

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Sledování růstu kmenových buněk za účelem
vytváření kostních náhrad pro tkáňové inženýrství a
tvorba nosiče kostní náhrady**

**David Havrlant
Moravskoslezský kraj**

Ostrava, 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Sledování růstu kmenových buněk za účelem
vytváření kostních náhrad pro tkáňové inženýrství a
tvorba nosiče kostní náhrady**

**Stem cells growth observations aimed to engineer
bone tissue replacements and appropriate scaffolds**

Autoři: David Havrlant

Škola: Wichterlovo gymnázium, Čs. Exilu 669, 70800 Ostrava

Kraj: Moravskoslezský kraj

Konzultant: RNDr. Jana Musílková, CSc.

Ostrava, 2023

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 Ostravě dne 20.3. 2023David Havrlant.....

Poděkování

Zde bych rád poděkoval své konzultantce RNDr. Janě Musílkové, CSc., která mě vedla v mé studentské práci, naučila mě spoustu cenných poznatků a tuto práci mi umožnila skrz program Otevřená věda Akademie věd ČR. Také bych chtěl poděkovat organizačnímu týmu Otevřené vědy a Mgr. Nikole Daškové, která byla v tomto projektu mou kontaktní osobou. Nadále moc děkuji Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství pod vedením Doc. MUDr. Lucie Bačákové, CSc. Konečné díky patří týmu z laboratoře Protolab na Vysoké škole báňské pod vedením Ing. Jiřího Hajnyše, který mi umožnil vytvořit vzorku pro svůj výzkum v jejich laboratoři.

Anotace

Cílem výzkumu letošní stáže byl výběr vhodného scaffoldu pro kolonizaci a dlouhodobý růst buněk. Zabýval jsem se vlivem těchto scaffoldu na buněčnou aktivitu. Tento výzkum je prvním krokem k tvorbě kostní tkáňové náhrady. Kostní náhrady na bázi kmenových buněk by redukovaly riziko imunitní reakce a zároveň by snížily nutnost reoperace z důvodu opotřebení či poškození vložené náhrady. Časem by totiž splynuly se zbytkem kosti. Obzvláště tvorba polymerního scaffoldu na bázi 3D tisku představuje možnost jejich výroby v libovolném tvaru.

Předmětem výběru byly tři základní druhy scaffoldů, lišící se na základě materiálu, jeho zpracování a vnitřní 3D struktury. První z nich byly printy vytištěné na FDM 3D tiskárně. Testovali jsme 10 typů třírozměrných struktur s tloušťkami vláken buď 240 um nebo 200 um a mezerou od 0 um do 200 um. Druhý druh scaffoldů byly struktury připomínající tvarem včelí plástve. Jejich struktura byla spíše dvouvrstvá, byly vystaveny radiaci o různé intenzitě a cílem bylo zjistit vliv této úpravy na růst buněk. Třetí druh scaffoldů byly pryskyřice vytištěné na SLA 3D tiskárně s třírozměrnou žebříčkovou strukturou a šířkou vlákna i mezery 100 um.

Samotný pokus spočíval v nasazení kmenových buněk ASC izolovaných z lidské tukové tkáně na tyto tři druhy scaffoldů. Buňky jsme kultivovali v termostatu, po dobu až 10 dní za statických podmínek. Růst buněk jsme vyhodnocovali buď podle snímků z konfokálního mikroskopu Dragonfly 503 nebo optického mikroskopu Olympus IX71, součtu jader barvených pomocí fluorescenčního barviva Hoechst 33258, nebo metabolických testů MTS.

V printech buňky úspěšně kolonizovaly všech 10 typů, ačkoli ne všechny stejně do hloubky. Podle snímků konfokálního mikroskopu jsme zjistili, že nejlépe byly kolonizovány printy typu struktur 2, 3 a 8. Co se pláství týče tak lze podle výsledků MTS testu a buněčných součtů říci, že dlouhodobou proliferaci nejlépe podporuje vzorek ozářený hladinou 1000, kde byly zjištěny hodnoty dokonce vyšší nežli u pozitivní kontroly polystyren. Na pryskyřicích metabolický test MTS ukázaly, že proliferace probíhá velmi dobře a ze snímků z Olympu IX71 bylo patrné, že buňky pronikají i do hloubky.

Klíčová slova

kmenové buňky, scaffold, proliferace, 3D tiskárna, kost

Annotation

The ultimate objective of this year's internship was to select an appropriate scaffold for colonization and long-term proliferation of cells. It focused on the impact of scaffolds on cell activity. This research represents the first step towards the engineering of bone tissue replacement. Bone tissue replacements could reduce the risk of immune reaction and decrease the need for reoperation caused by implanted replacements overuse or damage; thus, they promote consequent progressive blending in the rest of the tissue. Particularly, the development of polymer scaffold by 3D printing presents an opportunity to manufacture the replacements in any arbitrary shape.

The objects of selection were three basic kinds of scaffolds differing by material, their processing and inner 3D structures, namely FDM 3D printed prints, honeycomb structure scaffolds and SLA 3D resins. The first tests were carried out on 10 types of three-dimensional print structures with fiber width either 240 um or 200 um and space between them from 0 um up to 200 um. The second kind of scaffolds were structures resembling honeycomb structure by shape. Their structure was two-dimensional, and they were exposed to radiation of varying intensities and the aim of which was to determine the impact of radiation processing on the proliferation of cells. The third kind of scaffolds were resins printed on SLA 3D printer with three-dimensional ladder structure and with fiber and space width 100 um.

The experiment consisted of ASC stem cells seeding isolated from human fat tissue on the above mentioned three kinds of scaffolds. The cells were cultivated in thermostat for up to 10 days in static conditions. Their growth was evaluated based on either the images from the Dragonfly 503 confocal microscope or the Olympus IX71 optical microscope, summing up the nuclei dyed by fluorescent dye Hoechst 33258 or MTS metabolic test.

The cells colonized all the 10 types of prints. However, the depth of colonization differed. According to the images from the confocal microscope proved that the most efficient penetration occurred in types number 2, 3 and 8. Regarding of honeycombs, MTS tests and nuclei sums revealed that long-term proliferation is best supported by scaffold radiated by level 1,000, where the cells reached higher levels of proliferation than in polystyrene positive control. The MTS tests on resins proved sufficient proliferation and deep penetration was obvious from IX71 optical microscope.

Keywords

stem cells, scaffold, proliferation, 3D printer, bone

Obsah

1	Úvod a cíle práce	10
2	Teoretický úvod	11
2.1	Kosti v lidském těle	11
2.1.1	Kompaktní kostní tkáň	11
2.1.2	Spongiozní kostní tkáň	12
2.1.3	Osteoblasty	12
2.1.4	Osteocyty	12
2.1.5	Osteoklasty	12
2.1.6	Vaskularizace kostní tkáně	13
2.2	Onemocnění kostní tkáně	13
2.2.1	Osteoporóza	13
2.2.2	Nádory kostí	14
2.2.3	Traumatická poranění kostí	14
2.2.4	Vrozené vady růstu kostí	14
2.3	Současné kostní náhrady	14
2.3.1	Kostní štěpy	14
2.3.2	Kovové náhrady kostí	16
2.4	Kmenové buňky	16
2.4.1	Diferenciace kmenových buněk	17
2.4.2	Podmínky pro diferenciaci buněk do kostí	17
2.4.3	Osteogenní markery	18
2.4.4	F-aktin	18
2.5	Tkáňové nosiče neboli scaffoldy	18
2.6	3D tisk	19
2.6.1	FDM technologie	20
2.6.2	SLA technologie	21
3	Materiály a metody	22
3.1	Buňky	22
3.2	Scaffoldy	22
3.2.1	Printy	23
3.2.2	Plástve	24
3.2.3	Pryskyřice	24
3.3	Kultivace buněk ve statickém prostředí	26
3.3.1	Počítání buněk před nasazením	26
3.3.2	Nasazování buněk na scaffoldy	26
3.4	Barvení buněk	26
3.4.1	Fixace buněk	27
3.4.2	Faloidin	27

3.4.3	Hoechst 33258	28
3.4.4	Texas red.....	29
3.5	Fotografování buněk	29
3.5.1	Stanovení počtu buněk.....	29
3.5.2	Sledování kolonizace scaffoldu pomocí mikroskopu Dragonfly 503	30
3.6	MTS test.....	31
4	<i>Výsledky a diskuse</i>.....	33
4.1	Růst buněk na printech.....	33
4.1.1	Vyhodnocení růstu buněk na printech	35
4.2	Růst buněk na plástvích	35
4.2.1	Počty buněk	36
4.2.2	Vyhodnocení růstu buněk měřením metabolické aktivity	39
4.2.3	Morfologie buněk	40
4.2.4	Vyhodnocení růstu buněk na plástvích	41
4.3	Růst buněk na pryskyřicích	41
4.3.1	Vyhodnocení růstu na pryskyřicích	43
5	<i>Závěr</i>.....	44
6	<i>Použitá literatura</i>	45
7	<i>Obrázky</i>.....	48
7.1	Zdroje převzatých obrázků.....	49

Seznam použitých zkratek

ASC – kmenové buňky tukové tkáně (adipose derived stem cells)

FDM – fused deposition modelling

SLA – stereolitography

EPC – endothelial progenitor cells

ESC – embryonal stem cells

PGC – primordial germ cells

HSC – hematopoietic stem cells

FS – fetální sérum

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

PCL – polykaprolakton

PLA – kyselina polylactonová

FGF2 – bazický fibroblastový růstový faktor beta

PBS – fosfátový pufr, stabilizuje pH ve vzorku

MTS - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, též označení metabolického testu s tímto substrátem

AV ČR – Akademie věd České republiky

1 Úvod a cíle práce

V dnešní současné době roste potřeba po tkáňových náhradách a hledají se nové způsoby, jak tuto potřebu co nejefektivněji uspokojit. Zvláště efektivní možností by mohla být tvorba náhrady jako kombinace tkáňového nosiče kolonizovaného buněčnou složkou, která by umožnila inkorporaci tkáňového štěpu do kosti a jeho další regeneraci. K tomuto účelu jsou vhodné kmenové buňky, kmenových buněk, které se dají získat bez větších obtíží a újmy od dárců. Jak však z těchto darovaných buněk, které určitě nemůžou být kostní, novou kostní tkáň vytvořit? Klíčem je diferenciací, která umožňuje přeměnu kmenových buněk, které nemají žádnou vlastní specializaci, na specializované buňky, jako například zmiňované kostní. Diferenciací probíhá v přírodě i v nás zcela běžně a přirozeně, naším úkolem je jen ji usměrnit, abychom dosáhli výsledků, které potřebujeme. Naším dlouhodobým cílem je tvorba drobných kostních štěpů in vitro, které budou schopné vlastní životaschopnosti in vivo a které by bylo možné operovat do místa, kde pacientova vlastní tkáň chybí a tento umělý štěp časem sroste s vlastní kostí.

Začneme s výběrem kmenových buněk, které necháme diferencovat. Nejlepší a nejdostupnější volbou budou určitě buňky typu ASC. Buňky ASC můžeme získat třeba při liposukci, jsou to tedy buňky tukové tkáně.

Diferenciací můžeme dosáhnout přiblížením podmínek a okolí v jakých se daný typ vyskytuje. Pro kosti je to zejména vyšší obsah minerálů proteinu fibrin a aktin ve fetálním séru, ve kterém je pěstujeme. Tyto proteiny nám tedy mohou pomoci určit, jestli k diferenciaci dochází a vyhodnotit tak kvalitu vzorků

Poslední, co potřebujeme je vhodná 3D struktura, tedy scaffold, ve které se mohou buňky množit a diferencovat. Je nutné, aby měla vhodnou velikost a tvar pórů, aby se na ni buňky dobře držely a materiál struktury musí být biokompatibilní, aby nevyvolala reakci buněk a imunity a aby se po čase v těle sama rozložila.

Hlavní cíle práce tedy budou:

- Vyhodnocování potenciálních materiálů a scaffoldů pro kostní náhrady
- Tvorba scaffoldu

V teoretickém úvodu bych rád shrnul anatomii kosti a popíšu pár častých kostních onemocnění, jejichž řešením by náhrada z kmenových buněk mohla být. Dále bych rád sumarizoval v dnešní době dostupné kostní náhrady a také proč jsou vhodné a proč nikoli. Nakonec shrnu výhody a nevýhody kmenových buněk a tkáňových náhrad jako řešení náhrady kostí.

2 Teoretický úvod

Zdrojem k teoretickému úvodu týkajícího se zejména kostí byl zdroj [1]

2.1 Kosti v lidském těle

Kosti jsou základem opěrné soustavy obratlovců. Je to tvrdá pojivová tkáň, v níž jsou mezibuněčné hmoty vysoce mineralizovány. Kost je mezenchymálního původu a hlavními složkami jsou fosforečnan vápenatý, hydroxyapatit a uhličitan vápenatý. Díky 85% složení z hydroxyapatitových krystalů a inverznímu krystalovému uspořádání má kost piezoelektrické vlastnosti, znamenající, že při zatížení nebo tahu vzniká částečný elektrický náboj. Tento náboj poté stimuluje osteogenezi. Kostní tkáň se podle vnitřní struktury dělí na:

- a) Kompaktní
- b) spongiózní

2.1.1 Kompaktní kostní tkáň

Tento typ kostní tkáně tvoří nejčastěji vnější část kosti. Mikroskopická stavba kosti může být buď vláknitá nebo lamelózní. Přitom vláknitá kost je typická pro nižší obratlovce a novorozence do prvního roku věku, pak se mění na lamelózní kost, která je tvořena z lamel.

Rozlišujeme tři druhy lamel:

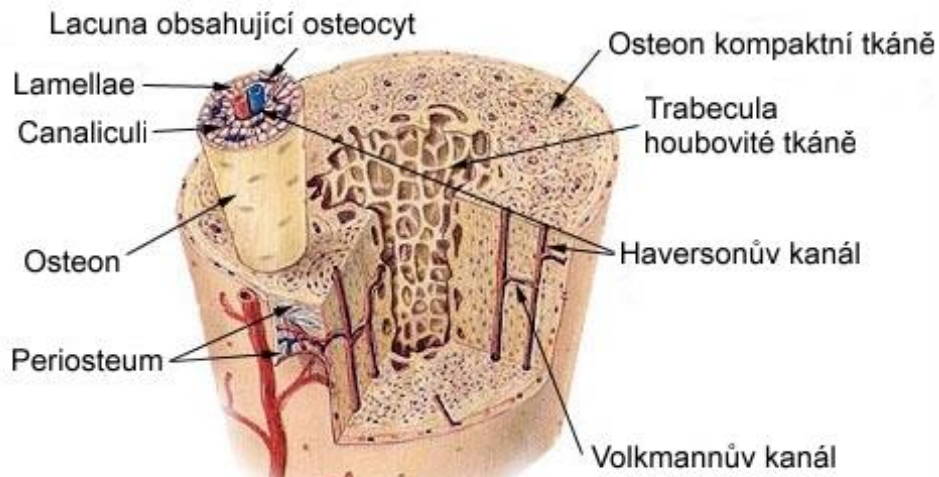
- a) Lamely Haversovy – tvoří mnohvrstevné dlouhé soubory buněk osteony
- b) Lamely intersticiální – vyplňují volná místa
- c) Lamely povrchové – výsledkem apoziční tvorby periostu

Pokud v kosti převažuje kompaktní tkáň, mluvíme o kortikální kosti.

2.1.2 Spongiózní kostní tkáň

Tento typ kosti najdeme uvnitř kosti pod kompaktní vrstvou. Její houbovitá struktura se skládá z trámců, které jsou uspořádány buď nepravidelně, nebo v určitých směrech podle spongiózního architektonického systému. V obou případech tak vzniká jakási síť a ta se tvaruje podle směru zatížení kosti. Z tvaru sítě tedy můžeme poznat trajektorie v jakých je kost zatěžována. Pod vrstvou spongiózní tkáně se nachází ještě kostní dřevina, která slouží k tvorbě krve.

Kompaktní a houbovitá kostní tkáň (lamelární kost)



Obrázek 1: Anatomie kosti

2.1.3 Osteoblasty

Osteoblasty jsou buňky, které jsou základním tvůrčím elementem kostní tkáně, protože jejich působením vzniká organická kostní matrix. Vznikají z pluripotentních mezenchymálních zárodečných buněk, které se nacházejí v kostní dřevině, periostu a nejspíše i endoteliích periferních cév. Osteoblasty jsou citlivé na většinu hormonů, které ovlivňují kostní metabolismus. Produkty jejich metabolismu také mají přímý efekt na ostatní kostní buňky. Produkují alkalickou fosfatázu, jejíž přítomností můžeme určit přítomnost osteoblastů a potvrdit tak probíhající diferenciaci.

2.1.4 Osteocyty

Osteocyty jsou buňky, které vznikají z osteoblastů. Na rozdíl od nich však nevytváří novou kost, ale pouze se zachytávají do již existující kostní matrixe. Osteocyty jsou propojeny cytoplazmatickými výběžky a při přítomnosti parathormonu (PTH), pumpují do mezibuněčného prostředí kalciové ionty, které nebyly do té doby dostatečně využívány v kostní matrixi a které slouží pro tvorbu další kostní tkáně. Jsou také citlivé na vnější mechanické signály a přenášejí je na ostatní buňky.

2.1.5 Osteoklasty

Rovnováhu a remodelaci kostní tkáně umožňují buňky nazývané osteoklasty, které jsou zodpovědné za resorpci kostní tkáně za pomoci enzymatické degradace. Používají k tomu

lyzozomální enzymy. Na rozdíl od osteoblastů a osteocytů se osteoklasty derivují z hemopoetických mononukleárních buněk. Jsou velké a mají mnoho jader. Citlivě reagují na látky vypouštěné osteoblasty, příkladem takové látky může být protein RANKL, který je součástí signalizačního systému mezi osteoklasty a osteoblasty, aby byla udržena rovnováha mezi resorpcí a produkcí kostní tkáně. Převáží-li aktivita osteoklastů nad aktivitou osteoblastů, dochází ke kostní atrofii, která se projevuje řidnutím kostí. To snižuje její pevnost a další mechanické kvality. Vzniká při nedostatku zátěže na kost, například při dlouhém pobytu ve vesmíru ve stavu beztlíže anebo při absenci jakéhokoliv pohybu. Nedostatek mechanické zátěže představuje problém i pro tvorbu kostní tkáně z kmenových buněk ve statických in-vitro kulturách. Proto je třeba buněčné kultury umisťovat do dynamických systémů, kde zátěž stimuluje růst kostí.

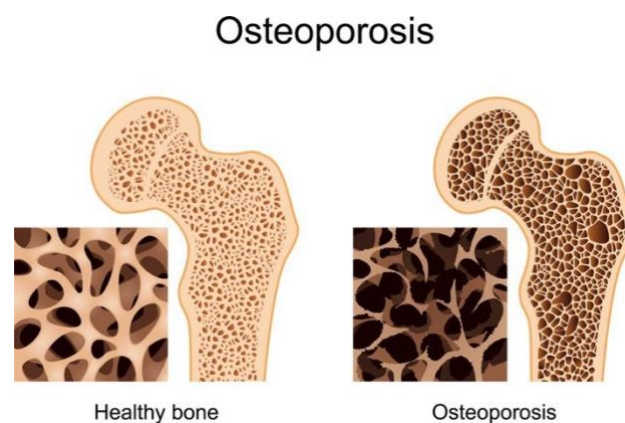
2.1.6 Vaskularizace kostní tkáně

Kostní tkáň je vaskularizována primárně díky Haversovým a Volkmannovým kanálkům, kterými se do kosti dostávají cévy a nervy. Nejdůležitější pro vaskularizaci je ovšem periost, což je pevný obal kosti protkaný cévami, cévy se z periostu do kosti dostávají pomocí právě Haversových a Volkmannových kanálků

2.2 Onemocnění kostní tkáně

2.2.1 Osteoporóza

Osteoporóza neboli řidnutí kostí je metabolické onemocnění kosti, při které dochází k úbytku kostní hmoty a k degeneraci vnitřní architektury kostní tkáně. K osteoporóze může docházet hned z několika různých důvodů. Prvním z nich je nízká tělesná hmotnost nebo náhlá ztráta tělesné hmotnosti, rodinná anamnéza a přílišné požívání alkoholu, cigaret nebo kofeinu, a naopak je způsobena nedostatečným množstvím kalcia ve stravě a přílišným obsah vlákniny, fosfátů a proteinů.



Obrázek 2: úbytek kostní hmoty vlivem osteoporózy

Riziko osteoporózy se pro současné generace ještě zvyšuje i z důvodu sedavého způsobu života a nedostatku pohybu, které rovněž vede k řidnutí kostí. Při přílišném nedostatku kostní hmoty

dochází ke zlomeninám, které je možno řešit zákroky užívající právě kostní štěpy ze zdravé tkáně. Osteoporóza postihuje všechny jedince s rostoucím věkem.

2.2.2 Nádory kostí

Kostní tkáň je kvůli značnému průtoku krve velmi náchylná na maligní nádorová onemocnění. Nádory, tzv. sarkomy v ní buď přímo vznikají nebo se do kosti nádorové buňky dostanou krevním řečištěm z nádorů v jiných částech těla a v kostech začnou vznikat nádorová ložiska neboli metastáze. Nádory se léčí povětšinou chemoterapií, avšak někdy je třeba nádor odstranit operativně. V místě odstranění pak ovšem kost chybí a zde své uplatnění opět nacházejí kostní štěpy, které by mohly být výsledkem našeho výzkumu.

2.2.3 Traumatická poranění kostí

Během poranění různých druhů občas dojde k takovému poškození kostní tkáně, že kost už nejde napravit do původního stavu a musí dojít k její excizi. Na tomto místě je nutné nahradit odebranou kostní tkáň, což je opět možné provést za pomoci kostních štěpů.

2.2.4 Vrozené vady růstu kostí

Takovýmito vrozenými vadami může být například dysplazie, kdy dochází k poruše vývoje skeletu, vady se mohou projevovat jako různost délky končetin. Tyto poruchy mají vždy genetickou příčinu a jejich řešením může být použití kostních štěpů. Dysplazie má novorozeneckou četnost asi 5:1000.

2.3 Současné kostní náhrady

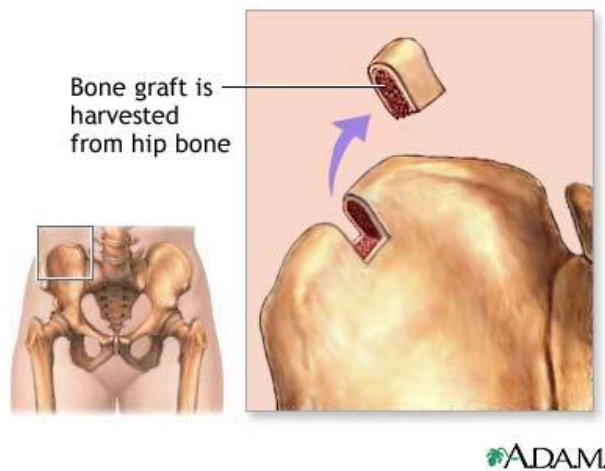
2.3.1 Kostní štěpy

Kostním štěpem nazýváme část kostní tkáně lidského původu, která byla transplantována za účelem výplně defektů a náhradě části kostí na potřebném místě. Kostní štěpy jsou hojně používané v kostní chirurgii a časem srůstají s kosti do níž jsou implantovány.[2]

Kostní štěpy dělíme na:

- Autogenní transplantáty – odebraná část kosti z těla téhož pacienta; velmi často z kosti pánevní
- Homogenní transplantáty – odebraná část kosti z jiného pacienta; často z tkáňových bank

Autogenní transplantáty v těle celkem dobře přežívají, přetvarují se podle zatížení, které je na ně působeno a později jsou nahrazeny nově vytvořenou kostí. Nevýhodou autogenních transplantátů je ta, že k odřezání kosti nemůže docházet opakovaně.



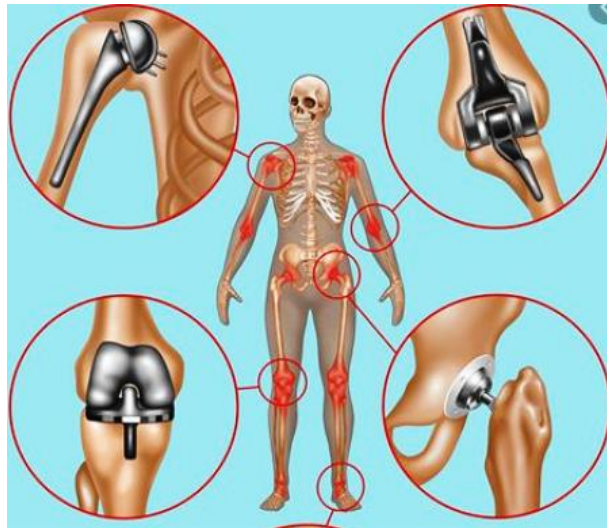
Obrázek 3: použití kostního štěpu z pánve

Homogenní transplantáty, nebo také alogenní transplantáty, často vykazují vysokou antigenní nesnášenlivost, která u pacientů dosahuje až 48 % [6], kterou lze konzervací a dalšími technologiemi snížit. Tato reakce antigenů však nemá pouze negativní důsledky, protože stimuluje činnost osteoblastů, které v daném místě tvoří novou kostní hmotu a umožní tak integraci homogenního transplantátu do samotné kosti. Homogenní transplantát je tedy časem zcela pohlcen kostí, ale význam transplantátů je v tom, že se stávají vodící strukturou pro vrůstání nově vytvořené kosti.

Dalším rizikem kostních štěpů je vznik infekce, krevních sraženin nebo poškození nervů.[3] V Evropě a ve Spojených státech pacienti potřebují opravovat každý rok, což zdravotní systémy vyjde každoročně na 3 miliardy dolarů [5].

2.3.2 Kovové náhrady kostí

Léčba, která používá kovové náhrady kostí se nazývá osteosyntéza a používá se v případech otevřených nebo komplikovaných zlomenin. Zejména se používají různé dlahy, ale také další tvary implantátů. Kovy jsou poměrně dobrým materiálem pro výrobu implantátů, protože jsou velmi pevné, takže dokážou dobře poskytnout oporu rostoucí kosti. Dále jsou tepelně a



Obrázek 4: kovové kostní implantáty

elektricky vodivé a oplývají i dalšími vhodnými fyzikálními vlastnostmi. Velmi významnou vlastností je jejich inertnost a odolnost proti korozi, nechceme totiž, aby se implantát rozpustil nebo způsobil buď infekci nebo imunitní reakci. Pro dosažení tohoto však nemůžeme použít kovy samotné, ale musíme použít jejich slitiny. Velmi vhodné jsou kovy schopné pasivace, které si na svém povrchu vytvoří neporézní vrstvu a s okolím dále nereagují.

Imunitní reakce na kovové kostní náhrady fungují následujícím způsobem: první odpověď na přítomnost náhrady tvoří polymorfonukleární leukocyty, brzy následované monocytami, které působí na cizí materiál fagocytózou a na místě vzniká zánět. Buňky fagocytózou pohlcují částičky z implantovaného biomateriálu [19]. Monocyty se po 1-3 dnech v krevní cirkulaci přeměňují na makrofágy. Reakce imunity na náhradu je zásadně ovlivněna vlastnostmi náhrady, jako velikost, tuhost, chemie a vlastnosti povrchu. Imunitní reakce opadá přibližně po dvou týdnech. Pokud, pokračuje dále, tak se zpravidla jedná o infekci cizím patogenem. [4]

2.4 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou buňky nediferencované, které samy o sobě nemají žádnou specializaci. Dosahují však vysoké míry proliferace a diferencují do jiných typů buněk. Tuto funkci tělo využívá v prvních stádiích života při vzniku embrya a jeho postupného vývoje do blastocytu. Ten je složen z kmenových buněk ESC, tedy embryonální kmenové buňky. Kmenové buňky v plodu se časem diferencují, do všech typů buněk, které tvoří tkáně a orgány, našeho těla. Kmenové buňky můžeme najít i v tělech dospělých jedinců například v resorpčním epitelu střeva, klku, v kostní dřeni nebo v tukové tkáni. [7]

Největší výhodou kmenových buněk z pohledu regenerativní medicíny je jejich schopnost časově neomezené sebeobnovy, kmenové buňky se totiž mohou neustále opakovaně množit. Díky tomu jsou schopné regenerace poškozených nebo opotřebovaných tkání organismu, protože při vhodných podmínkách a dodaných podnětech, buď námi nebo tělem, všechny rapidně namnožené buňky diferencují do buněk tkáně, kterou je třeba opravit. Kmenové buňky dělíme do několika skupin podle schopnosti diferenciovat do určitých buněčných fenotypů následovně:

- a) Totipotentní – dokáží se diferenciovat do jakéhokoli typu buňky, a navíc zrodit nového jedince, například ESC
- b) Pluripotentní buňky – dokáží se diferenciovat do jakéhokoli typu buňky, ale nedokáží zrodit nového jedince, například PGC
- c) Multipotentní buňky – dokáží se diferenciovat do více typů buněk a jsou více omezeny ve svých schopnostech růstu a diferenciaci, například HSC
- d) Unipotentní buňky – dokáží se diferenciovat pouze do jednoho buněčného typu, například EPC

2.4.1 Diferenciace kmenových buněk

Diferenciace je procesem, při které se kmenové buňky přeměňují na cílový typ finálně diferencovaných buněk v tkáni, jejíž funkci mají za úkol vykonávat. K tomu dochází za pomoci exprese regulátorů transkripce, které se starají o to, aby tvořily jen proteiny ze správné části DNA. Tato exprese může být ovlivněna mnoha okolnostmi. Musíme uvažovat, jako bychom byli v samotné regenerované tkáni a tomu také přizpůsobovat podmínky, kterým buňky vystavujeme in vitro. Těmito podmínkami mohou být například různá složení média, materiál scaffoldu, ze kterého tvoříme podklad pro růst buněk a jeho povrchová úprava, mechanické působení na buňky nebo hustota osazení a typ buněk v okolí nám nasazených kmenových buněk. Tyto faktory ovlivňují, jak dobře se nám podaří in vitro vypěstovat tkáňovou náhradu a klíčová je jejich vzájemná kombinace. V našem výzkumu se budeme zajímat hlavně vlivem materiálu, protože pokud nemáme vhodný materiál pro pěstování buněk, tak buňky nebudou správně proliferovat i v případě splnění jejich ostatních potřeb.

2.4.2 Podmínky pro diferenciaci buněk do kosti

Pokud chceme dosáhnout co nejlepších výsledků u tvorby kostní náhrady in vitro tak musíme naše in vitro prostředí co nejvíce připodobnit podmínkám panujícím v kostech. Dodáním těchto vlastností naší in vitro kultuře podpoříme buňky v diferenciaci do kostí:

- a) Tvrdý podklad – kost je tvrdou tkání a tvrdý podklad buněk bude lépe indukovat kostní diferenciaci
- b) Mineralizace podkladu – kosti obsahují velké množství anorganických minerálů, hlavně hydroxyapatitu. Iontový charakter podkladu by mohl zvýšit diferenciaci.
- c) Mechanické zatížení – pro lepší kostní diferenciaci by bylo dobré vystavit in vitro kulturu mechanickému stlačování, které simuluje tlakovou zátěž při chůzi
- d) Růstové faktory – kultivaci buněk v média, které obsahuje růstové faktory a jiné bioaktivní látky pro indukci osteogenní diferenciaci, jako β -glycerolfosfát, dexamethason a kyselinu L-askorbovou (vitamin C) stimuluje diferenciaci.

2.4.3 Osteogenní markery

Markery jsou takové molekuly, většinou bílkoviny, které jsou specifické pro určitý buněčný typ, a tedy indikují, že v kultuře dochází k diferenciaci. V případě kostí je časným markerem kolagen 1 (COL1A1) a enzym alkalická fosfatáza (ALP). Markery střední části diferenciaci jsou osteokalcin a osteopontin a RUNX, markerem pozdní diferenciaci, tedy částí, kdy se buňka přemění na osteocyt je sclerostin a FGF23 [8]. Tyto markery je možné zvýraznit pomocí barvení, a určit tak míru diferenciaci. Ve svém výzkumu jsem se zaměřil na f-aktin.

2.4.4 F-aktin

Pod zkratkou f-aktin se skládá termín filamentózní aktin, jehož mikrofilamenta tvoří velkou část cytoskeletu, a tedy jejich rozprostření odpovídá tvaru buňky. Jeho obarvení lze použít pro její vizualizaci. F-aktin vzniká polymerací aktinu, což je globulární strukturní protein, hojně se vyskytující v eukaryotických buňkách. Tvoří asi 5 % všech proteinů. Aktin vytváří filamenta polymerací do tvaru dvoušroubovice, jejíž tloušťka se pohybuje okolo 7 nm a délka až několik nm.

2.5 Tkáňové nosiče neboli scaffoldy

Scaffold nahrazuje mimobuněčnou hmotu, která má svůj tvar, strukturu a vlastnosti dané dle toho, jakou tkáň nebo orgán nahrazuje. Pokud je scaffold co nejvíce podobný původní tkáni, může zajistit pro buňky dobrou adhezi, proliferaci a přísun látek.

Jelikož pak na scaffoldu dochází k diferenciaci buněk a scaffold interaguje s buňkami a v budoucnu pak s vnitřním prostředím lidského těla, musí mít ty správné vlastnosti.

První z důležitých vlastností je porozita a interkonektivita pórů, která umožňuje kolonizaci celého scaffoldu, případně vaskularizaci náhrady. Scaffold musí mít správný tvar a rozměry, aby se do něj buňky dostaly v hojném počtu a pronikly do celé struktury.

Dalším důležitým aspektem jsou dobré mechanické vlastnosti, aby scaffold vydržel mechanickou zátěž v lidském těle. Scaffoldy mohou být buď z biologického nebo syntetického materiálu. Scaffold také musí být schopný před použitím přežít svoji sterilizaci, aby nedošlo k infekci buněk.

Scaffoldy musí být biokompatibilní, aby na něm buňky dobře přežívaly. U nahrazování některých tkání musí být scaffold bioinertní. To znamená, že nepodporuje adhezi buněk. Příklady užití bioinertního scaffoldu může být například nahrazení kloubní plochy, nitrooční čočky nebo cévní protézy, které se v současné době používají.

Scaffoldy mohou být buď dvourozměrné nebo třírozměrné. Pro tvorbu náhrad kostních štěpů jsou vhodné třírozměrné. Oproti tomu na dvourozměrných náhradách se může testovat vhodnost materiálu kovových náhrad, jako například kyčle.

Naším cíle je vytvoření náhrady kostního štěpu, tedy třírozměrný scaffold ze syntetického materiálu, který je zároveň biokompatibilní, aby na něm buňky dobře adherovaly, proliferovaly a dlouhodobě přežívaly. Co se mechanických vlastností týče, tak by měl připomínat kost, to

znamená tvrdý a také mineralizovaný, aby simuloval kostní mezibuněčnou hmotu a indukoval tak lépe jejich diferenciaci. Dále by scaffold měl být biodegradabilní, který v těle časem zanikne a je nahrazen vlastními produkty buněk.

Také prostorové uspořádání vláken musí být takové, aby buňky již při nasazení penetrovaly scaffold do hloubky, ale takové, aby se scaffoldem nepropadly. Takovými strukturami by mohly být takzvané žebříčkové struktury, ve kterých vlákna jdou různě přes sebe a struktura se pravidelně opakuje.

2.6 3D tisk

3D tisk neboli aditivní výroba je přírůstkovou neboli inkrementální technologií, která umožňuje výrobu trojdimenzionálních objektů z počítačového modelu po vrstvách. Její historie sahá až do poloviny 80. let, kdy první verze 3D tiskáren vznikaly. Dnes jsou 3D tiskárny rozšířené po celém světě a staly se z nich běžné doplňky vzdělávání či produkce. Právě výroba po vrstvách je největší výhodou poskytovanou 3D tiskem protože nám umožňuje velkou variabilitu produkce, protože pomocí něj můžeme tisknout jakékoli tvary v požadovaných množstvích a nejsme závislí na klasické průmyslové produkci založené na formách a odlitcích. V průmyslu je 3D tisk také hojně využíván pro tvorbu prototypů či vizualizaci staveb a produktů. Počítačové modely je možné tvořit v mnoha různých programech

V našem výzkumu budeme používat 3D tisk k tvorbě scaffoldů, na kterých budeme kmenové buňky pěstovat.

Variabilita tvarů má totiž velký potenciál i v tkáňovém inženýrství, protože potřebujeme vytvořit scaffoldy a kostní náhrady přesně přizpůsobené zvláště každému pacientovi a výroba základů pomocí odlívání by v tomto případě byla zkrátka nemožná.

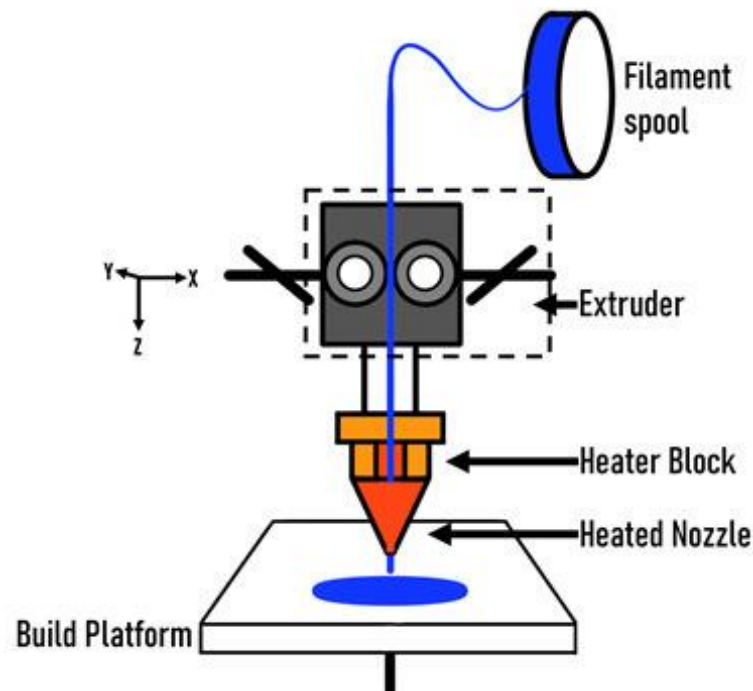
Dalším důležitým parametrem pro použití v tkáňovém inženýrství je jemnost vnitřní struktury scaffoldu. Potřebujeme, aby byla struktura v řádu od jednotek do stovek mikrometrů, protože právě v těchto rozměrech jsou i lidské buňky. Jak jsi i v tomto výzkumu ukážeme, tak i jemnost 3D struktury může významně ovlivnit proliferaci buněk in vitro a významně tak určit výsledek pěstování náhrad.

Škála materiálů, se kterými dokáží 3D tiskárny pracovat a tvořit z nich produkty, v našem případě scaffoldy je velmi široká. Základem jsou polymery a postupně byly vyvinuty i polymery s různými příměsmi. nyní existují již i 3D tiskárny, které dokáží tisknout produkty z různých kovových kompozitů, které se již dnes používají jako kostní náhrady. Tato technologie je velmi drahá. Také již existují i tiskárny, které jsou schopné do určité míry tisknout živou hmotu, odborně se nazývají biotiskárny a fungují na principu vrstvení buněk a dalších komponentů tkání. V našem výzkumu však zůstaneme u použití 3D tisku pro tvorbu scaffoldů a manuálním přidání buněk.

Existuje velké množství variant technologie 3D tisku. Budu se zabývat dvěma druhy 3D tisku, které byly použity v tomto výzkumu.

2.6.1 FDM technologie

FDM neboli fused deposition modeling je technologií 3D tisku při níž dochází k tavení vstupního materiálu, který do tiskárny většinou vstupuje ve formy struny. Roztavený materiál



Obrázek 5: tisk pomocí FDM technologie

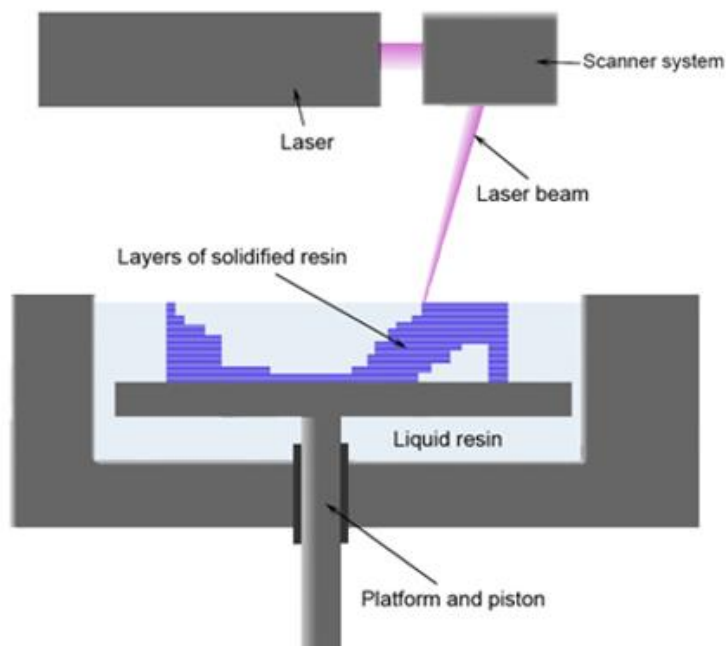
se poté vrství pomocí extruderu, který se pohybuje ve třech osách a postupně po vrstvách z roztavené struny vzniká celý 3D model. Tato technologie byla patentována společností Stratasys v roce 1988 a vypršel v roce 2009, přičemž společnost Stratasys stále vlastní ochrannou známku FDM. [21]

Nejčastějšími materiály, které se používají jsou různé druhy polymerů označované někdy jako termopolymery. Termopolymery se taví při teplotě ~ 200 °C, tato teplota je rozdílná pro různé polymery. Nejčastěji používaným termopolymerem je PLA.

Výhodou FDM tisku je její jednoduchost a dostupná cena. FDM tiskárny jsou nejvíce rozšířeným druhem tiskáren. Její nevýhodou je naopak omezenost tisku jemných struktur a přesnost tisku těchto jemných struktur, protože šířka tištěných vláken je omezena šířkou trysky extruderu. V současné době se používají nejtenčí trysky s průměrem 100 μm . Její zmenšování na desítky mikrometrů je v praxi těžko proveditelné. Tloušťka vrstvy je pak ovlivněna krokem motoru osy, u běžných tiskáren je to nejméně 50 μm .

2.6.2 SLA technologie

Technologie SLA neboli stereolitography byla první vynalezenou technologií 3D tisku. Byla patentována v roce 1986 Američanem Chuckem Hullem. Je to jedna z nejpřesnějších metod 3D tisku [9], protože na rozdíl od FDM tisku vlákno není dané šířkou trysky extruderu, ale laserovým paprskem. SLA tiskárny totiž pracují s takzvaným fotopolymerem (někdy nazýván také pryskyřice) který je v kapalném skupenství v nádobě tisku. Nádoba je ozařována laserem a v místě podložky, kam laserový paprsek dopadne, se díky fotochemickým procesům řetězce fotopolymeru začínají spojovat a dají tak vzniknout pevné látce. Laser poté vysvítí všechna místa podle 3D modelu než se přesune na další vrstvu. Její tloušťka běžně bývá až 25 μm .



Obrázek 6: tisk pomocí SLA technologie

Výhodou SLA tisku proti FDM tisku je mnohem vyšší přesnost, menší textury a více detailů.

Máme několik druhů fotopolymerů, a to buď na základě:

- a) Akrylátů – starší, méně přesné, smrštivé
- b) Epoxidů – novější přesnější, nesmrštivé

Fotopolymery se obecně skládají ze tří složek a to pojiva, kterých je v médiu asi 50-80 %. Monomery se vážou s dalšími monomery a s pojivem. Poslední složkou jsou fotoiniciátory, které vážou všechny tři složky dohromady.

Počet materiálů, které je možné pro SLA tisk použít je mnohem menší, protože materiály musí mít polymerní vlastnosti. Hlavními druhy fotopolymerů jsou:

- a) Standartní – jsou velmi tuhé a hladké, barva ovlivňuje výsledné vlastnosti
- b) Technické – vysoká houževnatost a pevnost v tahu, tepelně stabilní, odolné proti opotřebení
- c) Biokompatibilní – pro náš výzkum asi nejzajímavější kategorie. Dnes se používají jako chirurgické pomůcky a přístroje v zubním lékařství. Jsou také pro vývoj scaffoldů pro tkáňové inženýrství perspektivní díky biokompatibilním vlastnostem.

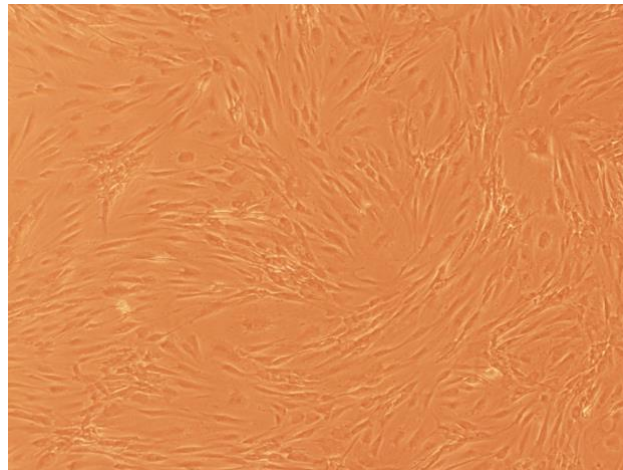
3 Materiály a metody

3.1 Buňky

K pokusům jsme používali kmenové buňky ASC odebrané z lidské tukové tkáně na oddělení plastické chirurgie v nemocnici Bulovka a z odebraného tuku byly izolovány ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Během pokusu jsme pracovali s 2. pasáží buněk ASC. Před pokusem byly buňky kultivovány na polystyrenovém podkladu v Eaglově minimálním esenciálním médiu Dulbeccem (DMEM, Sigma, USA) obohaceném o 10% fetálního hovězího séra (FS)(Sebak GmbH, Aidenbach, Germany).

Buňky ASC jsme pro výzkum vybrali, protože jsou ideální pro účely regenerativní medicíny. [10] Jsou excelentní, co se týče vlastností proliferace, diferenciací do kostní (i dalších typů buněk) a imunoregulačních vlastností. Jsou také velmi vhodné, protože se je jednoduché je získávat ve velkých množstvích například při liposukci.

Obecné vlastnosti buněk ASC se liší podle dárce. Buňky ASC odebrané z lidí trpící jsou více náchylné k vyvolání imunitní reakce v těle pacienta. Vhodnost buněk ASC pro použití in vivo se tedy může lišit. po izolaci z tukové tkáně byly stanoveny průtokovou cytometrií povrchové markery buněk, např. CD105, 90, 73, 29, 146, 45, 31 and 34. Metoda izolace a charakterizace



Obrázek 7: buňky ASC kultivované na polystyrenu, Olympus IX71, 10x zvětšení

námi použitých buněk je popsána v článku [X, Molitor, Trávníčková, Review, 2021]. O morfologii buněk lze říci, že jsou to drobnější buňky podlouhlého tvaru.

3.2 Scaffoldy

Scaffoldy neboli tkáňové nosiče, jsou trojrozměrnou strukturou z biologického nebo syntetického materiálu, které slouží kultivaci buněk. V našem výzkumu jsou scaffoldy předmětem hodnocení. Budeme hodnotit, jak dobře buňky na scaffoldy reagují a jak dobře na nich rostou. Ideální scaffoldem by měl být z biokompatibilního materiálu, aby na něm buňky

dlouhodobě přežívaly, měl by být mineralizovaný, aby buňkám připomínal kost a indukovala tak lépe jejich diferenciaci. Dále by scaffold může být biodegradabilní, který v těle časem zanikne a je nahrazen vlastními produkty buněk. Struktura scaffoldu může být vláknitá. Pak by se měla skládat z tenkých vláken, vhodně vzdálených, aby do nitra scaffoldu proniklo co nejvíce buněk, zároveň dost širokých na to, aby na vlákna mohly buňky bez problémů adhedovat. Podobně pro mezery mezi vlákny platí, že musí být dost malé na to, aby jich bylo co nejvíce a vytvořili tak dostatečně pórovitou strukturu s co největším povrchem a buňkami blízko sebe, ale zase ne příliš malé, aby se buňky nedostaly dovnitř.

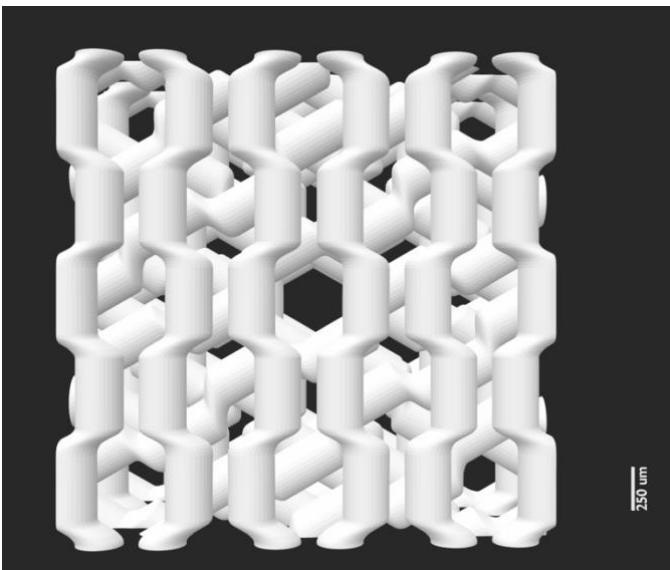
V našem výzkumu jsme testovali 3 základní druhy scaffoldů, tato označení jsme používali při práci s nimi, abychom je od sebe vzájemně odlišili

- a) Printy
- b) Plástve
- c) Pryskyřice

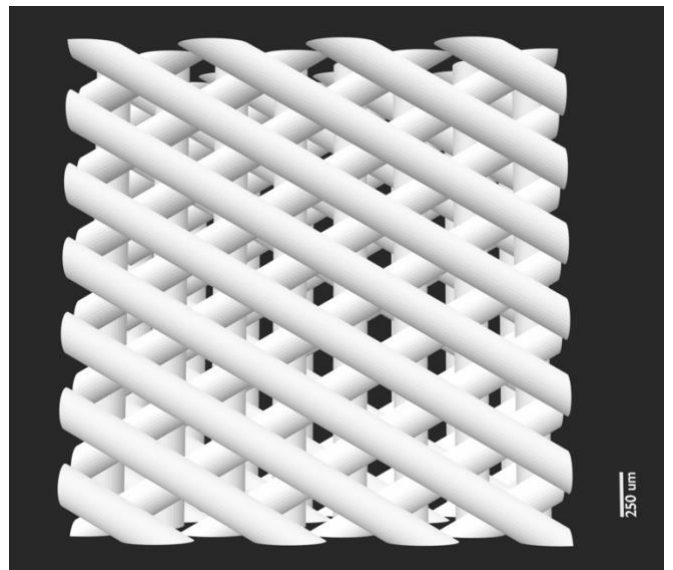
3.2.1 Printy

Printy jsou scaffoldy, které byly vytvořeny na Výzkumném ústavu potravinářském v Praze. Byly vytištěny na 3D tiskárně s FDM technologií a použitým materiálem byla směs polymerů PLA a PCL v poměru 3:5. Tyto polymery byly vybrány pro svou schopnost biodegradability. PLA je navíc jedním z nejhojněji využívaných polymerů v FDM 3D tisku. Oba (zejména PLA [11]) navíc vykazují skvělé vlastnosti, co se biokompatibility týče. PCL oplývá vlastnostmi odolnosti, proti mechanickým, chemickým a biologickým vlivům. Jejich vlastnostmi tak dohromady vzniká skvělá kombinace pro využití v tkáňovém inženýrství.[12]

Cílem výzkumu bude výběr vhodných parametrů šířky vlákna jejich mezer. Tým Švorčíka dodal 10 typů printů s různými šířkami vláken a mezer. Printy měly vnitřní strukturu buď ve tvaru rectilinear (rovná vlákna), nebo honeycomb (vlákna do tvaru včelí plástve).



Obrázek 9: vizualizace struktury honeycomb 8



Obrázek 8: vizualice struktury rectilinear 2

Seznam typů struktur:

01. - struktura rectilinear, šířka vlákna 0.20mm, šířka mezery 0.20mm
02. - struktura rectilinear, šířka vlákna 0.20mm, šířka mezery 0.16mm
03. - struktura honeycomb, šířka vlákna 0.20mm, šířka mezery 0.08mm
04. - struktura honeycomb, šířka vlákna 0.20mm, šířka mezery 0.04mm
05. - struktura honeycomb, šířka vlákna 0.20mm, šířka mezery 0.00mm
06. - struktura rectilinear, šířka vlákna 0.24mm, šířka mezery 0.20mm
07. - struktura rectilinear, šířka vlákna 0.24mm, šířka mezery 0.16mm
08. - struktura honeycomb, šířka vlákna 0.24mm, šířka mezery 0.08mm
09. - struktura honeycomb, šířka vlákna 0.24mm, šířka mezery 0.04mm
10. - struktura honeycomb, šířka vlákna 0.24mm, šířka mezery 0.00mm

Naše hypotéza byla taková, že nejlépe osídleny budou typy se šířkou vlákna 200 um a velikostí mezery 80 um, tedy typ 3. Mysleli jsme si, že to bude nejlepší poměr mezery a vlákna a buňky budou dobře adhedovat a zároveň pronikat dovnitř.

3.2.2 Plástve

Na rozdíl od printů a pryskyřic nemají plástve trojdimenzionální strukturu. Mají pouze dvě prostorové vrstvy, které buňky mohou kolonizovat. Jsou vyrobené na VŠCHT Praha a jejich struktura předmětem právě podávaného patentu. Plástve jsou vyrobeny opět z PLA. Materiál je tedy opět biokompatibilní. Cílem tohoto pokusu není otestovat biokompatibilitu materiálu ani vnitřní strukturu, ale možnost radiace jako povrchové úpravy. Tým, který plástve vyráběl jej ozařoval pomocí laserové expozice. Laserový tok při této expozici byl 10 mJ/cm². Expozice byla prováděna v pulsech o frekvenci 10 Hz. Jednotlivé typy pláství se lišily množstvím pulsů a podle, plástve jsme měli označené podle tohoto počtu. Pracovali jsme s plástvemi exponovanými počtu pulsů 0, 500 a 1000. Plazmatická modifikace FEP substrátu probíhala při 8 W po dobu 240 s a tlaku pracovního plynu Ar 10 Pa.

Tato povrchová úprava zdrsňuje povrch scaffoldu a zvětšuje tak jeho celkový obsah. Tím by se podle naší hypotézy zlepšila buněčná adheze a jejich celková proliferace.

3.2.3 Pryskyřice

Třetím typem testovaných scaffoldů byly pryskyřice. Autorem nápadu na jejich vytvoření a poté jejich provedení je autor této práce SOČ. Pryskyřice jsem vyrobil na SLA tiskárně Formlabs 3 v laboratoři Protolab pod vedením Ing. Jiřího Hajnyše, PhD., která je sponzorována Vysokou školou Báňskou v Ostravě. Počítačový model pro tvorbu pryskyřic jsem vypracoval v programu Blender. Výhodou pryskyřic je, že mají šířku vlákna a mezery 100 um, což je výhoda proti printům, kde je šířka vlákna větší. Struktura pryskyřic je žebříčková, vlákna jsou uspořádána tak, že buňky mohou projít do prvních 6 vrstev a pak se zaseknou, dokud tyto vrstvy nejsou zcela kolonizovány, teprve potom mohou scaffold penetrovat dále.

Samotná tvorba pryskyřic byla sama o sobě malým výzkumem, protože jsem musel po namodelování scaffoldu určit vhodnou nejmenší šířku vláken a mezery. Dost malé, aby byly

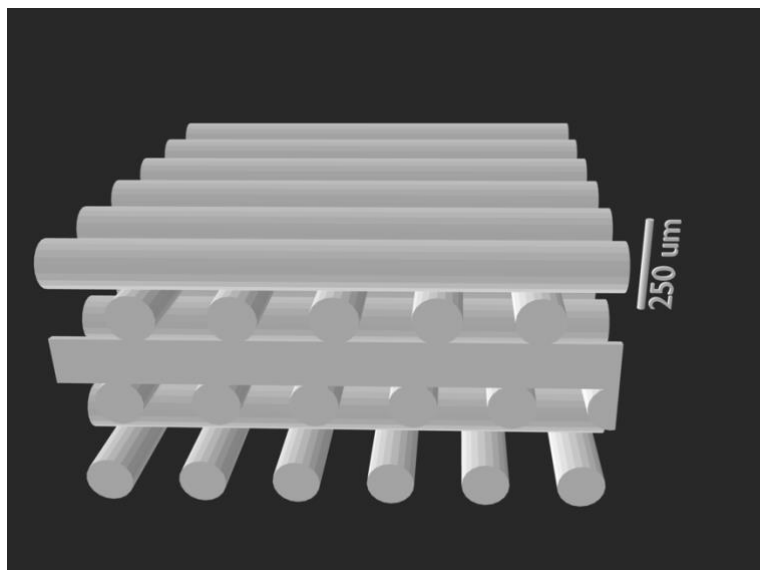
scaffolds pro výzkum, ale zároveň dost velké, aby je totiž zvládla tiskárna Formlabs 3 vytisknout. Při příliš malé velikosti vlákna totiž dojde ke poruše tisku a vytvořené scaffolds jsou nepoužitelné. Tiskárna má totiž minimální krok v ose Z 25 μm , což znemožňuje tisknout struktury menší než tento rozměr. K chybovosti však docházelo i u struktur menší než 100 μm . Pracovat jsem i s úpravou parametrů tiskárny, aby došlo k co nejvyšší úspěšnosti tisku.

Po vytištění se musely scaffolds ve speciálním roztoku, který výtisk zbavil nepolymerovaného resinu a poté ošetřit UV zářením a teplotou 60 $^{\circ}\text{C}$ na 10 minut.

Po vytištění na SLA tiskárně a převezení na FgÚ byly pryskyřice vysterylizovány UV zářením ve sterilním boxu, aby došlo k prevenci infekce kultivovaných buněk.

Materiál je v případě pryskyřic poměrně problémový, protože fotopolymer, který jsem během práce s tiskárnou Formlabs 3 používal spadá do fotopolymerů kategorie a), tedy standardní nebiokompatibilní, společnost Formlabs, která vyrábí tiskárny i polymery, na výrobu fotopolymerů používá zřejmě nějakou směs akrylátů, jenomže přesné složení není dostupné veřejnosti, protože se jedná průmyslové tajemství společnosti Formlabs. Akryláty nejsou vhodné pro styk se živými organismy.

Rozhodli jsme se pryskyřice otestovat i přes nebiokompatibilitu fotopolymeru, protože v rámci dalšího výzkumu přemýšlíme o koupi biokompatibilního fotopolymeru. Tím, že se bude jednat o látky se stejným základem, že pokud buňky budou proliferovat na nebiokompatibilním polymeru společnosti Formlabs, tak budou určitě proliferovat na tom biokompatibilním.



Obrázek 10: vizualizace žebříčkové 3D struktury pryskyřice

Tento pokus tedy měl sloužit jako zkouška materiálu a SLA technologie, která měla určit, jestli se touto technologií zajímat dále. SLA technologie by pro náš výzkum byla potenciálně vhodná z důvodu jemnější struktury scaffoldu, než jakou poskytují FDM.

3.3 Kultivace buněk ve statickém prostředí

Buňky jsou během pokusu buněk kultivovány v takzvaném statickém prostředí. Je to prostředí, ve kterém cirkulace média neprobíhá samovolně. Vzorky také nejsou vystaveny žádnému mechanickému vlivu. Diferenciaci je tedy iniciována složením média a vlastnostmi podkladu.

Buňky jsou kultivovány v termostatu Thermoforma 321 od společnosti ThermoFischer Inc. za teploty 37 °C, pH 7,4 při 5% koncentraci CO₂. Na každý vzorek bylo použito 10 ml média DMEM, dále 3 ml 10% fetálního séra a také 2 ml růstového faktoru FGF 2. Gen FGF 2 brání buněčné smrti a podporuje proliferaci a angiogenezi.

K výměně média dochází každé 3 dny, kdy se vymění polovina média. Buňky jsou kultivovány v jamkových nádobách.

3.3.1 Počítání buněk před nasazením

Před samotným nasazením je počet buněk potřeba určit pomocí takzvaného cell counteru, který nám určí, s kolika buňkami v daném pokusu pracujeme a kolik buněk použijeme na každou jamku v jamkové nádobě. Pracujeme se cell counterem Vi-Cell XR od společnosti Beckman counter.

Z původní suspenze buněk odebereme 0,5 ml, které vložíme do cell counteru. Pomocí průměrné hustoty buněk na mililitr spočítáme celkový počet zbytku buněk, které po centrifugaci 500 G na 5 minut doplníme do požadovaného objemu a můžeme nasadit. Centrifugace se používá pro snížení nasazovaného objemu na scaffoldy a jeho správné dělitelnosti mezi počet jamek se scaffoldy. Centrifugu také používáme, abychom se ujistili, že použijeme všechny buňky z původního vzorku. Dalším krokem je nasazení.

3.3.2 Nasazování buněk na scaffoldy

Samotný pokus zahajujeme nasazením buněk na testované scaffoldy, které také sterilně umístíme do jamkových nádob. Veškerá práce s buňkami musí probíhat ve sterilním prostředí, aby nedošlo k infekci buněk patogeny nebo zanesení vzorku nečistotami. My pracujeme ve sterilním boxu ESCO AC 2, který zajišťuje laminární proudění mezi vnějším a vnitřním chráněnou zónou a zabraňuje tak vniknutí infekce do vnitřní části boxu.

Buňky nanášíme na scaffoldy pomocí pipety tak, aby došlo k jejich rovnoměrnému rozprostření na celý povrch scaffoldu, aby nedošlo ke zkreslení výsledků v případě, že by v jednom místě scaffoldu došlo k přehučení buněk.

3.4 Barvení buněk

První z metod vyhodnocování kvality proliferace buněk je jejich barvení neboli vizualizace a následné hodnocení růstu buněk jako určení a porovnání počtu buněk v jednotlivých fázích růstu, a to nejjednodušeji stanovením počtu jejich jader po obarvení vhodným barvivem. Po vizualizaci celých buněk pomocí barvení vhodného proteinu, např. specifického markeru, můžeme určit morfologii buňky, případně stupeň její adheze k podkladu, nebo stupeň diferenciace do určitého buněčného typu. Vizualizaci v podstatě zvýrazňujeme požadované

látky v buňce a poté sledujeme pod mikroskopem. Barvy, se kterými pracujeme musí být rozsvíceny paprsky z mikroskopu a poté začnou vyzařovat signál zachytitelný mikroskopem. Pracujeme s dvěma typy barev, fluorescenční a imunofluorescenční. Dalším typem barvy jsou barvy protilátkové.

Všechny tyto typy fungují na podobném principu. Jedna část molekuly barviva se naváže na cílovou molekulu, kterou chceme zvýraznit. Druhá část molekuly je schopná excitovat při určité vlnové délce dopadajícího záření, v našem případě laseru z mikroskopu. Poté barvivo emituje záření viditelné v mikroskopu.

Před barvením je potřeba si vzorek s buňkami vhodně připravit.

3.4.1 Fixace buněk

Fixace buněk je metodou dočasné konzervace vzorku po buněčné kultivaci. Při buněčné fixaci dojde k perforaci buněčné membrány, dehydrataci a usmrcení všech buněk ve vzorku. Vzorek dále může být uskladněn v lednici. Pro fixaci se běžně používá buď 70% ethanol nebo 4% formaldehyd.

V případě fixace ethanolem na buňky po promytí PBS nalijeme ledový ethanol, vzorek dáme do mrazáku a necháme ethanol působit 10 minut. Ethanol má navíc tu vlastnost, že zvládne permeabilizovat membránu, což je pro barvení nezbytné, neboť aby mohly barvy zvýraznit struktury v buňce, musí se do buňky nějak dostat. K tomu slouží drobné díry v cytoplazmatické membráně vzniklé permeabilizací. Po 10 minutách působení ethanol odsajeme a promyjeme PBS, ve kterém buňky můžeme uložit do lednice.

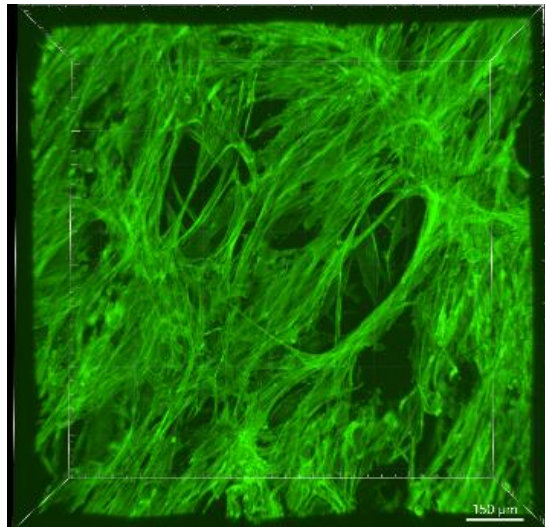
Fixace formaldehydem probíhá v pokojové teplotě po dobu 20 minut. Před následné barvení kompartmentů buňky je však nutné permeabilizovat membránu. K čemuž nám může posloužit dvojice detergentů: 1% triton, 1% albumín a 1% tween. Tyto detergenty vytvářejí drobné díry v cytoplazmatické membráně, aby se dovnitř mohly dostat barvy. První přidáme triton s albumínem a necháme působit 20 minut. Po odsátí tritonu a albumínu ještě na 20 minut přidáme tween, který opět necháme působit 20 minut. I po tomto kroku vzorek pročistíme PBS.

Vzorky jsou nyní připraveny na barvení.

3.4.2 Faloidin

Faloidin je cyklický heptapeptid patřící do skupiny falotoxinů. Je jedem, který se v přírodě vyskytuje v prudce jedovatých houbách, muchomůrce zelené a muchomůrce jízlivé. Jeho jedovaté vlastnosti z něj dělají výborné barvivo. Váže se totiž na cytoskelet tvořený aktinovými filamenty, konkrétně f-aktinem. Faloidin je spojen s fluorescenčním barvivem TRITC, které pak září při osvětlení pod mikroskopem. K excitaci barviva TRITC dochází při vlnové délce záření 540 nm. Emitováno je pak záření o vlnové délce 565 nm. [14]

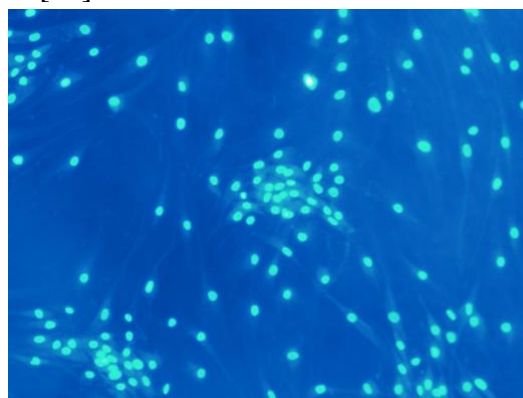
Faloidin ředíme v poměru 1:400 a na vzorku jej necháme působit 60 minut za pokojové teploty [13].



Obrázek 11: příklad barvení f-aktinu faloidinem

3.4.3 Hoechst 33258

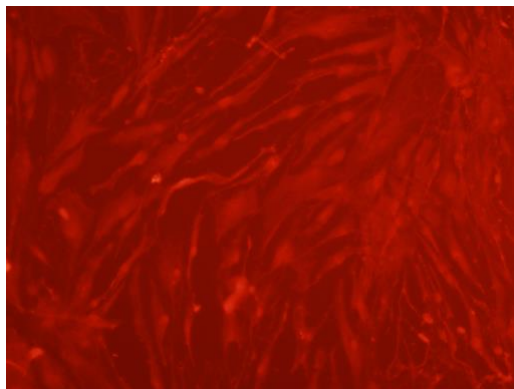
Hoechst 33258 je často používaným barvivem k zobrazení jader buněk ve vzorku. Toto barvivo se váže na nukleové kyseliny. Excituje při dopadu záření o vlnové délce 352 nm a emituje záření o vlnové délce 461 nm [15]. Pokud je navázána na dsDNA, tak vyzařuje fluorescenční modrou. Hoechst 33258 je barvivo na základě bisbenzimidů, váží se nejlépe do nukleových kyselin, která jsou deoxyribonukleové, tedy DNA, na nich sedají do drobných žlábků zejména do míst bohatých na nukleotidy adenin a thymin. Hoechst 33258 se dokáže vázat i na ostatní nukleové kyseliny, ale září hůře. [16]



Obrázek 12: příklad barvení jader barvivem Hoechst 33258

3.4.4 Texas red

Texas red je jasné červeně fluorescenční barvivo, které se používá k vizualizaci celé stavby buněk, protože se váže na bílkoviny a protilátky, které jsou přítomny na povrchu buňky. Excituje při dopadu záření o vlnové délce 596 nm a emituje záření o vlnové délce 615 nm.[22] Chemicky se jedná o látku sulforhodamine, která se na bílkoviny váže pomocí skupiny SO_2Cl .



Obrázek 13: příklad barvení Texas red

3.5 Fotografování buněk

K fotografování obarvených buněk používáme dva mikroskopy. Buď Olympus IX71 nebo Dragonfly 503.

3.5.1 Stanovení počtu buněk

Stanovení počtu buněk se na každém vzorku můžeme pomocí počítání jader na snímcích, pořízených na mikroskopu IX71, metodou zorných polí. Jde o opakované fotografování jednoho vzorku na různých náhodných místech tak, abychom se přiblížili průměrnému zahuštění buněk na ploše.

Vyhodnocovat růst buněk na plástvích a pryskyřicích budeme z mikrofotografií pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX71.

Olympus IX71 je klasický invertovaný fluorescenční mikroskop.

Tuto metodu lze aplikovat pouze na podklady, na kterých buňky rostou pouze v jedné rovině. U pláství fotografujeme buňky ve dvou rovinách, což znamená, že součet provedeme po přeostrění po prvním součtu podruhé. V našem případě jde o plástve.

Pro počítání buněk je nejlepší nabarvit buněčná jádra např. barvivem Hoechst 33258, protože na každou buňku ASC připadá jedno jádro. Takto vizualizovaná jádra jsou oválná.

Ze snímků zjistíme počty buněk buď ručním sčítáním, nebo za pomoci počítačů buněk, v našem případě programu ImageJ, ve kterém můžeme upravit barevné hladiny fotografie na černou (pozadí) a bílou (jádra buněk, ze kterých nám vzniknou tečky). Program ImageJ pak dokáže

tyto bílé tečky spočítat a určit tak součty buněk v jednotlivých fotografiích. Klíčovým údajem je pro nás pak průměrný počet buněk na snímcích z jednoho vzorku.

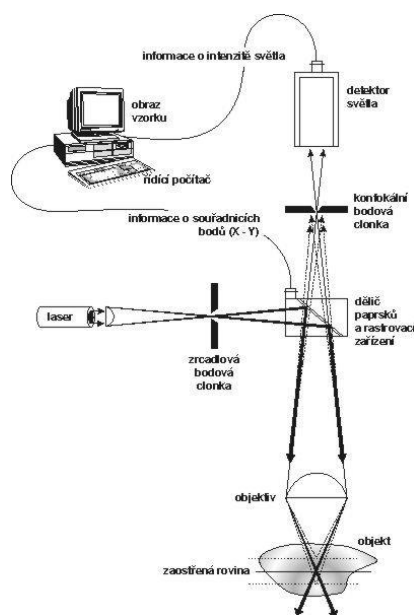
Pojmem, se kterým se v buněčném výzkumu často setkáváme je tzv. růstová křivka, která popisuje vývoj počtu buněk v buněčných kulturách. Časový průběh růstu dělí na 4 fáze:

1. Lag fáze – buňky se adaptují na nové prostředí a nedochází k výrazným růstům počtu.
2. Log fáze – buňky se intenzivně množí, generační doba je nejkratší a populace exponenciálně roste.
3. Stacionární fáze – dochází k ní při vyčerpání živin z média a nedostatku prostoru k růstu. Vzniká stav rovnováhy, kdy se počet buněk zhruba nemění.
4. Fáze odumírání – v této fázi dochází k odumírání buněk a populace se zmenšuje

Během našich pokusů se na exponenciální křivce na grafech dostáváme do stacionární fáze. Fáze odumírání není u našich vzorků pozorována.

3.5.2 Sledování kolonizace scaffoldu pomocí mikroskopu Dragonfly 503

Dragonfly 503 je konfokálním mikroskopem, který se svou funkcí zásadně liší od mikroskopu Olympus IX71. Dokáže totiž snímat i hlubší vrstvy ve vzorku a z fotografií jednotlivých vrstev je schopen složit 3D snímek zkoumaného vzorku. Tato možnost představuje zásadní výhodu, neboť nám umožňuje udělat si lepší obraz o kolonizaci trojrozměrného scaffoldu buňkami a můžeme tak lépe porovnávat výsledky jednotlivých scaffoldů.



Obrázek 14: schéma konfokálního mikroskopu

Konfokální mikroskop je druh optického mikroskopu, který má vyšší rozlišovací schopnost danou detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Dragonfly 503 je konfokálním mikroskopem rastrovacího typu, který netvoří obraz najednou, ale bod po bodu a pak takzvaným řádkováním. [17]

Princip jeho fungování je následující: laserový paprsek prochází přes clonku a objektiv na vzorek, odkud se odrazí a prochází zpátky a je lokalizován na fotonásobič, kde je umístěna druhá konfokální clonka, která filtruje světlo pocházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Výhodou rastrování je přesnější kvantitativní měření.

Pomocí konfokálního mikroskopu Dragonfly 503 budeme vyhodnocovat růst buněk na printech.

3.6 MTS test

MTS test nám slouží k určení celkové metabolické aktivity buněk. Je založen na změně barvy při metabolizování látek. Metabolické testy obecně slouží k měření výsledků buněčné proliferace, testování cytotoxických účinků látek a odhadnutí celkového počtu buněk ve vzorku. Mohou se také používat pro měření vázání receptorů, expresi genetických reportérů, přenosu komponentů buňky. Nebo kontrola buněčných organel.

MTS testování funguje na bázi tetrazolinové redukce [18], molekula tetrazolea (MTS) je přitom záporně nabitá, nepřípravená na proniknutí do buňky a spoléhající na přenos elektronu za pomoci zprostředkovávajícího akceptoru elektronu, který je schopný elektron přenést z cytoplazmy a spouští tak redukci tetrazolia do výsledného barevného produktu formazanu.

MTS patří mezi vylepšené reagenty, například oproti staršímu typu testu MTT, který přináší méně přesné výsledky. K MTS testu navíc nepotřebujeme druhou dávku reagentu, což dělá práci s MTS testy mnohem pohodlnější. Negativní náboj formazanu, které přispívají v rozpustnosti média navíc zřejmě omezují propustnost tetrazolea do buněk. Tetrazoleové reagenty jsou v MTS testu použity dohromady v kombinaci se zprostředkujícími reagenty, které jsou akceptory elektronů, zejména se jedná phenazin methyl sulfát (PMS) phenazin ethyl sulfát (PES), které proniknou do živých buněk, v cytoplasmě nebo na povrchu buněk dojde k jejich redukci a poté buňky opustí, kde přemění tetrazoleum na výsledný formazanový produkt.

Obecně se je možno tvrdit, že tyto tetrazoleové sloučeniny se používají při koncentraci 2 mg/ml, protože nejsou tak rozpustné jako v případě MTT. Tato koncentrace se může v různých komerčně prodávaných sadách lišit. V našem pokusu jsme použili sadu od společnosti:

Použití MTS testu spočívá v následujících krocích: do jamek s médiem, kde buňky na scaffoldech kultivujeme přidáme 20 ul roztoku tetrazolea obsahující phenazin ethyl sulfát. Pak plato s buňkami a tetrazoleem přesuneme do termostatu, kde jej necháme kultivovat jednu až čtyři hodiny při teplotě 37 °C.

Metabolizování tetrazolea probíhá po tyto následující až čtyři hodiny. Během nich bude postupně docházet k výrazné změně barvy, na kterou si musíme dávat pozor. V určité chvíli se totiž barva změní velmi výrazně do hněda za krátký časový úsek. To je přesně ta chvíle, kdy je načase metabolizaci ukončit a plato umístit do přístroje pro vyhodnocení výsledků.

Do přístroje, který vyhodnocuje MTS test, musíme média vložit v 96-jamkovém platu. Do každé jamky pipetou nalijeme 20 ul média z testovaných vzorků. Přičemž vzorky z původního platu můžou být v několika jamkách a výsledkem hodnocení původní jamky bude průměr výsledků menších jamek. Celé 96-jamkové musíme popsát, ať se pak ve výsledcích vyznáme.

V přístroji dochází k ozáření média zářením o vlnové délce 490 nm. Čím více záření je absorbováno, tím je vyšší koncentrace formazanu, který je důsledkem buněčné aktivity a tím je větší samotná metabolická aktivita buněk a tedy proliferace a další aspekty buněčného fungování, které se pomocí testu snažíme dokázat.

Během testu MTS bychom měli brát v potaz možnou redukci tetrazolea materiálem scaffoldu. Pokud by k takové redukci došlo, tak bychom měli značně zkreslené výsledky, neboť bychom z MTS testu měli pouze údaje o reakci materiálu a tetrazolea. V případě, že bychom si to neuvědomili a proliferace buněk na tomto scaffoldu by nedosahovala příliš vysoké míry, tak nás výsledek tohoto špatně provedeného MTS testu mohl svést na scestí a my bychom mohli pracovat s chybnými úvahami a vynášet nepravdivé závěry.

Do MTS testu totiž musíme vždy přidat i takzvanou negativní kontrolu, totiž médium s tetrazoleem, které přišlo do kontaktu pouze se scaffoldem bez buněk. Tím, že máme tuto kontrolu, kterou necháme také vyhodnotit v přístroji na MTS testy, tak si můžeme být jistí, že máme správné výsledky a vytvářet podložené domněnky.

Tuto negativní kontrolu poté odečteme od výsledků u buněk a získáme výslednou hodnotu míry metabolizace.

Metodu MTS test jsme použili pro vyhodnocování růstu buněk na pryskyřicích a na plástvích. Vybrali jsme ji z toho důvodu, protože umožňuje přesně určit, jak dobře buňky na daném typu podkladu proliferují.

4 Výsledky a diskuse

Pomocí dříve popsaných metod jsme úspěšně došli k závěrům a podařilo se nám úspěšně vyhodnotit vhodnost každého z testovaných podkladů.

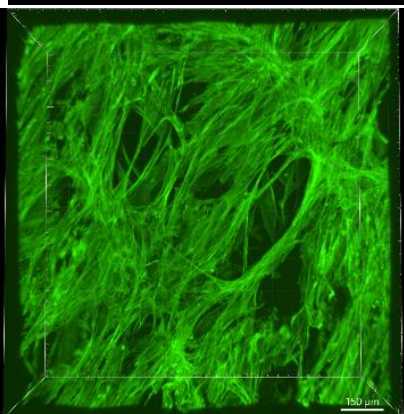
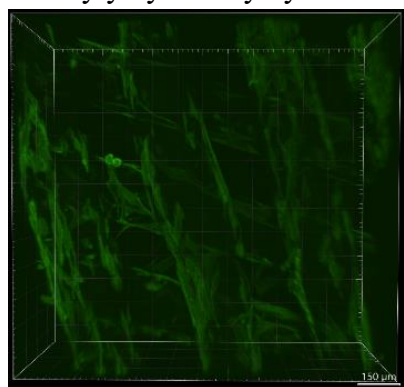
4.1 Růst buněk na printech

Naším cílem bylo otestovat 10 typů printů a vybrat z nich pro další výzkum tři, na kterých se buňkám nejlépe daří.

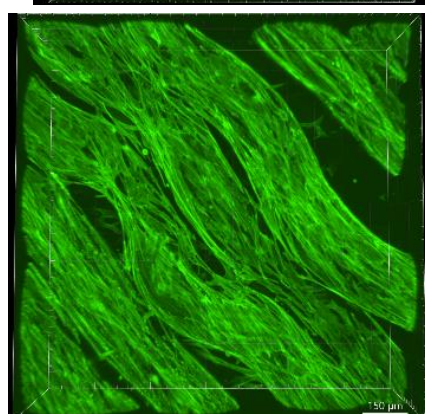
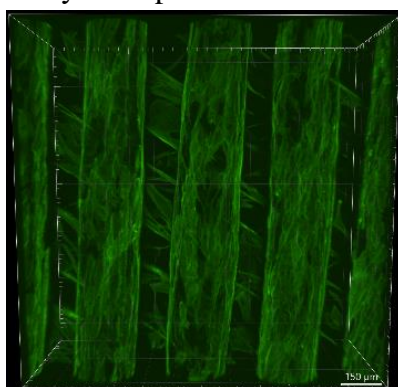
Printy testovali pomocí buněk ASC, po nasazení byli kultivováni v termostatu. Printy jsme fixovali a barvili v den 10. Použitým barvivem byl faloidin, pomocí kterého jsme zvýraznili f-aktin jako předčasný marker diferenciaci. Cílem je vybrat 3 nejlepší struktury pro další použití ve výzkumu, tj. takové struktury se správným poměrem tloušťky vlákna a mezery, aby jej buňky dobře kolonizovaly.

Pomocí hustoty a vývoje aktinu je možné určit kvalitu růstu buněk, průnik buněk do scaffoldu a také srovnání mezi 10 typy použitých vzorků. Struktury f-aktinu nabarvené faloidinem jsme zkoumali pomocí konfokálního mikroskopu Dragonfly 503, který nám umožňuje struktury f-aktinu na printech zobrazit jako 3D obraz a my tak můžeme lépe vyhodnotit výsledky. Tyto 3D obrazy však není možné ukázat v rámci této práce, protože jejich zobrazení samotné vyžaduje velký výpočetní výkon a není jej možné ukázat v dokumentu.

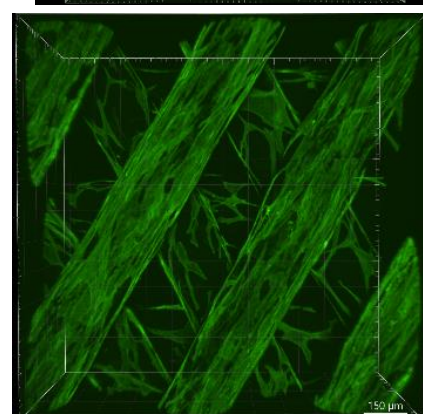
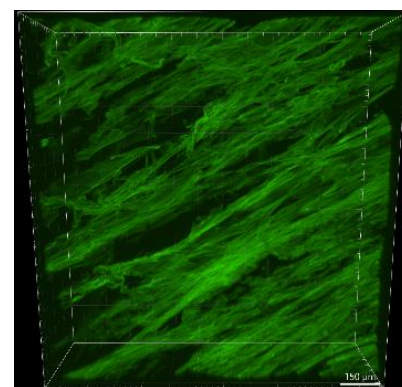
Můžeme se však zaměřit na jednotlivé 2D snímky, které zobrazují horní povrch printu. Snímky byly vytvořeny vyfocením horní strany z 3D pohledu.



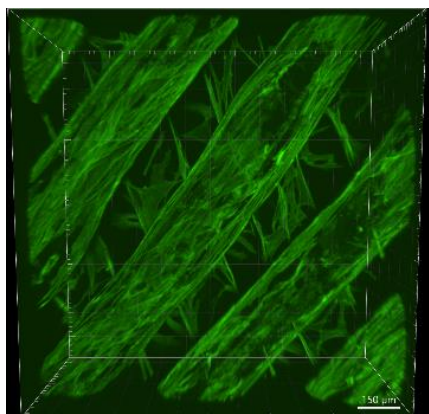
Obrázek 15: print 4, 10x zvětšení



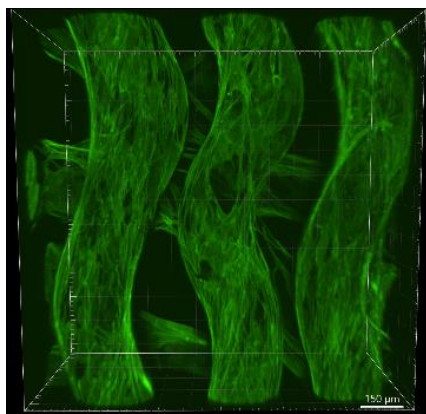
Obrázek 17: print 5, 10x zvětšení



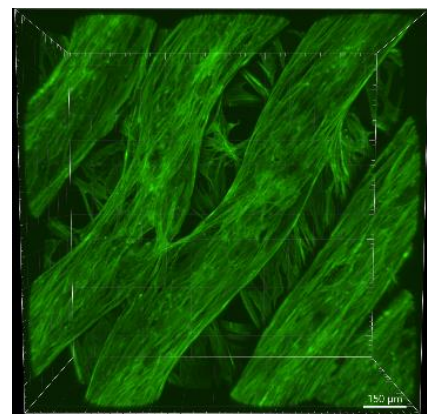
Obrázek 18: print 6, 10x zvětšení



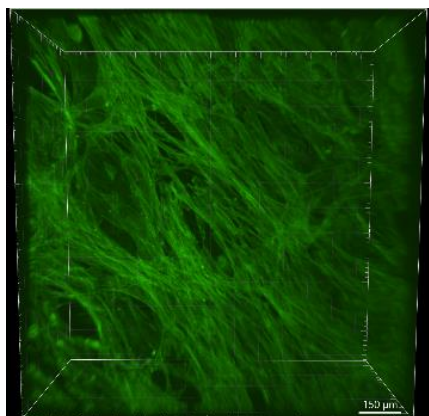
Obrázek 24: print 7, 10x zvětšení



Obrázek 22: print 8, 10x zvětšení



Obrázek 23: print 9, 10x zvětšení



Obrázek 21: print 10, 10x zvětšení

Pracujeme nyní s úvahou, že proliferace buněk je přímo ovlivněna strukturou printu.

Nyní se podíváme na hodnocení růstu na jednotlivých printech.

Print 1 – podle hustoty aktinových vláken je zřejmé, že zde buňky kolonizovaly scaffold slabě. Mezera je u tohoto typu velmi velká, je možné, že buňky propadly příliš dovnitř a nebyly schopny vytvořit souvislou vrstvu a tím pádem úspěšnou kolonii.

Print 2 – na tomto typu jsou buňky narostlé ideálně, pokrývají totiž rovnoměrně všechna vlákna a pronikají dovnitř, což je také dobře vidět na samotném snímku 3D struktury.

Print 3 – buňky jsou zde podobně dobře narostlé, jako na typu 2. Dobře je to opět vidět na 3D snímku. U těchto dvou typů jsou v dobrém poměru rozměry vláken a mezery.

Print 4 – buňky u tohoto typu printu nekolonizovaly strukturu dostatečně do hloubky.

Print 5 – tento print je podobný printu 4, buňky u tohoto typu printu nekolonizovaly strukturu dostatečně do hloubky.

Print 6 – na tomto printu je kolonizace buňkami příliš řídká. Tento print má zase velkou mezeru. Buňky se nejspíše dostaly příliš hluboko a rychle dovnitř a nedokázaly vytvořit souvislou vrstvu.

Print 7 – tento typ vypadá z pohledu výsledků podobně velmi dobře jako printy 2 a 3.

Print 8 – tento typ je prvním typem s honeycomb tvarem, který má uspokojivé výsledky. Buňky velmi dobře porůstají jeho povrch a jsou v několika vrstvách.

Print 9 – Buňky na tomto typu mají tendenci hustěji růst na povrchu printu a nepronikají dovnitř.

Print 10 – Buňky se dostaly pouze do prvních dvou vrstev a vůbec ne hlouběji, nekolonizují do hloubky.

4.1.1 Vyhodnocení růstu buněk na printech

Sledovali jsme morfologii buněk, schopnost vytvořit souvislý povrch a kolonizaci nitra scaffoldu. Podle výsledků ze snímků jsme se rozhodli vybrat pro další výzkum typy printů 2, 3 a 8. Buňky na těchto typech splňují nejlépe stanovené požadavky. To znamená, že buňky na nich tvoří souvislou vrstvu a zároveň pronikají dovnitř do struktury.

Na typu 7 sice buňky rostou srovnatelnou mírou jako na typech 2 a 3, avšak v dalším výzkumu nechceme mít jen strukturu rectilinear, ale i honeycomb a proto přibíráme typ 8.

Pokud bychom chtěli obecněji popsat vlastnosti printů, na kterých rostly buňky nejlépe, tak se jedná o struktury s mezerou větší než 40 μm a menší než 200 μm . Pro tyto mezery platí, že buňky do nich mohou proniknout v dostatečné míře, ale zároveň nepropadnou příliš hluboko dovnitř scaffoldu. Co se týče tloušťky vlákna, tak u struktury rectilinear jsou lepší tenčí vlákna. Zřejmě to bude souviset s vhodným poměrem s mezerou. Celý scaffold navíc může mít více jemnějších pórů. U struktury honeycomb však výsledky naznačují, že vhodnější mohou být naopak širší vlákna. To může s tím, že se buňky nezaseknou na povrchu scaffoldu, protože struktura honeycomb má vlákna zatočená, což může buňky brzdit.

Materiál je pro tvorbu scaffoldů velmi vhodný. Buňky jej dobře kolonizují, a navíc byl tento materiál již dříve schválen pro použití v medicínských aplikacích americkou FDA.

4.2 Růst buněk na plástvích

Cílem práce bylo ověřit vhodnost a určit optimální způsob povrchové úpravy scaffoldu.

Plástve jsme testovali pomocí buněk ASC, které jsme nasadili na scaffoldy, ozářené počty pulsů 0, 500 a 1000. Buňky jsme nasazovali na scaffoldy umístěné do 24 jamkových polystyrenových destiček, v koncentraci 40000 buněk na jamku. Nasadili jsme celkem 10 plat, abychom jich měli dostatek pro veškeré testovací metody. Buňky jsme poté kultivovali v termostatu.

Výsledky jsme vyhodnocovali ve dnech 1, 3, 7 od začátku kultivace. Každý z těchto dnů jsme zafixovali buňky pro stanovení počtu buněk. Nezafixovali jsme ale všechny, protože jsme zároveň jsme provedli na nezafixovaných buňkách metabolický test. Pro vyhodnocení výsledků jsme použili 2 různé metody, konkrétně určení počtu buněk a metabolický test MTS. Rozhodli jsme se použít tyto dvě metody paralelně pro zvýšení přesnosti pozorování.

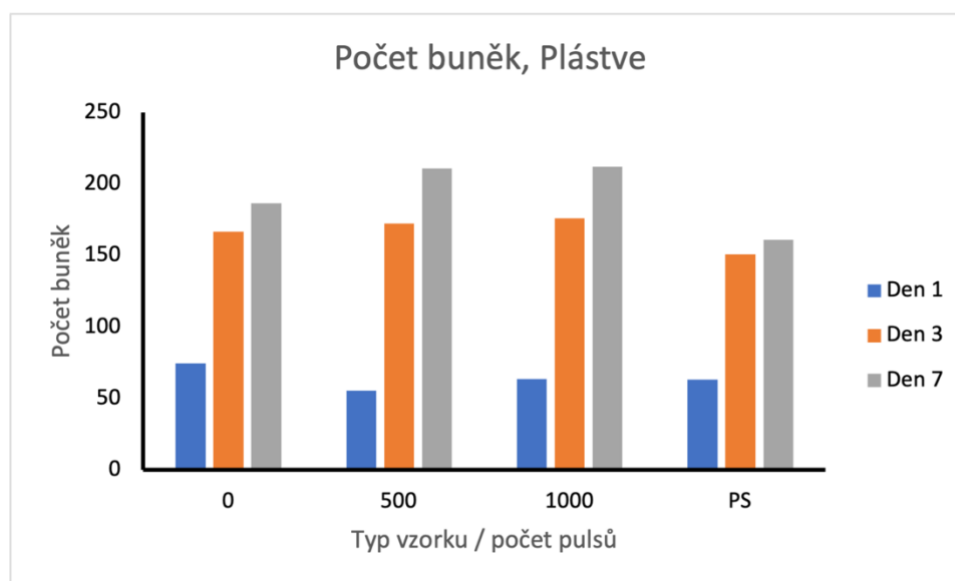
4.2.1 Počty buněk

Buňky jsme po zafixování barvili fluorescenčním barvivem Hoechst 33258, kterými jsme vizualizovali jádra, která jsme fotili na optickém mikroskopu Olympus IX71 a pořízených mikrofotografií jsme buňky sčítali a mohli jsme tak určit jejich průměrný počet na snímek na vzorku. Z porovnání průměrů počtu buněk můžeme určit kvalitu proliferace buněk na vzorku.

Tento typ vzorků je také třírozměrný, ale má velmi malou hloubku, proto byly snímky pořízeny. Při dvou zaostřeních do různé hloubky, aby byla na mikrofotografii zachycena většina buněk. Jako kontrolu jsme použili buňky nasazené přímo na polystyren a také vzorek exponovaný nulovému počtu pulsů

Dále jsme některé ze zafixovaných vzorků nabarvili barvivem Texas red, abychom mohli sledovat morfologii buněk, která vypovídá o vhodnosti podkladu pro buněčnou adhezi. Focení buněk barvených barvou Texas red jsme provedli až den 7, kdy byly buňky nejvíce narostlé.

Pokud se nyní podíváme na vývoj počtu buněk ve dnech, budeme moci pozorovat podobné výsledky jako u výsledků MTS testu, je možno říct, že tyto dvě hodnoty vzájemně korelují a metabolická aktivita je závislá na počtu buněk na podkladu. Jednotkou tohoto grafu je průměrný počet buněk na snímek mikrofotografie z mikroskopu.



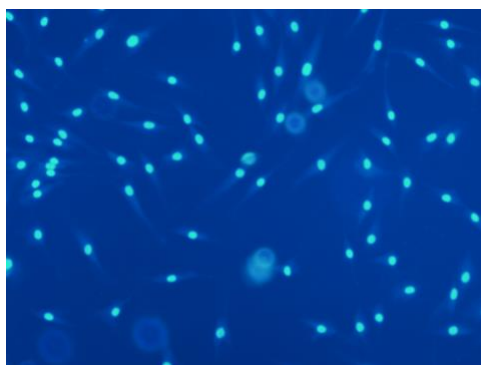
Obrázek 25: graf vývoje počtu buněk ve dnech

Na tomto grafu vidíme podobný výsledek jako na grafu metabolické aktivity. Opět obě ozářené plástve překonávají neozářený vzorek a vzájemně se příliš neliší. Podobná je v tomto případě opět změna růstu mezi dny 1 a 3 a dny 3 a 7, kdy se růst zpomalí. V tomto případě je rozdíl mezi dny větší než u metabolického testu. Je možné, že to je dáno tím, že buněk už poté příliš nepřibývá, ale buňky, které už jsou narostlé jsou větší a dosahují vyšší metabolické aktivity. Vidíme, že u polystyrenu je přírůstek mezi dny 3 a 7 velmi malý. Z pohledu růstové křivky je zde přechod mezi log fází stacionární fází více zřetelný.

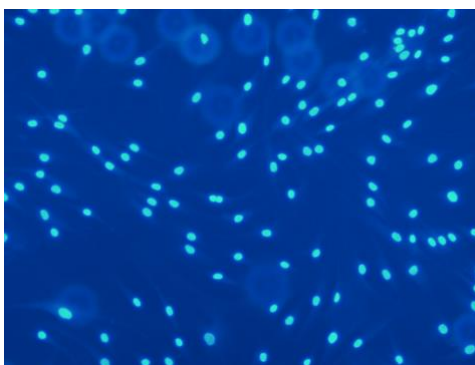
Nyní se můžeme podívat na vývoj počtu buněk na vzorcích pomocí mikrofotografií. Vybíráme takové snímky, které se nejvíce blíží průměru celkového součtu.

Je nutno dodat, že buňky na polystyrenu rostly pouze v jedné vrstvě, tedy měly větší prostor, který mohly kolonizovat, oproti tomu buňky na plástvích ve dvou a počet buněk na plástvi jsme dostali jako součet dvou vrstev. Na polystyrenu už buňky dosahovaly v den 7 konfluencie a měly tak omezenou možnost dalšího růstu.

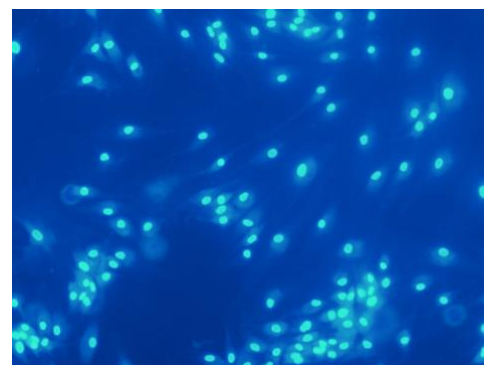
Plástev s intenzitou ozáření 0:



*Obrázek 28: plástev 0, den 1, 10x
zvětšení*

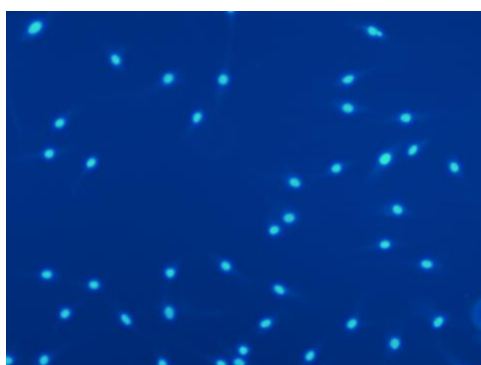


*Obrázek 26: plástev 0, den 3, 10x
zvětšení*

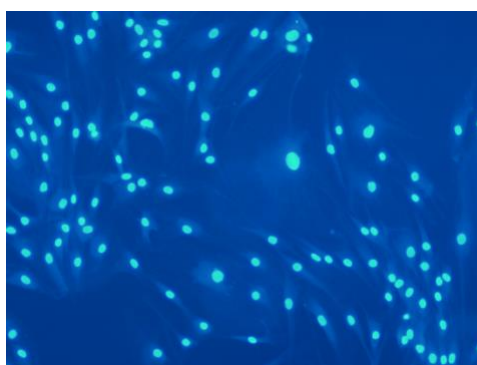


*Obrázek 27: plástev 0, den 7, 10x
zvětšení*

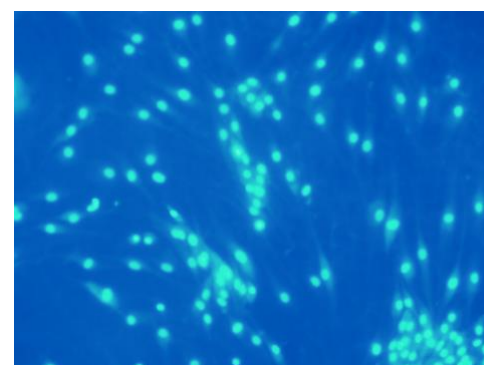
Plástev s intenzitou ozáření 500:



*Obrázek 31: plástev 500, den 1, 10x
zvětšení*

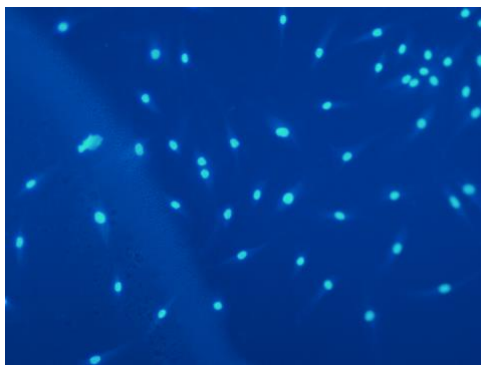


*Obrázek 30: plástev 500, den 3, 10x
zvětšení*

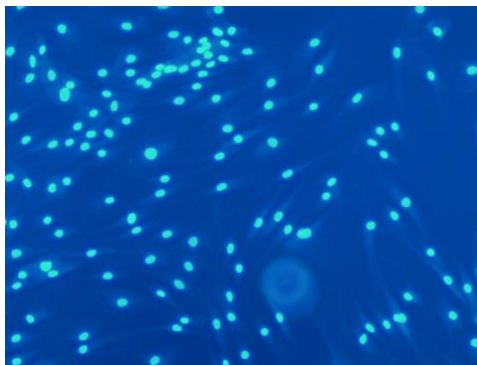


*Obrázek 29: plástev 500, den 7, 10x
zvětšení*

Plástev s intenzitou ozáření 1000:



Obrázek 34: plástev 1000, den 1, 10x
zvětšení

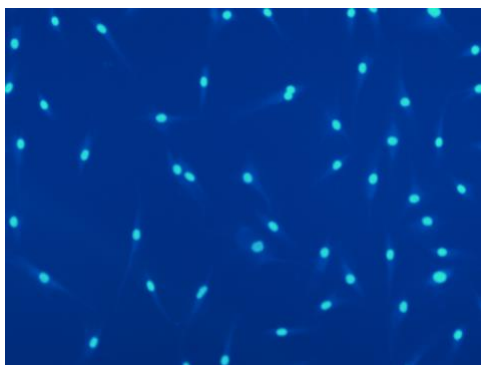


Obrázek 33: plástev 1000, den 3, 10x
zvětšení

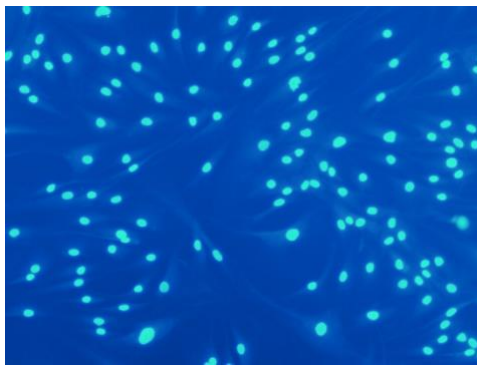


Obrázek 32: plástev 1000, den 7, 10x
zvětšení

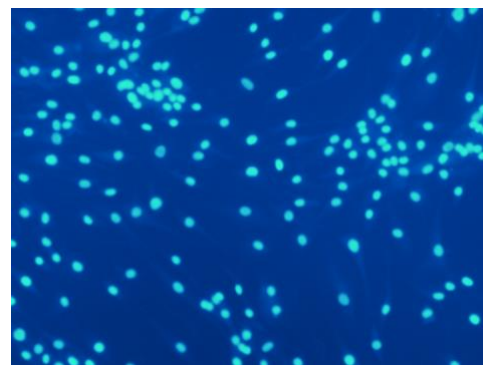
Pozitivní kontrola polystyren:



Obrázek 37: polystyren, den 1, 10x
zvětšení



Obrázek 35: polystyren, den 3, 10x
zvětšení

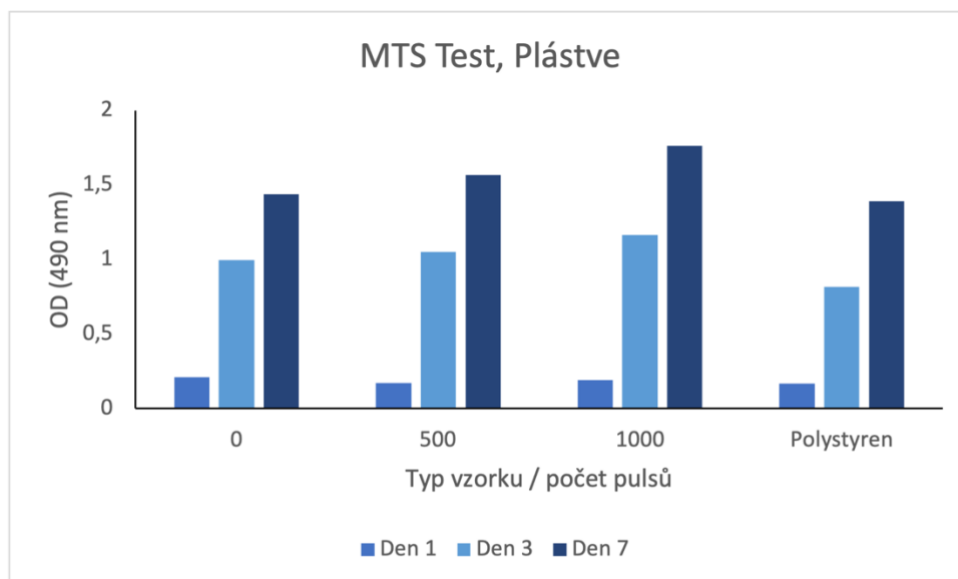


Obrázek 36: polystyren, den 7, 10x
zvětšení

Na obrázcích zejména ze dne 7 si můžeme všimnout jevu zvaného konfluence buněk, je to chvíle, kdy se buňky začnou vzájemně dotýkat a vytvoří souvislý povrch. Konfluenci na obrázku poznáme jako výrazný shluk jader na jednou místě. Krásná konfluence je například na obrázku 26 v pravém dolním rohu. Můžeme si také všimnout klesajícího trendu růstu mezi dnem 3 a 7.

4.2.2 Vyhodnocení růstu buněk měřením metabolické aktivity

Vývoj výsledků MTS testů počtů buněk jsme zanesli do grafů po dnech, aby byl vidět lépe vývoj metabolické aktivity v čase pro jednotlivé vzorky se stejnou hladinou ozáření (Obrázek 39).



Obrázek 38: graf vývoje výsledků MTS testu ve dnech

Metabolická aktivita je přímo úměrná počtu buněk, také monitoruje jejich stav. Jako kontrolu jsme použili buňky nasazené přímo na polystyren, na kterém víme, že buňky rostou velmi dobře. Polystyren nám tedy sloužil jako pozitivní kontrola. Srovnáním, jak se buňkám daří na známém materiálu a neznámém materiálu, můžeme zjistit kdy není na vině materiál, ale samotné buňky. Také jsme použili vzorek ozářený 0 pulsy, abychom věděli, jak přítomnost pulsů ovlivní růst buněk

Z grafu vidíme, že metabolická aktivita buněk stoupá průběžně po celých 7 dní kultivace. Tedy buňky v průběhu celého pokusu proliferovaly a kolonizovaly materiál. V průběhu prvního dne kultivace buňky nejprve adherují k podkladu, pak v optimálním prostředí dochází zpravidla k rychlému nárůstu počtu buněk. Později, když buňky zaplní kultivační prostor, dochází ke zpomalení růstu. V našem pokusu jsme zjistili, že změna mezi dnem 1 a 3 je mnohem vyšší než změna mezi 3 a 7, ačkoli druhá zmíněná je také velmi výrazná. Takovýto vývoj lze očekávat v případě, že materiál i kultivační prostředí jsou pro růst a proliferaci buněk vhodné. Zároveň relativně rychlý nástup proliferace buněk znamená, že buňky byly nasazeny na materiál ve vhodném množství. Pokud by bylo buněk nasazeno málo, podklad by byl osazen příliš řídko, nástup lineární fáze růstu buněk by byla opožděná. Toto optimální množství buněk jsme určili v krátkém předpokusu. Z pohledu růstové křivky došlo u buněk mezi dnem 1 a 3 k log fázi s poměrně strmou lineární částí, a poté mezi dnem 3 a 7 ke buněčnému růstu blížil stacionární fázi, kdy již je prostor dostatečně osídlen buňkami a dále jich nepřibývá., protože buňky jsou limitovány prostorem a jejich denní přírůstek se proto mírně zpomalí. V našem případě mohlo být snížení metabolické aktivity pouze zdánlivé, protože buňky později osidlovaly i hlubší vrstvu scaffoldu, ve které docházelo k pomalejší výměně metabolizovaného substrátu.

V porovnání s mikrofotografiemi morfologie buněk (Obrázek 36) ze které je zřejmé, že buňky nejsou ještě v plné konfluenci, toto vysvětlení je pravděpodobné., nebo alespoň má podíl na snížení nárůstu metabolické aktivity. Metabolický test byl prováděn ve statickém systému bez stimulace proudění média ve vzorku. V každém případě je tento testovací systém vhodný k porovnání sledovaných vzorků a ke zjištění, zda je materiál vhodným scaffoldem pro kultivaci buněk a tvorbu tkáňové náhrady.

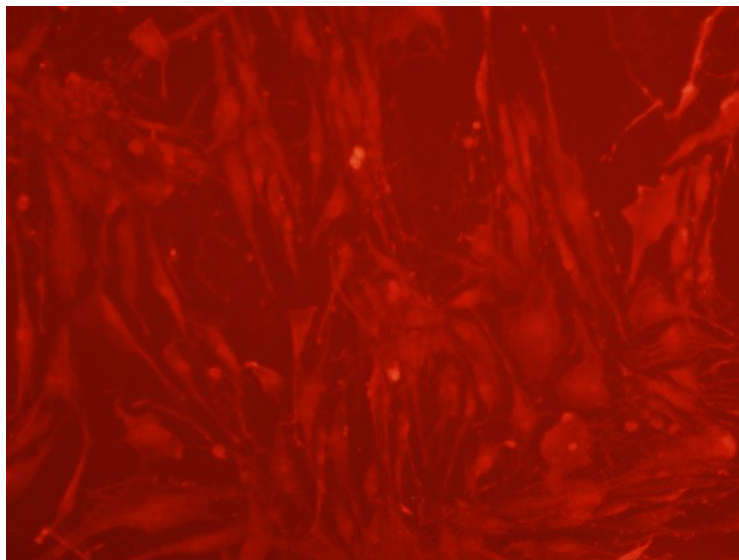
Porovnáním výsledků vzorků exponovaných počtu pulsů 0, 500 a 1000 jsme zjistili, že na vzorcích exponovaných vyššímu počtu pulsů byla zjištěna vyšší metabolická aktivita buněk. Tento rozdíl byl signifikantní, ale nebyl příliš výrazní oproti srovnání s pozitivní kontrolou a vzorkem exponovaným nulovým počtem pulsů. (Obrázek 25). Zajímavý je tento rozdíl mezi ozářenými pláštvi a pozitivní kontrolou polystyrenem bez ozáření. Tento Polystyrenový povrch je totiž speciálně vyvinutý pro kultivaci buněk. Pokud by se mu naše scaffoldy blížily, znamená to, že pláštve jsou vhodným scaffoldem pro kultivaci buněk a tvorbu tkáňové náhrady.

Dále, jsme prokázali, že oba typy pláštvi, které byly ozářeny dosahují znatelně lepšího výsledku než pozitivní kontrola polystyren, což může svědčit o vhodnosti záření. Porovnáním se vzorkem 0 pulsů jsme zjistili, že buňky na ozářených podkladech dosahují vyšší metabolické aktivity než na podkladu neozářeném.

Zajímavý je i rozdíl změny metabolické aktivity mezi dnem 1 a 3, který je v tomto časovém rozmezí výrazný. Oproti tomu přírůstek mezi dny 3 a 7 je mezi všemi vzorky srovnatelný. Je to z toho důvodu, že buňky již došly do konfluencie a zastavily růst.

4.2.3 Morfologie buněk

Nyní se podívejme na morfologii buněk. Máme nabarvené buňky pomocí barviva Texas red, které dobře ukazuje celou strukturu buňky. Barvivem Texas red byly nabarveny buňky ze dne 7.



Obrázek 40: pláštve 1000, den 7, 10x zvětšení

Vidíme, že buňky na obrázku velmi hustě porůstají podklad a že jsou téměř v konfluenci. Tvar buněk je spíše podlouhlý, což je typické pro buňky ASC. Je tedy zřejmé, že nedošlo k diferenciaci buněk. Na obrázku jsou také krásně pozorovatelné nožičky buněk, kterými se

buňky přilepují na povrch podkladu. Je tedy zřejmé, že dochází k vysoké míře adheze buněk na podklad.

4.2.4 Vyhodnocení růstu buněk na plástvích

Pomocí metod součtu buněk a MTS testu se nám podařilo určit, že vystavení planárního podkladu záření o přiměřené intenzitě je s nejvyšší pravděpodobností vhodnou povrchovou úpravou, která vede ke zlepšení růstu a proliferace buněk. Hladiny, se kterými jsme pracovali, tedy 0, 500 a 1000 dosahují podobných výsledků a překonávají neozářený polystyren. Ozářené plástve také navíc překonávají neozářenou plástev. Nejlépe však proliferaci umožňuje plástev ozářená intenzitou 1000. Buňky bohužel podkladem nejsou indukovány k diferenciaci a povrch bude potřeba ještě dále vylepšit a zvážit další možnosti, nicméně ozáření můžeme zvážit jako možnou úpravu i dalších typů scaffoldů.

4.3 Růst buněk na pryskyřicích

Naším cílem bylo určit, jestli jsou materiály na tomto základu vhodné pro kultivaci buněk a jestli v této struktuře pronikají buňky do hloubky. Testovali jsme pouze jeden typ pryskyřic. Materiál, ze kterého jsou pryskyřice vyrobeny nebyl dříve kvůli vlastnostem biokompatibility testován.

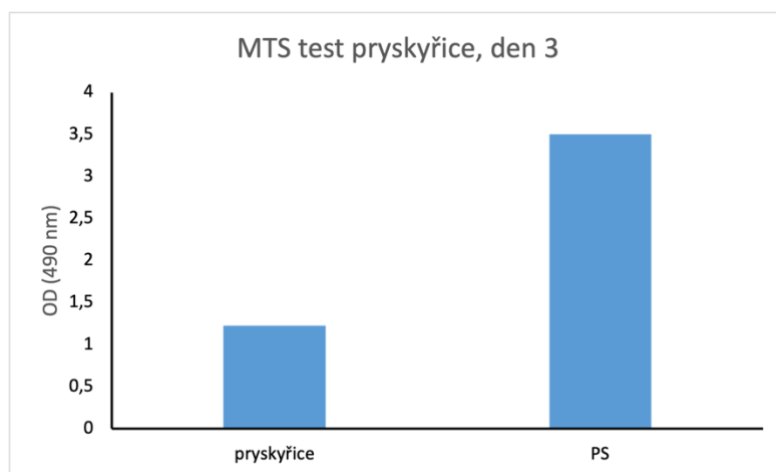
Pryskyřice jsme testovali pomocí buněk ASC. Máme pouze jeden typ pryskyřic. Buňky jsme poté kultivovali v termostatu. Výsledky růstu jsme vyhodnocovali v den 3 po nasazení buněk pomocí dvou metod. První z nich je test MTS. Druhou pak fixace, barvení buněčných jader barvivem Hoechst 33258 a focení buněk, které jsou ve více optických rovinách pomocí mikroskopu Olympus IX71. Pryskyřice jsou scaffoldy s třírozměrnou strukturou a druhá ze zmíněných metod nám pomůže určit, jestli a případně jak dobře buňky pronikají do hloubky scaffoldu.

Pryskyřice se zásadně odlišují od printů ve dvou hlavních vlastnostech, přestože byly oba typy scaffoldů vyrobeny za pomoci 3D tisku. První z nich je známá biokompatibilita materiálu. O materiálu, ze kterého jsou vyrobeny printy víme, že je biokompatibilní. U fotoresinu, ze kterého jsou pryskyřice zatím nebyla naměřena data, která by potvrdila, nebo vyvrátila, jestli je výrobní materiál biokompatibilní. Fotoresin, který byl na výrobu pryskyřic použit značku biokompatibilní od výrobce nemá. Fotoresiny jsou většinou z akrylátů, které biokompatibilní příliš nejsou. Pokud by materiál byl pro buňky škodlivý, projevilo by se to na růstu buněk už v den 3, kdy výsledky měříme.

Dalším parametrem, kterým se pryskyřice odlišují od printů je jemnost jejich třírozměrné struktury. Pryskyřice jsou tvořeny vlákny o šířce 100 um s mezerou mezi vlákny velkou taktéž 100 um. Printy jsou naopak tvořeny vlákny 200 um nebo 240 um, a mezerami 0 um až 200 um.

Podle naší hypotézy by měly buňky lépe pronikat do struktury s jemnějšími vlákny, protože jemnější vlákna vytvoří větší množství pórů, do kterých mohou buňky pronikat.

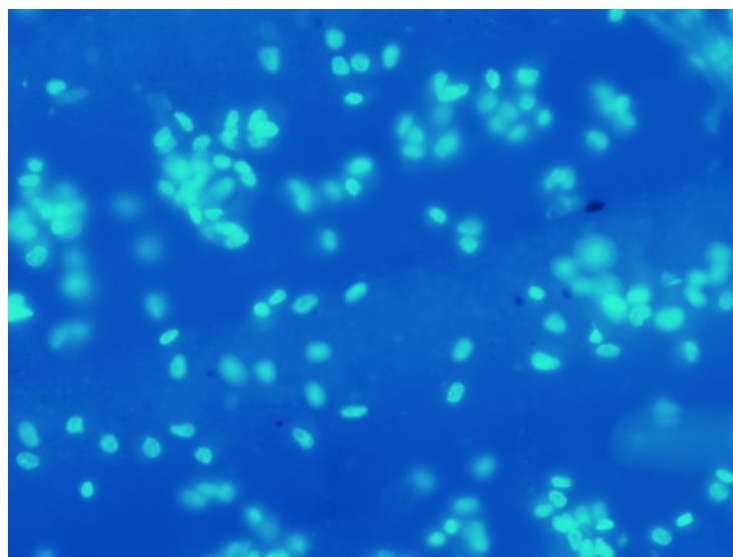
Nyní se podívejme na výsledky MTS testu pryskyřic ze dne 3. Buňky jsme vedle pryskyřic nasadili i na polystyren, který nám slouží jako pozitivní kontrola a srovnání výsledku.



Obrázek 41: graf MTS testu, den 3

Na grafu můžeme vidět, že polystyren dopadl v testu metabolické aktivity výrazně lépe. I tento výsledek však můžeme považovat za úspěch, neboť hodnota pro pryskyřice jednoznačně ukazuje, že buňky jsou schopné růst na tomto materiálu a že materiál není pro buňky toxickým.

Dále se podívejme na mikrofotografie z mikroskopu Olympus IX71, na kterém jsme fotili buněčná jádra ve více optických rovinách. Cílem bylo určit, jak buňky pronikají do hloubky. Výsledek je možné vidět na tomto obrázku.



Obrázek 42: zobrazení jader na pryskyřici, 20x zvětšení

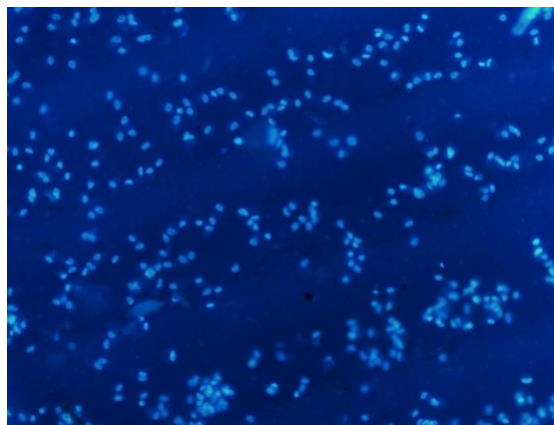
Na tomto obrázku lze krásně vidět buněčná jádra, která rostou na pryskyřicích. Jako první si můžeme všimnout jejich poměrně vysokého množství a začínající konfluence na několika místech. Na obrázku jsou také vidět náznaky trámčů, což jsou vlákna samotného scaffoldu pryskyřice. Pokud se na obrázy jader podíváme pozorně, zjistíme, že některé jsou méně zaostřené nebo je jejich obraz zcela rozmazaný. Různá ostrost obrazu jader je způsobena tím,

že se jádra nenacházejí ve stejné optické rovině, tedy jsou v jiné výšce než jádra ostatní. To však může znamenat pouze, že jsou buňky v nižší vrstvě scaffoldu, neboli že pronikly dovnitř do pryskyřice, což je velmi dobrá zpráva, protože se nám podařilo najít, takovou strukturu, do které buňky rychle hluboko pronikají.

Na posledním obrázku můžeme vidět celkový růst buněk na pryskyřicích. Z obrázku je patrné, že buněk je na scaffoldu výrazné množství a buňky mají tendenci nezůstávat na horních vláknech, ale naopak se propadat do hloubky scaffoldu. Opět je vidět výskyt buněk v různých optických rovinách.

4.3.1 Vyhodnocení růstu na pryskyřicích

Má tedy význam a smysl se dále zabývat vývojem scaffoldů z SLA 3D tiskárny, která na tisk používá materiály na podobném základu jako tyto pryskyřice, které ale mohou mít výrobcem stanovenou vyšší míru biokompatibility. SLA tisk je pro tkáňové inženýrství velmi perspektivní, protože odemyká možnosti, jak vyrábět scaffoldy s mnohem jemnější strukturou, tenčími vlákny a mezerami, a dosáhnout tak větší pórovitosti, která prospívá buňkám. Tento výzkum však byl pouze krokem, který nám měl určit, jestli se vyplatí zabývat se tímto typem materiálu a výroby, než abychom nyní mohli říct, že máme recept na výrobu scaffoldu pro tkáňové inženýrství a celkově lze říci, že tento materiál je spíše vhodný pro dlouhodobé použití jako nosič kmenových buněk. Co se týče srovnání kvality průniku buněk do scaffoldu vůči printům, tak vlastnosti obou scaffoldů jsou srovnatelné a budou muset být provedena další měření, abychom potvrdili, které ze scaffoldů jsou lepší.



*Obrázek 43: kolonizace pryskyřic buňkami
ASC, 4x zvětšení*

5 Závěr

Podářilo se nám experimentálně určit vhodnost či nevhodnost podkladů, které by mohly být základem pro budoucí scaffolds pro tvorbu kostních náhrad. V první fázi výzkumu se nám také podařilo vytvořit pomocí dostupných metod scaffold, na kterém rostly kmenové buňky. Splnili jsme tak cíle naší práce. Ty je možno shrnout následovně:

Z 10 typů scaffoldů z FDM tiskárny z materiálu o známých biokompatibilních vlastnostech se nám podařilo pro další výzkum vybrat tři nejlepší, u kterých došlo k nejlepšímu růstu buněk a nejvýraznějšímu průniku do hloubky. Jednalo se o typy 2, 3, 8. Konkrétně dva typy s rectilineární strukturou a šířkou vláken 200 um a mezerami 160 um a 80 um. Třetím vybraným typem byl scaffold s honeycomb strukturou se šířkou vlákna 240 um a mezerou 80 um.

Z výsledků práce s plástmí se nám podařilo určit, že dávka záření měnící rozložení náboje na povrchu scaffoldu se jeví jako perspektivní povrchová úprava. Nejlépe dopadl vzorek s vyšší hladinou intenzity ozáření.

U pryskyřic se nám podařilo určit, že se jedná o materiál, na kterém buňky ros, ale zároveň nejsou příliš vhodné pro růst buněk. Nicméně jsme zjistili, že má smysl se zabývat dále tímto typem materiálu a obecně SLA tiskem jako metodou pro tvorbu nosiče kmenových buněk jako součástí tkáňové náhrady.

Vývoj bezpečné a funkční tkáňové náhrady je, a ještě bude dlouhým procesem, který probíhá pomalu krok za krokem a doufám, že tato středoškolská odborná činnost jej posunula, sice jen o velmi malý nepatrný krůček, zase o něco blíže k cíli.

6 Použitá literatura

[1] DUNGL, Pavel a kolektiv. Ortopedie. 2014. ISBN 9788024743578.

[2] Transplantace a reparace (hojení) kosti [online]. 2018 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://ftvs.cuni.cz/FTVS-1547.html>

<https://ftvs.cuni.cz/FTVS-1547.html> kostní štěpy

[3] Bone grafting [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/treatment-tests-and-therapies/bone-grafting>

<https://www.hopkinsmedicine.org/health/treatment-tests-and-therapies/bone-grafting> rizika kostních štěpů

[4] [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/29109/BPTX_0_0_11160_0_55978_0_51340.pdf?sequence=1&isAllowed=y

https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/29109/BPTX_0_0_11160_0_55978_0_51340.pdf?sequence=1&isAllowed=y kovové náhrady

[5] ZHANG, Jiazhen a kolektiv. Biodegradable metals for bone defect repair: A systematic review and meta-analysis based on animal studies [online]. 2021 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8089787/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8089787/> nevýhody bone grafts

[6] MORASCHINI, Vittorio a kolektiv. Biodegradable metals for bone defect repair: A systematic review and meta-analysis based on animal studies [online]. 2020 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31985847/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31985847/> 48 % immune reactions

[7] Kmenové buňky [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Kmenové_buňky

https://www.wikiskripta.eu/w/Kmenov%C3%A9_bu%C5%88ky

[8] SHEN, Chongyang. Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC) [online]. 2019 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-019-0281-3>

<https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-019-0281-3> markery osteogenní diferenciace

[9] SLA [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.fs.cvut.cz/ostatni/sekce-3dtisk/3dtisk/moznosti-3dtisk/rozdeleni-technologie-3dtisk/sla-3dtisk/>

<https://www.fs.cvut.cz/ostatni/sekce-3dtisk/3dtisk/moznosti-3dtisk/rozdeleni-technologie-3dtisk/sla-3dtisk/> sla tisk

[10] PATRIKOSKI, Mimmi. Perspectives for Clinical Translation of Adipose Stromal/Stem Cells [online]. 2019 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/5858247/>

<https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/5858247/> buňky ASC vhodnost

[11] SANTORO, Marco. POLY(LACTIC ACID) NANOFIBROUS SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING [online]. 2017 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081275/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081275/> pla tissue engineering

[12] DWIVEDI, Ruby. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature [online]. 2020 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854079/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854079/> pcl tissue engineering

[13] Phalloidin staining protocol [online]. 2021 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/protocols/phalloidin-staining-protocol>

<https://www.abcam.com/protocols/phalloidin-staining-protocol> použití faloidinu

[14] Rhodamine Phalloidin [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R415>

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R415> faloidin

[15] Hoechst 33258 [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3569%20hoechst%2033258>

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3569> hoechst 33258

[16] PORTUGAL, J; WARING, MJ. Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochimica et Biophysica Acta*. Feb 28, 1988, s. 158–68. DOI 10.1016/0167-4781(88)90079-6. PMID 2449244. (anglicky) Hoechst vlastnosti

[17] Konfokální mikroskop [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/konfokalni_mikroskopie.pdf

http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/konfokalni_mikroskopie.pdf konfokální mikroskop

[18] RISS, Terry. Cell Viability Assays [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> mts test

[19] RISS, Zeeshan. Immune Response to Implanted Bone Replacement Graft Materials [online]. 2020 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.oralhealthgroup.com/features/immune-response-to-implanted-bone-replacement-graft-materials/>

<https://www.oralhealthgroup.com/features/immune-response-to-implanted-bone-replacement-graft-materials/> imunitní reakce na kovovou náhradu

[20] KAO, Fu-Cheng. The application of nanogenerators and piezoelectricity in osteogenesis [online]. 2019 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6968561/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6968561/> piezoelectricity in osteogenesis

[21] Legal documents [online]. 2019 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.stratasys.com/en/legal/legal-information/>

[22] Texas Red (and Texas Red-X) Dye [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/texas-red.html>

7 Obrázky

Obrázek 1: Anatomie kosti.....	12
Obrázek 2: úbytek kostní hmoty vlivem osteoporózy	13
Obrázek 3: použití kostního štěpu z pánve.....	15
Obrázek 4: kovové kostní implantáty	16
Obrázek 5: tisk pomocí FDM technologie	20
Obrázek 6: tisk pomocí SLA technologie	21
Obrázek 7: buňky ASC kultivované na polystyrenu, Olympus IX71, 10x zvětšení	22
Obrázek 8: vizualice struktury rectilinear 2	23
Obrázek 9: vizualizace struktury honeycomb 8	23
Obrázek 10: vizualizace žebříčkové 3D struktury pryskyřice.....	25
Obrázek 11: příklad barvení f-aktinu faloidinem	28
Obrázek 12: příklad barvení jader barvivem Hoechst 33258.....	28
Obrázek 13: příklad barvení Texas red	29
Obrázek 14: schéma konfokálního mikroskopu	30
Obrázek 15: print 4, 10x zvětšení.....	33
Obrázek 16: print 1, 10x zvětšení.....	33
Obrázek 17: print 5, 10x zvětšení.....	33
Obrázek 18: print 6, 10x zvětšení.....	33
Obrázek 19: print 2, 10x zvětšení.....	33
Obrázek 20: print 3, 10x zvětšení.....	33
Obrázek 21: print 10, 10x zvětšení.....	34
Obrázek 22: print 8, 10x zvětšení.....	34
Obrázek 23: print 9, 10x zvětšení.....	34
Obrázek 24: print 7, 10x zvětšení.....	34
Obrázek 27: graf vývoje počtu buněk ve dnech	36
Obrázek 28: plástev 0, den 3, 10x zvětšení	37
Obrázek 30: plástev 0, den 7, 10x zvětšení	37
Obrázek 29: plástev 0, den 1, 10x zvětšení	37
Obrázek 31: plástev 500, den 7, 10x zvětšení	37
Obrázek 32: plástev 500, den 3, 10x zvětšení	37
Obrázek 33: plástev 500, den 1, 10x zvětšení	37
Obrázek 34: plástev 1000, den 7, 10x zvětšení	38
Obrázek 35: plástev 1000, den 3, 10x zvětšení	38
Obrázek 36: plástev 1000, den 1, 10x zvětšení	38
Obrázek 37: polystyren, den 3, 10x zvětšení.....	38
Obrázek 38: polystyren, den 7, 10x zvětšení.....	38
Obrázek 39: polystyren, den 1, 10x zvětšení.....	38
Vývoj výsledků MTS testů počtů buněk jsme zanesli do grafů po dnech, aby byl vidět lépe vývoj metabolické aktivity v čase pro jednotlivé vzorky se stejnou hladinou ozáření (Obrázek 26).....	39
Obrázek 25: graf vývoje výsledků MTS testu ve dnech	39
Obrázek 40: plástev 1000, den 7, 10x zvětšení	40

Obrázek 41: graf MTS testu, den 3	42
Obrázek 42: zobrazení jader na pryskyřici, 20x zvětšení.....	42
Obrázek 43: kolonizace pryskyřic buňkami ASC, 4x zvětšení	43

7.1 Zdroje převzatých obrázků

Tyto obrázky byly použity z externích zdrojů. V případě, že nejsou na tomto seznamu byly pořízeny nebo vytvořeny autorem této práce SOČ.

Obrázek 1:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/78/Kompaktn%C3%AD_a_houbovit%C3%A1_kostn%C3%AD_tk%C3%A1%C5%88_%28lamel%C3%A1rn%C3%AD_kost%29.jpg

Obrázek 2:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.spineuniverse.com%2Fconditions%2Fosteoporosis%2Fosteoporosis-silent-thief&psig=AOvVaw0WX6H-OxDVt8yTS-TurjS4&ust=1673265286688000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCIDR_Yr1t_wCFQAAAAAdAAAAABAI

Obrázek 3:

<https://medlineplus.gov/ency/images/ency/fullsize/8745.jpg> kostní štěpy z pánve

Obrázek 4:

<https://sil.vscht.cz/images/450!0/uzel/0055633/0005~~y8wt0DUGAA.png> kovové kostní náhrady

Obrázek 5:

<https://cdn.thomasnet.com/insights-images/embedded-images/87ab5c4b-8555-42c9-b276-ad9780888f22/768d2291-4b16-4f48-a27b-c4369930c4de/FullHD/fig1.jpg> obrázek fdm

Obrázek 6:

<https://www.fs.cvut.cz/content/.thumbs/700x382/images/Obr.12.png> obrázek SLA