

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2024**

**Tereza Baslová**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

**Tereza Baslová**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**INTERAKCE MAKROFÁGŮ S BIOMATERIÁLEM PRO  
KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Mgr. Jana Dvořáková, Ph.D.

PLZEŇ 2024

Na této straně se nachází v tištěné verzi zadání bakalářské práce.



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Baslová Tereza

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Interakce makrofágů s biomateriálem pro kostní tkáňové inženýrství

Vedoucí práce: Mgr. Jana Dvořáková, Ph.D.

Počet stran – číslované: 38

Počet stran – nečíslované: 22

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 54

Klíčová slova: makrofág, polarizace, skafold, kostní tkáňové inženýrství, ELISA

### **Souhrn:**

Bakalářská práce se zabývá testováním vlivu hydrogelů HA2 a HB2 na polarizaci THP-1 makrofágů *in vitro*. Během polarizace makrofágů byla sledována produkce interleukinů, morfologie a viabilita buněk. Ve výzkumu bylo zjištěno, že testování polarizace makrofágů na skafoldech je možné, a že výhodnější imunomodulační vlastnosti vykazuje hydrogel HB2, vzhledem ke svému složení. Získané výsledky jsou graficky znázorněny.

## **Abstract**

Surname and name: Baslová Tereza

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Interaction of macrophages with biomaterial for bone tissue engineering

Consultant: Mgr. Jana Dvořáková, Ph.D.

Number of pages – numbered: 38

Number of pages – unnumbered: 22

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 54

Keywords: macrophage, polarization, scaffold, bone tissue engineering, ELISA

### Summary:

The bachelor thesis deals with the testing of the effect of HA2 and HB2 hydrogels on the polarization of THP-1 macrophages *in vitro*. Interleukin production, morphology and cell viability were monitored during macrophage polarization. In the research, it was found that testing macrophage polarization on scaffolds is feasible and that more favorable immunomodulatory properties are exhibited by HB2 hydrogel, due to its composition. The obtained results are graphically illustrated.

## **Předmluva**

Kritickým bodem úspěšné integrace kostního štěpu z umělého materiálu je imunitní odpověď. Této reakce se účastní makrofágy, které se v reakci na daný materiál polarizují na makrofágy M1 a M2, a které iniciují buďto zánětlivou nebo protizánětlivou odpověď. Pro vývoj nových biomateriálů je proto důležité optimalizovat metodiku jejich testování *in vitro* s ohledem na sledování imunomodulační reakce, a získat tak důležité informace ještě před použitím laboratorních zvířat.

## **Poděkování**

Na prvním místě patří velké poděkování vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Janě Dvořákové, Ph.D. za trpělivost, odborné rady a podporu v průběhu celého procesu. Děkuji také Ing. Petře Chocholaté, Ph.D. z Ústavu lékařské chemie a biochemie na LF UK Plzeň za zapůjčení hydrogelových skafoldů, bez kterých by nebylo možné uskutečnit praktickou část. Také bych chtěla poděkovat svým nejbližším, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.



# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK .....	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1 IMUNITNÍ SYSTÉM A LEUKOCYTY .....	17
1.1 Fyziologie a funkční morfologie imunitního systému.....	17
1.1.1 Imunitní odpověď .....	17
1.2 Leukocyty .....	18
1.2.1 Granulocyty .....	19
1.2.2 Agranulocyty .....	19
1.3 Makrofágy .....	20
1.4 Makrofágy v kostní reparaci.....	24
2 KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	27
2.1 Historie a vývoj tkáňového inženýrství .....	27
2.2 Tkáňové inženýrství .....	29
2.2.1 Skafoldy.....	31
2.3 Druhy materiálů pro kostní tkáňové inženýrství .....	32
2.3.1 Kovové .....	35
2.3.2 Keramické.....	35
2.3.3 Polymerní .....	35
2.3.4 Kompozity .....	36
PRAKTICKÁ ČÁST .....	37
3 CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	37
3.1 Hlavní cíl .....	37
3.2 Dílčí cíle .....	37
4 VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....	38
5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	39
6 METODIKA PRÁCE .....	40
6.1 Buněčná kultura.....	40
6.2 Hydrogelové skafoldy .....	40
6.3 Polarizace THP-1 makrofágů .....	42
6.4 ELISA.....	43
6.5 Morfologie buněk .....	45

6.6	Viabilita buněk .....	45
6.7	Statistická analýza .....	45
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	46
7.1	ELISA – testování polarizace makrofágů.....	46
7.2	Morfologie buněk .....	48
7.3	Viabilita buněk .....	50
	DISKUZE .....	51
	ZÁVĚR.....	53
	SEZNAM LITERATURY.....	54

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Koncentrace IL-10 v průběhu kultivace.....	46
Graf 2: Koncentrace IL-12 v průběhu kultivace.....	47
Graf 3: Koncentrace TNF $\alpha$ v průběhu kultivace .....	48
Graf 4: Viabilita buněk THP-1 při započetí pokusu v den 0 .....	50
Graf 5: Viabilita makrofágů M1 a M2 v den 14.....	50

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Morfologie krevních elementů.....	18
Obrázek 2: Polarizace makrofágů M1 a M2.....	21
Obrázek 3: Komunikace mezi zánětlivými buňkami a kostními progenitorovými buňkami .....	26
Obrázek 4: Příklad míst v lidském těle, které je možné uměle nahradit .....	27
Obrázek 5: Snímek myši s lidským uchem .....	29
Obrázek 6: Použitá kultivační lahev TPP 25 .....	40
Obrázek 7: Použitý hydrogelový skafold HA2 a HB2 .....	42
Obrázek 8: Možnosti uspořádání metody ELISA.....	43
Obrázek 9: Schéma uspořádání přímé ELISA.....	44
Obrázek 10: Morfologické změny monocytů THP-1 v průběhu 14denní polarizace. Vyfoceno na invertovaném mikroskopu Olympus CKX41 s objektivem 40x.....	48
Obrázek 11: Fluorescenční barvení THP-1. Aktinová vlákna barvená ActinRed červeně; jádra buněk barvená NucBlue modře. Vyfoceno na fluorescenčním stereomikroskopu Leica DM6 B s dipovacím objektivem 40x.....	49

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Shrnutí fenotypových znaků M1, M2 makrofágů a jejich subpopulací .....	23
Tabulka 2: Nomenklatura makrofágů.....	24
Tabulka 3: Druhy materiálů používaných v tkáňovém inženýrství, jejich výhody a nevýhody .....	34

## SEZNAM ZKRATEK

°C – stupeň Celsia

CD – diferenciační skupina (z angl. *Cluster of differentiation*)

CNS – centrální nervový systém

ECM – extracelulární matrix

ELISA – enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (z angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

GM-CSF – faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů (z angl. *Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*)

HA – kyselina hyaluronová

IL – interleukin

INF – interferon

LCIS – Live Cell Imaging Solution

LPS – lipopolysacharid

M1 – prozánětlivé, klasicky aktivované makrofágy

M2 – protizánětlivé, alternativně aktivované makrofágy

M-CSF – faktor stimulující kolonie makrofágů (z angl. *Macrophage Colony Stimulating Factor*)

ml – mililitr

nm – nanometr

pg – pikogram

PLA – kyselina polymléčná

PVA – polyvinylalkohol

TGF – transformující růstový faktor

Th1 – pomocné buňky typu 1

Th2 – pomocné buňky typu 2

TI – tkáňové inženýrství

TLR – toll-like receptor

TNF – faktory nekrotizující nádory

$\mu\text{l}$  – mikrolitr

$\mu\text{m}$  – mikrometr

## ÚVOD

Kost je řazena do samoregeneračních tkání, dokáže si sama opravit malé zlomeniny nebo vady. V případě velkých defektů, kostní tkáň postrádá schopnost přirozené a snadné regenerace a je třeba použít biomateriály. Ty jsou však tělem považovány za cizí složky a mohou vyvolat imunitní odpověď hostitele. Z tohoto důvodu se vývoj nových a vhodnějších biomateriálů v kostním tkáňovém inženýrství neustále posouvá směrem k vytvoření imunomodulačního mikroprostředí s využitím sledování imunitních buněk jako jsou makrofágy. Makrofágy hrají klíčovou roli v inženýrství kostní tkáně, a to vzhledem k tomu, že jsou zapojeny do každé fáze regenerace kosti. Disponují schopností polarizace na podtypy M1 nebo M2, které jsou zásadní pro opravu kostí.

Tato bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Teoretická část v první kapitole přibližuje imunitní systém a buňky imunitního systému, především makrofágy. Druhá kapitola se věnuje tkáňovému inženýrství, jeho historii a materiálům, které jsou používány. V praktické části se práce věnuje sledování vlivu hydrogelu na makrofágy, jejich polarizaci a vyhodnocení imunomodulačních vlastností testovaných typů hydrogelu.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 IMUNITNÍ SYSTÉM A LEUKOCYTY

### 1.1 Fyziologie a funkční morfologie imunitního systému

Pojem imunita zahrnuje řadu mechanismů a jejich schopnost chránit organismus rozpoznáním a eliminací potenciálně škodlivých cizorodých agens, ale také nepotřebných součástí vlastního těla. Přítomnost takových cizorodých nebo abnormálních substancí v těle stimuluje systém k rozvoji imunitní odpovědi, která představuje komplexní soubor fyziologických dějů vedoucích postupně k destrukci a eliminaci těchto substancí (2).

Imunitní systém se skládá ze dvou hlavních komponent:

1. Leukocyty
2. Lymfatické tkáně

Lymfatické tkáně zahrnují kostní dřeň, thymus, slezinu, lymfatické uzliny, fetální játra a tonzily. Zde se leukocyty shromažďují, vyvíjejí a přicházejí do kontaktu s cizorodými materiály. Všechny leukocyty (stejně jako erytrocyty) se vyvíjejí v kostní dřeni z prekurzorových buněk (hematopoetických kmenových buněk) a zároveň v kostní dřeni i dozrávají (s výjimkou T-lymfocytů, které migrují do brzlíku). Tkáně, kde se leukocyty vyvíjejí a dozrávají (kostní dřeň, thymus, fetální játra), se souhrnně nazývají centrální lymfatické tkáně, zatímco tkáně, kam pak zralé leukocyty putují, aby vykonávaly své imunitní funkce, tvoří periferní lymfatické tkáně (slezina, lymfatické uzliny, tonzily). Periferní lymfatické tkáně jsou tvořeny hustou sítí buněk, která dokáže zachytit mikroorganismy a cizorodé částice a umožňuje tak leukocytům jejich funkci (2).

#### 1.1.1 Imunitní odpověď

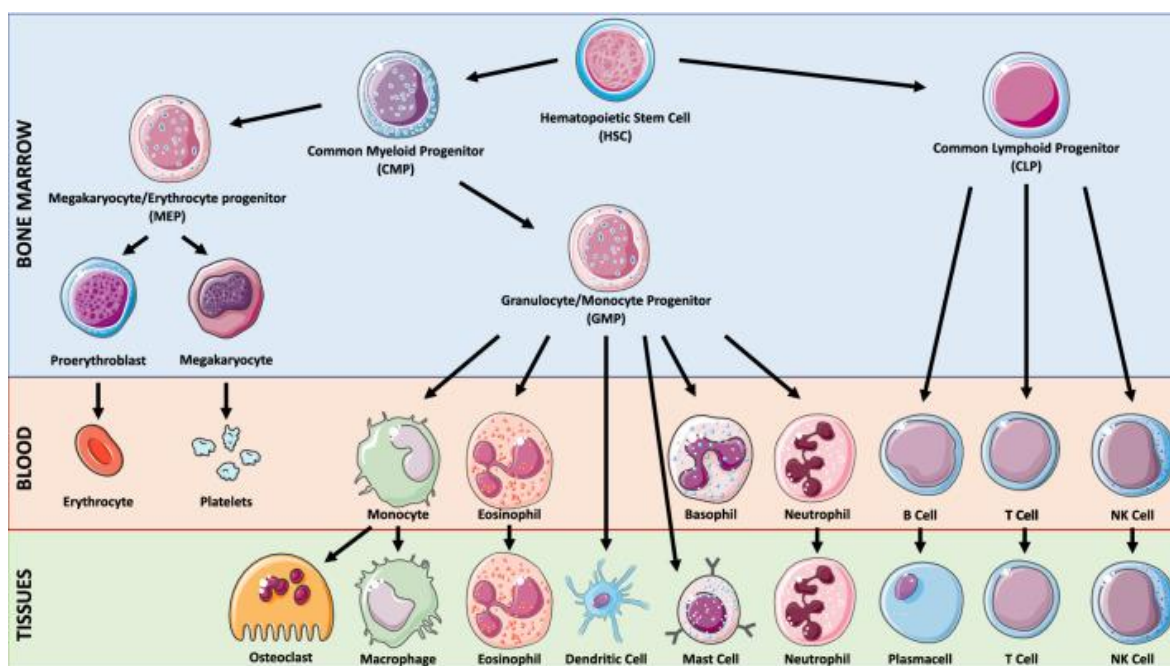
Imunitní mechanismy, které má organismus k dispozici, se tradičně dělí na specifické a nespecifické podle selektivity imunitní odpovědi. Mechanismy nespecifické imunity slouží k obraně organismu proti potenciálně škodlivým agens bez ohledu na jejich přesnější identifikaci; kromě toho se tyto mechanismy podílejí na čištění a hojení ran poškozených tkání. Mechanismy specifické imunity představují vysoce selektivní reakci zaměřenou na konkrétní agens po jeho přesné antigenní identifikaci; jejich specifickou vlastností je posilování a urychlování odpovědi při opakovaném setkání s určitým antigenem (2).

Nespecifická imunita zahrnuje velkou řadu mechanismů; kožní a slizniční bariéru na styku mezi vnitřním a zevním prostředím organismu, sekrety produkované epitelovými buňkami slizničních bariér a kožní bariéry, zánětlivou reakci, interferony, zabijácké lymfocyty a systém komplementu (2).

Prostředky nespecifické imunitní odpovědi jsou sice velmi účinné, nemusí však vždy zcela eliminovat cizorodý materiál. Proto má organismus k dispozici také mechanismy specifické imunitní odpovědi, které sice nastupují pomaleji, ale mají vysokou účinnost. Na specifické imunitní odpovědi se podílejí jak B-, tak T-lymfocyty, které ale hrají odlišné role v této odpovědi. Kromě jiných funkcí se B-lymfocyty transformují na plazmatické buňky, které secernují specifické protilátky, jež pak kolují v krvi a v lymfě. Jedná se o složku specifické imunitní odpovědi, zvanou humorální imunita. T-lymfocyty se transformují na cytotoxické T-buňky, které se přímo vážou na abnormální buňky v těle a následně je likvidují. Této složce specifické imunitní odpovědi se říká buněčná imunita (2).

## 1.2 Leukocyty

Leukocyty představují buněčný pilíř imunitního systému. Jejich hlavní úlohou je likvidovat veškerý materiál, který se vyskytuje v organismu a není mu vlastní. Na základě morfologických odlišností se leukocyty dělí na dvě velké skupiny buněk granulocyty a agranulocyty (viz obrázek 1) (2).



Obrázek 1: Morfologie krevních elementů (převzato z [40])

### 1.2.1 Granulocyty

Granulocyty obsahují specifická i nespecifická granula a členěné jádro. Jedná se o terminálně diferenciované buňky bez schopnosti dělení. Jádro granulocytů je členěné na několik segmentů (laloků) spojených chromatinovými můstky. Granula granulocytů se rozlišují na azurofilní (nespecifická) a specifická. Azurofilní granula jsou lyzozomy, které se v krevním nátěru barví stejně purpurově u všech granulocytů. Specifická granula rozhodují o typu daného granulocytu podle své barvitelnosti. Existují tři typy granulocytů: neutrofilní, bazofilní a eozinofilní (1).

Neutrofilní granulocyty představují přibližně 50-70 % všech leukocytů, jsou nadány schopností fagocytózy. Vylučují také celou řadu cytokinů, které jsou zapojeny do zánětlivého procesu (2). Jejich tvar je kulovitý, velké jsou 10-12  $\mu\text{m}$ . Obsahují centrálně umístěné jádro, které je laločnaté, tvořené 2-5 segmenty. Počet segmentů je závislý na věku buňky. Jejich specifická granula jsou v krevním nátěru neviditelná pro jejich lososovou barvu (1).

Bazofilní granulocyty představují přibližně 1 % leukocytů, mají schopnost uvolnit histamin a podílejí se tak na zánětlivé odpovědi organismu. V zásadě hrají v krvi stejnou úlohu jako mastocyty v tkáních (2). Mají kulovitý tvar, velké jsou 10  $\mu\text{m}$ . Jádro je laločnaté, tvořené 2 segmenty nebo esovitě. Oproti jiným granulocytům, jádro bazofilu obsahuje méně chromatinu (je světlejší) a často bývá špatně viditelné, protože ho překrývají specifická bazofilní granula, která se v krevním nátěru barví výrazně bazofilně (1).

Eozinofilní granulocyty představují přibližně 5 % leukocytů a jejich hlavní úlohou je obrana proti parazitům, také mají schopnost fagocytózy (2). Jejich tvar je kulovitý, velké jsou 12-14  $\mu\text{m}$  (jedná se o největší granulocyty). Jádro je laločnaté, tvořené 2 segmenty a centrálně uložené. Díky tvaru jádra eozinofilu, se mu přezdívá "brýlovité jádro". Specifická granula eozinofilních granulocytů se v krevním nátěru barví výrazně eozinofilně a jsou dobře patrná (1).

### 1.2.2 Agranulocyty

Agranulocyty neobsahují specifická granula a jejich jádro není členěné. Nejedná se o terminálně diferenciované buňky. Na rozdíl od granulocytů mají zachovanou schopnost buněčného dělení a po vstupu do tkání se mohou dále diferencovat. Obsahují azurofilní granula a jejich cytoplazma se vždy barví bazofilně. Určujeme dva typy agranulocytů: lymfocyty a monocyty (1).

Monocyty představují přibližně 1-10 % všech leukocytů. Jsou nadány schopností opustit krevní řečiště a transformovat se na makrofágy mající schopnost fagocytózy ve tkáních. Makrofágy také hrají významnou roli při prezentaci antigenu ostatním složkám imunitního systému (především lymfocytům B) (2). Monocyty jsou největší leukocyty (velikost 20  $\mu\text{m}$ ), obsahují jedno ledvinovité jádro umístěné excentricky. Četné zastoupení azurofilních granul způsobuje našedlý nádech cytoplazmy (1).

Lymfocyty jsou druhé nejpočetnější leukocyty v krvi po neutrofilních granulocytech. Tvoří 15-50 % obíhajících leukocytů. Jejich jádro je kulové až lehce vpáčené umístěné centrálně, cytoplazma tvoří pouze úzký lem kolem jádra. Jsou aktivované zejména při chronickém zánětu a při zánětlivých reakcích virového a autoimunitního systému. Podle povrchových markerů rozlišujeme různé typy lymfocytů (1).

Lymfocyty B (název B pochází z pojmenování *bursa Fabricii*, nacházející se u ptáků, kde byly poprvé B-lymfocyty identifikovány) jsou schopné syntetizovat protilátky a jsou klasickým příkladem propojení buněčné a humorální části imunitní odpovědi organismu. Protilátky jsou schopné aglutinovat, opsonizovat cizorodý materiál a aktivovat komplement (2). Na svém povrchu mají specifický BCR (B-cell receptor) a charakterizují je molekuly CD-20, 23 a 19 (1).

Lymfocyty T (název odvozený od latinského názvu brzlíku – *thymus*) vznikají v kostní dřeni a následně migrují do thymu, kde podstupují další část svého vyžívání. Neprodukují protilátky, ale jsou schopné přímo napadat buňky infikované virem, případně odstraňovat nádorové buňky (2). Jsou charakterizované společnou molekulou CD-3 a na povrchu nesou specifický TCR (T-cell receptor). Odlišujeme různé typy T-lymfocytů: cytotoxické (Tc), pomocné (Th) a regulační (Treg) (1).

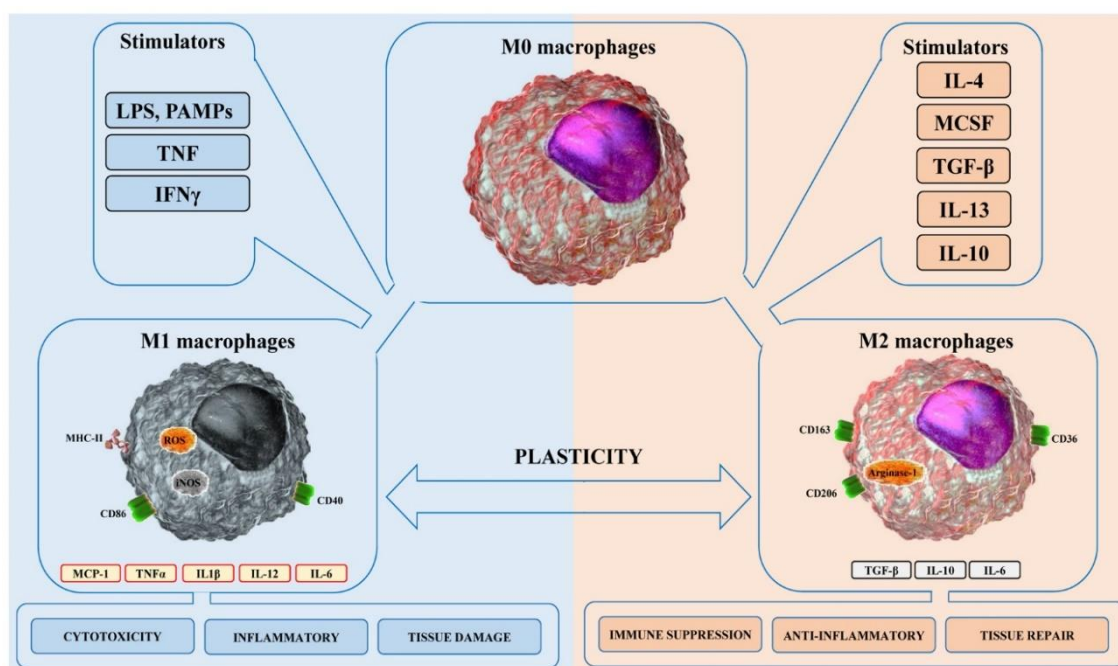
NK-buňky („přirození zabíječi“) jsou součástí protinádorové a protivirové imunity, mají schopnost likvidovat virem infikované buňky a nádorově přeměněné buňky. Ke své funkci nepotřebují být aktivovány vazbou na protilátkou označené cíle (1).

### 1.3 Makrofágy

Makrofágy původně identifikoval Ilja Iljič Mečnikov před více než 100 lety a za popis fagocytózy získal Nobelovu cenu za medicínu v roce 1908 (29). Monocyty a makrofágy jsou heterogenní populací myeloidních buněk, které hrají důležitou roli v imunitním systému rozličnými mechanismy, které zahrnují odstraňování a likvidaci

buněčných zbytků, poškozených buněk a cizorodých látek (30, 31). Jsou schopné měnit své fenotypové a funkční vlastnosti v odpovědi na signály z mikroprostředí (30). Makrofágy jsou odvozené z monocytů, pocházejících z prekursorové hematopoetické kmenové buňky. Jejich vyzrání probíhá v kostní dřeni až 24 hodin. Poté jsou vyplavovány do krve, kde cirkulují. Monocyty v krevním řečišti mají různé diferenační osudy, včetně maturace na makrofágy v reakci na poranění nebo zánět, nebo migrace do tkání a přeměna v rezidentní makrofágy (31). Diferenciace monocytů v makrofágy je závislá na lokalizaci tkáně, buněk a na molekulách v lokálním mikroprostředí, zahrnující specifické cytokiny a chemokiny, u kterých bylo prokázáno, že vyvolávají diferenciaci monocytů (30, 31).

Polarizace makrofágů označuje stav aktivace makrofágů obecně kategorizovaných na M1 (prozánětlivé, klasicky aktivované makrofágy), nebo M2 (protizánětlivé, alternativně aktivované makrofágy) (viz obrázek 2). Polarizace klasicky aktivovaných makrofágů nastává, když jsou vystaveny zánětlivým molekulám, jako jsou LPS (lipopolysacharidy), nebo cytokiny Th1 (pomocných buněk typu 1), jako je  $\text{INF-}\gamma$  (interferon gama), GM-CSF (faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů) a  $\text{TNF}\alpha$  (faktory nekrotizující nádory). Alternativně aktivované makrofágy polarizují v reakci na M-CSF (faktor stimulující kolonie makrofágů) a Th2 (pomocné buňky typu 2) cytokiny v mikroprostředí, jako je IL-4 a IL-13. Monocyty, které jsou stimulované M-CSF a GM-CSF vedou ke vzniku fenotypicky odlišných podskupin makrofágů. M-CSF stimuluje diferenciaci monocytů na M2 a GM-CSF stimuluje M1 (31).



Obrázek 2: Polarizace makrofágů M1 a M2 (převzato z [34])

M1 makrofágy rekrutují krátce po vzniku poranění a podílejí se na počáteční reakci na zánět jako součást imunitní reakce. Mají schopnost zesílit lokální zánět produkcí velkého množství prozánětlivých cytokinů a ROS (reaktivní formy kyslíku) ve snaze odstranit patogeny nebo cizorodé látky z poraněného místa (31, 32). M1 makrofágy jsou charakterizovány povrchovými markery CD-80 a CCR7 (C-C chemokinový receptor typu 7) (36), a mají schopnost produkovat vysoké hladiny IL-12, IL-23, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého) a IL-1 $\beta$ . V případě prodloužené aktivity M1 makrofágů může docházet k poškození tkání a chronickým zánětům (31, 33).

Makrofágy M2 omezují zánět a podporují reparaci tkáně, vaskularizaci a přispívají k opravám tkáně, remodelaci a udržení hemostázy (31, 33). Hlavními povrchovými markery makrofágů s fenotypem M2 jsou CD-163 a CD-206 (36). Existuje několik podtypů M2 makrofágů od M2a až po M2d (viz tabulka 1). Všechny se účastní zánětlivé odpovědi a jsou charakterizovány na základě aktivačních stimulů a cytokinů (31). M2 makrofágy produkují protizánětlivé cytokiny, jako jsou IL-10 a TGF- $\beta$  (transformující růstový faktor) (31, 33).

Klasifikace makrofágů na M1 a M2 byla navržena při pozorování diferenciálního metabolismu argininu makrofágů v různých kmenech myši pomocí Th1 a Th2. Myši Th1 s T buňkami, které produkují převážně INF- $\gamma$  prokázaly aktivaci makrofágů, při které byl z argininu generován oxid dusnatý (NO), který inhibuje patogeny nebo blízké hostitelské buňky. Zatímco myši Th2 s T buňkami, které produkují IL-4 a TGF- $\beta$ 1 prokázaly aktivaci makrofágů, při které dochází k přeměně argininu primárně na ornitin, který naopak stimuluje patogeny nebo blízké hostitelské buňky (41).

Tabulka 1: Shrnutí fenotypových znaků M1, M2 makrofágů a jejich subpopulací (vytvořeno dle [31, 34])

Fenotyp	Podněty	Cytokiny	Funkce
M1	INF- $\gamma$	INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , 6, 8	Prozánětlivá
	LPS	IL-10, 12, 18, 23, TNF $\alpha$	Stimulace imunitní odpovědi Th1
	GM-CSF	Interferony	Fagocytóza
M2a	IL-4, IL-13	TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 6, 12	Protizánětlivá, hojení ran
M2b	IL-1 $\beta$ , TLR ligandy	IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, 10	Imunoregulace
M2c	Glukokortikoidy, IL-10, TGF- $\beta$	IL-10, TGF- $\beta$	Fagocytóza apoptických buněk
M2d	TLR (toll-like receptor) antagonisté	IL-10	Angiogeneze

Hlavní úkol makrofágů je chránit tělo před patogeny a plnit hlavní roli v homeostáze prostřednictvím likvidace odpadních produktů a opravy tkání. Jejich klíčovou funkcí je fagocytóza, aneb požití velkých částic (>0,5  $\mu\text{m}$ ), což zahrnuje mikroby i umírající buňky (35). Během fagocytózy makrofágy migrují chemotaktickým způsobem směrem k částicím, které mají být pohlceny. Následuje adheze (přilnutí) na základě interakcí mezi receptory a specifickými molekulárními strukturami na povrchu částic nebo infikovaných buněk. Následuje ingesce (pohlcení) a degradace mechanismem závislým nebo nezávislým na kyslíku (29).

Makrofágy odvozené od monocytů se diferencují především jako ochranný mechanismus namířený proti zánětu nebo poranění. Existují však také tkáňové rezidentní makrofágy, které částečně vznikly již před narozením během embryogeneze. Vyznačují se vysokou sebeobnovovací schopností, což jim umožňuje udržet svou populaci ve specifických orgánech po celou dobu života bez přispění monocytů z kostní dřeně (31). Jsou přítomné v různých částech těla a liší se svými názvy, např. makrofágy/histiocyty ve vazivu,

Kupfferovy buňky v játrech, mikroglie v CNS (centrální nervový systém), alveolární makrofágy v plicích nebo chondroklasty v chrupavkách (1) (viz tabulka 2).

*Tabulka 2: Nomenklatura makrofágů (vytvořeno dle [31, 34])*

<b>Tkáň</b>	<b>Nomenklatura</b>
<b>Tuková tkáň</b>	Makrofágy tukové tkáně
<b>Krev</b>	Monocyty
<b>Lymfatické uzliny</b>	Sinusové histiocyty
<b>Kosti</b>	Osteoklasty, osteální makrofágy
<b>CNS</b>	Mikroglie, perivaskulární a meningeální makrofágy
<b>GIT</b> (gastrointestinální trakt)	Intestinální makrofágy
<b>Ledviny</b>	Renální makrofágy (glomerulární)
<b>Plíce</b>	Alveolární a intersticiální makrofágy
<b>Kůže</b>	Dermální makrofágy, Langerhansovy buňky
<b>Placenta</b>	Hofbauerovy buňky
<b>Slezina</b>	Makrofágy marginální zóny, červené a bílé dřene
<b>Játra</b>	Kupfferovy buňky
<b>Klouby, chrupavka</b>	Synoviální buňky typu A, chondroklasty
<b>Pojivová tkáň</b>	Tkáňové makrofágy (histiocyty)
<b>Serózní tkáň</b>	Peritoneální a pleurální makrofágy

#### **1.4 Makrofágy v kostní reparaci**

Hojení kosti je komplexní a dynamický proces samoobnovy, kterého se účastní imunitní buňky, osteoblasty, osteoklasty a endoteliální buňky (36). Kostní reparace má

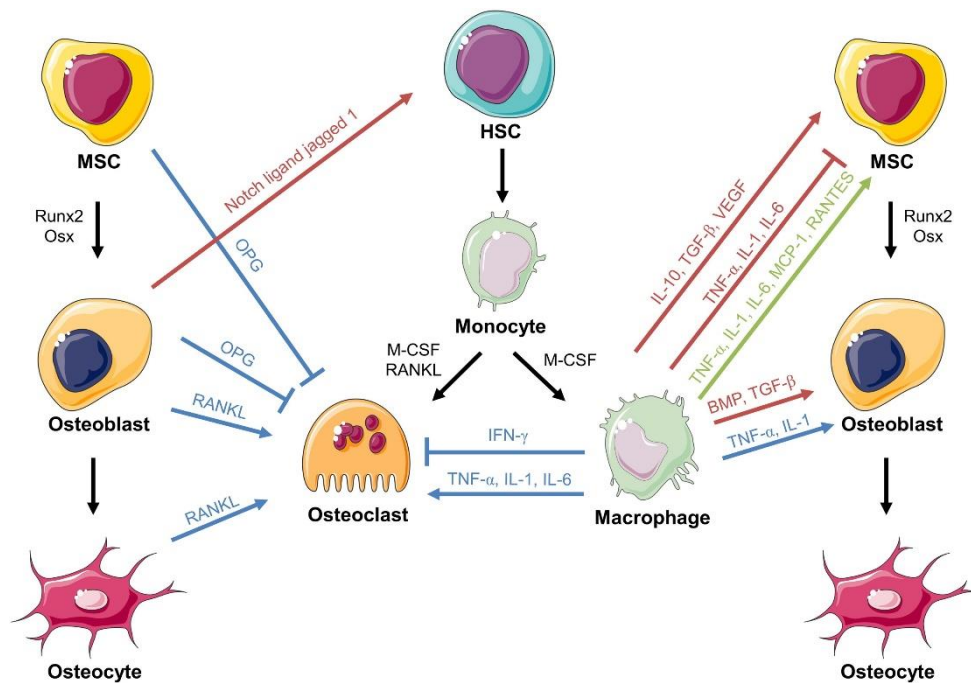


několik společných rysů s obecnými procesy hojení ran včetně zánětu, angiogeneze a náhrady poškozené mezenchymální tkáně (36, 37). Oprava kosti se však liší od opravy jiných tkání tím, že výsledkem není zjizvená tkáň. Proces opravy regeneruje složité 3D struktury, které musejí splňovat nároky na mechanické zatížení (37).

Primární fází hojení zlomeniny kosti je tvorba hematomu, následovaná akutní zánětlivou reakcí. První zánětlivé buňky, které migrují do místa zlomeniny, jsou neutrofilny. Sekrecí zánětlivých a chemotaktických mediátorů rekrutují sekundární vlnu zánětlivých buněk, což zahrnuje monocyty a makrofágy (38). Makrofágy fagocytují buněčné zbytky a po diferenciaci na osteoklasty resorbují nekrotické kostní fragmenty a nekrotické konce zlomené kosti. Část makrofágů se vlivem prozánětlivého prostředí přemění na fenotyp M1 a začne produkovat IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  a faktory, které stimulují kolonie k regulaci zánětlivých reakcí (36, 38). Aktivované M1 makrofágy také usnadňují expanzi mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně, osteoprogenitorových buněk a vaskulárních progenitorových buněk do místa zlomeniny za účelem zahájení osteogeneze. Mezenchymální kmenové buňky se diferencují na kostní buňky za účelem regenerace kostní tkáně (viz obrázek 3) (36).

Během anabolické fáze opravy kosti se makrofágy diferencují na fenotyp M2 a uvolňují cytokiny, jako je BMP-2 (kostní morfogenetický protein) nebo TGF- $\beta$ , které slouží k podpoře expanze a osteogenní diferenciaci kmenových buněk kostní dřeně. Také zvyšují expresi protizánětlivých faktorů IL-4 a IL-10, čímž omezují zánět a podporují rekonstrukci tkáně (36).

Makrofágy se podílejí i na angiogenezi během opravy kosti. Fenotyp makrofágů M1 produkuje prozánětlivé cytokiny, které stimulují angiogenezi, zatímco protizánětlivé cytokiny produkované fenotypem makrofágů M2 angiogenezi stabilizují a koordinují sestavování extracelulární matrix (ECM) (36, 39).



Obrázek 3: Komunikace mezi zánětlivými buňkami a kostními progenitorovými buňkami (převzato z [38])

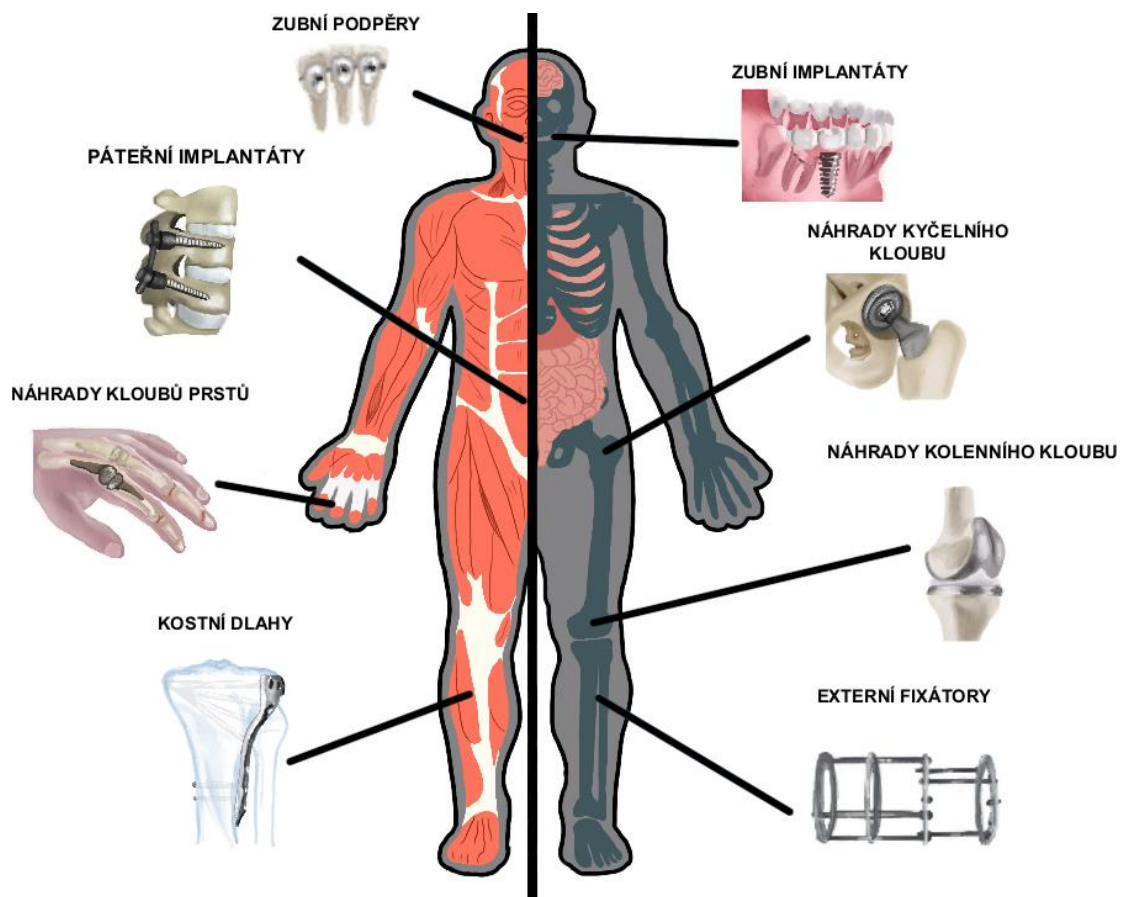
Zánět je klíčovým biologickým procesem, který slouží k likvidaci patogenů a udržení tkáňové homeostázy. Úspěšné odstranění zánětlivých podnětů je doprovázeno protizánětlivými a reparačními cytokiny, které odstraňují zánětlivé prostředí a obnovují homeostázu tkání. Pokud dojde k narušení sledu takových událostí v důsledku přetrvávání prozánětlivých podnětů, může proces přejít do stavu chronického zánětu. Přetrvávající zánětlivá reakce se projevuje pokračující sekrecí cytokinů a dalších faktorů, což vede k destrukci tkáně a poruše homeostázy. Zánětlivá reakce, vyvolaná poraněním kosti, je pro hojení prospěšná, pokud se jedná o akutní stav, který je vysoce regulovaný. Pokud dojde k potlačení této reakce, dysregulaci nebo k přeměně v chronickou reakci, stane se zánět škodlivým pro hojení kosti (38). Při chronickém zánětu kostí dochází k produkci TNF $\alpha$ , který stimuluje tvorbu osteoklastů a inhibuje funkci osteoblastů, což vede ke snížení objemu kostí (42).

Ačkoliv je zánět prvním klíčovým krokem ke zhojení kostí, nedostatek nebo inhibice akutního zánětu může vést k zhoršení tohoto procesu (42).

## 2 KOSTNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

### 2.1 Historie a vývoj tkáňového inženýrství

Tkáňové inženýrství (TI) je přes padesát let se vyvíjející vědeckou disciplínou, ačkoliv nahrazování měkkých či tvrdých lidských tkání není nové (viz obrázek 4). Indové a Číňané ve starověku používali různá lepidla a tmely k odstranění tělních defektů a na egyptských mumiiích byly nalezeny umělé oči, uši, nosy i zuby (8).



Obrázek 4: Příklad míst v lidském těle, které je možné uměle nahradit (zdroj vlastní)

V 16. století italský profesor chirurgie a anatomie Gaspare Tagliacozzi popsal ve své práci „De Curtorum Chirurgia per Insitionem“ (Chirurgie defektů implantací), která byla publikována roku 1597, náhradu nosu vytvořenou z chlopně předloktí (6, 9). V 70. letech 19. století probíhaly různé experimenty, například tvorba nové chrupavky za použití chondrocytů, které byly naočkovány do kostních fragmentů a implantované myším. Ačkoliv experiment samotný nebyl úspěšný, vedl k závěru, že s příchodem inovativních biomateriálů by bylo možné vytvořit novou tkáň naočkováním životaschopných buněk na vhodně uspořádaný tkáňový materiál (10).

Pravděpodobným klíčovým bodem ve zrodu TI byla polovina 80. let 20. století, kdy Dr. Joseph Vacanti a Dr. Robert Langer pracovali s myšlenkou navrhnout vhodný skafold pro růst buněk namísto očkování na dostupné přirozeně se vyskytující materiály s fyzikálními a chemickými vlastnostmi, se kterými nebylo možné manipulovat, což mělo za následek nepředvídatelné výsledky (10).

Roku 1988 byl prezentován článek, popisující novou technologii, na semináři Národní vědecké nadace a zároveň oficiálně vznikl termín „tkáňové inženýrství“ s cílem uplatnit principy a metody inženýrství a biologických věd k pochopení vztahů mezi stavbou a funkcí v tkáních savců a k rozvoji biologických náhrad pro obnovu, udržení nebo zlepšení funkce tkání (10, 11). První použití termínu „tkáňové inženýrství“ tak, jak ho známe dnes, je zakořeněno v článku „Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering“ v „Surgical Technology International“, který byl publikován roku 1991 (10).

V roce 1997 byla publikována studie v plastické a rekonstrukční chirurgii od Cao et al., která vzbudila velký zájem veřejnosti. Popisuje, jak zregenerovat chrupavkou část ucha tříletého dítěte na zádech laboratorní myši (viz obrázek 5) (12).



*Obrázek 5: Snímek myši s lidským uchem (převzato z [10])*

Ve snaze o zjištění potenciálu TI došlo ve Spojených státech a v Evropě ke vzniku řady laboratoří. Ačkoliv naprostá většina vznikala v okolí Bostonu, jednou z prvních významných laboratoří mimo Boston patří rozvoj PTEI (Pittsburgh Tissue Engineering Initiative) v 90. letech 20. století. V Londýně roku 1994 došlo ke vzniku volné asociace TES (Tissue Engineering Society), kterou založila Imperial College organizovaná britskou společností. TES nakonec vzniklo i v Německu a západní Evropě. V polovině a na konci 90. let 20. století se začaly objevovat prakticky ve všech vyspělých zemích světa pokusy o TI (10).

TES byla mezinárodní společností a během následujícího desetiletí se ve spolupráci s asijskými a evropskými společnostmi vyvíjela a reorganizovala, až roku 2005 změnila název na TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) (10).

Zakladatelé TES se domnívali, že je důležité mít účinný prostředek k šíření vědeckých informací a k svobodnému vyjadřování nových myšlenek, proto ve stejném roce (1994) založili časopis „Tissue Engineering“, jehož redakční rada byla složena z mezinárodních lékařů a vědců (10).

## **2.2 Tkáňové inženýrství**

Tkáňové inženýrství zahrnuje přípravu, návrh a výrobu náhrad lidských tkání, které je možné implantovat nebo transplantovat do lidského těla za účelem náhrady nebo rekonstrukce vlastních poškozených tkání (13).

Kosti hrají důležitou roli v homeostáze minerálů. Ty nejdůležitější, fosfátové a kalciové ionty, jsou v kostech uloženy a v případě potřeby se uvolňují do krve. Mezi další důležité funkce kostí patří zajištění opory a pohybu těla a ochrany vnitřních orgánů. Kostní tkáň je proměnlivé prostředí s vysokým krevním zásobováním. Při porušení integrity kostní tkáně většina zlomenin nevyžaduje chirurgický zákrok, kvůli vysoké regenerační schopnosti kostí, naopak velké kostní defekty a nesouvislé zlomeniny zákrok vyžadují (4).

Kostní defekty nadkritické velikosti postrádají schopnost regenerace. Definuje je charakteristický rozměr, který je 2,5krát větší než poloměr poraněné kosti. Defekty nadkritické velikosti mohou vzniknout úrazem, chronickou infekcí, odstraněním nádoru či nezdařenou rekonstrukční operací kloubu (artroplastiky) (5).

Při pouhé fixaci defektu nadkritické velikosti nedochází k jeho přemostění a vzniku plnohodnotné kosti, ale vzniká tzv. pakloub (tj. chybějící kostěný srůst fragmentů kosti). Proto je třeba vyvinout výplňový materiál, který by sloužil jako dočasná náhrada kostní tkáně. Jejím účelem je zajistit fyzickou podporu buňkám migrujícím do místa defektu a stimulovat regeneraci poškozené kosti. Standardem pro léčbu kostních defektů je transplantace za použití autologních kostních štěpů. Jde o část pacientovy kosti odebranou např. z kosti kyčelní, ze žeber nebo z kosti lýtkové. Dále je možné použít alogenní kostní štěp, tedy část kosti odebranou od jiného člověka (5) nebo xenogenní kostní štěp (kost jiného druhu: prasečí, telecí). Alogenní a xenogenní kostní štěpy jsou obecně nevhodné k použití vzhledem k možnosti vzniku imunitních reakcí a následné nepřijetí organismem pacienta, ale i vzhledem k možným přenosům infekcí. To jsou hlavní důvody, proč je kladen důraz na vývoj umělých materiálů pro náhrady kostní tkáně (8).

Cílem kostního tkáňového inženýrství je hledání jiných možností, které by nahradily užití kostních štěpů, jejichž použití je spojeno s mnoha nedostatky. U autologních štěpů jde zejména o vznik krevního výronu, odumření okolní tkáně, o infekci či bolestivost v místě, kde došlo k odebrání kosti. Odběr autologního štěpu je možný pouze z některých kostí a limitující je i velikost. Alogenní štěpy představují riziko přenosu nemoci či vzniku infekce. Navíc musejí být z důvodu imunitní reakce pacienta zbaveny alogenní (cizorodé) buněčné složky, což vede ke ztrátě osteogenní vlastnosti. To znamená, že v alogenním štěpu nejsou obsaženy buňky umožňující přímé formování kosti (5).

Při hledání náhradního řešení k použití kostních štěpů je třeba uvědomit si specifické požadavky kladené na ideální dočasné náhrady kostní tkáně (bone scaffold neboli „kostní nosiče“) (5).

### 2.2.1 Skafoldy

Termín „skafold“ se používá pro trojrozměrný (3D) biomateriál, který poskytuje vhodné prostředí pro buňky k regeneraci tkání a orgánů. Cílem TI je produkce skafoldů, které jsou schopné poskytovat regenerační signály buňkám, a tak stimulovat jejich přirozené chování. Vědci se snaží vyvinout způsoby, jak vyrábět skafoldy z biomateriálů, které jsou velmi podobné přirozenému prostředí těla, mají multifunkční vlastnosti a jsou efektivní z hlediska nákladů a klinického použití (4).

Nejdůležitější je struktura skafoldů (4). Pro kostní TI je nezbytné, aby byl nosič dostatečně porézní s propojenými póry, které umožňují buněčnou migraci, novotvorbu cév, difúzi plynů, živin a odpadních látek (5). Velikost pórů musí být dostatečně velká, aby umožnila migraci buněk, ale také dostatečně malá, aby umožnila vazbu buněk na skafold (4).

Ideální skafold pro kostní tkáň by měl mít vhodné osteobiologické vlastnosti. Měl by být biokompatibilní, osteokonduktivní, osteoinduktivní, osteointegrační, v některých případech biodegradabilní, a měl by mít vhodné mechanické vlastnosti (4).

Jedním z hlavních kritérií každého skafoldu pro TI je jeho biokompatibilita. Biokompatibilní materiál nesmí být toxický a karcinogenní. Buňky musejí přilnout, zachovat si funkčnost a postupně migrovat na povrch skrz skafold a začít proliferovat dřív, než začnou tvořit novou matrix. Po implantaci musí skafold vyvolat zanedbatelnou imunitní reakci, aby později nedošlo k silné zánětlivé reakci, která by mohla zpomalit hojení nebo způsobit rejekci materiálu (6).

Kostní tkáňový nosič by měl mít vhodné osteokonduktivní vlastnosti (schopnost komunikace napříč substrátem), jichž lze dosáhnout např. použitím mineralizovaného tkáňového nosiče, poskytujícího podporu v růstu nové kosti. Osteoinduktivní vlastnosti má funkcionalizovaný nosič, obsahující proteiny a růstové faktory, které stimulují diferenciaci buněk směrem k osteogenní linii, a tak zlepšují regeneraci kosti (4, 5). Další důležitou vlastností je oseointegrace, což znamená, že materiál je schopný fyzicky a funkčně integrovat s živou tkání. Vhodných vlastností lze dosáhnout pomocí nosiče obsahujícího

vlastní buňky pacienta umožňující přímou formaci (tvorbu) kosti (5). Příznivé přijetí tkáňového nosiče je ovlivněno mnoha faktory, např. typem nosiče nebo místem implantace (4).

U některých těchto materiálů je také vyžadována biologická odbouratelnost (biodegradabilita). Je vhodná pro materiály používané k dočasné tkáňové náhradě sloužící zároveň jako lešení podporující regeneraci tkání. Skafoldy, poskytující buňkám potřebnou podporu během procesu hojení, by měly postupně degradovat z důvodu pozvolného nahrazování novou kostní tkání (3). Degradace skafoldu musí trvat stejně dlouho, jako regenerace tkáně (4). Vedlejší produkty této degradace by neměly být toxické a měly by volně odcházet z těla. K tomu, aby rozklad materiálu probíhal současně s tvorbou tkáně, slouží zánětlivá reakce spojená s řízenou infuzí buněk, jako jsou makrofágy (6).

Na druhou stranu je biodegradabilita nežádoucí u materiálů sloužících jako trvalá náhrada tkáně, jako jsou např. titanové zubní implantáty (43).

V ideálním případě by skafold měl mít mechanické vlastnosti odpovídající anatomickému místu, do kterého má být implantován. Z praktického hlediska však musí být dostatečně pevný, aby umožnil chirurgickou manipulaci během implantace. V kostním TI je výroba skafoldů s odpovídajícími mechanickými vlastnostmi jednou z velkých výzev. Materiál musí mít dostatečnou mechanickou integritu, aby fungoval od okamžiku implantace až do dokončení procesu remodelace. Důležitou roli hraje i věk pacienta vzhledem k tomu, že rychlost hojení se liší podle věku. Klíčová je tedy rovnováha mezi mechanickými vlastnostmi a porézní strukturou skafoldu (6).

TI se snaží o výrobu “bioaktivních” materiálů, které mohou integrovat s biologickými molekulami, na rozdíl od minulosti, kdy byly navrhovány “bioinertní” materiály. Materiály, které mohou nahradit autologní nebo alogenní štěpy, se skládají např. z bioaktivní keramiky, bioaktivního skla, biologických nebo syntetických polymerů a kompozit. S takovými materiály je snazší vyhnout se problémům, které se pojí s transplantací a implantací, jako je infekce nebo nedostatečná adaptace na environmentální stres (4).

### **2.3 Druhy materiálů pro kostní tkáňové inženýrství**

Biomateriál je definovaný jako jakýkoliv materiál, konstrukce nebo povrch, který je schopný interagovat s biologickým systémem. Mohou pocházet z přírodních zdrojů nebo



jsou vyrobeny synteticky a jsou použity k částečné nebo úplné náhradě tkání (14). Přírodní polymery (chitosan, želatina, kolagen, celulóza atd.) jsou více preferované, než syntetické polymery jako jsou např. PCL (poly(kaprolakton)), PLA (kyselina polyléčná) nebo polyuretan, protože mají vyšší biokompatibilitu, vynikající biologickou rozložitelnost a vykazují minimální toxicitu (15). V TI jsou používány i kovy, bioaktivní sklo, fosforečnan vápenatý, HAp (hydroxyapatit) a jejich vzájemné kombinace, které řadíme do anorganických materiálů a jsou používány díky podobnosti s minerální fází kosti (16, 4).

Tabulka 3: Druhy materiálů používaných v tkáňovém inženýrství, jejich výhody a nevýhody  
(vytvořeno dle [4, 18, 27, 28])

Typ materiálu		Výhody	Nevýhody
Kovy		Biokompatibilní, netoxické, rezistence vůči korozi, pevné	Nejsou biodegradabilní (může být i výhodou)
Biokeramika		Biokompatibilní, osteokonduktivní, podobné kosti	Tvrdost, křehkost, pomalá degradace a resorpce, horší mechanické vlastnosti
Přírodní polymery	Kyselina hyaluronová	Biokompatibilní, biologická odbouratelnost, viskoelasticita	Velmi rychlá degradace, rozpustnost ve vodě
	Kolagen	Biokompatibilní, biologická odbouratelnost	Složité struktura
	Chitin	Biokompatibilní, netoxický, biologicky odbouratelný	Špatná mechanická pevnost
Syntetické polymery	Biologicky odbouratelné	Biokompatibilní, biodegradabilní	Riziko zánětu, špatná adheze buněk a pevnost v tlaku
	Biologicky neodbouratelné	Biokompatibilní, zachování mechanické integrity	Nemožnost úplné náhrady novou kostní tkání
Kompozity		Vynikající mechanické vlastnosti	Vysoká cena

### 2.3.1 Kovové

Kovy jsou považovány za jedny z nejstarších materiálů používaných jako implantáty. Prvními používanými kovy byly hliník, olovo, zlato a stříbro. Dnes jsou nejčastěji používanými kovovými biomateriály titan a jeho slitiny, a to z důvodu jejich biokompatibility, netoxičnosti a korozní odolnosti (4, 17). Nejčastěji jsou používány jako implantáty pro náhradu kostních kloubů, fixaci zlomenin a k podpoře hojení kosti (18).

### 2.3.2 Keramické

Biokeramika, zahrnující např. keramické kompozity nebo amorfní skla, je velmi slibným mechanicky pevným materiálem s příznivou bioaktivitou (4, 18). Obecně se jedná o velkou třídu, která slouží k opravám a rekonstrukcím poškozených či nemocných částí těla (19). Je odolná vůči korozi a tlaku. Nejčastěji používanou krystalickou biokeramikou jsou fosforečnan vápenatý, a to díky jejich převaze v kostní tkáni. Dále se používá HAp, TCP (fosforečnan vápenatý) a kombinace obou látek, známá jako BCP (dvoufázový fosforečnan vápenatý). V momentě, kdy buňka degraduje keramiku *in vivo*, dochází k produkci vápníkových a fosfátových iontů, které podporují tvorbu nové kosti osteoindukcí (4, 18).

### 2.3.3 Polymerní

Polymerní materiály tvoří jedny ze základních kamenů TI (22). Existují dva typy biodegradabilních polymerů. Jedná se o přírodní a syntetické polymery. Mezi přírodní polymery patří polysacharidy (škrob, chitin, deriváty kyseliny hyaluronové) a proteiny (kolagen, fibrinové gely). Jejich výhodou je pozoruhodné uchycení a růst buněk. Na druhou stranu mezi nevýhody můžeme zařadit problém imunologické reakce a špatné mechanické vlastnosti (4, 16).

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozený glykosaminoglykan nacházející se v ECM většiny pojivových tkání. Díky své chemické struktuře je HA řazena do hydrofilních polymerů a vyznačuje se především vysokou rychlostí regenerace. Skafoldy na bázi HA mají vysokou biokompatibilitu, biodegradaci a chemickou modifikaci. Podle způsobu zpracování mohou mít skafoldy podobu hydrogelů, kryogelů nebo injektovatelných hydrogelů (23).

Hydrogely jsou 3D flexibilní sítě z přírodního nebo syntetického polymeru, jejichž kapalnou složkou je voda. Hydrogely se skládají z dynamické síťovací struktury, která jim umožňuje udržet integritu hydrogelové sítě, a z toho důvodu se nerozpouštějí ve vysokých koncentracích vody (24), např. hydrogely na bázi polyethylenglykolu nebo alginátu (4). Díky hydrofilním skupinám jako jsou  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONH-$ , nebo  $-SO_3H$ ,

dokáže hydrogel zadržet velké množství vody nebo biologické tekutiny (4). Takzvané „chytré hydrogely“ mají schopnost napodobovat živé tkáně, protože reagují na změny podmínek ve svém vnějším prostředí. Takové polymery mohou vykazovat patrné změny ve své permeabilitě nebo mechanické pevnosti v reakci na změny pH, iontových sil nebo teploty (24). Jsou vhodné pro aplikaci převážně neinvazivním způsobem *in situ* při tělesné teplotě (4). Podstatná je jejich pružnost, elasticita a schopnost poskytovat potřebnou biochemickou a strukturální podporu okolním buňkám podobně jako ECM (7). Hydrogely mají mnoho různých funkcí v oblasti TI (25). Díky své pórovitosti se používají jako matrice. Buňky v nich rostou a prolifерují, mohou se z nich uvolňovat léky nebo přes ně mohou procházet živiny a odpadní produkty. Další výhodou je snadná modifikace pomocí adhezivních ligandů. Jako nosiče buněk se používají samosíťující hydrogely, např. ve vodě rozpustný chitosan a oxidovaná HA, protože nepotřebují žádná chemická síťovací činidla. Jejich nevýhodou je obtížná manipulace a sterilizace vzhledem k jejich slabým mechanickým vlastnostem (4).

Druhým typem polymerů jsou syntetické polymery, které jsou vzhledem ke své vyhovující mechanické pevnosti, reprodukovatelným mechanickým a chemickým vlastnostem a také kontrolovatelné rychlosti biodegradability široce používány k výrobě skafoldů. Lze je rozdělit do dvou tříd, kdy první jsou biologicky odbouratelné, do kterých patří PGA (kyselina poly(glykolová)), PLA a jejich kopolymery. Druhou třídou jsou biologicky nerozložitelné polymery, do kterých patří PVA (polyvinylalkohol), PAA (polyakrylová kyselina), PNIPA (poly(N-isopropylakrylamid)) (26).

#### **2.3.4 Kompozity**

Skafoldy a jejich úspěšnost v regeneraci tkáně jsou úzce spojeny s jejich strukturou, vlastnostmi pro danou tkáň a mechanickým zatížením, kterému bude skafold vystaven *in vivo*. Keramické materiály mají nízkou lomivou houževnatost (křehkost) a vysokou tuhost, což jsou nevýhody, které mohou vést k omezení jejich použití (19, 21). V tomto případě je nejlepším řešením zvolit kompozity skafoldu tj. kombinace biokeramiky a polymerů nebo kombinace syntetických polymerů s přírodními polymery (4, 20). Biokeramika je používána jako plnivo nebo povlak k polymerní matici, což vede ke zlepšení jejich mechanických vlastností (19, 21).

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 3 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 3.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo studovat vliv hydrogelu na polarizaci makrofágů *in vitro* a vyhodnocení imunomodulačních vlastností testovaných typů hydrogelu. Pro splnění tohoto cíle byly použity vzorky hydrogelu, připraveného z polyvinylalkoholu, hydroxyapatitu a kyseliny hyaluronové a lidské monocyty THP-1.

### 3.2 Dílčí cíle

1. Kultivace monocytů THP-1 a jejich polarizace v makrofágy
2. Testování polarizace makrofágů ovlivněných hydrogelovým skafoldem metodou ELISA
3. Sledování morfologie buněk THP-1 v průběhu polarizace
4. Testování viability buněk v průběhu pokusu

## 4 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

1. Mění se morfologie buněk THP-1 během polarizace?
2. Lze z kultivačního média testovat polarizaci makrofágů ovlivněných skafoldem?
3. Který ze skafoldů HA2 a HB2 by byl vhodnější k použití v kostním tkáňovém inženýrství z hlediska imunitní reakce?
4. Jak se lišila produkce interleukinů, typických pro podtypy makrofágů, vlivem skafoldů a vlivem diferenciacních kitů?

## **5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

Experiment byl proveden za použití zakoupené lidské buněčné linie THP-1 z American Type Culture Collection (ATCC® TIB202™) na hydrogelových skafoldech připravených Ing. Petrou Chocholatou, Ph.D. z Ústavu lékařské chemie a biochemie na LF UK v Plzni, kde byl celý experiment uskutečněn.

## 6 METODIKA PRÁCE

### 6.1 Buněčná kultura

K experimentu byla použita lidská buněčná linie THP-1 získaná z American Type Culture Collection (ATCC® TIB202™). Jedná se o buněčnou linii izolovanou z periferní krve pacienta s akutní monocytární leukémií, která se používá při výzkumu poruch imunitního systému, imunologickém a toxikologickém výzkumu. THP-1 jsou suspenzní plovoucí buňky (50).

Po rozmražení byly buňky nasazeny na kultivační lahev TPP 25 (viz obrázek 6) a v pozici svisle, jak se pro suspenzní buňky doporučuje, byly kultivovány 1 týden až po dosažení množství buněk potřebných pro pokus. Buňky byly po dobu rozpěstování udržovány v hustotě  $3-5 \times 10^5$  buněk/ml jak je doporučeno v manuálu.



Obrázek 6: Použitá kultivační lahev TPP 25  
(převzato z [44])

Jako médium bylo použito RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) obohacené o 10% hovězí fetální sérum, 1% Penicilin/Streptomycin a 2 mM stabilizovaný glutamin (Biosera Europe, Nuaille, France).

Kultivace buněk proběhla při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> ve zvlhčené atmosféře.

### 6.2 Hydrogelové skafoldy

Pro pokus byly použity hydrogelové skafoldy z polyvinylalkoholu (PVA), kyseliny hyaluronové (HA) a hydroxyapatitu (HAp), označené jako HA2 a HB2, připravené Ing. Petrou Chocholatou Ph.D. na Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UK v Plzni.



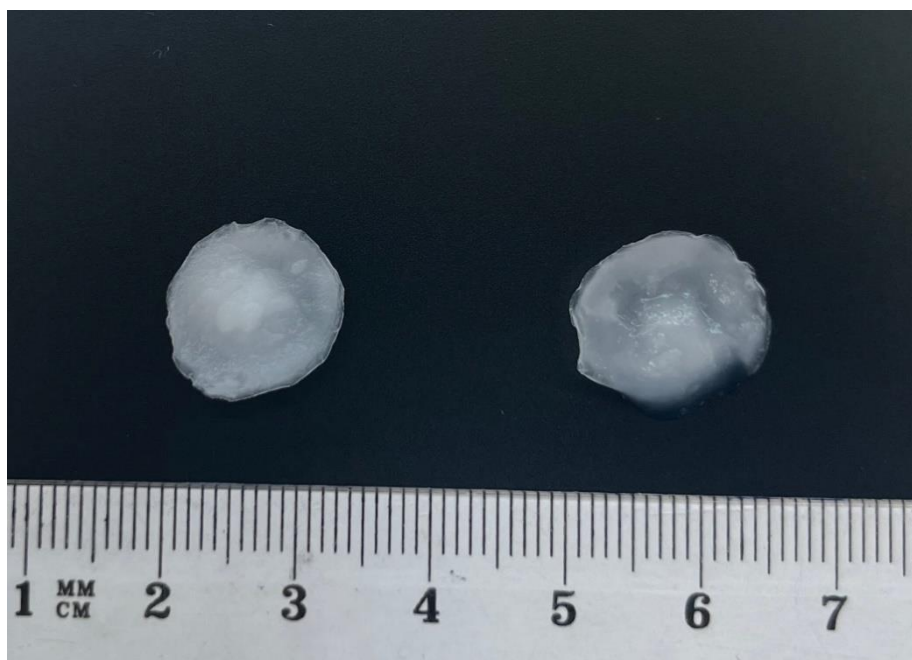
PVA je často testovaný syntetický polymer s dobrou biokompatibilitou. Lze jej snadno přeměnit na hydrogel pomocí opakovaných cyklů zmrazování a rozmrazování. Takovéto fyzikální zesíťování je velmi výhodné, protože není třeba použít chemické síťovací činidlo, které by mohlo působit toxicky. Vnitřní neadheze PVA k buňkám poskytuje špatnou podporu růstu a integraci do periferních tkání. Proto je PVA modifikován, což zlepšuje buněčnou adhezi a růst buněk (45).

HAp, jakožto hlavní přírodní anorganická složka kosti, vykazuje vynikající bioaktivitu, biokompatibilitu, osteokonduktivitu, netoxicitu a nezánetlivé vlastnosti. Mechanické vlastnosti jsou ovlivněny velikostí částic HAp, pórovitostí a hustotou. HAp je velmi tvrdý, ale křehký, s velmi pomalou rychlostí degradace *in vivo*, proto by měl být spojen s přírodními nebo syntetickými materiály při výrobě skafoldu (45).

HA je hojně zastoupena v ECM, především v pojivových tkáních. Jedná se o přírodní polysacharid, vyznačující se biokompatibilitou, biodegradabilitou a viskoelasticitou. Významnou výhodou HA je její enzymatická odbouratelnost enzymem hyaluronidázou, který je produkován savčími buňkami. Z důvodu rychlé degradace a rozpustnosti ve vodě je vhodné HA zesíťovat nebo smíchat s jiným přírodním nebo syntetickým polymerem (45).

Vzorky HA2 a HB2 použité v této práci se lišily poměrem směsi PVA a HA, a to tak, že u vzorku HA2 byl 5% roztok PVA smíchan s 1% roztokem HA v poměru 75:25 a u vzorku HB2 v poměru 50:50. Pak byl přidán 5% vodný roztok HAp. Tyto směsi byly nality do 24-jamkových destiček a sedmi cykly zamrazování a rozmrazování, sloužících k zesíťování vzorku, byl získán konečný hydrogel (viz obrázek 7). Přesný popis přípravy vzorků je popsán v publikaci (45) a samotná příprava hydrogelu nebyla předmětem této bakalářské práce.

Hydrogelové skafoldy o průměru 1 cm a tloušťce asi 5 mm byly před začátkem pokusu s makrofágy sterilizovány 70% ethanolem, promyty fosfátovým pufrům (PBS) a v kultivačním médiu dány na 24 h do inkubátoru k podpoře adsorpce proteinů, které usnadňují adhezi buněk (45).



Obrázek 7: Použitý hydrogelový skafold HA2 a HB2 (zdroj vlastní)

### 6.3 Polarizace THP-1 makrofágů

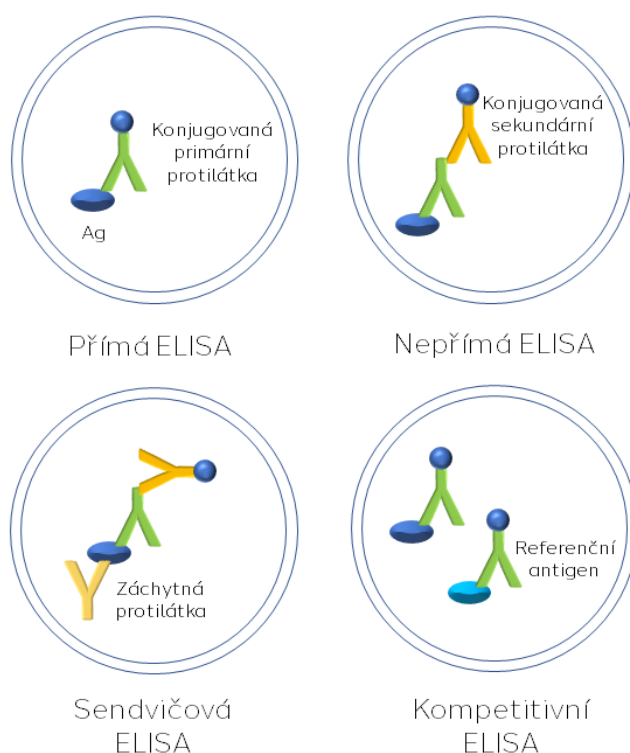
Skafoldy byly umístěny do 24-jamkových destiček a k nim byly v médiu RPMI 1640 přidány buňky THP-1 v koncentraci 300 000 buněk v 1 ml. V daných časech byly odebrány vzorky média a v něm byly stanovovány interleukiny charakteristické pro makrofágy M1 a M2, a to IL-10, IL-12 a TNF $\alpha$ . Vzorky byly odebírány v triplikátech.

Jako kontrola polarizace buněk sloužily buňky THP-1 kultivované rovněž na 24-jamkové destičce, které byly polarizovány pomocí zakoupeného kitu CellXVivo Human M1 Macrophage Differentiation Kit a CellXVivo Human M2 Macrophage Differentiation Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

Tyto diferenciační kity obsahují rekombinantní lidský GM-CSF a M-CSF, které podporují polarizaci makrofágů v prozánětlivý typ M1 a v protizánětlivý typ M2. Rozpouštějí se v pufru, který je ke kitu přiložený. Na 10 ml kultivačního média se pak přidává 20  $\mu$ l stimulačního faktoru (46, 47). Média byla měněna dvakrát týdně. K buňkám, které měly být polarizovány v makrofágy M1, byl navíc na začátku pokusu na 24 hodin přidán eBioscience™ Lipopolysaccharide (LPS) Solution (500X) (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), o objemu 2  $\mu$ l na 1 ml média tak, jak se doporučuje v manuálu kitu.

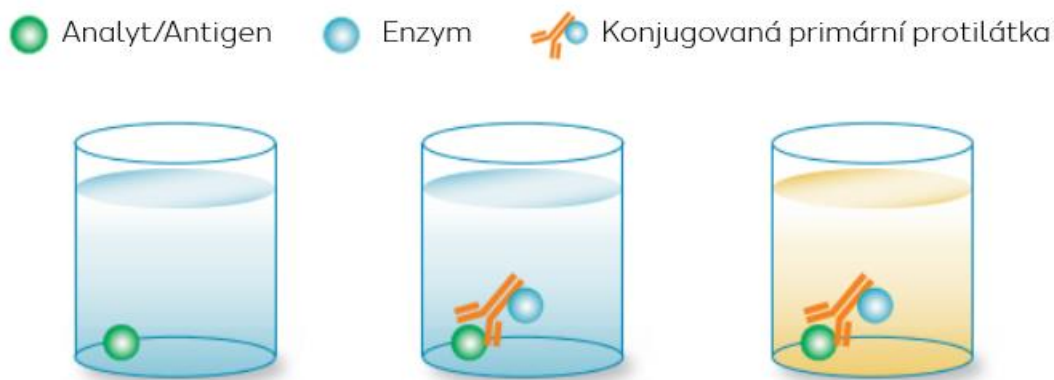
## 6.4 ELISA

Metoda ELISA (z angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je jednou z nejvíce užívaných imunochemických metod. Vznikla v 70. letech minulého století jako náhrada imunochemických testů, které využívaly radionuklidy k označení protilátek. ELISA kromě imunochemické reakce antigen-protilátka využívá přítomnost enzymu, nejčastěji křenové peroxidázy nebo alkalické fosfatázy. Jedná se o rychlou a jednoduchou laboratorní metodu, kterou řadíme do nejcitlivějších imunoanalýz používaných v rámci laboratorního výzkumu, kontroly kvality nebo diagnostiky biomarkerů různých onemocnění. Metoda ELISA může být použita v různých uspořádáních (viz obrázek 8) (48). V rámci experimentu byly použity destičky založené na principu přímé ELISA.



Obrázek 8: Možnosti uspořádání metody ELISA  
(převzato z [48])

Přímá ELISA (viz obrázek 9) je nejjednodušším uspořádáním této metody. Dochází k reakci antigenu, který je imobilizovaný na pevný povrch s protilátkou označenou enzymem. Enzym reaguje např. s chromogenním substrátem a vzniká měřitelná barevná změna. Uspořádání přímé ELISA lze použít pro kvalitativní i kvantitativní stanovení antigenu nebo protilátky ve vzorku. Výhodou je jednoduché uspořádání, které je méně časově náročné, a cenová dostupnost (48).



Obrázek 9: Schéma uspořádání přímé ELISA (převzato z [48])

V den 0, 4, 7, 10 a 14 byly odebírány vzorky média. Z každé zpracované jamky byl odebrán vzorek 1 ml média do 1,5 ml mikrozkuhavky Eppendorf. Následovala centrifugace 16 000 ot/min po dobu 15 minut při + 4°C (centrifuga MPW-260R), odebrání 950 µl čistého supernatantu do nové 1,5 ml mikrozkuhavky Eppendorf a zmražení na -80°C, čímž vznikl vzorek ELISA.

Interleukiny byly stanoveny najednou, po nasbírání celé kolekce vzorků médií. Pro stanovení jednotlivých interleukinů byly použity ELISA destičky, ELISA Kit for Interleukin 10 (IL10) 96T, ELISA Kit for Interleukin 12 (IL12) 96T a ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ ) 96T (výrobce Cloud-Clone Corp. Wuhan, zakoupeno u firmy Baria).

Při stanovení bylo postupováno dle manuálu. Všechny vzorky byly před měřením předehřáty na pokojovou teplotu. Pro vytvoření kalibrační křivky byly nařaděny standardy na koncentrace: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml a 0. Do příslušných jamek na destičce bylo přidáno 100 µl standardu nebo vzorku s následnou inkubací při 37°C po dobu 1 h. Poté byl roztok odstraněn a bylo přidáno 100 µl detekčního činidla A s inkubací opět při 37°C po dobu 1 h. Následně byly jamky 3x promyty pufrem. Dále bylo přidáno 100 µl detekčního činidla B a inkubováno 30 min při 37°C. Poté byly jamky 5x promyty promývacím pufrem. Po promytí bylo přidáno 90 µl TMB substrátu a proběhla inkubace 30 min při 37°C. Po přidání 50 µl stop roztoku byla na destičkovém readeru Cytation 5 (BioTek, USA) změřena absorbance při 450 nm. Ze sestavené kalibrační křivky byly odečteny hodnoty interleukinu.

## 6.5 Morfologie buněk

V průběhu polarizace buněk byla sledována jejich morfologie. Živé buňky byly foceny na invertovaném mikroskopu Olympus CKX41 (Olympus, Hamburg, Germany), viz obrázek 10.

Dále byly buňky foceny na fluorescenčním stereomikroskopu Leica DM6 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Buňky byly fixovány 2,5% glutaraldehydem a permeabilizovány 0,1% roztokem Tritonu X100. Po permeabilizaci byl k buňkám přidán premix sestávající z 1 ml média Live Cell Imaging Solution, 2 kapek NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (DAPI) a 2 kapek ActinRed™ 555 ReadyProbes™ Reagent (Rhodamine phalloidin) (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Po 30-minutové inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě byly buňky vyfoceny. NucBlue vizualizuje jádra v modré barvě a ActinRed aktinová vlákna v červené barvě, viz obrázek 11.

## 6.6 Viabilita buněk

K určení životaschopnosti buněk byl použit kit ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Kit obsahuje NucBlue® Live reagent a NucGreen® Dead reagent, které se přidávají přímo do média. Viabilita se určuje počítáním celkových a mrtvých buněk. Modré činidlo obarví jádra všech buněk, zatímco zelené obarví jen buňky, které mají porušenou integritu plazmatické membrány (49).

Suspenze buněk byla napipetována do 96-jamkové destičky pro měření fluorescence, vždy 1000 buněk na jamku/100 µl Live Cell Imaging Solution (LCIS). Do každé jamky byl přidán premix připravený z média LCIS a reagensů z kitu, a to tak, že na 1 ml LCIS připadly 2 kapky NucBlue Live reagent a 2 kapky NucGreen Dead reagent. Po 30-minutové inkubaci ve tmě při 37°C byla změřena fluorescence na destičkovém readeru Cytation 5 (Biotek, USA). NucBlue Live reagent má excitační/emisní maxima při 360/460 nm a NucGreen Dead reagent při 504/523 nm. Procento živých buněk se pak vypočítá z hodnoty fluorescence vzniklé odečtením naměřené hodnoty fluorescence u zeleného činidla od hodnoty fluorescence modrého činidla.

## 6.7 Statistická analýza

Ke statistickému vyhodnocení byl použit Studentův t-test ( $p \leq 0,05$ ).

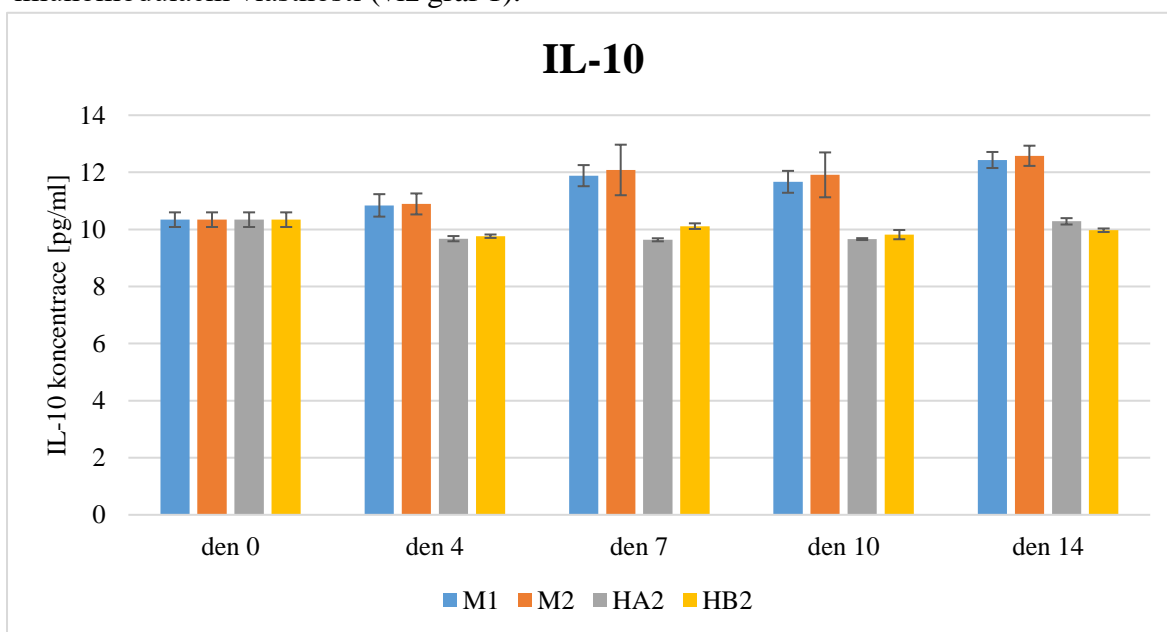
## 7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 7.1 ELISA – testování polarizace makrofágů

Během sledování produkce protizánětlivého IL-10 při polarizaci makrofágů působením polarizačních faktorů GM-CSF a M-CSF z diferenciačního kitu bylo zjištěno, že produkce interleukinu je vyšší než vlivem skafoldů.

V porovnání produkce IL-10 u M1 a M2 bylo zjištěno, že se statisticky neliší ani v jednom čase.

Produkce IL-10 na skafoldech se liší v den 7, kdy produkce je vyšší u HB2, a v den 14, kdy je produkce vyšší u HA2. Koncentrace IL-10 byla v průběhu 14denní kultivace buněk THP-1 u obou skafoldů prakticky stále stejná. Z těchto skutečností vyplývá, že podle produkce IL-10 nemůžeme jasně říci, zda má některý z testovaných skafoldů lepší imunomodulační vlastnosti (viz graf 1).



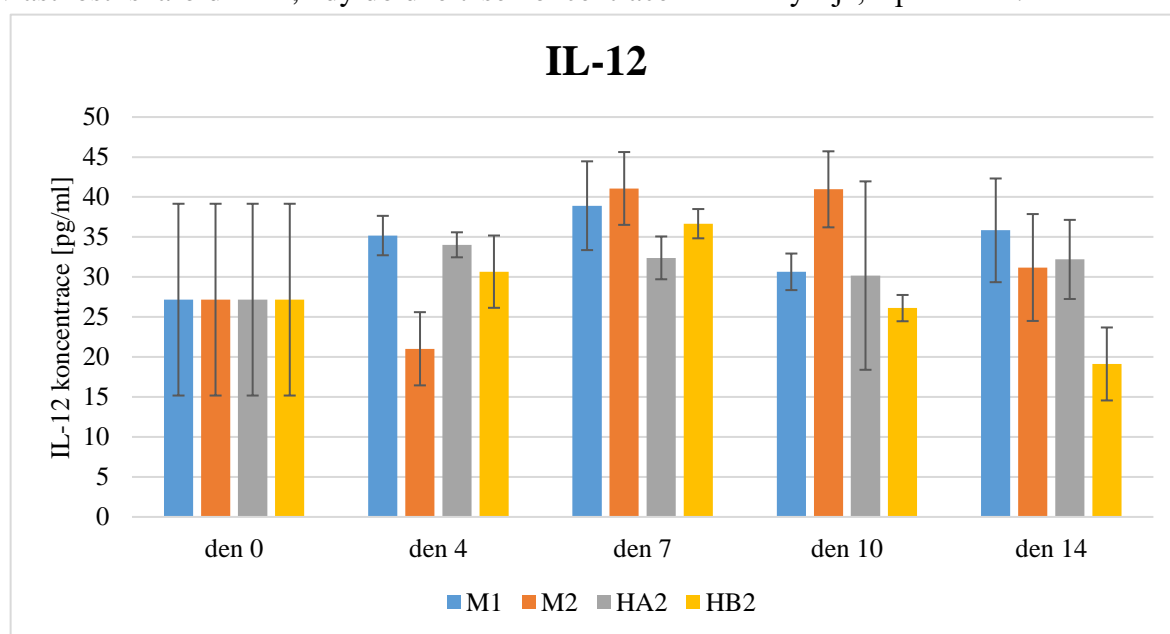
Graf 1: Koncentrace IL-10 v průběhu kultivace (zdroj vlastní, zpracování dle dat z LF UK Plzeň)

Během sledování produkce prozánětlivého IL-12 při polarizaci makrofágů polarizačními faktory GM-CSF a M-CSF z diferenciačního kitu bylo zjištěno, že produkce interleukinu je obdobná nebo vyšší než působením skafoldů.

V porovnání produkce IL-12 u M1 a M2 bylo zjištěno, že se produkce liší v den 4, kdy je vyšší u M1, a v den 10, kdy je vyšší u M2.

Produkce IL-12 na skafoldech se statisticky liší v den 14, kdy je vyšší u HA2. Koncentrace interleukinu u skafoldu HA2 byla v průběhu 14denní kultivace buněk THP-1 prakticky stále stejná. Naopak u skafoldu HB2 byla koncentrace interleukinu nejvyšší v den 7 a poté klesala (viz graf 2).

Z těchto skutečností vyplývá, že z testovaných skafoldů má lepší imunomodulační vlastnosti skafold HB2, kdy do dne 7 se koncentrace IL-12 zvyšuje, a pak klesá.



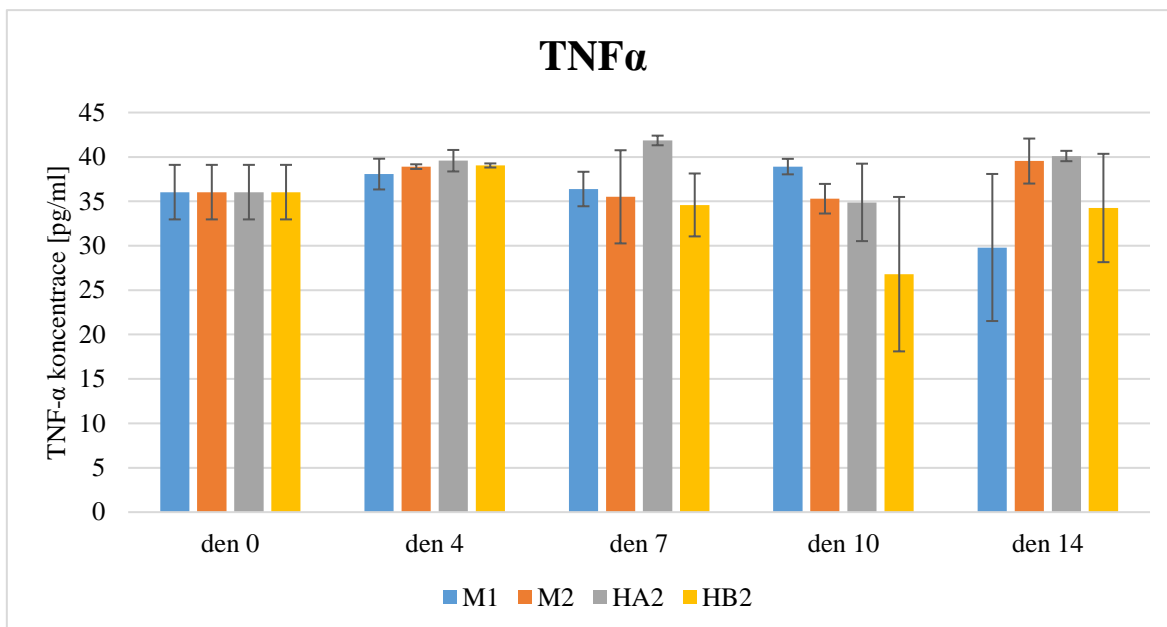
Graf 2: Koncentrace IL-12 v průběhu kultivace (zdroj vlastní, zpracování dle dat z LF UK Plzeň)

Během sledování produkce prozánětlivého TNF $\alpha$  při polarizaci makrofágů působením polarizačních faktorů GM-CSF a M-CSF z diferenciačního kitu bylo zjištěno, že polarizace na destičce je srovnatelná s působením skafoldů na buňky THP-1.

V porovnání produkce TNF $\alpha$  u M1 a M2 bylo zjištěno, že se produkce liší v den 10, kdy je vyšší u M1, a v den 14, kdy je vyšší u M2.

Produkce TNF $\alpha$  na skafoldech se liší v den 7, kdy je vyšší u HA2. V tento den byla zároveň koncentrace TNF $\alpha$  u skafoldu HA2 v průběhu 14denní kultivace buněk THP-1 nejvyšší. U skafoldu HB2 byla koncentrace interleukinu nejvyšší v den 4 a poté klesala (viz graf 3)

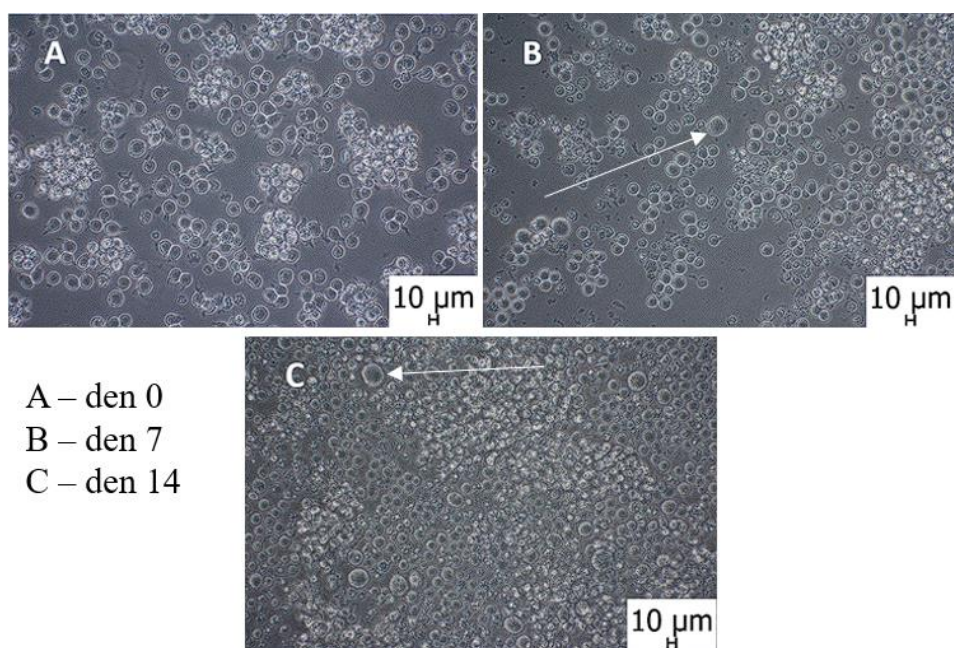
Z těchto skutečností vyplývá, že podle koncentrace TNF $\alpha$ , má lepší imunomodulační vlastnosti skafold HB2.



Graf 3: Koncentrace TNF $\alpha$  v průběhu kultivace (zdroj vlastní, zpracování dle dat z LF UK Plzeň)

## 7.2 Morfologie buněk

V den vysazení byly buňky velice malé, velikosti 4-10  $\mu\text{m}$ , kulatého tvaru s jedním, či dvěma výběžky. Sedmý den bylo patrné, že se některé z buněk začínají přeměňovat v makrofágy, které jsou větší než 10  $\mu\text{m}$  a na svém povrchu mají velké množství drobných výběžků (řasinek) a panožek. 14. den kultivace se vzhled buněk prakticky nelišil od 7. dne (viz obrázek 10). Pouze část kultivovaných buněk se přeměnila na větší makrofágy.

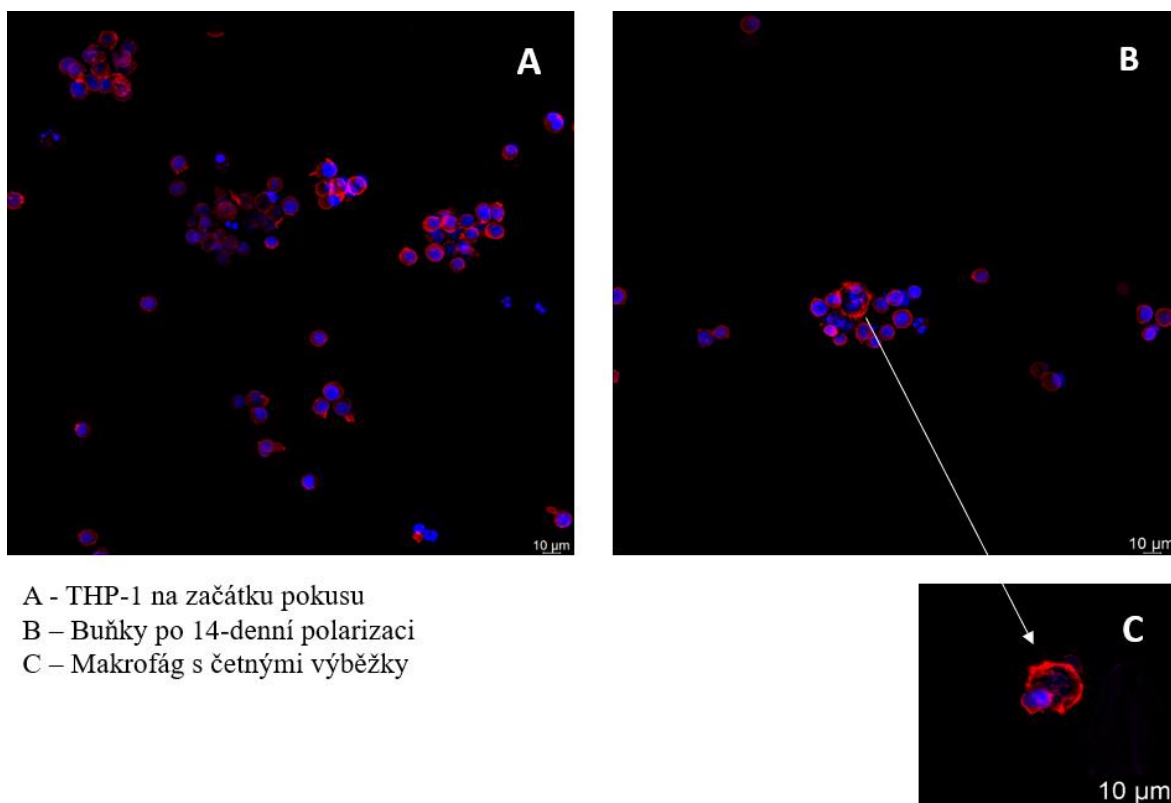


A – den 0  
B – den 7  
C – den 14

Obrázek 10: Morfologické změny monocytů THP-1 v průběhu 14denní polarizace. Vyfoceno na invertovaném mikroskopu Olympus CKX41 s objektivem 40x (zdroj vlastní)



Ten samý výsledek byl zaznamenán při fluorescenčním barvení. Barvivo ActinRed dobře zvýrazňuje aktinová vlákna ve výbězcích a panožkách, které jsou po 14denní kultivaci na makrofágu (viz obrázek 11-C) velmi dobře patrné.

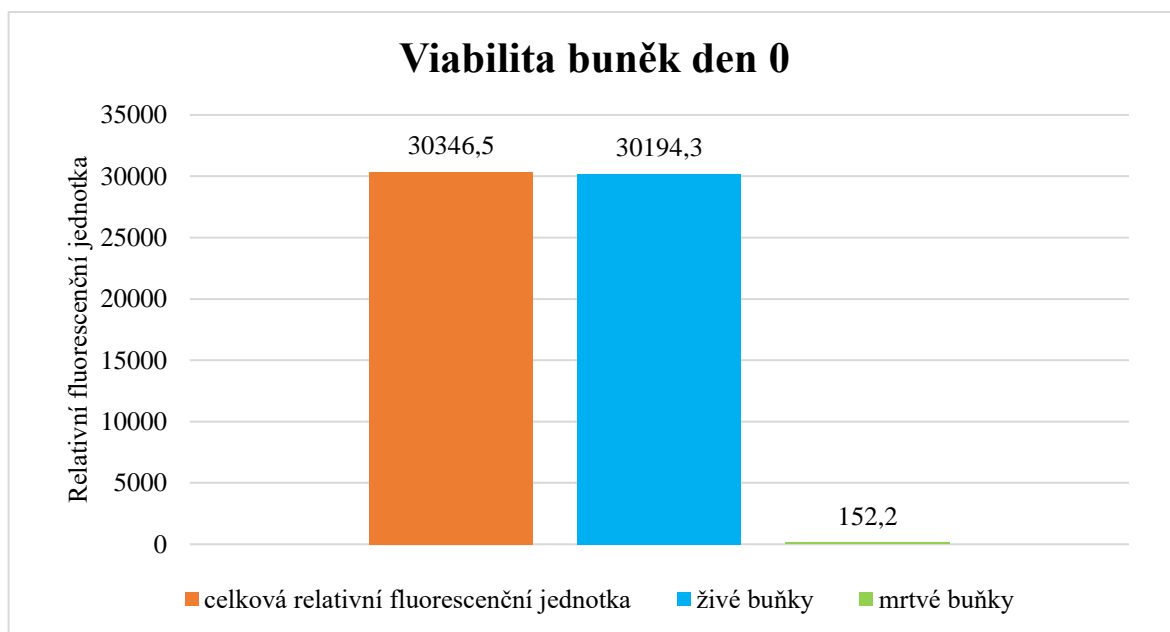


A - THP-1 na začátku pokusu  
B – Buňky po 14-denní polarizaci  
C – Makrofág s četnými výběžky

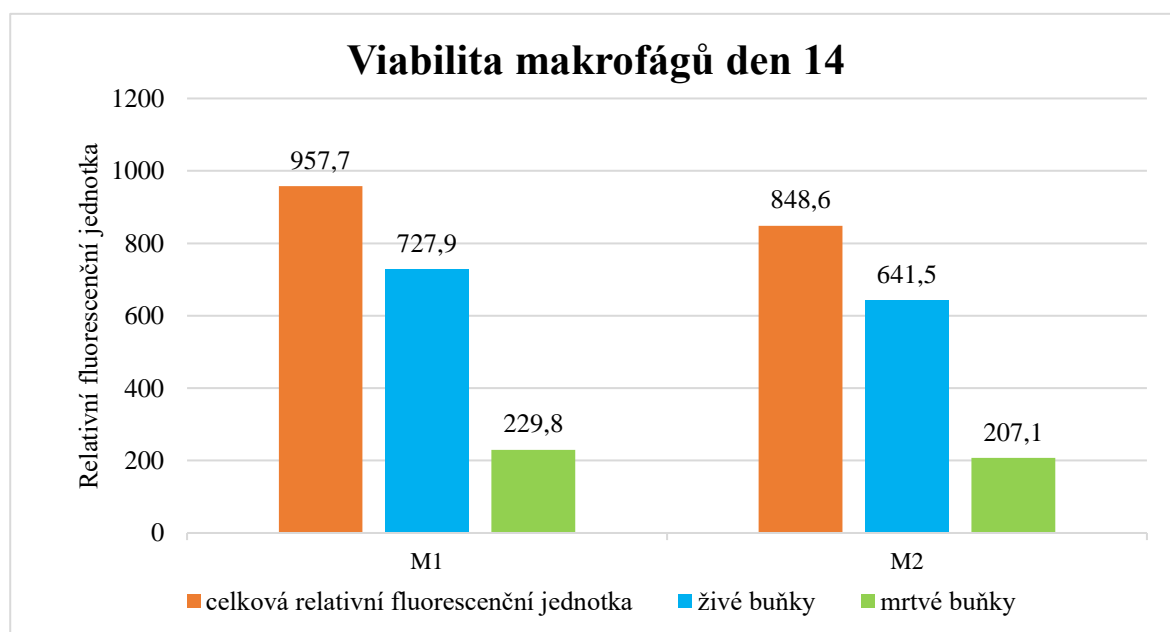
*Obrázek 11: Fluorescenční barvení THP-1. Aktinová vlákna barvená ActinRed červeně; jádra buněk barvená NucBlue modře. Vyfoceno na fluorescenčním stereomikroskopu Leica DM6 B s dipovacím objektivem 40x (zdroj vlastní)*

### 7.3 Viabilita buněk

V průběhu pokusu byla sledována viabilita buněk pomocí kitu ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green. V den 0, kdy byly buňky THP-1 rozsazeny do 24-jamkových destiček, byla jejich viabilita 99,5% (viz graf 4). Na konci pokusu (den 14) byla u buněk polarizovaných v M1 naměřena 76% viabilita a u buněk polarizovaných v M2 75,6% (viz graf 5).



Graf 4: Viabilita buněk THP-1 při započítání pokusu v den 0 (zdroj vlastní, vytvořeno dle dat z LF UK Plzeň)



Graf 5: Viabilita makrofágů M1 a M2 v den 14 (zdroj vlastní, vytvořeno dle dat z LF UK Plzeň)

## DISKUZE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo studovat vliv hydrogelu na polarizaci makrofágů *in vitro* a vyhodnocení imunomodulačních vlastností testovaných typů hydrogelu. K tomu byly použity lidské monocyty THP-1 zakoupené z American Type Culture Collection (ATCC® TIB202™) a vzorky hydrogelu připraveného z polyvinylalkoholu, hydroxyapatitu a kyseliny hyaluronové.

První výzkumná otázka se zabývá tím, zda se mění morfologie buněk THP-1 během polarizace. V průběhu polarizace byly buňky foceny invertovaným mikroskopem a fluorescenčním stereomikroskopem. Morfologie buněk byla průběžně sledována během 14denní kultivace, a to v den 0, 7 a 14. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že v den 0 byly buňky drobné, kulatého tvaru, o velikosti 4-10  $\mu\text{m}$ , s minimálním počtem výběžků na povrchu. V den 7 se některé buňky začaly přeměňovat v makrofágy, které měly velikost 10-20  $\mu\text{m}$ , a počet jejich výběžků a panožek na povrchu vzrostl. Poslední den kultivace byl vzhled buněk prakticky stejný jako v sedmý den. Ze všech kultivovaných buněk se jen část z nich přeměnila v makrofágy.

Druhá výzkumná otázka se zabývá tím, zda je možné z kultivačního média testovat polarizaci makrofágů ovlivněných skafoldem. Pro sledování polarizace makrofágů byly jednak použity skafoldy, ke kterým byly přidány THP-1 buňky a jednak, jako kontrola sloužící, THP-1 buňky polarizované vlivem zakoupeného kitu, který obsahuje GM-CSF a G-CSF podporující polarizaci makrofágů. Dle zjištěných výsledků lze na výzkumnou otázku odpovědět, že testování polarizace makrofágů na skafoldech je možné, vzhledem k příznivým finálním výsledkům viability buněk. V současnosti se vyvíjí velké množství nových biomateriálů a bylo by výhodné testovat jejich imunomodulační reakce *in vitro* ještě před použitím laboratorních zvířat.

Třetí výzkumná otázka se týká imunomodulačních vlastností použitých skafoldů. Oba skafoldy byly vyrobeny stejným způsobem, liší se pouze poměrem PVA a HA. Skafold HA1 obsahuje PVA a HA v poměru 75:25, zatímco skafold HB2 obsahuje PVA a HA v poměru 50:50. Dle získaných výsledků bylo zjištěno, že lepší imunomodulační vlastnosti vykazuje skafold HB2, u něhož se koncentrace prozánětlivého IL-12 zvyšovala do dne 7 a pak postupně klesala, což odpovídá fyziologickému hojení s odezníváním zánětu. Tím se HB2 lišil od HA2, u kterého zůstala koncentrace IL-12 prakticky stále stejná. Rovněž při hodnocení koncentrace TNF $\alpha$  bylo zjištěno, že nejvyšší hodnota byla u HB2 naměřena v den

4 a poté klesala. Rozdíl mezi skafoldy HA2 a HB2 byl zřejmě způsoben větším obsahem HA, látkou s protizánětlivými účinky, přirozeně se vyskytující v buněčné hmotě (51).

Čtvrtá výzkumná otázka zjišťuje, jak se liší produkce interleukinů vlivem skafoldů a vlivem diferenciačních kitů. Při sledování produkce interleukinů typických pro podtypy makrofágů M1 a M2 bylo zjištěno, že vyšší produkce IL-10 a IL-12 je vlivem diferenciačních kitů. Pouze v případě TNF $\alpha$  byla produkce srovnatelná.

Autoři výzkumného článku na podobné téma (52), kteří použili stejný typ monocytárních buněk jako my (THP-1), také zkoumali přeměny makrofágů na podtypy M1 a M2 jednak stejným způsobem, jaký je popsán v této práci, tedy měřením koncentrace interleukinů v supernatantech pomocí ELISA metody, a jednak pomocí imunobarvení povrchových markerů typických pro podtypy makrofágů (pro M1 CCR7 a pro M2 CD-36). Autoři článku přidávali do médií k THP-1 buňkám další suplementy např. PMA (tetradekanoylforbolacetát), LPS nebo INF- $\gamma$  za účelem lepší aktivace a přeměny na podtypy makrofágů, což mohlo mít vliv na rozdílné výsledky.

V jiném článku (53) autoři testovali viabilitu buněk v reakci na biomateriál. Pokud buňky na materiál reagovaly negativně, jejich viabilita klesala. Vysoké hodnoty imunitních buněk však mohly znamenat jejich hojnou aktivaci v reakci na materiál. K testování použili jiný typ vizualizačních barviv (kalcein-acetoxymethyl), než je popsáno v této práci, za účelem odlišení mrtvých a živých buněk. Dále použili metabolické testy (glukóza-6-fosfát dehydrogenáza), které slouží k zjištění metabolické aktivity živých buněk, testy založené na expresi genů nebo funkční testy zahrnující hodnocení fagocytózy a produkce NO.

Výzkumníci dalšího článku (54) také sledovali reakci THP-1 buněk na biomateriál. Jimi použitý hydrogel byl vytvořen na bázi glykol-chitosanu na rozdíl od námi použitého hydrogelu na bázi PVA, HA a HAp. Autoři sledovali koncentrace TNF $\alpha$  a IL-10 pomocí metody ELISA za účelem rozlišení prozánětlivé a protizánětlivé odpovědi imunitních buněk. K vyhodnocení vlivu hydrogelu na vznik daného fenotypu makrofágů použili průtokovou cytometrii. Dle získaných výsledků přítomnost hydrogelu vyvolala aktivaci prozánětlivé populace makrofágů a vznikl zánět. Následné vymizení zánětu dokazují zvýšené hladiny IL-10 a zvýšená populace protizánětlivých makrofágů.

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s problematikou biomateriálů a jejich působením na imunitní buňky, konkrétně vliv hydrogelu na polarizaci makrofágů *in vitro*.

Teoretická část se věnovala imunitnímu systému, rozdělení imunitní odpovědi na nespecifickou a specifickou odpověď a imunitním buňkám, především se zaměřením na makrofágy, jejich polarizaci a roli, kterou hrají v kostní reparaci. Následovala kapitola se zaměřením na kostní tkáňové inženýrství, jeho vývoj, cíle a používané druhy materiálu.

Praktická část nejdříve popisovala kultivaci použitých THP-1 buněk a přípravu hydrogelových skafoldů HA2 a HB2. Následovala polarizace THP-1 makrofágů a její testování pomocí metody ELISA. Vyhodnocení proběhlo na základě sledování produkce protizánětlivých a prozánětlivých interleukinů, morfologie a viability buněk v průběhu polarizace.

Závěrem této bakalářské práce lze konstatovat, že interakce makrofágů s biomateriálem je důležitým faktorem, který ovlivňuje úspěch regenerace kostní tkáně. Studie ukazují, že patřičná reakce makrofágů na biomateriál může podpořit regeneraci tkáně a minimalizovat zánětlivou reakci. V opačném případě zánět přetrvává a regenerace kosti je potlačena. Porozumění této interakci je klíčové pro další vývoj biokompatibilních materiálů v tkáňovém inženýrství a pro úspěšnou aplikaci v medicíně. Další výzkum v této oblasti by měl směřovat k hlubšímu pochopení interakcí nejen mezi makrofágy, ale mezi celkovým imunitním systémem a biomateriály a k optimalizaci vlastností biomateriálů pro dosažení co nejlepších budoucích výsledků.

## SEZNAM LITERATURY

- (1) BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk a VARGA, Ivan. *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.
- (2) KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-1963-4.
- (3) VAGASKÁ, B.; BAČÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E. a BALÍK, K. Osteogenic Cells on Bio-Inspired Materials for Bone Tissue Engineering. Online. *Physiological research*. 2010, roč. 59, č. 3, s. 309-322. ISSN 0862-8408. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.33549/physiolres.931776>. [cit. 2023-09-19].
- (4) CHOCHOLATÁ, Petra; KULDA, Vlastimil a BABUŠKA, Václav. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. Online. *Materials (Basel)*. 2019, roč. 12, č. 4, s. 568. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ma12040568>. [cit. 2023-09-19].
- (5) LUKÁŠ, David. *Nanovlákná: teorie, technologie a použití*. Gerstner. Praha: Academia, 2023. ISBN 978-80-200-3400-7.
- (6) O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Online. *Materials Today*. 2011, roč. 14, č. 3, s. 88-95. ISSN 1369-7021. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X). [cit. 2023-10-03].
- (7) RADULESCU, Denisa-Maria; NEACSU, Ionela Andreea; GRUMEZESCU, Alexandru-Mihai a ANDRONESCU, Ecaterina. New Insights of Scaffolds Based on Hydrogels in Tissue Engineering. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 4, s. 799. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym14040799>. [cit. 2023-10-03].
- (8) BALÍK, Karel a SUCHÝ, Tomáš. *Biokompozitní náhrady kostní tkáně*. Věda kolem nás. Praha: Středisko společných činností AV ČR, v.v.i., pro Ústav struktury a mechaniky hornin Akademie věd ČR, 2015. ISBN 978-80-270-0112-5.
- (9) VACANTI, Joseph a VACANTI, Charles A., LANZA, Robert a LANGER, Robert (ed.). *Principles of Tissue Engineering*. Third Edition. Academic Press, 2007. ISBN 9780123706157.

- (10) VACANTI, Charles A. The history of tissue engineering. Online. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006, roč. 10, č. 3, s. 569-576. ISSN 1582-4934. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x>. [cit. 2023-11-26].
- (11) AKTER, F. *Tissue Engineering Made Easy*. Academic Press, 2016. ISBN 9780128053614. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00001-1>.
- (12) MORONI, Lorenzo; SCHROOTEN, Jan; TRUCKENMÜLLER, Roman; ROUWKEMA, Jeroen; SOHIER, Jérôme et al. *Tissue Engineering*. Second Edition. Academic Press, 2014. ISBN 9780124201453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00564-6>
- (13) OSTRÓ, Alexander a LEŠNÍK, František. *Biologické aspekty regenerační medicíny*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2008. ISBN 978-80-7182-250-9.
- (14) ELDEEB, Alaa Emad; SALAH, Salwa a ELKASABGY, Nermeen A. Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2022, roč. 23, č. 7, s. 267. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1208/s12249-022-02419-1>. [cit. 2023-12-03].
- (15) RODRÍGUEZ, Gloria Belén Ramírez; PATRÍCIO, Tatiana a LÓPEZ, Jose Manuel Delgado. *Bone Repair Biomaterials*. Second Edition. Woodhead Publishing, 2019. ISBN 9780081024515. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00008-1>
- (16) STEVENS, Molly M. Biomaterials for bone tissue engineering. Online. *Materials Today*. 2008, roč. 11, č. 5, s. 18-25. ISSN 1369-7021. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70086-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5). [cit. 2023-12-03].
- (17) BABUŠKA, Václav; DOBRÁ, Jana; KULDA, Vlastimil; KRIPNEROVÁ, Michaela; MOZTARZADEH, Amin et al. Comparison of Fibroblast and Osteoblast Response to Cultivation on Titanium Implants with Different Grain Sizes. Online. *Journal of Nanomaterials*. 2015, roč. 2015, s. 9. ISSN 1687-4110. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2015/920893>. [cit. 2023-12-03].
- (18) TURNBULL, Gareth; CLARKE, Jon; PICARD, Frédéric; RICHES, Philip; JIA, Luanluan et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. Online. *Bioactive Materials*. 2018, roč. 3, č. 3, s. 278-314. ISSN 2452-199X. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>. [cit. 2023-12-04].

- (19) BAINO, Francesco; NOVAJRA, Giorgia a VITALE-BROVARONE, Chiara. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. Online. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015, roč. 3, č. 202. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00202>. [cit. 2023-12-04].
- (20) BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J. a YARMUSH, Martin L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. Online. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. 2011, roč. 2, s. 403–430. ISSN 1947-5438. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>. [cit. 2023-12-04].
- (21) YUNOS, Darmawati Mohamad; BRETCANU, Oana a BOCCACCINI, Aldo R. Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds. Online. *Journal of Materials Science*. 2008, roč. 43, s. 4433–4442. ISSN 1573-4803. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10853-008-2552-y>. [cit. 2023-12-04].
- (22) KOHANE, Daniel S. a LANGER, Robert. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. Online. *Pediatric Research*. 2008, roč. 63, č. 5, s. 487–491. ISSN 1530-0447. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7>. [cit. 2023-12-05].
- (23) CHIRCOV, Cristina; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai a BEJENARU, Ludovic Everard. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. Online. *Rom J Morphol Embryol*. 2018, roč. 59, č. 1, s. 71-76. ISSN 2066-8279. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>. [cit. 2023-12-06].
- (24) MANTHA, Somasundar; PILLAI, Sangeeth; KHAYAMBASHI, Parisa; UPADHYAY, Akshaya; ZHANG, Yuli et al. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Online. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2019, roč. 12, č. 20, s. 3323. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ma12203323>. [cit. 2023-12-06].
- (25) DRURY, Jeanie L. a MOONEY, David J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Online. *Biomaterials*. 2003, roč. 24, č. 24, s. 4337-4351. ISSN 0142-9612. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5). [cit. 2023-12-11].



- (26) LIU, Xiaohua; HOLZWARATH, Jeremy M. a MA, Peter X. Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. Online. *Macromolecular Bioscience*. 2012, roč. 12, č. 7, s. 911-919. ISSN 1616-5187. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.201100466>. [cit. 2023-12-11].
- (27) *Oral Health in America: Advances and Challenges*. Bethesda (MD): National Institute of Dental and Craniofacial Research(US), 2021. ISBN 978-0-578-34609-0.
- (28) GARG, Tarun; AJAY, Bhawna Kapoor; KUMAR, Sunil a JOSHI, Ravi. Scaffold: Tissue engineering and regenerative medicine. Online. *International Research Journal of Pharmacy*. 2011, roč. 2, č. 12, s. 37-42. ISSN 2230-8407. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/256470899\\_Scaffold\\_Tissue\\_engineering\\_and\\_regenerative\\_medicine](https://www.researchgate.net/publication/256470899_Scaffold_Tissue_engineering_and_regenerative_medicine). [cit. 2023-12-12].
- (29) KUMAR, Vijay. *Macrophages*. IntechOpen, 2022. ISBN 978-1-80355-625-3. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98074>
- (30) HORWOOD, Nicole J. Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. Online. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016, roč. 51, č. 1, s. 79-86. ISSN 1559-0267. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12016-015-8519-2>. [cit. 2024-01-17].
- (31) MUÑOZ, Joseph; AKHAVAN, Neda S.; MULLINS, Amy P. a ARJMANDI, Bahram H. Macrophage Polarization and Osteoporosis: A Review. Online. *Nutrients*. 2020, roč. 12, č. 10, s. 2999. ISSN 1559-0267. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu12102999>. [cit. 2024-01-18].
- (32) VANNELLA, Kevin M. a WYNN, Thomas A. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. Online. *Annual Review of Physiology*. 2017, roč. 79, č. 1, s. 593-617. ISSN 0066-4278. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034356>. [cit. 2024-01-18].
- (33) SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas; MOHAMMADIAN, Saeed; VAZINI, Hossein; TAGHADOSI, Mahdi; ESMAEILI, Seyed-Alireza et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. Online. *Journal of Cellular Physiology*. 2018, roč. 233, č. 9, s. 6425-6440. ISSN 0021-9541. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.26429>. [cit. 2024-01-18].

- (34) STRIZOVA, Zuzana; BENESOVA, Iva; BARTOLINI, Robin; NOVYSEDLAK, Rene; CECRDLOVA, Eva et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? Online. *Clinical science*. 2023, roč. 137, č. 15, s. 1067-1093. ISSN 1470-8736. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/CS20220531>. [cit. 2024-01-18].
- (35) FU, Yan Lin a HARRISON, Rene E. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. Online. *Frontiers in immunology*. 2021, roč. 12, č. 1, s. 662063. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662063>. [cit. 2024-01-19].
- (36) LI, Yuanyuan; XU, Zhengyi; WANG, Jian; PEI, Xibo; CHEN, Junyu et al. Alginate-based biomaterial-mediated regulation of macrophages in bone tissue engineering. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 230. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123246>. [cit. 2024-01-20].
- (37) WU, Andy C.; RAGGATT, Liza J.; ALEXANDER, Kylie A. a PETTIT, Allison R. Unraveling macrophage contributions to bone repair. Online. *BoneKEy reports*. 2013, roč. 2, s. 373. ISSN 2047-6396. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.107>. [cit. 2024-01-20].
- (38) LOI, Florence; CORDOVA, Luis A.; PAJARINEN, Jukka; LIN, Tzu-hua; YAO, Zhenyu et al. Inflammation, fracture and bone repair. Online. *Bone*. 2016, roč. 86, s. 119-130. ISSN 8756-3282. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>. [cit. 2024-01-20].
- (39) CLAES, Lutz; RECKNAGEL, Stefan a IGNATIUS, Anita. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Online. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012, roč. 8, č. 3, s. 133-143. ISSN 1759-4804. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>. [cit. 2024-01-20].
- (40) OPPEZZO, Alessia a ROSSELLI, Filippo. The underestimated role of the microphthalmia-associated transcription factor. Online. *Cell & bioscience*. 2021, roč. 11, č. 1, s. 18. ISSN 2045-3701. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13578-021-00529-0>. [cit. 2024-02-16].

- (41) MILLS, Charles D.; KINCAID, Kristi; ALT, Jennifer M.; HEILMAN, Michelle J. a HILL, Annette M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. Online. *The Journal of Immunology*. 2000, roč. 164, č. 12, s. 6166-6173. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>. [cit. 2024-02-16].
- (42) MARUYAMA, Masahiro; RHEE, Claire; UTSUNOMIYA, Takeshi; ZHANG, Ning; UENO, Masaya et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. Online. *Frontiers in endocrinology*. 2020, roč. 11, s. 386. ISSN 1664-2392. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00386>. [cit. 2024-02-16].
- (43) DVOŘÁKOVÁ, Jana; WIESNEROVÁ, Lucie; CHOCHOLATÁ, Petra; KULDA, Vlastimil; LANDSMANN, Lukáš et al. Human cells with osteogenic potential in bone tissue research. Online. *BioMedical Engineering OnLine*. 2023, roč. 22, č. 1, s. 33. ISSN 1475-925X. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12938-023-01096-w>. [cit. 2024-02-16].
- (44) Lahvička kultivační. Online. P-LAB. 2000. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/lahvicka-kultivacni-tpp>. [cit. 2024-02-17].
- (45) CHOCHOLATÁ, Petra; KULDA, Vlastimil; DVOŘÁKOVÁ, Jana; DOBRÁ, Jana K. a BABUŠKA, Václav. Biological Evaluation of Polyvinyl Alcohol Hydrogels Enriched by Hyaluronic Acid. Online. *International journal of molecular sciences*. 2020, roč. 21, č. 16. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21165719>. [cit. 2024-02-19].
- (46) CellXVivo Human M2 Macrophage Differentiation Kit. Online. R&D Systems. 1996. Dostupné z: [https://www.rndsystems.com/products/cellxvivo-human-m2-macrophage-differentiation-kit\\_cdk013](https://www.rndsystems.com/products/cellxvivo-human-m2-macrophage-differentiation-kit_cdk013). [cit. 2024-02-24].
- (47) CellXVivo Human M1 Macrophage Differentiation Kit. Online. R&D Systems. 1996. Dostupné z: [https://www.rndsystems.com/products/cellxvivo-human-m1-macrophage-differentiation-kit\\_cdk012#assay-procedure](https://www.rndsystems.com/products/cellxvivo-human-m1-macrophage-differentiation-kit_cdk012#assay-procedure). [cit. 2024-02-24].
- (48) Metoda ELISA - aspekty jednotlivých uspořádání. Online. Baria. 2004. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc6186731-metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani>. [cit. 2024-02-24].

- (49) ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green. Online. Thermo Fisher Scientific. 2016. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37609>. [cit. 2024-02-24].
- (50) THP-1 - TIB-202. Online. ATCC: The Global Bioresource Center | ATCC. 1997. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/tib-202>. [cit. 2024-02-25].
- (51) MARINHO, Andreia; NUNES, Cláudia a REIS, Salette. Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. Online. *Biomolecules*. 2021, roč. 11, č. 10. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom11101518>. [cit. 2024-03-14].
- (52) TANG, Hongbo; HUSCH, Johanna F. A.; ZHANG, Yang; JANSEN, John A.; YANG, Fang et al. Coculture with monocytes/macrophages modulates osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stromal cells on poly(lactic-co-glycolic) acid/polycaprolactone scaffolds. Online. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019, roč. 13, č. 5, s. 785-798. ISSN 1932-6254. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/term.2826>. [cit. 2024-03-07].
- (53) LOCK, Alistair; CORNISH, Jillian a MUSSON, David S. The Role of In Vitro Immune Response Assessment for Biomaterials. Online. *Journal of functional biomaterials*. 2019, roč. 10, č. 3, s. 31. ISSN 2079-4983. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jfb10030031>. [cit. 2024-03-09].
- (54) COBURN, Patrick Thomas; HERBAY, Alexandre Camille; BERRINI, Mattia a LI-JESSEN, Nicole Y. K. An in vitro assessment of the response of THP-1 macrophages to varying stiffness of a glycol-chitosan hydrogel for vocal fold tissue engineering applications. Online. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2021, roč. 109, č. 8, s. 1337-1352. ISSN 1552-4965. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.37125>. [cit. 2024-03-11].