

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: lékařská biofyzika



Mgr. Michala Rampichová

Detekce a vizualizace nativních a uměle vytvořených chrupavčitých tkání
biofyzikálními technikami

Detection and visualization of native and artificial chondrogenous tissue using
biophysical methods

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

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

V Praze, 29. 11. 2012

Michala Rampichová

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali během mého studia, zejména pak mému školiteli prof. RNDr. Evženu Amlerovi, CSc. za odborné vedení a podporu během celého mého studia. Dále bych ráda poděkovala všem svým kolegům z Oddělení tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny AV ČR a týmu prof. Davida Lukáše z Technické Univerzity v Liberci za pomoc při experimentální činnosti.

V neposlední řadě také děkuji své rodině za podporu a trpělivost během celého mého studia.

Seznam zkratek

ACI	implantace autologních chondrocytů (<i>Autologous Chondrocyte Implantation</i>)
BMP	kostní morfogenní protein (<i>bone morphogenic protein</i> , BMP)
ESC	embryonální kmenové buňky (<i>Embryonic Stem Cells</i>)
FBS	fetální bovinní sérum
FGF	fibrogenní růstový faktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
GAG	glykosaminoglykan
GF	růstový faktor (<i>Growth Factor</i>)
HA	kyselina hyaluronová (<i>Hyaluronic Acid</i>)
IGF	insulinu podobný růstový faktor (<i>insulin like growth factor</i>)
MSC	mezenchymální kmenové buňky (<i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
PCL	polykaprolakton (<i>Polycaprolactone</i>)
PEO	polyetylen oxid
PLA	kyselina polyléčná (<i>Polylactic acid</i>)
PLGA	kopolymer kyseliny glykolové a mléčné (<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PGA	kyselina polyglykolová (<i>Polyglycolic Acid</i>)
PHB	polyhydroxybutyrát (<i>Polyhydroxybutyrate</i>)
PHEMA	polyhydroxyetyl metakrylát
PGS	polyglycerol sebakát (<i>Polyglycerol Sebacate</i>)
PU	polyuretan
PVA	polyvinyl alkohol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TGF	transformující růstový faktor (<i>Transformic Growth Factor</i>)
TPEM	dvoufotonová mikroskopie (<i>Two photon excitation microscopy</i>)
SHG	druhá harmonická (<i>Second Harmonic Generation</i>)
SLP	správná laboratorní praxe

Obsah

Seznam zkratk	4
Obsah	5
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1. Anatomie chrupavky	10
2.1.1. Hyalinní chrupavka	10
2.1.2. Elastická chrupavka	14
2.1.3. Vazivová chrupavka	14
2.2. Současné chirurgické přístupy k léčbě lézí chrupavky	14
2.3. Tkáňové inženýrství chrupavky	16
2.3.1. Zdroj buněk pro tkáňové inženýrství chrupavky	16
2.3.1.1. Chondrocyty	17
2.3.1.2. Kmenové buňky	19
2.3.2. Nosiče pro tkáňové inženýrství	21
2.3.2.1. Druhy nosičů	23
2.3.2.1.1. Hydrogely	23
2.3.2.1.2. Pěny	23
2.3.2.1.3. Vlákenné nosiče	25
2.3.2.2. Materiály pro přípravu nosičů	28
2.3.2.2.1. Přírodní materiály	29
2.3.2.2.2. Syntetické materiály	32
2.3.3. Stimulační faktory	34
2.3.3.1. Růstové faktory	35
2.3.3.2. Mechanická stimulace	36
2.3.4. Řízené dodávání léčiv	38
3. Cíle práce	40
Experimentální část	41
4. Metody	42
4.1. Metody in vitro	42
4.1.1. Příprava a charakterizace nosičů	42
4.1.1.1. Příprava nosičů elektrostatickým zvlákňováním	42
4.1.1.2. Příprava mikrovláknenných nosičů s adherovanými liposomy	43

4.1.1.3.	Měření interakce mezi mikrovlákný a liposomy.....	44
4.1.1.4.	Studie nábojové interakce mezi PHEMA vlákny a liposomy.....	44
4.1.1.5.	Příprava nosičů z netkaných textilií.....	44
4.1.1.6.	In vitro degradace nosičů z netkaných textilií	45
4.1.1.7.	Příprava nosiče z želatinové pěny.....	46
4.1.1.8.	Příprava nosiče z polykaprolaktonu.....	46
4.1.1.9.	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	46
4.1.1.10.	Kryoelektronová mikroskopie.....	46
4.1.2.	Tkáňové kultury, kultivace buněk	47
4.1.2.1.	Isolace a kultivace buněk	47
4.1.2.2.	Osazení nosičů buňkami	47
4.1.3.	Testování a vizualizace osazených nosičů <i>in vitro</i>	47
4.1.3.1.	MTT test buněčné viability	47
4.1.3.2.	Fluorescenční a konfokální mikroskopie	48
4.1.3.2.1.	Použité mikroskopy.....	48
4.1.3.2.2.	Zobrazení fluorescence jednofotonovou excitací.....	48
	Barvení propidium jodidem	49
	Barvení DiOC6	49
	Barvení BCECF-AM	49
	Imunofluorescenční barvení kolagenu II	50
4.1.3.2.3.	Druhá harmonická vlna	50
4.1.3.2.4.	Zobrazení signálu dvoufotonovou excitací	50
4.1.3.2.5.	Trojdimenzionální rekonstrukce obrazu.....	51
4.2.	Testování <i>in vivo</i>	52
4.2.1.	Zvířecí model.....	52
4.2.2.	Izolace buněk z hyalinní chrupavky	52
4.2.3.	Kultivace buněk.....	52
4.2.4.	Příprava implantátu.....	53
4.2.5.	Biomechanické testování	53
4.2.6.	Implantace osazeného nosiče.....	53
4.2.7.	Chirurgický zákrok provedený na kontrolních zvířatech	54
4.2.8.	Závěrečné pozorování.....	54
4.2.9.	Histologické vyšetření	54

4.2.10.	Bodovací systém vyhodnocování histologické metody.....	54
4.3.	Statistika.....	55
5.	Výsledky a diskuse	55
5.1.	Netkané textilie na bázi PGA a PVA jako vhodné nosiče pro růst chondrocytů	55
5.1.1.	Výsledky.....	55
5.1.1.1.	Adheze chondrocytů na PGA netkané textilní nosiče.....	55
5.1.1.2.	PVA zlepšilo proliferaci chondrocytů na PGA netkaných textiliích	57
5.1.1.3.	Konfokální mikroskopie naplavených netkaných nosičů ze směsi PGA....	57
5.1.1.4.	PVA v nosičích stabilizovalo pH.....	59
5.1.1.5.	Smáčivost nosičů ovlivňovala jejich degradaci	60
5.1.2.	Diskuse	61
5.1.2.1.	Chondrocyty dobře adherovaly, ale pouze slabě proliferovaly na nosiči PGA	61
5.1.2.2.	PVA v nosiči zlepšuje proliferaci chondrocytů	61
5.1.2.3.	Chitosan v PGA nosičích napomáhá proliferaci chondrocytů	62
5.2.	Jednoduchý systém řízeného dodávání látek na mikrovlákněm nosiči pro tkáňové inženýrství chrupavky.....	63
5.2.1.	Výsledky.....	63
5.2.1.1.	Příprava a charakterizace mikrovlákněm nosiče z PHEMA	63
5.2.1.2.	Interakce mikrovláken s liposomy	64
5.2.1.3.	Adheze a proliferace chondrocytů na PHEMA mikrovlákněm nosič a tvorba chrupavčité tkáně	66
5.2.1.4.	In vitro testování PHEMA1 nosiče obohaceného liposomy	68
5.2.2.	Diskuse	70
5.2.2.1.	Příprava vláken PHEMA elektrostatickým zvlákněním	70
5.2.2.2.	Imobilizované liposomy na mikrovláknech jako možnost řízeného dodávání léčiv	70
5.2.2.3.	Využití PHEMA mikrovláken pro účely tkáňového inženýrství.....	71
5.3.	Použití nelineární mikroskopie pro analýzu a 3D vizualizaci kolagenu v nosičích osazených chondrocyty.....	71
5.3.1.	Výsledky.....	71
5.3.2.	Diskuse	75
5.4.	Kompozitní hydrogel na bázi fibrinu a kyseliny hyaluronové jako vhodný nosič pro implantaci chrupavky in vivo	77

5.4.1.	Výsledky.....	77
5.4.1.1.	Příprava hydrogelového nosiče a biomechanické testování	77
5.4.1.2.	Implantace chondograftu a léčba zvířat	78
5.4.1.3.	Histopatologické a imunohistochemické vyšetření.....	79
5.4.1.4.	Vyhodnocení histologického vyšetření.....	82
5.4.1.5.	Biomechanické vlastnosti nově vytvořené tkáně.....	84
5.4.2.	Diskuse	84
6.	Závěr	86
	Abstrakt	88
	Summary	89
	Literatura	90
	Publikace autorky:.....	103

1. Úvod

Tkáňové inženýrství je rychle se vyvíjející obor, který využívá principů inženýrství a přírodních věd. Základní myšlenkou tkáňového inženýrství je obnovení nebo náhrada poškozené nebo chybějící tkáně pomocí nosiče z přírodního nebo syntetického materiálu, buněk a stimulačních faktorů, nebo jejich kombinací. Takto připravený materiál by měl po implantaci nahradit částečně nebo úplně poškozenou tkáň novou, plně funkční. Výhodou tkáňového inženýrství je možnost použití autologních buněk a biokompatibilních materiálů. Tím odpadají problémy s nedostatkem vhodných dárců a možné imunitní reakce a odhojení transplantované tkáně.

Proces tkáňového inženýrství začíná výběrem vhodného materiálu. Tento materiál musí být plně biokompatibilní s vhodnou délkou degradace. V současné době je testováno velké množství přírodních i syntetických materiálů. Výhodou přírodních materiálů je dobrá biokompatibilita, oproti tomu hlavní výhodou syntetických materiálů je možnost lépe nastavit degradaci materiálu tak, aby odpovídala potřebám regenerace konkrétní tkáně. Struktura nosiče musí mít velkou porositu s propojenými póry a dobré biomechanické vlastnosti.

Připravené nosiče jsou testovány nejdříve na buněčných kulturách, v podmínkách *in vitro*. Důraz je kladen na dobrou buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk. Pro diferenciaci buněk může být použito různých stimulačních faktorů, kupříkladu růstových faktorů, nebo mechanické stimulace. Během diferenciaci dochází k zahájení produkce specifických složek mezibuněčné hmoty, což je nezbytné pro utváření nové tkáně.

Před přikročením k následnému testování *in vivo*, preklinickým a klinickým studiím je potřebné kvality připraveného nosiče dobře zhodnotit. Vedle kvantitativních metod určujících buněčnou proliferaci a syntézu proteinů mezibuněčné hmoty je vhodné také zjistit distribuci buněk a mezibuněčné hmoty v nosiči. To umožňuje metoda fluorescenční a konfokální mikroskopie, kdy je možné pomocí specifických fluoroforů a fluorescenčně značených protilátek detekovat buňky a jejich chování v nosiči.

2. Literární přehled

2.1. Anatomie chrupavky

Chrupavka je pevná a pružná pojivová tkáň. Není vaskularizovaná ani inervovaná. Je tvořena buňkami - chondrocyty, které syntetizují její mezibuněčnou hmotu. Mezibuněčná hmota je tvořena glykosaminoglykany a proteoglykany, které interagují s kolagenními a elastickými vlákny. Rozeznáváme 3 druhy chrupavky, a to hyalinní, elastickou a vazivovou. Rozdíly mezi nimi jsou dány různým zastoupením složek mezibuněčné hmoty.

Mezibuněčná hmota obdařuje chrupavku pružností, která umožňuje tkáni vzdorovat mechanické námaze bez trvalé deformace. Hlavní funkcí chrupavky je podpora měkkých tkání. Díky své pružnosti a hladkému povrchu také tlumí nárazy a umožňuje kostem v kloubech hladký klouzavý pohyb (Konrádová V., 2000, Carneiro J., 2002).

2.1.1. Hyalinní chrupavka

Nejčastěji se v lidském těle vyskytuje chrupavka hyalinní. Pokrývá kloubní povrchy, tvoří část žeber a dále se vyskytuje v určitých částech dýchacích cest. U vyvíjejícího se jedince tvoří dočasný skelet, který je následně nahrazen kostí.

Hyalinní chrupavka pokrývající kloubní povrchy je specializovaná tkáň, kryjící kostní části kloubů. Je uzpůsobena k absorpci nárazů a odolávání smykovému napětí, které vzniká při zatěžování kloubů. Za své výjimečné vlastnosti vděčí složení a struktuře mezibuněčné hmoty, která je složena zejména z velkého množství proteoglykanů propletených v husté síti kolagenu a velkému množství vody. Kloubní chrupavka obsahuje také velmi řídkou populaci chondrocytů (pouze asi 1% objemu), které jsou odpovědné za syntézu mezibuněčné hmoty a její nahrazení v případě degradace (Stoop, 2008). Některé chondrocyty vysílají do okolní mezibuněčné hmoty cilia, které pravděpodobně hrají roli v citlivosti na mechanické podmínky v jejich okolí. Chondrocyty jsou známé tím, že mění syntézu složek mezibuněčné hmoty v závislosti na mechanickém zatěžování (Temenoff and Mikos, 2000).

Chondrocyty se vyvíjí z mezenchymálních kmenových buněk (*Mesenchymal stem cells* – MSC), které se vyskytují v kostní dřeni dospělého jedince. Během embryogeneze kmenové buňky diferencují v chondrocyty a syntetizují chrupavčitou mezibuněčnou hmotu. Dospělé chondrocyty kloubní chrupavky nejsou schopné dalšího dělení a jsou úplně obklopeny mezibuněčnou hmotou (Temenoff and Mikos, 2000, Konrádová V., 2000). Chondrocyty jsou uloženy v dutinách, které nazýváme lakuny. V jedné lakuně se může vyskytovat i celá skupina buněk – izogenetická skupina, která vzniká mitotickým dělením jednoho chondrocytu (Konrádová V., 2000).

Mezibuněčná hmota je tvořena zejména vodou a anorganickými solemi. Kolagen, proteoglykany a ostatní proteiny a glykoproteiny tvoří pouze 20 % nativní hmotnosti tkáně. Kolagen představuje 50 – 60 % suché hmotnosti chrupavky. V hyalinní chrupavce se vyskytuje kolagen II, VI, IX a XI, ovšem kolagen typu II zastává z celkového množství 90 – 95 %. Kolagen typu II na sebe váže velké množství uhlohydrátových skupin, které umožňují interakci s vodou a kolageny některých ostatních typů. Kolagen IX (1 % z celkového množství kolagenu) a XI (3 %) se podílí společně s kolagenem typu II na tvorbě vláken tvořících síť mezibuněčné hmoty. Tato organizace zaručuje pevnost a pružnost. Mezi další typy kolagenů vyskytujících se v kloubní chrupavce patří kolagen typu VI (1 %), nefibrilární kolagen, který tvoří disulfidickými můstky síť v prostoru kolem buněk. Kolagen typu X se vyskytuje pouze v oblastech kalcifikované mezibuněčné hmoty.

Proteoglykany se skládají z asi 95% z polysacharidu a 5 % proteinu. Protein je spojen s jedním, nebo několika druhy řetězců glykosaminoglykanů (GAG). GAG řetězce jsou nerozvětvené polysacharidy skládající se z disacharidů, nebo amino cukru a jiného cukru. Disacharidy mají negativně nabitě sulfátové nebo karboxylové skupiny, jejichž působením jsou GAG odpuzovány navzájem a od ostatních anionů. Zároveň přitahují kationy a usnadňují interakci s vodou. Mezi základní GAG, které obsahuje kloubní chrupavka, patří kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, keratan sulfát, dermatan sulfát a heparan sulfát.

V kloubní chrupavce se vyskytují jak velké agregující monomery, tak menší proteoglykany. Velké agregující proteoglykany, agrekany, se skládají z monomerů s keratan sulfátem a chondroitin sulfátem, které se váží na proteinové jádro. Většina molekul agrekanů spojuje mnoho (až 300) těchto monomerů v řetězec kyseliny hyaluronové. Agrekany vyplňují

většinu prostoru mezi fibrilární částí mezibuněčné hmoty a předpokládá se, že díky schopnosti vázat na sebe vodu, dávají chrupavce její pružnost a schopnost odolávat tlakům.

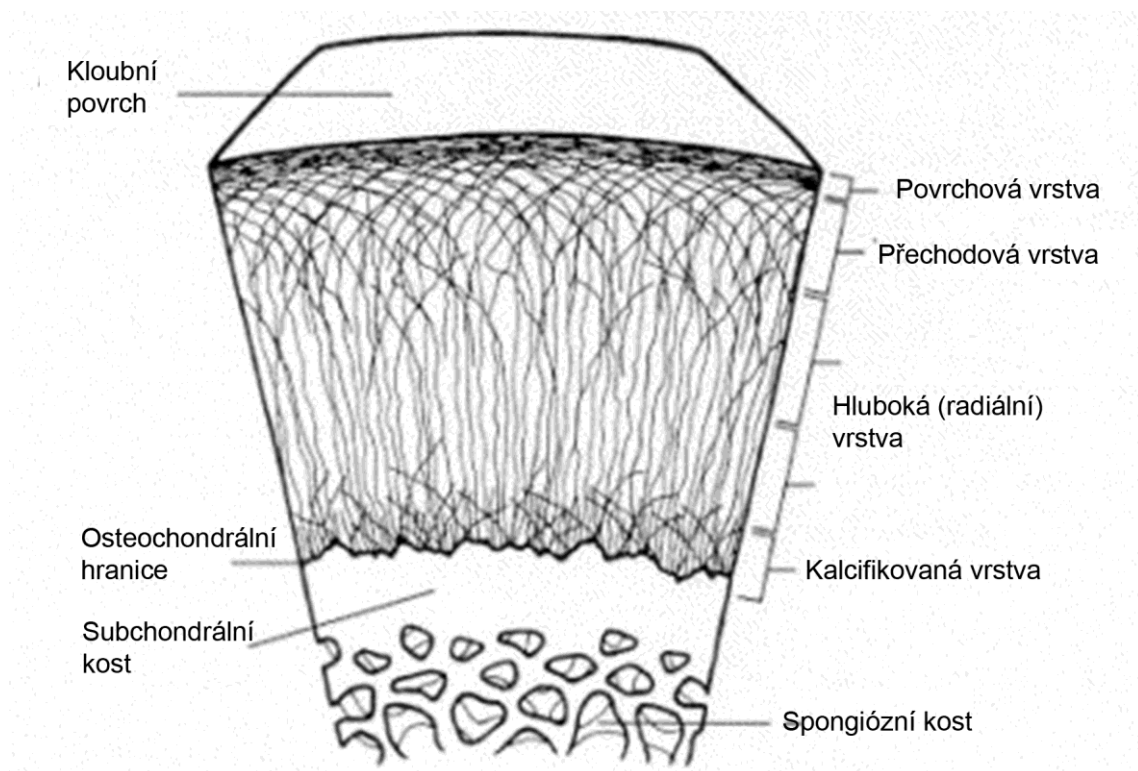
Mezi malé proteoglykany patří dekorin, biglykan a fibromodulin. Mají kratší proteinové jádro a méně GAG řetězců. Na rozdíl od agrekanů nehrají roli v mechanických vlastnostech chrupavky, ale předpokládá se, že mají vliv na funkci buněk a v organizaci kolagenní hmoty (Temenoff and Mikos, 2000).

Na rozdíl od proteoglykanů, glykoproteiny obsahují pouze malé množství oligosacharidů, které jsou navázány na proteinové jádro. Tyto polypeptidy pomáhají stabilizovat mezibuněčnou hmotu. Mezi nekolagenní proteiny nacházející se v hyalinní chrupavce patří anchorin a proteiny časté v ostatních tkáních, jako je fibronectin a tenascin.

Velmi důležitou součástí hyalinní chrupavky je tkáňová tekutina, která zastává více než 80 % její hmotnosti. V jednotlivých vrstvách je nerovnoměrně zastoupená. Nejvíce tekutiny je v povrchové vrstvě (80 %), její množství klesá směrem do hloubky chrupavky, v hluboké vrstvě je již pouze 65 % tekutiny. Kromě vody obsahuje plyny, metabolity a velké množství kationtů, které kompenzují negativní náboje GAG v mezibuněčné hmotě. Při výměně se synoviální tekutinou se do bezcévné chrupavky dostávají živiny a kyslík. Navíc tato tekutina při interakci se složkami mezibuněčné hmoty umožňuje chrupavce odolávat tlaku a po deformaci se vrátit do původního tvaru.

Kloubní chrupavku můžeme podle odlišné morfologie a biochemie rozdělit do 4 vrstev, a to povrchovou, přechodovou, hlubokou (radiální) a kalcifikovanou. V každé vrstvě můžeme navíc odlišit několik oblastí. V okolí buněk se vyskytují zejména vazebné nekolagenní vazebné proteiny, které zabezpečují zejména vazbu chondrocytů k mezibuněčné hmotě. V další vrstvě se objevuje hustá síť tenkých kolagenních vláken, které tvoří kolem buněk obal chránící je před mechanickými vlivy. Vyskytuje se zde kolagen IV, ve vysoké koncentraci proteoglykany a to agrekan, hyaluronan, dekorin, fibronectin a kolagen typu II a IX. Chondrocyt obklopený nejbližší mezibuněčnou hmotou (pericelulární hmotou) byl označen jako „chondron“ (Poole, 1997). Dále od buněk se zkracuje průměr kolagenových vláken a jejich orientace se stává paralelní. Tato oblast je odpovědná za mechanické vlastnosti chrupavky (Poole, 1997, Temenoff and Mikos, 2000).

Směrem od kloubního povrchu k subchondrální kosti se snižuje množství vody, zatímco se zvyšuje množství proteoglykanů. Povrchová vrstva obsahuje protáhlé chondrocyty a tenká kolagenní vlákna, která jsou orientována paralelně a povrchem. Přechodová vrstva se vyznačuje okrouhlými chondrocyty, které jsou obklopeny silnějšími, méně uspořádanými, kolagenními vlákny. Chondrocyty zde tvoří skupiny, chondrony, enkapsulované v lakunách. Produkují mezibuněčnou hmotu bohatou na hyaluronan, proteoglykany, fibronektin a tenká kolagenní vlákna. V hluboké vrstvě jsou hypertrofické chondrocyty soustředěny do sloupců orientovaných kolmo ke kloubnímu povrchu. Nejblíže k subchondrální kosti se vyskytuje kalcifikovaná vrstva, která je přechodem mezi hyalinní chrupavkou a kostí. Chondrocyty jsou zde malé a okrouhlé, úplně obklopené kalcifikovanou mezibuněčnou hmotou, což značí jejich minimální metabolickou aktivitu (Temenoff and Mikos, 2000, Poole, 1997, Holland and Mikos, 2003).



Obr. 2.1. Řez hyalinní chrupavkou (převzato a modifikováno z (Coumas and Palmer, 1998))

2.1.2. Elastická chrupavka

Elastická chrupavka je v lidském organismu méně častá, nachází se v ušním boltci, v hrtanu, tvoří epiglotis a stěnu Eustachovy trubice. Svou strukturou je velmi podobná chrupavce hyalinní, pouze chondrocyty jsou v lakunách uloženy zejména jednotlivě. Mezibuněčná hmota je tvořena kolagenem typu II a hustou sítí jemných elastických vláken (Carneiro J., 2002, Konrádová V., 2000).

2.1.3. Vazivová chrupavka

Vazivová chrupavka je jakousi formou mezi hustým kolagenním vazivem a hyalinní chrupavkou. Vyskytuje se v meziobratlových ploténkách, v symfýze stydké kosti a v místě úponů některých vazů.

Chondrocyty jsou podobné chrupavce hyalinní, vyskytují se buď izolovaně, nebo ve skupinách, často vytvářejí dlouhé sloupce. Mezibuněčná hmota obsahuje velké množství hrubých vláken kolagenu I. Kolagenní vlákna vytvářejí buď nepravidelné svazky, nebo jsou uspořádána paralelně podél sloupců tvořených chondrocyty. Orientace kolagenních vláken je rovnoběžná se směrem působením sil (Carneiro J., 2002, Konrádová V., 2000).

2.2. Současné chirurgické přístupy k léčbě lézí chrupavky

Chrupavka je avaskulární tkáň, která není inervována. Buňky chrupavky, chondrocyty, mají v dospělosti pouze omezenou schopnost dělení a syntézy mezibuněčné hmoty. Hojení defektů chrupavky závisí na druhu poškození. Pokud je porušena pouze vrstva chrupavky, jedná se o chondrální defekt, který se spontánně nehojí. V případě, že dojde zároveň k porušení subchondrální kosti kloubní hlavice, hovoříme o osteochondrálním defektu (Buckwalter and Mankin, 1998). Porušení subchondrální kosti otevírá cestu pro vnik krve kostní dřeně obsahující mesenchymální kmenové buňky. Může tak docházet k tvorbě nové tkáně, která má ale charakter fibrózní chrupavky. Fibrózní chrupavka je jizevnatá tkáň, která má v porovnání s hyalinní chrupavkou výrazně nižší mechanické vlastnosti a nemůže tak dlouhodobě odolávat zátěži kloubu. Dochází tak k dalšímu degenerativnímu poškození kloubu.

Současná chirurgická léčba defektů chrupavky má tři přístupy, a to odstranění poškozené tkáně, stimulace hojení narušením subchondrální kosti a náhrada poškozené tkáně. Odstranění poškozené chrupavky (debridement chrupavky) zlepšuje především bolestivé symptomy, nestimuluje však nijak tvorbu nové tkáně. Metoda mikrofraktur a abraze chrupavky je založena na porušení subchondrální kosti, což umožňuje vcestování mezenchymálních kmenových buněk, obsažených v kostní krvi, do defektu (Steadman et al., 2003, Steadman et al., 2002). MSC mají při použití vhodných stimulačních faktorů schopnost diferencovat do různých buněčných fenotypů, jako jsou chondrocyty, osteoblasty nebo fibroblasty (Uccelli et al., 2008). Při těchto zákrocích však dochází k diferenciaci MSC do fibrózní chrupavky (Freedman et al., 2003). Úspěšnější jsou metody nahrazující poškozenou chrupavku. Mozaiková plastika je metoda, při níž jsou z nezářezové části kloubu vyjmuty válečky osteochondrální tkáně a následně jsou implantovány do místa poškození (Outerbridge et al., 1995, Hangody et al., 2008). Tato metoda je poměrně úspěšná, její hlavní nevýhodou je poškození jiné části kloubu a omezená velikost léčeného defektu. Možností jak se této komplikaci vyhnout, je transplantace tkáně jiného dárce (alograf) (Gortz and Bugbee, 2006). Zde ovšem může docházet k imunitní reakci organismu o odhojení transplntované tkáně, nebo přenosu nemocí (Davidson and Carter, 2007).

V roce 1994 popsal Brittberg poprvé implantaci autologních chondrocytů (*Autologous chondrocyte implantation* – ACI) do chondrálního defektu u lidí (Brittberg et al., 1994). Při této metodě je z biopsie hyalinní chrupavky pacienta namnoženo *in vitro* dostatečné množství chondrocytů. Tyto buňky jsou následně implantovány do chondrálního defektu a překryty záplatou z periostu. Bylo dosaženo dobrých výsledků u 14 z 16 pacientů s defektem ve femuru holenní kosti. Horší byly výsledky u patelárních defektů (Brittberg et al., 1994).

Ani jedna z těchto metod nevede k úplnému nahrazení poškozené hyalinní chrupavky plnohodnotnou tkání. Slibnou metodou řešení tohoto problému je tkáňové inženýrství, vyvíjející nosiče, které by měly napomoci tvorbě nové chrupavčité tkáně s biologickými a mechanickými vlastnostmi odpovídajícími nativní chrupavce.

2.3. Tkáňové inženýrství chrupavky

2.3.1. Zdroj buněk pro tkáňové inženýrství chrupavky

K vytvoření nové funkční tkáně po implantaci nosiče do živého organismu je třeba vhodného zdroje buněk. Právě buňky produkují složky mezibuněčné hmoty a tvoří tak základ novotvořené tkáně. Zároveň buňky slouží i k testování nosičů *in vitro*. V tkáňovém inženýrství chrupavky se používá zejména chondrocytů a kmenových buněk. Kmenové buňky mohou být izolovány z kostní dřeni, tukové tkáně a svalů. Velkou kapacitu reparovat poškozené tkáně mají embryonální kmenové buňky. Všechny tyto buňky mají při vhodných kultivačních podmínkách potenciál produkovat chrupavčitou tkáň.

Je několik metod, jak získat buňky z hostitelské tkáně. První možností je použít malé kousky tkáně, obsahující některé, nebo všechny histologické struktury tkáně *in vivo* (orgánové kultury). Tkáň přilne ke dnu kultivační nádoby a následně z ní spontánně vyrůstají buňky. Další možností je rozvolnění tkáně enzymaticky, mechanicky nebo chemicky. Buňky jsou uvolněny z rozložené mezibuněčné hmoty a nasazeny do kultivačních nádob (buněčné kultury) (Vunjak-Novakovic G., 2006).

Většina živočišných buněk potřebuje ke svému dělení pevnou podložku (substrát), některé buňky se pak kultivují v suspenzních kulturách. Kultivace probíhá v kultivačních médiích. Ty obsahují základní živiny potřebné pro metabolismus buněk (základní aminokyseliny, stopové prvky a vitaminy, anorganické soli, glukózu, pyruvát, kyselinu linolovou). Pro snížení rizika kontaminace se přidávají antibiotika, případně antimykotika. Většina buněčných linií vyžaduje přídavek séra nebo jiných složek, obsahujících trofické a růstové faktory. Sérum obsahuje růstové faktory, které podporují buněčný růst a adhezi. Dále obsahuje minerály, tuky, proteiny a hormony. Nejčastěji používané je plodové hovězí sérum (*Foetal bovine serum* – FBS), dále sérum koňské a lidské. Bezsérové médium se používá ke studiím účinků růstových faktorů. Při kultivaci buněk je také třeba kontroly fyziologického prostředí (pH, teplota, osmotický tlak a množství O₂ a CO₂). K dosažení těchto podmínek slouží inkubátory (Vunjak-Novakovic G., 2006).

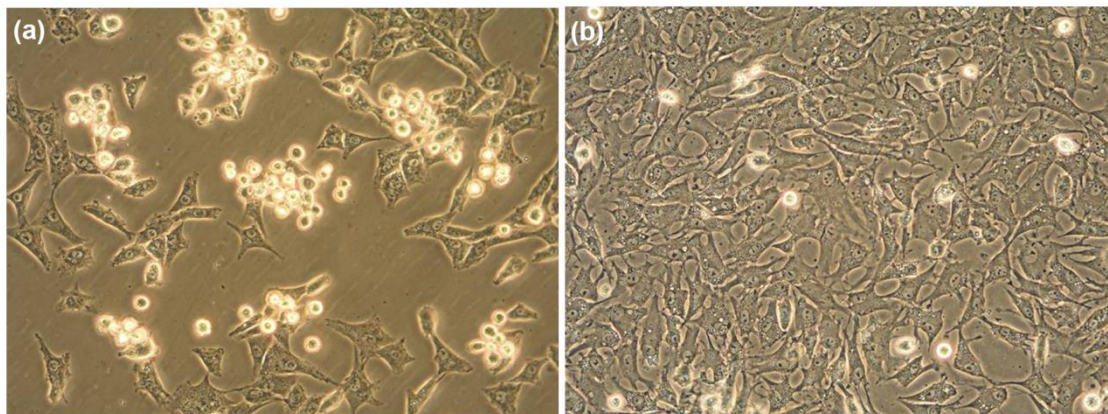
Buňky se v kultivačních nádobách množí do dosažení konfluence (buňky pokrývají celé dno kultivační nádoby). Pokud se buňky začnou navzájem dotýkat, dochází ke kontaktní inhibici a buňky se dále nedělí (Nečas, 2000). V tuto chvíli je potřeba buňky enzymaticky nebo mechanicky uvolnit ode dna a jejich část nasadit do nové kultivační nádoby (pasážování buněk).

2.3.1.1. Chondrocyty

Chondrocyty jsou v tkáňovém inženýrství chrupavky nejčastější volbou. Vyznačují se okrouhlým tvarem a produkcí specifických molekul mezibuněčné hmoty, zejména kolagenu II a glykosaminoglykanů.

Chondrocyty se získávají enzymatickým rozvolněním kousků chrupavky. Jak již bylo řečeno výše, obsahuje kloubní chrupavka pouze omezený počet buněk (pouze asi 1 %). Je tedy nutné buňky před jejich implantací namnožit. Chondrocyty se nasazují do kultivačních lahví a kultivují ve vhodném médiu. Bohužel buňky kultivované v jedné vrstvě (2D kultura) v kultivačních nádobách rychle ztrácejí svůj chondrogenní fenotyp, což je provázeno sníženou produkcí proteoglykanů a kolagenu II a naopak zvýšením produkce kolagenu I. Darling a kol. ukázali ve své studii, že ke změnám v genové expresi chondrocytů (kolagen I a II, aggrecan) dochází již v první pasáži (Darling and Athanasiou, 2005). K ireverzibilní dediferenciaci chondrocytů dochází ve čtvrté pasáži (Schulze-Tanzil et al., 2002, Schulze-Tanzil et al., 2004).

Během kultivace v 2D vrstvě mění chondrocyty svou morfologii z okrouhlého tvaru na oploštěný tvar podobný morfologii fibroblastů (Schulze-Tanzil et al., 2002, Schulze-Tanzil et al., 2004, Schulze-Tanzil, 2009). Postupně se mění struktura cytoskeletu a zvětšuje se průměr buněk (Sasazaki et al., 2008)(Obr. 2.2).



Obr 2.2. Chondrocyty kultivované na kultivačním plastiku si zachovávají svůj chondrogenní fenotyp (okrouhlou morfologií) ještě 4 dny po nasazení (a). Sedmý den kultivace již vykazují morfologii fibroblastů (b).

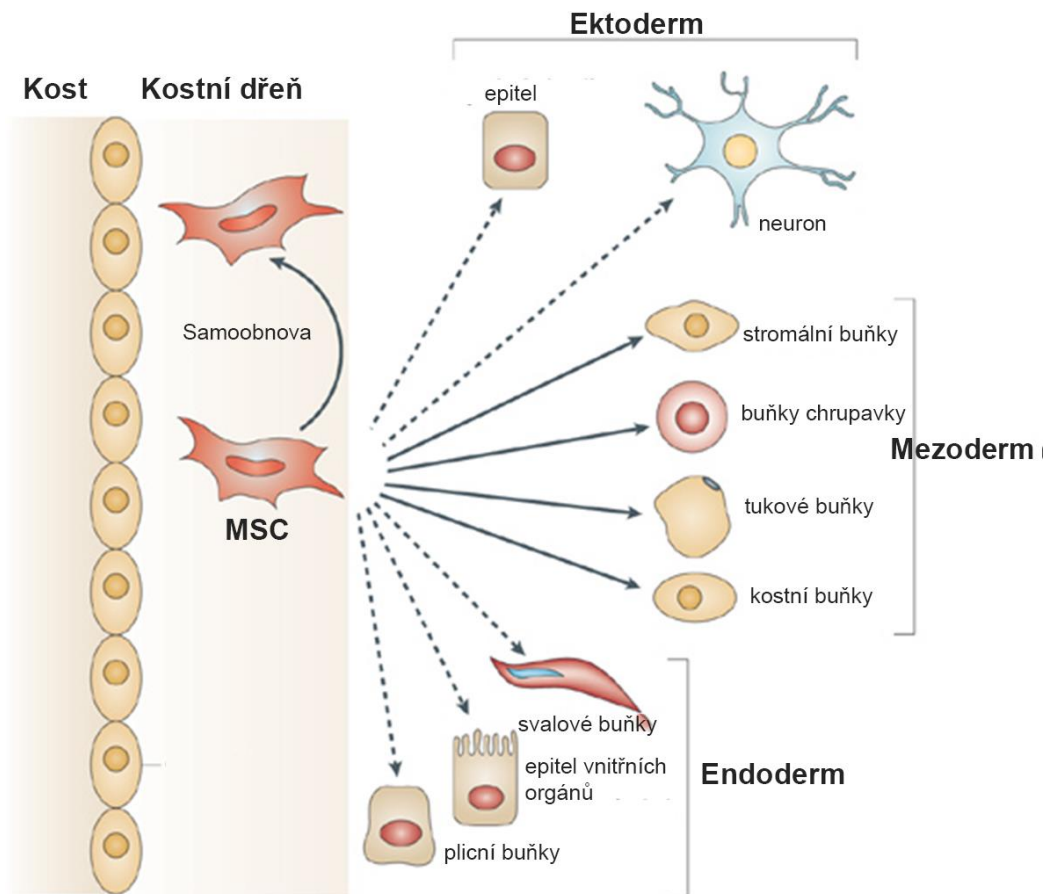
Za účelem zpomalit dediferenciaci chondrocytů nebo je opět rediferencovat se používá různých metod. Dediferenciace je například závislá na hustotě nasazených buněk. Při vyšší hustotě si chondrocyty déle zachovávají svůj fenotyp (Watt, 1988). Důležitým faktorem jsou také kultivační podmínky. Trojdimenzionální kultury napodobují podmínky ve fyziologické chrupavce a chondrocyty si udržují svou morfologii. Právě v prostředí, které podporuje jejich okrouhlý tvar, si chondrocyty zachovávají svůj chondrogenní charakter, spojený s genovou expresí kolagenu II a proteoglykanů (Brodkin et al., 2004). Buňky se kultivují v peletě (Imabayashi et al., 2003), nebo na substrátech jako je agaróza (Darling and Athanasiou, 2005), alginát (Benya and Shaffer, 1982), nebo fibrinové lepidlo (Lin et al., 2006). Dále se používají substráty z přírodních polymerů, jako jsou kolagen (Brodkin et al., 2004, Darling and Athanasiou, 2005), agrekan (Darling and Athanasiou, 2005) nebo fibrinogen (Brodkin et al., 2004). Buňky kultivované na vrstvě agrekanu vykazovaly zlepšenou chondrogenní genovou expresi (Darling and Athanasiou, 2005). Naproti tomu potažení kultivačního plastiku fibronectinem, nebo kolagenem I/II nezpomaluje dediferenciaci chondrocytů (Brodkin et al., 2004, Darling and Athanasiou, 2005).

Odběr kloubní chrupavky potřebné k izolaci chondrocytů je invazivní proces, který může způsobit zdravotní komplikace a ztrátu funkčnosti kloubu. Z tohoto důvodu byly zkoumány i jiné zdroje autologních chondrocytů, jako je například chrupavka ušního boltce, nosního septa, či žebra (Johnson et al., 2004, Isogai et al., 2006, Tay et al., 2004). Johnson a kol. ve své studii prokázal, že chondrocyty izolované z chrupavky kloubní, ušního boltce a

žebra a inkorporované do fibrinového gelu, mají potenciál vytvořit chrupavčitou tkáň *in vivo*. Tato novotvořená chrupavčitá tkáň dobře naléhala na okolní chrupavku a vykazovala dobré mechanické vlastnosti (Johnson et al., 2004).

2.3.1.2. Kmenové buňky

Kmenové buňky vzbuzují na poli tkáňového inženýrství velký zájem. Jedná se o pluripotentní buňky, které se mohou diferencovat do různých buněčných linií (Obr. 2.3). Kmenové buňky mohou být izolovány z kostní dřeně, tukové tkáně, svalů, synoviální tekutiny nebo periostu. Po izolaci mohou být množeny *in vitro* několik pasáží bez ztráty svého diferenciálního potenciálu a poté diferencovány do požadovaného buněčného fenotypu.



Obr 2.3. Mezenchymální kmenové buňky mohou přímo diferencovat do mezodermální linie. Transdiferenciace do ektodermálních a endodermálních buněk je označena čárkovaně, neboť její možnost v organismu je sporná (převzato a modifikováno z (Uccelli et al., 2008).

Mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně (*bone marrow-derived stem cells* - BMSC) procházejí chondrogenézí za různých kultivačních podmínek. Johnstone et al. prokázal, že BMSC kultivované v agregátech v přítomnosti TGF- β procházejí chondrogenní diferenciací (Yoo et al., 1998). Přítomnost TGF- β prokazatelně stimuluje chondrogenní diferenciaci, ovšem je závislá také na použitém nosiči. Byla použita řada nosičů, na kterých v přítomnosti TGF- β docházelo k tvorbě chrupavčité mezibuněčné hmoty: agaróza, alginát (Coleman et al., 2007), kolagen (Yokoyama et al., 2005).

Společná kultivace BMSC a chondrocytů zvyšuje buněčnou proliferaci a podporuje tvorbu chrupavčité mezibuněčné hmoty. Pravděpodobně je to způsobeno sekrecí růstových faktorů kmenovými buňkami a interakcí mezi buňkami (Tsuchiya et al., 2004).

Zajímavým zdrojem kmenových buněk je tuková tkáň. Předností je snadnost izolace bez velké zátěže pacienta a velké množství získaných buněk (Danisovic et al., 2009, Zuk et al., 2001). Tyto buňky mohou za vhodných kultivačních podmínek diferencovat do tukových, svalových, chondrogenních a kostních buněk (Zuk et al., 2002, Zuk et al., 2001, Masuoka et al., 2006).

Mezi další zdroje kmenových buněk patří svaly (Sakaguchi et al., 2005), synovium (Sakaguchi et al., 2005, Yokoyama et al., 2005, Park et al., 2005) a periost (Fukumoto et al., 2003). Sakaguchi a kol. porovnával ve své studii kmenové buňky získané z kostní dřeně, svalu, periostu, tuku a synovia. Nejlepší chondrogenézi vykazovaly buňky získané ze synovia, dále z kostní dřeně a z periostu (Sakaguchi et al., 2005).

Embryonální kmenové buňky (*embryonic stem cells* – ECS) se získávají z embrya ve stádiu blastocysty. Tyto buňky mají velký proliferační potenciál a jsou schopny diferencovat do všech somatických buněčných typů (Kramer et al., 2000). Přesto, že mají ESC obrovský proliferační a diferenciační potenciál, narážejí v klinické praxi na velké problémy se selekcí a čistotou, antigenicitou a zejména etické.

2.3.2. Nosiče pro tkáňové inženýrství

Prvním krokem v tkáňovém inženýrství je návržení a příprava porézního 3D nosiče. Matrice by měla být vyrobena z vysoce biokompatibilního materiálu, který nebude vyvolávat imunitní reakci. Mimoto je materiál polymerního nosiče vybírán tak, aby degradace a resorpce probíhaly kontrolovanou rychlostí od chvíle, kdy je 3D konstrukt osazen buňkami, až do úplného nahrazení funkční novotvořenou tkání *in vivo*. Při pomalé degradaci omezuje materiál tvorbu nové mezibuněčné hmoty, naopak při rychlé degradaci může dojít ke zborcení struktury nosiče (Hutmacher, 2000).

V ideálním případě by měl nosič pro tkáňové inženýrství splňovat tyto podmínky:

1. povrch by měl umožnit buněčnou adhezi a růst
2. při degradaci nosiče by neměly vznikat toxické produkty způsobující zánětlivé reakce *in vivo*
3. materiál by měl umožnit opakovatelnou přípravu 3D struktur
4. porosita nosiče by měla být minimálně 90%, s dostatečně velkými a propojenými póry, aby byl vytvořen velký povrch pro interakci mezi buňkami a materiálem nosiče, dostatečný prostor pro vytvoření mezibuněčné hmoty a nebyla omezena difúze během kultivace *in vitro*
5. nosič by měl sloužit jako podpora pro buňky a po té být vstřebán, do té doby je cizorodý materiál nebezpečný možným vznikem infekce
6. stupeň rozkladu nosiče by měl být volitelný, aby mohl být použit pro různé aplikace s různými typy buněk (Freed et al., 1994b)

Vstřebání materiálu může probíhat několika procesy, podle nichž je můžeme dělit na biodegradabilní, bioresorbovatelné, bioerodilní a bioabsorbovatelné (Hutmacher, 2000).

Biodegradabilní jsou pevné polymerní materiály, které se rozpadají díky makromolekulární degradaci. Dochází k rozptýlení molekul *in vivo*, ale ne k vylučování z organismu.

Bioresorbovatelný je pevný polymerní materiál, který vykazuje velkou degradaci a další resorpci *in vivo*; tj. polymery vylučované přírodní cestou díky jednoduché filtraci degradačních vedlejších produktů nebo jejich metabolizaci. Při bioresorbci tedy dochází k úplnému odstranění původního materiálu a velkou degradaci vedlejších produktů (sloučeniny s nízkou molekulární hmotností) bez zbytkových vedlejších efektů. Použití slova bioresorbovatelný předpokládá, že eliminace je nezvratná.

Bioerodibilní jsou pevné polymerní materiály, které vykazují povrchovou degradaci a kromě toho resorpci *in vivo*. Bioerose je proces, kdy dochází k úplné eliminaci původního materiálu a povrchovou degradaci vedlejších produktů (částice s nízkou molekulární hmotností), bez vedlejších reziduálních efektů.

Bioabsorbovatelné jsou pevné polymerní materiály, které se mohou rozpustit v tělních tekutinách bez rozpadu polymerních řetězců nebo poklesu hmoty. Například se jedná o pomalé rozpouštění ve vodě rozpustných implantátů v tělních tekutinách. Bioabsorbovatelný polymer může být bioresorbovatelný, pokud jsou rozptýlené makromolekuly vyloučeny z organismu.

Při navrhování nosiče se musí vzít v úvahu také množství nasazených buněk a metoda nasazování. Vhodné množství nasazených buněk je důležité pro mezibuněčné interakce. Větší množství nasazených buněk napomáhá tvorbě mezibuněčné hmoty (Iwasa et al., 2003, Huang et al., 2004, Freed et al., 1994a). Množství buněk je omezeno dostatečným přísunem živin a transportu odpadních produktů. Metoda nasazení buněk závisí na typu nosiče. U nosičů jako jsou pěny nebo vlákenné nosiče je s výhodou použít dynamického nasazování, které napomáhá lepší distribuci buněk (Freed et al., 1994a). Hydrogely poskytují rovnoměrnou distribuci buněk. Je důležité dobré promíchání buněčné suspenze s materiálem nosiče před jeho ztuhnutím.

2.3.2.1. Druhy nosičů

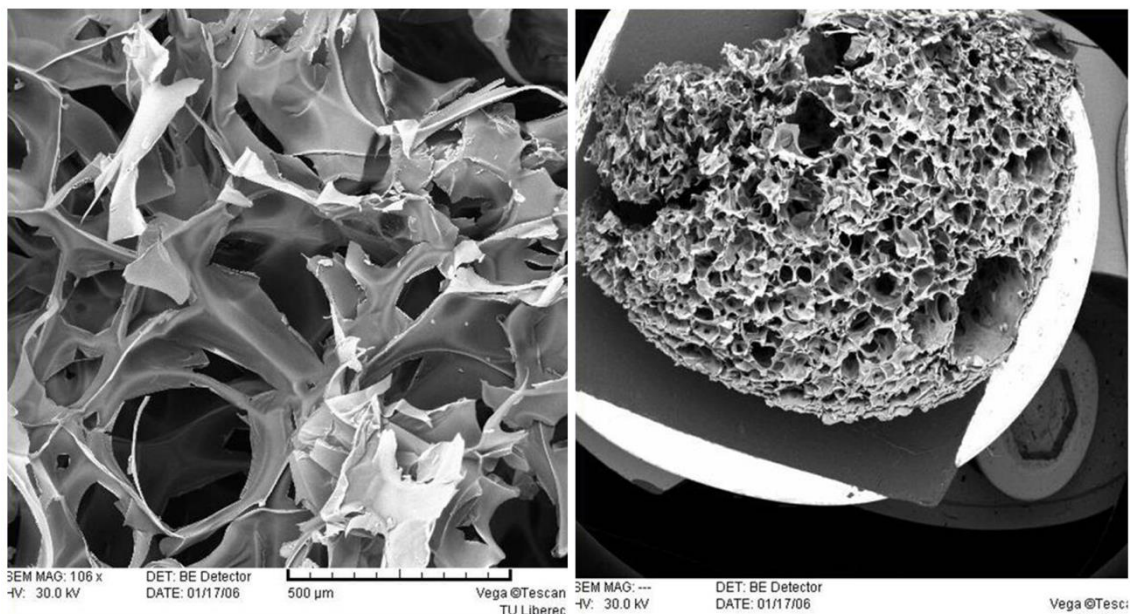
2.3.2.1.1. Hydrogely

Hydrogel je síť polymerních řetězců nerozpustná ve vodě. Hydrogely mají velký potenciál vázat v sobě vodu. Mohou obsahovat až kolem 90 % vody (Buckwalter and Mankin, 1998). Tento materiál umožňuje dobrý transport živin a odpadních produktů a také homogenní distribuci buněk. Ty si udržují svůj okrouhlý tvar a tak i svůj chondrogenní fenotyp. Struktura hydrogelu je vhodná pro přenos mechanických sil. Tlak na buňky inkorporované v nosiči je podobný fyziologickému stavu. Mechanická pevnost hydrogelů může být upravena síťováním, které ovšem může ohrozit viabilitu buněk (Bryant and Anseth, 2002). Omezená mechanická pevnost je hlavní nevýhodou hydrogelů.

Velkou výhodou hydrogelů je, že mohou být injikovány přímo do místa postižení a vyplnit tak defekty různých tvarů a velikostí. Následně mohou být síťovány chemicky (Behravesch et al., 2002), nebo fyzikálně pomocí světla (Wang et al., 2003), tepla (Park et al., 2009, Rowley et al., 1999), iontů (Rowley et al., 1999). Metoda a intenzita síťování, molekulová hmotnost a koncentrace materiálu, ovlivňují vlastnosti hydrogelu: mechanické vlastnosti, míru bobtnání, viabilitu buněk a rychlost degradace.

2.3.2.1.2. Pěny

Pěny jsou porézní nosiče, jejichž vlastnosti udává porosita, velikost pórů a jejich propojení (Obr. 2.4). Celková porosita určuje velikost povrchu a ovlivňuje buněčnou adhezi. Velikost a propojenost pórů ovlivňuje buněčnou migraci a transport živin. Obecně se upřednostňují pěny s vysokou porositou a propojenými póry. Architekturu pěnového nosiče ovlivňuje především způsob jeho přípravy.



Obr. 2.4. Ukázka želatinových pěn (vizualizace SEM).

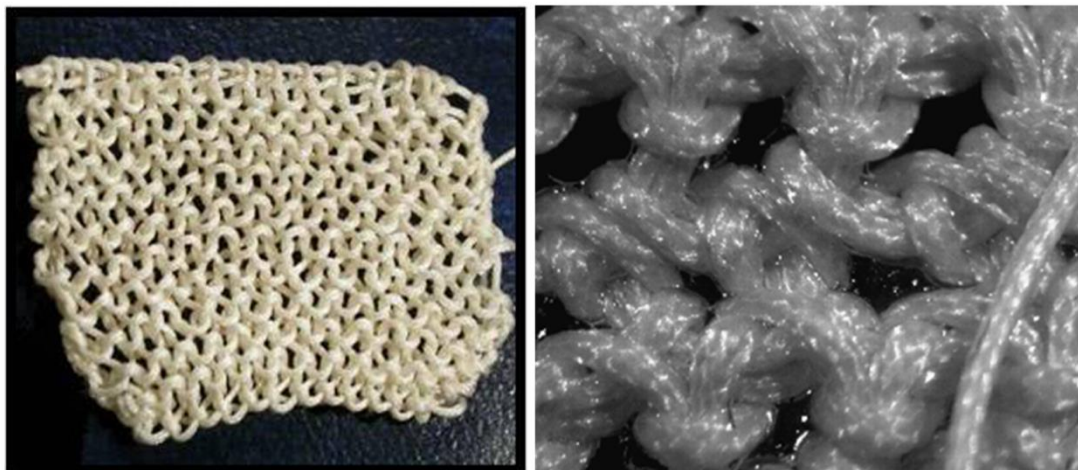
Jednou z metod používaných na přípravu pěn je rozpuštění polymeru ve vhodném rozpouštědle, smíchání s částicemi vhodné velikosti (porogenem) a odlití do formy požadovaného tvaru (*solvent casting*). Tato metoda umožňuje přípravu nosičů s kontrolovatelnou porositou, ovšem s omezenou tloušťkou. Jako porogen mohou být použity anorganické soli (*salt leaching*), krystalky sacharózy, želatiny, nebo kuličky parafinu (*porogen leaching*) (Deng et al., 2003, Sato et al., 2004). Velikost částic a poměr množství částic k objemu roztoku polymeru ovlivňuje výslednou porositu nosiče. Dalším krokem je odpaření rozpouštědla, čímž získáme pevný materiál obsahující porogen. Ten je následně vymyt vodou, nebo jiným vhodným rozpouštědlem, které rozpustí materiál porogenu, nikoli samotný nosič. Vymytím částic je dosaženo porézního nosiče. Je možno připravit vysoce porézní matrice s porositou až 93% a průměrnou velikostí pórů do 500 µm. Výhodou metody je jednoduchost přípravy, bez nároků na speciální vybavení. Vzhledem k potřebě vymytí částic z materiálu nosiče lze touto metodou ovšem připravovat pouze tenké vrstvy.

Další metodou k přípravě pěn je mrazová sublimace neboli lyofilizace (*freeze-drying*) (Daamen et al., 2003, Griffon et al., 2006). Při této metodě dochází k odstranění rozpouštědla (většinou vody) sublimací ze zmrzlého vzorku za snížené teploty a tlaku. Teplota je snížena tak, aby celá hmota polymerního roztoku byla zmrazena, což má za následek tvorbu krystalků

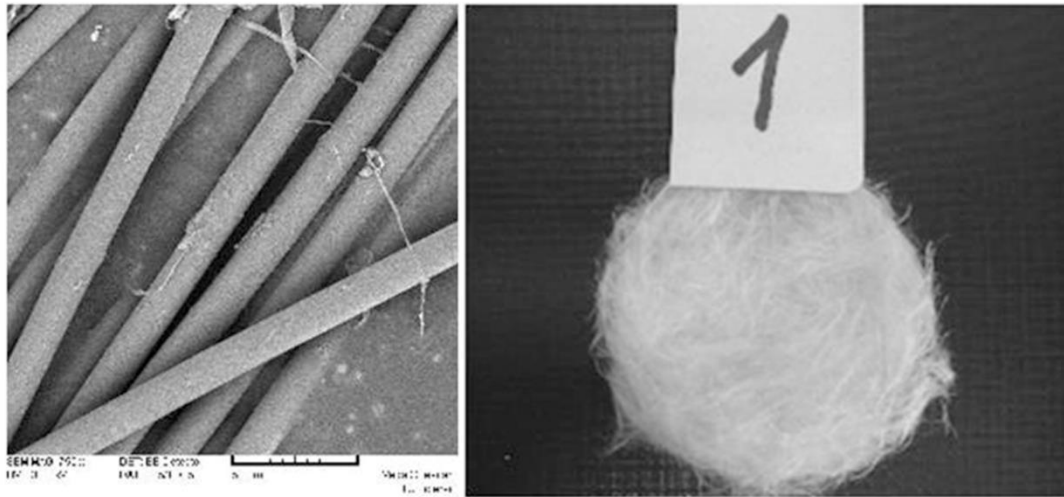
ledu. Molekuly polymeru jsou shromažďovány do mezer mezi krystaly. Následně je snížen tlak a dochází k sublimaci rozpouštědla. Úplného vysušení vzorku je dosaženo konečným mírným zahřáním. Sublimace krystalků ledu má za následek vytvoření vysoce porézní pěny, jejíž struktura je ovlivněna podmínkami procesu, jako je pH, stupeň zmražení a parciální tlak (Doillon et al., 1986, Maquet et al., 2003).

2.3.2.1.3. Vlákenné nosiče

Vlákenné nosiče se připravují z vláken o různé tloušťce a hustotě. Mohou být tkané nebo netkané. Netkané nosiče se vyznačují zejména velkým prostorem mezi vlákny a dávají tak prostor tvorbě nové mezibuněčné hmoty (Obr. 2.5). Naproti tomu tkané nosiče poskytují lepší mechanické vlastnosti a mohou být připraveny s volitelnou porositou (Valonen et al., 2010).



Obr. 2.5. Ukázka tkaných nosičů připravených z šicího materiálu z kys. polyglykolové.

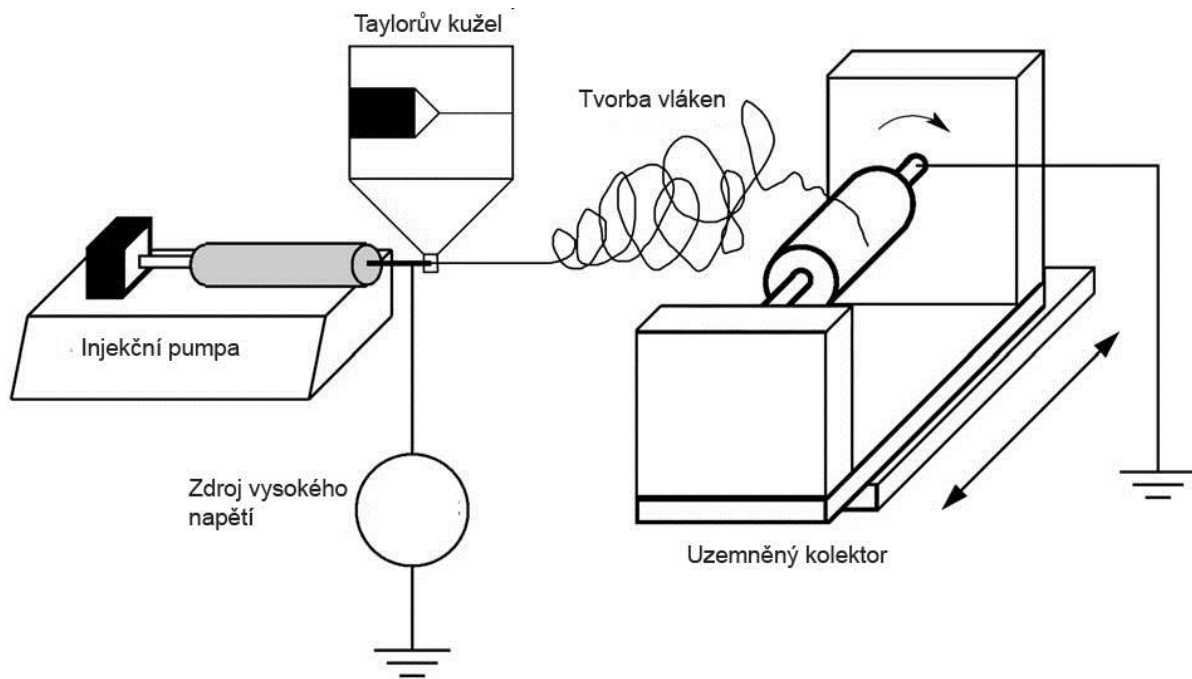


Obr. 2.6. Ukázka netkaných textilií připravených z textilních vláken (vlevo), metodou naplavování. Výsledný nosič vykazuje velkou porositu s propojenými póry (vpravo).

Velkou pozornost na poli tkáňového inženýrství vzbuzují nanovlákná. Jako nanomateriály označujeme částice nebo vlákna, která alespoň v jednom rozměru nepřesahují velikost 1000 nm. Díky svým malým rozměrům napodobují vlastnosti přírodní tkáně a velkou porositou umožňují dobrou komunikaci mezi buňkami.

Nanovlákná je možno připravit různými způsoby, jako je dlužení, podložková syntéza, fázová separace nebo samo-organizování. Výrobní postup, který se zdá být nejvýhodnější z hlediska produkce nanovláken ve velkém množství je elektrostatické zvlákňování (electrospinning).

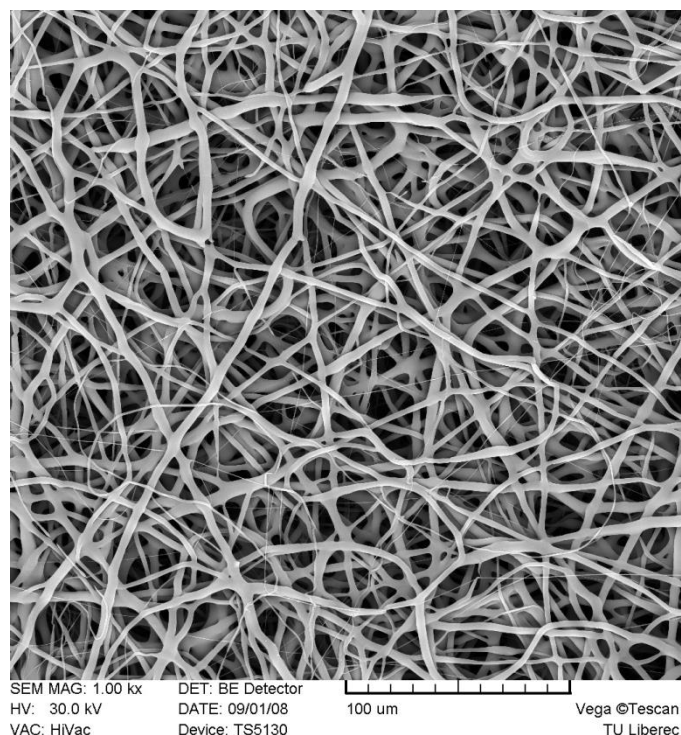
Metoda elektrostatického zvlákňování je postavena na využití pole vysokého napětí. Materiál se zvlákňuje z roztoku, nebo taveniny, která je spojena s jednou elektrodou (zvlákňovací tryskou nebo kapilárou). Díky vysokému napětí mezi špičkou trysky a polymerem na uzemněném kolektoru vzniká tzv. Taylorův kužel. Ten je způsoben rozdíly mezi povrchovým nábojem a povrchovým napětím kapaliny, kdy je kapka deformována do kónického tvaru. Z vrcholu kužele vychází proud nabitého roztoku, který je přitahován ke kolektoru. Proud se v elektrickém poli zrychluje a ztenčuje. Postupně se z něj odpařuje rozpouštědlo, polymerní vlákna tuhnou a tvoří vrstvu na povrchu sběrné elektrody - kolektoru (Lukáš et al., 2009, Sill and von Recum, 2008)(Obr. 2.7).



Obr. 2.7. Schéma elektrostatického zvlákňování

Kvalita vláken je závislá na parametrech výrobního procesu, jako je použité napětí, vzdálenost zvlákňovací trysky nebo kapiláry od kolektoru a vlastnosti taveniny nebo polymerního roztoku. Zvlákňovací vlastnosti materiálu jsou dané molekulovou hmotností polymeru, jeho koncentrací, viskozitou, povrchovým napětím a hustotou. Mezi další parametry patří rychlost odpařování rozpouštědla, vodivost roztoku a okolní parametry (teplota, vlhkost a rychlost proudění vzduchu v komoře). V neposlední řadě mohou být parametry nanovlákněné vrstvy ovlivněny vodivostí a morfologií kolektoru (Sill and von Recum, 2008).

Nanovlákněné nosiče se vyznačují vysokou porositou, velkou propojeností pórů a průměrem vláken připomínajícím vlastnosti mezibuněčné hmoty. Tyto vlastnosti jsou velmi výhodné pro účely tkáňového inženýrství (Obr. 2.8).



Obr. 2.8. Ukázka nanovláknenné vrstvy, nanovláknna PCL vizualizovaná pomocí SEM.

2.3.2.2. Materiály pro přípravu nosičů

V současné době se v tkáňovém inženýrství používá velké množství přírodních i syntetických materiálů. S výhodou je použít biodegradabilní a bioresorbovatelné polymery, které jsou schválené pro použití v humánní medicíně, například jako vstřebatelný šicí materiál (kyselina polyglykolová (PGA), polylaktidy (PLLA, PDLA), polykaprolakton (PCL), atd.). Další možností je použití materiálu z velkého množství biokompatibilních polymerů, které ještě nejsou schváleny pro klinické účely. Schválení takového materiálu je ovšem velmi složitý a nákladný proces. Mezi tyto materiály patří například polyorthoester (POE), polyanhydridy, polyglycerol sebakát (PGS) a polyuretany (PU). Syntéza nových polymerních biomateriálů, jako je poly(lactic acidcolysine), umožňuje selektivní působení na specifické buněčné fenotypy a ovlivnění jejich diferenciaci, proliferace a tvorby nově vytvořené tkáně (Hutmacher, 2000).

2.3.2.2.1. Přírodní materiály

Výhodou přírodních materiálů je jejich biodegradibilita, nízká toxicita a většinou i nízká cena. Navíc přírodní materiály většinou umožňují interakci s buňkami přes jejich povrchové receptory. Ovšem tyto interakce mohou zároveň iniciovat reakci imunitního systému. Další nevýhodou přírodních materiálů jsou zpravidla horší biomechanické vlastnosti a možnost enzymatické degradace v organismu. Komplikací využití těchto materiálů v humánní medicíně může být zdroj a čistota materiálu a nízká reprodukovatelnost. Nejčastěji používané přírodní polymery v tkáňovém inženýrství chrupavky jsou kolagen, kyselina hyaluronová, chitosan, fibrin a alginát.

Kolagen

Kolagen je v tkáních savců vůbec nejčastější protein. Vyskytuje se v mezibuněčné hmotě většiny tkání (kůže, kost, chrupavka, šlachy, cévy, zuby), kde zastává hlavní úlohu v strukturální a mechanické podpoře. Molekula kolagenu je tvořena třemi polypeptidovými řetězci, které jsou ovinuty kolem sebe. Fibrily jsou navzájem spojeny kovalentními vazbami, které dodávají celé síti mechanickou pevnost (Nečas, 2000).

Vlastnosti kolagenu jako je biodegradibilita, biokompatibilita a vazba s buňkami z něj dělají ideální nosič pro tkáňové inženýrství. Bylo prokázáno, že kolagenové nosiče podporují buněčnou adhezi a proliferaci (O'Brien et al., 2005). Kolagen byl připraven ve formě pěn (O'Brien et al., 2005), gelu (Zhang et al., 2012) i nanovláken (Thomas et al., 2007, Zhong et al., 2006).

Nevýhodou použití kolagenu jako nosiče pro tkáňové inženýrství je jeho rychlá degradace a tím rychlá ztráta jeho mechanických vlastností (Angele et al., 2004). Byla snaha tento problém řešit a prodloužit dobu rozpustnosti kolagenu přidáním různých složek, jako například minerálů, přírodních, nebo syntetických polymerů. Z přírodních polymerů byl použit elastin a glykosaminoglykany (Daamen et al., 2003), ze syntetických metakrylát (Woerly et al., 1991). Zlepšení mechanických vlastností kolagenu bylo dosaženo také síťováním (Zhong et al., 2006, Harriger et al., 1997).

Chitosan

Chitosan je netoxický a biodegradabilní polysacharid, který je tvořen deacetylací chitinu, produkovaného mořskými koryši (Nettles et al., 2002). Chondrocyty kultivované na nosičích na bázi chitosanu si udržují svou oválnou morfologii a syntetizují specifické proteiny mezibuněčné hmoty (Iwasaki et al., 2004, Lahiji et al., 2000, Risbud et al., 2001).

Nosiče s dobrou porositou je snadné z tohoto materiálu připravit rozličnými procesy, například lyofilizací (Nettles et al., 2002, Di Martino et al., 2005), nebo elektrostatickým zvláknováním (Skotak et al., 2008, Zhang et al., 2007b). Často je také chitosan využívám ve formě hydrogelu (Richardson et al., 2008).

Ve formě nanovláken byl použit v kombinaci s PVA (Zheng et al., 2001, Zhang et al., 2007b), polyethylenoxidem (PEO) (Kriegel et al., 2009), polykaprolaktonem (PCL) (Shalumon et al., 2010) nebo polylaktidem (Skotak et al., 2008). Přítomnost syntetické složky v nosiči ovlivnila mechanické vlastnosti a rychlost degradace. Chitosan byl rovněž použit ve formě injikovatelných mikrosfér a implantován *in vivo* do potkana (Mi et al., 2002). Mikrosféry vykazovaly vysokou biokompatibilitu a byly stabilní i po 20 týdnech.

Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (*hyaluronic acid* – HA) je častěji nazývána jako hyaluronan, protože se vyskytuje jako polyanion, a ne jako samotná kyselina. Jedná se o makromolekulární polysacharid s molekulární hmotností v řádech 10^3 - 10^7 (Laurent et al., 1995). Hyaluronan je jednou z hlavních komponent mezibuněčné hmoty pojivových tkání. Má funkci nejen strukturální, ale zároveň interaguje s proteiny, proteoglykany a ostatními bioaktivními molekulami a přispívá k udržování rovnováhy vody v tkáních. V kloubní chrupavce se chová jako lubrikant a ochraňuje tak povrch chrupavky. Hyaluronan je rozpoznatelný buněčnými receptory a hraje úlohu v buněčném chování, zánětlivých procesech, angiogenezi a hojení (Campoccia et al., 1998).

HA hydrogel v kombinaci s embryonálními kmenovými buňkami byl testován *in vivo* pro regeneraci osteochondrálního defektu potkana (Toh et al., 2010). Již po 12 týdnech byl defekt regenerován nově vytvořenou chrupavkou hyalinního charakteru. Obohacení kolagenového nosiče HA přispělo k lepší integraci MSC a syntéze proteinů mezibuněčné hmoty (Matsiko et al., 2012). Pro zpomalení degradace byl HA hydrogel úspěšně

modifikován pomocí metakrylátu (Hahn et al., 2007). Nanovlákná z HA byly připraveny pomocí jehlového zvlákňování (Um et al., 2004) a zvlákňováním ze směsi, například s želatinou (Li et al., 2006).

Fibrin

Fibrin je biopolymer, který je v tkáňovém inženýrství často využíván. Vzniká polymerizací monomeru fibrinogenu. Molekula fibrinogenu se skládá ze tří polypeptidických řetězců $A\alpha$, $B\beta$ a γ , které jsou spojeny šesti disulfidickými můstky (Ahmed et al., 2008). Fibrin se tvoří za přítomnosti trombinu spojením fibrinopeptidu A z řetězce $A\alpha$ a fibrinopeptidu B z řetězce $B\beta$.

V tkáňovém inženýrství chrupavky se fibrin používá zejména ve formě gelů. Chondrocyty osazené do fibrinového gelu si udržují svůj fenotyp a produkují proteiny typické pro hyalinní chrupavku (Eyrich et al., 2007). V kombinaci s kyselinou hyaluronovou byl fibrin úspěšně použit také jako materiál pro regeneraci tracheální chrupavky *in vivo* na modelu králíka (Kim et al., 2010).

Alginát

Alginát je přírodní polysacharid, vyskytující se v buněčných stěnách hnědých řas a je také exopolysacharidem produkovaným bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Pawar and Edgar, 2012). V tkáňovém inženýrství byl použit ve formě gelu (Stevens et al., 2004), vysoce porézní pěny (Wang et al., 2011) nebo nanovláken (Bonino et al., 2011).

Chondrocyty kultivované v alginátových nosičích si zachovávají svou oválnou morfologii a exprimují složky mezibuněčné hmoty, jako je kolagen II a proteoglykany (Stevens et al., 2004, Wang et al., 2011). Potenciál alginátového nosiče pro regeneraci chrupavky byl potvrzen také *in vivo* studiemi, kdy již po 4 týdnech byla patrna tvorba nové chrupavčité tkáně (Wang et al., 2012).

Celulóza

Celulóza je v přírodě velmi rozšířený materiál. Produkují jí rostliny a řasy, syntetizují jí také bakterie, nebo může být syntetizována chemicky. Byla použita ve formě nanovláken připravených elektrostatickým zvlákňováním (Liu and Hsieh, 2002), tenkých vrstev (Rambo et al., 2008, Verma et al., 2008) nebo pěn (Verma et al., 2008). Celulóza není *in vivo* degradovatelná, je možné ji modifikovat například oxidací pomocí jodistanů (Li et al., 2009).

Bakteriální celulóza je produkována bakteriemi *Acetobacter xylinum*. Je vysoce biokompatibilní, má nanovláknennou strukturu a velkou pevnost v tahu (Geyer et al., 1994, Svensson et al., 2005, Klemm et al., 2001, Rambo et al., 2008). Byla testována jako materiál pro náhradu cév (Klemm et al., 2001) a chrupavek (Svensson et al., 2005, Muller et al., 2006). Nosič z celulózy byl osazen chondrocyty a byl sledován růst a diferenciací chondrocytů (Svensson et al., 2005). Po osmi dnech kultivace byla zachována buněčná diferenciací. Mechanickými vlastnostmi se nosič blížil nativní chrupavce.

Polyhydroxyalkonáty

Tato skupina polyesterů je syntetizována rozličnými mikroorganismy při přerůstání kultur, kdy slouží jako zásobníky energie (Ye et al., 2009). Výhodou těchto materiálů je biokompatibilita a jednoduchost přípravy, stejně jako široké spektrum mechanických a biodegradabilních vlastností, které je dáno velkým množstvím těchto molekul a možností jejich kombinace. Patří sem například polyhydroxy butyrát (PHB), který byl testován ve formě pěn, připravených metodou vymývání částic (Deng et al., 2003). Chondrocyty nasazené na nosiče z PHB produkovaly mezibuněčnou hmotu typickou pro kloubní chrupavku.

2.3.2.2.2. Syntetické materiály

Syntetické materiály jsou lépe kontrolovatelné a předvídatelné díky možnosti kontroly chemických a fyzikálních vlastností. Tím se mohou měnit mechanické a degradační vlastnosti nosiče. Nevýhodou syntetických materiálů je, že nedochází k interakci mezi

materiálem a povrchovými receptory buněk. To hraje roli především v buněčné adhezi a komunikaci, přímé degradaci a přestavbě mezibuněčné hmoty.

Polyhydroxy estery

Polyhydroxy estery jsou biodegradabilní syntetické polymery, které se často používají v medicínských aplikacích a také v tkáňovém inženýrství. Jsou schválené jako vstřebatelný šicí materiál, materiál pro přípravu stentů a fixačních přípravků v ortopedii (Freed et al., 1994b, Lee and Shin, 2007, Rokkanen et al., 2000, Schaefer et al., 2000). Patří sem kyselina polyglykolová (poly(glycolic) acid - PGA), polymléčná (poly(lactic acid) - PLA) a jejich kopolymery (poly(lactic-*co*-glycolic acid) – PLGA).

Tyto materiály se snadno připravují a jejich fyzikální a chemické vlastnosti mohou být přizpůsobeny molekulovou hmotností a poměru kopolymerů. Bylo jich použito v mnoha studiích v rozličných formách, jako jsou nanovlákná, pěny (Lu et al., 2000) nebo vláknenné nosiče (Schaefer et al., 2000, Freed et al., 1994b, Shum and Mak, 2003).

Degradace polyhydroxy esterů probíhá v několika krocích. Jakmile se materiál dostane do vodného prostředí, dochází k hydrolyze esterových vazeb a poklesu molekulové hmotnosti. Objem materiálu se ovšem příliš nemění až do doby, kdy se řetězce nezkrátí natolik, že mohou volně difundovat z polymerní hmoty (Agrawal and Athanasiou, 1997). Během degradace se PGA a PLA rozpadá na kyselinu glykolovou, respektive mléčnou, které jsou enzymaticky odbourány na vodu a oxid uhličitý (Agrawal and Athanasiou, 1997, Athanasiou et al., 1996). Kyselé degradační meziprodukty mohou způsobovat silnou zánětlivou reakci (Bostman and Pihlajamaki, 2000, Lu et al., 2000). Rychlost degradace závisí na několika faktorech, jako je molekulová hmotnost, pH, velikost a struktura implantovaného nosiče, chemické složení a struktura, postup přípravy nosiče. Důležitá je také pufrovací schopnost okolního prostředí nebo tkáně.

Degradace polyhydroxy esterů může být upravena kombinací s jinými materiály. Byl sledován pozitivní vliv pufrovacích částic, jako jsou uhličitán vápenatý, uhličitán sodný, hydroxyapatit, wollastine nebo bioglass 45S5 (Agrawal and Athanasiou, 1997, Ara et al., 2002, Day et al., 2004).

Poly- ϵ -kaprolakton je lineární biodegradabilní polyester, který se rovněž hojně využívá v medicíně jako vstřebatelný šicí materiál a fixační šrouby v ortopedii. Jeho rychlost degradace je pomalejší než u PLA a PGA, díky jeho struktuře a hydrofobicitě. Byl použit ve formě tkané textilie (Valonen et al., 2010) nebo nanovláken (Li et al., 2005). Byla prokázána schopnost chondrogenese na těchto nosičích.

Jeong a kol. ve své studii porovnával PCL s dalšími dvěma polyestery, poly(1,8-oktanol-citrát) (POC) a polyglycerol sebakát (PGS) (Jeong and Hollister, 2010). Nosiče měly stejnou strukturu a porositu. Nejlepší vrůst buněk a syntéza proteinů specifických pro hyalinní chrupavku byl sledován u nosiče z POC, nejhorší pak u PGS. Přesto, že nosič z PCL měl nejlepší mechanické vlastnosti, byl zaznamenán nejhorší vrůst buněk. Chondrocyty na povrchu PCL nosiče vykazovaly dobrou diferenciaci, nikoli buňky uvnitř.

Polyuretany

Polyuretany jsou bioresorbovatelné materiály, jejichž výhodou je velká variabilita ve vlastnostech nosiče, která je dána širokou paletou chemických vlastností, molekulárních hmotností a strukturou molekul. Lze tak ovlivňovat mechanické, biologické a fyzikální vlastnosti výsledného materiálu. Mají výborné mechanické vlastnosti, což je činí vhodné pro použití v tkáňovém inženýrství kostí a chrupavky.

Chondrocyty adherují a proliferyjí na porézních nosičích z těchto materiálů, limitace představuje dediferenciaci buněk při delší kultivaci (Grad et al., 2003). Biokompatibilita tří různých polyuretanů byla potvrzena studií *in vivo* (Laschke et al., 2009).

2.3.3. Stimulační faktory

K dosažení a vylepšení buněčné proliferace a formace chrupavčité tkáně se v tkáňovém inženýrství využívá stimulačních faktorů. Patří sem růstové faktory, genová terapie a mechanická stimulace pomocí bioreaktoru.

2.3.3.1. Růstové faktory

Buněčná aktivita a procesy v tkáních jsou ovlivňovány různými molekulami, jako jsou hormony, cytokiny a růstové faktory. Právě růstové faktory (*angl. Growth factor – GF*) jsou v tkáňovém inženýrství hojně využívány. Jedná se o proteiny, které jsou uvolňovány mnoha druhy buněk. Zprostředkovávají přes povrchové receptory komunikaci mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou, hrají roli při buněčné migraci, diferenciaci, proliferaci a apoptóze (programová buněčná smrt). Ukazuje se, že mechanismy účinku růstových faktorů závisejí na koncentraci, expozičním čase a fenotypu daných buněk.

Přirozeně jsou růstové faktory uvolňovány z buněčných linií a řídí zdravý vývoj a růst buněk, nebo při hojení tkáně po úrazu (Barrientos et al., 2008). Mechanismus účinku růstových faktorů je jejich navázání na specifické receptory na povrchu buněk, které dále ovlivňují buněčné funkce (Riedel et al., 2006). Jeden růstový faktor může být produkován více typy buněk a zároveň jeden faktor může působit na různé buněčné typy stejným účinkem (pleiotropismus).

Růstové faktory a jiné stimulační látky mohou být přidávány do kultivačního média při kultivaci *in vitro*, nebo přímo do nosiče. Byla testována řada růstových faktorů, jako transformující růstový faktor (*transformic growth factor- β* , TGF- β), fibrogenní růstový faktor (*fibroblast growth factor*, FGF), kostní morfogenní protein (*bone morphogenic protein*, BMP) nebo insulin růstový faktor (*insulin like growth factor*, IGF) a dalších stimulačních látek, například kyselina hyaluronová (*hyaluronic acid*, HA), chondroitin sulfát nebo insulin. Tyto faktory byly studovány jak samostatně, tak v kombinaci. Jejich účinek je závislý na typu buněk a kultivačních podmínkách.

V chrupavce se vyskytují různé isoformy TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), které mají zásadní vliv na chondrogenezi a formaci chrupavčité tkáně, zvyšují syntézu proteoglykanů a zabraňují degradaci chrupavčité tkáně inhibicí matrixové metaloproteinázy (MMP). Tyto růstové faktory jsou často používány k vyvolání chondrogeneze u embryonálních kmenových buněk (Hwang et al., 2006), MSC (Coleman et al., 2007, Sakaguchi et al., 2005, Imabayashi et al., 2003), zvýšení syntézy chrupavčité mezibuněčné hmoty (Kim et al., 2003) a zlepšení proliferace chondrocytů (Tay et al., 2004). Účinky jednotlivých členů rodiny TGF- β se liší. TGF- β 1 navozuje počáteční chondrogenní diferenciaci, zvyšuje syntézu agrekanu a kolagenu II a odpovídá za mezibuněčné interakce

progenitorových buněk (Tuli et al., 2003), TGF- β 2 zprostředkovává hypertrofickou diferenciaci a TGF- β 3 má vliv na pozdější diferenciaci (Grimaud et al., 2002).

IGF-1 je exprimován v nově se vyvíjející chrupavce, zralé chrupavce a synoviální tekutině. Je znám pro svou úlohu v buněčné proliferaci a inhibici buněčné smrti (apoptózy). Stimuluje produkci proteoglykanů a kolagenu II (Phornphutkul et al., 2004). Druhý ligand, IGF-2, hraje podobnou roli jako IGF-1, má ovšem nižší efekt.

FGF-2 stimuluje tvorbu DNA a RNA a je mitogen pro většinu buněk. V nižších koncentracích podporuje syntézu GAG a kolagenu (Olney et al., 2004), ve vyšších má opačné účinky a tvorbu mezibuněčné hmoty utlumuje. Hlavní funkce FGF-2 v reeneraci chondrálních defektůp je stimulace proliferace progenitorových buněk (Hughes et al., 2006). Bylo prokázáno, že FGF přispívá k zachování chondrogenního charakteru chondrocytů rostoucích v kultivačních nádobách (Miot et al., 2006, Martin et al., 2001) a zvýšení buněčné proliferace (Schmal et al., 2005, Miot et al., 2006).

Většina biologických činidel má krátký poločas rozkladu, což omezuje jeho účinky *in vivo*. Alternativní metodou, jak inkorporovat bioaktivní molekuly do nosiče je genová terapie. Tato terapie je založená na pozměnění genové informace buněk, které poté produkují potřebné proteiny. Buňky jsou izolovány z kloubní chrupavky, transfekovány požadovaným genem a vráceny zpět do kloubu (Saraf and Mikos, 2006). K tranfekci buněk je možno použít virových vektorů (retroviry, adenoviry), nebo polymery a liposomy. Virové vektory mají výrazně vyšší úspěšnost transfekce (80 – 90%), ale představují zdravotní riziko, neboť mohou vyvolávat imunitní reakci. Pro polymery a liposomy je úspěšnost transfekce nižší (40 – 50%), jsou ovšem jednodušší na přípravu, představují menší zdravotní riziko a umožňují tvorbu delších plasmidů.

2.3.3.2. Mechanická stimulace

Je velmi komplikované napodobit biologické procesy odehrávající se v živém organismu v *in vitro* podmínkách. K tomuto účelu jsou vyvíjeny bioreaktory, které mají takové podmínky simulovat. Chrupavka je za fyziologických podmínek vystavena sníženému množství kyslíku a nepravidelnému zatěžování. Mechanická stimulace ovlivňuje

metabolickou aktivitu chondrocytů. Napodobením těchto podmínek lze dosáhnout lepší buněčné diferenciaci *in vitro*.

Mechanické vlastnosti chrupavky jsou dány velkým množstvím vody v tkáni (70 – 80% nativní hmotnosti), která je vázána na negativně nabitě molekuly proteoglykanů. Fyziologicky je chrupavka v kolenním kloubu vystavována tlakům mezi 3 a 10 MPa (Afoke et al., 1987). Průměrná frekvence kroků je 1 Hz (Waters et al., 1988). Mechanické vlastnosti kloubní chrupavky se liší v různých hloubkách tkáně, což je dáno různým zastoupením proteoglykanů a orientací kolagenních vláken (Temenoff and Mikos, 2000, Guilak et al., 1995, Elder and Athanasiou, 2009).

K přiblížení se fyziologickým podmínkám v organismu bylo vytvořeno pro tkáňové inženýrství několik bioreaktorů. Tyto bioreaktory by měly v ideálním případě umožňovat rychlý a správný vývoj funkční tkáně *in vitro* z buněk nasazených na trojdimenzionální nosič. Bioreaktory jsou navrženy tak, aby umožňovaly jednu, nebo více z následujících funkcí:

1. rovnoměrné rozložení buněk v trojdimenzionálním nosiči
2. kontrola kultivačních podmínek (teplota, pH, množství kyslíku, živin, metabolitů a regulačních molekul)
3. usnadnění přenosu mezi buňkami a kultivačním prostředím
4. umožňovat relevantní fyzikální signály (jako je například komprese pro chrupavku nebo pulzní tlak a napětí pro srdeční sval)

Výběr bioreaktoru závisí na druhu stimulované tkáně a konkrétním využití. Poměrně jednoduchým bioreaktorem je kultivační lahev s upevněným nosičem, kde je pomocí míchadla promícháváno médium (*Spinner flask*). Podmínkou je, aby byl nosič stabilní po dlouhou dobu (Vunjak-Novakovic et al., 1998). Pro pevné stabilní nosiče je určen i rotační bioreaktor, sestávající z rotující komůrky vyplněné kultivačním médiem, kam je uložen vzorek. Komůrka rotuje definovanou rychlostí a tím dochází k promíchávání média (Goldstein et al., 2001).

Ke kultivaci méně stabilních nosičů může být použit perfusní bioreaktor. Tento systém se skládá z komůrky s nosičem, peristaltické pumpy a reservoáru s médiem, umístěný v CO₂ inkubátoru (Liao et al., 2010). Pro stimulaci zátěže chrupavkových implantátů se může použít hydrostatického tlakového systému, který využívá konstantního nebo cyklického hydrostatického tlaku (Watanabe et al., 2005). Dalším typem bioreaktoru je pulsační bioreaktor, který byl vyvinut zejména, aby simuloval krevní tok v umělých cévách. Jedná se o uzavřený perfusní systém, který se skládá z kultivační komůrky, reservoáru média, peristaltické pumpy a magnetické chlopně kontrolované počítačem (Xu et al., 2007).

2.3.4. Řízené dodávání léčiv

Růstové faktory a další bioaktivní látky jsou nezbytné pro buněčnou proliferaci a stimulaci diferenciac buněk do požadovaného fenotypu. Ovšem podávání léčiv a jiných stimulačních faktorů do organismu může být provázeno jeho nežádoucím toxickým zatížením. Některé látky nemusí projít biologickou bariérou, nebo mohou být enzymaticky odbourány ještě než dorazí na místo určení. Při prostém injikování látek na místo poškození může docházet k difúzi do okolních tkání. Z toho důvodu je snaha vyvinout systém, který by umožnil bezpečně přenést léčivo na místo určení bez toxického zatížení organismu.

Dvěma nejdůležitějšími aspekty při řízeném dodávání léčiv je na jedné straně bezpečnost a na druhé efektivita. Je třeba plně kontrolovat dynamiku uvolňování léčiva a jeho dávku.

Nosiče pro tkáňové inženýrství by tak mohly kromě vlastností jako je biokompatibilita, odpovídající biodegradabilita a mechanická podpora ještě zastávat funkci v podpoře a řízení buněčné adheze, migrace a diferenciac. Růstové faktory mohou být inkorporovány přímo do matrice nosiče, nebo mohou být inkorporovány do částic, jako jsou kapsle nebo liposomy (Mickova et al., 2012).

Pro řízené dodávání léčiv byly použity hydrogely (Na et al., 2006, Chen et al., 2009) i porézní nosiče (Kim and Valentini, 2002, Kim et al., 2004). Obsah růstových faktorů napomáhá buněčné proliferaci a zvýšení produkce specifických proteinů mezibuněčné hmoty.

V kinetice uvolňování látek může hrát roli samotná forma nosiče. Kim a kol. porovnával ve své studii uvolňování BMP-2 z pěnového nosiče na bázi kyseliny hyaluronové a kolagenové gelu. Zatímco se faktor z kolagenového nosiče uvolňoval ve velkém množství a rychle, během 14 dní, u pěnového nosiče bylo uvolňování postupné, a jeho doba prodloužena až na 28 dní (Kim and Valentini, 2002).

Právě rychlé uvolňování faktorů je nevýhodou aplikace růstových faktorů a dalších stimulačních látek přímo do materiálu nosiče. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny různé formy částic, které jsou látkou naplněny. Mikro- a nanočástice mohou být připraveny z velkého množství materiálů jak syntetických (PGA, PLA, PCL nebo PLGA), tak přírodních (želatina, alginát).

3. Cíle práce

1. vytvoření funkcionalizovaného nosiče vhodného pro růst chondrocytů a jejich produkci specifických proteinů mezibuněčné hmoty
2. detekce a vizualizace buněk a proteinů mezibuněčné hmoty pomocí metod fluorescenční a konfokální mikroskopie
3. vytvoření vizualizační techniky pro rychlou detekci nově exprimovaných proteinů v nosičích osídlených chondrocyty
4. testování vhodného nosiče na velkém animálním modelu

Experimentální část

V experimentální části této práce jsou zahrnuty čtyři různé experimenty, tři *in vitro* a jeden *in vivo*. Tomu odpovídá i dělení experimentální části práce.

V *in vitro* pokusech byl vyvíjen vhodný nosič pro růst chondrocytů, byla sledována buněčná adheze, proliferace a diferenciaci. V první *in vitro* studii byly testovány netkané textilie na bázi kyseliny polyglykolové (PGA). Nosiče ze samotného PGA byly shledány jako vhodný materiál pro adhezi chondrocytů, ne však pro jejich proliferaci. To bylo způsobeno zejména kyselými rozpadovými produkty, vznikajícími při degradaci PGA. Pro zlepšení vlastností tohoto nosiče byly použity příměsi kyseliny hyaluronové (HA), chitosanu anebo polyvinylalkoholu (PVA). Přidání ani jedné z těchto látek nevedlo ke zlepšení buněčné adheze. Ovšem při další kultivaci na nosičích, byla buněčná proliferace negativně ovlivněna kyselými rozpadovými produkty PGA. Přidáním PVA anebo chitosanu do textilního nosiče došlo ke snížení okyselování prostředí, a tím k úpravě buněčné proliferace. Tyto kompozitní nosiče z netkaných textilií na bázi PGA se ukázaly jako hodné pro aplikace tkáňového inženýrství chrupavky.

Ve druhé studii byl vyvinut jednoduchý systém řízeného dodávání léčiv na mikrovlákněném nosiči z poly(2-hydroxyethylmetakrylátu) (PHEMA). Strukturální vlastnosti PHEMA vrstvy byly značně závislé na postupu síťování a nebulizace. Nosiče z PHEMA se jevily jako materiál vhodný pro nasazení chondrocytů a jejich růst. Navíc, dobrá adheze liposomů na tato mikrovlákna umožnila vývoj jednoduchého nosiče pro řízené dodávání léčiv. Naplnění liposomů přilnutých k vláknům vedlo k zlepšení buněčné adheze a proliferace. Vlákněný nosič z PHEMA se ukázal jako vhodný materiál pro tkáňové inženýrství a v kombinaci s liposomy může sloužit jako jednoduchý systém pro řízené dodávání léčiv.

Další studie byla zaměřena na detekci kolagenu obsaženého v mezibuněčné hmotě, tvořené chondrocyty na želatinové a PCL pění, a to dvoufotonovou mikroskopií (*Two-photon excitation microscopy* – TPTEM) a druhou harmonickou (*Second harmonic generation* – SHG) v předním a zadním nondescanned módu. Současné snímání TPTEM a SHG a následné stereologické vyhodnocení umožnilo 3D rekonstrukci obrazu s vysokým rozlišením, a navíc i kvantitativní analýzu množství kolagenu v nosiči. Vedle kolagenu byly

vizualizovány chondrocyty a nosič a jejich prostorové uspořádání, což bylo předtím nemožné. Tento systém může mít velký přínos pro detekci kolagenu v nosičích vyvinutých pro tkáňové inženýrství chrupavky.

Ve studii *in vivo* byl testován hydrogel ze směsi fibrinu a vysokomolekulární kyseliny hyaluronové (HA). Nosič byl osazen autologními chondrocyty a implantován do defektu v kolenní chrupavce miniprasete. Biomechanické vlastnosti tohoto hydrogelu byly porovnány s dříve vyvinutým a testovaným nosičem obsahujícím kolagen. Ukázalo se, že přítomnost kolagenu v nosiči není nutná pro vytvoření biomechanicky stabilní tkáně. Regenerovaná chrupavka vykazovala velmi dobré biomechanické a histologické vlastnosti již 6 měsíců po implantaci. Přitom kvalita nově tvořené chrupavky byla závislá na počátečním množství chondrocytů obsažených v nosiči při implantaci. Tato studie byla provedena v souladu se zásadami správné laboratorní praxe (SLP) a tím je připravena k dalším testům pro aplikaci tohoto nosiče v humánní medicíně.

4. Metody

4.1. Metody *in vitro*

4.1.1. Příprava a charakterizace nosičů

4.1.1.1. Příprava nosičů *elektrostatickým zvlákňováním*

Roztok poly(hydroxyetyl metakrylátu) (PHEMA; Rohm, Německo) byl připraven polymerací monomeru (8,55 g) za nepřítomnosti kyslíku a iniciován oxidačně-redukčním systémem amonium persulfát (0,05 g)-bisulfát sodný (0,05 g) ve vodném etanolu (66,3 % etanol, 55 g) při teplotě 23°C po dobu jednoho týdne. Molekulární hmotnost byla kontrolována množstvím iniciačního činidla a byla $6,9 \times 10^5$. Po polymerizaci byla PHEMA vysrážena do vody a rozpuštěna ve vodném roztoku 66,3 % etanolu. Výsledná koncentrace polymeru byla 16 hmot%. Vodivost roztoku určeného k elektrostatickému zvlákňování byla upravena přidáním 0,4 g nasyceného roztoku NaCl na 15 ml roztoku polymeru na 270 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Molekulová hmotnost byla určena pomocí statického rozptylu světla na přístroji ALV 6000/E

(ALV, Německo). Viskozita roztoku byla určena na Ostwaldově viskozimetru při 23°C na 28,0 mm².s⁻¹.

Nanovlákná byla připravena technologií Nanospider™. Polymer byl zvlákněn z elektrody ve formě rotujícího válečku. Zformovaná polymerní vlákna se ukládala na uzemněném kolektoru. Váleček z nerezové oceli (délka 200 ± 0,07 mm, průměr 20,87 ± 0,02) rotoval rychlostí 5 otáček za minutu v nádobě s polymerním roztokem. Proces probíhal při napětí 43 kV, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem byla 150 – 200 mm. Teplota během zvláknování byla 21°C ± 2°C, relativní vlhkost 73% ± 2%. Vytvořená vlákna byla nebulizována 5% kyselinou fosforečnou (PHEMA1) nebo 10% kyselinou fosforečnou (PHEMA2). Nebulizací byl pomocí sonikace připraven aerosol mikrometrových kapiček obsahujících síťovací činidlo. Interakce aerosolu s nesíťovanými vlákny zachovává vláknennou morfologii, která by byla při inkubaci v lázni se síťovadlem zcela zničena.

4.1.1.2. Příprava mikrovláknenných nosičů s adherovanými liposomy

Multilamelární liposomy byly připraveny smícháním 15 mg asolektinu (AS; Asolectin from soybean, Sigma-Aldrich) a 5 mg fosfatidylserinu (PS; Avanti Polar Lipids Inc.). Pro přípravu fluorescenčních liposomů byl do směsi přidán fluorescein DHPE (0.1 mg; Avanti Polar Lipids Inc.). Směs byla rozpuštěna v 1 ml chloroformu a následně vysušena v dusíkové atmosféře. Tenká vrstva fosfolipidů byla na stěně zkumavky ponechána v dusíkové atmosféře přes noc, aby se odpařilo zbylé rozpouštědlo. Vysušený fosfolipidový film byl resuspendován ve fosfátovém pufru (PBS; pH 7,4) nebo FBS a zkumavka byla třepána dalších 15 min. Pro spektroskopické měření byl film fosfolipidů resuspendován v roztoku TBS/DPX+ANTS (1 × TBS, pH 7,4/ 15 mM ANTS/ 45 mM DPX). Konečná koncentrace liposomů byla 15 mg/ml PBS. Suspenze liposomů byla poté 15krát extrudována skrz polykarbonovou membránu s póry o velikosti 1 μm pomocí Avanti® Mini-extruder (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA), čímž bylo dosaženo průměru liposomů 1 μm. K odstranění ANTS a DPX, které nebylo uzavřeno do liposomů, byla použita kolona (1 × 15 cm) naplněná Sephadex®G-25M (Sigma-Aldrich, Amersham Pharmacia Biotech).

Adheze liposomů na nanovláknennou vrstvu byla umožněna inkubací v suspenzi liposomů o koncentraci 15 mg/ml přes noc. Neadherované liposomy byly odstraněny důkladným promytím vzorků v PBS. Byly připraveny 2 druhy vzorků. V prvním případě

liposomy obsahovaly FBS (PHEMA1/FBS), v druhém případě obsahovaly PBS (PHEMA1/PBS).

4.1.1.3. Měření interakce mezi mikrovlákny a liposomy

Nanovlákená vrstva PHEMA1 o rozměru 2 cm² byla ponořena do suspenze s liposomy (15 mg/ml) a inkubována 60 sek. Nanovláknina byla následně opláchnuta a promývána přes noc v TBS (TRIS buffered saline; pH 7,4), aby byly odstraněny neadherované liposomy. Nanovláknenná vrstva byla následně rozpuštěna v etanolu, aby bylo uvolněno DPX+ANTS. Fluorescenční měření bylo provedeno na přístroji FluoreMax-3 JYHoriba. Excitační vlnová délka byla 370 nm, emisní 505 nm s šířkou pásma 4 nm. 1,5 ml suspenze bylo měřeno v kyvetě s tloušťkou 1 cm, naměřené hodnoty fluorescence byly korigovány vzhledem k naměřenému pozadí (u liposomů bez ANTP a DPX bylo naměřeno 2% z celkové intenzity).

4.1.1.4. Studie nábojové interakce mezi PHEMA vlákny a liposomy

Pro tuto studii byly připraveny negativní a neutrálně nabitě liposomy. Negativně nabitě liposomy byly připraveny smícháním 5 mg fosfatidylserinu (skupina PS) a neutrální 5 mg fosfatidylcholinu (skupina PC). Film fosfolipidů byl resuspendován v DPX+ANTS. Extruder Avanti byl použit k dosažení velikosti liposomů 1 μm. Nenavázaný fluorofor byl odstraněn pomocí gelové filtrace (Sephadex G25). 300 μl suspenze liposomů o koncentraci 15 mg/ml, byla inkubována s PHEMA1 nanovláknou (1 cm²) po dobu 1 hod, při pokojové teplotě. Poté byly vzorky opláchnuty TBS a následně bylo přidáno 1 ml čerstvého TBS, v němž byly vzorky inkubovány po dobu 1, 2 a 4 hodin. Poté byl inkubační roztok TBS odebrán, byla změřena jeho fluorescence, a ke vzorku bylo přidáno nové TBS. Po 17 hodinové kultivaci byly vzorky nakonec rozpuštěny v etanolu. Fluorescence uvolněného fluoroforu byla měřena spektrofluorometricky (Synergy 2, Biotec).

4.1.1.5. Příprava nosičů z netkaných textilií

Nosiče byly připraveny naplavením polymerních vláken. Vlákna polymerů byla nastříhána a rozvolněna v malé koncentraci ve vodném roztoku. Tato suspenze byla následně nalita na sítko, kde se procesem filtrace vytvořila síť vláken. Vzorky byly nakonec usušeny a

zpevněny. Byla použita vlákna kyseliny polyglykolové (PGA; chirurgický šicí materiál, Chirmax, ČR, průměr vláken 15 μm), vlákna polyvinylalkoholu (PVA; Kuralon K-II, Kuraray Europe GmbH, Německo, průměr vláken 15 μm), a chitosanová vlákna (CH; Weifang Young Deok Chitosan CO., LTD, Čína).

Bylo připraveno 5 různých vzorků naplavených textilií, s plošnou hustotou 283 g/m^2 :

PGA - vlákna PGA byla naplavena v destilované vodě.

PGA/PVA - směs vláken PGA (50%) a vláken PVA (50%) byla naplavena v n-butanolu a mechanicky zpevněna vpichováním.

PVA/PGA/PVA - směs vláken PGA (50%) a vláken PVA (50%) byla naplavena v n-butanolu a následně impregnována destilovanou vodou. Ta jemně rozpustila PVA vlákna, která jsou ve vodě nestabilní. Rozpuštěné PVA pak sloužilo jako pojivo pro PGA vlákna.

PGA/HA - vlákna PGA byla naplavena v 0,1% roztoku hyaluronanu sodného (M_w 1 500 000).

PGA/PVA/CH - směs vláken PGA (1/3), vláken PVA (1/3) a vláken chitosanu (1/3), byla naplavena v n-butanolu a impregnována destilovanou vodou. Ta jemně rozpustila PVA vlákna, která jsou ve vodě nestabilní. Rozpuštěné PVA pak sloužilo jako pojivo pro vlákna PGA.

4.1.1.6. *In vitro* degradace nosičů z netkaných textilií

U nosičů z netkaných textilií na bázi PGA, byl sledován také průběh degradace *in vitro*, množství zadržené vody v nosiči a změna pH media, ve kterém byly vzorky kultivovány. Byla změřena hmotnost vzorků v suchém a mokřém stavu. Z hmotností byla vypočítána absorpce vody. Tři vzorky z každé skupiny byly usušeny do konstantní hmotnosti a zváženy. Poté byly nosiče ponořeny do 70 % etanolu na 10 minut a poté do PBS na 1 hodinu. Povrchová voda byla osušena filtračním papírem a byla změřena hmotnost v mokřém stavu. Absorpce vody (AV) vypočítána podle vzorce (1),

$$AV = 100 \times (M_s - M_m) / M_m$$

kde M_m je hmotnost v mokřém stavu a M_s je hmotnost ve stavu suchém.

Pro měření změn pH v kultivačním médiu bylo použito 5 vzorků z každé skupiny. Každý vzorek byl ponořen do 20 ml PBS bez výměny nebo míchání. Nosiče byly inkubovány v CO₂ inkubátoru po dobu 42 dnů. pH bylo měřeno každé 2 dny (pH metr HANNA HI 92240).

4.1.1.7. Příprava nosiče z želatinové pěny

Želatinové nosiče byly připraveny z roztoku 5 hmot% želatiny v destilované vodě při 40°C. Roztok byl intenzivně míchán, až vznikla pěna, která byla následně sušena 48 hodin při pokojové teplotě. Následně byly pěny síťovány 0,7 hmot% N-(3-dimetilaminopropyl)-N'-etylkarbodiimid hydrochloridem (Sigma Aldrich) rozpuštěném v roztoku aceton/voda (poměr 8/2), 24 hodin při pokojové teplotě. Poté byly vzorky opět sušeny 48 hodin při pokojové teplotě. Hotové vzorky byly nakonec omyty destilovanou vodou, aby byly odstraněny zbytky nechtěných chemikálií.

4.1.1.8. Příprava nosiče z polykaprolaktonu

Pěnový nosič z polykaprolaktonu (poly-ε-caprolactone – PCL) byly připraveny technikou vymývání solných krystalů z 7 hmot% PCL (Mr 80 × 10³, Sigma Aldrich) v roztoku etanolu a chloroformu (v poměru 1:9). Krystaly byly do roztoku vmíchány mechanicky. Po odpaření rozpouštědla byly solné krystaly vymyty destilovanou vodou.

4.1.1.9. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

SEM snímky byly pořízeny na přístroji Vega TS 5130, umožňujícím zvětšení 12 – 250 000 × a rozlišením 9 nm. Vzorek připravených nanovláken byl pokryt tenkou vrstvou zlata (tloušťka 10 – 30 nm) poprašováním v přístroji SDC 030. Průměry vláken byly odečteny z náhodně vybraných snímků ze SEM.

4.1.1.10. Kryoelektronová mikroskopie

Pro vizualizaci liposomů adherovaných na nanovláčkách byla použita kryoelektronová mikroskopie (Cryo-field emission scanning microscopy - FESEM). Vzorky byly rychle zmrazeny v tekutém dusíku (-210°C) a následně přeneseny do kryokomory (ALTO2500), kde

byly zpracovány na řezy a následně pokryty vrstvou zlata (30 sek, -135°C). Takto připravené vzorky byly zpracovány mikroskopem Jeol 7401-FE (ve zmrzlém stavu při -135°C, při 3 kV a 4 kV, GB-L mode).

4.1.2. Tkáňové kultury, kultivace buněk

4.1.2.1. Isolace a kultivace buněk

Chondrocyty byly izolovány z kondylu kosti stehenní 3 měsíčního novozélandského bílého králíka v celkové anestezii (60 mg/kg ketamin a 4 mg/kg xylazin). Chrupavka byla nastříhána na malé kousky (1 × 1 mm), ponořena do roztoku kolagenázy (0.9 mg/mL, Collagenase crude 816 PSZ) a inkubována 14 hodin v CO₂ inkubátoru (37°C, 5 % CO₂). Následně byly buňky centrifugovány při 300 g po dobu 5 minut a nasazeny do kultivačních lahví. Chondrocyty byly kultivovány v IMDM médiu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) doplněném o 10 % fetálního telecího séra (Fetal Bovine Serum - FBS), antibiotika: penicillin/streptomycin (100 I.U./ml a 100 µg/ml), 400 mM L-glutaminu, 100 nM dexametazonu, 40 µg/ml fosfátu kyseliny askorbové a ITS-X (10 µg/ml insulínu, 5,5 mg/l transferinu, 6,7 µg/l sodium selenit, 2 mg/l etanolamin).

4.1.2.2. Osazení nosičů buňkami

Buňky byly nasazeny na vysterilizované nosiče. Hustota buněk závisela na druhu nosiče. Na nosiče z netkaných textilií a nanovláken bylo nasazeno 8×10^4 buněk/cm². Pěny, které měly větší póry a tím i větší povrch pro růst buněk, byly osazeny buňkami v hustotě 3×10^5 u PCL pěny a 8×10^5 u želatinové pěny. Médium bylo osazeným nosičům měněno každý třetí den.

4.1.3. Testování a vizualizace osazených nosičů *in vitro*

4.1.3.1. MTT test buněčné viability

MTT test se hojně využívá k měření metabolické aktivity a viability buněk *in vitro*. Je založen na tom, že MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid]

je v normálně metabolizující buňce redukován mitochondriální dehydrogenázou na fialové krystalky formazanu. Tyto krystalky jsou posléze rozpuštěny v roztoku *N,N*-dimethylformamidu. Fialové zbarvení roztoku tak ukazuje na množství normálně metabolizujících buněk. Zbarvení roztoku se měří spektrofotometricky

V den měření bylo přidáno ke 150 μ l kultivačního média každého vzorku 50 μ l MTT (1 mg/ml rozpuštěno ve fosfátovém pufru (PBS), pH 7,4). Po čtyřhodinové inkubaci v CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37°C), bylo přidáno 100 μ l vodného roztoku 50% *N,N*-dimethylformamidu a 20% dodecyl sulfátu sodného (SDS), pH 4.7. Po rozpuštění krystalků formazanu byla měřena absorbance roztoku při vlnové délce $\lambda = 570$ nm a referenční vlnové délce $\lambda_{\text{ref}} = 690$ nm. Od absorbance byla odečtena hodnota naměřená u vzorků inkubovaných v médiu bez buněk. Jako kontrola byly použity buňky nasazené na kultivační plastik.

4.1.3.2. Fluorescenční a konfokální mikroskopie

4.1.3.2.1. Použité mikroskopy

V experimentech byl použit fluorescenční mikroskop Olympus IX 51 s rtuťovou výbojkou Olympus U-RFL-T. Dále byly použity dva konfokální mikroskopy, Zeiss LSM 5 DUO a Leica TCS SP2 AOBS. Multifotonový konfokální skenovací mikroskop Leica byl založen na invertovaném mikroskopu Leica DM IRE2, vybaveném následujícími světelnými zdroji: Ar laserem (458 nm/5 mW, 476 nm/5 mW, 488 nm/20 mW, 514 nm/20 mW), HeNe laserem (543 nm/1,2 mW, 633 nm/10 mW) pro jednofotonovou mikroskopii a Ti:Saphire Chameleon Ultra laser (Coherent Inc., Santa Clara, USA), s nastavitelnou vlnovou délkou v rozmezí 690 – 1040 nm pro dvoufotonovou excitaci (Obr).

4.1.3.2.2. Zobrazení fluorescence jednofotonovou excitací

Pro zobrazení jednofotonovou excitací bylo použito několik fluorescenčních barvení:

Barvení propidium jodidem

Propidium jodid se váže na buněčnou DNA, barví tak jádra buněk a slabě i cytoplasmu. Buňky byly fixovány mraženým etanolem (-20°C), opláchnuty PBS a poté inkubovány v roztoku propidium jodidu (5 µg/ml v PBS) 10 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly 2krát opláchnuty PBS pro snížení svítivosti pozadí a sledovány pod konfokálním mikroskopem Leica SP2 AOBS ($\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 610\text{--}645 \text{ nm}$), nebo pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX51, U-RFL-T).

Barvení DiOC6

Pro měření buněčné adheze bylo použito barvení pomocí DiOC6, které barví membránové struktury buňky. Buňky byly nejprve fixovány v metanolu (-20°C) po dobu 10 min a poté opláchnuty PBS. Následně byly vzorky inkubovány 45 min v roztoku DiOC6 (0,1-1 µg/ml v PBS; pH 7,4) a opláchnuty. Poté byla jádra buněk obarvena propidium jodidem (5 µg/ml) a 2krát opláchnuta PBS. Obarvené vzorky byly vizualizovány na mikroskopu Leica SP2 AOBS (PI: $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 610\text{--}645 \text{ nm}$; DiOC6: $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 505\text{--}550 \text{ nm}$). Ze získaných obrázků byly odečteny plochu rozprostřených buněk pomocí software Ellipse (ViDiTo, SK).

Barvení BCECF-AM

Pro určení viability buněk na nosičích bylo použito barvení (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymetyl esterem (BCECF-AM) pro detekci živých buněk, v kombinaci s barvením propidium jodidem, které barví jádra mrtvých buněk. Tato metoda je založena na tom, že propidium jodid neprojde buněčnou membránou živých buněk. BCECF-AM projde buněčnou membránou a je metabolizováno mitochondriálními esterázami živých buněk na fluoreskující BCECF. BCECF-AM (ředěno 1:100 v čistém MEM mediu) bylo inkubováno s buňkami 30 min v CO₂ inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Následně byly vzorky opláchnuty PBS (pH 7,4), a bylo přidán roztok propidium jodidu (5 µg/mL v PBS) na 10 min. Vzorky byly 2krát opláchnuty PBS a zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP2 AOBS ($\lambda_{exc} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 610\text{--}645 \text{ nm}$; BCECF-AM: $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 505\text{--}550 \text{ nm}$).

Imunofluorescenční barvení kolagenu II

Pro detekci kolagenu II byla použita metoda nepřímé imunofluorescence. Vzorky byly fixovány 10 % roztokem formaldehydu v PBS 10 minut, opláchnuty PBS a inkubovány 30 min s 3 % roztokem FBS/0,1 % Tritonem v PBS při pokojové teplotě. Následně byla přidána primární protilátka proti kolagenu II (myší proti kolagenu typu II, klon II-II6B3, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA), zředěná 1:20, a inkubovaná po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky opláchnuty roztokem 0,05 % Tween v PBS po dobu 3, 10 a 15 minut. Následně byla přidána sekundární protilátka navázaná na Cy3 (ředěno 1:300; Cy 3-conjugated Donkey Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch) a inkubována po dobu 45 minut při pokojové teplotě. Po opětovném opláchnutí vzorků byl přidán roztok proti vysvěcování (PBS/90 % glycerol/2.5 % 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane (DABCO). Vzorky byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem Leica SP2 AOBS ($\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 555\text{--}600 \text{ nm}$).

4.1.3.2.3. Druhá harmonická vlna

Pro získání signálu druhé harmonické vlny (*Second harmonic generation* – SHG) bylo použito tří cest (schéma na obr. 4.1.). Signál procházející skenovací hlavou konfokálního mikroskopu byl snímán v zadním descanned módu fotonásobičem PMT1. Signál ze zadního nondescanned módu byl detekován fotonásobičem PMT4 a z předního nondescanned módu byl signál procházející vzorkem detekován pomocí PMT5. Pro snímání kolagenu pomocí SHG byla excitační vlnová délka nastavena na 860 nm, emise byla očekávána při 430 nm. V descanned módu byla snímána emise v rozmezí 420 – 440 nm. V sestavení nondescanned, kde by měl být získán lepší signál fluorescence vůči pozadí, byl před detektor zařazen short pass hranový filtr 700 nm, zeslabující průchod infračerveného světla. Poté následoval 430 nm pásmový filtr s šířkou 15 nm. Pro ověření, zda se skutečně jedná o SHG, byla excitační vlnová délka změněna na 800 nm, kdy by měl SHG signál zmizet a znovu se objevit po zařazení filtru 400 nm pásmového filtru.

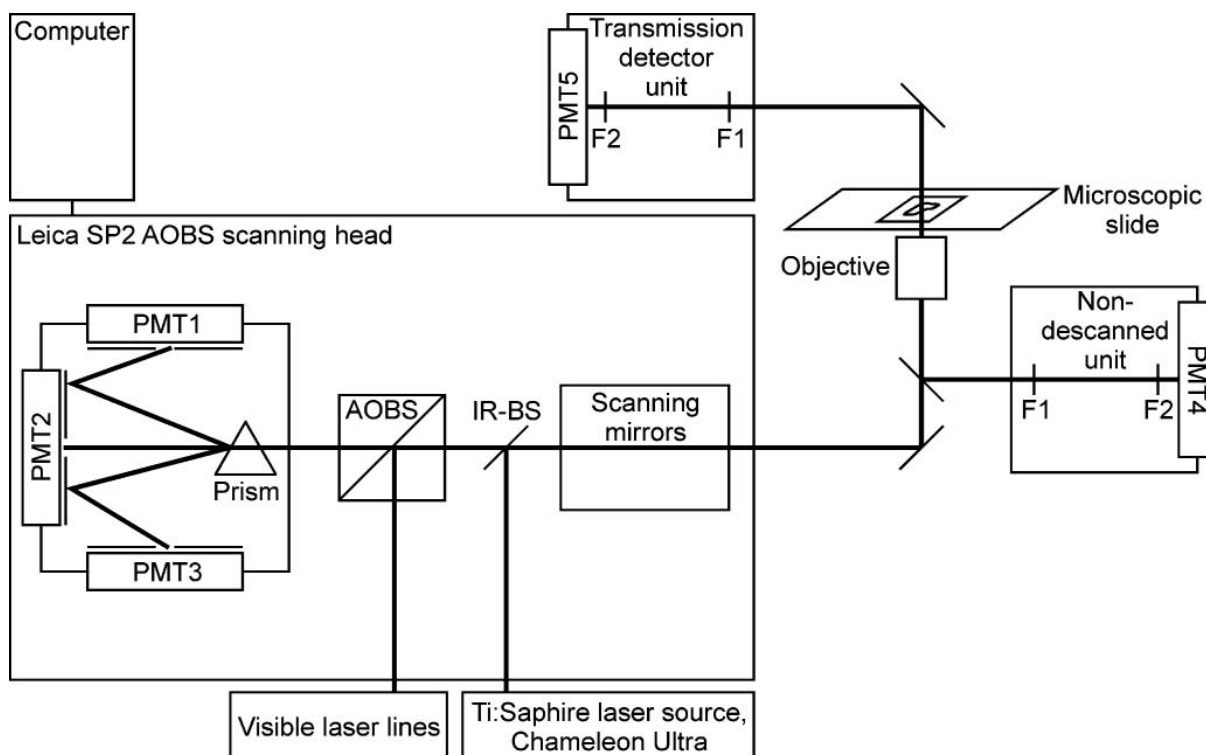
4.1.3.2.4. Zobrazení signálu dvoufotonovou excitací

Fluorescence obarvených buněk a/nebo autofluorescence nosičů byla detekována také dvoufotonovou mikroskopií (*Two photon excitation microscopy* – TPEM), v descanned módu (Obr.). Byla použita excitační vlnová délka 860 nm, abychom předešli záměně SHG

s autofluorescencí. Aby byl získán co nejsilnější signál autofluorescence, bylo použito celé spektrum excitačních vlnových délek.

4.1.3.2.5. Trojdimenzionální rekonstrukce obrazu

Informace o prostorovém rozložení tkáně bylo získáno trojdimenzionální (3D) rekonstrukcí obrazu (Capek et al., 2009). Pomocí softwaru Leica LCS byl získán 3D obraz maximálních intenzit. K vyjádření objemu proteinu byl použit software Ellipse 3D (modul Volume plug-in; ViDiTo, Košice, Slovensko).



Obr. 4.1. Schéma experimentálního rozložení založeného na konfokálním skenovacím mikroskopu Leica SP2 AOBS, vybaveného jedno- a dvoufotonovým laserem. PMT1, PMT2, a PMT3, jsou fotonásobiče ve skenovací hlavě pro detekci jedno a dvoufotonové excitace v descanned módu, PMT4, fotonásobič pro detekci signálu SHG v nondescanned zadním módu; PMT5, transmisní detektor pro detekci SHG signálu v nondescanned zadním módu; F1, E700SP short pass hranový filtr; F2, 430DF15 pásmový filtr; IR-BS, infračervený dělič paprsků.

4.2. Testování *in vivo*

4.2.1. *Zvířecí model*

V této studii bylo použito 16 miniaturních prasat z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AVČR Liběchov. Péče o zvířata probíhala podle evropské a české legislativy pro ochranu obratlovců. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin: léčená skupina (Skupina I) a kontrolní skupina (Skupina II), obě po 8 zvířatech.

4.2.2. *Izolace buněk z hyalinní chrupavky*

Zárok probíhal v celkové anestezii. Zvířatům bylo nejprve podáno intramuskulárně azaperonum (2 mg/kg) (Stresnil, JANSSEN Pharmaceutica N. V, Beerse, BE) a 1 mg atropinu (Atropin Biotika, BB Pharma, SK). Celková anestezie byla započata podáním ketaminu 20 mg/kg (Narketan 10, Vetoquinol, CZ) a vedena 1,5% isofluranem při konstantním proudění 2 l/min. Byla provedena laterální artrotomie s mediální luxací pately. Z chrupavky femorální hlavice byly odebrány kousky chrupavky, které byly neprodleně uloženy do transportního média (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) PAA, AT), doplněného o 40 µg/ml gentamicinu (Lek Pharmaceuticals, SI). Léze byla šita v anatomických vrstvách. Kloubní pouzdro, sval a podkoží byli šity vstřebavatelem šicím materiálem, kůže nevstřebatelným šicím materiálem. Všem zvířatům byla podána preventivní dávka antibiotik (procaini benzyloxylinum 8000 j/kg hm.; Peni-Kel 300, a.u.v., KELA Laboratoria n.v., Hoogstraten, BE) a analgetik (metamizolum 30 mg/kg hm.; Vetalgin inj., Intervet International B.V., Boxmeer, NL). Kožní stehy byly odstraněny 12 dní po operaci.

4.2.3. *Kultivace buněk*

Odebrané kousky chrupavky byly rozvolněny v roztoku kolagenózy (0,36 j/ml; Collagenase NB6, GMP Grade, Serva). Po 14 hodinové inkubaci byly chondrocyty (asi 1×10^6 buněk) centrifugovány 5 minut při 270 g, nasazeny do kultivačních lahví a kultivovány v kultivačním médiu IMDM obohaceném o 10% fetálního bovinního séra (Pharma Grade, PAA), 100 nM dexametazon (Dexamed, Medochemie), 40 µg/ml gentamicinu (Lek Pharmaceuticals), 10 µg/ml insulínu (Actrapid 100 m.j./ml; Novo Nordisk) a 20 µg/ml kyseliny askorbové (Acidum ascorbicum; Biotika) v CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37°C, vysoká

vlhkost vzduchu). Buněčné kultury byly pasážovány pomocí Accutase (PAA) před dosažením konfluence. Buňky byly kultivovány po dobu 19 dní ($\sim 7 - 9 \times 10^6$ buněk).

4.2.4. Příprava implantátu

Implantát byl připraven při 4°C smícháním 66 μ l kyseliny hyaluronové (10 mg/ml; Hyalgan, Fidia), 132 μ l buněčné suspenze, 0,32 ml roztoku fibrinogenu (70 – 110 mg/ml) v aprotininu (3000 kJ/ml) a 0,32 ml trombinu (4 j/ml) v roztoku CaCl₂ (40 μ mol/ml) (Tissucol® Kit, Baxter). Pro biomechanické testování byl gel obohacen 99 μ l kolagenu I (Collagen type I from cal skin, acid soluble; Sigma Aldrich, USA), neutralizovaným KOH, ve stejném poměru, jako v předchozích *in vivo* studiích (Filová et al., 2008, Filová et al., 2007). Prášek kolagenu byl rozpuštěn v 0,1 M kyselině octové a neutralizován 1 M KOH. Tuhnutí gelu probíhalo při 37°C.

4.2.5. Biomechanické testování

Nosiče byly biomechanicky testovány metodou plošného nárazu vyvinutou v naší laboratoři (Varga et al., 2007). Tato metoda je určena k dynamickému testování mechanických vlastností. Rezistence chrupavčité hmoty monitorovaná změny rychlosti kyvadélka přístroje detekovala rychlý vzestup působící síly. Deformace vzorku byla zaznamenána pomocí piezoelektrického akcelerometru (Bruel Kjaer 4375) a laserovým dopplerovským vibrometrem (Polytec OFV-302). Měření byla prováděna při konstantní počáteční rychlosti kyvadélka $v = 0,017$ m/s. Youngův modul byl stanoven z křivky zátěžového diagramu. Pro měření biomechanických vlastností byly použity vzorky ze 3 prasat, která nebyla zahrnuta do SLP studie. Tyto vzorky měly počáteční hustotu buněk $8,5 - 9 \times 10^6$ chondrocytů/ 1 ml nosiče.

4.2.6. Implantace osazeného nosiče

Vytvořený kompozitní hydrogel obsahující autologní chondrocyty byl implantován do pravého kolene osmi miniaturních prasat. Anestezie, medikace a následná péče byla provedena stejně, jako bylo popsáno výše (Izolace buněk z hyalinní chrupavky). Byla provedena laterální artrotomie pravého kolene a následná mediální luxace pately. V chrupavce na povrchu hlavice femuru byl vytvořen defekt okrouhlého tvaru, s průměrem 6

mm, který svou hloubkou sahal až k subchondrální kosti. Z hydrogelového nosiče bylo vyříznuto kolečko o průměru 6 mm a upevněno v defektu pomocí tkáňového lepidla (Tissucol®). Rána byla sešita po anatomických vrstvách.

4.2.7. Chirurgický zákrok provedený na kontrolních zvířatech

Byla vytvořena kontrolní skupina 8 miniaturních prasat. Těmto zvířatům byl proveden stejný zákrok jako léčené skupině, ovšem vytvořený defekt byl ponechán prázdný. Uzavření rány a následná péče byla stejná jako u léčené skupiny.

4.2.8. Závěrečné pozorování

Zvířata byla usmrcena 24 týdnů po operaci. Hrudní a břišní dutina byly otevřeny a makroskopicky vyšetřeny. Pravá kolena byla vyjmuta a femorální kondyly, se zhojenými defekty, byly fixovány 4% pufovaným formaldehydem pro histologické vyšetření.

4.2.9. Histologické vyšetření

Kosti byly dekalifikovány pomocí etylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). Histologické řezy byly zpracovány běžnou parafinovou metodou a obarveny hematoxolinen a eosinem (HE), kombinovanou technikou barvení alcianovou modří (AM) při pH 2,5 následovanou PAS-reakcí, barvení podle van Giesona a Gomoriho. Dále bylo provedeno imunohistochemické barvení kolagenu II, k prokázání tvorby diferencované chrupavčité tkáně. Byla použita primární protilátka proti kolagenu II (klon II-II6B3, Developmental Studies Hybridoma Bank, US), a následně polyklonální sekundární protilátka (horseradish peroxidase-labeled rabbit polyclonal anti-mouse antibody, Sigma Aldrich) a vizualizace pomocí DAB (SIGMAFAST DAB tablets set).

4.2.10. Bodovací systém vyhodnocování histologické metody

Zhojení osteochondrálních defektů v jednotlivých skupinách bylo zhodnoceno pomocí bodovacího systému s maximem 24 bodů. Tento systém byl modifikován podle Susante a kol. (van Susante et al., 1999). Analýza byla provedena dvěma nezávislými osobami.

4.3. Statistika

Všechna měření byla opakována nejméně třikrát. Výsledky byly presentovány jako hodnota \pm standardní odchylka. Výsledná data byla statisticky vyhodnocena pomocí jednocestné ANOVA a studentským Newman-Keulsovým testem. Hranice statistické významnosti byla zvolena 0,05.

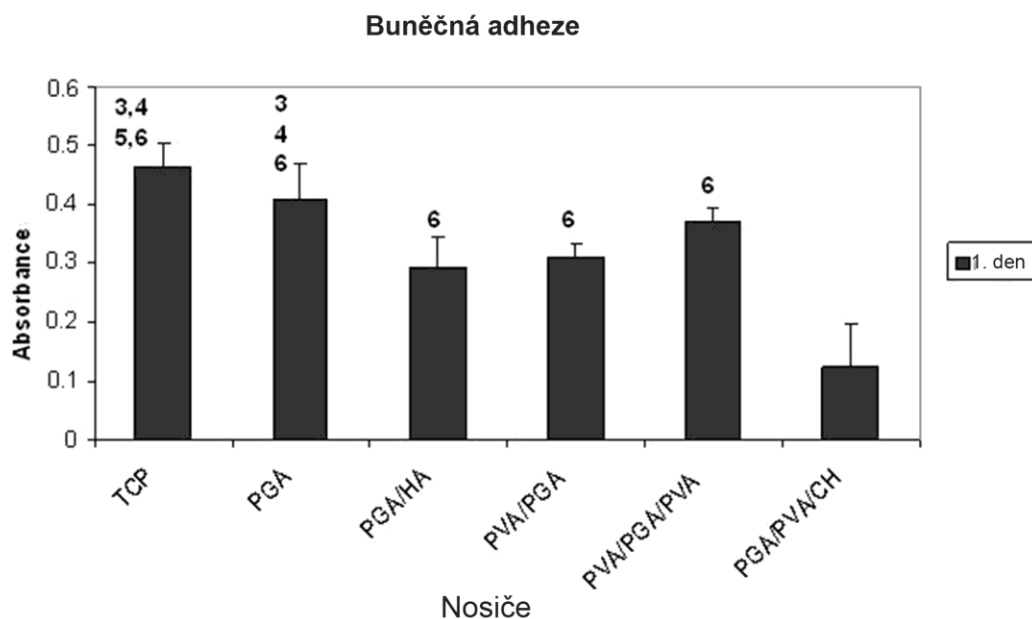
5. Výsledky a diskuse

5.1. Netkané textilie na bázi PGA a PVA jako vhodné nosiče pro růst chondrocytů

5.1.1. Výsledky

5.1.1.1. Adheze chondrocytů na PGA netkané textilní nosiče

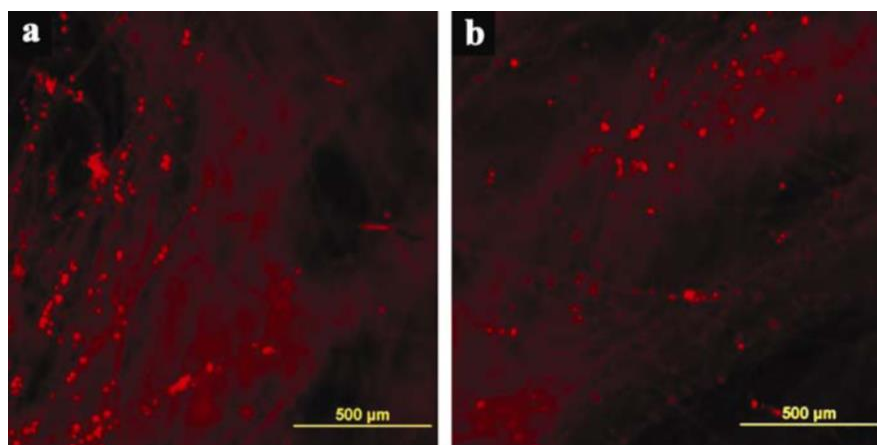
Adheze chondrocytů byla odvozena od MTT testu měřeného 24 hodin po nasazení buněk na nosiče (Obr. 5.1.1). Buňky adherovaly dobře na všechny druhy nosičů. Nejlepší adheze (absorbance $A = 0,41 \pm 0,06$) byla pozorována na samotném PGA a kontrolním kultivačním plastu ($A = 0,47 \pm 0,04$). Přítomnost PVA v nosiči signifikantně zhoršila adhezi chondrocytů, vyjma PVA/PGA/PVA. Absorpce klesla na $0,37 \pm 0,02$ u PVA/PGA/PVA a u PGA/PVA až na $0,32 \pm 0,02$.



Obr. 5.1.1. Buněčná adheze 24 hodin po nasazení na nosiče ($p < 0,05$).

Nejnižší počet adherovaných buněk byl zaznamenán na vzorku obsahujícím chitosan. Absorbance změřená na tomto vzorku 24 hodin po nasazení byla nejnižší ze všech zkoumaných vzorků ($0,12 \pm 0,07$).

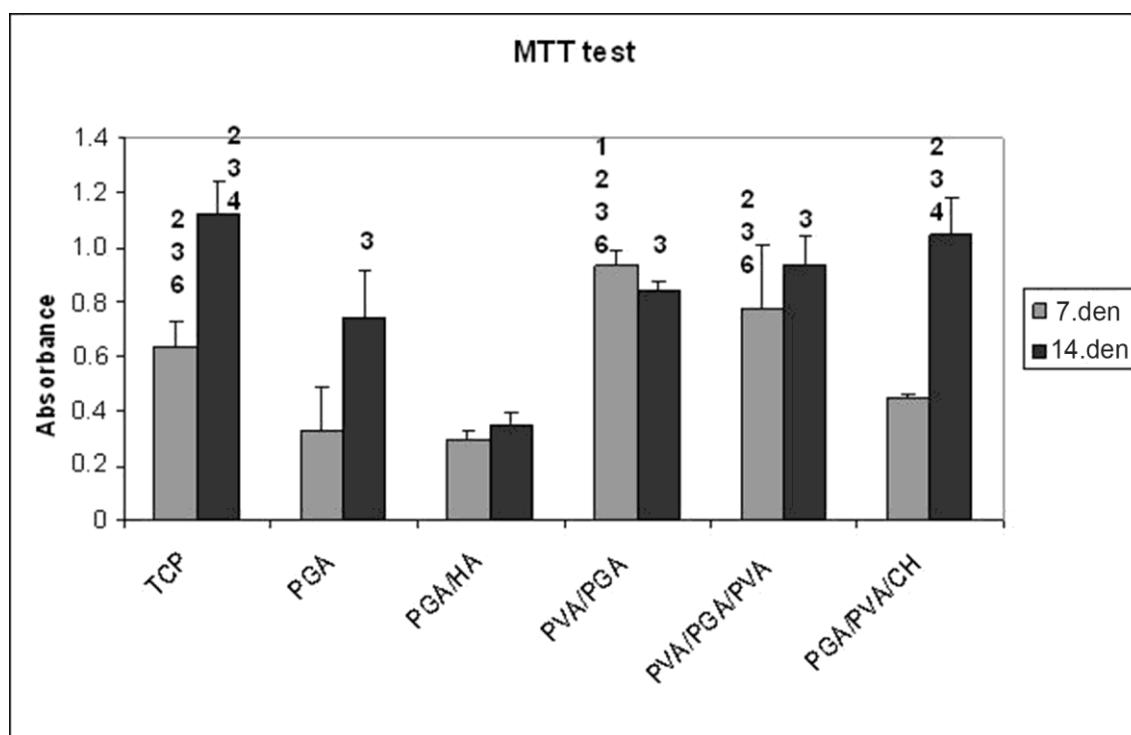
Přítomnost kyseliny hyaluronové ve směsi překvapivě nezlepšila adhezi chondrocytů. Absorbance byla na srovnatelná s PGA/PVA ($0,29 \pm 0,05$). Toto zjištění bylo potvrzeno fluorescenční konfokální mikroskopií, kde byly chondrocyty vizualizovány propidium jodidem (Obr. 5.1.2.).



Obr. 5.1.2. Fluorescenční mikroskopie buněčné adheze na nosičích PGA/PVA (a) a PGA/HA (b). Buněčná jádra jsou obarvena propidium jodidem.

5.1.1.2. PVA zlepšilo proliferaci chondrocytů na PGA netkaných textiliích

I když byla na vzorcích s PVA sledována horší adheze buněk, buňky následně vykazovaly velkou proliferaci. MTT test měřený 7. a 14. den ukázal, že nižší adheze buněk na vlákna nosiče byla následována jejich zvýšenou proliferací (Obr. 5.1.3.). Již 7. den po nasazení buněk na nosiče, byla nejlepší proliferace buněk sledována na PVA/PGA ($0,93 \pm 0,06$), druhá nejvyšší pak na PVA/PGA/PVA ($0,78 \pm 0,23$). Signifikantně nižší proliferace buněk byla sledována na nosiči obsahujícím pouze PGA ($0,33 \pm 0,16$) a překvapivě také na vzorku obsahujícím HA ($0,3 \pm 0,03$). Nejhorší adheze byla zjištěna na vzorcích obsahujících chitosan. Ačkoli ještě 7. den byla proliferace signifikantně nižší než u PGA nebo PGA/HA, 14. den se výrazně zlepšila ($1,05 \pm 0,14$) a byla srovnatelná s PVA/PGA/PVA. Ukázalo se tedy, že na proliferaci chondrocytů mělo pozitivní vliv přidání PVA a/nebo chitosanu do nosiče.

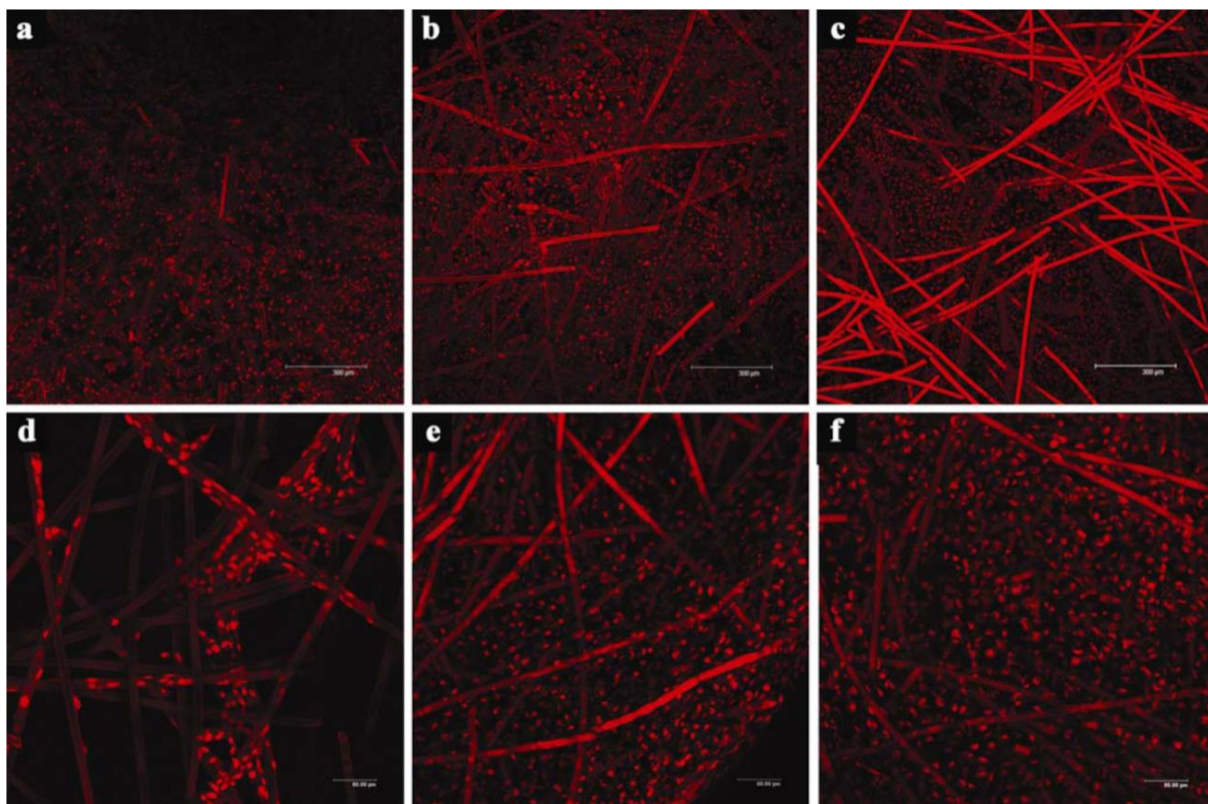


Obr. 5.1.3. Metabolická aktivita buněk na nosičích z netkaných textiliích na bázi PGA ($p < 0,05$)

5.1.1.3. Konfokální mikroskopie naplavených netkaných nosičů ze směsi PGA

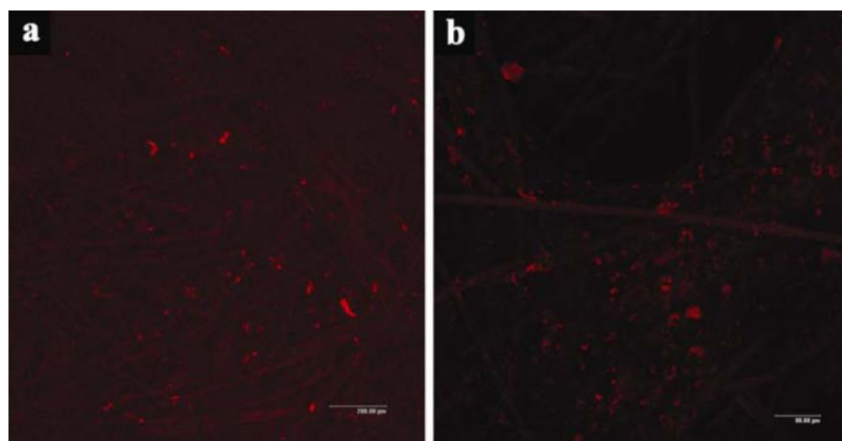
Pozitivní vliv přítomnosti PVA v netkaném nosiči na proliferaci chondrocytů byl sledován pomocí MTT testu. Nicméně abychom tuto skutečnost potvrdili, byla použita také

vizualizace pomocí konfokální mikroskopie. Již sedmý den od nasazení buněk bylo patrné jejich rozprostírání podél vláken nosiče. 14. a 21. den experimentu byla sledována výrazná proliferace, zejména na nosičích PGA/PVA/CH a PVA/PVA/PGA (Obr. 5.1.4.).



Obr. 5.1.4. Fluorescenční konfokální mikroskopie zobrazující proliferující chondrocyty. Buňky byly obarveny propidium jodidem, které se váže na buněčnou DNA. Viditelná jsou také vlákna nosiče pro svou autofluorescenci. Nosič PGA/PVA/CH 7. (a), 14. (b) a 21. den (c) po osazení buňkami, PVA/PVA/PGA nosič 7. (d), 14. (e) a 21. den (f).

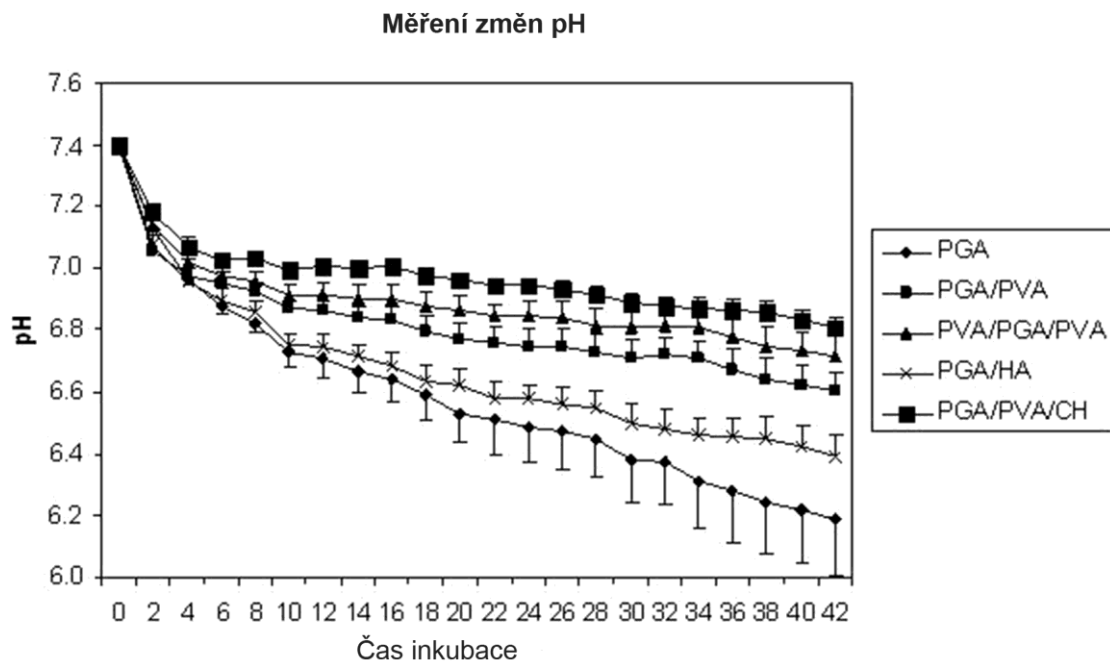
Produkce chrupavčité mezibuněčné hmoty byla sledována pomocí detekce kolagenu II, typického markeru hyalinní chrupavky. Pro vizualizaci kolagenu II byla použita metoda nepřímé imunofluorescence a konfokálního mikroskopu. Kolagen II byl produkován chondrocyty již týden po nasazení na nosiče PGA/PVA a jeho množství se zvyšovalo i 14. den kultivace (Obr. 5.1.5.).



Obr. 5.1.5. Fluorescenční konfokální mikroskopie zobrazující produkci kolagenu II pomocí imunofluorescenčního barvení. PVA/PGA/PVA nosič 7. (a) a 14. (b) den po nasazení buněk.

5.1.1.4. PVA v nosičích stabilizovalo pH

Změna pH v inkubačním roztoku byla testována u všech nosičů po dobu 42 dnů (Obr. 5.1.6.). U všech vzorků byl sledován počáteční výrazný pokles pH, který nastal ihned po vložení do kultivačního roztoku. Vývoj změny pH ovšem dále probíhal u různých vzorků odlišně. Přítomnost PVA v nosičích vedla k velmi pozvolnému snižování pH, zejména u vzorku PGA/PVA/CH. Naproti tomu u vzorků obsahujících pouze PGA a u vzorků obsahujících PGA v kombinaci s HA, docházelo ke značnému poklesu pH během celého experimentu. To značilo vyšší množství kyselých rozpadových produktů v inkubačním roztoku.



Obr. 5.1.6. Měření změn pH kultivačního roztoku, vyvolaným rozpadovými produkty nosičů na bázi PGA, během 42 dnů kultivace.

5.1.1.5. Smáčivost nosičů ovlivňovala jejich degradaci

Pomalejší degradace kompozitních nosičů obsahujících PVA byla spojena také s další důležitou vlastností, a to schopností vázat v sobě vodu. Přítomnost PVA ve směsi netkané textilie vedla k několikanásobnému zvýšení absorpce vody (Tabulka 5.1.1.). Největší smáčivost byla zaznamenána u vzorku PVA/PGA, 3krát vyšší než u PGA nosiče. Naproti tomu u nosičů obsahujících HA bylo množství tekutiny 2krát nižší než u vzorku PGA. Vzorky s větší schopností vázat v sobě vodu vykazovaly jednoznačně i nižší pokles pH. Navíc, schopnost vázat v sobě vodu neměla souvislost pouze se změnami pH, ale i s buněčnou proliferací, která byla lepší u více smáčivých vzorků. Naopak u vzorku PGA/HA, vykazujícího malou schopnost vazby vody, byla zaznamenána nejhorší buněčná proliferace.

Tabulka 5.1.1. Smáčivost nosičů z netkaných textilií (hodnota ± směrodatná odchylka)

Nosič	Hmotnost v suchém stavu [mg]	Hmotnost v mokřém stavu [mg]	Absorpce vody [%]
PGA	4,2 ± 0,9	9,5 ± 1,6	141 ± 46
PVA/PGA	4,4 ± 0,2	22,5 ± 1,2	416 ± 26
PVA/PGA/PVA	4,5 ± 0,3	5,5 ± 0,6	23 ± 10
PGA/HA	3,9 ± 0,5	6,7 ± 0,8	73 ± 13
PGA/PVA/CH	5,3 ± 0,3	18,3 ± 2,3	242 ± 22

5.1.2. Diskuse

5.1.2.1. *Chondrocyty dobře adherovaly, ale pouze slabě proliferovaly na nosiči PGA*

Kyselina polyglykolová, používaná ve zdravotnictví jako vstřebatelný šicí materiál, je často používaná v aplikacích tkáňového inženýrství (Freed et al., 1994b, Rokkanen et al., 2000, Schaefer et al., 2000, Lee and Shin, 2007). PGA byla použita v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně v mnoha formách, ale pouze několik málo studií se zabývá tímto materiálem ve formě netkané textilie pro růst chondrocytů (Freed et al., 1994b, Schaefer et al., 2000). Stejně jako v ostatních studiích se PGA ukázalo jako vhodný materiál pro adhezi chondrocytů. Právě obsah PGA v nosiči se překvapivě ukázal jako klíčový pro dobrou buněčnou adhezi na netkaných nosičích. Kyselina hyaluronová ani PVA v žádném z nosičů nevedlo ke zlepšení adheze. Bylo tedy potvrzeno, že PGA, ať už samotná, nebo v kombinaci s jiným materiálem, je vhodný polymer pro adhezi chondrocytů. Zároveň však došlo k negativnímu ovlivnění další proliferace chondrocytů přítomností rozpadových kyselých produktů. Při degradaci se PGA rozpadá na kyselinu glykolovou, která je dále transformována v citrátovém cyklu na konečné produkty, oxid uhličitý a vodu (Athanasίου et al., 1996, Agrawal and Athanasίου, 1997).

Zvýšená koncentrace kyselých vedlejších produktů může být *in vitro* upravena kontrolou pH, nebo výměnou kultivačního média. Tato metoda však nemůže být použita u kompozitních nosičů, kde je kyselina polyglykolová uzavřena v gelu, nebo jiném materiálu. Avšak právě tyto kompozitní nosiče se stávají velmi populárními pro možné nastavení a úpravu vlastností, které zlepšují buněčnou adhezi a proliferaci. Lepší porozumění degradačnímu procesu PGA a jeho možná regulace je tedy velmi důležitá.

5.1.2.2. *PVA v nosiči zlepšuje proliferaci chondrocytů*

Ačkoli kompozitní nosiče na bázi PGA netkané textilie nevykazovaly zlepšení buněčné adheze, jejich aplikace v tkáňovém inženýrství se zdá být velmi slibná. Vhodně přidaný materiál může vylepšit biomechanické vlastnosti nosiče, které jsou při vývoji nosičů pro tkáňové inženýrství chrupavky zásadní. Navíc mohou přidané materiály upravit čas

biodegradace. V této studii byl prokázán pozitivní vliv PVA v PGA netkané textilii na proliferaci chondrocytů. Počáteční nižší buněčná adheze byla překonána již během prvního týdne kultivace. Zvýšená proliferace byla spojena s lepší stabilitou pH inkubačního média. To bylo způsobeno menším množstvím kyselých rozpadových produktů v nosiči, což zabezpečilo lepší podmínky pro růst chondrocytů. Přestože přídavek chitosanu do nosiče PGA/PVA nezměnilo signifikantně pozitivní vliv PVA na buněčnou proliferaci, mohou tyto přísady upravit biomechaniku a biodegradabilitu kompozitního nosiče. Vliv přísad se dá však poměrně těžko odhadnout, jak se ukázalo u vzorku s kyselinou hyaluronovou. Právě ta je jednou z klíčových složek mezibuněčné hmoty hyalinní chrupavky. Správné složení kompozitního nosiče a metodika jeho přípravy zůstává předmětem dalšího zkoumání.

Příprava kompozitních nosičů je důležitým aspektem a výrazně ovlivňuje využití nosiče. Shledali jsme, že přidání PVA značně zvýšila schopnost vázat v sobě vodu. To je jeden z klíčových bodů pro vysvětlení zlepšené proliferace chondrocytů, neboť větší množství tekutiny v nosiči zajišťuje lepší zásobování buněk živinami a rychlejší odvod rozpadových produktů. Struktura nosiče by měla mít pevné vazby mezi vlákny a měla by být charakterizována hydrofilním prostředím s velkými póry, které umožní penetraci tekutin a růst buněk. Zpevnění nosiče může být dosaženo chemickou nebo fyzikální cestou. Fyzikální propojení vláken pomocí vpichování se neukázalo jako účinné. Naopak se jako účinná ukázala metoda chemická – pojení PGA vláken pomocí PVA.

5.1.2.3. Chitosan v PGA nosičích napomáhá proliferaci chondrocytů

Vedle PVA byl v naší studii sledován vliv na buněčnou adhezi a proliferaci ještě dalších složek, a to kyseliny hyaluronové a chitosanu. HA je biokompatibilní a biodegradovatelný polysacharid, který je hojně zastoupen v synoviální tekutině a mezibuněčné hmotě a hraje důležitou roli v hydrataci tkání. Pro své fyzikálněchemické vlastnosti je hojně využíván v medicíně a tkáňovém inženýrství (Hahn et al., 2007). Bylo popsáno, že HA zlepšuje *in vitro* schopnost adheze a proliferace lidských chondrocytů (Patti et al., 2001). Proti očekávání však HA, použitá jako pojivo pro PGA vlákna v netkaném textilním nosiči, selhala. Nejen, že HA v nosiči nezlepšila v žádném ohledu růst chondrocytů na nosiči, nezvýšila však ani schopnost textilie zadržovat vodu. Tyto výsledky ukazují, že více než hydrofilicita povrchu netkané textilie, má na proliferaci buněk vliv velikost pórů nosiče.

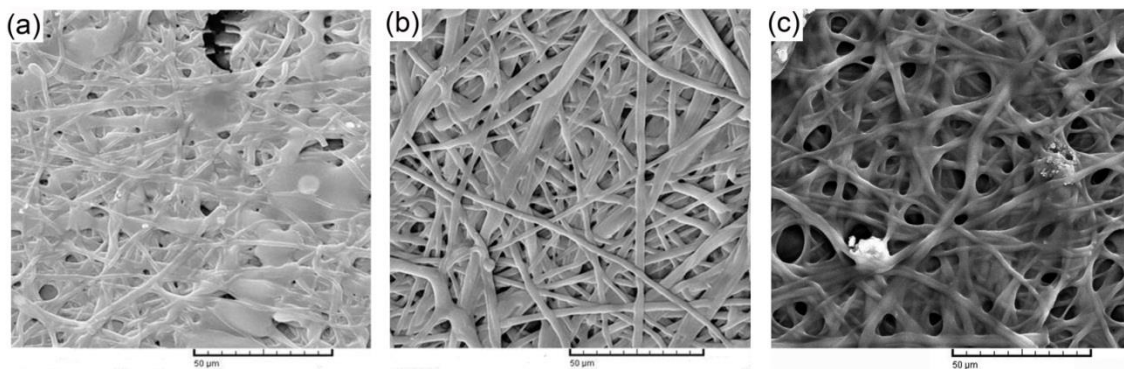
Použití chitosanu jako složky kompozitního nosiče na bázi PGA vykazovalo různé vlastnosti. Chitosan je částečně deacetylovaná forma chitinu, který je v přírodě velmi rozšířen. Jedná se o biokompatibilní a biodegradovatelný polymer, který má některé zajímavě biologické účinky, jako antitrombogenní nebo homeostatické, zlepšuje imunitu a hojení ran (Jia et al., 2007). Chitosan byl jako zajímavý materiál použit jako složka testovaných nosičů. Zatímco na adhezi chondrocytů neměl chitosan žádný pozitivní vliv, jeho přítomnost v nosiči výrazně zvýšila buněčnou proliferaci již v prvním týdnu kultivace, zejména pak v druhém kultivačním týdnu. Chitosan se vedle PVA ukázal jako vhodná složka pro přípravu nosičů na bázi netkané textilie z PGA vláken pro tkáňové inženýrství chrupavky. Měl by však být brán zřetel na to, že vlastnosti chitosanu jsou velice závislé na jeho zdroji a čistotě.

5.2. Jednoduchý systém řízeného dodávání látek na mikrovlákněm nosiči pro tkáňové inženýrství chrupavky

5.2.1. Výsledky

5.2.1.1. Příprava a charakterizace mikrovlákněho nosiče z PHEMA

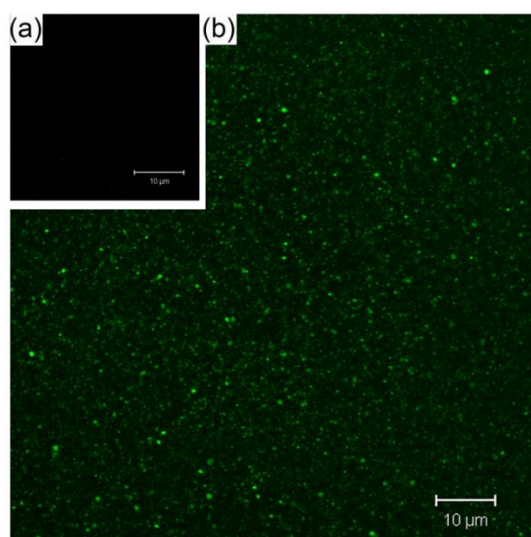
Vlákna z PHEMA byla úspěšně připravena, ale byla nestabilní ve vodném prostředí, a to díky vysoké hydrofilnosti. Pro snížení nestability byla PHEMA vrstva síťována kyselinou fosforečnou. Jako optimální množství pro vytvoření PHEMA vláken stabilních ve vodě se ukázalo 5 hmot% (vzorek PHEMA1) a 10 hmot% kyseliny fosforečné (PHEMA2). Mikrovlákna byla testována vařením 30 min ve vodě. Připravený vzorek PHEMA1 měl průměr vláken $2,1 \pm 0,6 \mu\text{m}$, tloušťka vláken u vrstvy PHEMA2 byla větší, $3,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (Obr. 5.2.1.).



Obr. 5.2.1. SEM vizualizace mikrovláken připravených elektrostatickým zvlákňováním z PHEMA, síťovaných 5 hmot% kyseliny fosforečné – PHEMA1 (a), a 10 hmot% kyseliny fosforečné - PHEMA2 (b). Vzorek PHEMA2 byl stabilní i po 30 min varu (30 min varu ve vodě a usušeno) (c).

5.2.1.2. Interakce mikrovláken s liposomy

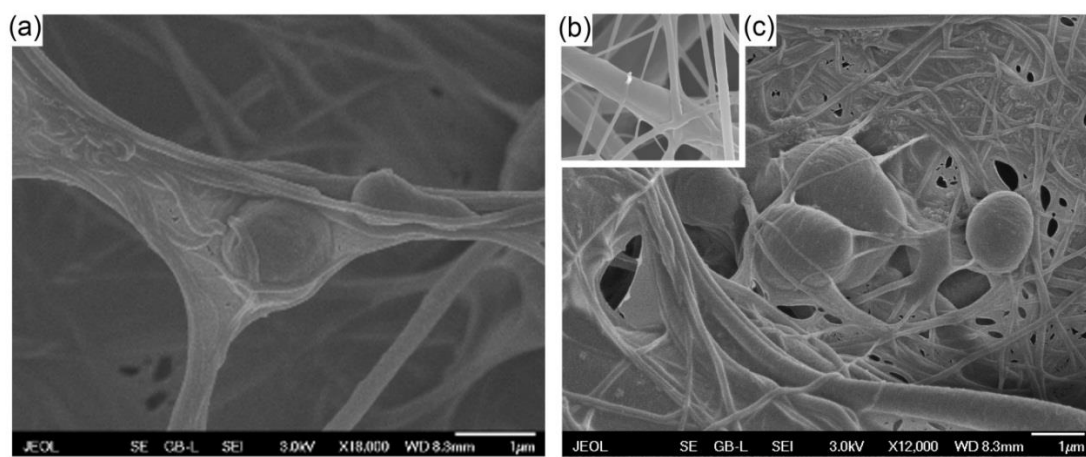
Vývoj funkcionalizovaných mikro- a nanovláken a porozumění jejich biologickému účinku je nezbytné pro jejich použití v tkáňovém inženýrství. V naší studii byla použita mikrovláknina z PHEMA jako model pro funkcionalizaci pomocí liposomů. Ta byla navozena inkubací vláken s liposomy. Velký povrch a vhodný povrchový náboj mikrovláken vedl k imobilizaci liposomů připravených ze směsi fosfolipidů (FITC-PC:PL v poměru 1:1000), což bylo prokázáno konfokální mikroskopií (Obr. 5.2.2.). Liposomy pevně přilnuly k povrchu vláken, což prokázala jejich přítomnost i po intenzivním omývání.



Obr. 5.2.2. Adheze liposomů na PHEMA mikrovláknina. Fluorescenčně značené liposomy (fluorescein DHPE), adherované k povrchu mikrovláknenné vrstvy, byly vizualizovány pomocí konfokální mikroskopie (b). Jako kontrola byla použita mikrovláknina bez adherovaných liposomů (a).

Adheze liposomů byla měřena také kvantitativně pomocí fluorescenční měření DPX + ANTS systému. Změřená fluorescence ANTS ($I = 519 \pm 29$ a.u., po odečtení pozadí) prokázala přítomnost velkého množství liposomů na mikrovláknech. Adheze liposomů byla pevná i po omývání vzorků přes noc, kdy byla změřena intenzita fluorescence 140 ± 38 a.u. To znamená, že okolo 27 % liposomů zůstalo na povrchu mikrovláken i po jejich omývání přes noc.

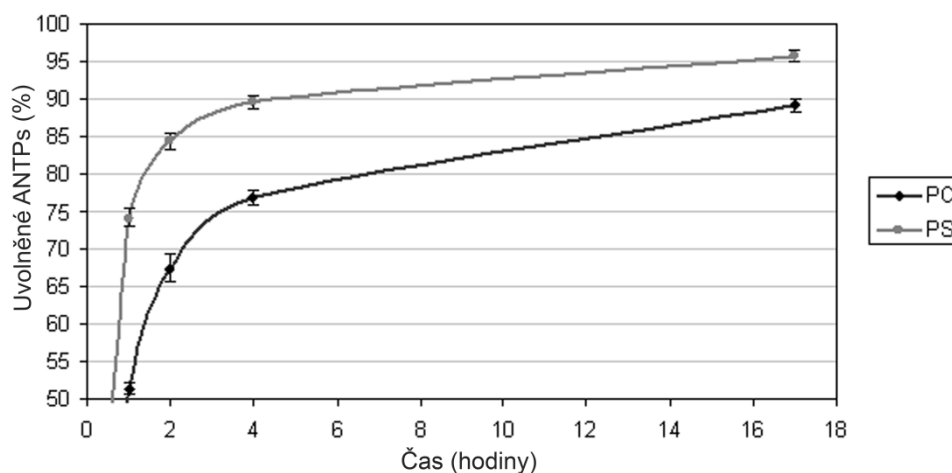
Vizualizace spojení liposomů s povrchem mikrovláken byla provedena pomocí kryoelektronové mikroskopie (Obr. 5.2.3.). Jak je jasně zřejmé, liposomy pevně přilnuly k povrchu vláken a penetrovaly hluboko do mikrovlákenné vrstvy.



Obr. 5.2.3. Detailní zobrazení adheze liposomů na PHEMA mikrovlákna. FESEM mikrovláken s adherovanými liposomy (a,c) a nemodifikovaných mikrovláken (b).

Nábojová interakce mezi polymerem a liposomy byla potvrzena měřením uvolňování nabitých a nenabitých liposomů z PHEMA vláken. PHEMA je nukleofilní díky hydroxylovým a karbonylovým skupinám v jeho řetězcích. Ukázalo se, že negativně nabitě liposomy (PS) byly charakterizovány kratším poločasem uvolňování než nenabitě liposomy (PC) (Obr. 5.2.4.). Rychlejší uvolňování záporně nabitých liposomů může být vysvětleno repulzí mezi částečně záporně nabitými funkčními skupinami PHEMA a PS. Tyto výsledky ukazují, že interakce mezi mikrovlákny a liposomy je částečně založena na elektrostatických interakcích.

Uvolňování ANTPs z liposomů



Obr. 5.2.4. Povrchový náboj PHEMA mikrovláken ovlivnil uvolňování ANTP z negativně nabitých (PS) a nenabitých (PC) liposomů.

5.2.1.3. Adheze a proliferace chondrocytů na PHEMA mikrovláknenný nosič a tvorba chrupavčité tkáně

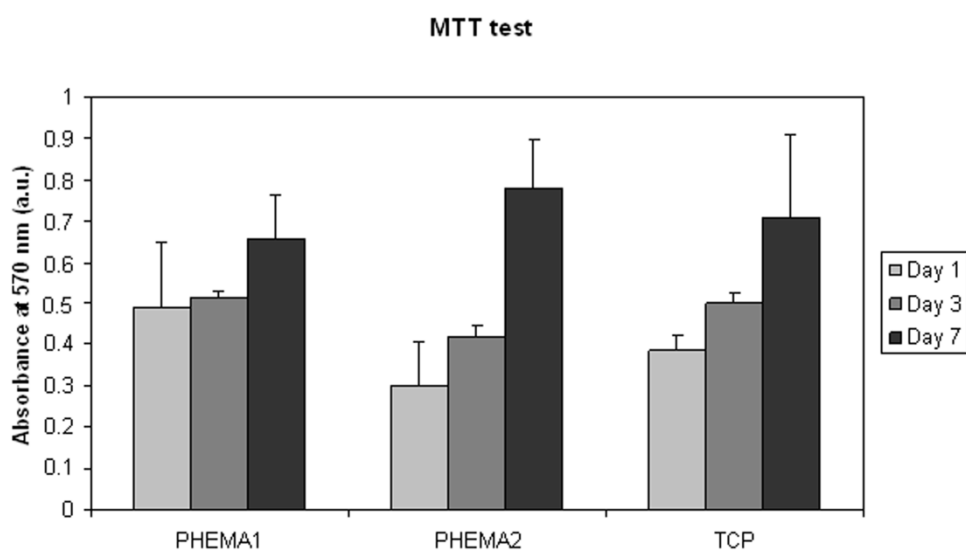
PHEMA mikrovláknenný nosič se jeví jako zajímavý materiál pro použití v tkáňovém inženýrství. Avšak pouze struktura nosiče jako taková není dostatečná pro tvorbu nové tkáně. Vedle vhodného průměru vláken musí materiál vykazovat také biokompatibilitu vůči buňkám. Z tohoto důvodu byl nejprve otestován pro adhezi chondrocytů samotný nosič z PHEMA (bez funkcionalizace). Buňky byly fluorescenčně obarveny a sledovány konfokálním mikroskopem. Buněčná adheze byla odečtena z plochy adherovaných buněk. Chondrocyty adherovaly k oběma PHEMA nosičům (Tabulka 5.2.1.).

Tabulka 5.2.1. Buněčná adheze na PHEMA nosiče

Nosič	Plochy buněk (μm^2)
PHEMA1	257 ± 19
PHEMA2	254 ± 25
PHEMA 1/PBS	203 ± 63*
PHEMA 1/FBS	269 ± 78

Plochy buněk na mikrovláknenných nosičích PHEMA1 a PHEMA2 (kultivováno v médiu s FBS), a na nosičích s adherovanými liposomy (PHEMA1/PBS a PHEMA/FBS, kultivováno v bezsérovém médiu) 24 hodin po nasazení. Plochy buněk byly odečteny z obrázků konfokální mikroskopie pomocí softwaru Ellipse (hodnota ± směrodatná odchylka; $p < 0,05$).

Metabolická aktivita a proliferace buněk byla měřena pomocí MTT testu. Oba mikrovláknenné nosiče připravené z PHEMA prokázali dobrou biokompatibilitu k chondrocytům. Pomocí MTT testu byla zjištěna dobrá proliferace 3 a 7 dní po nasazení buněk na nosiče (Obr. 5.2.5.). 3. den nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi PHEMA nosiči (absorbance A = 0,51 a 0,42) a kontrolním kultivačním plastikiem (A = 0,50). 7 dní po nasazení buněk na nosiče pak byla největší absorbance naměřena na nosiči PHEMA2 (A = 0,77), nicméně nebyl zaznamenán rozdíl v signifikanci mezi jednotlivými vzorky (kultivační plastik: A = 0,71; PHEMA1: A = 0,66).



Obr. 5.2.5. Adheze chondrocytů a biokompatibilita PHEMA mikrovláknenných nosičů byla zjištěna pomocí MTT testu.

Proliferace a distribuce buněk na nosičích byla vizualizována pomocí barvení propidium jodidem a konfokálním mikroskopem. 7 dní po nasazení buněk na nosiče byly buňky soustředěny do oddělených ostrůvků. Hustota buněk výrazně stoupla po 14 dnech kultivace, kdy byla průměrná hustota buněk na PHEMA1 naměřena $2,2 \times 10^5$ buněk/cm² a na PHEMA2 $1,8 \times 10^5$ buněk/cm².

Tvorba chrupavčité tkáně na nosičích byla hodnocena podle přítomnosti proteinů charakteristických pro její mezibuněčnou hmotu. Specifickým proteinem pro hyalinní chrupavku je kolagen II. Pro jeho detekci byla použita imunofluorescenční metoda pomocí fluorescenčně značené protilátky. Z obrázků získaných z konfokálního mikroskopu byla

odečtena relativní plocha pokrytá kolagenem II. Po 14 dnech kultivace pokrýval kolagen II 47 % povrchu PHEMA nosičů (Tabulka 5.2.2.).

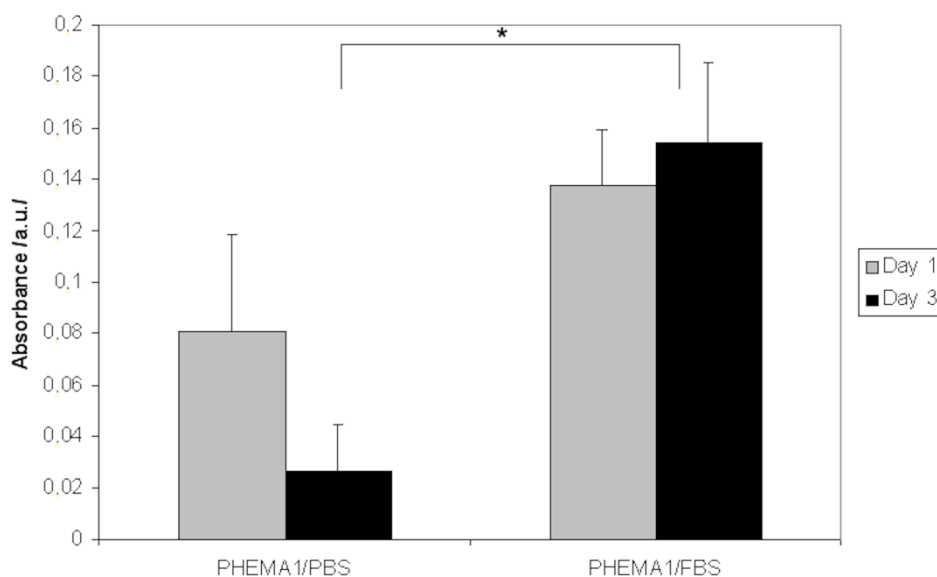
Tabulka 5.2.2. Expresí kolagenu II na PHEMA nosičích po 14 denní kultivaci

Nosič	Množství kolagenu II (%)
PHEMA1	47 ± 0,9
PHEMA2	47 ± 3,6

Plocha kolagenu II vyprodukovaného na mikrovlákných nosičích, 14 dní po nasazení chondrocytů (hodnota ± směrodatná odchylka). Plochy byly určeny z obrázků získaných z konfokální mikroskopie, pomocí softwaru Ellipse.

5.2.1.4. In vitro testování PHEMA1 nosiče obohaceného liposomy

Vyvinutý nosič s liposomy byl testován jako možný systém řízeného dodávání léčiv. Do liposomů navázaných na vlákna nosiče byly uzavřeny stimulační faktory, pozitivně ovlivňující buněčnou adhezi a proliferaci. Jako modelová látka bylo použito FBS, které obsahuje celou řadu látek se stimulačními efekty na buňky. Buněčná adheze byla posuzována podle plochy rozptřeni buněk, odečtených z fluorescenčního barvení 24 hodin po nasazení buněk na nosič. Nejlepší buněčná adheze byla sledována na nosiči PHEMA1/FBS (269 μm^2), což byla hodnota signifikantně vyšší než na kontrolním nosiči PHEMA1/PBS (203 μm^2) a dokonce než na nosiči PHEMA1 kultivovaném v médiu obohaceném FBS (257 μm^2) (Tabulka 5.2.1.). Během této části experimentu nebylo vyměňováno kultivační médium, abychom předešli odmývání stimulačních faktorů. Z tohoto důvodu byla provedena MTT analýza pouze 1. a 3. den kultivace. Výsledky dobře korelovaly s buněčnou adhezí. Výrazně vyšší buněčná proliferace byla naměřena na PHEMA1/FBS ($A = 0,15$), než na PHEMA1/PBS ($A = 0,05$) (Obr. 5.2.6.).



Obr. 5.2.6. Adheze chondrocytů a biokompatibilita PHEMA mikrovláknenných nosičů funkcionalizovaných liposomy byla zjištěna pomocí MTT testu.

Zlepšená buněčná proliferace byla potvrzena také metodou počítání živých buněk (Tabulka 5.2.3.). Navíc byla zaznamenána větší plocha kolagenu II na PHEMA1/FBS (8,2 %), než u PHEMA1/PBS (1,7 %) (Tabulka 5.2.4.).

Tabulka 5.2.3. Viabilita buněk na PHEMA mikrovláknenných nosičích obohacených liposomy

Nosič	Průměrná hustota buněk, 1. den (buňky/cm ²)	Průměrná hustota buněk, 3. den (buňky/cm ²)
PHEMA 1/PBS	$2,5 \pm 0,9 \times 10^3$	$2,1 \pm 0,7 \times 10^3$
PHEMA 1/FBS	$4,4 \pm 1,6 \times 10^{3*}$	$5,2 \pm 3,3 \times 10^{3*}$

Hustota buněk na mikrovláknenných nosičích byla odečtena z barvení živých/mrtvých buněk, vizualizovaného pomocí konfokální mikroskopie (hodnota \pm směrodatná odchylka; $p < 0,05$).

Tabulka 5.2.4. Expresí kolagenu II na nosičích s adherovanými liposomy

Nosič	Množství kolagenu II
PHEMA 1/PBS	$1,7 \pm 0,7$
PHEMA 2/FBS	$8,2 \pm 2,5^*$

Plocha kolagenu II vyprodukovaného na PHEMA1 nosičích s adherovanými liposomy 3 dny po nasazení chondrocytů (hodnota \pm směrodatná odchylka; $p < 0,05$). Plochy byly určeny z obrázků získaných z konfokální mikroskopie, pomocí softwaru Ellipse.

5.2.2. Diskuse

5.2.2.1. Příprava vláken PHEMA elektrostatickým zvlákňováním

Syntetické polymery jsou úspěšně používány v tkáňovém inženýrství (Lannutti et al., 2007). V této studii byla úspěšně připravena mikro- a nanovlákná z PHEMA. To bylo předpokládáno na základě předchozích studií (Horak et al., 2008). Bylo ovšem třeba odstranit problém s nestabilitou ve vodném roztoku, což bylo docíleno nebulizací kyselinou fosforečnou. Nižší koncentrace kyseliny fosforečné (5 %) vedla k vytvoření vláken s menším poloměrem. Nebulizace sehrála důležitou roli při tvorbě struktury mikrovláken a klíčovou roli při tvorbě pevného nosiče. Delší nebulizace vedla k větší koncentraci síťovadla a tím větší stabilitě ve vodě, což umožňuje jejich využití v tkáňovém inženýrství.

5.2.2.2. Imobilizované liposomy na mikrovláknech jako možnost řízeného dodávání léčiv

Bylo prokázáno, že PHEMA mikrovlákna jsou vhodný nosič pro adhezi a proliferaci chondrocytů. Navíc se ukázalo, že PHEMA je vhodný materiál pro adhezi liposomů a tím může sloužit jako nosič pro řízené dodávání léčiv. Mikro- a nanovlákná jsou charakteristické velkým specifickým povrchem, což umožňuje velkou adhezi. Bylo prokázáno, že vazba liposomů na vlákna je ovlivněna nábojovými interakcemi. Záporně nabitě liposomy se z PHEMA mikrovláken uvolňovaly rychleji. Nábojové interakce mezi liposomy a vlákny je třeba nadále studovat.

Liposomy a imunizované liposomy jsou často využívány jako nosiče pro léčiva, proteiny, peptidy, plasmatickou DNA, oligonukleotidy nebo ribosomy pro farmaceutické, kosmetické a biochemické účely (Ulrich, 2002, Bonanomi et al., 1987). Jejich membrána je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, která je nepropustná pro ionty a velké bipolární molekuly, jako jsou sacharidy a proteiny. To umožňuje uzavřít do nich látky rozpustné ve vodě a ochránit je před vnějším prostředím. Tyto vlastnosti dělají z liposomů vhodný prostředek pro transport mnoha biologicky aktivních látek (Matteucci and Thrall, 2000). Nicméně liposomy mají i slabiny, mezi něž patří například cílené doručení. Přichycení liposomů na nanovlákná může rozšířit jejich užití v řízeném dodávání léčiv.

Imobilizace liposomů v blízkosti chondrocytů umožňuje uvolnění v nich obsažených látek v okolí buněk. To bylo potvrzeno v našem pokusu, kdy bylo jako stimulační látky

použito FBS. Liposomy přichycené k povrchu mikrovláknenného nosiče společně s chondrocyty, ovlivnily chování buněk. Postupné uvolňování séra do okolí buněk ovlivnilo pozitivně buněčnou proliferaci (Tabulka 5.2.3., Obr. 5.2.6). Tento systém se ukázal jako slibný pro řízené uvolňování léčiv v tkáňovém inženýrství.

5.2.2.3. Využití PHEMA mikrovláken pro účely tkáňového inženýrství

Nosiče pro tkáňové inženýrství by měly v ideálním případě napodobovat nativní tkáň. Z tohoto důvodu jsou vláknenné nosiče s průměrem vláken podobným mezibuněčné hmotě slibným materiálem pro regenerativní medicínu. Nanovláknenné kompozitní nosiče připravené elektrostatickým zvlákněním PLGA, chitosanu a PVA byly použity pro rekonstrukci kůže (Duan et al., 2006). Kompozitní membrána z PVA a chitosanu napodobila strukturu mezibuněčné hmoty a může být použita jako 3D nosič v tkáňovém inženýrství (Duan et al., 2007). Mezi další slibné syntetické materiály pro tvorbu nanovláken jsou polyvinylalkohol (Yang et al., 2008), kyselina polymléčná (Liang et al., 2007), polykaprolakton (Schnell et al., 2007), polyetylglykol (Rhee et al., 1997), polyakrylamid (Savina et al., 2006), polyfosfazeny (Carampin et al., 2007) a polyuretany (Zhang et al., 2007a). Všechny tyto materiály lze použít pro růst chondrocytů a jiné aplikace tkáňového inženýrství.

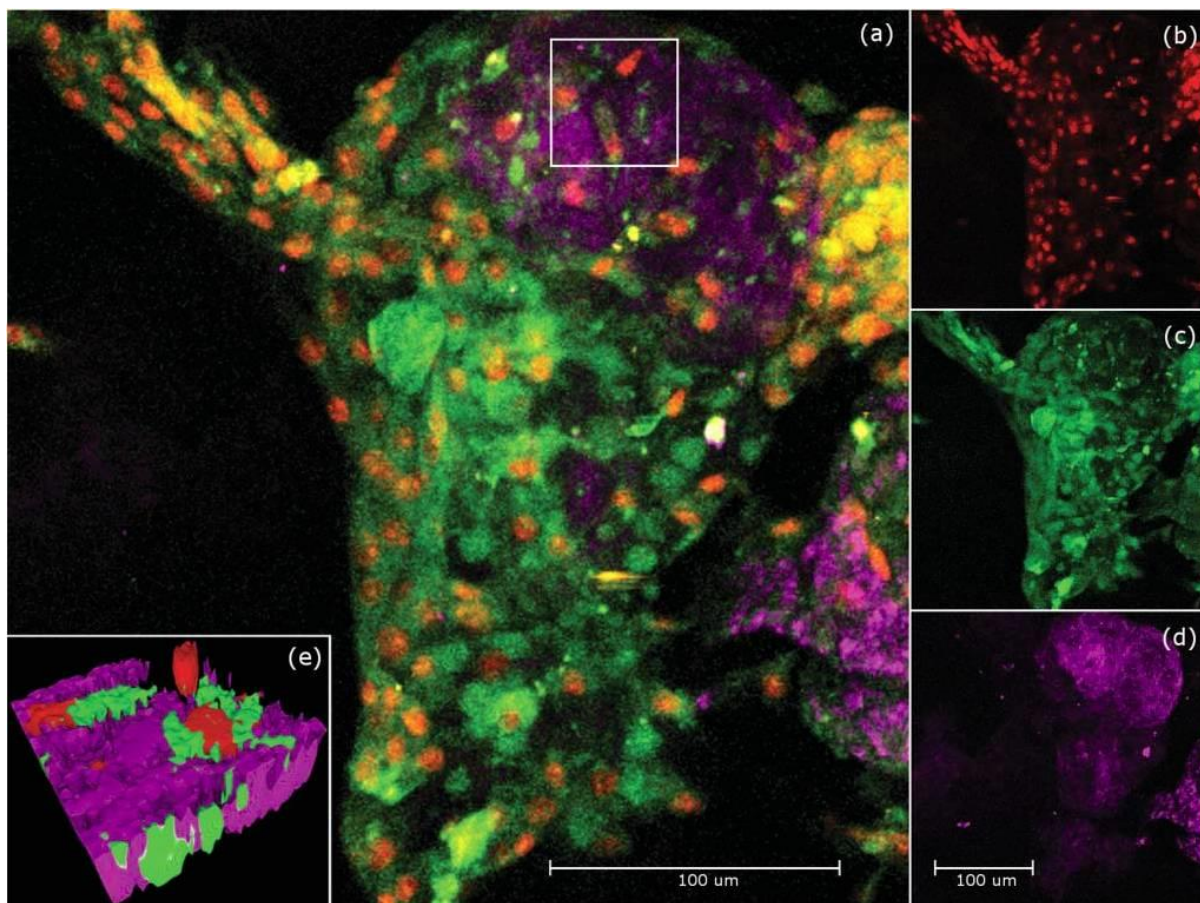
Jak vyplývá z našich výsledků, velká plocha a vysoká adheze jsou důležitými vlastnostmi vláken připravených elektrostatickým zvlákněním. Přichycení liposomů na tato vlákna společně s buňkami může lokálně posílit efekt stimulační látky, jako je zlepšená adheze a proliferace. Vývoj a příprava systému vláknenné vrstvy s liposomy může vést k vývoji nové aplikace v tkáňovém inženýrství. Přes naše pozitivní výsledky *in vitro*, je třeba dalších studií, aby byla lépe objasněna interakce tohoto systému s živou tkání. Z tohoto důvodu plánujeme další experimenty *in vivo*.

5.3. Použití nelineární mikroskopie pro analýzu a 3D vizualizaci kolagenu v nosičích osazených chondrocyty

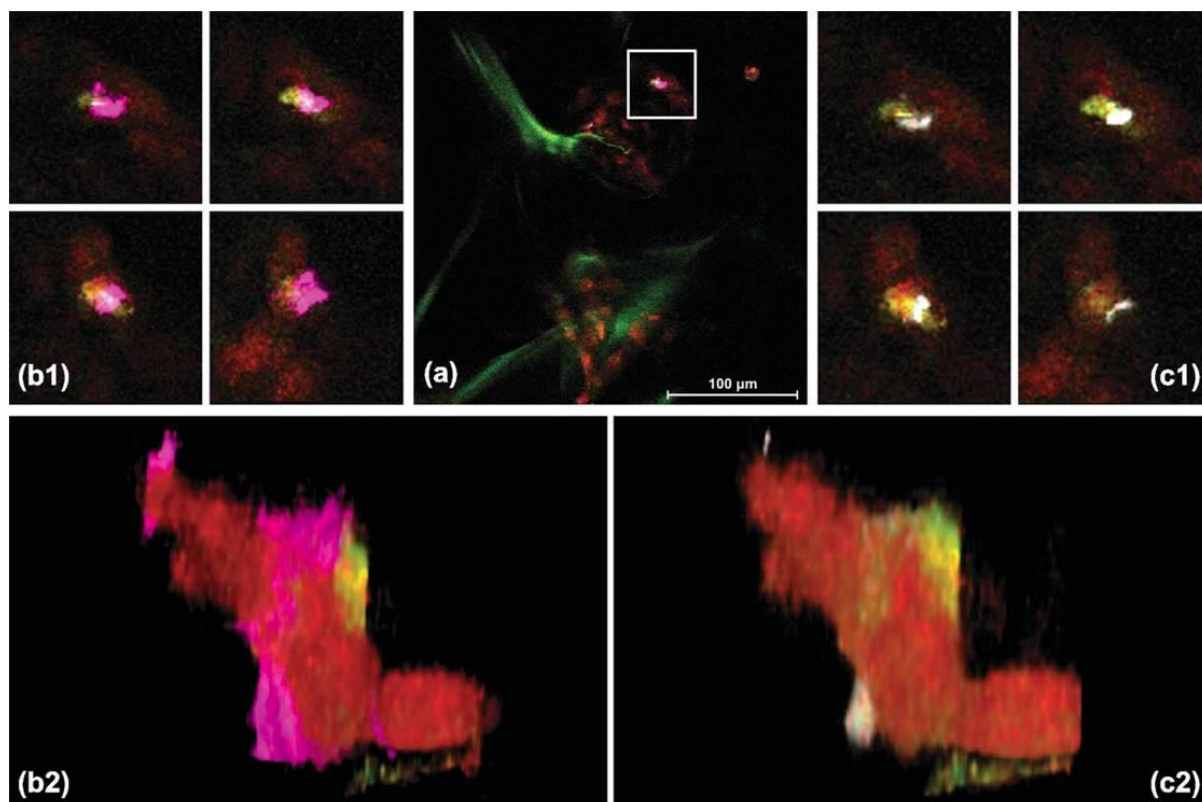
5.3.1. Výsledky

SHG bylo použito jako metoda pro detekci kolagenu II v mezibuněčné hmotě. Jako model pro testování detekce kolagenu v tkáňovém inženýrství, byly použity želatinové a PCL pěny osazené chondrocyty. Hustota buněk na 5% želatinové pěně byla $1,4 \times 10^4$ buněk /mm³ a na PCL pěně $5,5 \times 10^4$ buněk /mm³. Chondrocyty dobře přilnuly k povrchu jak PCL (Obr. 5.3.1.), tak želatinové pěny (Obr.5.3.2.). Podle očekávání buňky nosič dobře porostly a vrůstaly hluboko do jeho tloušťky (až 80 μm po 5 dnech). Buňky byly shromážděny do velkých ostrůvků, nebo tvořily souvislou vrstvu.

Proliferace chondrocytů byla spojena s produkcí proteinů mezibuněčné hmoty. Jako typický protein chrupavky byl vizualizován kolagen II a to nejprve konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM). Byla použita fluorescenčně značená protilátka proti kolagenu II. Zatímco na želatinovém nosiči byla zaznamenána pouze ojedinělá přítomnost kolagenu II, velké množství bylo shledáno na pěně PCL (Obr. 5.3.1.). Bylo provedeno stereologické měření objemu kolagenu v pěti 100 μm tlustých vzorcích z PCL pěny. Měření odhalilo $5,6 \pm 1,8 \%$ ($7,49 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) a $2,6 \pm 2,3 \%$ ($3,43 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) kolagenu v nosiči ($140,57 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) při použití nondescanned a descanned módu.



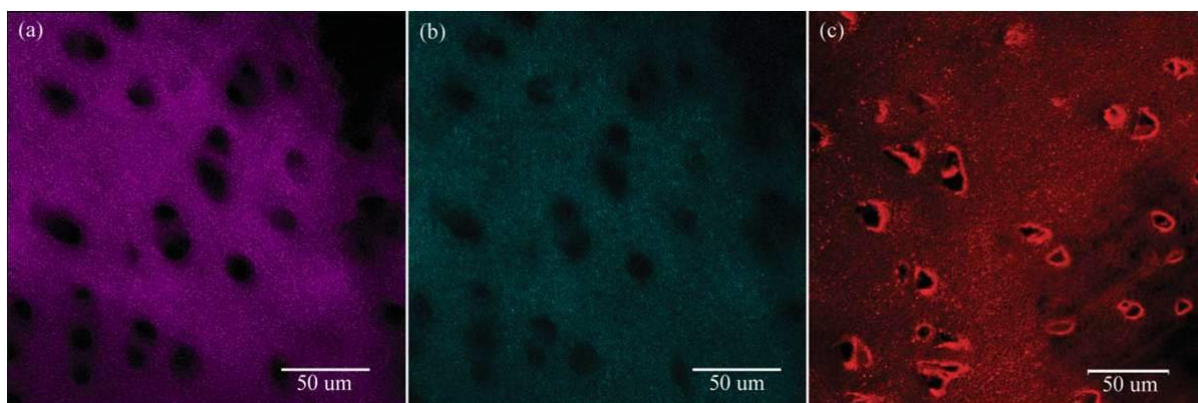
Obr. 5.3.1. Detekce kolagenu na PCL pěnovém nosiči. Projekce maximálních intenzit z 30 μm hloubky nosiče (a), objektiv 20 \times , zoom 2 \times , měřítko 100 μm . Jedná se o překryv signálu buněčných jader obarvených propidium jodidem (červený signál), detekovaného TPE v descanned módu (b), prokolagenu obarveného Cy3 (zelený signál), detekovaného TPE a kolagenu detekovaného SHG v zadním nondescanned módu (purpurová)(d). Výběr na obrázku (a) znázorňuje detailně 3D rekonstrukci rozložení kolagenu v části nosiče o velikosti 36 \times 36 \times 19 μm (e).



Obr. 5.3.2. Želatinový nosič zobrazený pomocí SHG v předním a zadním módu. Na obrázku (a) jsou pomocí TPE zobrazena buněčná jádra obarvená propidium jodidem (červený signál), autofluorescence nosiče (zelený signál) a SHG signál v zadním módu (purpurová). Výběr na obrázku (a) je v detailu zobrazen na čtyřech optických sekcích, 10 μm každá: (b1) SHG signál v zadním módu (purpurová), (c1) SHG signál v předním módu (modrozelená). 3D znázornění výběru z obrázku (a) vykazuje silnější SHG signál detekovaný v zadním módu (b2) v porovnání se signálem v předním módu (c2). Rozměry výseku jsou 60 \times 60 \times 70 μm , objektiv 20 \times .

Výsledky z tradiční konfokální mikroskopie byly porovnány s obrázky získanými pomocí SHG v předním a zadním nondescanned módu. U obou nosičů byl SHG signál dobře viditelný (Obr. 5.3.1 a 5.3.2.) a dobře korespondoval s detekcí imunofluorescenčního barvení kolagenu II. Autofluorescence byla použita pro zviditelnění struktury pěnových nosičů. Nejsilnější signál kolagenu II byl detekován v okolí velkých shluků buněk.

Fluorescenční signál kolagenu II byl získán pomocí CLSM (Obr. 5.3.3.). Intenzivní signál SHG byl detekován jak v mezibuněčné hmotě chrupavky, tak v okolí buněk, kde byl přítomen nově syntetizovaný kolagen. Vedle kolagenu byly rovněž vizualizovány chondrocyty a nosiče, a to současným snímáním SHG a TPEM.



Obr. 5.3.3. Kolagen v nativní prasečí chrupavce. SHG signál kolagenu byl značně silnější v zadním módu (a), než v předním (b). Imunohistochemické barvení kolagenu II, pomocí Cy3 fluorescenční sondy, bylo vizualizováno pomocí CLSM ($\lambda_{exc} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 555 \text{ to } 600 \text{ nm}$) (c). Projekce maximálních intenzit, objektiv $20\times$, měřítko $50 \mu\text{m}$.

Bylo měřeno množství vizualizovaného kolagenu produkovaného buňkami (porovnáním signálu z předního a zadního módu SHG). Pro rozeznání oblastí se silným signálem SHG bylo použito prahování ve stupních šedi na získaných 3D obrázcích. Objem těchto oblastí byl vypočítán z počtu voxelů. Při použití prahu 30 (škála 0 – 225 stupňů šedi), byl vypočítán objem kolagenu detekovaný v předním módu na $5,36 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ a v zadním na $1,54 \times 10^5 \mu\text{m}^3$. Objem celého snímaného vzorku byl $140,57 \times 10^5 \mu\text{m}^3$. To naznačuje větší citlivost detekce kolagenu v zadním módu v porovnání s módem předním.

5.3.2. Diskuse

Multifotonová mikroskopie je vyvíjející se technika s vysokou rozlišovací schopností, která byla úspěšně použita v různých odvětvích biomedicíny (Denk et al., 1990, Diaspro et al., 2005). Nelineární mikroskopie může produkovat dva druhy signálů, fluorescence a SHG. Zatímco dvoufotonová excitace (*Two photon excitation* – TPE) je metoda platná pro monitorování dynamického chování chemických složek tkání, SHG je nová metoda pro zjištění jejich prostorové distribuce (Imanishi et al., 2007). Při TPE je fluorescenční molekula excitována současně dvěma fotony, jejichž celková energie vede k přechodu molekuly do excitovaného stavu, zatímco SHG je koherentní nelineární proces, který vzniká při extrémně intenzivním osvětlení centrálně symetrických molekul, jako je kolagen, myosin a mikrotubuly (Campagnola et al., 2002). Aby bylo možno dosáhnout takové koncentrace fotonů, je třeba

koncentrace laseru do krátkých pulsů (kolem 200 fs) s frekvencí kolem 80 MHz. Vlnová délka emitovaného světla odpovídá přesně polovici excitační vlnové délky. Intenzita emise odpovídá čtverci energie excitační v ohnisku (Palero, 2007). Mezi výhody SHG patří vysoká citlivost a rozlišení a nevysvěcování vzorku, absence autofluorescence a nedestruktivní zviditelnění nativní tkáně.

SHG bylo použito pro studium různých tkání obsahujících kolagen, jako je kůže, šlacha, sval, chrupavka, fascie nebo endometrium (Légaré et al., 2007, Williams et al., 2005, Bianchini and Diaspro, 2008, Chernyavskiy et al., 2009, Cox et al., 2003, Brockbank et al., 2008). Také byly sledovány strukturální změny kolagenu v chrupavce zamražené pro uchování (Brockbank et al., 2008).

V naší studii byl sledován signál SHG z mezibuněčné hmoty chrupavky (Obr. 5.3.3.a, b). Tento signál byl homogenní, což bylo ve shodě s imunohistochemickým obarvením kolagenu II (Obr. 5.3.3.c). Byla hledána optimální technika pro detekci kolagenu pomocí SHG. Byly sledovány signály z descanned a nondescanned módu, tyto signály se lišily. Jak se ukázalo v pracích Bianchiniho a Diaspra (Bianchini and Diaspro, 2008) a Coxe a kol. (Cox et al., 2003), signál SHG ve předním módu nemůže projít vzorkem tlustším než 500 μm . Využití zadního módu SHG u tlustších vzorků je tedy výhodnější. To je v souladu s výsledky naší studie, kde byly použity vzorky s tloušťkou 100 a 300 μm .

Data získaná z obou módů ukázala nehomogenní distribuci kolagenu ve 3D a byla ve shodě s imunohistochemickým barvením kolagenu II. Již pátý den kultivace buněk na nosičích byl přítomen kolagen a to zejména v okolí buněk. To bylo způsobeno tím, že použitá protilátka se váže na prokolagen a novotvořený kolagen (Obr.). Naopak SHG signál byl viditelný v oblasti dobře organizovaného kolagenu v mezibuněčné hmotě. Tyto data jsou v souladu s dřívější studií *in vivo* (Filova et al., 2008). Nižší signál SHG u želatinových pěn může být způsoben větším obsahem nezralého kolagenu ve vzorku.

Vedle kolagenu mohou být pomocí CLSM, TPEM A SHG zviditelněny i jiné přírodní nebo syntetické polymery (Sun et al., 2008, Wang et al., 2005). Mnoho přírodních fluoroforů, jako jsou například aminokyseliny (tryptofan, tyrosine a fenylyalanin) obsažené v kolagenu, elastinu a dalších proteinech, flavin adenin di-nukleotid, nikotinamid adenin di-nukleotid, porfyrin, melanin, lipofuscin a další, způsobují přirozenou autofluorescenci (Chorvat and Chorvatova, 2009). Autofluorescenční signál závisí také na chemickém složení nosiče.

Například syntetické polyestery, jako je PCL, obsahují π elektrony nezbytné pro emisi fluorescence.

Produkcí kolagenu I a II chondrocyty v nosičích ovlivňuje stav diferenciací chondrocytů, hustota buněk, složení média a biomechanická stimulace (Carver and Heath, 1999, Nečas et al., 2010). V želatinovém nosiči byl signál SHG pouze ojedinělý, což bylo způsobeno pravděpodobně větším množstvím nezralého kolagenu. Silný SHG signál byl detekován v nosiči PCL (Obr. 5.3.1.). 3D rekonstrukce ukázala prostorovou distribuci kolagenu, který byl přítomen zejména v oblastech velké koncentrace buněk.

TPEM a SHG bylo použito pro vizualizaci různých tkání (Chen et al., 2008). V této studii byly pomocí CLSM, TPEM a SHG zviditelněny vzorky připravené *in vitro*. Analýza obrazu, stereologická měření a 3D rekonstrukce obrazu umožnila kvantifikaci a vizualizaci systému buněk, kolagenu a nosiče. To zatím nebylo nikde publikováno. Bylo prokázáno, že zmíněné metody jsou použitelné pro analýzu a vizualizaci kolagenu v nosičích určených pro tkáňové inženýrství chrupavky.

5.4. Kompozitní hydrogel na bázi fibrinu a kyseliny hyaluronové jako vhodný nosič pro implantaci chrupavky *in vivo*

5.4.1. Výsledky

5.4.1.1. Příprava hydrogelového nosiče a biomechanické testování

Byly připraveny 2 druhy nosičů, z nichž jeden obsahoval kolagen I (0,1 mg/ml), a druhý nikoli. Biomechanické vlastnosti těchto nosičů připravených *in vitro*, byly testovány pomocí metody tupého nárazu. Přítomnost kolagenu výrazně ovlivnila biomechanické vlastnosti nosiče, který byl signifikantně pevnější a byl charakterizován o přibližně 25% vyšším Youngovým modulem pružnosti (Tabulka 5.4.1.).

Tabulka 5.4.1. Biomechanické vlastnosti hydrogelů

Nosič	Youngův modul (MPa)
Kolagenní nosič	0,544 ± 0,008
Nosič bez kolagenu	0,445 ± 0,005
Regenerovaná chrupavka	1,754 ± 0,015
Nativní chrupavka	2,390 ± 0,051

Youngův modul kolagenního nosiče, kompozitního hydrogelu na bázi fibrinu/HA okamžitě po přípravě a 6 měsíců po implantaci *in vivo* (regenerovaná chrupavka), nativní chrupavky, měřený metodou tupého nárazu (hodnota ± směrodatná odchylka, určeno z 10 nezávislých měření).

5.4.1.2. Implantace chondrograftu a léčba zvířat

Přes pozitivní účinek kolagenu na biomechanické vlastnosti, který byl prokázán v *in vitro* experimentu, v *in vivo* studii byl použit hydrogel bez kolagenu. Zvířatům v léčené skupině (Skupina I) byl implantován nosič se zvyšující se koncentrací autologních chondrocytů ($8,1 \times 10^6$ až $10,3 \times 10^6$ buněk/ml nosiče). Během 6 měsíců trvání pokusu stoupala kontinuálně váha léčených zvířat, přiměřeně k jejich věku (Tabulka 5.4.2.). Jak je patrné, v léčené skupině byla hmotnost zvířat na konci pokusu mírně vyšší. To bylo způsobeno zřejmě lepším a rychlejším hojením defektů a tím lepším krmením zvířat. Nebyly sledovány žádné klinické změny a při hojení ran nedocházelo k sekundárním zánětům. Pohyblivost kolen nebyla operací ovlivněna. Všechna zvířata přežila až do plánovaného termínu jejich eutanazie.

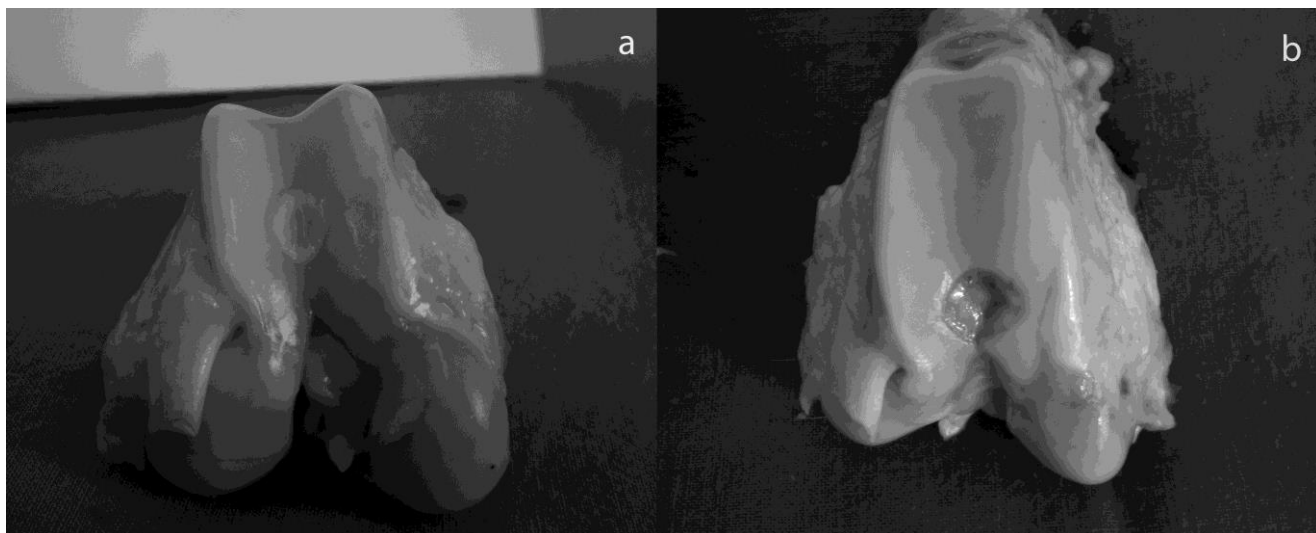
Tabulka 5.4.2. Průměrná hmotnost miniaturních prasat v průběhu pokusu

	Hmotnost 1. den (kg)	Hmotnost 3. týden (kg)	Hmotnost 6. měsíc (kg)
Skupina I	13,2 ± 0,5	15,3 ± 0,6	40,1 ± 2,3
Skupina II	12,4 ± 0,3	14,7 ± 1,0	35,5 ± 2,0

Průměrná hmotnost mini prasat ve skupině I a skupině II během experimentu. Prasata byla vážena 1. den, po 3 týdnech, a po 6 měsících. Hodnota byla průměrována z hmotnosti 8 prasat v každé skupině (hodnota ± směrodatná odchylka).

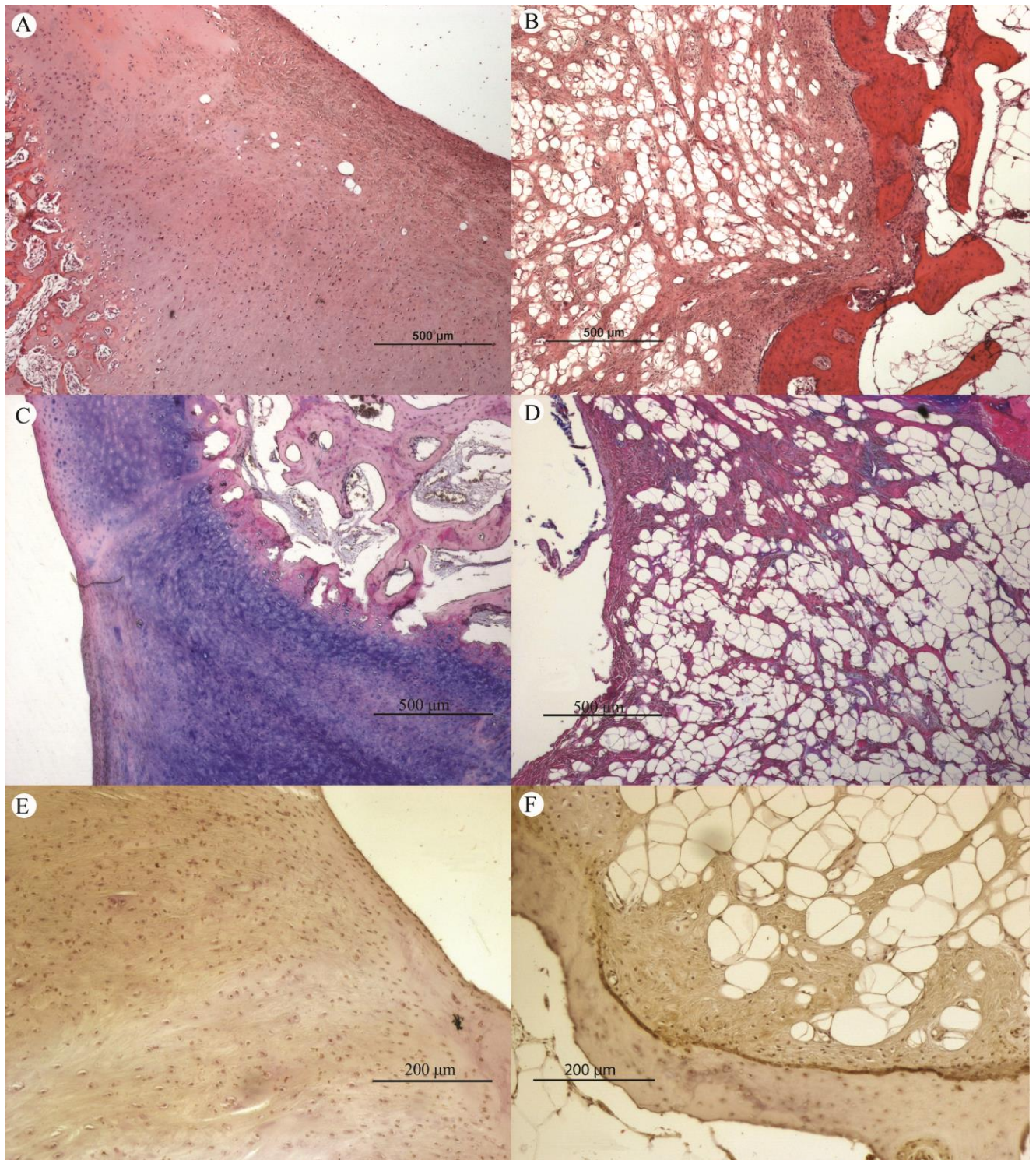
5.4.1.3. Histopatologické a imunohistochemické vyšetření

Po 6 měsících trvání experimentu bylo provedeno histologické vyšetření osteochondrálních defektů léčených hydrogelem, na bázi fibrinu a HA. Typický obraz zhojeného defektu byl oválný, s průměrem 6 – 9 mm, bílé barvy (Obr. 5.4.1.a). V některých případech byla přítomna centrální proláklina. Nebyla pozorována přítomnost exsudátu v kloubním pouzdru, ani zánět okolních měkkých tkání. Ostatní orgány v hrudní a břišní dutině nevykazovaly u žádného z miniprasat abnormality.



Obr. 5.4.1. Makroskopické vyšetření regenerované chrupavky. Snímek regenerované chrupavky 6 měsíců po implantaci nosiče osazeného buňkami (a), u kontrolní skupiny bez léčby (b).

Bylo zajímavé, že výsledky z histologického vyšetření se lišily v závislosti na počtu buněk obsažených v implantovaném nosiči. U pěti zvířat s počtem buněk od 8 do 9×10^6 byly výsledky podobné (Skupina I[A]). Okraje defektů byly lemovány úzkou nebuněčnou zónou. Směrem do defektu byly přítomny izogenetické řady chondrocytů kolmo na osu defektu, v defektu byly pozorovány známky pokročilé diferenciaci do fibrózně chrupavčité tkáně (Obr. 5.4.2.a). Byly přítomny pouze ojedinělé tukové buňky a nevýrazná vaskularizace. PAS reakce byla pozitivní na bázi defektu a jemně v jeho středu. Podobné výsledky byly shledány při barvení alcianovou modří (Obr. 5.4.2.c), přičemž fibrózní tkáň pokrývající defekt byla negativní pro oboje barvení. Imunohistochemické barvení na kolagen II bylo pozitivní v novotvořené chrupavce na okrajích defektů. Kolagen se formoval v okolí izogenetických skupin a v centru fibrózní tkáně na povrchu defektu. Méně kolagenu II bylo přítomno v centru defektu (Obr. 5.4.2.e).



Obr. 5.4.2. Histopatologické a imunohistologické vyšetření, pomocí barvení hematoxylin-eosinem, alciánovou modří, PAS a barvení kolagenu II. Histopatologické vyšetření osteochondrálních defektů léčených pomocí nosičů osazených buňkami, vykazovalo dva odlišné případy. V prvním případě (skupina I, defekt léčený nosičem obsahujícím $8,4 \times 10^6$ buněk/ml nosiče) byla vytvořena hyalinní chrupavka a fibrózní chrupavka: HE (a), alciánová modř a PAS (c), zatímco kontrolní defekt byl vyplněn tkání s minimem kolagenu a velkým množstvím tukových buněk a značnou vaskularizací: HE (b), alciánová modř a PAS (d). Nově vytvořený kolagen v regenerované chrupavce byl obarven imunohistologicky pomocí monoklonální protilátky proti kolagenu II, osteochondrální defekt léčený nosičem s buňkami (e) a kontrolní defekt bez léčby (f).

Horší hojení bylo pozorováno u nosičů obsahujících více než 9×10^6 buněk/ml (Skupina I[B]). Defekt u prasete s implantovaný nosičem obsahujícím 9×10^6 buněk/ml byl po obou okrajích lemován tenkou nebuněčnou zónou. Na okrajích a dně defektu byla vytvořena vrstva fibrózní chrupavky, obsahující izogenetické skupiny chondrocytů se znaky pokročilé diferenciaci. Střed defektu byl vyplněn řídkým vazivem s četnými tukovými buňkami a relativně nevýraznou vaskularizací. Četné malé ostrůvky chondrocytů byly pravděpodobně pozůstatkem implantovaných autologních chondrocytů. Defekt byl pokryt hustým fibrózním vazivem. Imunohistochemickým barvením byla prokázána přítomnost kolagenu II v novotvořené chrupavce na okrajích defektu v okolí izogenetických skupin. Méně kolagenu bylo pozorováno v centrální části defektu. Podobné byly výsledky z barvení alciánovou modří a PAS.

U dvou zbývajících vzorků byl defekt vyplněn řídkým kolagenním vazivem, s hojně se vyskytujícími tukovými buňkami a výraznou vaskularizací. Defekt byl na obou stranách ohraničen tenkou nebuněčnou zónou a vrstvou fibrózní chrupavky. Barvení PAS a alciánovou modří bylo pozitivní v okolí isogenetických skupin chondrocytů, střed defektu vykazoval pouze slabou pozitivitu. Kolagen II byl přítomen pouze v nebuněčné zóně v novotvořené fibrózní chrupavce.

Výsledky histologie kontrolní skupiny byly podobné jako u skupiny I(B). Defekty v kloubní chrupavce měly oválný tvar, s průměrem 8 – 11 mm, a byly vyplněny bílou tkání. V kloubní dutině, ani v okolních měkkých tkáních, nebyly shledány známky exsudátu nebo zánětu (Obr. 5.4.1.b).

Histopatologické vyšetření odhalilo, že defekt zasahuje hluboko do subchondrální kosti (hloubka přesahovala tloušťku chrupavky asi 2 – 3krát). Na obou stranách byla úzká bezbuněčná zóna. Na laterálních stranách defektu se nacházely četné izogenetické skupiny chondrocytů, procházející časnou fází diferenciaci do hyalinní chrupavky. Baze defektu byla ohraničena vrstvou kubických buněk, zřejmě osteoblasty, na níž navazovala fibrózní tkáň s četnými kapilárami. Střed defektu byl vyplněn řídkým kolagenním vazivem s velkým množstvím tukových buněk a značnou vaskularizací (Obr. 5.4.2.b). Defekt byl pokryt hustým vazivem. Barvení PAS a alciánovou modří bylo pozitivní pouze v okolí izogenetických skupin chondrocytů, střed defektu byl pozitivní pouze slabě (Obr. 5.4.2.d).

Imunohistochemické barvení na kolagen II ukázalo pouze slabou pozitivitu na okrajích defektu (Obr. 5.4.2.f).

5.4.1.4. Vyhodnocení histologického vyšetření

Obrázky z histologických řezů defektů obou skupin byly vyhodnoceny pomocí histologického bodovacího systému (Tabulka 5.4.3.). Překvapivě bylo zjištěno, že hodnota histologického skóre byla závislá na množství buněk implantovaných v hydrogelovém nosiči (Tabulka 5.4.4.). Zatímco skóre pro nosiče obsahující méně než 9×10^6 buněk/ml bylo průměrně $16,0 \pm 3,8$, skóre pro nosiče obsahující více buněk bylo pouze $9,0 \pm 0,8$. Tato hodnota byla na stejné hladině statistické signifikance jako kontrolní skupina ($9,7 \pm 2,3$).

Tabulka 5.4.3. Histologický a histochemický skórovací systém (modifikováno z Susante a kol. 1999; Skupina I – osteochondrální defekt léčený hydrogelovým kompozitním nosičem na bázi fibrinogenu a HA; II – Skupina II - kontrolní – defekt bez léčby)

Charakteristika	Skupina I A (5)	Skupina I B (3)	Skupina II
<i>Nature of predominant tissue</i>			
Morfologie buněk (I)			
Hyalinní kloubní chrupavka	0	0	0
Ne plně diferenciováno	4	0	2
Fibrózní tkáň a kost	1	3	6
Barvení tkáně alciánovou (II)			
Normální nebo blízko normálu	2	0	0
Přiměřené	2	0	1
Slabé	1	2	7
Žádné	0	1	0
<i>Strukturální charakteristika</i>			
Povrch tkáně (III)			
Hladký a kompaktní	1	1	1
Povrchová horizontální laminace	3	2	5
Praskliny, 25-100% tloušťky	1	0	2
Těžké narušení a fibrilace	0	0	0
Strukturální integrita (IV)			
Normální	1	0	0
Jemné narušení, obsahuje cysty	4	3	8
Těžká rozkládání tkáně	0	0	0
Tloušťka (V)			
100% okolní chrupavky	5	1	3
50-100% okolní chrupavky	0	2	5
0-50% okolní chrupavky	0	0	0
Vazba na okolní tkáň (VI)			
Vazba na obou okrajích a dně defektu	4	1	2
Částečná vazba	1	2	6
Není vazba	0	0	0
<i>Buněčné změny a hypocelularita</i>			
Hypocelularita (VII)			
Žádná	1	0	0
Slabá	3	0	1
Mírná	1	1	3
Těžká	0	2	4
Tvorba klastrů (VIII)			
Žádné	2	0	1
<25% buněk	3	3	7
25-100% buněk	0	0	0
Degenerativní změny v okolní chrupavce (IX)			
Normální celularita, bez klastrů, normální barvení	1	0	0
Normální celularita, mírné klastry, mírné barvení	2	0	2
Mírná nebo slabá hypocelularita, slabé	2	3	6
Těžká hypocelularita, slabé nebo žádné	0	0	0

Tabulka 5.4.4. Přehled histologického skóre pro jednotlivé skupiny

Skupina	Počet buněk v nosiči ($\times 10^6$ chondrocytů na 1 ml nosiče)	Histologické skóre	Průměrná hodnota histologického skóre
Skupina I (A)	8,1	18	$16,0 \pm 3,8^*$
	8,2	15	
	8,4	20	
	8,6	9	
	8,8	18	
Skupina I (B)	9,0	10	$9,0 \pm 0,8$
	9,7	9	
	10,3	8	
Skupina II (kontrolní)			$9,7 \pm 2,3$

Vztah mezi počtem buněk v nosiči a histologickým skóre (skupina I (A) – nosiče s množstvím buněk pod 9×10^6 buněk/ml nosiče; skupina I (B) – nosiče s množstvím buněk 9×10^6 buněk /ml nosiče, nebo více; skupina II – kontrolní, bez léčení)(hodnota \pm směrodatná odchylka, * $p < 0,05$).

5.4.1.5. Biomechanické vlastnosti nově vytvořené tkáně

Biomechanické vlastnosti tkáně zformované 6 měsíců po implantaci kompozitního hydrogelu na bázi HA a fibrinu byly porovnány s nativní chrupavkou (Tabulka 5.4.1.). Použití nosiče vedlo k tvorbě tkáně, která dosahovala 73,4 % mechanických vlastností nativní chrupavky. Youngův modul se výrazně měnil a přiblížil se tak nativní chrupavce, podobně jako diagram závislosti napětí na protažení (Tabulka 5.4.1.). Nově vytvořená tkáň vykazovala dobré biomechanické vlastnosti i přes absenci kolagenu v implantovaném nosiči.

5.4.2. Diskuse

Hydrogel vytvořený smícháním fibrinu s vysokomolekulární HA, s obsahem kolagenu I, nebo bez něj, se jevil jako vhodný materiál pro osazení chondrocyty a jejich kultivaci *in vitro*. Přítomnost kolagenu v nosiči jednoznačně změnila viskoelastické vlastnosti a zlepšila biomechanické vlastnosti chondrograftu *in vitro*. Toto zjištění souhlasí s dříve publikovanými studiemi (Filova et al., 2008, Filova et al., 2007, Park et al., 2004). Ovšem je obtížné získat

kolagen schválený pro použití v humánní medicíně. Většina schválených produktů obsahujících kolagen není povoleno použít pro kosti, šlachy nebo vazy (Bauman, 2004). Příčinou je nebezpečí přenosu bovinní encefalopatie při použití hovězího kolagenu. Rekombinantní lidský kolagen zatím nebyl rozšířen do praktického užití.

Z tohoto důvodu nebyl kolagen v této studii do hydrogelu přidán, byl tedy použit pouze fibrin a vysokomolekulární HA. Přes to, že v hydrogelu nebyl obsažen kolagen, přítomnost HA přispěla k tomu, že nosič byl poměrně tuhý a měl vhodné biomechanické vlastnosti pro implantaci.

Oproti výsledkům *in vitro*, pro regeneraci chrupavky *in vivo* nebyla přítomnost kolagenu I nutná, i tak vedla k tvorbě biomechanicky stabilní tkáně. Implantace nosičů osazených autologními chondrocyty byla miniaturními prasaty dobře tolerována. Proces hojení zasahoval většinou hluboko do subchondrální kosti bez přítomnosti tukových buněk vaskularizací ve středu defektu. Bylo přítomno více kolagenu II v místech časně diferenciací chondrocytů, novotvořená tkáň byla více diferenciována do hyalinní chrupavky oproti kontrolám. Novotvořená chrupavka vykazovala po 6 měsících od implantace zlepšené biomechanické vlastnosti a lepší výsledky histologie pokud nosič obsahoval méně buněk ($8 - 9 \times 10^6$ buněk/ml). U nosičů osazených větším množstvím buněk byly výsledky srovnatelné s neléčenými kontrolami. Biomechanické anebo viskoelastické vlastnosti nosičů jsou zřejmě limitujícími faktory během procesu hojení. Nižší difúzní koeficient a částečná destrukce fibrinového nosiče mohou být spojeny s horším prostupem živin anebo odpadních produktů. Volný objem připadající na jednu buňku nosiči byl 2 – 3krát menší než u nativní chrupavky (Temenoff 2004). Vyšší množství buněk v hydrogelu může omezit výměnu živin. Navíc, sekrece plasminogenů a metaloproteinů z enkapsulovaných buněk může ovlivnit integritu fibrinového nosiče a degradační produkty mohou negativně ovlivnit mikroprostředí buněk (Passaretti et al., 2001). Tento problém může být detailně popsán a řešen teoretickými výpočty. Tato studie byla provedena v soulasu s principy SLP.

6. Závěr

Bylo úspěšně vytvořeno několik nosičů z přírodních i syntetických materiálů, které se ukázaly jako vhodné pro růst chondrocytů a jejich syntézy proteinů mezibuněčné hmoty. Jedním z hlavních požadavků na nosiče pro tkáňové inženýrství chrupavky je 3D struktura s velkou porositou. Tento požadavek splňovaly nosiče z netkaných textilií na bázi PGA. U nosičů ze samotných PGA vláken ovšem docházelo k poklesu buněčné proliferace a to díky vzniku kyselých rozpadových produktů. Přidání PVA a/nebo chitosanu snížilo okyselení média a vylepšilo proliferaci chondrocytů na jejich povrchu. Dále byly připraveny hydrogelové nosiče na bázi fibrinu, hyaluronanu a kolagenu, pěnové nosiče z želatiny a PCL.

Mikrovláknenné nosiče z PHEMA připravené elektrostatickým zvlákněním byly funkcionalizovány pomocí liposomů sloužících jako systém řízeného dodávání látek. Chondrocyty i liposomy na PHEMA mikrovlákna dobře adorovaly. Imobilizace liposomů na vlákna nosiče přímo do blízkosti buněk a postupné uvolňování FBS vedlo k zvýšení buněčné proliferace a k podpoře syntézy kolagenu II. Tento systém se ukázal jako velmi platný pro zlepšení funkce nosiče.

Pro vizualizaci buněk a proteinů mezibuněčné hmoty bylo použito metod fluorescenční a konfokální mikroskopie. Pomocí několika barvení pomocí fluorescenčních sond a fluorescenčně značených protilátek, bylo značeno buněčné jádro a membrány. Dále bylo použito barvení živých a mrtvých buněk pro určení buněčné viability. Imunofluorescenční barvení bylo použito pro detekci kolagenu II, typického proteinu, který je syntetizován buňkami hyalinní chrupavky. Vizualizace takto obarvených buněk a struktur navíc znázornila jejich polohu ve struktuře nosiče.

Pro rychlou detekci nově exprimovaných proteinů bylo použito SHG. Výhodou této metody je možnost vizualizace mezibuněčné hmoty bez fixace a následného fluorescenčního barvení, což značně snižuje dobu přípravy vzorku. Tato metoda umožnila 3D rekonstrukci kolagenu obsaženého v nosiči v celé jeho tloušťce. Navíc, při současném použití TPDM, bylo

možno zviditeľnit nosič a buňky, a tým získať informácie o distribúci a štruktúre celého systému.

Pro regeneraci chrupavky *in vivo* je třeba vytvořit nosič, který je biokompatibilní a biomechanicky simulující nativní tkáň. Tyto podmínky dobře splňoval hydrogel na bázi fibrinu a kyseliny hyaluronové, testovaný na miniaturních prasatech. Regenerovaná chrupavka vykazovala již 6 měsíců po implantaci vylepšené biomechanické a histologické parametry. Bylo prokázáno, že kvalita procesu hojení závisí na počáteční koncentraci buněk v nosiči. Tato studie byla provedena podle principu SLP a je připravena k dalším krokům vedoucím k aplikaci pro lidské pacienty.

Abstrakt

Tkáňové inženýrství je rychle se vyvíjející obor využívající nosiče z přírodních nebo syntetických materiálů kombinovaných s buňkami a stimulačními látkami pro náhradu poškozené či chybějící tkáně. Při testování nosičů je potřeba dobře zhodnotit jejich kvality nezbytné pro růst buněk a jejich mechanickou podporu na místě určení.

Cílem práce bylo vytvoření vhodného nosiče pro růst chondrocytů, jeho funkcionalizace a detekce buněk a proteinů mezibuněčné hmoty pomocí metod fluorescenční a konfokální mikroskopie. Vhodný nosič měl být otestován na velkém animálním modelu.

V této práci bylo připraveno několik nosičů jak z přírodních, tak ze syntetických materiálů, a to ve formě mikrovláken, netkaných textilií, gelů a pěn. Nosiče byly osazeny buňkami a byla sledována buněčná adheze, proliferace a syntéza proteinů mezibuněčné hmoty. K vizualizaci buněk a mezibuněčné hmoty bylo použito metod fluorescenční a konfokální mikroskopie a druhé harmonické (SHG). Jako nosič pro implantaci do osteochondrálního defektu mini prasete byl použit gel na bázi fibrinu a hyaluronanu.

Připravené nosiče vykazovaly biokompatibilitu, chondrocyty k nim dobře adherovaly a produkovaly proteiny mezibuněčné hmoty. Mikrovlákenný nosič z PHEMA byl navíc obohacen o liposomy obsahující fetální bovinní sérum. Tento systém řízeného dodávání látek se jevil jako účinný v podpoře buněčné proliferace a diferenciaci. Fluorescenční konfokální mikroskopie byla vhodná metoda k zobrazení buněk a specifických proteinů. Použití druhé harmonické (SHG) navíc umožnilo zobrazení proteinů mezibuněčné hmoty bez použití fluoroforů. Kombinací obou těchto metod bylo možné sledovat rozložení buněk a jimi vytvořené mezibuněčné hmoty v nosiči. Kompozitní gel na bázi fibrinu a hyaluronanu byl úspěšně testován na modelu miniaturního prasete. Již po 6 měsících po implantaci byla vytvořena chrupavka hyalinního charakteru s biomechanickými vlastnostmi blízcími se nativní chrupavce.

Summary

Tissue engineering is a rapidly developing field, based on using scaffolds made from natural or synthetic materials in combination with cells and stimulating factors for the replacement of damaged or lost tissue. It is very important to evaluate qualities of these scaffolds, which are necessary for cell proliferation and their mechanical support.

The aim of this study was to develop a suitable scaffold for chondrocyte proliferation, scaffold functionalization and detection of cells and proteins of extracellular matrix (ECM) using methods of fluorescence and confocal microscopy. Another aim was to test an appropriate scaffold on a big animal model *in vivo*.

Several scaffolds from natural and synthetic materials, in the form of microfibers, non-woven textiles, gels and foams were prepared for this study. Scaffolds were seeded with chondrocytes and cell adhesion, proliferation and synthesis of ECM proteins were detected. Methods of fluorescence microscopy, confocal microscopy and second harmonic generation (SHG) were used for visualization of cells and proteins. A hydrogel based on fibrin and hyaluronan was used as a scaffold for osteochondral defect regeneration in minipigs study.

Prepared scaffolds showed high biocompatibility, good chondrocyte adhesion and ECM proteins synthesis. Moreover, microfibrinous scaffold from PHEMA was enriched by liposomes containing fetal bovine serum (FBS). This system of drug delivery was found as an appropriate system for cell proliferation and differentiation support. Fluorescent confocal microscopy was shown as a suitable method for visualization of cells and ECM. Moreover, the usage of SHG enabled detection of ECM specific proteins without any need of a fluorescent probe. Combination of these two methods enabled detection of cells and ECM distribution. Composite hydrogel based on fibrin and hyaluronan was successfully tested on the minipig model *in vivo*. Hyaline like cartilage was created 6 months after implantation.

Literatura

1. AFOKE, N. Y., BYERS, P. D. & HUTTON, W. C. 1987. Contact pressures in the human hip joint. *J Bone Joint Surg Br*, 69, 536-41.
2. AGRAWAL, C. M. & ATHANASIOU, K. A. 1997. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 38, 105-114.
3. AHMED, T. A., DARE, E. V. & HINCKE, M. 2008. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 14, 199-215.
4. ANGELE, P., ABKE, J., KUJAT, R., FALTERMEIER, H., SCHUMANN, D., NERLICH, M., KINNER, B., ENGLERT, C., RUSZCZAK, Z., MEHRL, R. & MUELLER, R. 2004. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 25, 2831-41.
5. ARA, M., WATANABE, M. & IMAI, Y. 2002. Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials*, 23, 2479-2483.
6. ATHANASIOU, K. A., NIEDERAUER, G. G. & AGRAWAL, C. M. 1996. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17, 93-102.
7. BARRIENTOS, S., STOJADINOVIC, O., GOLINKO, M. S., BREM, H. & TOMIC-CANIC, M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16, 585-601.
8. BAUMAN, L. 2004. CosmoDerm/CosmoPlast (Human Bioengineered Collagen) for the Aging Face. *Facial plast Surg*, 20, 125-128.
9. BEHRAVESH, E., TIMMER, M. D., LEMOINE, J. J., LIEBSCHNER, M. A. & MIKOS, A. G. 2002. Evaluation of the in vitro degradation of macroporous hydrogels using gravimetry, confined compression testing, and microcomputed tomography. *Biomacromolecules*, 3, 1263-70.
10. BENYA, P. D. & SHAFFER, J. D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30, 215-24.
11. BIANCHINI, P. & DIASPRO, A. 2008. Three-dimensional (3D) backward and forward second harmonic generation (SHG) microscopy of biological tissues. *Journal of Biophotonics*, 1, 443-450.
12. BONANOMI, M. H., VELVART, M., STIMPEL, M., ROOS, K. M., FEHR, K. & WEDER, H. G. 1987. Studies of pharmacokinetics and therapeutic effects of glucocorticoids entrapped in liposomes after intraarticular application in healthy rabbits and in rabbits with antigen-induced arthritis. *Rheumatology International*, 7, 203-212.
13. BONINO, C. A., KREBS, M. D., SAQUING, C. D., JEONG, S. I., SHEARER, K. L., ALSBERG, E. & KHAN, S. A. 2011. Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers*, 85, 111-119.
14. BOSTMAN, O. & PIHLAJAMAKI, H. 2000. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, 21, 2615-2621.

15. BRITTBERG, M., LINDAHL, A., NILSSON, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O. & PETERSON, L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331, 889-95.
16. BROCKBANK, K. M., MACLELLAN, W. R., XIE, J., HAMM-ALVAREZ, S., CHEN, Z. & SCHENKE-LAYLAND, K. 2008. Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage. *Cell and Tissue Banking*, 9, 299-307.
17. BRODKIN, K. R., GARCIA, A. J. & LEVENSTON, M. E. 2004. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*, 25, 5929-38.
18. BRYANT, S. J. & ANSETH, K. S. 2002. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res*, 59, 63-72.
19. BUCKWALTER, J. A. & MANKIN, H. J. 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*, 47, 487-504.
20. CAMPAGNOLA, P. J., MILLARD, A. C., TERASAKI, M., HOPPE, P. E., MALONE, C. J. & MOHLER, W. A. 2002. Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophysical journal*, 82, 493-508.
21. CAMPOCCIA, D., DOHERTY, P., RADICE, M., BRUN, P., ABATANGELO, G. & WILLIAMS, D. F. 1998. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 19, 2101-2127.
22. CAPEK, M., BRUZA, P., JANACEK, J., KAREN, P., KUBINOVA, L. & VAGNEROVA, R. 2009. Volume reconstruction of large tissue specimens from serial physical sections using confocal microscopy and correction of cutting deformations by elastic registration. *Microsc Res Tech*, 72, 110-9.
23. CARAMPIN, P., CONCONI, M. T., LORA, S., MENTI, A. M., BAIGUERA, S., BELLINI, S., GRANDI, C. & PARNIGOTTO, P. P. 2007. Electrospun polyphosphazene nanofibers for in vitro rat endothelial cells proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80A, 661-668.
24. CARNEIRO J., J. C. L., KELLEY R.O. 2002. *Základy histologie*, Praha, H+H.
25. CARVER, S. E. & HEATH, C. A. 1999. Influence of intermittent pressure, fluid flow, and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes. *Biotechnology and Bioengineering*, 65, 274-281.
26. CHEN, M. C., TSAI, H. W., LIU, C. T., PENG, S. F., LAI, W. Y., CHEN, S. J., CHANG, Y. & SUNG, H. W. 2009. A nanoscale drug-entrapment strategy for hydrogel-based systems for the delivery of poorly soluble drugs. *Biomaterials*, 30, 2102-11.
27. CHEN, W.-L., SUN, Y., LO, W., TAN, H.-Y. & DONG, C.-Y. 2008. Combination of multiphoton and reflective confocal imaging of cornea. *Microscopy Research and Technique*, 71, 83-85.
28. CHERNYAVSKIY, O., VANNUCCI, L., BIANCHINI, P., DIFATO, F., SAIIEH, M. & KUBÍNOVÁ, L. 2009. Imaging of mouse experimental melanoma in vivo and ex vivo by combination of confocal and nonlinear microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 72, 411-423.
29. CHORVAT, D. & CHORVATOVA, A. 2009. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Physics Letters*, 6, 175-193.
30. COLEMAN, R. M., CASE, N. D. & GULDBERG, R. E. 2007. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors. *Biomaterials*, 28, 2077-2086.

31. COUMAS, J. M. & PALMER, W. E. 1998. KNEE ARTHROGRAPHY: Evolution and Current Status. *Radiologic Clinics of North America*, 36, 703-728.
32. COX, G. C., XU, P., SHEPPARD, C. J. R. & RAMSHAW, J. A. 2003. Characterization of the second harmonic signal from collagen. 32-40.
33. DAAMEN, W. F., VAN MOERKERK, H. T., HAFMANS, T., BUTTAFOCO, L., POOT, A. A., VEERKAMP, J. H. & VAN KUPPEVELT, T. H. 2003. Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4001-9.
34. DANISOVIC, L., VARGA, I., POLAK, S., ULICNA, M., HLAVACKOVA, L., BOHMER, D. & VOJTASSAK, J. 2009. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Gen Physiol Biophys*, 28, 56-62.
35. DARLING, E. M. & ATHANASIOU, K. A. 2005. Retaining zonal chondrocyte phenotype by means of novel growth environments. *Tissue Eng*, 11, 395-403.
36. DAVIDSON, P. A. & CARTER, T. R. 2007. Osteochondral Allograft Transplantation. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 15, 53-61.
37. DAY, R. M., BOCCACCINI, A. R., SHUREY, S., ROETHER, J. A., FORBES, A., HENCH, L. L. & GABE, S. M. 2004. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 25, 5857-5866.
38. DENG, Y., LIN, X. S., ZHENG, Z., DENG, J. G., CHEN, J. C., MA, H. & CHEN, G. Q. 2003. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials*, 24, 4273-4281.
39. DENK, W., STRICKLER, J. H. & WEBB, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 248, 73-76.
40. DI MARTINO, A., SITTINGER, M. & RISBUD, M. V. 2005. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983-5990.
41. DIASPRO, A., CHIRICO, G. & COLLINI, M. 2005. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 38, 97-166.
42. DOILLON, C. J., WHYNE, C. F., BRANDWEIN, S. & SILVER, F. H. 1986. Collagen-based wound dressings: control of the pore structure and morphology. *J Biomed Mater Res*, 20, 1219-28.
43. DUAN, B., WU, L. L., LI, X. R., YUAN, X. Y., LI, X. L., ZHANG, Y. & YAO, K. D. 2007. Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 18, 95-115.
44. DUAN, B., YUAN, X. Y., ZHU, Y., ZHANG, Y. Y., LI, X. L., ZHANG, Y. & YAO, K. D. 2006. A nanofibrous composite membrane of PLGA-chitosan/PVA prepared by electrospinning. *European Polymer Journal*, 42, 2013-2022.
45. ELDER, B. D. & ATHANASIOU, K. A. 2009. Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 15, 43-53.
46. EYRICH, D., BRANDL, F., APPEL, B., WIESE, H., MAIER, G., WENZEL, M., STAUDENMAIER, R., GOEPFERICH, A. & BLUNK, T. 2007. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28, 55-65.
47. FILOVA, E., JELINEK, F., HANDL, M., LYTVYNETS, A., RAMPICHOVA, M., VARGA, F., CINATL, J., SOUKUP, T., TRC, T. & AMLER, E. 2008. Novel

- composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 87, 415-24.
48. FILOVA, E., RAMPICHOVA, M., HANDL, M., LYTVYNETS, A., HALOUZKA, R., USVALD, D., HLUCILOVA, J., PROCHAZKA, R., DEZORTOVA, M., ROLENCOVA, E., KOSTAKOVA, E., TRC, T., STASTNY, E., KOLACNA, L., HAJEK, M., MOTLIK, J. & AMLER, E. 2007. Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol Res*, 56 Suppl 1, S5-S16.
 49. FREED, L. E., MARQUIS, J. C., LANGER, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & EMMANUAL, J. 1994a. Composition of cell-polymer cartilage implants. *Biotechnol Bioeng*, 43, 605-14.
 50. FREED, L. E., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., BIRON, R. J., EAGLES, D. B., LESNOY, D. C., BARLOW, S. K. & LANGER, R. 1994b. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*, 12, 689-93.
 51. FREEDMAN, K. B., NHO, S. J. & COLE, B. J. 2003. Marrow stimulating technique to augment meniscus repair. *Arthroscopy*, 19, 794-8.
 52. FUKUMOTO, T., SPERLING, J. W., SANYAL, A., FITZSIMMONS, J. S., REINHOLZ, G. G., CONOVER, C. A. & O'DRISCOLL, S. W. 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 55-64.
 53. GEYER, U., HEINZE, T., STEIN, A., KLEMM, D., MARSCH, S., SCHUMANN, D. & SCHMAUDER, H. P. 1994. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *Int J Biol Macromol*, 16, 343-7.
 54. GOLDSTEIN, A. S., JUAREZ, T. M., HELMKE, C. D., GUSTIN, M. C. & MIKOS, A. G. 2001. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22, 1279-1288.
 55. GORTZ, S. & BUGBEE, W. D. 2006. Fresh osteochondral allografts: graft processing and clinical applications. *J Knee Surg*, 19, 231-40.
 56. GRAD, S., KUPCSIK, L., GORNA, K., GOGOLEWSKI, S. & ALINI, M. 2003. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials*, 24, 5163-5171.
 57. GRIFFON, D. J., SEDIGHI, M. R., SCHAEFFER, D. V., EURELL, J. A. & JOHNSON, A. L. 2006. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater*, 2, 313-20.
 58. GRIMAUD, E., HEYMANN, D. & REDINI, F. 2002. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 241-57.
 59. GUILAK, F., RATCLIFFE, A. & MOW, V. C. 1995. Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *J Orthop Res*, 13, 410-21.
 60. HAHN, S. K., PARK, J. K., TOMIMATSU, T. & SHIMOBOJI, T. 2007. Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 374-380.
 61. HANGODY, L., VASARHELYI, G., HANGODY, L. R., SUKOSD, Z., TIBAY, G., BARTHA, L. & BODO, G. 2008. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury*, 39 Suppl 1, S32-9.

62. HARRIGER, M. D., SUPP, A. P., WARDEN, G. D. & BOYCE, S. T. 1997. Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. *J Biomed Mater Res*, 35, 137-45.
63. HOLLAND, T. A. & MIKOS, A. G. 2003. Advances in drug delivery for articular cartilage. *J Control Release*, 86, 1-14.
64. HORAK, D., HLIDKOVA, H., HRADIL, J., LAPCIKOVA, M. & SLOUF, M. 2008. Superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based scaffolds: Preparation and characterization. *Polymer*, 49, 2046-2054.
65. HUANG, C. Y., REUBEN, P. M., D'IPPOLITO, G., SCHILLER, P. C. & CHEUNG, H. S. 2004. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 278, 428-36.
66. HUGHES, F. J., TURNER, W., BELIBASAKIS, G. & MARTUSCELLI, G. 2006. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, 41, 48-72.
67. HUTMACHER, D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543.
68. HWANG, N. S., KIM, M. S., SAMPATTAVANICH, S., BAEK, J. H., ZHANG, Z. & ELISSEEFF, J. 2006. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24, 284-91.
69. IMABAYASHI, H., MORI, T., GOJO, S., KIYONO, T., SUGIYAMA, T., IRIE, R., ISOGAI, T., HATA, J., TOYAMA, Y. & UMEZAWA, A. 2003. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, 288, 35-50.
70. IMANISHI, Y., LODOWSKI, K. H. & KOUTALOS, Y. 2007. Two-Photon Microscopy: Shedding Light on the Chemistry of Vision†. *Biochemistry*, 46, 9674-9684.
71. ISOGAI, N., KUSUHARA, H., IKADA, Y., OHTANI, H., JACQUET, R., HILLYER, J., LOWDER, E. & LANDIS, W. J. 2006. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng*, 12, 691-703.
72. IWASA, J., OCHI, M., UCHIO, Y., KATSUBE, K., ADACHI, N. & KAWASAKI, K. 2003. Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Artificial Organs*, 27, 249-255.
73. IWASAKI, N., YAMANE, S. T., MAJIMA, T., KASAHARA, Y., MINAMI, A., HARADA, K., NONAKA, S., MAEKAWA, N., TAMURA, H., TOKURA, S., SHIONO, M., MONDE, K. & NISHIMURA, S. 2004. Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. *Biomacromolecules*, 5, 828-33.
74. JEONG, C. G. & HOLLISTER, S. J. 2010. A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. *Biomaterials*, 31, 4304-4312.
75. JIA, Y.-T., GONG, J., GU, X.-H., KIM, H.-Y., DONG, J. & SHEN, X.-Y. 2007. Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*, 67, 403-409.
76. JOHNSON, T. S., XU, J. W., ZAPOROJAN, V. V., MESA, J. M., WEINAND, C., RANDOLPH, M. A., BONASSAR, L. J., WINOGRAD, J. M. & YAREMCHUK, M. J. 2004. Integrative repair of cartilage with articular and nonarticular chondrocytes. *Tissue Eng*, 10, 1308-15.

77. KIM, D. Y., PYUN, J., CHOI, J. W., KIM, J. H., LEE, J. S., SHIN, H. A., KIM, H. J., LEE, H. N., MIN, B. H., CHA, H. E. & KIM, C. H. 2010. Tissue-Engineered Allograft Tracheal Cartilage Using Fibrin/Hyaluronan Composite Gel and Its In Vivo Implantation. *Laryngoscope*, 120, 30-38.
78. KIM, H. D. & VALENTINI, R. F. 2002. Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res*, 59, 573-84.
79. KIM, K., LUU, Y. K., CHANG, C., FANG, D., HSIAO, B. S., CHU, B. & HADJIARGYROU, M. 2004. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J Control Release*, 98, 47-56.
80. KIM, S. E., PARK, J. H., CHO, Y. W., CHUNG, H., JEONG, S. Y., LEE, E. B. & KWON, I. C. 2003. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release*, 91, 365-74.
81. KLEMM, D., SCHUMANN, D., UDHARDT, U. & MARSCH, S. 2001. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26, 1561-1603.
82. KONRÁDOVÁ V., U. J., VAJNER L. 2000. *Funkční histologie*, Praha, H+H.
83. KRAMER, J., HEGERT, C., GUAN, K., WOBUS, A. M., MULLER, P. K. & ROHWEDEL, J. 2000. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev*, 92, 193-205.
84. KRIEGL, C., KIT, K. M., MCCLEMENTS, D. J. & WEISS, J. 2009. Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*, 50, 189-200.
85. LAHIJI, A., SOHRABI, A., HUNGERFORD, D. S. & FRONDOZA, C. G. 2000. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res*, 51, 586-95.
86. LANNUTTI, J., RENEKER, D., MA, T., TOMASKO, D. & FARSON, D. F. 2007. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 27, 504-509.
87. LASCHKE, M. W., STROHE, A., SCHEUER, C., EGLIN, D., VERRIER, S., ALINI, M., POHLEMANN, T. & MENGER, M. D. 2009. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater*, 5, 1991-2001.
88. LAURENT, T. C., LAURENT, U. B. & FRASER, J. R. 1995. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis*, 54, 429-32.
89. LEE, S. H. & SHIN, H. 2007. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 339-359.
90. LÉGARÉ, F., PFEFFER, C. & OLSEN, B. R. 2007. The Role of Backscattering in SHG Tissue Imaging. *Biophysical journal*, 93, 1312-1320.
91. LI, J., HE, A., HAN, C. C., FANG, D., HSIAO, B. S. & CHU, B. 2006. Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications*, 27, 114-120.
92. LI, J., WAN, Y., LI, L., LIANG, H. & WANG, J. 2009. Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1635-1642.

93. LI, M. Y., MONDRINOS, M. J., GANDHI, M. R., KO, F. K., WEISS, A. S. & LELKES, P. I. 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 5999-6008.
94. LIANG, D., HSIAO, B. S. & CHU, B. 2007. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1392-1412.
95. LIAO, J., GUO, X., GRANDE-ALLEN, K. J., KASPER, F. K. & MIKOS, A. G. 2010. Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 8911-20.
96. LIN, Z., WILLERS, C., XU, J. & ZHENG, M. H. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng*, 12, 1971-84.
97. LIU, H. & HSIEH, Y.-L. 2002. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 40, 2119-2129.
98. LU, L., PETER, S. J., LYMAN, M. D., LAI, H. L., LEITE, S. M., TAMADA, J. A., UYAMA, S., VACANTI, J. P., LANGER, R. & MIKOS, A. G. 2000. In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, 21, 1837-1845.
99. LUKÁŠ, D., SARKAR, A., MARTINOVÁ, L., VODSED'ÁLKOVÁ, K., LUBASOVÁ, D., CHALOUPEK, J., POKORNÝ, P., MIKEŠ, P., CHVOJKA, J. & KOMÁREK, M. 2009. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*, 41, 59-140.
100. MAQUET, V., BOCCACCINI, A. R., PRAVATA, L., NOTINGHER, I. & JEROME, R. 2003. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams. *J Biomed Mater Res A*, 66, 335-46.
101. MARTIN, I., SUETTERLIN, R., BASCHONG, W., HEBERER, M., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & FREED, L. E. 2001. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*, 83, 121-8.
102. MASUOKA, K., ASAZUMA, T., HATTORI, H., YOSHIHARA, Y., SATO, M., MATSUMURA, K., MATSUI, T., TAKASE, B., NEMOTO, K. & ISHIHARA, M. 2006. Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 79, 25-34.
103. MATSIKO, A., LEVINGSTONE, T. J., O'BRIEN, F. J. & GLEESON, J. P. 2012. Addition of hyaluronic acid improves cellular infiltration and promotes early-stage chondrogenesis in a collagen-based scaffold for cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*, 11, 41-52.
104. MATTEUCCI, M. L. & THRALL, D. E. 2000. THE ROLE OF LIPOSOMES IN DRUG DELIVERY AND DIAGNOSTIC IMAGING: A REVIEW. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 41, 100-107.
105. MI, F. L., TAN, Y. C., LIANG, H. F. & SUNG, H. W. 2002. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*, 23, 181-191.
106. MICKOVA, A., BUZGO, M., BENADA, O., RAMPICHOVA, M., FISAR, Z., FILOVA, E., TESAROVA, M., LUKAS, D. & AMLER, E. 2012. Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System. *Biomacromolecules*, 13, 952-962.

107. MIOT, S., SCANDIUCCI DE FREITAS, P., WIRZ, D., DANIELS, A. U., SIMS, T. J., HOLLANDER, A. P., MAINIL-VARLET, P., HEBERER, M. & MARTIN, I. 2006. Cartilage tissue engineering by expanded goat articular chondrocytes. *J Orthop Res*, 24, 1078-85.
108. MULLER, F. A., MULLER, L., HOFMANN, I., GREIL, P., WENZEL, M. M. & STAUDENMAIER, R. 2006. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 3955-63.
109. NA, K., PARK, J. H., KIM, S. W., SUN, B. K., WOO, D. G., CHUNG, H. M. & PARK, K. H. 2006. Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF beta-3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biomaterials*, 27, 5951-7.
110. NEČAS, A., PLÁNKA, L., SRNEC, R., CRHA, M., JUHÁSOVÁ, J., KLÍMA, J., STARÝ, D., KŘEN, L., AMLER, E., VOJTOVÁ, L., JANČÁŘ, J. & GÁL, P. 2010. Quality of newly formed cartilaginous tissue in defects of articular surface after transplantation of mesenchymal stem cells in a composite scaffold based on collagen I with chitosan micro- and nanofibres. *Physiological research*, 59, 605-614.
111. NEČAS, O. 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, Praha, H+H.
112. NETTLES, D. L., ELDER, S. H. & GILBERT, J. A. 2002. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng*, 8, 1009-16.
113. O'BRIEN, F. J., HARLEY, B. A., YANNAS, I. V. & GIBSON, L. J. 2005. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26, 433-441.
114. OLNEY, R. C., WANG, J. W., SYLVESTER, J. E. & MOUGEY, E. B. 2004. Growth factor regulation of human growth plate chondrocyte proliferation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 1171-1182.
115. OUTERBRIDGE, H. K., OUTERBRIDGE, A. R. & OUTERBRIDGE, R. E. 1995. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am*, 77, 65-72.
116. PALERO, J. A. 2007. Nonlinear spectral imaging of biological tissues. *PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands*.
117. PARK, K. M., LEE, S. Y., JOUNG, Y. K., NA, J. S., LEE, M. C. & PARK, K. D. 2009. Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomater*, 5, 1956-65.
118. PARK, S., HUNG, C. T. & ATESHIAN, G. A. 2004. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 65-73.
119. PARK, Y., SUGIMOTO, M., WATRIN, A., CHIQUET, M. & HUNZIKER, E. B. 2005. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 527-36.
120. PASSARETTI, D., SILVERMAN, R. P., HUANG, W., KIRCHHOFF, C. H., ASHIKU, S., RANDOLPH, M. A. & YAREMCHUK, M. J. 2001. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. *Tissue Eng*, 7, 805-15.
121. PATTI, A. M., GABRIELE, A., VULCANO, A., RAMIERI, M. T. & DELLA ROCCA, C. 2001. Effect of hyaluronic acid on human chondrocyte cell lines from articular cartilage. *Tissue & Cell*, 33, 294-300.
122. PAWAR, S. N. & EDGAR, K. J. 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33, 3279-305.

123. PHORNPHTKUL, C., WU, K. Y., YANG, X., CHEN, Q. & GRUPPUSO, P. A. 2004. Insulin-like growth factor-I signaling is modified during chondrocyte differentiation. *J Endocrinol*, 183, 477-86.
124. POOLE, C. A. 1997. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 191 (Pt 1), 1-13.
125. RAMBO, C. R., RECOUVREUX, D. O. S., CARMINATTI, C. A., PITLOVANCIV, A. K., ANTÔNIO, R. V. & PORTO, L. M. 2008. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 28, 549-554.
126. RHEE, W., ROSENBLATT, J., CASTRO, M., SCHROEDER, J., RAO PREMA, R., HARNER CAROL, F. H. & BERG RICHARD, A. 1997. In vivo Stability of Poly(ethylene glycol)-Collagen Composites. *Poly(ethylene glycol)*. American Chemical Society.
127. RICHARDSON, S. M., HUGHES, N., HUNT, J. A., FREEMONT, A. J. & HOYLAND, J. A. 2008. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*, 29, 85-93.
128. RIEDEL, K., RIEDEL, F., GOESSLER, U. R., HOLLE, G., GERMANN, G. & SAUERBIER, M. 2006. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair. *Int J Mol Med*, 17, 183-93.
129. RISBUD, M., RINGE, J., BHONDE, R. & SITTINGER, M. 2001. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant*, 10, 755-63.
130. ROKKANEN, P. U., BOSTMAN, O., HIRVENSALO, E., MAKELA, E. A., PARTIO, E. K., PATIALA, H., VAINIONPAA, S., VIHTONEN, K. & TORMALA, P. 2000. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*, 21, 2607-2613.
131. ROWLEY, J. A., MADLAMBAYAN, G. & MOONEY, D. J. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20, 45-53.
132. SAKAGUCHI, Y., SEKIYA, I., YAGISHITA, K. & MUNETA, T. 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 52, 2521-9.
133. SARAF, A. & MIKOS, A. G. 2006. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 592-603.
134. SASAZAKI, Y., SEEDHOM, B. B. & SHORE, R. 2008. Morphology of the bovine chondrocyte and of its cytoskeleton in isolation and in situ: are chondrocytes ubiquitously paired through the entire layer of articular cartilage? *Rheumatology (Oxford)*, 47, 1641-6.
135. SATO, T., CHEN, G., USHIDA, T., ISHII, T., OCHIAI, N., TATEISHI, T. & TANAKA, J. 2004. Evaluation of PLLA–collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 24, 365-372.
136. SAVINA, I. N., GALAEV, I. Y. & MATTIASSON, B. 2006. Ion-exchange macroporous hydrophilic gel monolith with grafted polymer brushes. *Journal of Molecular Recognition*, 19, 313-321.
137. SCHAEFER, D., MARTIN, I., SHASTRI, P., PADERA, R. F., LANGER, R., FREED, L. E. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2000. In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials*, 21, 2599-2606.
138. SCHMAL, H., MEHLHORN, A. T., ZWINGMANN, J., MULLER, C. A., STARK, G. B. & SUDKAMP, N. P. 2005. Stimulation of chondrocytes in vitro by gene transfer

- with plasmids coding for epidermal growth factor (hEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). *Cytotherapy*, 7, 292-300.
139. SCHNELL, E., KLINKHAMMER, K., BALZER, S., BROOK, G., KLEE, D., DALTON, P. & MEY, J. 2007. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend. *Biomaterials*, 28, 3012-3025.
 140. SCHULZE-TANZIL, G. 2009. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 191, 325-338.
 141. SCHULZE-TANZIL, G., DE SOUZA, P., VILLEGAS CASTREJON, H., JOHN, T., MERKER, H. J., SCHEID, A. & SHAKIBAEI, M. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 308, 371-9.
 142. SCHULZE-TANZIL, G., MOBASHERI, A., DE SOUZA, P., JOHN, T. & SHAKIBAEI, M. 2004. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12, 448-58.
 143. SHALUMON, K. T., ANULEKHA, K. H., GIRISH, C. M., PRASANTH, R., NAIR, S. V. & JAYAKUMAR, R. 2010. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydrate Polymers*, 80, 413-419.
 144. SHUM, A. W. T. & MAK, A. F. T. 2003. Morphological and biomechanical characterization of poly(glycolic acid) scaffolds after in vitro degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 81, 141-149.
 145. SILL, T. J. & VON RECUM, H. A. 2008. Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 1989-2006.
 146. SKOTAK, M., LEONOV, A. P., LARSEN, G., NORIEGA, S. & SUBRAMANIAN, A. 2008. Biocompatible and biodegradable ultrafine fibrillar scaffold materials for tissue engineering by facile grafting of L-lactide onto chitosan. *Biomacromolecules*, 9, 1902-1908.
 147. STEADMAN, J. R., MILLER, B. S., KARAS, S. G., SCHLEGEL, T. F., BRIGGS, K. K. & HAWKINS, R. J. 2003. The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J Knee Surg*, 16, 83-6.
 148. STEADMAN, J. R., RODKEY, W. G. & BRIGGS, K. K. 2002. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg*, 15, 170-6.
 149. STEVENS, M. M., QANADILO, H. F., LANGER, R. & PRASAD SHASTRI, V. 2004. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 887-94.
 150. STOOP, R. 2008. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 39, S77-S87.
 151. SUN, Y., TAN, H.-Y., LIN, S.-J., LEE, H.-S., LIN, T.-Y., JEE, S.-H., YOUNG, T.-H., LO, W., CHEN, W.-L. & DONG, C.-Y. 2008. Imaging tissue engineering scaffolds using multiphoton microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 71, 140-145.
 152. SVENSSON, A., NICKLASSON, E., HARRAH, T., PANILAITIS, B., KAPLAN, D. L., BRITTEBERG, M. & GATENHOLM, P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26, 419-431.

153. TAY, A. G., FARHADI, J., SUETTERLIN, R., PIERER, G., HEBERER, M. & MARTIN, I. 2004. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng*, 10, 762-70.
154. TEMENOFF, J. S. & MIKOS, A. G. 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21, 431-440.
155. THOMAS, V., DEAN, D. R., JOSE, M. V., MATHEW, B., CHOWDHURY, S. & VOHRA, Y. K. 2007. Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite. *Biomacromolecules*, 8, 631-7.
156. TOH, W. S., LEE, E. H., GUO, X. M., CHAN, J. K., YEOW, C. H., CHOO, A. B. & CAO, T. 2010. Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. *Biomaterials*, 31, 6968-80.
157. TSUCHIYA, K., CHEN, G., USHIDA, T., MATSUNO, T. & TATEISHI, T. 2004. The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Materials Science and Engineering: C*, 24, 391-396.
158. TULI, R., TULI, S., NANDI, S., HUANG, X., MANNER, P. A., HOZACK, W. J., DANIELSON, K. G., HALL, D. J. & TUAN, R. S. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*, 278, 41227-36.
159. UCCELLI, A., MORETTA, L. & PISTOIA, V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8, 726-36.
160. ULRICH, A. S. 2002. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*, 22, 129-50.
161. UM, I. C., FANG, D., HSIAO, B. S., OKAMOTO, A. & CHU, B. 2004. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules*, 5, 1428-1436.
162. VALONEN, P. K., MOUTOS, F. T., KUSANAGI, A., MORETTI, M. G., DIEKMAN, B. O., WELTER, J. F., CAPLAN, A. I., GUILAK, F. & FREED, L. E. 2010. In vitro generation of mechanically functional cartilage grafts based on adult human stem cells and 3D-woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials*, 31, 2193-2200.
163. VAN SUSANTE, J. L., BUMA, P., SCHUMAN, L., HOMMINGA, G. N., VAN DEN BERG, W. B. & VETH, R. P. 1999. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials*, 20, 1167-75.
164. VARGA, F., DRZIK, M., HANDL, M., CHLPIK, J., KOS, P., FILOVA, E., RAMPICHOVA, M., NECAS, A., TRC, T. & AMLER, E. 2007. Biomechanical characterization of cartilages by a novel approach of blunt impact testing. *Physiol Res*, 56 Suppl 1, S61-8.
165. VERMA, V., VERMA, P., RAY, P. & RAY, A. R. 2008. 2, 3-Dihydrazone cellulose: Prospective material for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 28, 1441-1447.
166. VUNJAK-NOVAKOVIC, G., OBRADOVIC, B., MARTIN, I., BURSAC, P. M., LANGER, R. & FREED, L. E. 1998. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog*, 14, 193-202.
167. VUNJAK-NOVAKOVIC G., F. R. I. 2006. *Culture of Cells for Tissue Engineering*, New Jersey, John Wiley and Sons Inc.
168. WANG, C. C., YANG, K. C., LIN, K. H., LIU, H. C. & LIN, F. H. 2011. A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology. *Biomaterials*, 32, 7118-26.

169. WANG, C. C., YANG, K. C., LIN, K. H., LIU, Y. L., LIU, H. C. & LIN, F. H. 2012. Cartilage regeneration in SCID mice using a highly organized three-dimensional alginate scaffold. *Biomaterials*, 33, 120-7.
170. WANG, D. A., WILLIAMS, C. G., LI, Q., SHARMA, B. & ELISSEEFF, J. H. 2003. Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel. *Biomaterials*, 24, 3969-80.
171. WANG, Y.-W., WU, Q., CHEN, J. & CHEN, G.-Q. 2005. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. *Biomaterials*, 26, 899-904.
172. WATANABE, S., INAGAKI, S., KINOCHI, I., TAKAI, H., MASUDA, Y. & MIZUNO, S. 2005. Hydrostatic pressure/perfusion culture system designed and validated for engineering tissue. *J Biosci Bioeng*, 100, 105-11.
173. WATERS, R. L., LUNSFORD, B. R., PERRY, J. & BYRD, R. 1988. Energy-speed relationship of walking: standard tables. *J Orthop Res*, 6, 215-22.
174. WATT, F. M. 1988. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci*, 89 (Pt 3), 373-8.
175. WILLIAMS, R. M., ZIPFEL, W. R. & WEBB, W. W. 2005. Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical journal*, 88, 1377-1386.
176. WOERLY, S., MARCHAND, R. & LAVALLEE, C. 1991. Interactions of copolymeric poly(glyceryl methacrylate)-collagen hydrogels with neural tissue: effects of structure and polar groups. *Biomaterials*, 12, 197-203.
177. XU, Z. C., ZHANG, W. J., LI, H., CUI, L., CEN, L., ZHOU, G. D., LIU, W. & CAO, Y. 2007. Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor. *Biomaterials*.
178. YANG, E. L., QIN, X. H. & WANG, S. Y. 2008. Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane. *Materials Letters*, 62, 3555-3557.
179. YE, C., HU, P., MA, M. X., XIANG, Y., LIU, R. G. & SHANG, X. W. 2009. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30, 4401-4406.
180. YOKOYAMA, A., SEKIYA, I., MIYAZAKI, K., ICHINOSE, S., HATA, Y. & MUNETA, T. 2005. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res*, 322, 289-98.
181. YOO, J. U., BARTHEL, T. S., NISHIMURA, K., SOLCHAGA, L., CAPLAN, A. I., GOLDBERG, V. M. & JOHNSTONE, B. 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80, 1745-57.
182. ZHANG, C., ZHANG, N. & WEN, X. 2007a. Synthesis and characterization of biocompatible, degradable, light-curable, polyurethane-based elastic hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A, 637-650.
183. ZHANG, L., YUAN, T., GUO, L. & ZHANG, X. 2012. An in vitro study of collagen hydrogel to induce the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*, 100, 2717-25.
184. ZHANG, Y., HUANG, X., DUAN, B., WU, L., LI, S. & YUAN, X. 2007b. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science*, 285, 855-863.
185. ZHENG, H., DU, Y. M., YU, J. H., HUANG, R. H. & ZHANG, L. 2001. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 80, 2558-2565.

186. ZHONG, S., TEO, W. E., ZHU, X., BEUERMAN, R. W., RAMAKRISHNA, S. & YUNG, L. Y. 2006. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J Biomed Mater Res A*, 79, 456-63.
187. ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P. & HEDRICK, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-95.
188. ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. & HEDRICK, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.

Publikace autorky:

Tato práce vznikla na Oddělení tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny AV ČR v.v.i. Základem práce jsou následující články.

Rampichová M, Košťáková E, Filová E, Prosecká E, Plencner M, Ocheretná L, Lytvynets A, Lukáš D, Amler E.: Non-woven PGA/PVA fibrous mesh as an appropriate scaffold for chondrocyte proliferation. *Physiol Res*. 2010;59(5):773-81. IF 2010 = 1,43

Rampichová M, Filová E, Varga F, Lytvynets A, Prosecká E, Koláčná L, Motlík J, Nečas A, Vajner L, Uhlík J, Amler E.: Fibrin/hyaluronic acid composite hydrogels as appropriate scaffolds for in vivo artificial cartilage implantation. *ASAIO J*. 2010 Nov-Dec;56(6):563-8. IF 2010 = 1,221

Rampichová M, Martinová L, Košťáková E, Filová E, Míčková A, Buzgo M, Michálek J, Přádny M, Nečas A, Lukáš D, Amler E.: A simple drug anchoring microfiber scaffold for chondrocyte seeding and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Feb;23(2):555-63. IF 2011 = 2,316

Filová E, Burdíková Z, Rampichová M, Bianchini P, Čapek M, Košťáková E, Amler E, Kubínová L.: Analysis and three-dimensional visualization of collagen in artificial scaffolds using nonlinear microscopy techniques. *J Biomed Opt*. 2010 Nov-Dec;15(6):066011. IF 2010 = 3,188

Ostatní publikace autorky:

M. Rampichová, J. Chvojka, M. Buzgo, E. Prosecká, P. Mikeš, L. Vysloužilová, D. Tvrđík, P. Kochová, T. Gregor, D. Lukáš, E. Amler: An elastic three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) nanofibre scaffold enhanced the migration, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. Accepted August 2012. IF 2011 = 2,521

Buzgo M, Jakubová R, Míčková A, Rampichová M, Prosecká E, Kochová P, Lukáš D, Amler E. Time-regulated drug delivery system based on coaxially incorporated platelet α -granules for biomedical use. *Nanomedicine (Lond)*. 2012 Dec 2. [Epub ahead of print] IF = 5,055

Míčková A, Buzgo M, Benada O, Rampichová M, Fišar Z, Filová E, Tesařová M, Lukáš D, Amler E.: Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules*. 2012 Apr 9;13(4):952-62. IF = 5,479

Prosecká E, Buzgo M, Rampichová M, Kocourek T, Kochová P, Vysloužilová L, Tvrđík D, Jelínek M, Lukáš D, Amler E.: Thin-layer hydroxyapatite deposition on a nanofiber surface stimulates mesenchymal stem cell proliferation and their differentiation into osteoblasts. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:428503. IF = 1,225

Prosecká E, Rampichová M, Vojtová L, Tvrđík D, Melčáková S, Juhasová J, Plencner M, Jakubová R, Jančář J, Nečas A, Kochová P, Klepáček J, Tonar Z, Amler E.: Optimized

conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Nov;99(2):307-15. IF 2011 = 2,625.

Jakubová R, Míčková A, Buzgo M, Rampichová M, Prosecká E, Tvrđík D, Amler E.: Immobilization of thrombocytes on PCL nanofibres enhances chondrocyte proliferation in vitro. *Cell Prolif*. 2011 Apr;44(2):183-91. IF 2011 = 2,521

Filová E, Jelínek F, Handl M, Lytvynets A, Rampichová M, Varga F, Činátl J, Soukup T, Trč T, Amler E.: Novel composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Nov;87(2):415-24. IF 2008 = 2,030

Filová E, Rampichová M, Handl M, Lytvynets A, Halouzka R, Usvald D, Hlučilová J, Procházka R, Dezortová M, Rolencová E, Kostáková E, Trc T, Stastný E, Koláčná L, Hájek M, Motlík J, Amler E.: Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol Res*. 2007;56 Suppl 1:S5-S16. IF 2007 = 1,505

Varga F, Držík M, Handl M, Chlpík J, Kos P, Filová E, Rampichova M, Necas A, Trc T, Amler E.: Biomechanical characterization of cartilages by a novel approach of blunt impact testing. *Physiol Res*. 2007;56 Suppl 1:S61-8. IF 2007 = 1,505