

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie



## **Vliv VEGF růstového faktoru na diferenciaci kmenových buněk směrem k hladkému svalu**

**Veronika Musílková**  
**Hlavní město Praha**

**Praha, 2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č.4: Biologie

**Vliv VEGF růstového faktoru na diferenciaci  
kmenových buněk směrem k hladkému svalu**

**The influence of VEGF growth factor on stem cells  
differentiation towards smooth muscle**

**Autoři:** Veronika Musílková

**Škola:** Gymnázium Christiana Dopplera, Zborovská 45, 150 00 Praha

**Kraj:** Hlavní město Praha

**Konzultant:** RNDr. Jana Musílková CSc.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 2. února 2020 .....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své konzultantce RNDr. Janě Musílkové CSc., jež mi poskytla mnoho cenných rad a jež mne již řadu let vedla skrze odborné studentské stáže programu Otevřené vědy Akademie věd ČR. Tímto děkuji i Mgr. Zuzaně Všeckové za organizaci projektů OV AV ČR, který umožnil vznik této práce. Velké díky patří i celému Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství FgÚ AV ČR pod vedením Doc. MUDr. Lucie Bačákové, CSc.. Zvláštní poděkování patří i Mgr. Ivaně Zajanové za rychlé barvení části vzorků.

## Anotace

V této práci SOČ jsem se zabývala zkoumáním diferenciaci lidských kmenových buněk směrem k hladkému svalu pro účely tkáňového inženýrství. Zjišťovala jsem především vliv růstových faktorů na tento proces. Dnešní tkáňové inženýrství usiluje o vytvoření cévní náhrady obsahující buněčnou složku, která by umožnila samoopravitelnost transplantované náhrady v lidském těle. Zvládnutím problematiky diferenciaci kmenových buněk směrem k hladkému svalu jako zdroje buněk pro vytvoření této buněčné složky se posuneme o krok blíže k moderním a dlouhodobě funkčním cévním náhradám, včetně náhrady cévy o malém průřezu, která v současné medicíně schází.

Kmenové buňky izolované z tukové tkáně jsme kultivovali v dynamickém i ve statickém prostředí v diferenciacním médiu DMEM, obsahujícím růstový faktor TGF- $\beta$  produkovaný původně fibroblasty, a regulační molekulu BMP4, která během vývoje mezodermy podporuje vaskularizaci kostní tkáně. K části vzorků jsme přidali také vaskulární endotelový růstový faktor VEGF, původně znám jako produkt buněk endotelových, tedy buněk, které sousedí v cévní stěně s buňkami hladkého svaly. V první části pokusu jsme zjistili, že růstový faktor VEGF má v dynamickém prostředí pozitivní vliv na diferenciaci kmenových buněk. Ve druhé části pokusu jsme testovali ve statickém prostředí pět typů diferenciacních médií, které obsahovaly různé kombinace tří původně sledovaných růstových faktorů TGF- $\beta$ , BMP-4 a VEGF, a hledali kombinaci optimální. Úroveň diferenciaci buněk po 7 a 14 dnech kultivace jsme zjišťovali jednak na úrovni genové exprese specifických markerů metodou real-time PCR, rovněž jsme prováděli pozorování zafixovaných vzorků vizualizovaných metodou imunofluorescenčního barvení, kde jsme zjišťovali rozvinutost cytoskeletálních struktur  $\alpha$ -aktinu a kalponinu, typických pro hladký sval. Na základě těchto postupů jsem zjistila, že VEGF růstový faktor má pozitivní vliv na diferenciaci kmenových buněk směrem na buňky hladkého svaly, a že diferenciaci ve statickém prostředí probíhá nejúspěšněji v médiu Naopak diferenciaci kmenových buněk směrem k endotelu v tomto médiu prakticky neprobíhá.

*Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví České republiky (grant AZV NV19-02-00068) a grantem Grantové agentury České republiky (grant GAČR 18-01163S).*

## Klíčová slova

kmenové buňky; diferenciaci; hladký sval; růstové faktory; VEGF

## Annotation

In my work I focused on human adipose tissue-derived stem cells (ASC) differentiation towards vascular smooth muscle cells for purposes of tissue engineering. Modern tissue engineering is attempting to construct the vascular prostheses containing the cell component that enables their selfrepair in human body. Managing of the stem cell differentiation to the smooth muscle cells as a source of this cell component will take us one step further to the developing of the modern and the in long term functional vascular prostheses, including the small diameter vascular prosthesis, that are not available in current medicine.

The human ASC were cultivated either under static and dynamic conditions in a DMEM medium supplemented by the following growth factors: transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), originally found to be produced by fibroblasts; bone morphogenetic protein (BMP4), i.e. a regulatory molecule involved in the mesoderm induction during development and supporting the vascularization in bone tissue. To one part of cultivated cells we added the vascular endothelial growth factor (VEGF), originally found to be produced by endothelial cells, i.e. adjacent cells to the smooth muscle cells in the *tunica media* of the vascular wall. In the first part of our work we found out that VEGF has in dynamic system a positive influence on the stem cell differentiation toward smooth muscle. Subsequently we tested five types of cell culture medium containing different combinations of three growth factors TGF- $\beta$ , BMP-4 and VEGF. We were searching for the optimal combination. The cell differentiation after 7 and 14 days of cultivation was estimated either at the gene expression level of specific markers by real-time PCR, or by immunofluorescence staining of specific protein structures of  $\alpha$ -actin and calponin. Potential differentiation of ASC towards endothelial cell type was also taken into account, but it was not confirmed. We can conclude, that VEGF has a positive influence on the stem cell differentiation toward smooth muscle. The optimal differentiation under static conditions was attempt in medium containing the combination of VEGF and TGF $\beta$ .

*Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NV19-02-00068) and by the Czech Science Foundation (grant No. 18-01163S).*

## Keywords

Stem cell; differentiation; smooth muscle cell; growth factors; VEGF

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTA2	Actin alpha 2, smooth muscle
ASC	Kmenové buňky tukové tkáně ( <i>Adipose-derived Stem Cells</i> )
AV ČR	Akademie věd České republiky
B2M	Gen $\beta$ -2 mikroglobulinu
BMP4	Kostní morfogenetický protein ( <i>Bone Morphogenetic Protein 4</i> )
CD 31	Protein kódovaný genem PECAM1 ( <i>Cluster of Differentiation 31</i> ), marker endotelu
cDNA	Cyklická DNA
CNN1	Gen proteinu kalponinu 1, markeru hladkého svalu
ČSÚ	Český statistický úřad
DMEM	Eaglovo minimální esenciální médium modifikované Dulbecem ( <i>Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium</i> )
EC	Buňky endotelu ( <i>Endothelial cells</i> )
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ePTFE	Expandovaný polytetrafluorethylen
FgÚ AV ČR	Fyziologický ústav Akademie věd České republiky
FS	Fetální sérum
GF	Růstový faktor ( <i>Growth Factor</i> )
ICHS	Ischemické choroby srdeční
KDR	Těž VEGFR-2, gen pro receptor pro VEGF-A
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina ( <i>Messenger RiboNucleon Acid</i> )
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	Národní zdravotnický institut Spojených států amerických( <i>National</i>

*Institutes for Health)*

OV	Projekt Otevřené vědy Akademie věd České republiky
PBS	Fyziologický roztok pufovaný fosfáty ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDGF	Placenta derived growth factor, podtyp růstového faktoru VEGF
PECAM 1	Gen pro syntézu endotelového proteinu CD 31( <i>Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i> )
PET	Polyethylentereftalát
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase , modifikace klasické polymerázové řetězové reakce ( <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> )
STREX	Strex Automated Cell Stretching System model STB-140-04
TGFβ	transforming growth factor, růstový faktor produkovaný např. buňkami
TGFβ	Typ růstového faktoru fibroblastů ( <i>Transforming Growth Factor</i> )
TRIS	Běžně používaný pufr (tris(hydroxymethyl)aminomethan)
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	Endotelový růstový faktro ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ), v této práci míněna izoforma VEGF-A 165
VEGFR-2	Viz KDR
VSMC	Buňky hladkého svalů ( <i>Vascular smooth muscle cells</i> )



# OBSAH

1	Úvod a cíle práce .....	11
2	Teoretický úvod .....	12
2.1	Cévy v lidském těle .....	12
2.1.1	Endotel .....	13
2.1.2	Hladký sval .....	13
2.2	Onemocnění cévního systému.....	13
2.2.1	Ateroskleróza .....	14
2.2.2	Ischemické choroby srdeční (ICHS).....	14
2.3	Cévní náhrady .....	15
2.3.1	Bypass .....	15
2.3.2	Biologické náhrady .....	15
2.3.3	Syntetické náhrady.....	16
2.4	Markery hladkého svalu .....	16
2.5	Markery endotelu .....	17
2.6	Kmenové buňky .....	17
2.6.1	Diferenciace kmenových buněk.....	17
2.7	Růstové faktory .....	18
2.7.1	TGFβ.....	18
2.7.2	BMP4 .....	18
2.7.3	VEGF .....	18
3	Materiály a metody .....	20
3.1	Buňky .....	20
3.2	Kultivace ve statickém a dynamickém prostředí .....	20
3.2.1	Nasazování buněk na podklady .....	21
3.2.2	Kultivace v dynamickém systému STREX .....	22
3.3	Real-Time PCR .....	25
3.3.1	Izolace mRNA z buněk kultivovaných na silikonových komůrkách .....	25
3.3.2	Izolace mRNA z buněk kultivovaných v polystyrenových destičkách .....	25
3.3.3	Reverzní transkripce .....	25
3.3.4	Vlastní měření RT-PCR.....	25
3.3.5	Analýza dat .....	27

3.4	Vizualizace buněk .....	27
3.4.1	Fixace buněk .....	27
3.4.2	Imunofluorescenční barvení .....	27
3.4.3	Barvení buněčných jader .....	28
3.5	Fotografování .....	28
4	Výsledky a diskuse .....	29
4.1	Vliv VEGF na diferenciaci buněk .....	29
4.1.1	Vliv VEGF na tvorbu markerů hladkého svalu .....	29
4.1.2	Vliv VEGF na tvorbu markerů endotelu .....	32
4.2	Výběr optimální kombinace růstových faktorů pro diferenciaci .....	35
4.2.1	Detekce míry diferenciaci buněk metodou RT-PCR .....	36
4.2.2	Detekce míry diferenciaci buněk metodou imunofluorescenčního barvení .....	40
5	Závěr .....	45
6	Reference .....	46
7	Seznam obrázků a grafů .....	49

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Kardiovaskulární onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí v civilizovaném světě. Podstoupí-li dnes pacient operaci cévního systému, kupříkladu transplantaci cévy, bude mu voperována syntetická cévní náhrada. U tohoto typu náhrad je vyšší riziko vzniku krevních sraženin, které mohou způsobit až smrt pacienta. Syntetickou náhradu o malém průsvitu (0,6cm a menší) z důvodu vysokého rizika ucpání vůbec nelze použít. Navíc časem dochází k degradaci použitého materiálu, do patnácti let bývá nutná reoperace. Tento postup znamená především pro mladšího pacienta podstoupit více operačních zákroků, u starších pacientů je pak reoperace riskantní či nemožné. Tkáňové inženýrství proto usiluje v současné době o vytvoření nové cévní náhrady na bázi biologické (kupříkladu decelularizovaná prasečí céva osázená diferencovanými lidskými kmenovými buňkami), která by díky buněčné složce byla samoopravitelná. Dnes by již bylo možné implantovat pacientovi náhradu osázenou jeho vlastními cévními buňkami, tento postup je však nákladný. Biologické náhrady na principu kmenových buněk by díky nízké imunogenicitě těchto primárně nediferencovaných buněk poskytovali výhodu universalitu pro všechny typy pacientů. Navíc by tak bylo možno vytvořit cévní náhrady o malém průsvitu, které v dnešních medicínských podmínkách nejsou dosažitelné. To by otevřelo možnost použití cévních náhrad i u dětských pacientů, což dosud nebylo možné.

K vytvoření biologického cévního transplantátu obsahujícího buněčnou složku je zapotřebí rozšíření znalostí v oblasti diferenciaci kmenových buněk směrem k buněčným typům vytvářejících cévy. Tím je právě hladký sval. V této práci se budu zabývat zkoumáním vlivu růstových faktorů na diferenciaci kmenových buněk směrem k hladkému svalu. Specificky se budeme zaměřovat na vliv VEGF růstového faktoru, jehož účinky na proces diferenciaci nejsou zatím zcela známy, byť s ním buňky hladkého svalu v lidských cévách v prostředí *in vivo* přichází do přímého kontaktu. Rovněž se budu zabývat sledováním a následným porovnáváním účinků diferenciačního média a médií s kombinacemi růstových faktorů na proces diferenciaci.

Hlavní cíle práce:

- Zjistit účinek růstového faktoru VEGF na diferenciaci kmenových buněk tukové tkáně směrem k hladkému svalu.
- Určit složení média nejvhodnějšího pro diferenciaci tukových kmenových buněk směrem k buňkám hladkého svalu sledováním míry exprese specifických markerů a tvorby cytoskeletálních struktur typických pro hladký sval

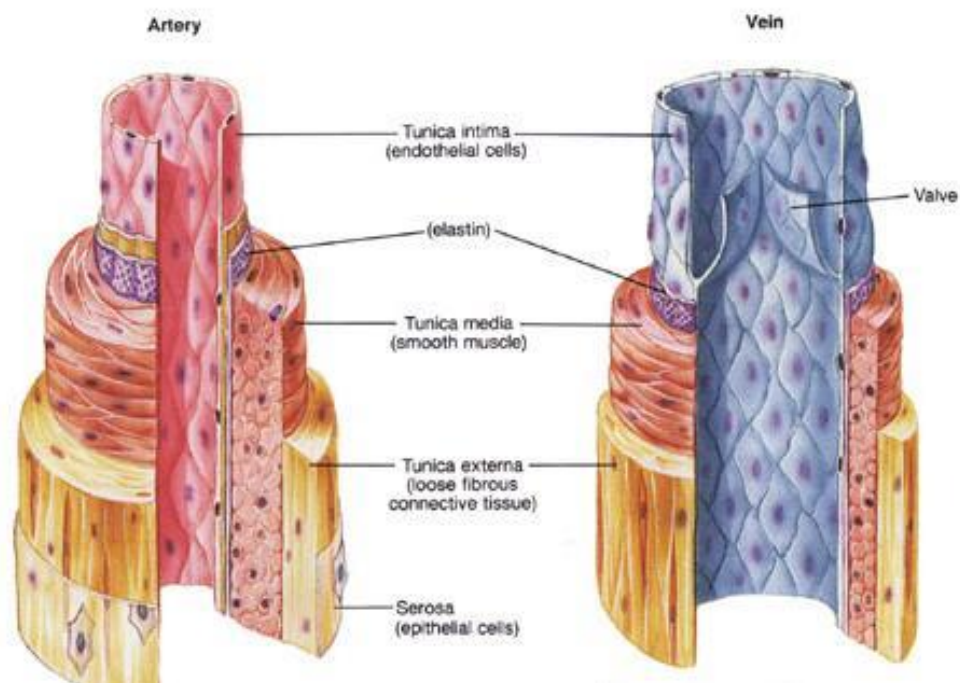
V teoretickém úvodu nejprve popíši stavbu lidských cév a budu se věnovat častým cévním onemocněním. Dále bych ráda shrnula téma současných cévních náhrad včetně jejich výhod a nevýhod, případně možnosti nového typu biologických náhrad. Rovněž se budu zabývat vlastnostmi kmenových buněk vzhledem k jejich potenciálu pro využití v oboru tkáňového inženýrství, dále některými růstovými faktory jako jedním z faktorů diferenciaci buněk.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Cévy v lidském těle

Lidské cévy dodávají kyslík a potřebné látky všem tkáním a orgánům v lidském těle. Hlavními cévními komponenty jsou endotelové buňky (EC, endothelial cells) a vaskulární buňky hladkého svalstva (VSMC, vascular smooth muscle cells). Pouze u vlásečnic buněčná složka hladkého svalstva chybí. Oba buněčné typy (EC a VSMC) jsou potřebné pro správné fungování cév, zahrnující kontrolu krevního tlaku, interakce s buňkami imunitního systému a předávání potřebných látek z krve do tkání. EC a VSMC jsou zahrnuty v množství patologických procesů v cévách, jako je například ateroskleróza.

Lidské cévy se skládají ze tří soustředných vrstev tkání: *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia* (Obr. 2.1). Tloušťka každé z vrstev je rozdílná v závislosti na typu cévy. *Tunica adventitia* (alt. *tunica externa*) je vnější vrstva skládající se z fibroblastů a kolagenových pojivových tkání (v arteriích rovněž i z elastických lamin) (Trávníčková, 2018). *Adventitia* je rovněž zdrojem pericytů (v kapilárah a mikrocévách) a adventiálních cév (kolem velkých cév), které jsou fakticky mesenchymální kmenové buňky schopné diferenciaci na další buněčné typy (Corselli *et al.*, 2012).



**Obr. 2.1:** Anatomie tepny (**artery**) a žíly (**vein**).

## 2.1.1 Endotel

Buňky endotelu tvoří hlavní složku vnitřní vrstvy lidských cév *tunica intima*, která přichází do přímého kontaktu s krví. *Intima* se dále skládá z bazální membrány a pojivové tkáně. Rovněž může obsahovat podpurná vnější elastická lamina. (Trávníčková, 2018)

Buňky endotelu, v případě implantování do lumenu cévní náhrady, zabraňují trombóze a okluzi transplantátu. Kromě toho podporují migraci vlastních EC příjemce do transplantované náhrady a formaci neointimy. Tím zvyšují délku životnosti náhrady. (Dimitrievska, Niklason, 2014)

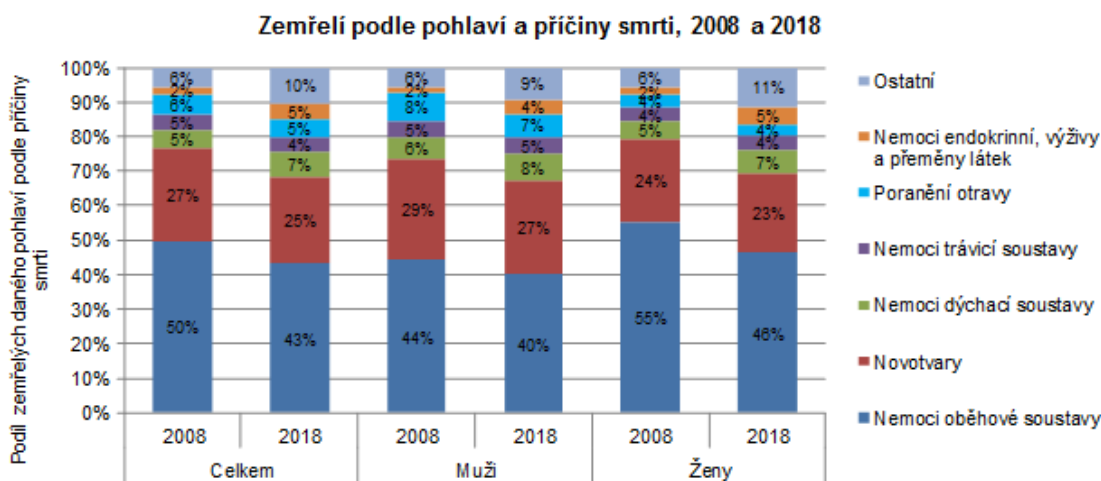
## 2.1.2 Hladký sval

Buňky hladkého svalu tvoří hlavní složku střední vrstvy cév *tunica media*. *Media* se skládá z buněk VSMC a fibroblastů. Oba přítomné buněčné typy produkují extracelulární matrix převážně se skládající z vláken elastinu a kolagenu (Trávníčková, 2018). Zralé a diferencované buňky hladkého svalu jsou protáhlé a vřetenovité, vytvářejí v buněčné kultuře samovolně svazky a později typickou strukturu valů a údolí nazývanou v literatuře „hills and valleys“. (Campbell 2012)

Hladký sval přítomný v cévách je schopný kontrakce, ta je ale pomalejší a zároveň plynulejší, než v případě svalu kosterního. V orgánech je tak hladký sval schopný vyvolat a udržet stabilní tonus. Tímto způsobem je upravován průsvit cévy a následně i průtok krve lumenem cévy. Hladký sval je inervován autonomním nervovým systémem, je tedy na vůli nezávislý. (Lodish *et al.*, 2008)

## 2.2 Onemocnění cévního systému

Nejčtenější příčinou smrti jsou v ČR dlouhodobě nemoci oběhové soustavy, v roce 2018 stály za úmrtím 40,0 % zemřelých mužů a 46,5 % zemřelých žen. Celkem zapříčinila onemocnění oběhového systému 43% veškerých úmrtí v ČR za rok 2018 (ČSÚ, 2018).



Obr. 2.2: Statistické údaje příčin úmrtí v ČR v letech 2008 a 2018.

## 2.2.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je komplexní systémové onemocnění postihující cévy tepenného řečiště (velké a střední). Na patogenezi aterosklerózy se podílí komplex po sobě jdoucích událostí, zahrnujících rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny arterií jako odpověď na hemodynamické poškození cévní stěny v nejvíce namáhaných místech. To způsobuje nejprve dysfunkci cévního endotelu související s tvorbou cytokinů, adhezních molekul a růstových faktorů. Aktivované endotelové buňky přitahují do místa léze monocyty/makrofágy a T-lymfocyty z krevní cirkulace a buňky vaskulární hladké svaloviny z *medie*. Subendotelový prostor se postupně zvětšuje. Rovněž dochází k pohlcování uvolněného cholesterolu makrofágy za vzniku pěnových buněk. Stěna cévy se v místě poškození ztlušťuje. Celý proces vyúsťuje do tvorby aterómu (aterómového plátu)(Jaroslav Masopust). Při komplikacích a ruptuře aterómového plátu vzniká trombus, který může být následně příčinou infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice, v závislosti na tom, jaké tepny byly poškozeny. Jedny z tepen nejčastěji trpících aterosklerózou jsou právě koronární tepny (Jakubíčková, 2017). Vezmeme-li v potaz i poškození jiných tepen po celém těle, ateroskleróza je zodpovědná téměř za polovinu úmrtí v Evropě (Chlupáč *et al.*, 2009). Rizikové faktory aterosklerózy jsou výsledkem interakce životního stylu jedince s jeho genetickou výbavou. Rozdělují se na ovlivnitelné, mezi něž patří z hlavních rizikových faktorů kouření, hyperlipidémie, hypertenze a diabetes mellitus, a neovlivnitelné, mezi něž patří věk, mužské pohlaví a genetická zátěž, obvykle vyjádřená pozitivní rodinnou anamnézou předčasné ICHS nebo jiné klinické manifestace aterosklerózy. (Hradec, Býma, 2007)

## 2.2.2 Ischemické choroby srdeční (ICHS)

Ischemické choroby srdce jsou onemocnění srdečního svalu, a to buď klidová, nebo při zvýšení nároků na dodávku kyslíku, např. při námaze, vznikající na podkladě patologických změn koronárního řečiště. V naprosté většině případů je ICHS způsobena aterosklerózou věnčitých tepen. Všechny příčiny vzniku aterosklerózy a tedy ani ICHS nejsou známy. Neexistuje proto účinná kauzální léčba, umíme pouze do jisté míry odstraňovat symptomy a léčit komplikace. Jsou ale známy určité stavy nebo faktory, které pravděpodobnost vzniku ICHS a rychlost jejího rozvoje mnohonásobně zvyšují. Označují se jako rizikové faktory (viz 2.2.1)(Hradec, Býma, 2007). Dle mezinárodní klasifikace zahrnují ischemické choroby srdeční *anginu pectoris*, akutní infarkt myokardu, pokračující infarkt myokardu, některé komplikace následující infarkt myokardu, jiné akutní ischemické choroby srdeční a chronickou ischemickou chorobu srdeční. (ÚZIS, 2012)

## 2.3 Cévní náhrady

### 2.3.1 Bypass

Bypass je přemostění cévy, která již nedokáže plnit svůj účel, resp. hrozí její selhání. Jedním z nejčastějších bypassů je bypass aortokoronární. Ten je způsobem chirurgické léčby ICHS a provádí se přemostěním jedné či více věnčitých tepen, resp. jejich větví. (Aschermann *et al.*, 2004).

Chirurgický bypass je využíván jako běžný způsob léčby u komplikací koronárních tepen. Důležitou součástí bypassu je volba vhodné cévní náhrady. Ideální náhrada by měla být mechanicky odolná, neimunogenní, biokompatibilní, dobře začlenitelná do hostitelské tkáně, tromboresistentní, netrombogenní, snadno dostupná a užitelná a bez vysokých finančních nároků na výrobu (Chlupáč *et al.*, 2009). V současné době nejužívanějším materiálem pro bypass jsou cévní náhrady autografní, tedy odebrané přímo pacientovi během zákroku.

### 2.3.2 Biologické náhrady

Dnes užívané biologické náhrady běžně dělíme do tří skupin: náhrady alogenní, autologní a xenogenní.

**Alogenní** cévní náhrady jsou biologické náhrady, jejichž dárce je stejný živočišný druh. Přestože v minulosti bylo od používání alogenních náhrad od zemřelých dárců upuštěno, dnes byl tento postup znovu oživen a dle některých studií je jejich užití výhodnější, než užití syntetických náhrad. (Chlupáč *et al.*, 2009)

**Autologní** cévní náhrady jsou v současnosti nejčastějším materiálem užívaným pro chirurgické bypassy. Jedná se o transplantáty, jejichž dárce je přímo pacient. Nejčastějším transplantátem v bypassu periferních tepen a tepen dolních končetin je *vena saphena magna*. Ta je rovněž používána při aortokoronárním bypassu, přestože *arteria radialis*, či *arteria thoracica interna* vykazují lepší výsledky (Aschermann *et al.*, 2004). Přes dobré klinické výsledky je však transplantovaná *vena saphena magna* náchylná k ateroskleróze a intimální hyperplasii. Kromě toho 30-40% pacientů nedisponuje vhodnou *vena saphena magna* kvůli předcházejícím zánětům, operacím, varixům či anatomické nevhodnosti (Chlupáč *et al.*, 2009). Použití jiných tepen je bohužel limitováno nevyhnutelnou morbiditou dárcovské tkáně. Proto je třeba hledat zdroj cévní náhrady jinde. (Aschermann *et al.*, 2004)

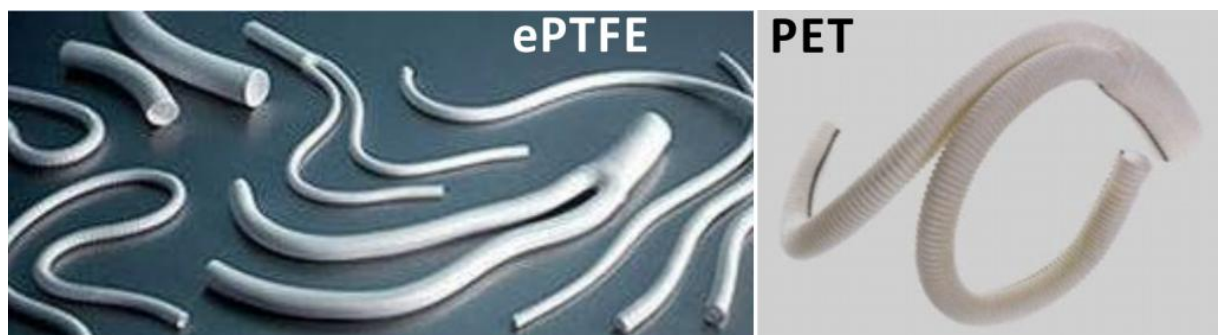
Zdrojem **xenogenních** náhrad jsou dárci jiného živočišného druhu. U člověka jsou z důvodu genetické příbuznosti nejčastějšími dárci xenogenních náhrad prasata domácí (*sus scrofa f. domestica*).

V současné době probíhá intenzivní výzkum v oblasti vývoje nového typu biologických náhrad, tj. náhrad obsahujících živé buňky. Jsou zkoumány různorodé scaffoldy (tj. „lešení“-podklady vhodné pro osazení buněčnými kulturami), různé typy buněk a rozličné podmínky

jejich kultivace. Ideální scaffold musí zajistit podmínky pro růst buněk, jejich migraci a syntézu proteinů extracelulární matrix. Nejúspěšnější způsoby výroby scaffoldu jsou dnes užití degradabilních syntetických polymerů, scaffoldů založených na proteinech extracelulární matrix, či decelularizovaných biologických tkáních (Dimitrievska, Niklason, 2014). Zajímavá je práce o tvorbě maloprůsvitových cév (Zhou, 2016), ve které autoři vytvořili cévu tvořenou vrstvou buněk hladkého svalu a endotelu na silikonové trubičce pokryté směsí degradabilního polymeru polykaprolaktonu a želatiny. Produkt inkubovali v pulzním dynamickém systému po dobu osmi týdnů. Během této doby byl polymer degradován, bylo možno produkt ze silikonové trubičky sejmout a ověřit jeho mechanické vlastnosti, které byly podobné mechanickým vlastnostem cévy.

### 2.3.3 Syntetické náhrady

Zlatý standard v syntetických cévních protézách již více než 50 let představují polyetylen tereftalát (PET, Dacron) a expandovaný polytetrafluoroetylén (ePTFE)(Obr. 2.3). Tyto polymery fungují dobře jako náhrady velkých cév, avšak jejich dlouhodobá průchodnost při náhradě cév o malém průměru (< 6 mm) je neuspokojivá. U cév s průsvitem menším než 6 mm (např. koronární, fibulární a tibiální tepny) se bohužel začnou projevovat jejich nedostatky jako trombogenicita, intimální hyperplazie v blízkosti distální anastomózy a odolnost vůči endotelizaci. (Chlupáč *et al.*, 2009)



**Obr. 2.3:** Klinicky užívané cévní protézy vyráběné z expandovaného polytetrafluoroethylénu (ePTFE) a z polyetylen tereftalátu (PET). Materiál protéz je vysoce hydrofobní a v tom stavu, v jakém vychází z výroby, neumožňuje rekonstrukci přirozených buněčných vrstev cévní stěny.

## 2.4 Markery hladkého svalu

**Kalponin 1**, rovněž známý jako bazický kalponin, je protein kódovaný genem **CNN1**, doprovázející aktinová filamenta. Nejspíše hraje důležitou roli ve formaci aktinových filament a zapojuje se do kontrakcí hladkého svalu. (NCBI, 2019)

**$\alpha$ -aktin 2** (smooth muscle actin) je kontraktilní protein kódovaný genem **ACTA2**, nacházející se ve filamentech buněk hladkého svalu.  $\alpha$ -aktin 2 je jedním z 6 typů aktinu nacházejících se u člověka. Je zodpovědný za kontrakci buněk hladkého svalu ve stěnách cév a tedy udržení krevního tlaku a homeostázy. (NCBI, 2019)



## 2.5 Markery endotelu

**CD 31** (Cluster of Differentiation 31) je protein kódovaný genem **PECAM1**. Nachází se rovněž na povrchu krevních destiček, monocytů, neurofilů. Tvoří velkou část mezibuněčných spojení endoteliálních buněk. Kódovaný protein je členem nadrodiny imunoglobulinů a pravděpodobně se podílí na transmigraci leukocytů, angiogenezi a aktivaci integrinu. (NCBI, 2020)

**VEGFR-2** (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2), kódovaný genem **KDR**, je endotelový membránový receptor pro růstový faktor VEGF. Jeho funkce, jakožto hlavního mediátora VEGF, je vyvolávat u buněk endotelu proliferaci, migraci, tubulární morfogenezi a pučení. (NCBI, 2020)

## 2.6 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou biologické jednotky organismu, zodpovědné za vývoj a regeneraci tkání a orgánových systémů. Jsou schopné diferenciaci a dlouhodobé sebeobnovy tkáně. Proto mají vysoký potenciál v oboru tkáňového inženýrství. Jsou-li *in vitro* nasazeny na vhodný syntetický nebo přírodní scaffold (podklad), mohou být diferencovány směrem k určitému buněčnému fenotpu (Bačáková *et al.*, 2018). Zdroje kmenových buněk jsou buďto tkáně dospělých jedinců (např. kostní dřev, tuková tkáň) nebo novorozenců (např. placenta, pupečníková šňůra)(Dimitrievska, Niklason, 2014). Podle původu kmenové buňky určujeme její „potenci“. Stupně „potence“ kmenových buněk (např. škála buněčných typů, na které je kmenová buňka schopná diferencovat) jsou následovné: i) totipotentní (schopné diferenciaci na všechny typy buněk včetně extraembryonálních buněk), ii) pluripotentní (schopné diferenciaci na všechny buněčné typy vyjma totipotentních), iii) multipotentní (schopné diferenciaci na většinu tkáňových typů), iv) unipotentní (schopné diferencovat pouze na jediný typ buněk). (Trávníčková, 2018)

Kmenové buňky mají vysoký potenciál využití v oboru tkáňového inženýrství, neboť mají vyšší kapacitu proliferace, nižší tendenci k senescenci a vydrží vyšší množství pasážování než již diferencované dospělé buňky. (Atala, 2005)

### 2.6.1 Diferenciace kmenových buněk

Kmenové buňky slouží v lidském těle k opravě a dotváření jednotlivých tkání. V cílové tkáni pak dochází v závislosti na typu kmenové buňky vlivem prostředí k jejich proliferaci, změně morfologie a diferenciaci. Je tedy přirozené, že kmenové buňky jsou velice citlivé na signály přijímané z okolí. Mezi takové vnější stimuly mohou patřit vlastnosti a složení biomateriálu, na kterém se buňky zachytí a rostou, dále například magnetické, elektrické a mechanické stimuly (pro diferenciaci směrem k hladkému svalu je typický dynamický systém natahování podél jedné osy), nebo složení diferenciačního média často obsahujícího přidané růstové faktory (Bačáková *et al.*, 2018). Tyto typy stimuly je možné a vhodné kombinovat.

V současné době užívanou metodou diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladkého svalu je kultivace buněk v diferenciacním médiu obsahujícím růstové faktory TGF $\beta$  a BMP4. Tohoto postupu užívají ve svých pracích kupříkladu Zhou (Zhou, 2016), Elçin (Elçin, 2017), nebo Xu (Xu, 2017). Zhou nebo Elcin pro diferenciaci tukových kmenových buněk ASC, Xu pro kmenové buňky zubní dřevě (dental pulp stem cells). Vrstva hladkého svalu se v cévě nachází v bezprostřední blízkosti vrstvy buněk endotelových. V prostředí *in vivo* tedy přichází běžně do kontaktu s růstovými faktory typicky se vyskytujícími v mezibuněčných prostorech okolí endotelu. Je tedy logické zkoumat, jaký vliv má na proces diferenciaci kmenových buněk směrem k hladkému svalu růstový faktor VEGF, produkovaný endotelovými buňkami.

## 2.7 Růstové faktory

Růstové faktory (*growth factors*, GF) jsou specifické chemické látky bílkovinné povahy syntetizované buňkami. Slouží jako lokální mediátory v místě jejich syntézy. Mohou působit autokrinně, parakrinně i endokrinně. Specificky se váží na receptory buněčných membrán za účelem indukce buněčné proliferace či diferenciaci. Většina GF je výrazně biopotentní, a to již při nanomolárních koncentracích. (Frei, 2008)

### 2.7.1 TGF $\beta$

TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) je růstový faktor syntetizovaný širokým spektrem typů tkání. Jde o několik extracelulárních proteinů o délce okolo 110 aminokyselin, které mohou mít celou řadu funkcí. Mohou jak stimulovat buňky k dělení, tak naopak buněčné dělení inhibovat. TGF $\beta$  má potenciální význam v embryonálním vývoji, buněčné diferenciaci, hormonální sekreci a imunitní obrany. Často jedná syngreticky s faktorem TGF $\alpha$ . (NIH, 2015)

### 2.7.2 BMP4

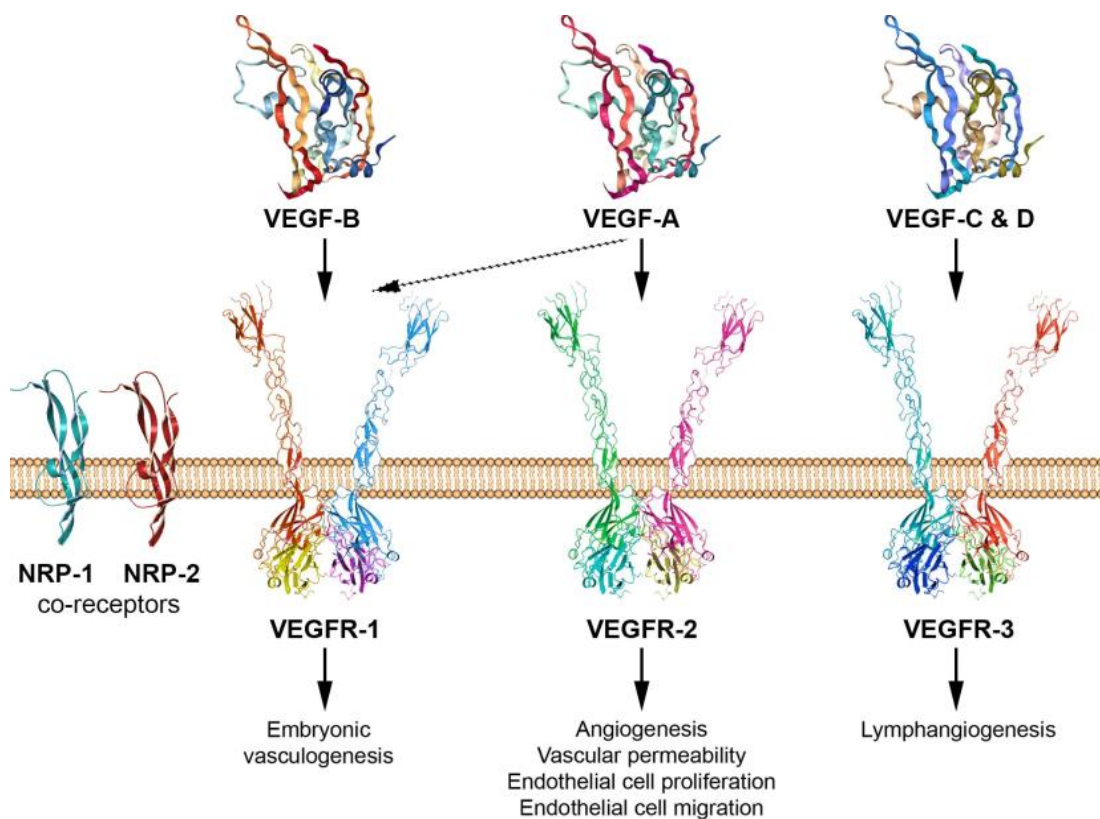
BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) je kostní morpfo-genetický protein, podílí se na časném vývoji embrya. Vývojově je velmi konzervativní. U dospělého jedince se podílí na vývoji kostí, chrupavek, zubů, končetin a opravě zlomených kostí, rovněž se podílí i na vývoji svalů. Může se také účastnit některých patologických jevů v kardiovaskulárním systému. (NCBI, 2020)

### 2.7.3 VEGF

Jeden z nejdůležitějších a nejspecifičtějších dosud objevených buněčných mediátorů je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor). Je hlavním mediátorem angiogeneze, ovšem dosud byl spojován s vývojem endotelové části cévy. Funkcí VEGF je mimo jiné vytváření nových krevních cév během embryonálního vývoje a po poranění. Celkem existuje 5 podskupin růstového faktoru VEGF ( VEGF-A, -B, -C a -D, a placenta derived growth factor PDGF). VEGF-A se vyskytuje ve třech izoformách

s různou afinitou k ECM (Tischer, 1991). V této práci se budeme zabývat účinky růstového faktoru VEGF-A izoformy 165 (dále už jen VEGF), který se váže na receptor VEGFR-1 a VEGFR-2 (KDR), který je v membráně endotelových buněk. Zdá se, že VEGFR-2 zprostředkovává téměř všechny známé buněčné odpovědi na VEGF. Funkce VEGFR-1 je méně dobře definovaná, i když se předpokládá, že bude modulovat signalizaci VEGFR-2. (Karkkainen, 2000)

Důležitou vlastností VEGF je jeho interakce s ECM, tím se reguluje jeho aktuální koncentraci v extracelulárním prostoru. Vytváří se tak koncentrační gradient závislý na okamžité produkci buněk endotelu. To umožňuje regulaci procesu angiogeneze (Gianni-Barrera R, 2020). V oblasti tkáňového bioinženýrství byl zkoumán z hlediska možné vaskularizace kosti a chrupavky. VEGF produkované buňkami kostní dřeni může efektivně zvýšit vaskularizaci kostních náhrad. (Helmrich, 2013)( Gianni-Barrera, 2020)



**Obr. 2.4:** Grafické znázornění VEGF růstových faktorů a membránových receptorů odpovědných za indikaci jejich přítomnosti v mezibuněčných prostorách. Faktor VEGF-A se specificky váže na receptory VEGFR-1 a VEGFR-2. Tímto ovlivňuje buněčné procesy, jako jsou např. embryonální vaskulogeneze, angiogeneze a proliferace a migrace endotelových buněk.

## 3 MATERIÁLY A METODY

### 3.1 Buňky

K pokusům jsme používali kmenové buňky izolované z tukové tkáně, běžně označované jako ASC (Adipose Stem Cells), které byly získány na oddělení plastické chirurgie v nemocnici Bulovka a z odebraného tuku byly izolovány ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Během pokusu jsme pracovali se 4. pasáží buněk ASC. Před pokusem byly buňky kultivovány na polystyrenovém podkladu v Eaglově minimálním esenciálním médiu Dulbecem (DMEM, Sigma, USA) obohaceném o 10% fetálního hovězího séra (FS)(Sebak GmbH, Aidenbach, Germany).

### 3.2 Kultivace ve statickém a dynamickém prostředí

Buňky byly za standardních podmínek kultivovány v termostatu (ThermoFisher, Inc., USA) při průměrné teplotě 37°C a obsahu CO<sub>2</sub> 5%. Po dobu diferenciačních pokusů byly buňky kultivovány v médiu DMEM, které je vhodné pro pěstování a diferenciaci směrem k hladkému svalu. Obohacení média o FS pro účely diferenciace bylo nižší, pouze 2%. Dále byly k médiu přidány růstové faktory.

Kultivace buněk pro první část pokusu (určení vlivu VEGF na diferenciaci) probíhala ve statickém i dynamickém systému paralelně ve dvou sadách diferenciačních médií:

DMEM + BMP4 + TGFβ

DMEM + BMP4 + TGFβ + VEGF

Pro druhou část pokusu (určení nejvhodnější kombinace růstových faktorů pro diferenciaci), která byla pouze statická, jsme sestavili následující média:

DMEM

DMEM + TGFβ

DMEM + TGFβ + BMP4

DMEM + TGFβ + VEGF

DMEM + VEGF

Koncentrace užitých faktorů v kombinaci s DMEM byly následovné: 2,5 ng/ml pro TGFβ a BMP4; 10ng/ml pro VEGF.

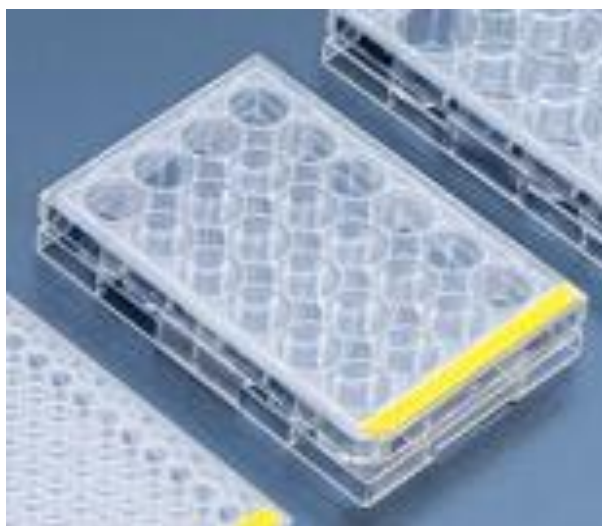
V dynamickém i statickém systému byly buňky kultivovány v objemu 1,5ml média. 1ml média byl vždy po třech dnech nahrazen čerstvým.

### 3.2.1 Nasazování buněk na podklady

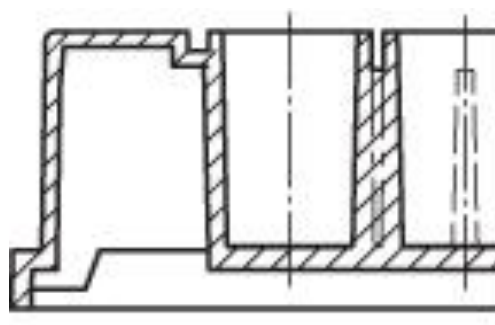
Z kultivační nádoby s buňkami jsme nejprve odsáli médium a buňky jsme opláchli fyziologickým roztokem pufovaným fosfáty (PBS). Poté jsme buňky oddělili od podkladu pomocí roztoku trypsin + EDTA, který jsme nechali v termostatu při teplotě 37°C po dobu 5 minut působit. Vizually jsme pod optickým mikroskopem zkontrolovali, zda jsou buňky kvantitativně odděleny od podkladu. Poté jsme zastavili proces trypsinizace přidáním média. Buněčnou suspenzi jsme přenesli do centrifugační zkumavky a centrifugovali při 300G po dobu 5 minut. Po odsání supernatantu jsme buněčný pelet zředili inkubačním médiem a pomocí stroje Vi-CELL™ Cell XR Viability Analyzer (Beckman Coulter, Inc.) jsme zjistili počet buněk v 1 mililitru suspenze a jejich viabilitu. Následně jsme buňky nasadili do kultivačních médií na podklady v koncentraci 20 000 buněk/cm<sup>2</sup> v případě statického systému a 40 000 buněk/cm<sup>2</sup> v případě systému dynamického.

Ve statickém systému byly buňky nasazeny a dále kultivovány na polystyrenových 24jamkových destičkách (Techno Plastic Products, Switzerland)(Obr. 3.1, Obr. 3.2).

V dynamickém systému proběhla kultivace na elastických silikonových komůrkách ST-CH-04 (B-Bridge International, Inc.)(Obr. 3.3, Obr. 3.4). Pro usnadnění adheze buněk bylo dno komůrek pokryto vrstvou fibronektinu (Human, Natural, Corning, USA).



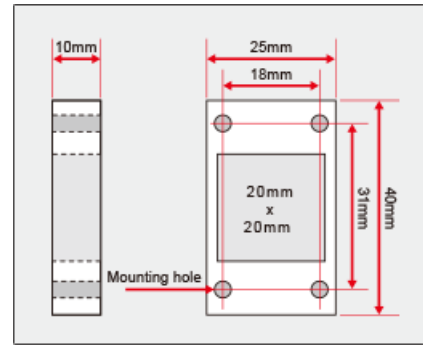
**Obr. 3.1:** Polystyrenová 24jamková destička určená pro kultivaci ve statickém systému; tvar jamek typu F; plocha jamky 1,864cm<sup>2</sup>; maximální objem média 3ml; doporučené používané množství média 0,5-1ml; vhodná pro přesná optická měření, světlo není ovlivněno geometrickou stavbou jamky; (Techno Plastic Products, Switzerland)



**Obr 3.2:** Znárodnění tvaru dna jamky typu F



**Obr. 3.3:** Silikonová elastická komůrka typu ST-CH-04 určená ke kultivaci buněk v dynamickém systému STREX (B-Bridge International, Inc.)



**Obr 3.4:** Rozměry silikonových komůrek typu ST-CH-04; tloušťka membrány dna komůrky 0,1mm; plocha dna komůrky 4 cm<sup>2</sup>

### 3.2.2 Kultivace v dynamickém systému STREX

Kultivace buněk v dynamickém systému je jeden ze způsobů simulace podmínek *in vivo*. V živém těle je hladký sval cévy přirozeně pulzující krví natahován. Pro podporu diferenciaci na hladký sval je tedy typické vystavení mechanickému stresu natahováním, který jsme zajistili kultivací buněk v dynamickém systému STREX Automated Cell Stretching System model STB-140-04 (B-Bridge International, Inc.). Přístroj je plně automatizovaný systém umožňující volbu frekvence natahování a amplitudu relativního prodloužení.

Před nasazením do dynamického systému jsme vzorky již nasazené na silikonových komůrkách nejprve prekulivovali ve statických podmínkách po dobu 1 dne, aby měly buňky dostatek času k úplné adhezi k podkladu. Vzorky buněk byly vloženy do dynamického systému až poté, co dosáhly úplné konfluence, tedy vytvořily souvislou vrstvu.

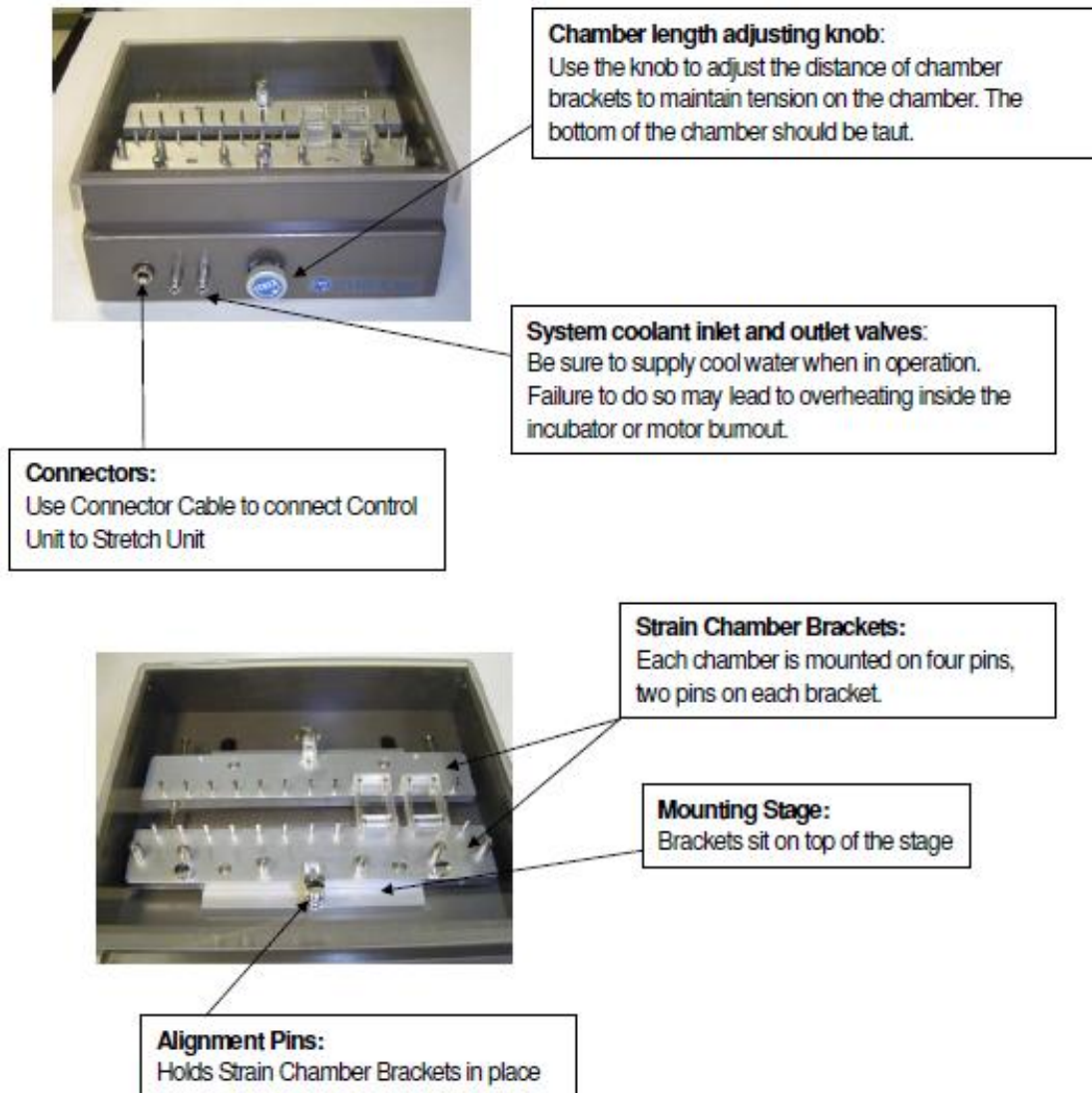
Dynamický systém STREX, simulující dynamické podmínky *in vivo*, byl před pokusem náležitě sterilizován a celá kultivace probíhala ve sterilním prostředí. Zároveň byl celý dynamický systém umístěn v inkubačním termostatu. Dynamický systém prováděl periodické natahování ve směru jedné osy s amplitudou relativního prodloužení 5% a frekvencí natahování 0,5Hz. Průběh natahování byl plynulý, sinusoidní (sinusoidal wave pattern).

Do dynamického systému byly postupně nasazeny dvě sady vzorů:

Po 4 hodinách (1.den) od počátku natahování byla u první sady vzorků frekvence zvýšena na 1Hz. Z této první sady jsme provedli odběry vzorků v časech 15 a 30 minut od zvýšení frekvence natahování.

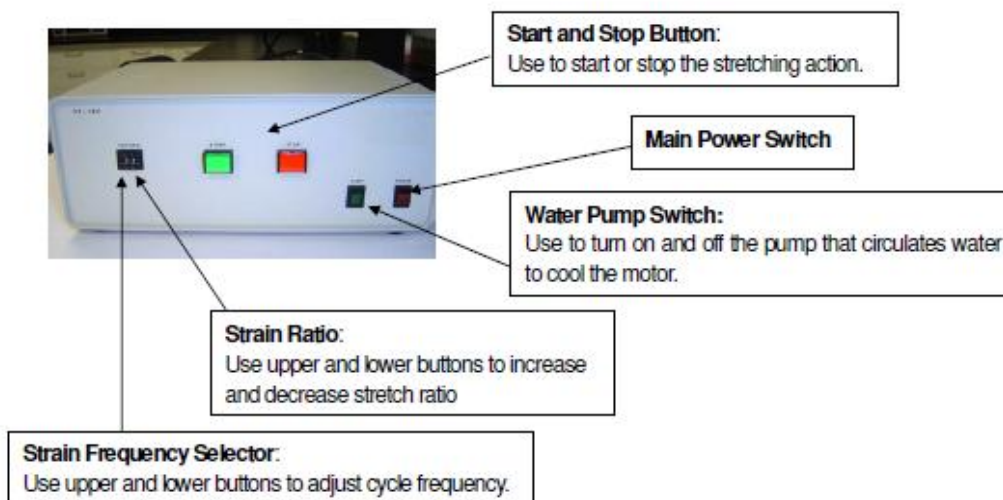
Po 96 hodinách (5.den) od počátku natahování byla i u druhé sady vzorků frekvence zvýšena na 1Hz. Ze druhé sady jsme provedli odběr vzorků v čase 30 minut od zvýšení frekvence natahování.

## Stretch Unit

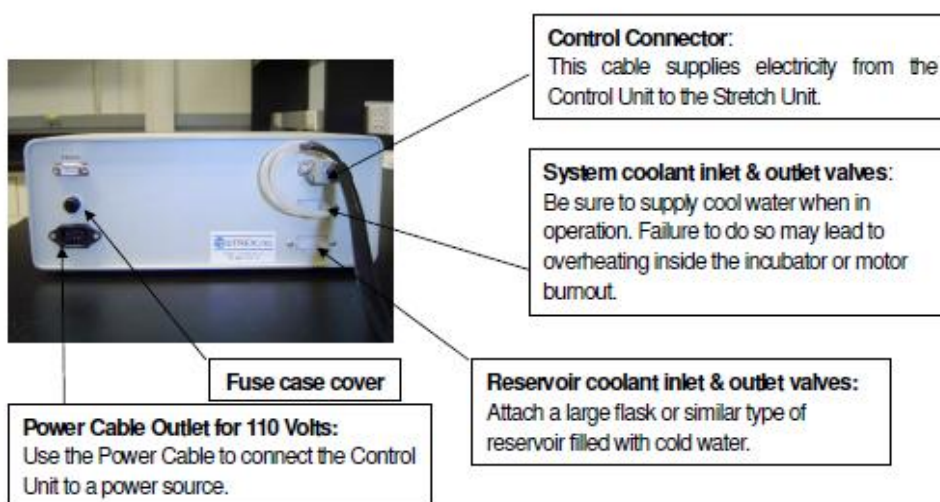


**Obr. 3.5** Schéma pracovní jednotky STREX STB-140-04. Popisky: **Chamber length adjusting knob:** Use the knob to adjust the distance of chamber brackets to maintain tension on the chamber. The bottom of the chamber should be taut. - **Knoflík ovládání délky komůrky:** Použijte knoflík k upravení vzdálenosti mezi čelistmi přístroje k úpravě tenze na komůrce. Dno komůrky by mělo být napjaté. **System coolant inlet and outlet valves:** Be sure to supply cool water when in operation. Failure to do so may lead to overheating inside the incubator or motor burnout. - **Vstup a výstup chladicí kapaliny:** Ujistěte se, že přístroj v chodu je vždy chlazen. Neučiníte-li tak, může se přehřívat inkubátor a motor. **Connectors:** Use Connector Cable to connect Control Unit to Stretch Unit. - **Konektory:** Použijte konektorový kabel k propojení pracovní jednotky a řídicí jednotky. **Strain Chamber Brackets:** Each chamber is mounted on four pins, two pins on each bracket. **Čelisti přístroje:** Každá komůrka je uchycena na čtyřech kolíčkách, dva kolíčky na každé čelisti. **Mounting Stage:** Brackets sit on top of the stage.- **Montážní konzoly:** Čelisti jsou nasazeny na vrchu konzol. **Alignment Pins:** Holds Strain Chamber Brackets in place. - **Příchytné kolíky:** Drží čelisti přístroje na správném místě..

### Control Unit Front Panel



### Control Unit Back Panel



**Obr. 3.6** Schéma řídicí jednotky STB-140-04. Popisky: **Start and Stop Button:** Use to start or stop the stretching action. - **Tlačítka Start a Stop:** Použijte k zahájení nebo zastavení natahování. **Main Power Switch. - Hlavní vypínač.** **Water Pump Switch:** Use to turn on and off the pump that circulates water to cool the motor. - **Vypínač vodní pumpy:** Použijte k zapnutí a vypnutí pumpy, která cirkulací vody ochlazuje motor. **Strain Ratio:** Use upper and lower buttons to increase and decrease stretch ratio. - **Poměr natažení:** Použijte horní a spodní tlačítko k zvýšení a snížení poměru natahování. **Strain Frequency Selector:** Use upper and lower buttons to adjust cycle frequency. - **Výběr frekvence natahování:** Použijte horní a spodní tlačítko k nastavení frekvence natahování. **Control Connector:** This cable supplies electricity from the Control Unit to the Stretch Unit. - **Řídicí kabel:** Tento kabel napájí pracovní jednotku proudem z řídicí jednotky. **System coolant inlet & outlet valves:** Be sure to supply cool water when in operation. Failure to do so may lead to overheating inside the incubator or motor burnout.- **Vstup a výstup chladicí kapaliny:** Ujistěte se, že přístroj v chodu je vždy chlazen. Neučíníte-li tak, může se přehřívat inkubátor a motor. **Reservoir coolant inlet & outlet valves:** Attach a large flask or similar type of reservoir filled with cold water.- **Vstup a výstup chladicí kapaliny z rezervoáru:** Připojte velkou baňku nebo podobnou nádobu naplněnou studenou vodou. **Fuse case cover.- Kryt pojistky.** **Power Cable Outlet for 110 Volts:** Use the Power Cable to connect the Control Unit to a power source.- **Zdíčka na 110 V napájecí kabel** (v našem případě použit přístroj s konfigurací na 230 V): Použijte napájecí kabel k připojení řídicí jednotky ke zdroji napětí.



### **3.3 Real-Time PCR**

Real-Time PCR je velice citlivá metoda, kterou zjišťujeme míru exprese genů jednotlivých proteinů produkovaných buňkou. Lze ji tedy použít i ke stanovení míry exprese specifických markerů, tedy ke sledování procesu diferenciaci kmenových buněk směrem k jednotlivým buněčným podtypům. V této práci jsme sledovali míru diferenciaci směrem k hladkému svalu a k endotelu.

#### **3.3.1 Izolace mRNA z buněk kultivovaných na silikonových komůrkách**

Po vyjmutí silikonových komůrek z dynamického systému STREX jsme buňky opláchli PBS a oddělili od podkladu 300 $\mu$ l roztoku trypsin + EDTA. Po pěti minutové trypsinizaci probíhající při teplotě 37°C jsme buněčnou suspenzi stabilizovali přidáním 900 $\mu$ l kultivačního média DMEM obohaceného 10% FS. Suspenzi jsme přenesli do centrifugační zkumavky a centrifugovali 5 min při 300G. Pelet buněk jsme rozsuspendovali v solubilizačním médiu kitu Total RNA Purification Micro Kit (Norgen Biotek) a tím jsme narušili buněčné membrány včetně membrány jaderné. Dále jsme postupovali dle návodu. Principem izolace je vysrážení mRNA etanolem z roztoku solubilizovaných buněk a následné zachycení vysrážené mRNA na izolační koloně. Opětovné uvolnění mRNA jsme provedli promytím elučním roztokem bez etanolu. Získané vzorky jsme skladovali při teplotě -80°C.

#### **3.3.2 Izolace mRNA z buněk kultivovaných v polystyrenových destičkách**

Izolace byla prováděna obdobně jako izolace z buněk kultivovaných na silikonových komůrkách. Byla však vynechána fáze trypsinizace, solubilizační roztok byl aplikován na opláchnuté buňky přímo ve 24jamkové polystyrenové destičce.

#### **3.3.3 Reverzní transkripce**

mRNA je vysoce nestabilní a nelze ji proto přímo použít i k provedení RT-PCR. Proto je mRNA obsažená ve vzorku převedena procesem reverzní transkripce na stabilní cDNA.

Reverzní transkripce byla prováděna kitem Omniscript Reverse Transcription Kit (205113; Qiagen, Hilden, Germany) s použitím random hexamerů z kitu ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, USA) v celkovém objemu 20 $\mu$ l. Vzorky byly třikrát naředěny sterilní vodou a zamraženy při teplotě -20°C.

#### **3.3.4 Vlastní měření RT-PCR**

Míru exprese sledovaných genů jsme určili cyklickou polymerázovou reakcí, při níž dochází k exponenciálnímu nárůstu původního množství cDNA ve vzorku. cDNA byla při pokusu kvantifikována v reakční směsi čisté vody (RNase free water), mastermixu 5 $\times$ HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX)(08-36-00001; Solis BioDyne, Tartu, Estonia) a genově specifické próby (TaqMan Gene Expression Assays, 4331182; Thermo Fisher Scientific).

Specifické próby obsahují směsí F-primerů, R-primerů a hydrolyzační sondu značenou fluorescenční značkou FAM. Použili jsme hydrolyzační TaqMan próby specifické pro sledované geny: CNN1 (sonda Hs 00154543\_m1), ACTA2 (sonda Hs00909449\_m1), PECAM1(sonda Hs01065282\_m1), KDR(sonda Hs00911700\_m1). Referenčním genem pro pokus byl gen B2M (sondaHs00187842\_m1). Vzorek templátové cDNA vstupoval do reakce v počátečním množství 2µl, vzorek byl doplněn reakční směsí na celkový objem 20µl. Při pipetování jsme postupovali podle schématu na příbalovém letáku k používanému mastermixu 5×HOT FIREPol (Obr. 3.7).

Reakce probíhala na 96jamkových reakčních destičkách (Well optical reaction plate, (Applied Biosystems™; Thermo Fisher Scientific) po dobu čtyřiceti cyklů. Pro provedení měření byl použit stroj Vii™ 7 Real-time PCR Systém (Applied Biosystems™; Thermo Fisher Scientific).

### Recommended qPCR reaction mix:

Component	10 µl/rxn	20 µl/rxn	Final conc.
5x HOT FIREPol® Probe Universal qPCR Mix	2 µl	4 µl	1x
Primer Forward (10 pmol/µl)	0.2-0.4 µl	0.4-0.8 µl	200-400 nM
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0.2-0.4 µl	0.4-0.8 µl	200-400 nM
Probe	x µl	x µl	100-250 nM
OPTIONAL: UNG (Uracil-N-glycosylase)	x µl	x µl	x U/µl
OPTIONAL: 100% DMSO	variable	variable	Up to 10%
DNA template <sup>1</sup>	Variable <sup>1</sup>	Variable <sup>1</sup>	Variable <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O PCR grade	up to 10 µl	up to 20 µl	
<b>Total</b>	<b>10 µl</b>	<b>20 µl</b>	

<sup>1</sup> Conc. of cDNA 0.1 pg/µl - 10 ng/µl ; gDNA 10 pg/µl – 4 ng/µl

**Obr. 3.7** Složení reakční směsi vstupující do reakce při RT-PCR (podle Data Sheet 5x HOT FIREPol® Probe Universal qPCR Mix Silos BioDyne). Při pokusu jsme pracovali s údaji pro směs o výsledném objemu 20µl.

### 3.3.5 Analýza dat

Vyhodnocení Real-time PCR je založena na konceptu Ct hodnoty (Ct jako cycle of treshold, cyklus prahu). Ct hodnota označuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Tato fluorescence je zachycena detektorem. Číslo tohoto cyklu je zaznamenáno a dále využíváno právě jako Ct hodnota. Obecně platí, že čím je Ct nižší, tím nižší byla původní koncentrace templátové cDNA sledovaného genu. Relativní exprese jednotlivých genů byla spočítána jako  $2^{-\Delta Ct}$ , kde  $\Delta Ct$  jsme stanovili jako rozdíl sledovaného genu vůči genu referenčnímu, tedy genu  $\beta$ -2 mikroglobulinu (B2M).

Každá hodnota je průměrem 4-6ti experimentálních bodů ze dvou až tří nezávislých biologických vzorků. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru.

## 3.4 Vizualizace buněk

Vizualizace buněk je důležitou metodou zkoumání buněčného materiálu. Pomocí metody imunofluorescenčního barvení jsme sledovali míru rozvinutosti struktur typických pro hladký sval a endotel.

### 3.4.1 Fixace buněk

Fixace je jedním z důležitých mezikroků při vizualizaci buněk a vždy předchází imunofluorescenčnímu barvení.

Od dosud živých kultur usazených na podkladu jsme odsáli médium a jednou až dvakrát jsme opláchli PBS, to jsme poté odsáli (není nutné dokonalé odsátí). Buňky jsme fixovali 70% roztokem ledového etanolu, který jsme na buňky nechali působit při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut. Etanol jsme odsáli a již umrtvené buňky jsme naposledy opláchli PBS. Zafixované buňky jsme i nadále uchovávali v PBS, abychom zabránili vysychání.

### 3.4.2 Imunofluorescenční barvení

Imunofluorescenční barvení jsme prováděli již na fixovaných buňkách. Před začátkem procesu jsme perforovali cytoplazmatickou membrána buněk 20 minutovou inkubací v roztoku TRIS.

U buněk jsme imunofluorescenční barvili markery hladkého svalu a markery endotelu. Nejprve jsme namíchaly roztoky protilátek specificky se vážících na sledované proteiny:

Kalponin: monoklonální Anti-Calponin 1 (Thermo Fisher scientific, USA), vyprodukovaná v myši, v ředění 1:200

CD 31: monoklonální (Orbiene Technologies Inc., Estonsko), vyprodukováno v myši, ředění v poměru 1:200

KDR: monoklonální Anti-VEGFR-2 (Life Span BioSciences Inc., USA), vyprodukováno v myši, ředění v poměru 1:200

U druhé části pokusu (určení nejvhodnější kombinace růstových faktorů pro diferenciaci) jsme vizualizovali i struktury  $\alpha$ -aktinu:

$\alpha$ -aktin: monoklonální Anti- $\alpha$  Smooth Muscle Actin (Sigma Aldrich, USA), vyprodukováno v myši, ředění v poměru 1:200

Roztoky s primárními látkami jsme nechali působit na buněčný materiál přes noc, poté jsme roztok odsáli a buňky opláchli.

Namíchali jsme roztok PBS a sekundární fluorescenčně značené protilátky Alexa 488 (Anti-Mouse) v poměru 400:1. Sekundární protilátku jsme nechali vázat na primární po dobu jedné hodiny v prostředí bez přístupu světla. Poté jsme buňky opláchli PBS a dále skladovali v temném prostředí v lednici při teplotě 4°C.

### **3.4.3 Barvení buněčných jader**

Pro vizualizaci buněčných jader jsme používali fluorescenční barvivo Hoechst #33258 (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A). Barvivo Hoechst nepatří do škály imunofluorescenčních barviv, neboť se specificky váže přímo na molekuly nukleových kyselin.

Před přímou aplikací barviva na předem fixované buňky jsme namíchali roztok Hoechst a PBS v poměru 1:250. Namíchaný roztok jsme před aplikací uchovávali v prostředí bez přístupu světla.

Od buněk zafixovaných a adherovaných k podkladu jsme odsály PBS zabraňující vysychání. K buňkám jsme přidali předem namíchaný roztok Hoechst, který jsme nechali působit bez přístupu světla po dobu 10 minut. Poté jsme preparát jedenkrát opláchli PBS.

## **3.5 Fotografování**

Zafixované nabarvené vzorky jsme fotografovali za použití optického mikroskopu Olympus IX51 s invertovaným systémem optiky s fluorescenční lampou Olympus U-RFL-T.

Rovněž jsme k fotografování buněk využívali konfokálního mikroskopu Leica TCS (True Confocal Scanner) SP8 s argonovým a UV laserem. Byl použit software Leica application suite X (LAS X).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Vliv VEGF na diferenciaci buněk

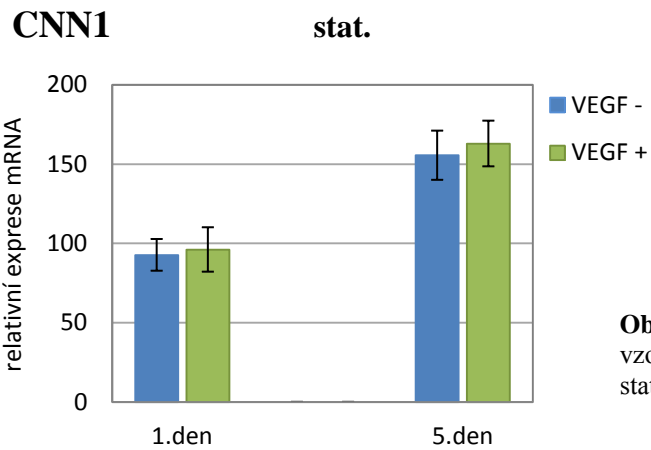
U jednotlivých vzorků buněk kultivovaných v diferenciacním médiu s přidavkem růstového faktoru VEGF a bez něj a to jak ve statickém, tak dynamickém systému, jsme sledovali diferenciaci buněk směrem k hladkému svalu. Zároveň jsme také sledovali, zda po přidání VEGF, který je růstovým faktorem produkovaným buňkami endotelu, nedojde i ke zvýšené diferenciaci směrem k endotelovému buněčnému typu.

#### 4.1.1 Vliv VEGF na tvorbu markerů hladkého svalů

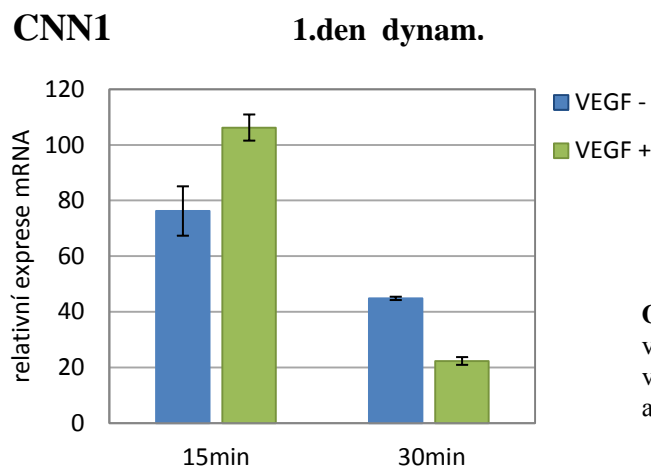
Metodou RT-PCR jsme určovali míru exprese specifických genů mRNA v porovnání s mírou exprese referenčního genu B2M. Sledovali jsme především míru exprese genů zodpovědných za syntézu proteinů, jejichž struktury jsou specifické pro buňky hladkého svalů. Tímto markerem diferenciaci kmenových buněk byl v našem případě především protein kalponin1 (gen CNN1), který je markerem pozdnější diferenciaci směrem k hladkému svalu.

K samotné tvorbě cytoskeletální struktury kalponinu, typické struktury pro buňku hladkého svalů, dochází díky kultivaci v diferenciacním médiu i nezávisle na dynamické stimulaci. Zjistili jsme, že při kultivaci ve statickém kultivačním systému v polystyrenových destičkách proces tvorby kalponinové struktury není prokazatelně ovlivněn přítomností růstového faktoru VEGF. To jsme prokázali jak na úrovni RT-PCR (Obr. 4.1), tak vizuálním sledováním struktury po imunofluorescenčním obarvení vzorků (Obr. 4.4, Obr. 4.5).

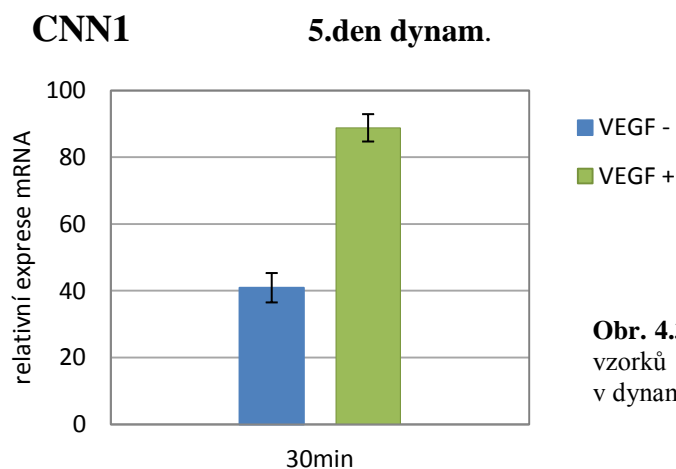
Při kultivaci v dynamickém systému jsme metodou RT-PCR zjistili, že v první fázi dynamické stimulace (odběr po 15 minutách od zvýšení frekvence natahování 1.den kultivace) je úroveň exprese CNN1 za přítomnosti VEGF signifikantně zvýšena, naopak při pozdějším odběru vzorku (po 30 minutách od zvýšení frekvence natahování 1.den kultivace) dochází k relativnímu poklesu míry exprese CNN1 u vzorků s VEGF (Obr. 4.2). Tento průběh exprese mRNA je standardní odpovědí buňky na dynamickou stimulaci. Nejprve dochází k bezprostřední změně, zpravidla prudkému nárůstu exprese v řádu minut, později k útlumu, nakonec dojde k ustanovení stabilní rovnováhy odpovídající trvalým nárokům buňky za dané situace (např. Chlupáč, 2014). V našich pokusech jsme při dlouhodobé kultivaci buněk v dynamickém systému (odběr 5.den) u vzorků kultivovaných s přidáním VEGF sledovali více než dvounásobně zvýšenou expresi CNN1 (Obr. 4.3). Tento rozdíl vypovídá o dlouhodobé změně v metabolismu buňky, která je důsledkem její diferenciaci směrem k hladkému svalu. Především je však důležité tento výsledek porovnat s rozvojem proteinové struktury kalponinu v kultivovaných buňkách. U dlouhodobě kultivovaných buněk jsme zjistili zřetelně rozvinutější strukturu kalponinového cytoskeletonu u vzorků kultivovaných v přítomnosti VEGF (Porovnání Obr. 4.8 a Obr. 4.9).



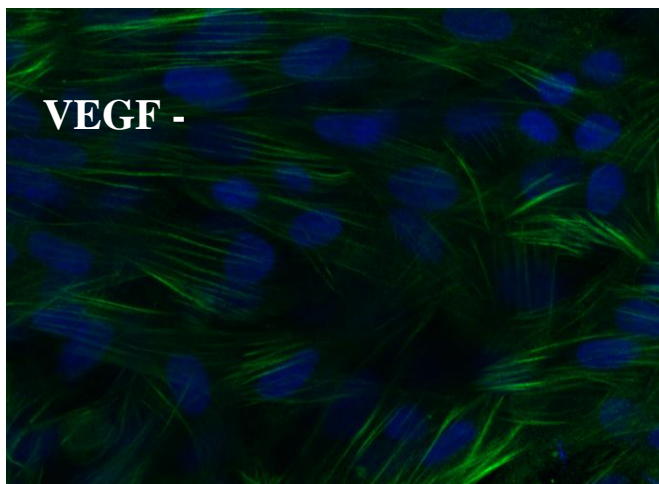
**Obr. 4.1:** Graf relativní míry exprese CNN1 u vzorků odebraných 1. a 5. den kultivace ve statickém prostředí.



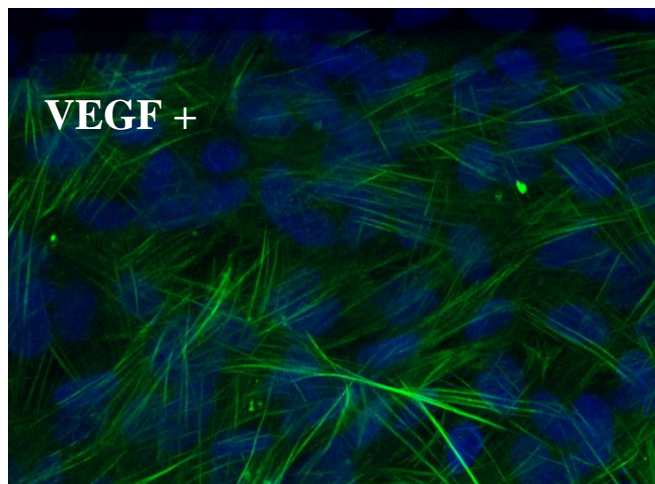
**Obr. 4.2:** Graf relativní míry exprese CNN1 u vzorků odebraných 1. den kultivace v dynamickém prostředí. Odběry provedeny 15 a 30 minut po zvýšení frekvence natahování.



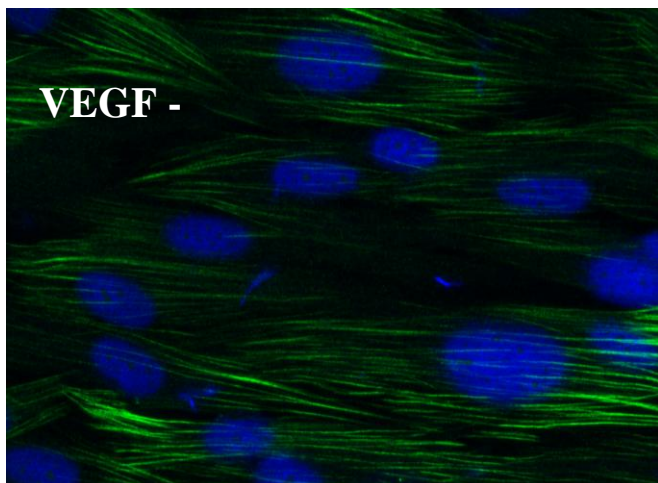
**Obr. 4.3:** Graf relativní míry exprese CNN1 u vzorků odebraných 5. den kultivace v dynamickém prostředí.



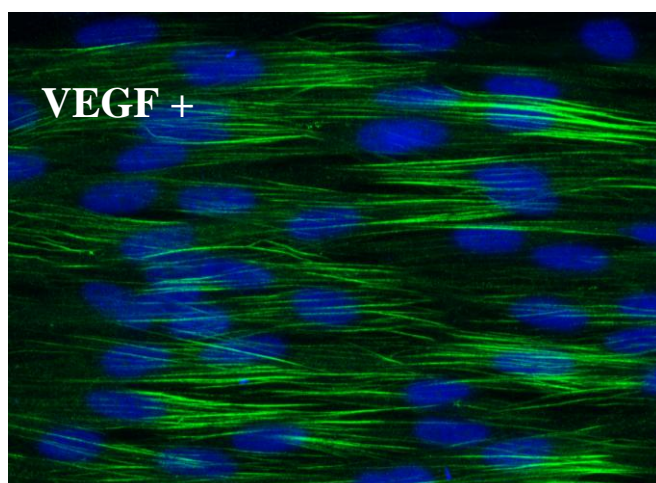
**Obr. 4.4:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace ve **statickém** systému v diferenciálním médiu bez přidaného VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x.



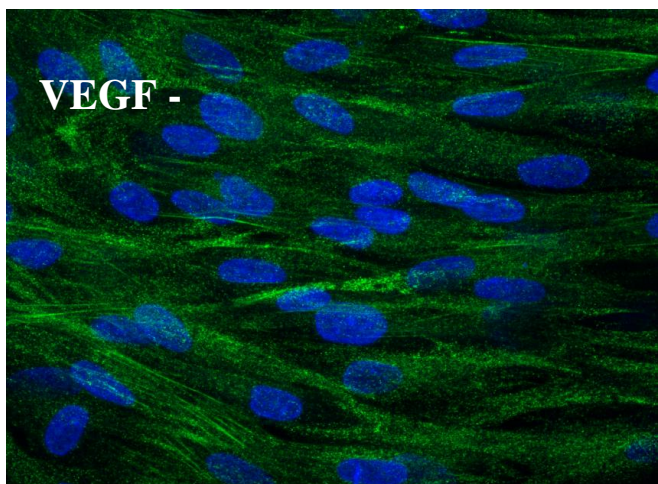
**Obr. 4.5:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace ve **statickém** systému v diferenciálním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x.



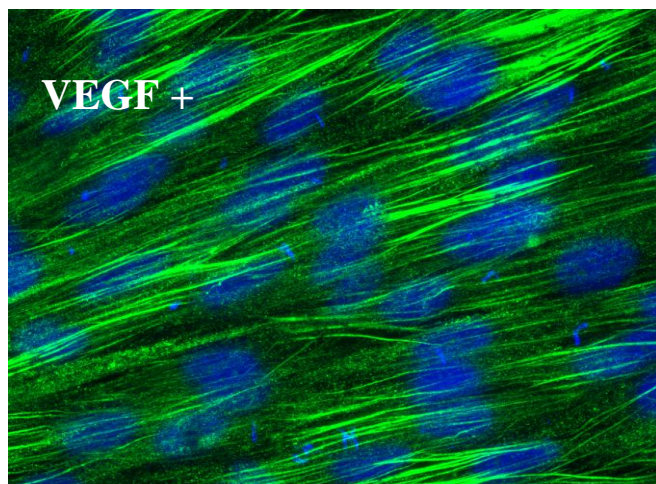
**Obr. 4.6:** Struktura kalponinových vláken 1.den kultivace v dynamickém systému **STREX** v diferenciálním médiu bez přidaného VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x.



**Obr. 4.7:** Struktura kalponinových vláken 1.den kultivace v dynamickém systému **STREX** v diferenciálním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x.



**Obr. 4.8:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace v dynamickém systému **STREX** v diferenciálním médiu bez přidaného VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x.



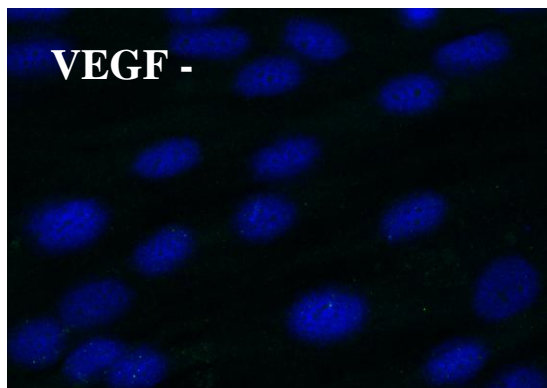
**Obr. 4.9:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace v dynamickém systému **STREX** v diferenciálním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x.

#### 4.1.2 Vliv VEGF na tvorbu markerů endotelu

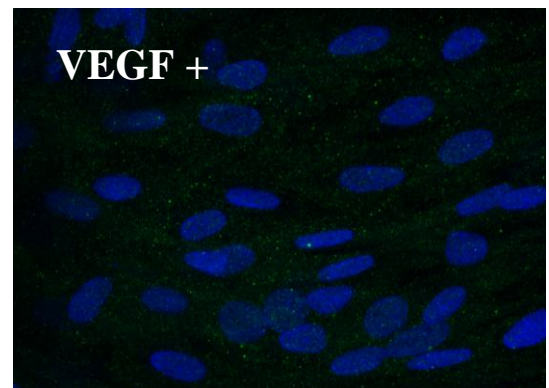
U odebíraných vzorků buněčného materiálu kultivovaného v dynamickém i statickém systému jsme sledovali míru exprese markerů endotelu, konkrétně KDR a PECAM1. Metodou RT-PCR jsme pozorovali míru exprese sledovaných genů vůči expresi referenčního genu B2M.

U obou genů jsme zjistili stejný vzorec proměnlivosti míry exprese. Zjistili jsme, že vlivem dlouhodobé kultivace v diferenačních médiích exprese genů klesá. Při kultivaci ve statickém prostředí nejprve stoupá míra exprese genů u vzorků kultivovaných v médiu s VEGF, u pozdějších odběrů (odběr 5. den) je naopak exprese genů u buněk s VEGF nižší (Obr. 4.14, Obr.4.17). V případě kultivace v dynamickém systému je exprese genů PECAM1 a KDR signifikantně nižší u buněk kultivovaných s VEGF, a to ve všech fázích odběrů (Obr.4.15, Obr. 4.16, Obr. 4.18, Obr. 4.19).

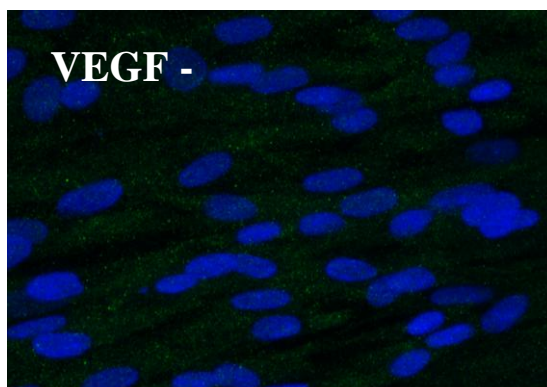
V případě statické i dynamické kultivace jsme však pomocí metody RT-PCR zjistili u všech odebraných vzorků velmi nízkou míru exprese obou sledovaných genů, a to jak v médiu s VEGF, tak bez něj. To jsme ověřili i imunofluorescenčně (Obr. 4.10, Obr. 4.11, Obr. 4.12, Obr. 4.13). Na základě tohoto zjištění jsme míru diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám endotelu označili za zanedbatelnou.



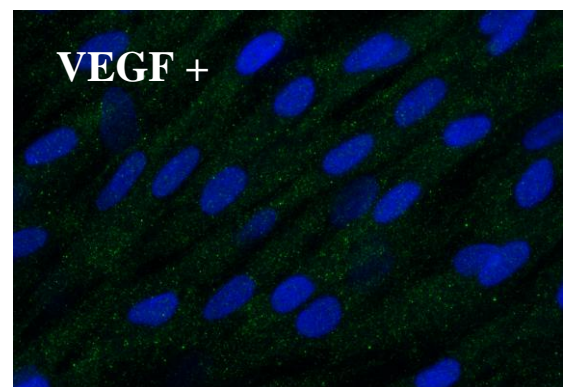
**Obr. 4.10:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace ve statickém systému v diferenačním médiu bez VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x



**Obr. 4.11:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace ve statickém systému v diferenačním médiu s přidáním VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x

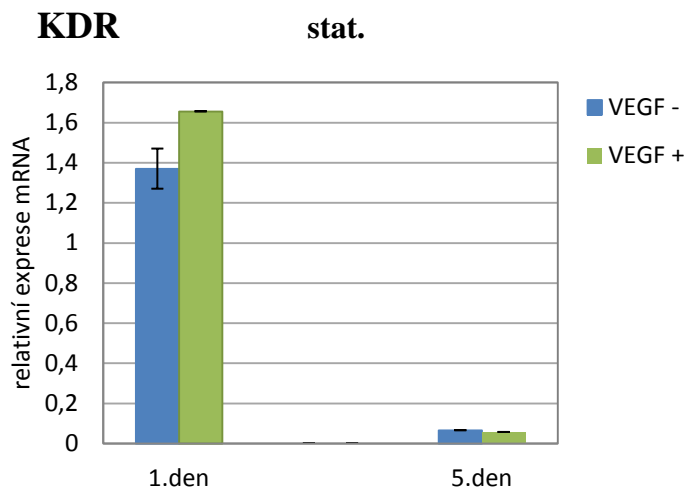


**Obr. 4.12:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenačním médiu bez VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x.

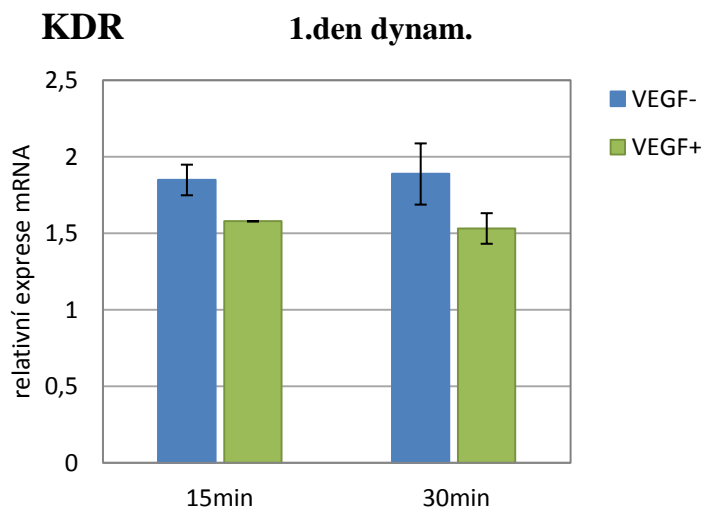


**Obr. 4.13:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenačním médiu s přidáním VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x.

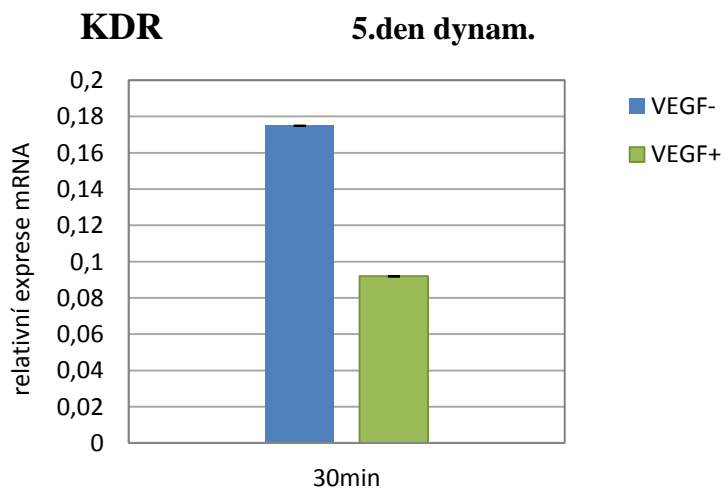




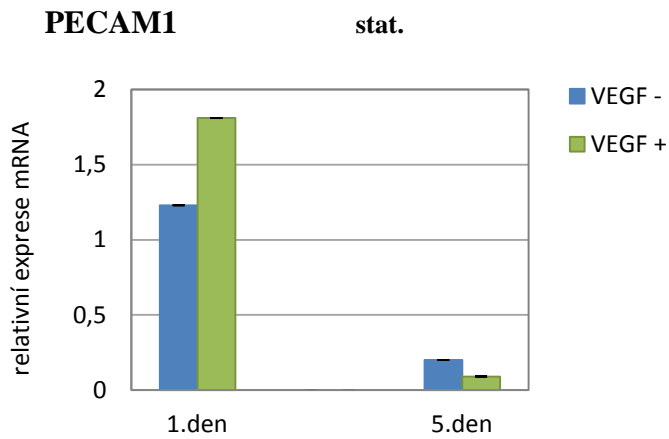
**Obr. 4.14 :** Graf relativní míry exprese KDR u vzorků odebraných 1. a 5. den kultivace ve statickém prostředí.



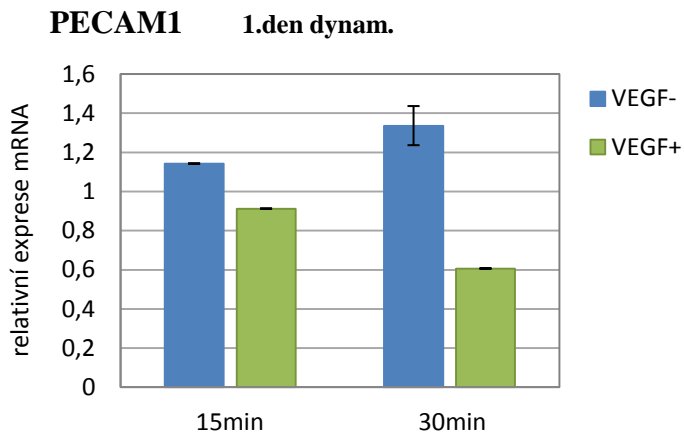
**Obr. 4.15:** Graf relativní míry exprese KDR u vzorků odebraných 1. den kultivace v dynamickém prostředí. Odběry provedeny 15 a 30 minut po zvýšení frekvence natahování.



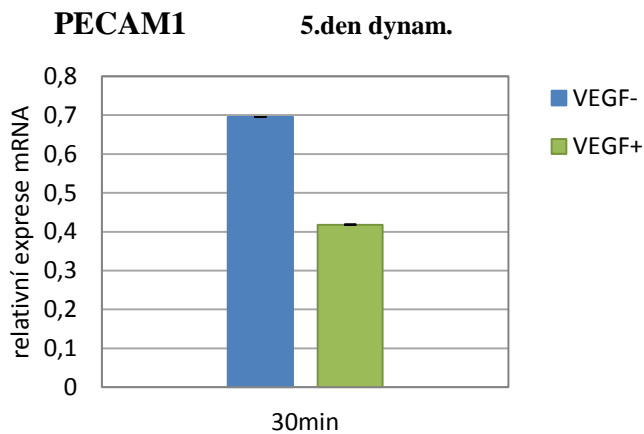
**Obr. 4.16 :** Graf relativní míry exprese KDR u vzorků odebraných 5. den kultivace v dynamickém prostředí.



**Obr. 4.17:** Graf relativní míry exprese PECAM1 u vzorků odebraných 1. a 5. den kultivace ve statickém prostředí.



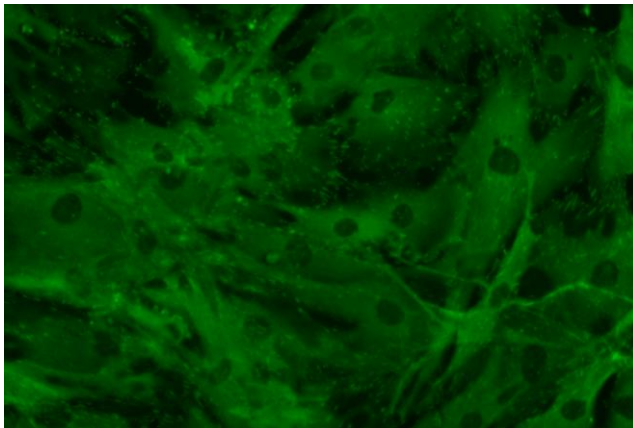
**Obr. 4.18:** Graf relativní míry exprese PECAM1 u vzorků odebraných 1. den kultivace v dynamickém prostředí. Odběry provedeny 15 a 30 minut po zvýšení frekvence natahování.



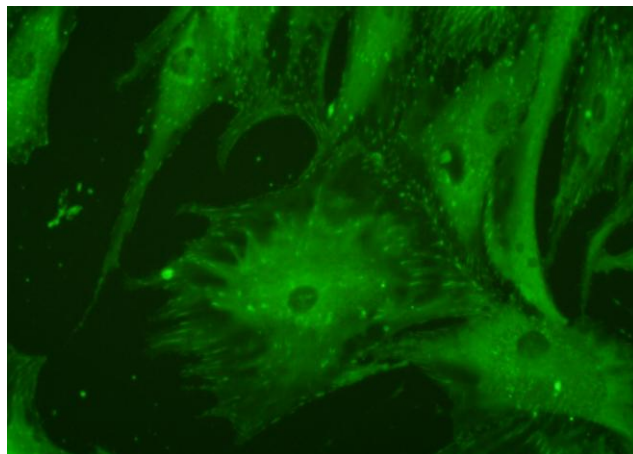
**Obr. 4.19 :** Graf relativní míry exprese PECAM1 u vzorků odebraných 5. den kultivace v dynamickém prostředí.

## 4.2 Výběr optimální kombinace růstových faktorů pro diferenciaci

K určení růstových faktorů vhodných k diferenciaci kmenových buněk do hladkého svalu jsme buňky kultivovali ve statickém systému po dobu dvou týdnů. Zvolili jsme celkem pět typů diferenciacních médií na bázi DMEM, ovšem s přidavkem odlišných růstových faktorů, nebo jejich kombinací: 1) TGF $\beta$  + BMP4, 2) TGF $\beta$  + VEGF, 3) TGF $\beta$ , 4) VEGF a jako kontrola 5) DMEM bez růstových faktorů. Tímto způsobem jsme sledovali pět typů vzorků. Odběry byly prováděny 7. a 14. den kultivace. Tedy jsme získali k porovnání celkem deset typů vzorků. Odebrané vzorky jsme porovnávali z hlediska míry diferenciacie buněk sledováním tvorby proteinových struktur typických pro hladký sval (struktur  $\alpha$ -aktinu a kalponinu) a endotel (CD31, VEGF receptor2), k tomu jsme používali metodu imunofluorescenčního barvení proteinů. Paralelně jsme zjišťovali míru exprese těchto proteinů na úrovni mRNA. Tedy expresi genů typicky hladkosvalových (ACTA2, CNN1) i endotelových (PECAM1 a KDR). Adhezi buněk k podkladu jsme ověřili vizuálně imunofluorescenčním obarvením vinkulinu, proteinu fokální adheze. Tímto způsobem jsme zjistili, že buňky jsou po čtrnáctidenní kultivaci dobře adherované k podkladu (Obr. 4.20, Obr. 4.21).



**Obr. 4.20:** Reprezentativní obrázek struktury vinkulinu, proteinu fokální adheze, u buněk kultivovaných v diferenciacním médiu DMEM . Foceno 14.den kultivace. Zvětšení 63x.



**Obr. 4.21:** Reprezentativní obrázek struktury vinkulinu, proteinu fokální adheze, u buněk kultivovaných v diferenciacním médiu s kombinací růstových faktorů TGF $\beta$  + VEGF. Foceno 14.den kultivace. Zvětšení 63x.

### 4.2.1 Detekce míry diferenciacce buněk metodou RT-PCR

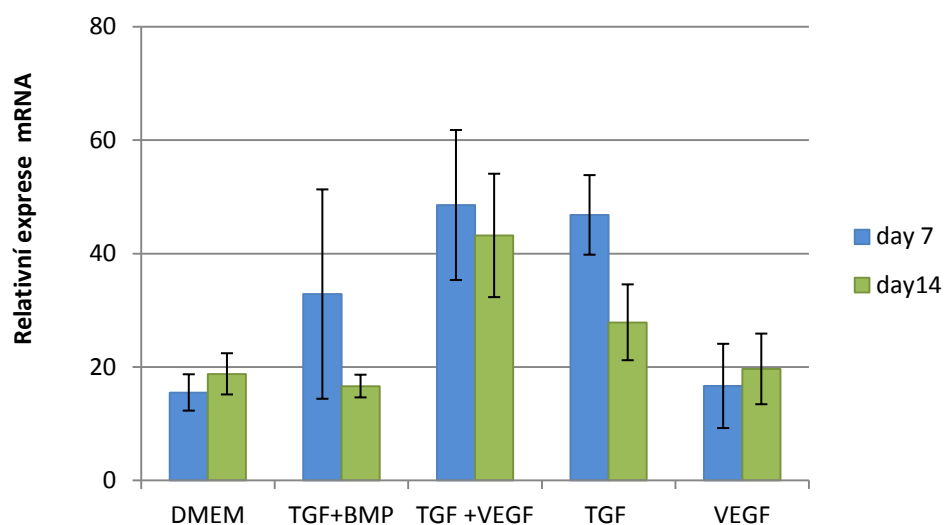
K nejvyšší míře exprese genů CNN1 a ACTA2 docházelo u buněk kultivovaných v kombinovaném médiu obsahujícím růstové faktory TGF $\beta$  + VEGF. Exprese ACTA2 byla již po sedmidenní kultivaci relativně vysoká, prakticky na úrovni diferencované hladkosvalové buňky (Obr. 4.22). Exprese CNN1 stoupala postupně, během druhého týdne kultivace docházelo k signifikantnímu zvýšení exprese oproti hodnotám naměřených 7. den kultivace (Obr. 4.23).

U vzorků kultivovaných v samotném diferenciacním médiu DMEM a v médiu s přidaným VEGF byla míra exprese CNN1, jakožto markeru diferenciacce směrem k hladkému svalu, signifikantně nižší. Dokonce po druhém týdnu kultivace ještě klesla (Obr. 4.23). Naopak míra exprese markeru endotelu PECAM1 v těchto vzorcích byla velmi nízká, po dvoutýdenní kultivaci mírně stoupla (Obr. 4.24). Z toho lze soudit, že tato média diferenciaci do hladkého svalu ve statickém systému dlouhodobě nepodporují, naopak dochází ke slabému posunu ve prospěch buněk endotelových.

Zajímavé jsou také výsledky zjištěné pro KDR, gen pro VEGF receptor (Obr. 4.25). U vzorků buněk kultivovaného v médiu DMEM + VEGF během kultivace v druhém týdnu míra exprese tohoto genu stoupala, podobně jako u PECAM1 (Obr. 4.24). Ovšem signifikantně nejvyšších hodnot dosáhla v kombinovaném médiu obsahujícím růstové faktory TGF $\beta$  + VEGF, podobně jako markery hladkého svalu. Nelze tedy vyloučit, že dochází k mírné tvorbě receptoru pro VEGF i u hladkého svalu.

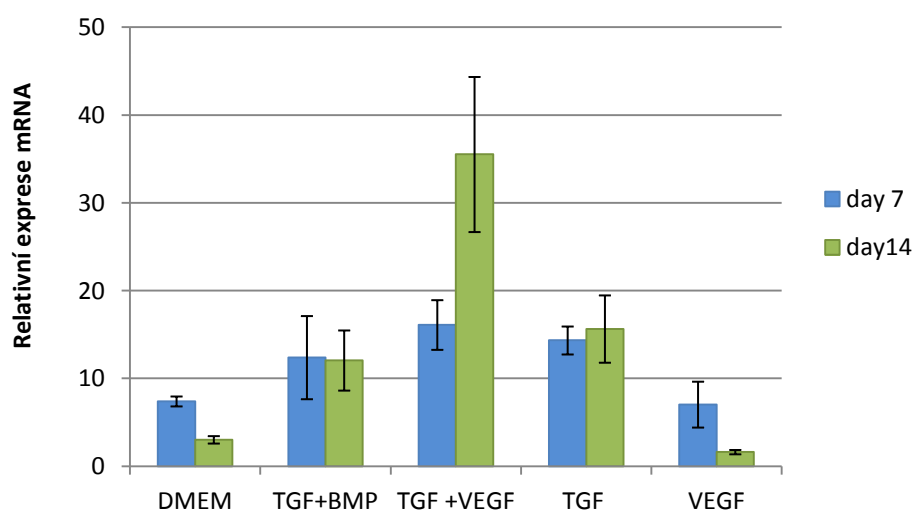
Srovnání míry exprese markerů hladkého svalu a endotelu v médiu obohaceném kombinací růstových faktorů TGF $\beta$  + VEGF je zcela zřejmé ze souborného obrázku (Obr. 4.26). Na obrázku je zároveň dobře vidět rozdíl mezi expresí časného markeru diferenciacce  $\alpha$ -aktinu a pozdějšího markeru kalponinu. Marker  $\alpha$ -aktin dosahuje maximální exprese již sedmý den kultivace a později produkce tohoto genu spíše klesá (rozdíl není signifikantní). Exprese kalponinu naopak dosahuje maximální hodnoty až po 14ti dnech kultivace a toto zvýšení je více nežli dvojnásobné a signifikantní. Lze předpokládat, že k expresi pozdních markerů diferenciacce bude docházet ještě později. Ovšem k úplné diferenciacce by bylo pravděpodobně třeba i splnění dalších kultivačních podmínek, jako je například dynamická stimulace. Naopak zjištěné hodnoty exprese markerů endotelu PECAM1 a KDR byly v porovnání s hodnotami exprese CNN1 a ACTA2 velmi nízké. Z toho lze usuzovat, že toto diferenciacní médium nejsilněji podporuje diferenciaci buněk ASC do hladkého svalu.

## ACTA2



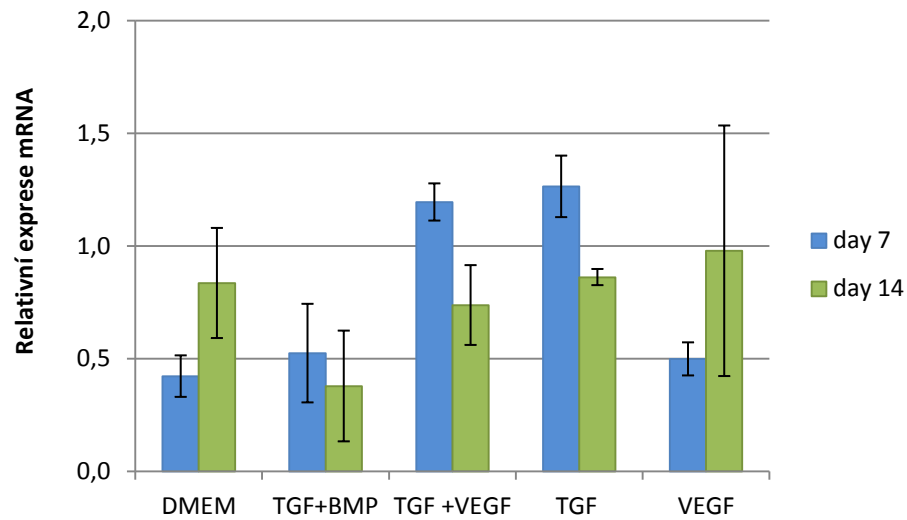
**Obr. 4.22:** Porovnání míry exprese ACTA2 (genu mRNA pro syntézu  $\alpha$ -actinu) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenciačních médií.

## CNN1



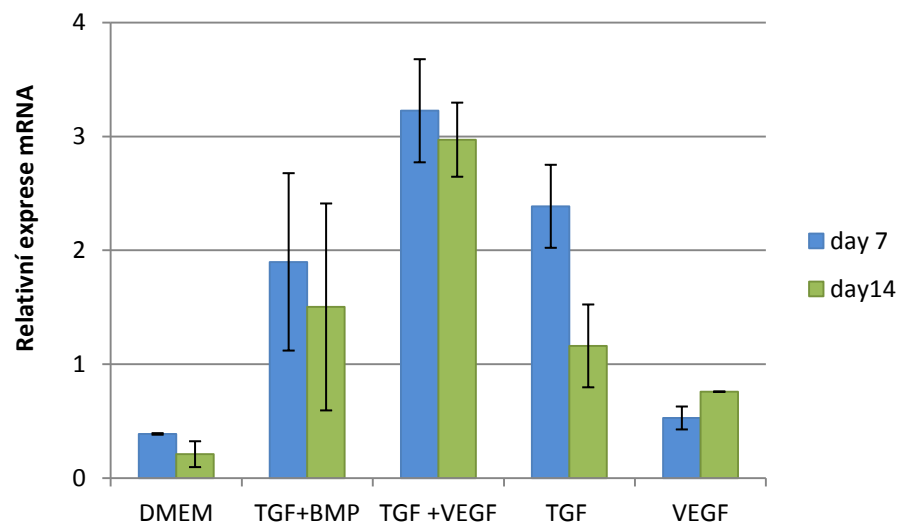
**Obr. 4.23:** Porovnání míry exprese CNN1 (genu mRNA pro syntézu proteinu kalponin) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenciačních médií.

## PECAM 1



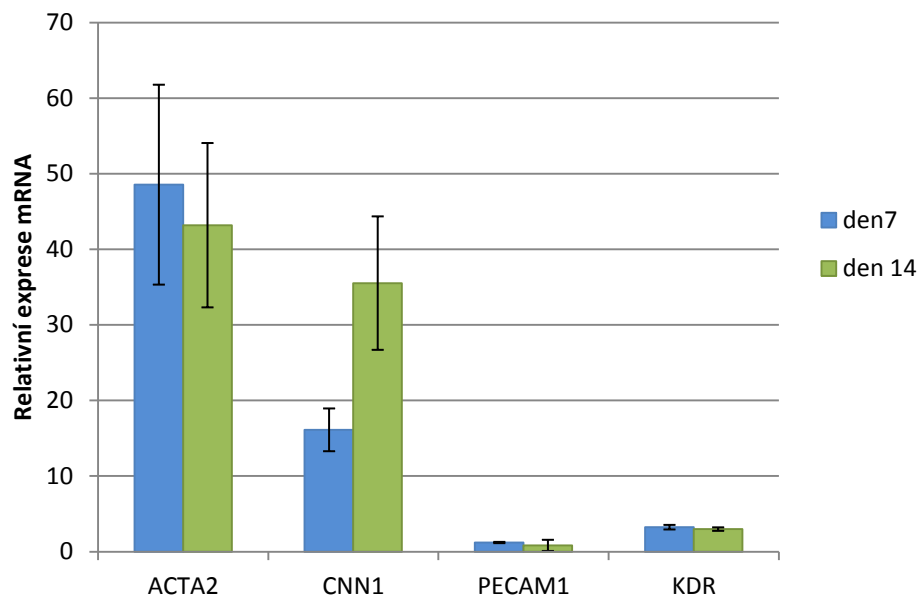
**Obr. 4.24:** Porovnání míry exprese PECAM1 (genu mRNA pro syntézu CD 31) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenačních médií

## KDR



**Obr. 4.25:** Porovnání míry exprese KDR (genu mRNA pro syntézu endotelového receptoru pro VEGF růstový faktor) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenačních médií.

## VEGF+TGFβ



**Obr. 4.26:** Porovnání míry exprese markerů hladkého svalu (ACTA2 a CNN1) a markerů endotelu (PECAM1 a KDR) v buněk kultivovaných v diferenciálním médiu s přidavkem růstových faktorů optimálních pro diferenciaci do hladkého svalu. (TGFβ + VEGF)

## 4.2.2 Detekce míry diference metodou imunofluorescenčního barvení

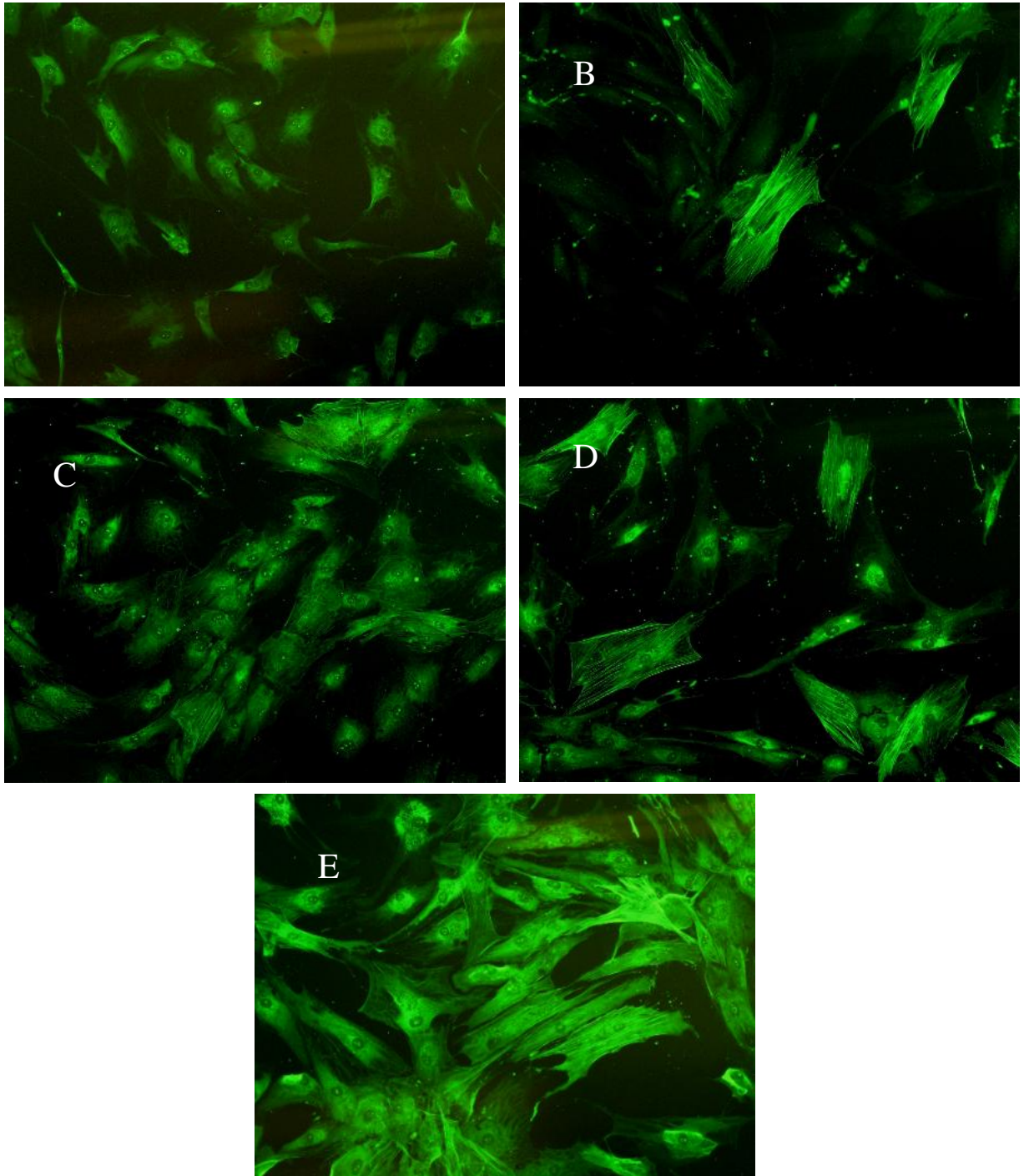
Paralelně s molekulárně genetickými metodami jsme prováděli detekci míry diference buněk na základě vizuálního pozorování vzorků. K tomuto účelu jsme buňky pěstované v jednotlivých typech médií zafixovali a obarvili specifickými primárními protilátkami metodou imunofluorescenčního barvení. Tyto preparáty jsme pak prohlíželi pod mikroskopem.

Díky vizualizaci proteinových struktur metodou imunofluorescenčního barvení jsme byli schopni pozorovat tvorbu typických struktur cytoskeletonu, tvořeného vláknou  $\alpha$ -aktinu a kalponinu uvnitř fixovaných buněčných preparátů. Toto pozorování jsme prováděli pro buňky kultivované ve všech pěti typech médií odebraných 7.den (Obr. 4.27, Obr. 4.28) a 14. den (Obr. 4.29, Obr. 4.30). Vývoj proteinových struktur typických pro endotel byl pod úrovní detekce.

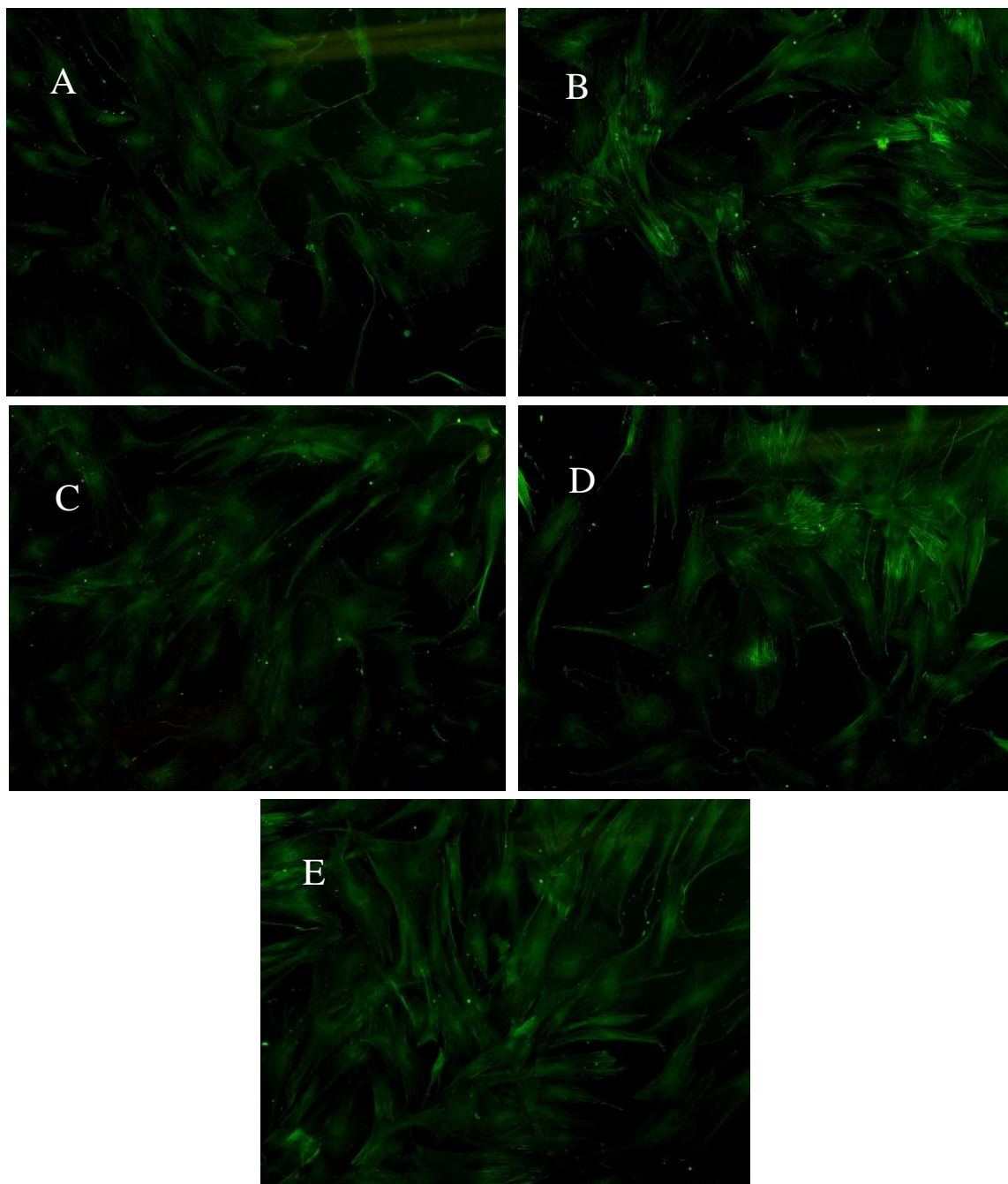
Výsledky z této části pokusu jsou plně v souladu s výsledky molekulárně-biologickými. Proteinové struktury vláknou  $\alpha$ -aktinu a kalponu byly v médiích obsahujících VEGF dobře vyvinuté. Nejvyšší rozvinutosti struktury typických pro hladký sval jsme dosáhli při kultivaci v médiu s přidanými růstovými faktory TGF $\beta$  + VEGF. Podobně jako u výsledků z molekulárně biologické části pokusu jsme zjistili tvorbu struktury vláken časného markeru diference  $\alpha$ -aktinu již 7.den (Obr. 4.27). Nejvyvinutější strukturu aktinu jsme zaznamenali u vzorku buněk, který byl kultivován v kombinovaném médiu obsahujícím růstové faktory TGF $\beta$  + VEGF. (Obr. 4.27: E). Buňky na tomto vzorku měly dobře vyvinuté fokální adheze, byly polygonální a mírně protáhlé, odpovídající běžné morfologii buněk hladkého svaly. Ještě výrazněji se vývoj aktinového cytoskeletonu projevil po dvoutýdenní kultivaci (Obr. 4.29: E). V médiu obsahujícím pouze VEGF (Obr. 4.29: C) se  $\alpha$ -aktin hromadil výrazně spíše jako lobulární kolem jádra. Relativně výrazná, i když slabší struktura  $\alpha$ -aktinu se vyvíjela také v kombinovaném médiu TGF $\beta$  + BMP4 (Obr. 4.29: D). Struktura pozdnějšího markeru kalponinu byla v 7.den (Obr. 4.28) vizualizovaná slabě a plně se vytvořila teprve po dvou týdnech kultivace (Obr. 4.30), nejvýrazněji též u vzorku buněk, který byl kultivován v kombinovaném médiu obsahujícím růstové faktory TGF $\beta$  + VEGF (Obr. 4.28: E, Obr. 4.18: E). Po dvou týdnech kultivace si u obou typů barvení můžeme všimnout paralelního uspořádání vláken do svazků, která je typická pro hladký sval (Obr. 4.29, Obr. 4.30).

Zajímavé je porovnání našich výsledků s prací Jianga (Jiang, 2019), který kultivoval kmenové buňky zubní dřene v diferencečním médiu obohaceném růstovým faktorem TGF $\beta$  a sledoval vliv diference buněk směrem k hladkému na proces signalizace specifické kanonické Wnt dráhy. Zjistil, že po 14ti dnech kultivace byla utlumena exprese některých růstových faktorů jako například TGF $\beta$  a VEGF. Z toho lze usoudit, že tyto růstové faktory se diference kmenových buněk zubní dřeni účastní.

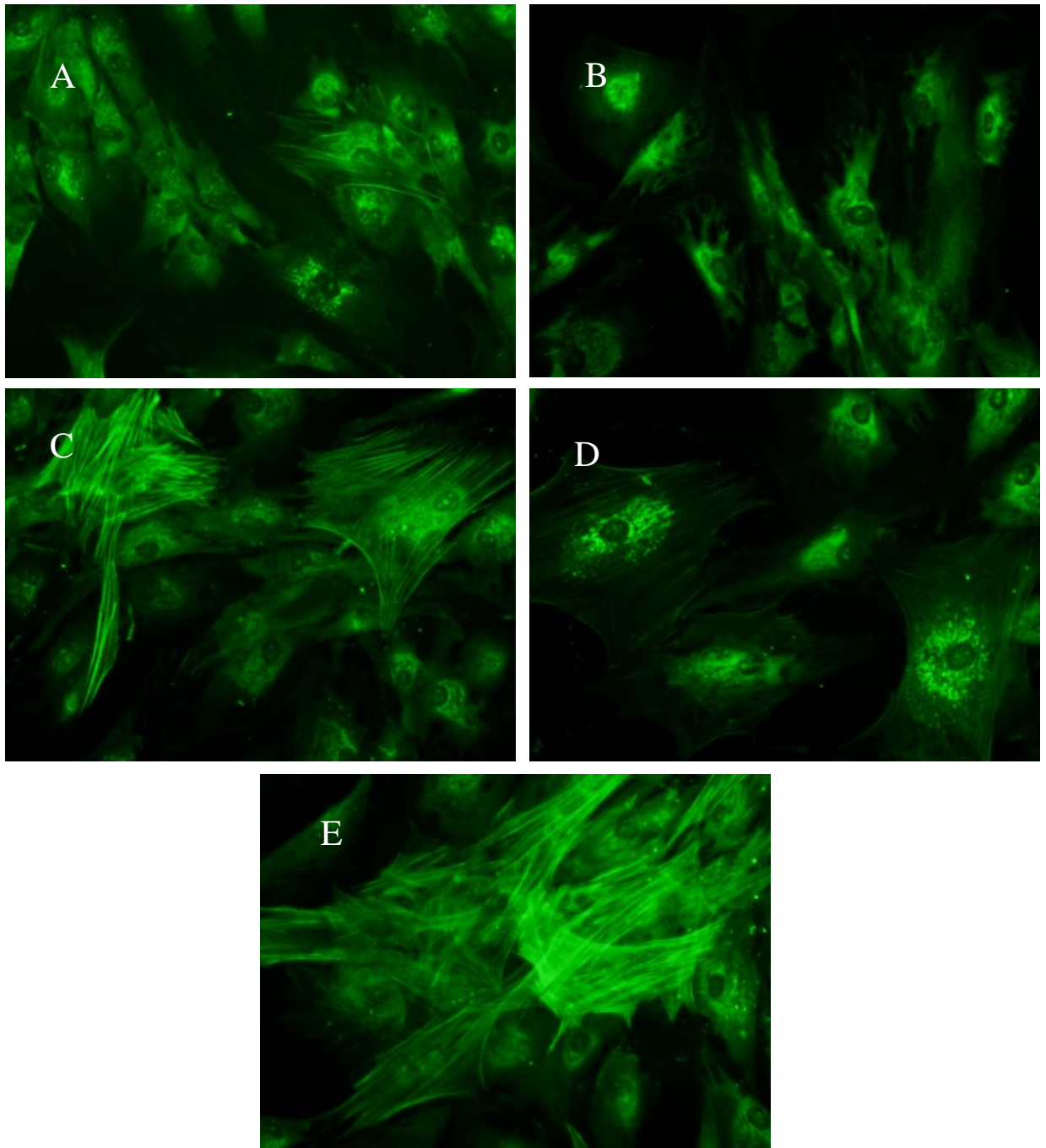




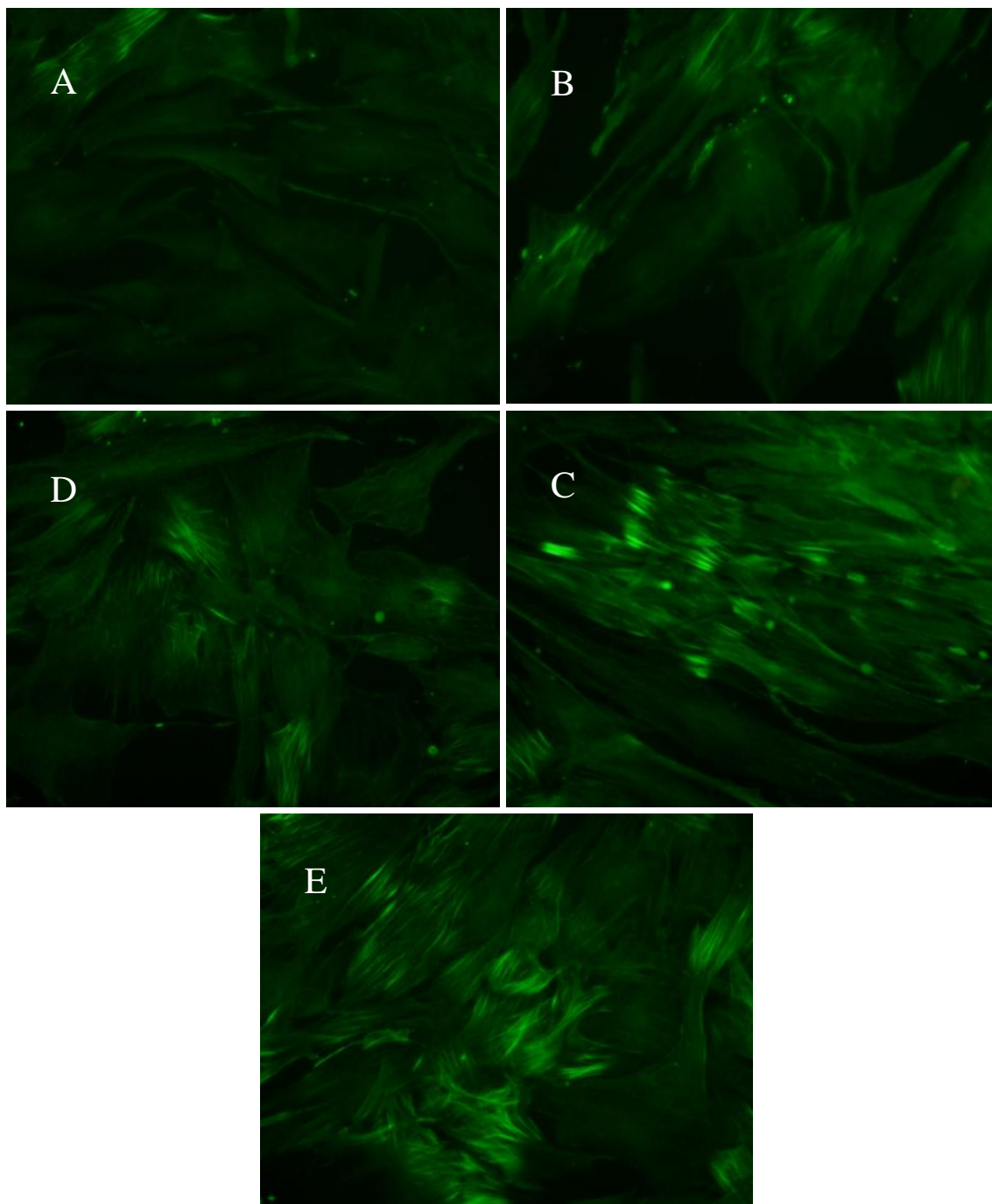
**Obr. 4.27:** Vývoj cytoskeletální struktury  $\alpha$ -aktinu 7.den od počátku kultivace. Imunofluorescenční fotografie buněk pěstovaných v pěti odlišných typech diferenačních médií na bázi DMEM s přidavkem odlišných růstových faktorů, nebo jejich kombinací: TGF $\beta$  (B), VEGF (C), TGF $\beta$  + BMP4 (D), TGF $\beta$  + VEGF (E) v porovnání s kontrolou bez růstových faktorů: DMEM (A). Zvětšení 20x.



**Obr. 4.28: Vývoj cytoskeletální struktury kalponinu 7. den od počátku kultivace.** Imunofluorescenční fotografie buněk pěstovaných v pěti odlišných typech diferenciačních médií na bázi DMEM s přidavkem odlišných růstových faktorů, nebo jejich kombinací: TGFβ (**B**), VEGF (**C**), TGFβ + BMP4 (**D**), TGFβ + VEGF (**E**) v porovnání s kontrolou bez růstových faktorů: DMEM (**A**). Zvětšení 20x.



**Obr. 4.29: Vývoj cytoskeletální struktury  $\alpha$ -aktinu 14. den od počátku kultivace.** Imunofluorescenční fotografie buněk pěstovaných v pěti odlišných typech diferenačních médií na bázi DMEM s přidavkem odlišných růstových faktorů, nebo jejich kombinací: TGF $\beta$  (**B**), VEGF (**C**), TGF $\beta$  + BMP4 (**D**), TGF $\beta$  + VEGF (**E**) v porovnání s kontrolou bez růstových faktorů: DMEM (**A**). Zvětšení 20x.



**Obr. 4.30: Vývoj cytoskeletální struktury kalponinu 14. den od počátku kultivace.** Imunofluorescenční fotografie buněk pěstovaných v pěti odlišných typech diferenačních médií na bázi DMEM s přidavkem odlišných růstových faktorů, nebo jejich kombinací: TGFβ (**B**), VEGF (**C**), TGFβ + BMP4 (**D**), TGFβ + VEGF (**E**) v porovnání s kontrolou bez růstových faktorů: DMEM (**A**). Zvětšení 20x.

## 5 ZÁVĚR

Zjistili jsme, že přítomností VEGF růstového faktoru v diferenciacním médiu dochází u buněk kultivovaných v dynamickém prostředí k vyšší míře exprese genu pro tvorbu kalponinu, markeru diferenciacce směrem k hladkému svalu. Rovněž je u takto kultivovaných buněk patrná vyšší rozvinutost kalponinových cytoskeletálních struktur. Celkově lze tedy říci, že tukové kmenové buňky prokazují vyšší míru diferenciacce směrem k hladkému svalu při kultivaci v dynamickém prostředí za přítomnosti VEGF růstového faktoru. Zároveň jsme prokázali, že růstový faktor VEGF nepodporuje v tomto systému diferenciaci směrem k buňkám endotelu.

Podle míry exprese genů pro tvorbu  $\alpha$ -actinu a kalponinu, markerů diferenciacce směrem k hladkému svalu, a úrovně rozvinutosti struktur těchto proteinů, jsme nejvyšší míru diferenciacce směrem k hladkému svalu při kultivaci ve statickém prostředí pozorovali u buněk kultivovaných v diferenciacním médiu s kombinací růstových faktorů TGF $\beta$  a VEGF.

Můžeme tedy uzavřít, že růstový faktor VEGF-A (izoforma 165) má pozitivní vliv na diferenciaci buněk ASC směrem k hladkému svalu. Kultivace kmenových buněk ASC v médiu DMEM s přidavkem růstových faktorů v kombinaci TGF $\beta$  a VEGF je tedy vhodným prostředím, pro jejich diferenciaci.

## 6 REFERENCE

ACTA2 actin alpha 2, smooth muscle [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI. National Center for Biotechnology Information [online]. Gene ID: 59, updated on 13-Mar-2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59>

*Aktuální populační vývoj v kostce*, ČSÚ- Český statistický úřad aktualizováno: 20. 2. 2020. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/aktualni-populacni-vyvoj-v-kostce>

ASCHERMANN M, Widimský P, Veselka J, Linhart A, Krupička J: *Kardiologie*. 1. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-726-2290-0.

ATALA A: Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. *Expert Opin Biol Ther* 5: 879-892, 2005.

BAČÁKOVÁ L, Zarubová J, Krocilova N, Travnicková M, Musilkova J, Pajorova J, Motarjemi H, Molitar M: Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells. *review*, 2018

BMP4 bone morphogenetic protein 4 [ *Homo sapiens* (human) ]- Gene - NCBI. National Center for Biotechnology Information [online]. Gene ID: 652, updated on 13-Mar-2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/652>

CAMPBELL JH, Campbell GR: Smooth muscle phenotypic modulation--a personal experience *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Aug;32(8):1784-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.243212

CNN1 calponin 1 [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI. National Center for Biotechnology Information [online]. Gene ID: 1264. updated on 13-Mar-2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1264>

CORSELLI M, Chen C W, Sun B, Yap S, Rubin J P, Peault B: The tunica adventia of human arteries and veins as source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 21: 1299-1308; 2012

DIMITRIEVSKA S, NIKLASON L.E. In-vitro blood vessel regeneration. MA, Peter X. *Biomaterials and regenerative medicine*. Cambridge: Cambridge University Press, c2014, s. 603-620. ISBN 978-1-107-01209-7.

ELCIN AE, Parmaksiz M, Dogan A, Seker S, Durkut S, Dalva K, Elçin YM: Differential gene expression profiling of human adipose stem cells differentiating into smooth muscle-like cells by TGFβ1/BMP4. *Exp Cell Res*. 2017 Mar 15;352(2):207-217. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.006. Epub 2017 Feb 7.

FREI R, Biosca F E, Handl M, Trč T: The Role of Growth Factors in the Human Organism and Their Use in Medicine, Especially in Orthopedics and Traumatology. *Acta Chirurgiae Orthopedicae et Traumatologiae Čechoslov.*, 75, 2008, p. 247–252

GIANNI-BARRERA R, Di Maggio N, Melly L, Burger MG, Mujagic E, Gürke L, Schaefer DJ, Banfi A: Therapeutic vascularization in regenerative medicine: Concise Review. *Stem Cells Transl Med.* 2020 Jan 10. doi: 10.1002/sctm.19-0319. [Epub ahead of print]

HELMRICH U, Di Maggio N, Güven S, Groppa E, Melly L, Largo RD, Heberer M, Martin I, Scherberich A, Banfi A: Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. *Biomaterials.* 2013 Jul;34(21):5025-35. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.040. Epub 2013 Apr 6.

HRADEC J, BÝMA S: Ischemická choroba srdeční Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. © 2007 Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, ISBN: 80-86998-14-2; dostupné z: <https://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy-2003-2007/ICHS.pdf>

CHLUPAC J, Filova E, Havlikova J et al.: The Gene Expression of Human Endothelial Cells Is Modulated by Subendothelial Extracellular Matrix Proteins:Short-Term Response to Laminar Shear Stress. *TISSUE ENGINEERING: Part A* Volume 20, Numbers 15 and 16, 2014, Mary Ann Liebert, Inc.DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0153

CHLUPAC J, Filová E, Bacakova L: Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res.* 2009; 58 Suppl 2:S119-39

JAKUBÍČKOVÁ, Andrea. Cytokiny v ateroskleróze. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.

JIANG W, Wang D, Alraies A, Liu Q, Zhu B, Sloan AJ, Ni L, Song B: Stem Cells Int.Wnt-GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Regulates the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Bladder Smooth Muscle Cells. *Stem Cells Int.* 2019 Jan 28;2019:8907570. doi: 10.1155/2019/8907570. eCollection 2019.

KARKKAINEN M.J, Petrova T.V: Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene.* 19 (49): 5598–5605. doi:10.1038/sj.onc.1203855. PMID 11114740.)

KDR kinase insert domain receptor [ *Homo sapiens* (human) ]- Gene - NCBI. National Center for Biotechnology Information [online]. Gene ID: 3791. updated on 13-Mar-2020.Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3791>

LODISH H. F, BERK A. et al.: *Molecular cell biology.* 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2000. ISBN 0-7167-3136-3.

MASOPUST, Jaroslav: Patogeneze Aterosklerózy. Dostupné z: <http://dotdiag.cz/img/prednasky/atero.pdf>

PECAM1 platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 [ *Homo sapiens* (human) ]- Gene - NCBI. National Center for Biotechnology Information [online]. Gene ID: 5175. updated on 13-Mar-2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175>

TGFβ Transforming Growth Factor beta, MeSH Descriptor Data 2020- NIH. National Institute of Health, revision date: 2015/06/02. Dostupné z : <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=TGF-beta>

TISCHER E, Mitchell R, Hartman T, *et al*: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991;266:11947-11954.

TRAVNICKOVA M, Bačáková L: Application of Adult Mesenchymal Stem cCell in Bone and Vascular Tissue Engineering. *Adult Stem Cells in Tissue Engineering, Physiol. Res.* 67: 831-850, 2018

XU JG, Zhu SY, Heng BC, Dissanayaka WL, Zhang CF. TGF-β1-induced differentiation of SHED into functional smooth muscle cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Jan 23;8(1):10. doi: 10.1186/s13287-016-0459-0.

ZHOU R, Zhu L, Fu S, Qian Y, Wang D, Wang C. Small Diameter Blood Vessels Bioengineered From Human Adipose-derived Stem Cells. *Sci Rep.* 2016 Oct 14;6:35422. doi: 10.1038/srep35422.



## 7 SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

**Obr. 2.1:** Anatomie tepny (artery) a žíly (vein). Dostupné z: <http://www.kardiosystem.websnadno.cz/Cevy.html>

**Obr. 2.2:** Statistické údaje příčin úmrtí v ČR v letech 2008 a 2018. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/aktualni-populacni-vyvoj-v-kostce>

**Obr. 2.3:** Klinicky užívané cévní protézy vyráběné z expandovaného polytetrafluoroetylén (ePTFE) a z polyetylen tereftalátu (PET). Dostupné z: <https://www.fgu.cas.cz/departments/biomaterialy-a-iskanove-inzenyrstvi?publicationsCount=120>

**Obr. 2.4:** Grafické znázornění VEGF růstových faktorů a membránových receptorů odpovědných za indikaci jejich přítomnosti v mezibuněčných prostorech. Dostupné z: <http://manspub.com/ojs3/index.php/AMMR/article/view/26>

**Obr. 3.1:** Polystyrenová 24jamková destička určená pro kultivaci ve statickém systému (Techno Plastic Products, Switzerland). Dostupné z: [https://www.tpp.ch/page/bilder/Produkte/TC-plates/plates-all\\_463.jpg?m=1557880768](https://www.tpp.ch/page/bilder/Produkte/TC-plates/plates-all_463.jpg?m=1557880768)

**Obr. 3.2:** Znázornění tvaru dna jamky typu F. Dostupné z: <https://www.tpp.ch/page/bilder/picto/F-Kalotte.jpg?m=1557880698&>

**Obr. 3.3:** Silikonová elastická komůrka typu ST-CH-04 určená ke kultivaci buněk v dynamickém systému STREX (B-Bridge International, Inc.). Dostupné z: <https://strexcell.com/wp-content/uploads/2018/11/SC04-1018-STB-150-User-Manual.pdf>

**Obr. 3.4:** Rozměry silikonových komůrek typu ST-CH-04. Dostupné z: <https://strexcell.com/wp-content/uploads/2018/11/SC04-1018-STB-150-User-Manual.pdf>

**Obr. 3.5** Schéma pracovní jednotky STREX STB-140-04. *Cell Stretching SystemModel # STB-140-10User Manual*. Dostupné z: <https://www.manualslib.com/manual/1485287/Strex-Stb-140-10.html#product-STB-140-10>

**Obr. 3.6** Schéma řídicí jednotky STB-140-04. *Cell Stretching SystemModel # STB-140-10User Manual*. Dostupné z: <https://www.manualslib.com/manual/1485287/Strex-Stb-140-10.html#product-STB-140-10>

**Obr. 3.7:** Složení reakční směsi vstupující do reakce při RT-PCR (podle Data Sheet 5x HOT FIREPol® Probe Universal qPCR Mix Silos BioDyne). Dostupné z: [http://www.medibena.at/media/Solis/manual19/sb\\_08-17\\_gp\\_data\\_sheet\\_hot\\_firepol\\_probe\\_universal\\_qpcr\\_mix.pdf](http://www.medibena.at/media/Solis/manual19/sb_08-17_gp_data_sheet_hot_firepol_probe_universal_qpcr_mix.pdf)

**Obr. 4.1:** Graf relativní míry exprese CNN1 u vzorků odebraných 1. a 5. den kultivace ve statickém prostředí. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.2:** Graf relativní míry exprese CNN1 u vzorků odebraných 1. den kultivace v dynamickém prostředí. Odběry provedeny 15 a 30 minut po zvýšení frekvence natahování. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.3:** Graf relativní míry exprese CNN1 u vzorků odebraných 5. den kultivace v dynamickém prostředí. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.4:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace ve statickém systému v diferenciacním médiu bez přidaného VEGF růstového faktoru. Foto autor.

**Obr. 4.5:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace ve statickém systému v diferenciacním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Foto autor.

**Obr. 4.6:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenciacním médiu bez přidaného VEGF růstového faktoru. Foto autor.

**Obr. 4.7:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenciacním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Foto autor.

**Obr. 4.8:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenciacním médiu bez přidaného VEGF růstového faktoru. Foto autor.

**Obr. 4.9:** Struktura kalponinových vláken 5. den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenciacním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Foto autor.

**Obr. 4.10:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace ve statickém systému v diferenciacním médiu bez VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x. Foto autor.

**Obr. 4.11:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace ve statickém systému v diferenciacním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x. Foto autor.

**Obr. 4.12:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenciacním médiu bez VEGF růstového faktoru. Zvětšení 63x. Foto autor.

**Obr. 4.13:** Vizualizace VEGFR-2 5.den kultivace v dynamickém systému STREX v diferenciacním médiu s přidaným VEGF růstovým faktorem. Zvětšení 63x. Foto autor.

**Obr. 4.14:** Graf relativní míry exprese KDR u vzorků odebraných 1. a 5. den kultivace ve statickém prostředí. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.15:** Graf relativní míry exprese KDR u vzorků odebraných 1. den kultivace v dynamickém prostředí. Odběry provedeny 15 a 30 minut po zvýšení frekvence natahování. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.16:** Graf relativní míry exprese KDR u vzorků odebraných 5. den kultivace v dynamickém prostředí. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.17:** Graf relativní míry exprese PECAM1 u vzorků odebraných 1. a 5. den kultivace ve statickém prostředí. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.18:** Graf relativní míry exprese PECAM1 u vzorků odebraných 1. den kultivace v dynamickém prostředí. Odběry provedeny 15 a 30 minut po zvýšení frekvence natahování. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.19:** Graf relativní míry exprese PECAM1 u vzorků odebraných 5. den kultivace v dynamickém prostředí. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.20:** Reprezentativní obrázek struktury vinkulinu, proteinu fokální adheze, u buněk kultivovaných v diferenciacním médiu DMEM . Foceno 14.den kultivace. Zvětšení 63x. Foto autor.

**Obr. 4.21:** Reprezentativní obrázek struktury vinkulinu, proteinu fokální adheze, u buněk kultivovaných v diferenciacním médiu s kombinací růstových faktorů TGF $\beta$  + VEGF. Foceno 14.den kultivace. Zvětšení 63x. Foto autor.

**Obr. 4.22:** Porovnání míry exprese ACTA2 ( genu mRNA pro syntézu  $\alpha$ -aktinu) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenciacních médií. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.23:** Porovnání míry exprese CNN1 ( genu mRNA pro syntézu proteinu kalponin) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenciacních médií. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.24:** Porovnání míry exprese PECAM1 ( genu mRNA pro syntézu CD 31) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenciacních médií. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.25:** Porovnání míry exprese KDR ( genu mRNA pro syntézu endotelového receptoru pro VEGF růstový faktor) u vzorků kultivovaných v různých typech diferenciacních médií. Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.26:** Porovnání míry exprese markerů hladkého svalu (ACTA2 a CNN1) a markerů endotelu (PECAM1 a KDR) u buněk kultivovaných v diferenciacním médiu s přidavkem růstových faktorů optimálních pro diferenciaci do hladkého svalu. (TGF $\beta$  + VEGF). Autorem grafu autor práce.

**Obr. 4.27:** Vývoj cytoskeletální struktury  $\alpha$ -aktinu 7. den od počátku kultivace. Foto autor.

**Obr. 4.28:** Vývoj cytoskeletální struktury kalponinu 7. den od počátku kultivace. Foto autor.

**Obr. 4.29:** Vývoj cytoskeletální struktury  $\alpha$ -aktinu 14. den od počátku kultivace. Foto autor.

**Obr. 4.30:** Vývoj cytoskeletální struktury kalponinu 14. den od počátku kultivace. Foto autor.