adipose stem cells. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **95**, 21–33 (2019).
275. Marrache, S. *et al.* Nanocarriers for Tracking and Treating Diseases. *Curr. Med. Chem.* **20**, 3500–3514 (2013).
276. Ghassemi, T. *et al.* Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Archives of Bone and Joint Surgery* vol. 6 90–99 (2018).
277. Zheng, Y. F., Gu, X. N. & Witte, F. Biodegradable metals. *Materials Science and Engineering R: Reports* vol. 77 1–34 (2014).
278. Orlov, D., Ralston, K. D., Birbilis, N. & Estrin, Y. Enhanced corrosion resistance of Mg alloy ZK60 after processing by integrated extrusion and equal channel angular pressing. *Acta Mater.* **59**, 6176–6186 (2011).
279. Gu, X. N. *et al.* In vitro study on equal channel angular pressing AZ31 magnesium alloy with and without back pressure. in *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology* vol. 176 1802–1806 (Elsevier, 2011).
280. Yang, Y. *et al.* The enhancement of Mg corrosion resistance by alloying Mn and laser-melting. *Materials (Basel)*. **9**, (2016).
281. Han, H. S. *et al.* Biodegradable Magnesium Alloys Promote Angio-Osteogenesis to Enhance Bone Repair. *Adv. Sci.* **7**, 2000800 (2020).
282. Alvarez, K. & Nakajima, H. Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials (Basel)*. **2**, 790–832 (2009).
283. Wang, Q. *et al.* Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: A review. *Nanomaterials* vol. 10 1–27 (2020).
284. Kopova, I. *et al.* Newly developed Ti-Nb-Zr-Ta-Si-Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength and enhanced biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C* **60**, 230–238 (2016).
285. Hussein, A. H., Gepreel, M. A. H., Gouda, M. K., Hefnawy, A. M. & Kandil, S. H. Biocompatibility of new Ti-Nb-Ta base alloys. *Mater. Sci. Eng. C* **61**, 574–578 (2016).
286. Hanawa, T. Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 7 170 (2019).
287. Prosecká, E. *et al.* Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **103**, 671–

- 682 (2015).
288. Prosecká, E. *et al.* Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **103**, 671–682 (2015).
289. Kalmar, L., Homola, D., Varga, G. & Tompa, P. Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization. *Bone* **51**, 528–534 (2012).
290. Wald, T. *et al.* Biophysical characterization of recombinant human ameloblastin. *Eur. J. Oral Sci.* **119**, 261–269 (2011).
291. Ramis, J. M. *et al.* Effect of enamel matrix derivative and of proline-rich synthetic peptides on the differentiation of human mesenchymal stem cells toward the osteogenic lineage. *Tissue Eng. - Part A* **18**, 1253–1263 (2012).
292. Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F. & Perale, G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J. Clin. Periodontol.* **46**, 92–102 (2019).
293. Fu, R. *et al.* Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* vol. 158 890–902 (2013).
294. James, A. W. *et al.* A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 22 284–297 (2016).
295. Carragee, E. J., Hurwitz, E. L. & Weiner, B. K. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: Emerging safety concerns and lessons learned. *Spine Journal* vol. 11 471–491 (2011).
296. Delawi, D. *et al.* OP-1 compared with iliac crest autograft in instrumented posterolateral fusion a randomized, multicenter non-inferiority trial. *J. Bone Jt. Surg. - Am. Vol.* **98**, 441–448 (2016).
297. Lukasova, V. *et al.* Osteogenic differentiation of 3D cultured mesenchymal stem cells induced by bioactive peptides. *Cell Prolif.* **50**, (2017).
298. McKee, M. D. & Cole, W. G. Bone Matrix and Mineralization. in *Pediatric Bone* 9–37 (Elsevier Inc., 2012). doi:10.1016/B978-0-12-382040-2.10002-4.
299. Price, P. A., Otsuka, A. S., Poser, J. W., Kristaponis, J. & Raman, N. Characterization of a γ carboxyglutamic acid containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1447–1451 (1976).
300. 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* vol. 71 1201–1215 (2017).
301. Niinomi, M., Liu, Y., Nakai, M., Liu, H. & Li, H. Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone. *Regenerative Biomaterials* vol. 3 173–185 (2016).
 302. Li, Y., Wong, C., Xiong, J., Hodgson, P. & Wen, C. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. *J. Dent. Res.* **89**, 493–497 (2010).
 303. Liu, J., Ruan, J., Chang, L., Yang, H. & Ruan, W. Porous Nb-Ti-Ta alloy scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication, mechanical properties and in vitro/vivo biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C* **78**, 503–512 (2017).
 304. Málek, J. *et al.* Microstructure and mechanical properties of Ti-35Nb-6Ta alloy after thermomechanical treatment. *Mater. Charact.* **66**, 75–82 (2012).
 305. Kulkarni, M. *et al.* Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology* vol. 26 (2015).
 306. Capellato, P., Smith, B. S., Papat, K. C. & Claro, A. P. R. A. Fibroblast functionality on novel Ti₃₀Ta nanotube array. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 2060–2067 (2012).
 307. Oh, S. *et al.* Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2130–2135 (2009).
 308. Voltrova, B. *et al.* Different diameters of titanium dioxide nanotubes modulate Saos-2 osteoblast-like cell adhesion and osteogenic differentiation and nanomechanical properties of the surface. *RSC Adv.* **9**, 11341–11355 (2019).
 309. Fojt, J., Filip, V. & Joska, L. On the increasing of adhesive strength of nanotube layers on beta titanium alloys for medical applications. *Appl. Surf. Sci.* **355**, 52–58 (2015).
 310. Zhao, X. *et al.* Delicate refinement of surface nanotopography by adjusting TiO₂ coating chemical composition for enhanced interfacial biocompatibility. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 8203–8209 (2013).
 311. Qadir, M., Li, Y., Biesiekierski, A. & Wen, C. Optimized Fabrication and Characterization of TiO₂-Nb₂O₅-ZrO₂ Nanotubes on β -Phase TiZr₃₅Nb₂₈ Alloy for Biomedical Applications via the Taguchi Method. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 2750–2761 (2019).
 312. Shin, D. H., Shokuhfar, T., Choi, C. K., Lee, S. H. & Friedrich, C. Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces. *Nanotechnology* **22**, (2011).
 313. Saha, S., Kumar, R., Pramanik, K. & Biswas, A. Interaction of osteoblast -TiO₂

- nanotubes in vitro: The combinatorial effect of surface topography and other physico-chemical factors governs the cell fate. *Appl. Surf. Sci.* **449**, 152–165 (2018).
314. Shokuhfar, T. *et al.* Biophysical evaluation of cells on nanotubular surfaces: The effects of atomic ordering and chemistry. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3737–3748 (2014).
 315. Bačáková, L., Filová, E., Rypáček, F., Švorčík, V. & Starý, V. Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. *Physiol. Res* **53**, 35–45 (2004).
 316. Liu, J. *et al.* Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4864–E4873 (2015).
 317. 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).
 318. Lv, L. *et al.* The nanoscale geometry of TiO₂ nanotubes influences the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by modulating H3K4 trimethylation. *Biomaterials* **39**, 193–205 (2015).
 319. Park, J., Bauer, S., Von Der Mark, K. & Schmuki, P. Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett.* **7**, 1686–1691 (2007).
 320. Jarolimova, P. *et al.* Mesenchymal stem cell interaction with Ti6Al4V alloy pre-exposed to simulated body fluid. *RSC Adv.* **10**, 6858–6872 (2020).
 321. Shin, Y. C. *et al.* Enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti surfaces with electrochemical nanopattern formation. *Mater. Sci. Eng. C* **99**, 1174–1181 (2019).
 322. Rutkovskiy, A., Stensløyken, K.-O. & Vaage, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **22**, 95–106 (2016).
 323. Ganss, B., Kim, R. H. & Sodek, J. Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* vol. 10 79–98 (1999).
 324. Kauschke, V. *et al.* Effects of new beta-type Ti-40Nb implant materials, brain-derived neurotrophic factor, acetylcholine and nicotine on human mesenchymal stem cells of osteoporotic and non osteoporotic donors. *PLoS One* **13**, (2018).
 325. Bahl, S., Meka, S. R. K., Suwas, S. & Chatterjee, K. Surface Severe Plastic Deformation of an Orthopedic Ti-Nb-Sn Alloy Induces Unusual Precipitate Remodeling and Supports Stem Cell Osteogenesis through Akt Signaling. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 3132–3142 (2018).

326. Von Wilmsky, C. *et al.* The diameter of anodic TiO₂ nanotubes affects bone formation and correlates with the bone morphogenetic protein-2 expression in vivo. *Clin. Oral Implants Res.* **23**, 359–366 (2012).
327. Liu, J., Ruan, J., Chang, L., Yang, H. & Ruan, W. Porous Nb-Ti-Ta alloy scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication, mechanical properties and in vitro/vivo biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C* **78**, 503–512 (2017).
328. Liu, J., Zhou, X., Wang, H., Yang, H. & Ruan, J. In vitro cell response and in vivo primary osteointegration of highly porous Ta-Nb alloys as implant materials. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **107**, 573–581 (2019).
329. Losic, D., Aw, M. S., Santos, A., Gulati, K. & Bariana, M. Titania nanotube arrays for local drug delivery: Recent advances and perspectives. *Expert Opinion on Drug Delivery* vol. 12 103–127 (2015).
330. 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).
331. Pamula, E. *et al.* The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 425–435 (2008).
332. Loh, Q. L. & Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 19 485–502 (2013).
333. 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).
334. Cai, Y. *et al.* Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J. Mater. Chem.* **17**, 3780–3787 (2007).
335. Higashi, T. & Okamoto, H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *J. Endod.* **22**, 236–239 (1996).
336. Khashaba, R. M. *et al.* Cytotoxicity, calcium release, and pH changes generated by novel calcium phosphate cement formulations. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **93**, 297–303 (2010).
337. Witek, L., Shi, Y. & Smay, J. Controlling calcium and phosphate ion release of 3D printed bioactive ceramic scaffolds: An in vitro study. *J. Adv. Ceram.* **6**, 157–164 (2017).

338. Irawan, R. M., Margono, A. & Djauhari, N. The comparison of calcium ion release and pH changes from modified MTA and bioceramics in regeneration. in *Journal of Physics: Conference Series* vol. 884 (Institute of Physics Publishing, 2017).
339. Pinto, M. C. X. *et al.* Calcium signaling and cell proliferation. *Cell. Signal.* **27**, 2139–2149 (2015).
340. Zayzafoon, M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 97 56–70 (2006).
341. Penido, M. G. M. G. & Alon, U. S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatric Nephrology* vol. 27 2039–2048 (2012).
342. 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).
343. 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).
344. Chow, L. C. Solubility of calcium phosphates. *Monogr. Oral Sci.* **18**, 94–111 (2001).
345. Shih, Y.-R. V., Chen, C.-N., Tsai, S.-W., Wang, Y. J. & Lee, O. K. Growth of Mesenchymal Stem Cells on Electrospun Type I Collagen Nanofibers. *Stem Cells* **24**, 2391–2397 (2006).
346. Zeng, J., Lin, J., Yao, G., Kong, K. & Wang, X. Effect of modified compound calcium phosphate cement on the differentiation and osteogenesis of bone mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Surg. Res.* **12**, (2017).
347. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* vol. 26 5474–5491 (2005).
348. Huri, P. Y., Ozilgen, B. A., Hutton, D. L. & Grayson, W. L. Scaffold pore size modulates in vitro osteogenesis of human adipose-derived stem/stromal cells. *Biomed. Mater.* **9**, (2014).
349. Kapat, K. *et al.* Influence of Porosity and Pore-Size Distribution in Ti6Al4 v Foam on Physicomechanical Properties, Osteogenesis, and Quantitative Validation of Bone Ingrowth by Micro-Computed Tomography. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 39235–39248 (2017).
350. Di Luca, A. *et al.* Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci. Rep.* **6**,

- (2016).
351. Viti, F. *et al.* Osteogenic differentiation of MSC through calcium signaling activation: Transcriptomics and functional analysis. *PLoS One* **11**, (2016).
 352. Silver, I. A., Murrills, R. J. & Etherington, D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **175**, 266–276 (1988).
 353. Eyckmans, J., Roberts, S., Schrooten, J. & Luyten, F. A clinically relevant model of osteoinduction: a process requiring calcium phosphate and BMP/Wnt signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1845–1856 (2010).
 354. Viti, F. *et al.* Osteogenic Differentiation of MSC through Calcium Signaling Activation: Transcriptomics and Functional Analysis. *PLoS One* **11**, e0148173 (2016).
 355. Wang, H. *et al.* Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 3338–3348 (2007).
 356. 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).
 357. Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G. & Missirlis, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* **22**, 87–96 (2000).
 358. Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. & Bizios, R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 475–483 (2000).
 359. Veisoh, O. *et al.* Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat. Mater.* **14**, 643–651 (2015).
 360. Oh, W. K. *et al.* Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-Titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano* **4**, 5301–5313 (2010).
 361. 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).

362. 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).
363. J, Z. *et al.* Accurate micro-computed tomography imaging of pore spaces in collagen-based scaffold. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, (2016).
364. 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).
365. Andreopoulos, F. & Persaud, I. Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. *Biomaterials* **27**, 2468–2476 (2006).
366. Benington, L., Rajan, G., Locher, C. & Lim, L. Fibroblast Growth Factor 2-A Review of Stabilisation Approaches for Clinical Applications. *Pharmaceutics* **12**, 1–14 (2020).
367. Akita, S., Akino, K. & Hirano, A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. *Adv. wound care* **2**, 44–49 (2013).
368. Tiede, S. *et al.* Basic fibroblast growth factor: a potential new therapeutic tool for the treatment of hypertrophic and keloid scars. *Ann. Anat.* **191**, 33–44 (2009).
369. Koledova, Z. *et al.* Fibroblast Growth Factor 2 Protein Stability Provides Decreased Dependence on Heparin for Induction of FGFR Signaling and Alters ERK Signaling Dynamics. *Front. cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
370. Ludwig, T. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**, 185–187 (2006).
371. Kanematsu, A. *et al.* Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. *J. Control. Release* **99**, 281–292 (2004).
372. Munisso, M. *et al.* Collagen/Gelatin Sponges (CGSs) Provide Both Protection and Release of bFGF: An In Vitro Study. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
373. Wu, J. *et al.* Heparin-functionalized collagen matrices with controlled release of basic fibroblast growth factor. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **22**, 107–114 (2011).
374. Babrnáková, J. *et al.* Synergistic effect of bovine platelet lysate and various polysaccharides on the biological properties of collagen-based scaffolds for tissue engineering: Scaffold preparation, chemo-physical characterization, in vitro and ex ovo evaluation. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **100**, 236–246 (2019).
375. Litwin, M. *et al.* The role of FGF2 in migration and tubulogenesis of endothelial progenitor cells in relation to pro-angiogenic growth factor production. *Mol. Cell.*

- Biochem.* **410**, 131–142 (2015).
376. Marks, M., Doillon, C. & Silver, F. Effects of fibroblasts and basic fibroblast growth factor on facilitation of dermal wound healing by type I collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* **25**, 683–696 (1991).
377. Judith, R., Nithya, M., Rose, C. & Mandal, A. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. *Life Sci.* **87**, 1–8 (2010).
378. Brew, K., Dinakarpanian, D. & Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 267–283 (2000).
379. Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A. & Dubertret, L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 679–685 (1991).
380. Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* **298**, 29–32 (1992).
381. Holmes, K., Roberts, O., Thomas, A. & Cross, M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* **19**, 2003–2012 (2007).
382. Jetten, N. *et al.* Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118 (2014).
383. Singla, D., Singla, R., Abdelli, L. & Glass, C. Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart. *PLoS One* **10**, (2015).
384. Im, J. *et al.* FGF2 alters macrophage polarization, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
385. Matricali, G. A., Dereymaeker, G. P. E. & Luvten, F. P. Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: A review. *Acta Orthopaedica Belgica* vol. 76 669–674 (2010).
386. Darling, E. M. & Athanasiou, K. A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res.* **23**, 425–432 (2005).
387. Pulliainen, O. *et al.* Poly-L-D-lactic acid scaffold in the repair of porcine knee cartilage lesions. *Tissue Eng.* **13**, 1347–1355 (2007).
388. Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., Hsu, H. P., Martin, S. D. & Spector, M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical

- properties of articular cartilage in the canine knee. *J. Orthop. Res.* **18**, 790–799 (2000).
389. Kim, H. D. *et al.* Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, (2017).
390. Wang, W., Zhang, Y., Ye, R. & Ni, Y. Physical crosslinkings of edible collagen casing. *Int. J. Biol. Macromol.* **81**, 920–925 (2015).
391. Takitoh, T. *et al.* Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* **119**, 217–225 (2015).
392. Maslennikova, A. *et al.* Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling. *Int. J. Radiat. Biol.* **91**, 240–247 (2015).
393. Patrício, T., Domingos, M., Gloria, A. & Bártolo, P. Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering. in *Procedia CIRP* vol. 5 110–114 (Elsevier B.V., 2013).
394. Gordon, M. K. & Hahn, R. A. Collagens. *Cell and Tissue Research* vol. 339 247–257 (2010).
395. Vinatier, C. & Guicheux, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 139–144 (2016).
396. Amini, A. R., Laurencin, C. T. & Nukavarapu, S. P. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **40**, 363–408 (2012).
397. Solorio, L. D., Fu, A. S., Hernández-Irizarry, R. & Alsberg, E. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell aggregates via controlled release of TGF- β 1 from incorporated polymer microspheres. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **92**, 1139–1144 (2010).
398. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research* vol. 4 30–35 (2002).
399. Hefka Blahnova, V., Dankova, J., Rampichova, M. & Filova, E. Combinations of growth factors for human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Bone Joint Res.* **9**, 412–420 (2020).
400. Shetty, S., Kapoor, N., Bondu, J., Thomas, N. & Paul, T. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* vol. 20 846–852 (2016).
401. Ottewell, P. D. The role of osteoblasts in bone metastasis. *J. Bone Oncol.* **5**, 124–127 (2016).

402. Blair, H. C. *et al.* Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 23 268–280 (2017).
403. Manual of Diagnostic Cytology – ScienceOpen.
<https://www.scienceopen.com/document?vid=e4a20ea9-5e85-440c-a1c9-71a90fdb78d1>.
404. Caetano-Lopes, J., Canhão, H. & Fonseca, J. E. Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatológica portuguesa* vol. 32 103–110 (2007).
405. 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* vol. 29 49–61 (2017).
406. Prame Kumar, K., Nicholls, A. J. & Wong, C. H. Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and Tissue Research* vol. 371 551–565 (2018).
407. McNally, A. K. & Anderson, J. M. Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* **91**, 673–681 (2011).
408. Miron, R. J. & Bosshardt, D. D. Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 24 53–65 (2018).
409. Jacobs, L. *et al.* Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: An intervention study. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* **9**, 64 (2010).
410. Nathan, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* vol. 6 173–182 (2006).
411. Kisiel, M. *et al.* Critical assessment of rhBMP-2 mediated bone induction: An in vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release* **162**, 646–653 (2012).
412. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–13 (2006).
413. Ghanaati, S. *et al.* Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater.* **6**, 4476–4487 (2010).

10 Publikace, které jsou podkladem disertace

Zhu H.*, **Hefka Blahnova 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 Blahnova 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

11 Ostatní publikace autorky

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

Hefka Blahnova 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.

Jarolimova P., Voltrova B., **Blahnova 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

Voltrova B., Hybasek V., **Blahnova 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

Gregor A., Filova E., Novak M., Kronek J., Chlup H., Buzgo M., **Blahnova 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.