

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv hypoxie na *in vitro* produkci VEGF u mesenchymálních stromálních buněk
získaných z tukové tkáně

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Karolína Cívínová**
Osobní číslo: **C23223**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Vliv hypoxie na *in vitro* produkci VEGF u mesenchymálních stromálních buněk získaných z tukové tkáně**
Téma práce anglicky: **The Effect of Hypoxia on *in vitro* VEGF Production in Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na mesenchymální stromální buňky.
- Věnovat se v úvodních kapitolách definici a charakteristice mesenchymálních stromálních buněk a možnostem jejich zisku.
- V dalších kapitolách se zabývat produkcí VEGF, jeho významem v těle a možnostmi stimulace jeho produkce.

Experimentální část:

- Izolace a kultivace mesenchymálních stromálních buněk a jejich následná charakterizace.
- Ověření produkce VEGF těmito buňkami.
- Porovnání produkce VEGF buňkami kultivovanými v normoxickém prostředí a v modelové hypoxii.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martina Špryncová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **doc. MUDr. Jan Kříž, Ph.D.**
Institut Klinické a Experimentální Medicíny (IKEM)
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Vliv hypoxie na *in vitro* produkci VEGF u mesenchymálních stromálních buněk získaných z tukové tkáně jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.5.2025

Karolína Cívínová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Janu Křížovi, Ph.D. za skvělou příležitost podílet se na tomto experimentu, za pomocnou ruku během vypracování a za komentáře, kterými mě zasvětlil do této problematiky.

Dále bych chtěla poděkovat zejména Mgr. Kláře Zacharovové, Ph.D. za její vždy vstřícný přístup a odborné rady. Zvláště si cením její trpělivosti a neutuchajícího optimismu i v náročných chvílích, které během vypracování této práce nastaly. Mé dík patří i všem ostatním pracovníkům Laboratoře Langerhansových ostrůvků za přijetí do kolektivu a cenné rady.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým blízkým za nekonečnou podporu během celého mého studia.

ANOTACE

Mesenchymální stromální buňky (MSC) představují v současné době slibný nástroj v oblasti regenerativní medicíny a buněčné terapie. Vzhledem k jejich schopnostem produkovat různé růstové faktory a další složky nebo se diferencovat na různé typy buněk (zejména adipocyty, osteocyty a chondrocyty), nacházejí široké uplatnění při léčbě řady degenerativních onemocnění včetně srdečních onemocnění, ortopedických, neurologických poruch, diabetes mellitus a dalších. I když se jedná o stále se rozvíjející oblast, MSC mají potenciál výrazně změnit přístup k léčbě mnoha dosud obtížně léčitelných onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mesenchymální stromální buňky, VEGF, hypoxie, charakteristika MSC, izolace MSC

TITLE

The Effect of Hypoxia on *in vitro* VEGF Production in Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue

ANNOTATION

Mesenchymal stromal cells (MSCs) currently represent a promising tool in the field of regenerative medicine and cell therapy. Due to their ability to produce various growth factors and other bioactive molecules, as well as their capacity to differentiate into multiple cell types (particularly adipocytes, osteocytes, and chondrocytes), they are widely applied in the treatment of numerous degenerative diseases, including cardiac conditions, orthopaedic and neurological disorders, diabetes mellitus, and others. Although this field is still evolving, MSCs hold the potential to significantly transform the approach to treating many currently hard-to-manage diseases.

KEYWORDS

Mesenchymal stem cells, VEGF, hypoxia, characterization of MSC, isolation of MSC

OBSAH

SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM ROVNIC.....	10
SEZNAM GRAFŮ	10
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	11
SEZNAM SCHÉMAT	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Mesenchymální stromální buňky.....	15
1.1.1 Adheze buněk	16
1.1.2 Fenotypická charakterizace MSC	17
1.1.3 Diferenciace MSC.....	19
1.2 Zdroje MSC	25
1.3 Sekretom MSC.....	26
1.4 Vaskulární endotelový růstový faktor.....	28
1.5 Možnosti stimulace produkce VEGF.....	30
1.5.1 Hypoxie.....	30
1.5.2 Genetické modifikace	32
1.6 Metodika	34
1.6.1 Biologický materiál.....	34
1.6.2 Izolace mesenchymálních stromálních buněk z tukové tkáně	34
1.6.3 Průtoková cytometrie	35
1.6.4 Měření hladiny vaskulárního endotelového faktoru	35
1.6.5 Fluorescenční mikroskopie	36
2 CÍL PRÁCE	38
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1 Odběr tukové tkáně.....	39
3.1.1 Seznam laboratorních pomůcek, chemikálií a roztoků.....	39
3.1.2 Pracovní postup.....	39
3.2 Izolace a kultivace MSC	40

3.2.1	Seznam laboratorní techniky	40
3.2.2	Seznam laboratorních pomůcek.....	41
3.2.3	Seznam chemikálií	41
3.2.4	Seznam médií a roztoků.....	42
3.2.5	Pracovní postup.....	43
3.3	Průtoková cytometrie	45
3.3.1	Seznam laboratorní techniky	45
3.3.2	Seznam laboratorních pomůcek.....	45
3.3.3	Seznam protilátek a jejich příprava na použití.....	45
3.3.4	Seznam roztoků.....	46
3.3.5	Pracovní postup.....	46
3.4	Měření VEGF	47
3.4.1	Seznam laboratorní techniky	47
3.4.2	Seznam laboratorních pomůcek.....	47
3.4.3	Seznam médií a kitů.....	48
3.4.4	Pracovní postup.....	48
3.5	Chemicky navozená hypoxie	48
3.5.1	Seznam laboratorní techniky	48
3.5.2	Seznam laboratorních pomůcek.....	49
3.5.3	Seznam chemikálií a kitů	49
3.5.4	Seznam roztoků.....	49
3.5.5	Pracovní postup.....	50
3.6	Diferenciace	51
3.6.1	Seznam laboratorní techniky	51
3.6.2	Seznam laboratorních pomůcek.....	51
3.6.3	Seznam chemikálií	51
3.6.4	Seznam médií, roztoků a ředění protilátek	52
3.6.5	Pracovní postup.....	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
4.1	Izolace a kultivace MSC	55
4.2	Charakterizace MSC	55
4.2.1	Adheze buněk k plastovým lahvím.....	55
4.2.2	Analýza povrchových markerů pomocí průtokové cytometrie.....	57

4.2.3	Diferenciace MSC.....	62
4.3	Produkce VEGF.....	64
4.4	Stimulace produkce VEGF chemicky navozenou hypoxií.....	67
ZÁVĚR		72
POUŽITÁ LITERATURA		74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Porovnání exprese vybraných CD markerů na lidských a potkaních MSC	18
Tabulka 2 Postup přípravy buněčných suspenzí pro měření VEGF a životností.....	50
Tabulka 3 Podrobnější údaje o jednotlivých izolacích.....	55
Tabulka 4 Procentuální zastoupení jednotlivých povrchových znaků ve 2. a 3. pasáži.....	58
Tabulka 5 Produkce VEGF ve druhé a třetí pasáži	64
Tabulka 6 Hodnoty doubling–time mezi počátečním inokulem a první pasáží, mezi první a druhou pasáží a mezi druhou a třetí pasáží.	65
Tabulka 7 Koncentrace VEGF v kultivačním médiu u MSC v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem.	67
Tabulka 8 Procentuální zastoupení mrtvých buněk v jednotlivých časech a koncentracích CoCl_2	71

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Vzorec pro výpočet doubling–time.....	64
--	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Grafické znázornění závislosti koncentrace produkovaného VEGF na době zdvojení buněk.	66
Graf 2 Znázornění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 1. hypoxie (potkan C).....	68
Graf 3 Znázornění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 2. hypoxie (potkan G).....	68
Graf 4 Znázornění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 3. hypoxie (potkan H).....	69
Graf 5 Znázornění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 4. hypoxie (potkan J).....	69

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Znázornění klasických a neklasických intracelulárních mechanismů	27
Obrázek 2 Znázornění izoform VEGF a jejich vazby na specifické receptory	29
Obrázek 3 Znázornění sandwichové ELISA	36
Obrázek 4 Umístění epididymálního tuku u potkana	40
Obrázek 5 Fotografie z izolace	43
Obrázek 6 Mikroskopické snímky MSC v různých časových bodech od nasazení primární buněčné kultury do kultivační lahve.	56
Obrázek 7 Stanovení fenotypu buněk pomocí průtokové cytometrie.	59
Obrázek 8 Adipogenní diferenciaci MSC.....	62
Obrázek 9 Osteogenní diferenciaci MSC.	63
Obrázek 10 Mikroskopický snímek znázorňující životnost buněk.	70

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1 Schéma pro pipetování kultivačních desek určených pro stanovení VEGF (vlevo) a životností (vpravo).	51
--	----

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAS	antibiotický a antimykotický stabilizovaný roztok (z angl. antibiotic antimycotic solution stabilized)
BMP	kostní morfogenetický protein (z angl. bone morphogenetic protein)
BSA	bovinní sérový albumin (bovine serum albumin)
CFU–F	buňky podobné fibroblastům (z angl. fibroblast colony–forming units)
DABCO	1,4–diazabicyklo(2,2,2) oktan (z angl. 1,4–diazabicyclo [2.2.2] octane)
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (z angl. Dulbecco’s modified Eagles’s medium)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbeccův fosfátem pufovaný fyziologický roztok (z angl. Dulbecco’s phosphate buffered saline)
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor)
ELISA	enzymově vázaná imunosorpční analýza (z angl. enzyme–linked immunosorbent assay)
FBS	fetální bovinní sérum (z angl. fetal bovine serum)
FGF	fibroblastový růstový faktor (z angl. fibroblast growth factor)
HBSS	Hanksův vyvážený solný roztok (z angl. Hanks’ balanced salt solution)
HIF	hypoxií indukovatelný faktor (z angl. hypoxia inducible factor)
IGF	inzulínu podobný růstový faktor (z angl. insulin like growth factor)
IBMX	isobuthylmethylxantin
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
ISCT	International Society for Cell & Gene Therapy
ITS	Inzulín–Transferin–Selen
KLF	Krüppelům podobné faktory (z angl. Krüppel–like factor)

MSC	mesenchymální stromální buňky (z angl. mesenchymal strom cells)
PIGF	placentární růstový faktor (z angl. placental growth factor)
PPAR γ	receptory aktivované peroxizómovými proliferátory γ (z angl. peroxisome proliferator activated receptor γ)
PS	penicilin–streptomycin
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
TGF	transformující růstový faktor (z angl. transforming growth factor)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptory pro vaskulární endotelový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor receptor)
VPF	faktor indukující vaskulární permeabilitu (z angl. vascular permeability factor)

ÚVOD

Mezi moderní postupy léčby nejen diabetes mellitus 1. typu v současné medicíně patří transplantace inzulín produkující tkáně, a to buď ve formě transplantace celé slinivky břišní nebo transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků. Ostrůvky jsou transplantovány přímo do portální žíly jater, kde se usazují. Tento postup není optimální, protože během transplantace dochází k okamžité destrukci zhruba 50 % transplantovaných buněk vlivem hypoxie a zejména v důsledku rychlé nespecifické zánětlivé reakce zprostředkované krví. Dlouhodobě je štěp vystavený vysoké koncentraci živin, léků i toxinů přicházejících portální krví ze střeva. Řešením tohoto problému by mohlo být vytvoření umělé dutiny např. ve tvaru válce vyrobeného z polymerní síťoviny, který v kombinaci s teflonovou vložkou může vytvarovat požadovanou dutinu a poskytnout štěpu vhodné prostředí bez přímého kontaktu mezi ostrůvkem a krví příjemce. Výhodou této metody je, že je dutinu možné vytvořit do podkoží, a vyhnout se vstupu do portální žíly. Zárok je tedy pro pacienta mnohem méně invazivní. Vzhledem k tomu, že Langerhansovy ostrůvky jsou buňky velmi náročné na přísun kyslíku, ale zároveň je pro ně přímý kontakt s krví destruktivní, je potřeba vyřešit problém vaskularizace umělé dutiny. Toho je možné docílit přidáním mesenchymálních stromálních buněk do implantovaného skeletu a ovlivnit hojení tkáně žádoucím směrem (Fábryová *et al.*, 2014; Kříž *et al.*, 2010; Kříž *et al.*, 2012).

Mesenchymální stromální buňky mají mimo jiné i reparační schopnost. Prostřednictvím parakrinní signalizace buňky do okolí uvolňují biologicky aktivní látky jako například růstové faktory (VEGF, EGF aj.) nebo cytokiny, které přispívají ke snížení zánětu, podpory angiogeneze a zejména napomáhají procesu hojení ran (Maxson *et al.*, 2012; Mozaffari *et al.*, 2024).

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mesenchymální stromální buňky

Mesenchymální stromální buňky (MSC) jsou multipotentní nehematopoetické buňky mající schopnost sebeobnovy a diferenciaci (Amorin *et al.*, 2013). První zmínky o těchto buňkách se datují už do roku 1867, kdy německý patolog Julius Cohnheim objevil v kostní dřeni nehematopoetické kmenové buňky, ze kterých vznikají fibroblasty, které se zapojují do procesu hojení ran. O více než 100 let později v roce 1970 ruský vědec Alexander Friedenstein a jeho kolegové tyto buňky identifikovali jako buňky lišící se od krvetvorných buněk a že navíc mají potenciál se diferencovat do osteogenní buněčné linie. Označili je jako „buňky podobné fibroblastům“ (CFU–F). V roce 1987 Friedenstein v tomto výzkumu pokročil a prokázal, že jsou tyto buňky schopny diferencovat i do chondrogenní tkáně a potencionálně i do dalších typů buněk (jako jsou například adipocyty), což o rok později potvrdil. Zároveň se rozhodl tyto buňky přejmenovat na „bone marrow osteogenic stem cells“, což by se do češtiny dalo přeložit jako „osteogenní kmenové buňky kostní dřene“ (Stefaňska *et al.*, 2020; Hernigou, 2015). V roce 1999 se Marku Pittengerovi a jeho týmu povedlo vykultivovat *in vitro* z kostní dřene adipocyty, osteocyty a chondrocyty. (Pittenger *et al.*, 1999) Název mesenchymální stromální buňky poprvé použil v roce 1991 Arnold Caplan a ačkoli je tento název vědeckou společností běžně používán, někteří autoři se domnívají, že tento název není přesný a měl by být změněn (Caplan, 1991; Bianco *et al.*, 2008). Dokonce sám autor současného názvu od roku 2010 vydal několik publikací, ve kterých navrhuje přejmenování těchto buněk. Navrhuje název „Medicinal Signaling Cells“ (volně přeloženo do českého jazyka jako „léčebné signální buňky“), kvůli důrazu na mechanismus jejich léčebných účinků po transplantaci. Předpokládá se, že tento mechanismus je založen především na sekreci faktorů usnadňujících regenerační procesy (Caplan, 2010; Caplan, 2017).

S rozvojem znalostí a vývojem dalších možností využití MSC v regenerativní medicíně, začal stoupat zájem o tyto buňky v mnoha výzkumných laboratořích po celém světě. Vyvíjely se nové metody izolace buněk a výzkumné týmy přicházely s dalšími alternativami jejich využití. Současně s tím se ukázalo, že MSC nemají jeden specifický znak, podle kterého by se dalo určit, že se skutečně jedná o MSC. Využívá se tedy kombinace pozitivních a negativních markerů. Vzhledem k tomu, že každá vědecká skupina přistupovala k výzkumu a k charakterizaci MSC odlišně, bylo složité pokroky jednotlivých týmů porovnávat

a posouvat se tak dál v bádání (Dominici *et al.*, 2006; Horwitz *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2014). Na základě toho vydala společnost International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) v roce 2006 seznam kritérií, které buňky musí splňovat, aby mohly být označeny za MSC (Dominici *et al.*, 2006; Lv *et al.*, 2014):

1. Buňky musí být přilnavé k plastovým lahvím pro tkáňové kultury za standardních kultivačních podmínek.
2. Více než 95 % buněčné populace musí exprimovat povrchové antigeny CD105, CD73 a CD90, naopak méně než 2 % buněčné populace nesmí exprimovat povrchové antigeny CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 α nebo CD19 a HLA–DR.
3. Buňky musí být schopny *in vitro* diferenciaci na osteoblasty, chondroblasty a adipocyty.

1.1.1 Adheze buněk

Adheze buněk hraje významnou roli v buněčné komunikaci i regulaci řady buněčných procesů. Má také význam ve vývoji a udržování tkání. Pojem buněčná adheze označuje schopnost jedné buňky přilnout k jiné buňce nebo k extracelulární matrix, kterou během *in vitro* kultivace nahrazují kultivační lahve. Během *in vitro* adheze buňky podléhají morfologickým změnám. Adheze je zprostředkována integriny a povrchovými receptory (Khalili a Ahmad, 2015).

Tento proces je obvykle rozdělen do třech fází (Khalili a Ahmad, 2015):

- Fáze 1 – počáteční připojení buňky k substrátu a její zploštění
- Fáze 2 – buňka se rozšiřuje a reorganizuje aktinový cytoskelet
- Fáze 3 – buňka dosahuje maximální rozprostřené plochy a adheze je nejsilnější

V současné době lze ke kultivaci MSC využívat nanokompozity vyrobené ze syntetických i přírodních biomateriálů (Shotorbani *et al.*, 2017).

1.1.2 Fenotypická charakterizace MSC

Rozdíly v expresi povrchových znaků mohou být pozorovány nejen mezi různými druhy, ale také v rámci jednoho druhu. Tyto rozdíly jsou často důsledkem specifických vlastností tkáně, ze které byly MSC izolovány. Expresie markerů může být ovlivněna různými faktory, které se týkají jak samotného procesu izolace, tak i následné manipulace s buňkami. Například vystavení buněk enzymům, jako je trypsin během trypsinace, mohou ovlivnit expresi povrchových markerů. Dalším důležitým faktorem je typ použitého kultivačního média a přítomnost jeho specifických doplňků, které mohou modulovat jejich růst a diferenciaci buněk, a tím i změnit profil povrchových markerů. Je také potřeba brát v úvahu, že intenzita exprese těchto markerů je i závislá na metodě jejich detekce. Nejpoužívanější metodou stanovení povrchových znaků je průtoková cytometrie. Ovšem některé výzkumné laboratoře ale pro detekci využívají například metodu ELISA nebo polymerázovou řetězovou reakcí s reverzní transkripcí (Rojewski *et al.*, 2008).

V našem experimentu jsme povrchové markery na MSC stanovovali ve druhé a třetí pasáži pomocí specifických protilátek průtokovou cytometrií. Podrobnosti o principu této metody a našem přístupu, kterým jsme k charakteristice přistupovali je popsána dále v kapitole s názvem „Metodika“.

Přehled pozitivních a negativních povrchových markerů u MSC izolovaných z lidské a potkaní tukové tkáně a kostní dřeně jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 Porovnání exprese vybraných CD markerů na lidských a potkaních MSC; + ... pozitivní exprese; +/- ... pozitivní exprese s nízkou intenzitou; - ... negativní exprese

Marker	Název	Člověk		Potkan		Reference
		kostní dřev	tuková tkáň	kostní dřev	tuková tkáň	
CD29	integrin β -1	+	+	+	+	Boxall a Jones, 2012; Marycz <i>et al.</i> , 2016; Sachs <i>et al.</i> , 2012
CD31	adhezní molekula endotelových buněk krevních destiček 1	-	-	-	-	Boxall a Jones, 2012; Karaoz <i>et al.</i> , 2009; Maharlooei <i>et al.</i> , 2011; Sachs <i>et al.</i> , 2012; Vanchinathan <i>et al.</i> , 2015
CD34		-	+/-	-	-	Boxall a Jones, 2012; He <i>et al.</i> , 2018; Sachs <i>et al.</i> , 2012; Zaki <i>et al.</i> , 2020
CD44	P-glykoprotein 1	+	+	+	+/-	Bayati <i>et al.</i> , 2013; Boxall a Jones, 2012; Senbanjo a Chellaiah, 2017; Yang <i>et al.</i> , 2011
CD45	receptor tyrosinfosfatázy	-	-	-	-	Bayati <i>et al.</i> , 2013; Boxall a Jones, 2012; Hao <i>et al.</i> , 2017; Rheinländer <i>et al.</i> , 2018; Yang <i>et al.</i> , 2011
CD73	ekto-5'-nukleotidáza	+	+	+	+	Bayati <i>et al.</i> , 2013; Boxall a Jones, 2012; Chen <i>et al.</i> , 2019; Yang <i>et al.</i> , 2011
CD90	thymocytový diferenciační antigen 1	+	+	+	+	Bayati <i>et al.</i> , 2013; Boxall a Jones, 2012; Bunnell, 2021; Hao <i>et al.</i> , 2017; Kisselbach <i>et al.</i> , 2009
CD105	endoglin	+	+	+	+/-	Boxall a Jones, 2012; He <i>et al.</i> , 2018; Sachs <i>et al.</i> , 2012; Yang <i>et al.</i> , 2011

1.1.3 Diferenciace MSC

Jednou ze základních vlastností MSC je jejich více liniový potenciál. Obecně by se průběh diferenciace MSC dal shrnout do dvou kroků. V prvním kroku dochází k přeměně MSC na liniově specifické progenitory. Ve druhém se tyto progenitory diferencují na konkrétní buněčný typ. Oba tyto kroky jsou ovlivněny biologickými, chemickými a fyzikálními vlivy, které se vzájemně prolínají (Chen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2024):

- **Biologické vlivy**

Vlivem stárnutí dochází v kostní tkáni k posunu diferenciační rovnováhy mezi osteogenezí a adipogenezí. Důsledkem tohoto procesu je úbytek kostní hmoty. Dalším biologickým faktorem ovlivňujícím diferenciaci MSC patří metabolické procesy, jako například oxidační stres nebo metabolismus glukózy (Chen *et al.*, 2016).

Do biologických vlivů, ovlivňující nejen diferenciaci MSC, můžeme zařadit i proces zvaný senescence. Jedná se o buněčnou odpověď, která je charakterizována trvalou zástavou buněčného cyklu. To vede k nedostatečné proliferaci a diferenciaci, změnám exprese proteinů a chromozomové struktury (Weng *et al.*, 2022). Doposud jsou známy 4 typy stárnutí buněk:

- replikativní – dochází ke kritickému zkrácení telomer;
- stárnutí indukované onkogenem – závisí na aktivaci nebo nadměrné expresi onkogenů;
- stárnutí indukované stresem – v důsledku mnoha různých stimulací např. reaktivní kyslíkaté radikály, ionizační záření, osmotický stres, tepelný šok...;
- vývojové stárnutí – součást normálního vývojového procesu.

V procesu senescence MSC se uplatňují různé mechanismy, které se vzájemně ovlivňují. Mezi nejstudovanější mechanismy patří poškození DNA (vlivem například oxidačního stresu), zkracování telomer nebo snížená funkce mitochondrií. Obecně se délka života MSC kultivovaných *in vitro* pohybuje od 30 do 40 dělení (Weng *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2020).

- **Chemické vlivy**

Diferenciace je řízena různými cytokiny, růstovými faktory, transkripčními faktory a molekulami extracelulární matrix. *In vitro* diferenciace je závislá na složení diferenciačního média, které je charakteristické pro každý buněčný typ (Almaki a Agrawal, 2016).

- **Fyzikální vlivy**

Zároveň diferenciaci ovlivňuje i mechanické působení, a to zejména u tkání, jejichž buňky jsou pod vlivem cyklického mechanického namáhání v důsledku biologických rytmů, jako je například dýchání nebo průtok krve. Dalším fyzikálním vlivem je i místo, kde se MSC nacházejí. Tím, že se MSC vyskytují v různých tkáních, má na diferenciaci vliv i tuhost matrice, ve které buňky jsou (tužší matrice podporují myogenní diferenciaci, rigidní matrice osteogenní aj.) (Chen *et al.*, 2016).

Výše zmíněné faktory jsou pouze příklady těch, které se podílejí na ovlivňování diferenciaci MSC. Je důležité si uvědomit, že tyto vlivy neovlivňují pouze diferenciaci, ale i další procesy jako je například buněčná proliferace nebo sekreční vlastnosti MSC, a zároveň existují i další faktory, které mají vliv na jejich diferenciací kapacitu (například epigenetické faktory aj.).

MSC mají schopnost se diferencovat do různých typů buněk, které odpovídají třem základním embryonálním listům – mezodermu, ektodermu a endodermu. Nejjednodušší je diferenciaci do mezodermálních buněk, což je dáno tím, že MSC mají svůj původ v mezodermu během embryonálního vývoje. Za určitých přesně definovaných kultivačních podmínek a přidáním vhodných stimulů jako jsou například růstové faktory, jsou MSC schopny se diferencovat i do ektodermálních (neurony aj.) a endodermálních (hepatocyty, buňky pankreatu aj.) buněk. Tento proces, při kterém je popisována schopnost kmenových buněk diferencovat se do buněčných linií, které patří do jiných typů tkáně, než ve kterých původně sídlí, a to i do buněk pocházejících z různých zárodečných vrstev, se nazývá transdiferenciaci (Ding *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2024).

Transdiferenciaci zahrnuje genetické přeprogramování, při němž dochází k vypnutí některých genů a aktivaci jiných. V případě, že by tento proces probíhal moc rychle, mohly by být přechodně exprimovány produkty obou skupin genů naráz. Na druhou stranu, pokud by proces transdiferenciaci trval delší dobu, mohly by vznikat mezistupně, kdy by původní geny specifické pro daný typ buněk byly neaktivní a současně nové geny by ještě nebyly aktivovány. O skutečné transdiferenciaci lze hovořit až v okamžiku, kdy je trvale stanoven nový charakteristický fenotyp buňky (Krabbe *et al.*, 2005; Song a Tuan, 2004).

Jak už bylo výše zmíněno, nejjednodušeji se MSC diferencují do mezodermálních buněčných linií. Jedná se tedy nejčastěji o procesy adipogeneze, osteogeneze a chondrogenese:

- **Adipogeneze**

Adipogeneze je proces, při kterém se MSC zapojují do tukové linie a diferencují se na adipocyty. Tuková tkáň je volná pojivová tkáň, která je složená z velkého množství buněk, z nichž nejvíce zastoupené jsou adipocyty. Rozlišují se dva typy tukové tkáně – bílá a hnědá (Weger *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2020). Bílá tuková tkáň se dělí ještě na dva podtypy – subkutánní a viscerální. Subkutánní se nachází pod kůží a slouží k ukládání energie ve formě triacylglycerolů a při nedostatku energie uvolňuje mastné kyseliny. Jedná se o převládající tukovou tkáň u dospělých. Oproti tomu viscerální tuková tkáň obklopuje orgány a je metabolicky aktivnější (Mittal, 2019). Naopak hnědá tuková tkáň uvolňuje energii procesem termogeneze a nachází se hlavně u novorozenců (Sarjeant a Stephens, 2012; Tong *et al.*, 2000). Morfologicky se od sebe dají tyto tkáně jednoduše odlišit pomocí světelné nebo elektronové mikroskopie. Adipocyty bílé tukové tkáně mají kulovitý tvar a dosahují velikosti kolem 10 – 100 μm . Jejich orgány jsou utlačovány lipidovými kapénkami, které zabírají většinu cytosolu. Buňky obsahují malé množství mitochondrií. Jádro je vmáčknuté mezi lipidové kapénky a plazmatickou membránu. Oproti tomu adipocyty z hnědé tukové tkáně jsou menší. Dosahují velikosti 15 – 50 μm a mají elipsovité tvar. Jádra těchto buněk jsou centralizovaná v cytoplazmě a ostatní orgány jsou klasicky přítomné v normální velikosti. Tyto buňky jsou bohaté na mitochondrie. Hnědá tuková tkáň je dobře vaskularizovaná a inervována sympatickým nervovým systémem (Sarjeant a Stephens, 2012).

Adipogeneze je komplexní proces, během kterého dochází nejprve k závazku kmenových buněk k diferenciaci do preadipocytů. Preadipocyty se následně přestanou proliferovat, začnou akumulovat lipidové kapénky a vyvinou se morfologicky i biochemicky do zralých adipocytů. Nejvýznamnějšími transkripčními faktory, které se podílí na diferenciaci MSC do adipocytů jsou PPAR γ a C/EBP. PPAR γ má 2 izoformy (PPAR γ 1 a PPAR γ 2), které se podílí na adipogenezi. PPAR γ 2 se v procesu uplatňuje již v nižších koncentracích, než PPAR γ 1. C/EBP se v procesu uplatňuje v časných stádiích. Zvyšuje se exprese izoform C/EBP β a C/EBP δ , což zvyšuje expresi C/EBP α a PPAR γ . Mezi další efekторы adipogeneze patří Krüppelům podobné faktory (KLF). Některé formy KLF pozitivně ovlivňují adipogenezi (např. KLF 4, 5, 6 nebo 15), některé formy naopak diferenciaci do adipocytů inhibují (např. KLF 2, 3 nebo 7). Do negativních efektorů adipogeneze lze zařadit i GATA transkripční faktor, který potlačuje expresi PPAR γ 2. GATA má 6 členů (GATA 1–6), na inhibici adipogeneze se podílí zejména GATA 2 a GATA 3. Tyto transkripční faktory jsou exprimovány v preadipocytech, které jsou přítomny v bílé tukové tkáni. Adipogeneze je

taktéž regulována signálními drahami jako například Wnt/ β -kateninová dráhou nebo HH signální dráhou (Sarjeant a Stephens, 2012; Zhang *et al.*, 2020).

In vitro diferenciaci probíhá v kultivačním médiu obsahující různé látky, které jsou do média přidávány za účelem podpory adipocytární diferenciaci. Konkrétně se jedná například o isobuthylmethylxantin (IBMX) – aktivuje C/EBP β , indometacin – aktivuje PPAR γ , dexamethason nebo inzulin. Ke znázornění morfologických změn adipocytů se běžně využívají lipidové vakuoly, které mohou být obarveny například olejovou červení. Dále se k potvrzení diferenciaci používá protilátka proti mFABP4 (anti-mFABP4), která slouží jako specifický marker pro tento typ buněk (Chamberlain *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2009; Liu, 2024).

- **Osteogeneze**

Osteogeneze je souhrnný název pro celý proces tvorby nové kosti od diferenciaci MSC až po tvorbu a mineralizaci kostní matrix – osifikace. Osifikace se obecně dělí na dva základní typy – intramembranózní a endochondrální. Intramembranózní osifikace neboli osifikace přímá, probíhá především v plochých kostech lebky a částečně i v klíčních kostech. Tento proces začíná kondenzací MSC, ze kterých se v přítomnosti osteoprogenitorů stanou osteoblasty. Zralé osteoblasty se následně mohou stát buňkami kostní výstelky, vyvinout se v osteocyty nebo podléhají apoptóze. Druhým typem osifikace je endochondrální osifikace neboli nepřímá. Ta probíhá v dlouhých kostech, obratlech, v bázi lební a v zadní části lebky. Na rozdíl od prvního typu osifikace, tento typ spočívá v tom, že se MSC nejprve diferencují na chrupavku, která je později nahrazena kostí (Valenti *et al.*, 2017).

Pro osteogenní diferenciaci je stěžejní transkripční faktor Runx2, který indukuje diferenciaci MSC nejprve na proosteoblasty a dále až na osteocyty. Tento transkripční faktor dále inhibuje adipogenní a chondrogenní diferenciaci MSC. Mezi další významné transkripční faktory patří osterix. V jeho nepřítomnosti nedochází k tvorbě kosti intramembranózní a ani endochondrální osifikací (Almaki a Agrawal, 2016).

Osteogenní diferenciaci MSC je regulována dvěma klíčovými signálními cestami – BMP a Wnt. Na počátku BMP signalizace jsou aktivovány SMAD proteiny, které řídí expresi genu pro Runx2, který je hlavním transkripčním faktorem pro osteogenezi. Aktivace Wnt signální dráhy indukuje expresi osterixu a potlačuje transkripční faktor PPAR γ , který je hlavním transkripčním faktorem adipogeneze. Tento typ regulace se nazývá nekanonická signální dráha. Wnt také reguluje expresi Runx2, a to pomocí kanonické signální dráhy, která působí

buď stimulačně nebo supresivně v závislosti na úrovni diferenciaci progenitorových buněk (Almaki a Agrawal, 2016; Mahajan a Bhattacharyya, 2023; Valenti *et al.*, 2017).

In vitro lze diferencovat MSC do osteocytů v kultivačním médiu obohaceném o látky typu dexamethason, β -glycerolfosfát, vitamin D nebo fosfát kyseliny askorbové. Takto diferencované osteocyty se poté dají znázornit pomocí specifické protilátky proti osteokalcinu (anti-osteokalcin). Charakteristické také pro tyto buňky je akumulace vápníku v cytoplazmě a zvýšená aktivita alkalické fosfatázy (Almaki a Agrawal, 2016; Chamberlain *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2009).

- **Chondrogeneze**

Chondrogeneze je proces vzniku chrupavky po kondenzaci raných mesenchymálních tkání za vzniku vyvíjejícího se chrupavčitého skeletu. Chrupavka je tenká vrstva husté tkáně bez nervů, krevních cév a lymfy, která se nachází na koncích kostí v kloubech. Tato vrstva zabraňuje přímému kontaktu mezi kostmi a spolu se synoviální tekutinou umožňuje hladký pohyb kostí. Součástí kloubní chrupavky, jsou kromě chondrocytů (nativní buňky chrupavky), ještě složky extracelulární matrix jako například kolagen (zejména kolagen typu II) a proteoglykany (nejzastoupenější je agrekan) (Barter *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2021).

V procesu chondrogeneze nejprve dochází ke shlukování MSC. Tyto shluky jsou poté schopny diferenciaci na chondroprogenitorové buňky a až následně na chondrocyty. Během procesu zvaném endochondrální osifikace se chondrocyty stávají hypertrofickými a následně podlehnou apoptóze. To umožňuje nahrazení chondrocytů osteoblasty, tedy výměnou chrupavčité tkáně za tkáň kostní. Tyto jevy jsou přirozené v období vývoje a růstu, hypertrofie chondrocytů ale také může být nežádoucí například při osteoartróze (Chen *et al.*, 2021).

Klíčovým regulačním faktorem chondrogeneze je SOX9 (protein SRY-box 9), který inhibuje hypertrofii chondrocytů a udržuje jejich fenotyp. Obsahuje 509 aminokyselin a má význam hlavně v počátečních fázích chondrogeneze. V pokročilejších fázích spolupracuje s proteiny SOX5 a SOX6. Na hypertrofickém zvratu chondrocytů se již nepodílí. Zde se využívá další faktor Runx2, hlavní transkripční faktor osteogeneze, který podporuje endochondrální osifikaci. Dalším růstovým faktorem je BMP. BMP se podílí na udržování homeostázy chrupavky a hraje klíčovou roli v regulaci její diferenciaci. Dále také ovlivňuje endochondrální osifikaci. Tento proces probíhá prostřednictvím přenosu signálu z receptorů

na plazmatické membráně buněk do jádra, přičemž signál je zprostředkován pomocí SMAD proteinů (Chen *et al.*, 2021; Mamachan *et al.*, 2024; Song a Park, 2020).

Tyto růstové a transkripční faktory pro růst a vývoj chondrocytů jsou regulovány signálními cestami, mezi které patří například Wnt/ β -kateninová dráha (kanonická), NOTCH (Neurogenic Locus Notch Homolog Protein), RhoA/ROCK nebo TGF β signální dráha (Mamachan *et al.*, 2024).

In vitro diferenciaci probíhá v kultivačním médiu, které je obohacené o různé látky, jako je dexamethason, kyselina askorbová, TGF β (různé izoformy – 1, 2, 3 nebo kombinace), BMP, FGF a IGF. Diferenciaci je dále podpořena tím, že jsou buňky pěstovány v těsném kontaktu, ve formě pelet. Lze je znázornit specifickou protilátkou proti agrekanu (anti-hAggrecan) (Chamberlain *et al.*, 2007; Hwank *et al.*, 2009; Vater *et al.*, 2011).

1.2 Zdroje MSC

Jako první byly MSC izolovány z kostní dřeně. Tento typ odběru buněk je ale pro dárce velmi bolestivý, může ho doprovázet krvácení a riziko infekce. Z tohoto důvodu byla veškerá pozornost vědců přenesena k hledání alternativních zdrojů MSC. Jako další volbou pro odběr MSC se ukázala být tuková tkáň. Buňky jsou v tukové tkáni dostupnější, je jich možné izolovat více a odběr je pro pacienta mnohem méně invazivní. Dalo by se tedy říct, že je tuková tkáň mnohem lepší volbou pro odběr MSC než kostní dřeň. Postupem času se MSC povedlo izolovat i z jiných tkání jako například z plicní tkáně, srdce, periferní krve nebo zubní dřeně. Ukázalo se, že je možné MSC izolovat i ze tkání plodu třeba z tkáně pupeční šňůry (jinak nazývané Whartonův rosol), plodové vody nebo pupečnickové krve. Vzhledem k nezralosti MSC z těchto tkání, má tato buněčná populace mnohem větší potenciál v terapeutických aplikacích. Dalo by se tedy říct, že MSC mohou být izolovány prakticky ze všech tkání. Kvůli snadnému odběru, jejich množství a téměř neomezenému spektru tkání, které mohou být zdrojem těchto buněk, patří tyto buňky mezi nejpraktičtější pro experimentální a možné klinické aplikace. MSC lze ale také získat *in vitro* diferenciací pluripotentních buněk jako například embryonálních kmenových buněk nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk (Ambrosio *et al.*, 2015; Berebichez-Fridman a Montero-Olvera, 2018; Hass *et al.*, 2011; Kobolak *et al.*, 2016).

Pro náš experiment jsme jako zdroj MSC zvolili tukovou tkáň z několika důvodů:

- Získání tukové tkáně je mnohem jednodušší než získat například kostní dřeň.
- V navazujícím experimentu budou polymerní skelety implantované do podkožního tuku.
- Tuková tkáň je osvědčeným a používaným zdrojem MSC v Laboratoři Langerhansových ostrůvků v IKEM.

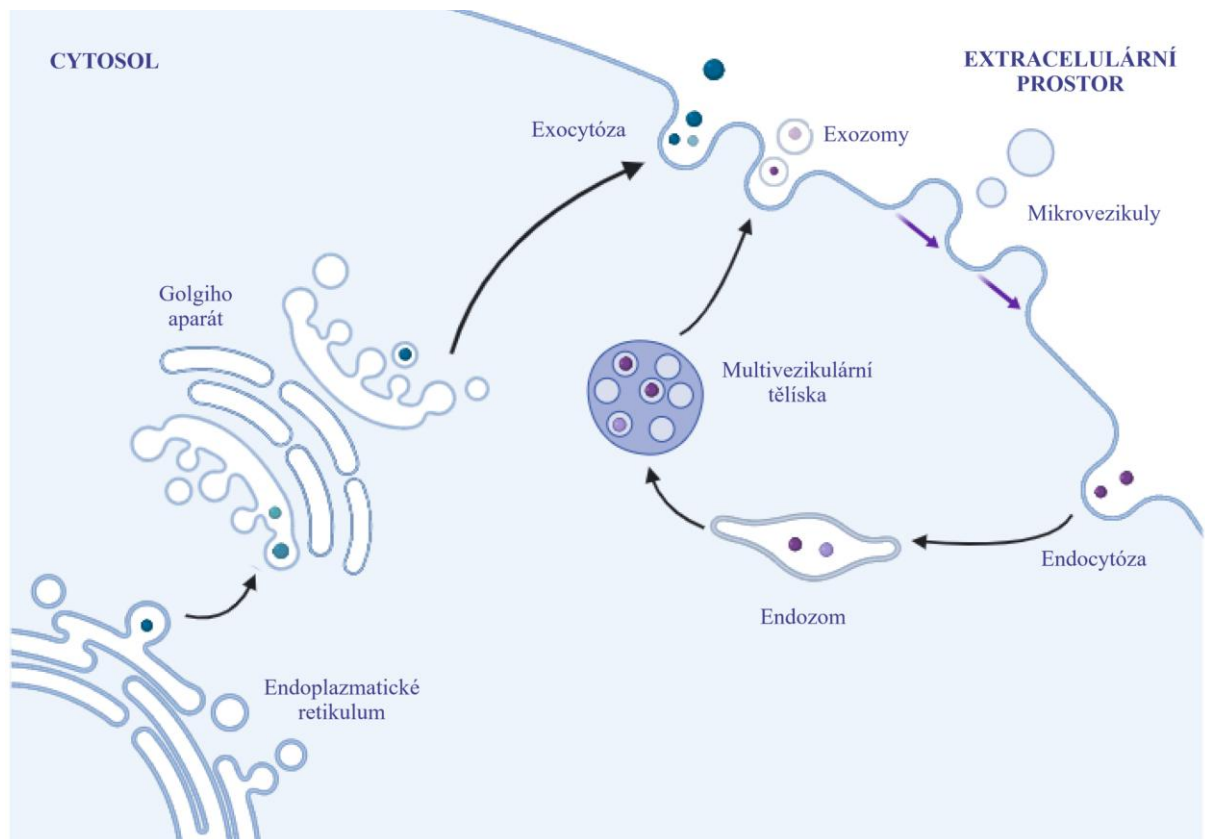
1.3 Sekretom MSC

MSC produkují mnoho rozpuštěných bioaktivních látek. Toto spektrum ochranných bioaktivních látek se nazývá sekretom. Sekretom má dvě složky – rozpustnou a nerozpustnou. Mezi rozpustné složky sekretomu řadíme různé cytokiny, chemokiny, růstové faktory a další. MSC mohou prostřednictvím těchto látek například modulovat imunitní systém. Jsou schopny ovlivňovat reakce vrozené i adaptivní imunity v závislosti na působení různých podnětů prostřednictvím kontaktu mezi buňkami. Je ovšem důležité zmínit, že tyto imunomodulace nejsou trvalé, MSC mohou v závislosti na charakteru mikroprostředí zvyšovat nebo snižovat svoji aktivitu. MSC zároveň mohou také prostřednictvím produkce těchto bioaktivních látek podporovat neovaskularizaci a hojení poraněných tkání (např. produkce vaskulárního endotelového růstového faktoru nebo destičkového růstového faktoru) (Eleuteri a Fierabracci, 2019; González-González *et al.*, 2020; Prado-Yupanqui *et al.*, 2025).

Do nerozpustné složky sekretomu řadíme extracelulární vezikuly. Extracelulární vezikuly představují sofistikovaný komunikační systém pro buňky. Jsou vylučovány různými typy buněk, nalezneme je tak ve většině tělesných tekutinách. Jsou tedy tkáňově specifické. Zapouzdřují mnoho bioaktivních molekul – proteiny, lipidy, organely a nukleové kyseliny (mikro RNA, nekódující RNA, jedno i dvou řetězcovou DNA, mitochondriální DNA...). (Kou *et al.*, 2022) Podle původu jsou klasifikovány jako mikrovezikuly a exozomy. Liší se od sebe zejména velikostí. Exozomy jsou větší, měří zhruba 50–1000 nm. Oproti tomu mikrovezikuly dosahují velikosti pouze 40 – 120 nm. Mikrovezikuly a exozomy mohou být z buňky vyloučeny buď klasickými nebo neklasickými mechanismy (viz Obrázek 1). Klasický mechanismus spočívá v transportu nově syntetizovaných proteinů do lumen endoplazmatického retikula. Zde proteiny prochází posttranslačními modifikacemi a následně jsou tyto modifikované proteiny transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou zpracovány do finální podoby. Odsud jsou poté proteiny uvolněny exocytózou do extracelulárního prostoru. Během neklasických procesů jsou molekuly uvolněny bez modifikací v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu přes buněčnou membránu nebo zapouzdřením v extracelulárních vezikulách (Eleuteri a Fierabracci, 2019; González-González *et al.*, 2020; Kou *et al.*, 2022; Prado-Yupanqui *et al.*, 2025).

Využití sekretomu MSC představuje inovativní alternativu k transplantaci buněk. Jeho transplantační působení je založeno spíše na uvolňování bioaktivních faktorů než na integraci buněk do cílové tkáně. Tato strategie obchází omezení spojená se skladováním a manipulací s životaschopnými buňkami. Výhodou použití sekretomu je minimalizace rizika imunitní

rejekce, čímž dochází k výraznému zvýšení bezpečnosti léčby. Zároveň je složení sekretu výrazně ovlivněno různými podněty přítomnými v mikroprostředí, což nám umožňuje upravit jej tak, aby lépe vyhovoval konkrétním terapeutickým cílům. Dalším benefitem je možnost aplikace bez nutnosti invazivních zákroků nutných k izolaci buněk, což zjednodušuje celý terapeutický proces (González-González *et al.*, 2020; Múzes a Sipos, 2022; Prado-Yupanqui *et al.*, 2025).



Obrázek 1 Znáornění klasických a neklasických intracelulárních mechanismů (obrázek byl přeložen a upraven; Prado-Yupanqui *et al.*, 2025)

1.4 Vaskulární endotelový růstový faktor

Vytvoření cévního systému je klíčovým předpokladem pro embryogenezi a zahrnuje dva základní procesy – vaskularizaci a angiogenezi. Vaskularizace je proces, při kterém vznikají nové krevní cévy z progenitorových buněk endotelu. Oproti tomu angiogeneze je proces, při kterém se nové krevní cévy vytváří z již existujících cév. Tento proces vede k rozšíření cévní sítě (Holmes a Zachary, 2005; Liu *et al.*, 2023; Otrrock *et al.*, 2007). Angiogenní proces je vysoce komplexní a je regulován řadou proangiogenních a antiangiogenních faktorů. Hlavním faktorem, který se na tomto procesu podílí je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF). (Bao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2023) V současné době je u lidského VEGF známo 5 izoform: VEGF–A, VEGF–B, VEGF–C, VEGF–D a placentární růstový faktor (PlGF) (Melincovici *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2018).

Všechny izoformy VEGF vykonávají svou biologickou aktivitu prostřednictvím interakce s receptory (VEGFR; viz Obrázek 2). Tyto receptory se nachází na různých typech buněk. VEGFR1 je jinak označován jako Flt–1 a nachází se obvykle na vaskulárních endoteliálních buňkách nebo například na hematopoetických kmenových buňkách. VEGFR2 označovaný také jako KDR (u myši jako Flk–1). Tento receptor je obvykle exprimován na vaskulárních a lymfatických endoteliálních buňkách. Posledním významným receptorem je VEGFR3, známý také jako Flt–4, který je obvykle exprimován na lymfatických buňkách (Hickling a Ellis, 2005; Melincovici *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2018; Shibuya, 2012).

Spolu s receptory se na vazbě VEGF podílí koreceptory. Nejdůležitější jsou koreceptory neuropilin 1 a neuropilin 2 (Nrp–1 a Nrp–2). Tyto koreceptory jsou exprimovány zejména na neuronech (Hickling a Ellis, 2005; Holmes a Zachary, 2005).

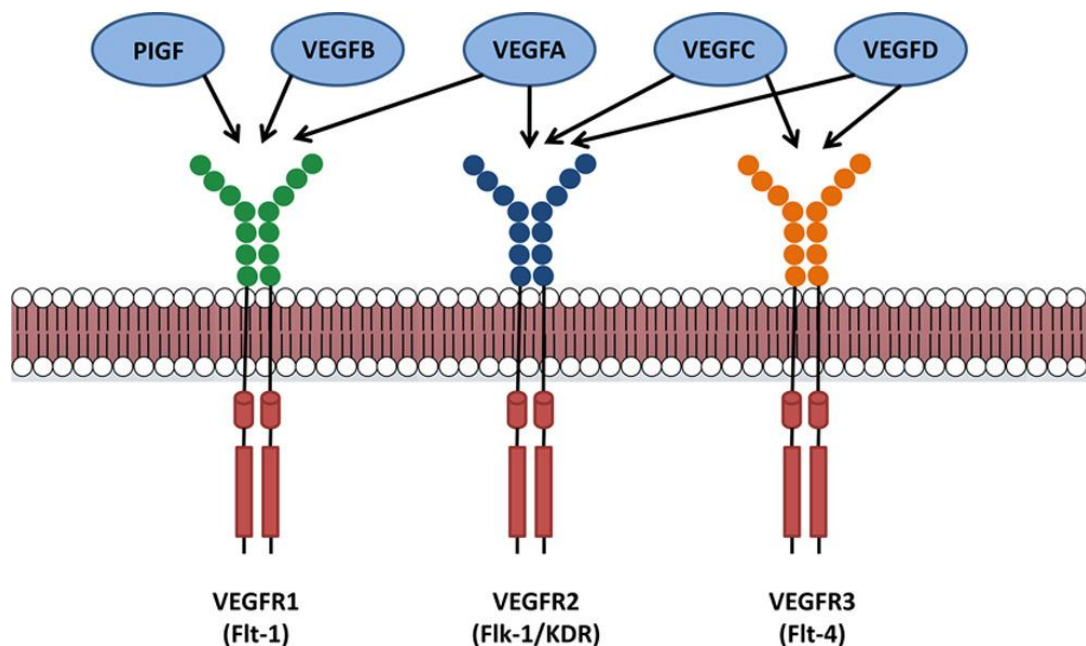
VEGF–A je obvykle zjednodušeně označován jen jako VEGF. Byl poprvé identifikován jako faktor indukující vaskulární permeabilitu (VPF) na počátku 80. let. Hraje důležitou roli při vaskularizaci, angiogenezi a podpoře cévní permeability. Gen *VEGF–A* prochází alternativním stříhem za vzniku zralých izoform nejčastěji v sekvencích 121, 165, 189 a 206 aminokyselin. Méně často se pak může vyskytovat ještě navíc v sekvencích 145 a 183 aminokyselin. VEGF₁₂₁ je volně vylučován, oproti tomu VEGF s větším množstvím aminokyselin (VEGF₁₈₉ a VEGF₂₀₆) musí být aktivovány rozštěpením proteázami. Jeho exprese je časově a prostorově spojena s klíčovými událostmi ve fyziologické, ale i patologické vaskularizaci a angiogenezi (Hickling a Ellis, 2005; Hu a Olsen, 2017; Melincovici *et al.*, 2018; Shibuya, 2012).

Funkce VEGF–B zůstává dosud nedostatečně prozkoumána (Shi *et al.*, 2025).

VEGF–C a VEGF–D jsou hojně exprimovány v embryonálních tkáních, kde regulují angiogenezi. U dospělých se už tolik v procesu angiogeneze neuplatňují, jsou exprimovány zejména v srdci, vaječnicích a placentě, kde fungují spíše jako regulátory lymfangiogeneze. Oba jsou produkovány ve formě prekurzorů a poté jsou štěpeny proteázami (Melincovici *et al.*, 2018; Shibuya, 2012).

Jak už je z názvu patrné, PlGF je exprimován v placentě a hraje důležitou roli v růstu a diferenciaci trofoblastů. Pro zajištění dostatečného prokrvení je nezbytná adekvátní invaze trofoblastů do děložní stěny. Pokud k tomuto nedojde, může to v pozdějších fázích těhotenství způsobit preeklampsii a zpomalení růstu plodu (Melincovici *et al.*, 2018; Patel a Yulia; 2022).

U potkanů jsou receptory i funkce jednotlivých izoforem VEGF velmi podobné těm lidským. Díky této vysoké míře podobnosti je možné provádět experimenty na potkanech s očekáváním, že výsledky budou do značné míry přenositelné na lidské modely (Li *et al.*, 2017).



Obrázek 2 Znáornění izoforem VEGF a jejich vazby na specifické receptory (Pandey *et al.*, 2018)

Existují i další izoformy VEGF, které se ovšem v lidských tkáních nevyskytují. VEGF-E Virus Orf, rodu *Parapoxvirus* způsobuje lokalizované proliferativní kožní léze u lidí a kopytníků. Tato infekce začíná v regenerující se epidermis poraněné kůže a léze postupují do stádií erytému, papule, vezikuly, pustuly a poté tvorby strupu. Také má schopnost indukovat proliferaci endoteliálních buněk, vaskulární permeabilitu a angiogenezi. Tyto biologické funkce VEGF-E jsou zprostředkovány výhradně jeho interakcí s receptorem VEGFR-2, na receptory VEGFR-1 a VEGFR-3 se neváže (Wise *et al.*, 2012).

VEGF-F je součástí hadího jedu. Se savčími VEGF má společnou strukturu, je schopný indukovat vaskulární permeabilitu, snižuje krevní tlak a také podporuje angiogenezi. Povedlo se izolovat několik členů skupiny VEGF-F. Jedním z členů je například Vammin izolovaný z jedu hada *Vipera ammodytes*. Dále třeba VR-1 izolovaný z jedu hada *Daboia russelli russelli*. Oba se specificky váží na KDR receptory s velmi vysokou specifitou. Dalšími zástupci jsou například Tf-svVEGF (z jedu hada *Trimeresurus flavoviridis*) a Pm-VEGF (z jedu hada *Protobothrops mucrosquamatus*). Tito zástupci se přednostně vážou na Flt-1 receptory (Toivanen *et al.*, 2017; Yamazaki *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2009).

1.5 Možnosti stimulace produkce VEGF

1.5.1 Hypoxie

Strukturální a funkční mikroprostředí ve tkáních, kde sídlí kmenové buňky se nazývá jako nika kmenových buněk. V těchto nikách se mimo jiné také liší parciální tlak kyslíku (pO_2), který zachovává identitu a funkční charakteristiku těchto buněk. Pro představu v kostní dřeni se pO_2 pohybuje v rozmezí 1 – 7 %, v tukové tkáni v rozmezí 3 – 10 % pO_2 . Obvykle jsou ale MSC kultivovány za atmosférických hladin kyslíku (tzn. 21 % pO_2). Pro tuto hladinu kyslíku se používá termín normoxie (Bahir *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2013). Naopak stav, kdy je snížený přívod kyslíku do tkání nebo celého organismu je označován termínem hypoxie. (Ramakrishnan *et al.*, 2014) Lze tedy říct, že hladiny kyslíku v rozmezí 1 – 10 % pO_2 jsou fyziologické. Hladiny kyslíku pod 1 % pO_2 jsou označovány za patologické, ohrožují buněčný metabolismus a mohou způsobit i smrt buněk (Hadjipanayi *et al.*, 2010).

Klíčovou adaptativní reakcí eukaryot na hypoxické podmínky je stabilizace hlavního transkripčního faktoru – hypoxií indukovaný faktor (HIF). HIF je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek – podjednotky α a β . Podjednotka β je biosyntetizována, degradována a recyklována neustále (tedy za normoxických i hypoxických podmínek). Oproti tomu

podjednotka α je indukovaná hypoxií. Podjednotka α má ještě další 3 podjednotky – HIF-1 α , HIF-2 α a HIF-3 α . Podjednotky HIF-1 α a HIF-2 α mají podobnou aminokyselinovou sekvenci a proteinovou strukturu. Zároveň kódující geny pro HIF-2 α mají omezenější expresi než kódující geny pro HIF-1 α . Současně podjednotka HIF-1 α vyžaduje ke své stabilizaci velmi nízké hladiny kyslíku (1 – 5 % pO₂), kdežto podjednotce HIF-2 α stačí slabé hypoxie (do 5 % pO₂). Vyplývá z toho, že by podjednotka HIF-1 α působila v počátečních odpovědích na hypoxii, kdežto podjednotka HIF-2 α by se uplatňovala v dlouhodobějším období hypoxie. Poslední podjednotkou je HIF-3 α , která působí inhibičně proti předchozím dvěma podjednotkám tak, že brání jejich dimerizaci s β podjednotkou (Hirsilä *et al.*, 2005; Pulido-Escribano *et al.*, 2022; Ramakrishnan *et al.*, 2014; Teti *et al.*, 2018).

Za normoxie jsou HIF-1 α a HIF-2 α , sice syntetizovány, ale ihned také degradovány. Dochází k hydroxylaci v tzv. degradační doméně. Hydroxylace probíhá skupinou enzymů zvané prolylhydroxylázy. Tyto enzymy pro svoji aktivitu vyžadují kofaktory například α -ketoglutarát, askorbát a Fe²⁺ ionty. Hydroxylace obvykle u lidí probíhá na dvou prolinových zbytcích, a to pro HIF-1 α na P402 a P564, u HIF-2 α na P405 a P531. Po hydroxylaci dochází k vazbě na von Hippel–Lindau protein, který je součástí E₃ ubikvitin–ligázového komplexu. Následně jsou degradovány v proteazomu (Hirsilä *et al.*, 2005; Muñoz-Sánchez a Chánez-Cárdenas, 2019; Pulido-Escribano *et al.*, 2022; Teti *et al.*, 2018). Za hypoxie je hydroxylace inhibována, nedochází tedy ani k vazbě na von Hippel–Lindau protein a tím pádem nedochází k degradaci HIF-1 α a HIF-2 α . Přesouvají se tedy do jádra, kde se dimerizují s HIF-1 β a HIF-2 β a tím se stává HIF- α stabilní. Tento proces probíhá zejména v hypoxickém prostředí, ovšem v omezené míře k ní dochází i během normoxie. Tento dimer je transkripčně aktivní, vstupuje do jádra, kde iniciuje transkripci genů, které jsou citlivé na hypoxii (např. VEGF nebo erythropoetin) (Arfianti *et al.*, 2023; Bahir *et al.*, 2020; Muñoz-Sánchez a Chánez-Cárdenas, 2019; Teti *et al.*, 2018).

Některé laboratoře tedy začaly používat modely vyvolání hypoxie, aby získaly lepší představu o chování buněk v těle. Optimálním modelem hypoxie je hypoxie vyvolaná nízkým obsahem O₂ například v hypoxické komoře. Problémem ale je, že hypoxické komory nebo termostaty s řízeným přístupem O₂ jsou velmi nákladné. Z tohoto důvodu se zavedl model chemicky indukované hypoxie. V tomto modelu se místo hypoxických komor využívají mimetika, která jsou přidávána do kultivačního média k buňkám a blokují degradaci HIF-1 α . Přídavek mimetik je tedy levnějším způsobem, jak v buňkách indukovat reakce charakteristické

pro život v hypoxickém prostředí. Mezi nepoužívanější mimetika navozující modelovou hypoxii se řadí chlorid kobaltnatý (CoCl_2), dimethyloxaloglycin nebo deferoxamin. Konkrétně CoCl_2 funguje tak, že se Co^{2+} ionty váží místo Fe^{2+} do aktivního místa prolylhydroxyláz a tím blokuje jejich aktivitu (Muñoz-Sánchez a Chánez-Cárdenas, 2019; Teti *et al.*, 2018). Chemicky indukovaná hypoxie se od hypoxie vyvolané sníženým obsahem O_2 liší. Například CoCl_2 ovlivňuje transkripci genů, které nejsou aktivovány skutečnou hypoxií, dále také indukují oxidativní stres prostřednictvím tvorby volných kyslíkových radikálů, čímž regulují další geny nezávisle na HIF. Chemicky indukovaná hypoxie tak nepředstavuje plnohodnotnou náhradu fyziologické hypoxie, nicméně je dostatečná pro sledování buněčné proliferace, diferenciaci a indukci exprese vybraných růstových faktorů (Arfianti *et al.*, 2023; Muñoz-Sánchez a Chánez-Cárdenas, 2019; Teti *et al.*, 2018).

Za objasnění mechanismů, díky kterým se buňky dokážou přizpůsobit rozdílným hladinám kyslíku, získali v roce 2019 vědci Gregg Semenza, Peter Ratcliffe a William Kaelin Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství (Lee *et al.*, 2020).

1.5.2 Genetické modifikace

Geneticky upravené MSC mohou zvýšit produkci VEGF, zlepšit svou životaschopnost a tím zlepšit svůj terapeutický potenciál v oblasti regenerativní medicíny. Pro dosažení cílené změny v genové expresi MSC se využívá více strategií genetického inženýrství. Mezi nejběžnější a nejúčinnější přístupy patří použití genetických vektorů, které slouží k přenosu specifických genů – v tomto případě genu kódujícího VEGF – do genomu MSC. Tyto vektory mohou být buď virové nebo nevirové. Virové jsou v současné době využívanější, a to i přes rizika, která s používáním souvisí. Mají sice vysokou účinnost při přenosu genetické informace, avšak jsou velmi drahé a existuje velké riziko vzniku nechtěných imunitních reakcí. Využívají se nejčastěji adenoviry nebo lentiviry. Oproti tomu nevirové vektory nejsou tolik účinné, proto nejsou tolik využívané. Výhodou jejich používání je ale biologická bezpečnost. Nevirové vektory lze rozdělit ještě na chemické a fyzikální. Mezi chemické vektory patří například systémy na bázi polymerů nebo lipidů. Fyzikální vektory využívají principy jako elektroporace nebo sonoporace (Damasceno *et al.*, 2020; Nie *et al.*, 2020; Varkouhi *et al.*, 2020).

Mezi novější metody modifikace genové exprese vedoucí ke stimulaci produkce VEGF je metoda CRISPR/Cas9 (Chen *et al.*, 2022; Zhong *et al.*, 2024). Zjednodušeně se jedná o komplex tvořený nukleázou Cas9 a vodící RNA (gRNA). Metoda začleňuje fragmenty cizí

DNA (tzv. spacers), které jsou zpracovány za účelem vytvoření vodící RNA (gRNA). Cas proteiny zase poskytují enzymatický aparát potřebný pro získávání nových zacílených spacerů. Tento komplex poté vytváří cílově specifický zlom v genomu, do kterého je následně možné vložit novou genovou sekvenci. Je potřeba programovatelně sekvenčně specifické endonukleázy k vytvoření zlomů v přesně definovaných místech. Pro usnadnění vytvoření těchto vysoce specifických zlomů byly již dříve vytvořeny různé nástroje např. transkripční aktivátorová efektorová nukleáza nebo meganukleázy (Hillary a Ceasar, 2023; Varkouhi *et al.*, 2020).

Tuto metodu lze také spolehlivě použít i pro potlačení exprese genu *VEGF* (Chung *et al.*, 2022).

Za klíčové objevy v oblasti manipulace s DNA v rámci systému CRISPR/Cas9 získaly v roce 2020 vědkyně Emmanuelle Charpentier a Jennifer Doudna Nobelovu cenu za chemii (Gostimskaya, 2022).

1.6 Metodika

1.6.1 Biologický materiál

Pro náš experiment jsme použili inbrední kmen potkana Lewis, který se osvědčil jako spolehlivý experimentální model a je běžně používán v Laboratoři Langerhansových ostrůvků v IKEM. Potkani pocházeli od akreditovaného dodavatele Velaz–Charles River. Během fáze adaptace na chovné podmínky až do použití v experimentu byla zvířata umístěna v konvenčním chovu akreditovaného uživatelského zařízení IKEM – Centra experimentální medicíny. Toto centrum splňuje normy stanovené zákonem na ochranu zvířat před týráním. Všechny činnosti s pokusnými zvířaty byly schváleny Odbornou komisí pro zajištění dobrých životních podmínek pokusných zvířat IKEM a také resortní komisí Ministerstva zdravotnictví České republiky. Při pokusu byly dodrženy operační standardy dle akreditace pracoviště v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, tak aby byla zajištěna maximální pohoda a dobrý zdravotní stav pokusných zvířat.

1.6.2 Izolace mesenchymálních stromálních buněk z tukové tkáně

MSC lze z tukové tkáně izolovat dvěma metodami – enzymaticky nebo neenzymaticky. Obě metody vychází z čerstvě odebrané tukové tkáně. Enzymatická metoda spočívá v inkubaci tukové tkáně s enzymem. Nejběžněji je používána kolagenáza, kterou jsme i my v našem experimentu využili. Dochází k rozvolnění tkáně na jednotlivé buňky nebo malé buněčné agregáty. Následně je potřeba oddělit od buněk odpadní materiál (například zbývající enzym, krevní buňky nebo zbývající tuk, který se nerozštěpil atd.). Tento krok jsme prováděli centrifugací v hustotním gradientu. Následně jsou oddělené buňky přeneseny do kultivačních lahví s kultivačním médiem a kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a řízené 5% koncentraci CO₂. Nevýhodou enzymatické metody může být potenciaální poškození buněk enzymem, což může vyvolat změnu jejich vlastností. Naopak výhodou je vyšší množství buněk získaných z tkáně (Ferroni *et al.*, 2022; Mushahary *et al.*, 2017; Pharoun *et al.*, 2024).

Oproti tomu neenzymatická metoda spočívá ve spontánní migraci MSC z tukové tkáně do okolí. Nejprve dochází k oplachu tkáně, aby došlo k co největšímu vymytí krvinek. Následně je tkáň obvykle nakrájena na malé kousky velikosti několika milimetrů, kvůli lepšímu průchodu živin a plynů ke všem buňkám. Kousky tkáně jsou poté umístěny do kultivačních misek s malým množstvím kultivačního média tak, aby vzorky neplavaly. Po několika dnech kultivace v CO₂ inkubátoru lze kousky tkáně z misek vyndat. Podle některých studií tato technika produkuje buněčnou populaci, která je více homogenní, buňky

vykazují vyšší rychlost proliferace a lepší životaschopnost (Ghorbani *et al.*, 2014; Mushahary *et al.*, 2017; Pharoun *et al.*, 2024).

Úskalím těchto technik je, že protokoly nejsou standardizované. Každá laboratoř tedy používá například jiná kultivační média, jiné enzymy a jejich výsledné koncentrace atd. Tento problém lze vyřešit používáním komerčně dodávaných kitů, které jsou na trhu dostupné (Busser *et al.*, 2014; Ferroni *et al.*, 2022; Mushahary *et al.*, 2017).

Pro náš výzkum jsme se rozhodli použít enzymatickou metodu izolace MSC, která je v Laboratoři Langerhansových ostrůvků (IKEM) již zavedena a běžně používána.

1.6.3 Průtoková cytometrie

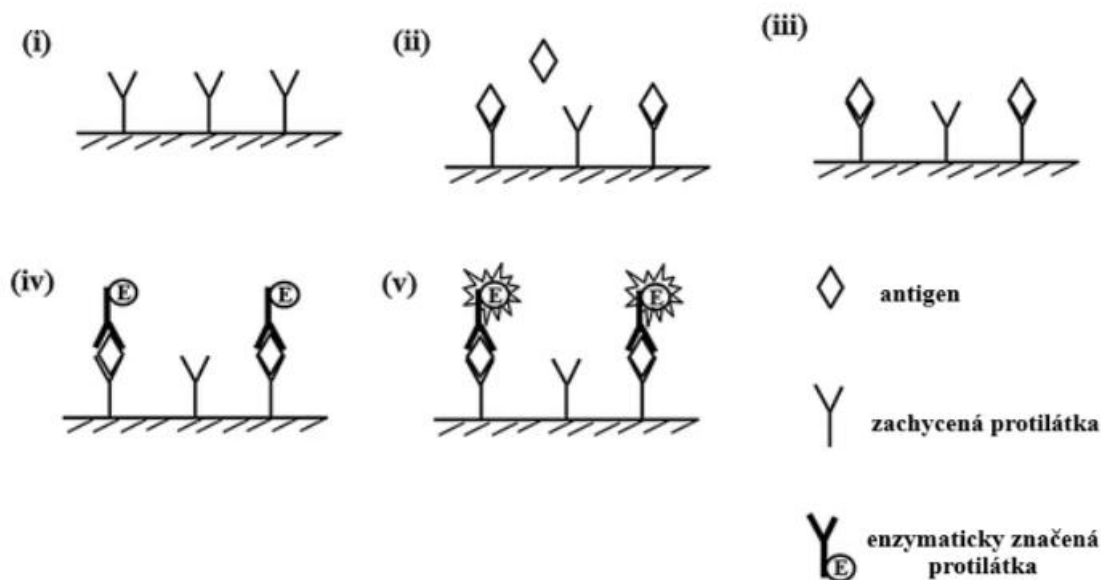
Jedná se o metodu poskytující rychlou multiparametrickou analýzu jednotlivých buněk v suspenzi. V této technice jsou buňky unášeny proudem průtokovou kapilárou, kde procházejí kolem sady laserů. Ozářené buňky vydávají světelné signály, které závisí na příslušných chemických, fyzikálních a optických vlastnostech buněk, které jsou většinou doplněny fluorescenčně značenými protilátkami. Vznikající signály jsou na detektorech (fotonásobičích) převedeny na elektronické signály, které jsou zaznamenány a analyzovány pomocí počítačového softwaru (Gross *et al.*, 2015; McKinnon, 2018; Wiener *et al.*, 2024).

Pro analýzu našich vzorků jsme použili analyzátor BD LSR II.

1.6.4 Měření hladiny vaskulárního endotelového faktoru

Hladinu VEGF sekretovaného buňkami do kultivačního média jsme kvantifikovali komerčně dodávaným kitem (katalogové číslo RRV00), založeným na principu sandwichové ELISA. Tento typ imunochemické metody funguje na principu detekce cílového antigenu prostřednictvím ukotvení mezi dvě protilátky – výsledné uspořádání tedy vypadá jako sandwich. Postup provedení testu je poměrně jednoduchý, avšak zdlouhavý. V prvním kroku je na dno mikrotitrační destičky imobilizována protilátka (v našem případě protilátka proti potkanímu VEGF), takto ošetřená destička je již součástí balení kitu. V dalším kroku je potřeba zablokovat volná vazebná místa na povrchu destičky, čímž se minimalizuje nespecifická vazba jiných proteinů. Do takto připravených jamek se poté nadávkuje vzorky a kalibrační standardy. Následně se nechají antigeny reagovat s imobilní protilátkou a poté se na antigen navázaný na zachycenou protilátku naváže enzymaticky značená protilátka (v našem případě značená křenovou peroxidázou). Po obou těchto krocích je potřeba nenavázané antigeny a protilátky pořádně promýt. V posledním kroku reaguje enzym se

substrátem, což vyvolá barevnou změnu, která je následně spektrofotometricky detekována. Intenzita zabarvení je úměrná koncentraci VEGF ve vzorku. Celý postup je schematicky znázorněn na Obrázku 3 (Sakamoto *et al.*, 2018).



Obrázek 3 Znázornění sandwichové ELISA: (i) imobilizovaná protilátka na dně jamky; (ii) inkubace s antigenem; (iii) důkladně vymytí nezreagovaných antigenů; (iv) inkubace s enzymaticky značenou protilátkou; (v) barevná změna vyvolaná substrátem
Obrázek byl upraven a přeložen. (Sakamoto *et al.*, 2018)

1.6.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je oproti průtokové cytometrii metoda umožňující detekci specifických struktur nebo molekul ve vzorcích díky schopnosti některých látek absorbovat světlo jedné vlnové délky (excitace) a následně emitovat světlo jiné, obvykle delší vlnové délky (emise). Tento jev se nazývá fluorescence. Základní mechanismus spočívá v absorpci fotonu fluorescenčním indikátorem (fluoroforem), jeho přechodu do excitovaného stavu a následné emisi fotonu s nižší energií (delší vlnovou délkou) během návratu do základního stavu. Typický časový rozdíl mezi excitací a emisí je v řádu nanosekund (Sanderson *et al.*, 2014).

V našich experimentech jsme využili hned několik fluorescenčních barviv, pomocí kterých se fluorescenčně detekují buněčná jádra. Prvním příkladem je propidium jodid. Toto barvivo je široce používáno pro testování buněčné životnosti. Barvivo prochází pouze narušenými buněčnými membránami, tzn. barví pouze mrtvé buňky. Jakmile se dostane do buňky, obarví

zde DNA a RNA. Následně vydává červený fluorescenční signál (Rosenberg *et al.*, 2019). Druhým použitým barvivem je 4',6-diamidino-2-fenyindol, neboli DAPI. DAPI se silně, avšak nekovalentně váže na DNA bez ohledu na to, jestli je buňka živá nebo mrtvá. Používá se tedy ke znázornění všech buněčných jader. Po vazbě na DNA vyzařuje modrý fluorescenční signál (Jež *et al.*, 2013; Żurek-Biesiada *et al.*, 2013). Poslední skupinou barviv jsou Hoechstova barviva. Jedná se o skupinu 3 bisbenziimidových barviv a to konkrétně 33258, 33342 a 34580. V našem experimentu jsme použili pouze první dvě zmíněná. Opět se vážou na DNA, a to konkrétně v oblastech, které jsou bohaté na adenin a thymin. Po vazbě se jejich fluorescence až 30ti násobně zvýší. Vyzařují modrý fluorescenční signál. Barvivo 33342 je pro buňky výrazně propustnější, proto se využívá zejména pro barvení živých buněk. Oproti tomu barvivo 33258 tolik neprostupuje, jeho využití je tedy primárně pro barvení mrtvých buněk (Bucevičius *et al.*, 2018).

Dále jsme využili nepřímé imunoznačení pomocí specifické protilátky proti konkrétním antigenům a sekundární fluorescenčně značené protilátky.

2 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zaměřuje na izolaci mesenchymálních stromálních buněk (MSC), jejich kultivaci, charakterizaci a vyhodnocení vlivu hypoxie na produkci vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF).

Cílem této diplomové práce je vědecky ověřit, že chemicky navozená hypoxie stimuluje produkci VEGF.

Experimentální část zahrnuje několik částí:

1. Odběr epididymálního tuku potkana kmene Lewis – tato část byla provedena některým pracovníkem oddělení Laboratoře Langerhansových ostrůvků v IKEM.
2. Enzymatická izolace a kultivace odebraných MSC.
3. Po druhé a třetí pasáži ověřit expresi typických povrchových znaků průtokovou cytometrií a produkci VEGF pomocí komerčně dodávaného ELISA kitu.
4. Po druhé nebo třetí pasáži buňky uvést do chemicky navozeného hypoxického prostředí a sledovat produkci VEGF po 24, 48 a 72 hodinách v různých koncentracích CoCl_2 (75, 100 a 125 μM) a zároveň sledovat životnost buněk v těchto časových obdobích a koncentracích.
5. Po třetí pasáži ověřit schopnost buněk diferencovat se do adipocytární a osteocytární buněčné linie.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

- Všechny níže uvedené postupy se vztahují k množství tukové tkáně odebrané z jednoho potkana.

3.1 Odběr tukové tkáně

Pro náš experiment jsme zvolili epididymální tukovou tkáň (tuková tkáň kolem varlat; viz Obrázek 4) z důvodu jejího velkého množství, které je možné snadno odebrat.

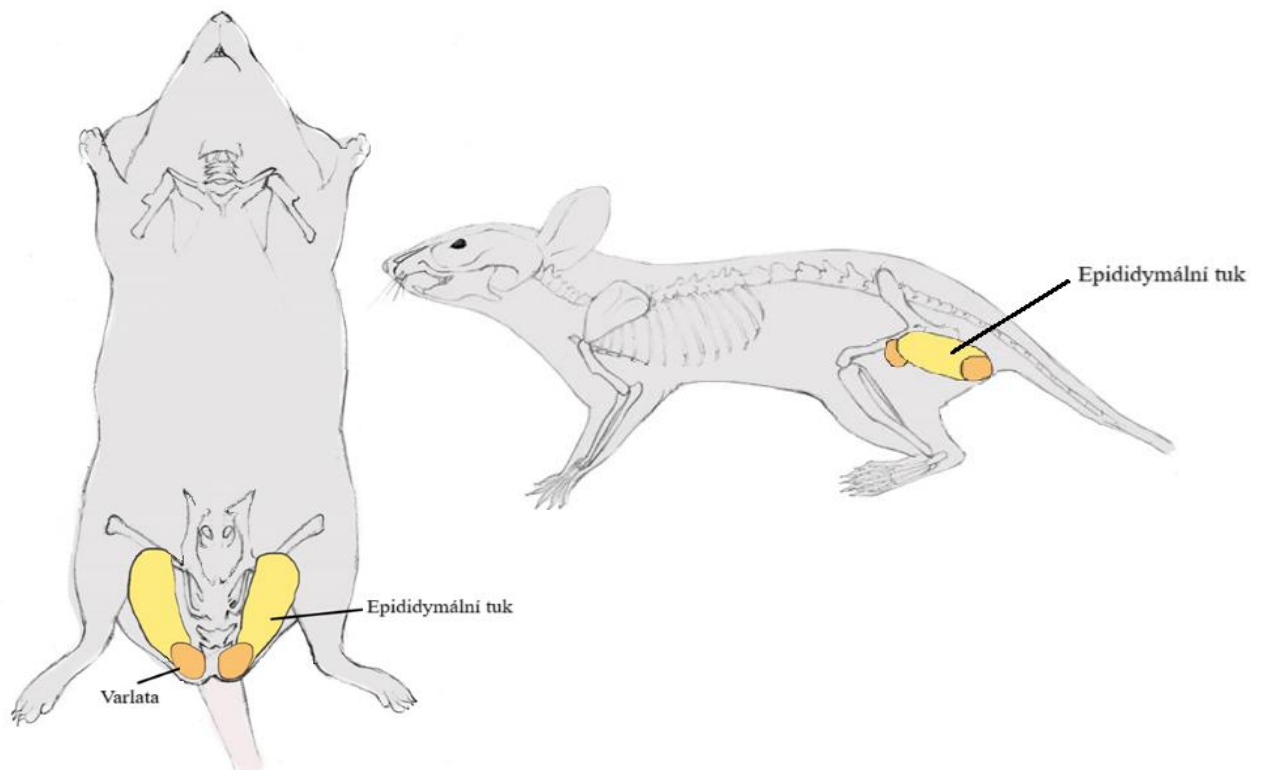
3.1.1 Seznam laboratorních pomůcek, chemikálií a roztoků

- Ajatin
- Analytické váhy
- Antibiotický a antimykotický stabilizovaný roztok – AAS (Antibiotic Antimycotic Solution Stabilized; A5955; Sigma-Aldrich, USA)
- Dexmedetomidin (Dexdomitor; C00392; Orion Corporation, Finsko)
- Dulbeccův fosfátem pufovaný fyziologický roztok – DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o CaCl₂ and MgCl₂; D8537; Sigma-Aldrich, USA)
- Holicí strojek
- Jednorázové injekční stříkačky + jehly
- Ketamin (Narkamon; C03491; Bioveta, a. s., Česká republika)
- Ledová lázeň
- Sterilní nástroje
- Roztok DPBS/AAS – 1 ml AAS na 100 ml DPBS

3.1.2 Pracovní postup

1. K anestezii byla použita kombinace ketaminu (36 mg/kg) a dexmedetomidinu (0,075 mg/kg) podaná intramuskulárně. Tato kombinace zajišťuje dostatečnou hloubku anestezie potřebnou pro bezbolestný zákrok. Potkan byl celou dobu odběru tkáně monitorován (respirace, srdeční činnost) a byla pravidelně kontrolována reakce na bolest (např. pomocí štípnutí mezi prsty).
2. Po dosažení plné anestezie byl potkan umístěn na sterilní operační pole, bylo mu oholeno břicho a dezinfikováno vhodným antiseptikem (v našem případě byl použit ajatin).

3. Následně byla nůžkami provedena incize dutiny břišní ve střední čáře a břišní dutina byla opatrně otevřena.
4. Za pomoci sterilních nástrojů byla opatrně odebrána epididymální tuková tkáň.
5. Odebraná tuková tkáň byla propláchnuta chlazeným roztokem DPBS/AAS. V tomto roztoku byl tuk uchován po nezbytně dlouhou dobu až do dalšího zpracování na ledu nebo v lednici.
6. Po odběru tuku bylo zvíře utraceno vykvrvením.



Obrázek 4 Umístění epididymálního tuku u potkana (obrázek byl upraven a přeložen; Chun, 2021)

3.2 Izolace a kultivace MSC

3.2.1 Seznam laboratorní techniky

- Analytické váhy GR-120 (A&D, Japonsko)
- Automatické pipety + špičky (Nichiryo, Japonsko)
- Centrifuga Rotina 48 R (Hettich, Německo)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Digitální fotoaparát (Canon, Japonsko)
- Inverzní mikroskop IX50 (Olympus, Japonsko)

- Laminární box Herasafe KS (ThermoFisher Scientific, USA)
- Lednice (AEG, Německo)
- Mrazák (Calex, Slovensko)
- pH metr (MINILAB, Nizozemí)
- Pipetovací nástavec (Pipet-Aid, USA)
- Světelný mikroskop (Olympus, Japonsko)
- Vakuová pumpa
- Vodní lázeň (IKA, Německo)
- Vortex (VELP, Itálie)

3.2.2 Seznam laboratorních pomůcek

- Bürkerova komůrka
- Jednorázové injekční stříkačky + jehly
- Jednorázové sérologické sterilní pipety (5, 10, 25 a 50 ml)
- Kovové síto s otvory o velikosti 500 μm
- Kultivační lahev o objemu 600 ml, kultivační plocha 182 cm^2 , ošetřený povrch lahve, sterilní (TCF012600; JetBioFil, Čína)
- Pasteurovy pipety
- Sterilní centrifugační zkumavky (15 ml, Corning, USA; 50 ml, Avantor, USA) + stojan na zkumavky
- Vakuové filtrační lahve (250, 500 ml; Corning, USA)
- Zásobní lahve (250, 500 ml; Corning, USA)

3.2.3 Seznam chemikálií

- Antibiotický a antimykotický stabilizovaný roztok – AAS (Antibiotic Antimycotic Solution Stabilized; A5955; Sigma–Aldrich, USA)
- Dulbeccův fosfátem pufovaný fyziologický roztok – DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o CaCl_2 and MgCl_2 ; D8537; Sigma–Aldrich, USA)
- Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium – DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium – low glucose; D5921; Sigma–Aldrich, USA)
- Epidermální růstový faktor – EGF (Rat epidermal growth factor; AF–400–25–100UG; Gibco, USA)
- Fetální bovinní sérum – FBS (F0804; Sigma–Aldrich, USA)

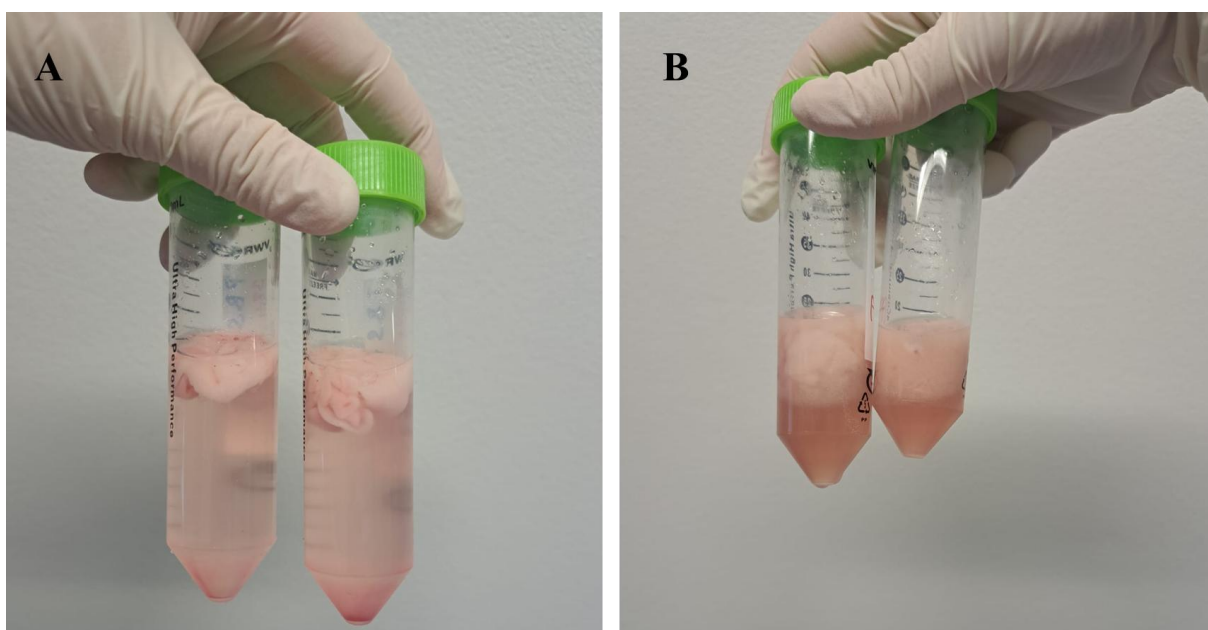
- Ficcol roztok o hustotě 1,077 g/ml (Ficoll–Pague PREMIUM sterile solution; 17544202; Cytiva, USA)
- GlutaMAX (35050-038; Gibco, USA)
- Hanksův vyvážený solný roztok – HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution; H8264; Sigma–Aldrich, USA)
- HEPES solution (H0887; Sigma–Aldrich, USA)
- Hydroxid sodný – NaOH (Lékárna IKEM)
- Chlorid sodný – HCl (Lékárna IKEM)
- Inzulín–Transferin–Selen – ITS (51500056; Gibco, USA)
- Kolagenáza z *Clostridium histolyticum* (Collagenase from *Clostridium histolyticum*; C9263; Sigma–Aldrich, USA)
- Penicilin–Streptomycin – PS (P4333; Sigma–Aldrich, USA)
- Trypanová modř (T0776; Sigma–Aldrich, USA)
- Trypsin–EDTA roztok (T4049; Sigma–Aldrich, USA)

3.2.4 Seznam médií a roztoků

- Kultivační médium pro MSC bez růstových faktorů – DMEM (84 ml), FBS (10 ml), HEPES (5 ml), PS (1 ml) → následně pomocí 1M NaOH nebo 1M HCl bylo pH média upraveno na 7,4 a přefiltrováno; před použitím předeřtát ve vodní lázni na 37 °C
- Kultivační médium pro MSC s růstovými faktory – DMEM (82 ml), FBS (10 ml), HEPES (5 ml), PS (1 ml), glutaMAX (1 ml), ITS (1 ml), EGF (5 µl/200 ml média) → následně pomocí 1M NaOH nebo 1M HCl bylo pH média upraveno na 7,4 a přefiltrováno; před použitím předeřtát ve vodní lázni na 37 °C
- Roztok DPBS/AAS – 1 ml AAS na 100 ml DPBS
- Roztok pro ukončení digesce kolagenázou – 10% roztok FBS v DPBS (5 ml FBS + 45 ml DPBS)
- Roztok pro ukončení trypsinizace – 10% roztok FBS v DPBS (2,5 ml FBS + 22,5 ml DPBS)
- Trypsinizační roztok – 20% Trypsin–EDTA + DPBS (2,5 ml 20% Trypsin–EDTA + 10 ml DPBS); před použitím předeřtát ve vodní lázni na 37 °C

3.2.5 Pracovní postup

1. Získaný epididymální tuk z potkana kmene Lewis (cca 10 mL) byl řádně opláchnut chlazeným roztokem DPBS/AAS.
2. Kolagenáza byla navážena v koncentraci 1 mg na ml tukové tkáně a rozpuštěna v HBSS v poměru 1:1 (1 mililitr HBSS na 1 miligram kolagenázy).
3. Do takto připraveného roztoku byla vložena opláchnutá tuková tkáň (viz Obrázek 5).
4. Poté následovala inkubace ve vodní lázni při 37 °C po dobu 30 minut za soustavného třepání.



Obrázek 5 Fotografie z izolace. A – čerstvě odebraný epididymální tuk; B – tuková tkáň po digesci kolagenázou.

5. Od této doby celý postup probíhal v laminárním boxu (vyjma centrifugace a procesu počítání buněk).
6. Následně byl ke směsi přidán roztok pro ukončení digesce kolagenázou.
7. Poté byla suspenze přefiltrována přes kovové síto do hodinového skla.
8. Přefiltrovaná buněčná suspenze byla přenesena do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugována 10 minut při 1000 g (2300 RPM).
9. Následně byl supernatant vylit a buněčná peleta byla 2x promyta 40 ml chlazeným roztokem DPBS/AAS. Po prvním promytí následovala centrifugace 10 minut při 1000 g (2300 RPM) a po druhém promytí pouze 5 minut při 1000 g (2300 RPM).
10. Peleta byla následně resuspendována ve 2 ml roztoku DPBS/AAS.

11. Do 15 mL zkumavky bylo odměřeno 3 ml Ficcol roztoku a na to pomalu nadávkováno 2 ml buněčné suspenze z předchozího kroku.
12. Poté následovala centrifugace 20 minut při 1000 g (2300 RPM).
13. Z rozhraní mezi vrstvami byla sesbírána buněčná suspenze, která byla následně 2× promyta 50 ml roztoku DPBS/AAS. Po prvním i druhém promývání byla suspenze centrifugována 5 minut při 760 g (2000 RPM).
14. Peleta byla následně resuspendována ve 2 ml kultivačního média bez růstových faktorů.
15. Poté bylo 20 μ l buněčné suspenze přidáno ke 20 μ l trypanové modři a tímto roztokem byla naplněna Bürkerova komůrka.
16. Následně byly buňky spočítány pod světelným mikroskopem.
17. Z výsledné buněčné suspenze byl do každé kultivační lahve nadávkován takový objem buněk, který odpovídá počtu cca 1 – 2 miliony buněk.
18. Do kultivačních lahví bylo následně ještě přidáno kultivační médium bez růstových faktorů v takovém objemu, aby výsledný objem v lahvi (buněčná suspenze + kultivační médium) byl 35 ml.
19. Kultivační lahve byly následně umístěny do termostatu a kultivovány při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 24 hodin.
20. Po 24 hodinách bylo kultivační médium bez růstových faktorů vyměněno za médium s růstovými faktory. Poté byla kultivační lahev opět vložena do CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).
21. U buněk následně každý den probíhala mikroskopická kontrola – hodnotila se míra konfluence (jak moc buňky tvoří souvislou vrstvu) buněk, zakalenost média a případná přítomnost kontaminace.
22. Každé 3 dny bylo buňkám měněno kultivační médium s růstovými faktory za čerstvé.
23. V momentě, kdy buňky dosahovaly téměř 100% míru konfluence, bylo potřeba buňky zpasážovat.
24. Z lahve bylo odsáto médium a obsah lahví byl 2× propláchnut 25 ml PBS zahřátým na 37 °C.
25. Do každé lahve bylo přidáno 12,5 ml trypsinizačního roztoku.
26. Kultivační lahev byla umístěna na 3 minuty zpátky do termostatu (37 °C, 5 % CO₂).
27. Poté byla rychlost odchlípnutí kontrolována pod mikroskopem.
28. V momentě, kdy byla většina buněk odchlípnutá ze dna kultivační lahve, byla suspenze odebrána do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky. Kultivační lahev byla

propláchnuta roztokem pro ukončení trypsinizace a tento roztok byl následně přepipetován k buněčné suspenzi.

29. Suspenze byla následně centrifugována při 270 g (1200 RPM) po dobu 10 minut.
30. Peleta byla poté resuspendována ve 2 ml kultivačního média s růstovými faktory.
31. Poté bylo 20 μ l buněčné suspenze přidáno ke 20 μ l trypanové modři a tímto roztokem byla naplněna Bürkerova komůrka.
32. Následně byly buňky spočítány pod světelným mikroskopem.
33. Z výsledné buněčné suspenze byl do nových kultivačních lahví nadávkován takový objem buněk, který odpovídá počtu cca 1 milionu buněk.
34. Do kultivačních lahví bylo následně ještě přidáno kultivační médium s růstovými faktory v takovém objemu, aby výsledný objem v lahvi (buněčná suspenze + kultivační médium) byl 35 ml.
35. Proces výměny kultivačního média a trypsinizace probíhal stejně až do momentu ukončení experimentu (v našem případě 3. pasáž).

3.3 Průtoková cytometrie

3.3.1 Seznam laboratorní techniky

- Centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo)
- Počítač (Lenovo) + software na zaznamenání (BD FACSDiva)
- Průtokový cytometr BD LSR II + BD HTS (BD, USA)
- Software na vyhodnocení (FlowJo)
- Vortex (VELP, Itálie)

3.3.2 Seznam laboratorních pomůcek

- 96jamková kultivační deska
- Automatické pipety + špičky (Nichiryo, Japonsko)
- Ledová tříšť
- Mikrozumavky (1,5 ml; Eppendorf, Německo) + stojan na mikrozumavky

3.3.3 Seznam protilátek a jejich příprava na použití

- Protilátka anti-CD29 (102216; BioLegend, USA)
→ Značena APC; před použitím naředit 1000 \times

- Protilátka anti-CD31 (555027; BD Pharmingen, USA)
→ Značena PE; před použitím naředit 80×
- Protilátka anti-CD34 (947-MSM1-PE-100T; NeoBiotechnologies, USA)
→ Značena PE; před použitím naředit 20×
- Protilátka anti-CD44 (ab23396; Abcam, Velká Británie)
→ Značena PE; před použitím naředit 10×
- Protilátka anti-CD45 (561587; BD Horizon, USA)
→ Značena V450; před použitím naředit 50×
- Protilátka anti-CD73 (LS-C417968; LS Bio, USA)
→ Značena FITC; před použitím naředit 20×
- Protilátka anti-CD90 (755464; BD OptiBuild, USA)
→ Značena RB780; před použitím naředit 50×
- Protilátka anti-CD105 (BAF1320; Bio Techne, USA)
→ Biotinylovaná; před použitím naředit 10×
- Do jamek, kde je přidávána tato protilátka se ještě musí přidat streptavidin v objemu 10 μL
- Streptavidin (405249; BioLegend, USA)
→ Značen BV785; před použitím naředit 200×

3.3.4 Seznam roztoků

- Cytometrický roztok – směs DPBS + 0,01% azid sodný + 0,2% fish skin gelatine – roztok byl již v laboratoři připraven
- Hoechst 33258 (94403; Sigma-Aldrich, USA)
- Roztok pro blokaci Fc receptorů – 2% potkaní sérum (R9759; Sigma-Aldrich, USA)

3.3.5 Pracovní postup

1. Buňky byly do jamek mikrotitrační destičky rozděleny po 100 000 buňkách.
2. Následně byla destička centrifugována 2 minuty při 300 g (1800 RPM).
3. Supernatant byl následně odstraněn, zbytek obsahu destičky promíchán a destička přesunuta na led.
4. Následně byly pelety v destičce promyty 100 μL cytometrickým roztokem a znovu centrifugovány 2 minuty při 300 g (1800 RPM).
5. Poté byl znovu zopakován krok číslo 3.

6. Následně bylo do každé jamky napipetováno 10 μ L roztoku pro blokaci Fc receptorů a buňky byly 10 minut inkubovány.
7. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 100 μ L cytometrického roztoku a buňky byly centrifugovány 2 minuty při 300 g (1800 RPM) a poté byl supernatant opět odcáknut a zbylý obsah v destičce zvortexován.
8. Následně bylo do každé jamky přidáno 10 μ L roztoku příslušné protilátky a destička byla inkubována ve tmě 30 minut.
9. Do všech jamek bylo poté přidáno 100 μ L cytometrického roztoku a buňky byly centrifugovány 2 minuty při 300 g (1800 RPM) a poté byl supernatant opět odcáknut a zbylý obsah v destičce zvortexován. Tento krok byl zopakován ještě jednou.
10. Až do měření byla destička uchovávána na ledu. Poté byl obsah jamek změřen průtokovým cytometrem, kde bylo těsně před měřením do příslušných jamek přidán roztok Hoechst 33258 pro označení mrtvých buněk.

3.4 Měření VEGF

3.4.1 Seznam laboratorní techniky

- Automatické mikropipety + špičky (Nichiryo, Japonsko)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Čtečka ELISA desek Epoch (BioTek, USA)
- Laminární box Herasafe KS (ThermoFisher Scientific, USA)
- Mrazák (Liebherr, Švýcarsko)
- Pipetovací nástavec (Pipet-Aid, USA)
- Počítač (Lenovo, Čína) + software na vyhodnocení (Gen5 5.10 BioTek)
- Promývací zařízení Hydorflex Plus (Tecan, Švýcarsko)
- Vortex (VELP, Itálie)

3.4.2 Seznam laboratorních pomůcek

- 24jamková sterilní kultivační deska
- Jednorázové sérologické sterilní pipety (5, 10, 25 a 50 ml)
- Mikrozkušavky (1,5 ml; Eppendorf, Německo) + stojan na mikrozkušavky
- Sterilní centrifugační zkumavky (15 ml; Corning, USA) + stojan na zkumavky

3.4.3 Seznam médií a kitů

- Kultivační médium s růstovými faktory; před použitím předeřhřát ve vodní lázni na 37 °C (viz kapitola 3.2.4)
- Rat VEGF Immunoassay – Qantikine ELISA kit (RRV00; R&D Systems, USA)

3.4.4 Pracovní postup

1. Nejprve byla do sterilních centrifugačních zkumavek připravena buněčná suspenze 200 000 buněk, ke které bylo následně přidáno kultivační médium tak, aby celkový objem směsi dosáhl 4 ml.
2. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a následně byla tato směs nadávkována po 1 ml do 3 jamek 24jamkové sterilní kultivační desky a následně inkubována v inkubátoru (37 °C; 5 % CO₂; 24 hodin).
3. Po uplynutí této doby byl obsah jamek důkladně promíchán a z jamek bylo odebráno 600 µl do mikrozkušavek, které byly následně centrifugovány při 370 g (2000 RPM) po dobu 5 minut.
4. Následně bylo z mikrozkušavek odebráno 450 µl supernatantu a z tohoto množství byly následně udělány 3 alikvoty po 150 µl, které byly až do dalšího zpracování uchovávány v mrazáku při -20 °C. Spolu se vzorky bylo zamraženo ještě kultivační médium, které později sloužilo jako kontrola.
5. Při dalším zpracování bylo rozmrazeno potřebné množství vzorků.
6. Dále se postupovalo podle instrukcí přiložených v komerčně dodávaném ELISA kitu.
7. Na konci byly výsledky odečteny čtečkou ELISA desek a stanovena koncentrace VEGF.

3.5 Chemicky navozená hypoxie

3.5.1 Seznam laboratorní techniky

- Analytické váhy GR-120 (A&D, Japonsko)
- Automatické mikropipety + špičky (Nichiryo, Japonsko)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Čtečka ELISA desek Epoch (BioTek, USA)
- Laminární box Herasafe KS (ThermoFisher Scientific, USA)
- Mrazák (Liebherr, Švýcarsko)

- Pipetovací nástavec (Pipet-Aid, USA)
- Počítač (Hp, USA) + software na vyhodnocení (M7000)
- Počítač (Lenovo, Čína) + software na vyhodnocení (Gen5 5.10 BioTek)
- Vícekanálový fluorescenční a světelný mikroskop EVOS M7000 (Invitrogen, USA)
- Vortex (VELP, Itálie)

3.5.2 Seznam laboratorních pomůcek

- 6jamková sterilní kultivační deska
- 96jamková sterilní kultivační deska černá
- Mikrozkušavky (1,5 ml; Eppendorf, Německo) + stojan na mikrozkušavky
- Sterilní centrifugační zkumavky (50 ml; Corning, USA) + stojan na zkumavky

3.5.3 Seznam chemikálií a kitů

- Dulbeccův fosfátem pufovaný fyziologický roztok – DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o CaCl_2 and MgCl_2 ; D8537; Sigma–Aldrich, USA)
- Chlorid kobaltnatý – CoCl_2 (C8661; Sigma–Aldrich, USA)
- Hoechst 33342 (R37605; Invitrogen, USA)
- Kultivační médium s růstovými faktory; před použitím předeřtát ve vodní lázni na 37 °C (viz kapitola 3.2.4)
- Propidium jodid (P1304MP; Invitrogen, USA) – vodný roztok o koncentraci 0,1 mg/ml
- Rat VEGF Immunoassay – Qantikine ELISA kit (RRV00; R&D Systems, USA)
- Sterilní voda (Kabi, Německo)

3.5.4 Seznam roztoků

- Buněčné suspenze – dle Tabulky 2
- Roztok CoCl_2 – rozpustit 5,95 mg v 1 ml sterilní vody (zásobní roztok 25 mM)
- Roztok DPBS/Hoechst – na 2 ml DPBS 8 kapek Hoechst 33342

Tabulka 2 Postup přípravy buněčných suspenzí pro měření VEGF a životností.

VEGF			
	koncentrace CoCl ₂	objem CoCl ₂	
1 080 000 buněk (pro každou koncentraci CoCl ₂)	0 μM	0 μl	doplnit kultivačním médiem na celkový objem 8 ml
	75 μM	24 μl	
	100 μM	32 μl	
	125 μM	40 μl	
ŽIVOTNOSTI			
	koncentrace CoCl ₂	objem CoCl ₂	
96 000 buněk (pro každou koncentraci CoCl ₂)	0 μM	0 μl	doplnit kultivačním médiem na celkový objem 1,5 ml
	75 μM	4,5 μl	
	100 μM	6 μl	
	125 μM	7,5 μl	

3.5.5 Pracovní postup

1. Nachystané buněčné suspenze spolu s konkrétními koncentracemi CoCl₂ byly v objemu 2 ml napipetovány do jamek 6jamkové kultivační desky (3×) a v objemu 150 μl do 96jamkové kultivační desky (3×) dle schématu (viz Schéma 1).
2. Všechny kultivační desky byly následně inkubovány v inkubátoru (37 °C; 5 % CO₂).
3. V časech 24, 48 a 72 hodin byla vždy jedna od každé desky vyndána z inkubátoru a dále zpracována.
4. Objem jednotlivých jamek 6jamkových kultivačních desek (určených na stanovení VEGF) byl nejprve důkladně promíchán. Následně bylo z každé desky odebráno 1,5 ml média do mikrozkušavek, které byly následně centrifugovány při 2000 otáček po dobu 5 minut. Poté bylo z mikrozkušavek odebráno 1,2 ml supernatantu, který byl až do dalšího zpracování uchováván v mrazáku při -20 °C. Vzorky poté byly zpracovány stejně jako standartní vzorky pro měření VEGF z kapitoly 3.4 s jedinou výjimkou – před samotnou analýzou byly 10× naředěny v DPBS.
5. Do jamek 96jamkových kultivačních desek (určených pro testování životnosti) bylo přidáno 150 μl roztoku DPBS/Hoechst a objem jednotlivých jamek byl důkladně promíchán. Destičky se nechaly 30 minut inkubovat při pokojové teplotě. Následně bylo do každé jamky přidány 3 μl propidium jodidu a opět byl obsah jamek důkladně promíchán. Po 5minutové inkubaci byly vzorky zobrazeny a nafoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu.

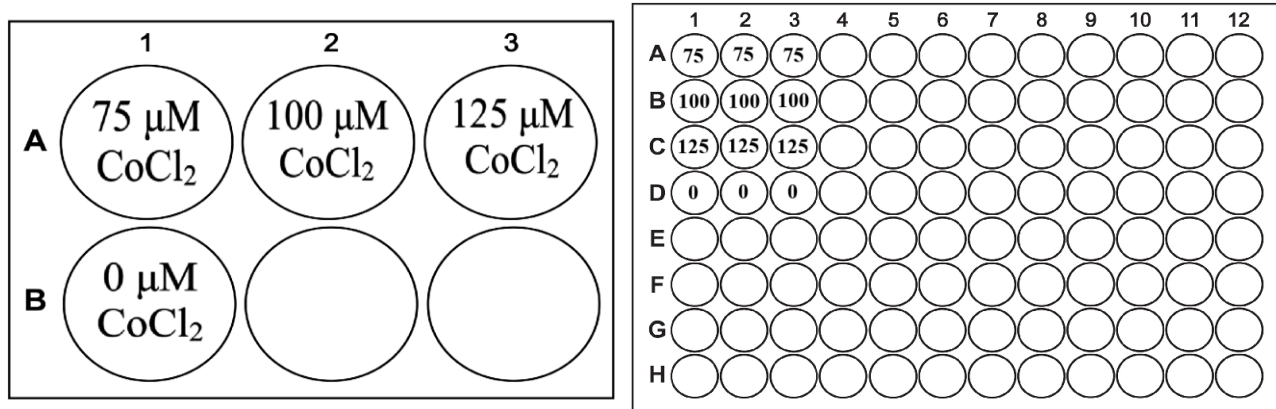


Schéma 1 Schéma pro pipetování kultivačních desek určených pro stanovení VEGF (vlevo) a životností (vpravo).

3.6 Diferenciace

3.6.1 Seznam laboratorní techniky

- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Inverzní mikroskop IX50 (Olympus, Japonsko)
- Laminární box Herasafe KS (ThermoFisher Scientific, USA)
- Pipetovací nástavec (Pipet-Aid, USA)
- Počítač (Hp, USA) + software na vyhodnocení (M7000)
- Vícekanálový fluorescenční a světelný mikroskop EVOS M7000 (Invitrogen, USA)

3.6.2 Seznam laboratorních pomůcek

- 24jambková sterilní destička černá
- Jednorázové sérologické sterilní pipety (5, 10, 25 a 50 ml)
- Sterilní centrifugační zkumavky (15 ml; Corning, USA) + stojan na zkumavky

3.6.3 Seznam chemikálií

- 1,4-diazabicyklo(2,2,2) oktan – DABCO (D27802; Sigma-Aldrich, USA)
- Adipogenní doplněk (StemXVivo® Adipogenic Supplement (100X); CCM011; R&D Systems, USA)
- Bovinní sérový albumin – BSA (B14; ThermoFisher Scientific, USA)
- Destilovaná voda
- Dulbeccův fosfátem pufovaný fyziologický roztok – DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o CaCl₂ and MgCl₂; D8537; Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol
- Isopropanol

- Kultivační médium (StemXVivo® Osteogenic/Adipogenic Base Media; CCM007; R&D Systems, USA)
- Mowiol (81381; Sigma-Aldrich, USA)
- NucBlue připravený roztok pro fixované buňky – DAPI (NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent; R37606; Invitrogen, USA)
- Olejová červeň (O0625; Sigma-Aldrich, USA)
- Oslí sérum (D9663; Sigma-Aldrich, USA)
- Osteogenní doplněk (StemXVivo® Mouse/Rat Osteogenic Supplement (20X); CCM009; R&D Systems, USA)
- Paraformaldehyd (30525-89-4; Polysciences, Inc., USA)
- Penicilin–Streptomycin – PS (P4333; Sigma–Aldrich, USA)
- Primární protilátka anti–mFABP4 (Mouse/Rat FABP4/A-FABP Antibody; AF1443; R&D Systems, USA)
- Primární protilátka anti–osteokalcin (Human/Rat Osteocalcin Antibody; MAB1419; R&D Systems, USA)
- Sekundární oslí protilátka anti–kozy IgG (Donkey anti–Goat IgG (H+L) Highly Cross–Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 488; A32814TR; Invitrogen, USA)
- Sekundární oslí protilátka anti–myší IgG (Donkey anti–Mouse IgG (H+L) Highly Cross–Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 555; A31570; Invitrogen, USA)
- Tris pufr (648311; Merck, USA)
- Triton X–100 (X100; Sigma-Aldrich, USA)

3.6.4 Seznam médií, roztoků a ředění protilátek

- 1% roztok BSA v DPBS
- 4% paraformaldehyd v DPBS
- Blokovací roztok – 0,3% Triton X–100 + 1% BSA + 10% oslí sérum v DPBS
- DAPI – v dávkování 2 kapky na 1 ml DPBS
- Diferenciační médium pro adipocyty – základní kultivační médium + adipogenní doplněk v ředění 1:100; před použitím předeřtát ve vodní lázni na 37 °C
- Diferenciační médium pro osteocyty – základní kultivační médium + osteogenní doplněk v ředění 1:20; před použitím předeřtát ve vodní lázni na 37 °C

- Montovací médium Dabco–Mowiol – tento roztok již byl připraven v laboratoři; složení roztoku: DABCO, Mowiol, glycerol, destilovaná voda, 0,2M Tris pH 8,5
- Olejová červeně
 - Nejprve byl připraven nasycený zásobní roztok – 0,5 g olejové červeně bylo rozpuštěno v 100 ml isopropanolu.
 - Pracovní roztok byl připraven v poměru 2:3 zásobního roztoku olejové červeně a destilované vody. Roztok byl zfiltrován a před každým barvením nachystán čerstvý.
- Ředění protilátek
 - Primární protilátka anti–mFABP4 pro adipocyty – protilátku rozpustit v 200 μ l DPBS; pořádně zamíchat; na výslednou koncentraci 10 μ g/ml naředit 20 \times blokovacím roztokem
 - Primární protilátka anti–osteokalcin pro osteocyty – protilátku rozpustit v 500 μ l DPBS; pořádně zamíchat; na výslednou koncentraci 10 μ g/ml naředit 50 \times blokovacím roztokem
 - Sekundární oslí protilátka anti–kozí IgG pro adipocyty – ředění 1:500 v DPBS
 - Sekundární oslí protilátka anti–myší IgG pro osteocyty – ředění 1:500 v DPBS
- Základní kultivační médium – kultivační médium + PS v ředění 1:100; před použitím predehřát ve vodní lázni na 37 °C

3.6.5 Pracovní postup

1. Nejprve byly připraveny buněčné suspenze – pro osteocyty byla nachystána buněčná suspenze v koncentraci 40 000 buněk v 2,5 ml kultivačního média; pro adipocyty v koncentraci 200 000 buněk také v 2,5 ml kultivačního média.
2. Následně byly do dvou 24jamkové kultivačních destiček napipetovány buněčné suspenze – vždy do 4 jamek po 0,5 ml suspenze (každá diferenciaci měla svojí vlastní destičku).
3. Následovala inkubace při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 24 hodin.
4. Další den dosahovaly buňky v jamkách, které se diferencovaly do osteocytů, zhruba 60% konfluenci a buňky, které se diferencovaly do adipocytů téměř 100% konfluenci.
5. V ten moment bylo nahrazeno základní kultivační médium za obohacená diferenciacní média, vždy pro každou diferenciaci zvlášť.
6. Destičky byly dále kultivovány při 37 °C a 5 % CO₂.
7. Kultivační médium bylo měněno každé 3 dny.

8. Po 2 – 3 týdnech se u buněk projeví morfológické změny. Navíc u osteogenně indukovaných buněk se objeví krystaly vápníku a u adipogenně indukovaných buněk lipidové vakuoly.
9. Následně byly jamky 2× promyty 1 ml DPBS.
10. Poté byly buňky fixovány 0,5 ml 4% paraformaldehydem při pokojové teplotě po dobu 20 minut.
11. Všechny jamky byly poté 3× promyty DPBS po dobu 5 minut.
12. Od této doby bylo do jamek určených pro barvení olejovou červení na znázornění lipidových vakuol vrstveno mezi jednotlivými kroky pouze DPBS, aby jamky nevyschly.
13. Poté byly buňky ošetřeny 0,5 ml blokovacího roztoku a inkubovány při pokojové teplotě po dobu 45 minut.
14. Po blokování byly buňky inkubovány s 300 µl naředěné primární protilátky ve tmě přes noc při teplotě 2 – 8 °C; do jamek určených jako negativní kontroly byl opět nadávkován blokovací roztok.
15. Poté byly buňky opět 3× promyty DPBS po dobu 5 minut.
16. Následovala inkubace s 300 µl naředěné sekundární protilátky ve tmě po dobu 60 minut.
17. Poté byly jamky opět promyty 3× DPBS po dobu 5 minut.
18. Následně byla dobarvena buněčná jádra pomocí 300 µl DAPI roztoku po dobu 5 minut ve tmě.
19. Poté byly jamky opět promyty 3× DPBS po dobu 5 minut.
20. Na buňky bylo navrstveno 300 µl montovacího média a následně byly zobrazeny pomocí fluorescenční mikroskopie.
21. Jamky určené pro barvení olejovou červení, byly na 15 minut převrstveny roztokem olejové červeně.
22. Poté byly opláchnuty destilovanou vodou a zobrazeny pomocí světelné mikroskopie

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Izolace a kultivace MSC

Izolovali jsme epididymální tuk celkem z 11 potkanů kmene Lewis (označeny písmeny A – K). Všechny vzorky MSC z tukové tkáně byly izolovány stejným způsobem, a to enzymatickou izolací s použitím enzymu kolagenáza. Všechny vzorky MSC byly kultivovány za standartních kultivačních podmínek (37 °C; 5 % CO₂). V Tabulce 3 jsou zaznamenány podrobnější údaje o jednotlivých izolacích.

Tabulka 3 Podrobnější údaje o jednotlivých izolacích.

	Datum izolace	Věk potkana	Hmotnost potkana [g]	Množství tuku		Počet získaných buněk
				[g]	[ml]	
A	14.10.2024	8 měsíců	416	6,09	13	$1,2 \times 10^6$
B	14.10.2024	8 měsíců	402	5,38	8	$2,44 \times 10^6$
C	14.10.2024	8 měsíců	390	7,38	15	$3,64 \times 10^6$
D	3.2.2025	5 měsíců	435	4,96	7	$1,6 \times 10^6$
E	3.2.2025	5 měsíců	426	3,28	5	$1,48 \times 10^6$
F	3.2.2025	5 měsíců	408	4,07	7	$2,4 \times 10^6$
G	3.3.2025	6 měsíců	392	3,69	10	$1,9 \times 10^6$
H	10.3.2025	11 měsíců	473	4,80	7	$1,7 \times 10^6$
I	10.3.2025	11 měsíců	482	4,32	8	$1,6 \times 10^6$
J	10.3.2025	11 měsíců	505	12,40	15	$2,5 \times 10^6$
K	10.3.2025	11 měsíců	497	4,91	10	$2,3 \times 10^6$

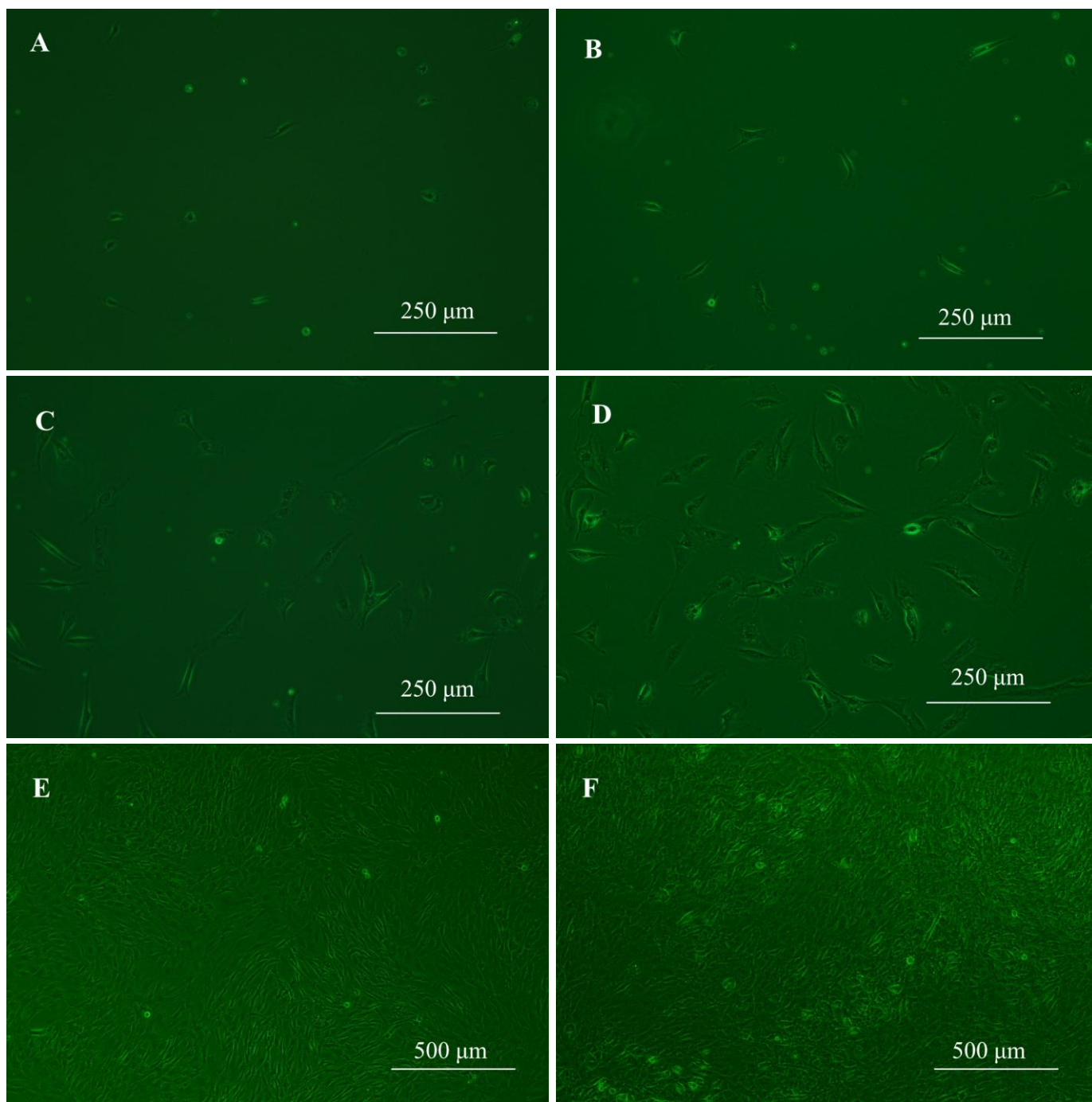
4.2 Charakterizace MSC

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1, MSC nemají jeden charakteristický znak, podle kterého by se daly identifikovat. Volí se proto kombinace kritérií dle doporučení ISCT:

4.2.1 Adheze buněk k plastovým lahvím

Prvním kritériem pro označení buněk jako MSC je jejich schopnost přilnout k plastovému povrchu kultivačních lahví za standardních kultivačních podmínek *in vitro*. Zaznamenávali jsme snímky v různých časových obdobích od nasazení primární buněčné kultury až do doby pasážování (viz Obrázek 6). Na snímcích z několika prvních dní je zřejmé, že buňky postupně přiléhají k povrchu kultivační lahve a dělí se. Zároveň je na snímcích zaznamenáno, jak

postupně získávají vřetenovitý tvar typický pro MSC. Z pohledu tohoto bodu, lze buňky charakterizovat jako MSC.



Obrázek 6 Mikroskopické snímky MSC v různých časových bodech od nasazení primární buněčné kultury do kultivační lahve. A – 24 hodin od nasazení; B – 48 hodin od nasazení; C – 72 hodin od nasazení; D – 96 hodin od nasazení; E, F – buňky dosahují téměř 100% konfluence.

4.2.2 Analýza povrchových markerů pomocí průtokové cytometrie

Dalším kritériem podle ISCT je exprese typických povrchových znaků. Vzhledem k tomu, že jsou původní kritéria vztažena na lidské MSC izolované z kostní dřeně, bylo potřeba testovat povrchové znaky exprimované na potkaních MSC izolovaných z tukové tkáně, které jsou mírně odlišně od povrchových znaků doporučených podle ISCT. Pokud budeme vycházet z dat uvedených v Tabulce 1 v kapitole 1.1.2, pro potkaní MSC izolované z tukové tkáně je charakteristická exprese povrchových znaků CD29, CD73 a CD90. Dále je možná přítomnost povrchových znaků exprimovaných s nízkou intenzitou CD44 a CD105. Naopak je potřeba, aby buňky postrádaly povrchové znaky CD31, CD34 a CD45.

U buněk jsme testovali expresi těchto povrchových markerů po druhé a třetí pasáži.

Z výsledků uvedených v Tabulce 4 vyplývá, že buňky v obou pasážích velmi významně produkují povrchové markery CD29 a CD90. Exprese CD73 byla v obou pasážích velmi nízká, přičemž tento marker podle literatury vykazuje silnou pozitivitu (El-Sawah *et al.*, 2022). Vzhledem k mírnému vzrůstu procenta pozitivních buněk ve třetí pasáži, by se dalo očekávat, že by se i v dalších pasážích mohlo procento pozitivních buněk zvýšit. Podobný problém je patrný i u markeru CD44. Jeho pozitivita je sice popisována jako nižší než u CD29 nebo CD90, avšak úroveň positivity jsme očekávali vyšší (Bayati *et al.*, 2013).

Je patrné, že u markeru CD105 je směrodatná odchylka u obou pasáží velmi významná. Lze to přičíst tomu, že tento marker byl ve větší míře ve druhé pasáži exprimován pouze u vzorků D – G, zatímco buňky vzorků A – D a H – K ho neexprimovaly. U některých vzorků došlo po druhé pasáži ke zmnožení buněk exprimujících CD105. Marker byl ve větší míře exprimován u vzorků A – G, u vzorků H – K opět exprimován nebyl. Toto se odráží i na velikosti směrodatné odchylky, která je kvůli tomu poměrně vysoká. Je tedy velmi pravděpodobné, že exprese tohoto povrchového znaku je závislá na množství pasáží.

Naopak, negativitu markerů CD31, CD34 a CD45 jsme jednoznačně potvrdili. Tyto povrchové znaky exprimovalo méně než 1 % buněk, což je v souladu s kritérii vydaným ISCT.

U buněk obou pasáží jsme navíc testovali životnost pomocí Hoechst 33258. Buňky druhé pasáže vykazovaly o něco vyšší úmrtnost než buňky třetí pasáže, a to v průměru 17,19 %. Nejvyšší procento mrtvých buněk vykazoval ve druhé pasáži vzorek číslo J, a to s celkovým obsahem 29,8 % mrtvých buněk. Naopak nejnižší procento mrtvých buněk bylo ve vzorku D

8,73 % mrtvých buněk. Ve třetí pasáži byl průměrný obsah mrtvých buněk 11,54 %. Největší podíl mrtvých buněk měl vzorek K s 21,1 % a nejmenší podíl vzorek B s 4,73 %.

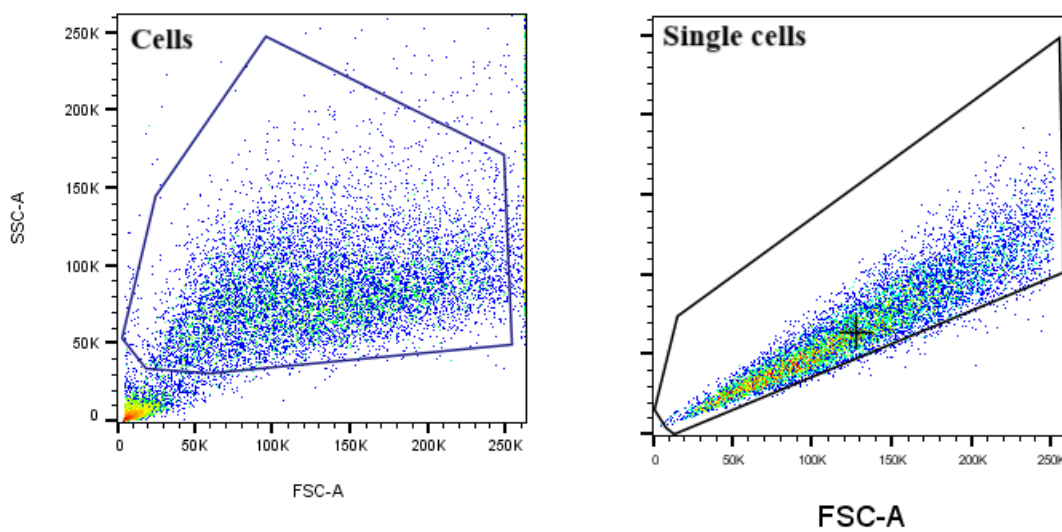
Tabulka 4 Procentuální zastoupení jednotlivých povrchových znaků ve 2. a 3. pasáži. Data jsou uvedena jako průměr zastoupení markerů u jednotlivých vzorků (A–K) \pm směrodatná odchylka.

Zeleně jsou označeny výsledky, které splňují požadavky ISCT, červeně ty, které je nesplňují.

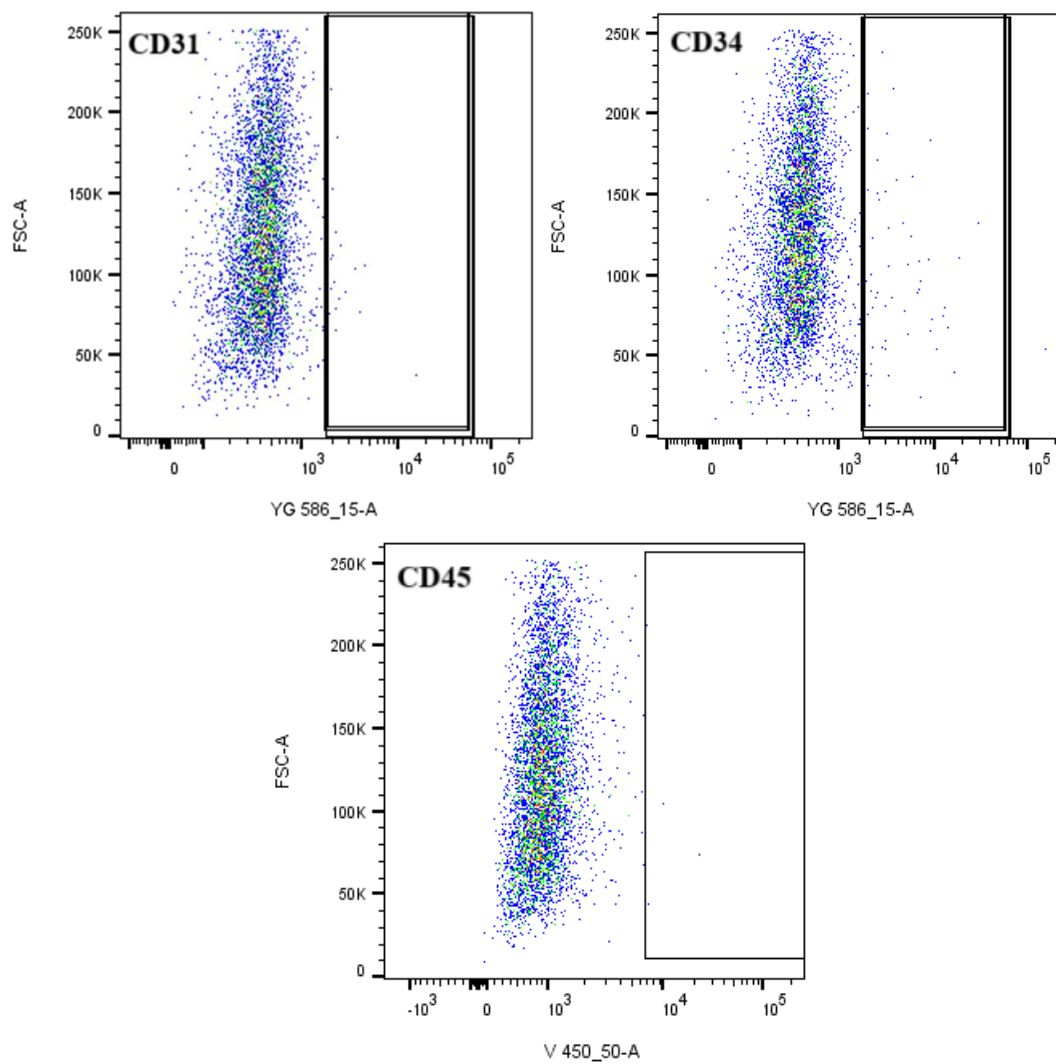
	2. pasáž [%]	3. pasáž [%]
CD29	99,21 \pm 0,69	99,15 \pm 1,45
CD31	0,35 \pm 0,40	0,30 \pm 0,22
CD34	0,56 \pm 0,56	0,51 \pm 0,40
CD44	10,83 \pm 6,89	4,86 \pm 3,45
CD45	0,1 \pm 0,11	0,15 \pm 0,14
CD73	2,13 \pm 1,6	2,78 \pm 1,25
CD90	98,95 \pm 0,87	99,39 \pm 0,67
CD105	56,78 \pm 44,29	62,33 \pm 32,74
Hoechst	17,19 \pm 7,50	11,54 \pm 5,13

Vzhledem k tomu, že byla pozitivní exprese jednoznačně potvrzena u CD29 a CD90, a naopak nebyly přítomny buňky s markery CD31, CD34 a CD45, je možné tyto buňky i tohoto pohledu považovat za MSC. Příklady výsledných záznamů z průtokové cytometrie pro jednotlivé markery jsou uvedeny na Obrázku 7.

Gatovací strategie:

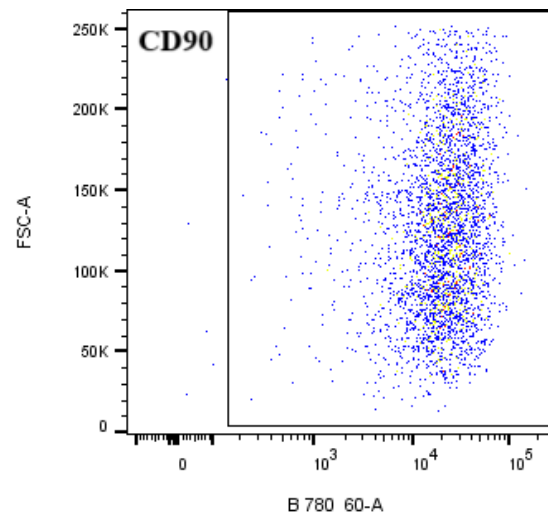
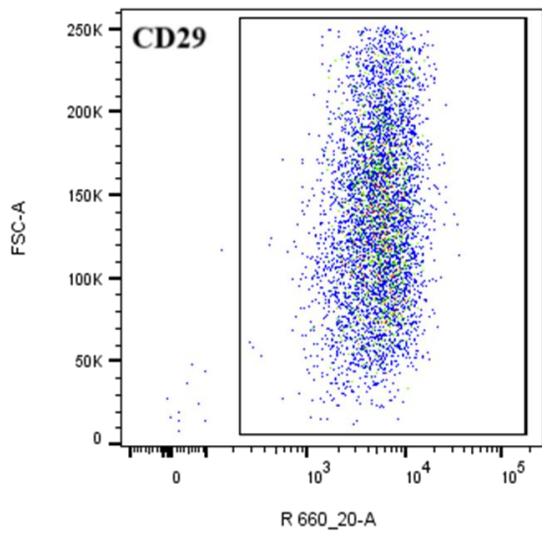


Negativní markery:

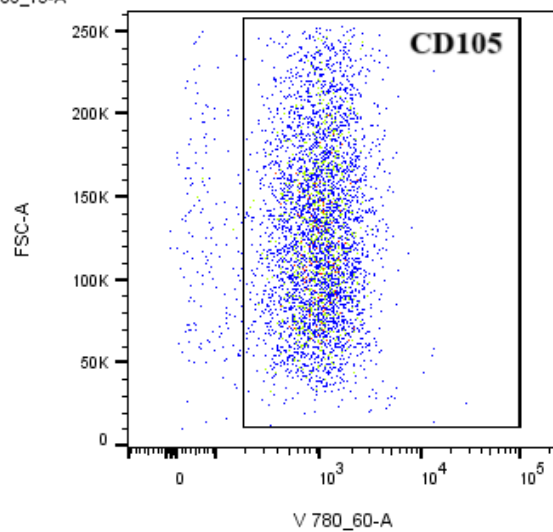
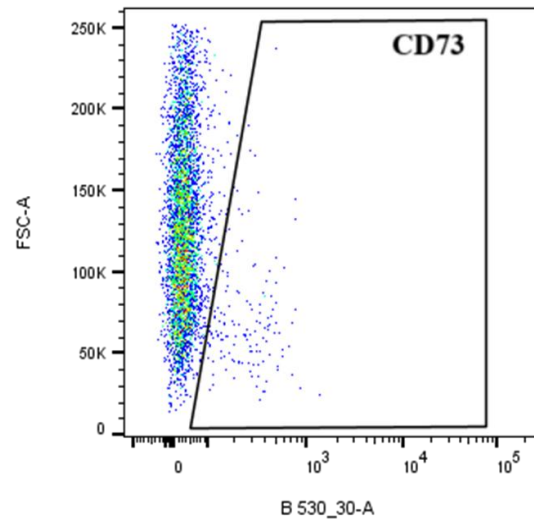
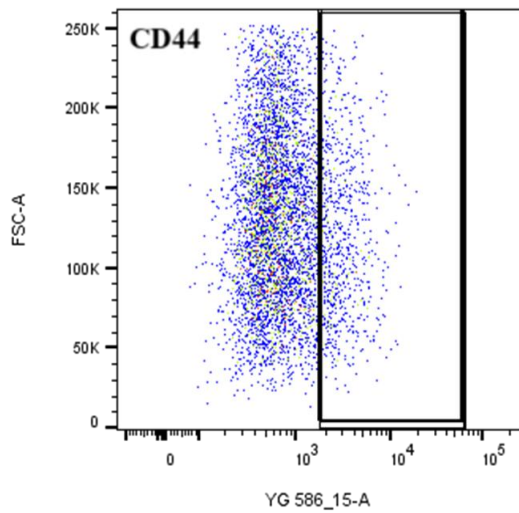


Obrázek 7 Stanovení fenotypu buněk pomocí průtokové cytometrie.

Pozitivní markery:

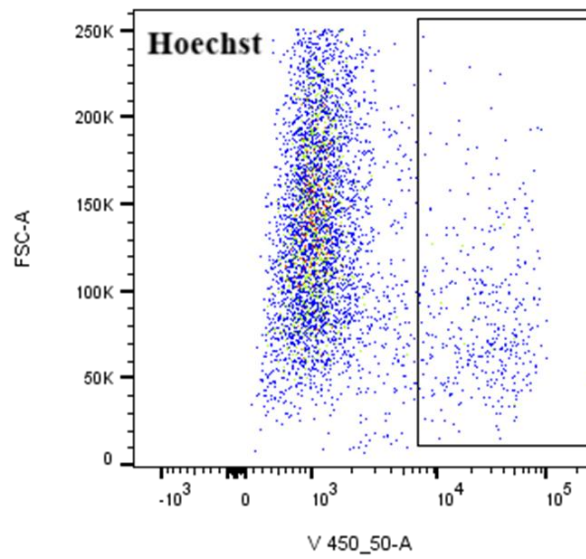


Pozitivní markery s nižší intenzitou:



Obrázek 7 Stanovení fenotypu buněk pomocí průtokové cytometrie. (pokračování)

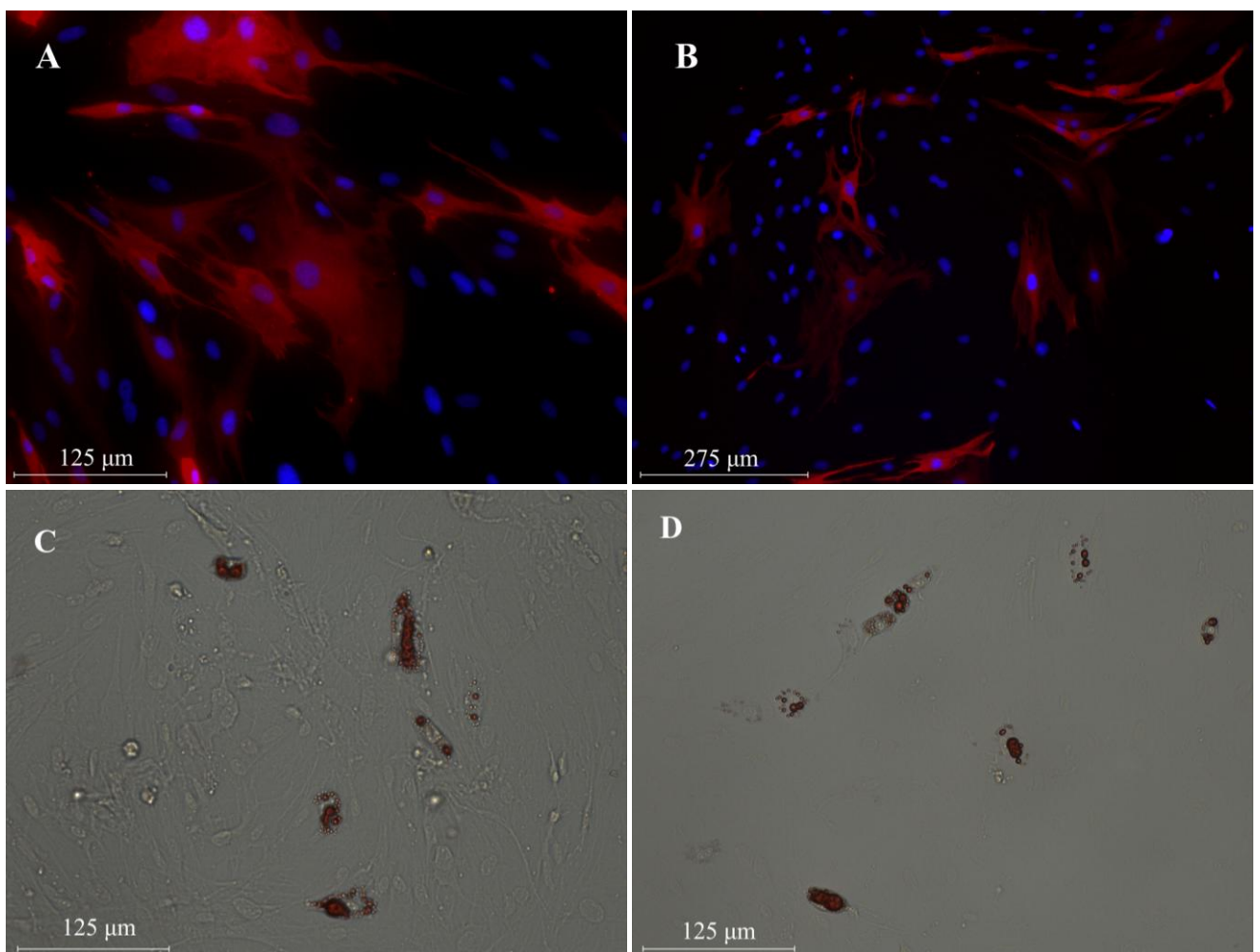
Životnost:



Obrázek 7 Stanovení fenotypu buněk pomocí průtokové cytometrie. (pokračování)

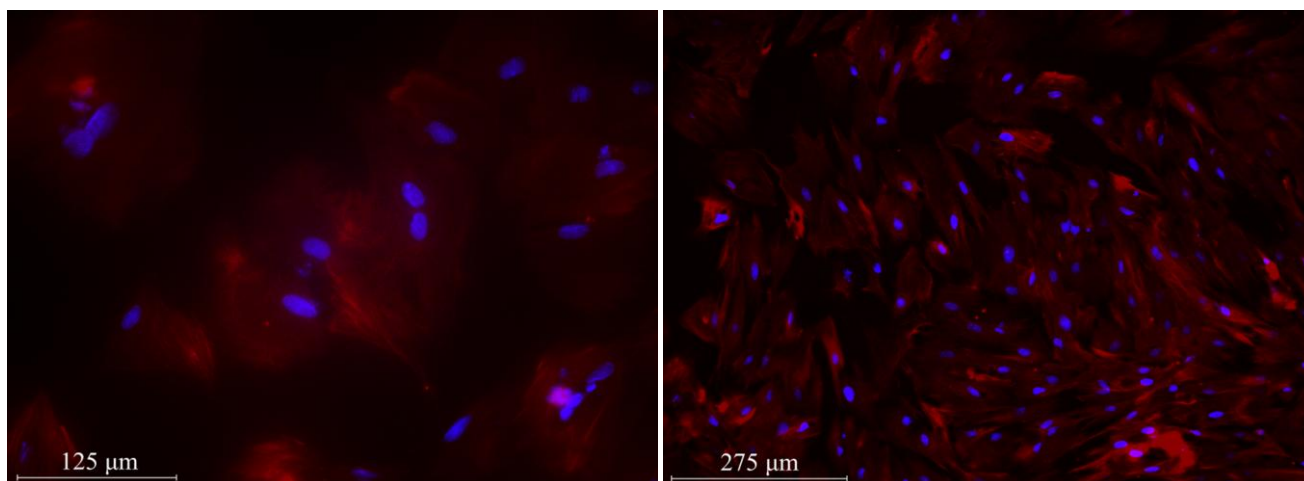
4.2.3 Diferenciace MSC

Posledním kritériem podle ISCT je schopnost buněk se diferenciovat do adipocytů, osteocytů a chondrocytů. V našem experimentu jsme sledovali pouze diferenciální kapacitu buněk do adipocytů a osteocytů. Chondrocyty byly z experimentu vyřazeny z důvodu stažení chondrogenního doplňku (směs látek pro obohacení média) z trhu. U všech buněk, které jsme kultivovali v diferenciálním kultivačním médiu s příslušným doplňkem se nám po 3 týdnech povedlo diferencovat MSC do adipocytů (viz. Obrázek 8) i osteocytů (viz. Obrázek 9). I z tohoto pohledu lze buňky charakterizovat jako MSC.



Obrázek 8 Adipogenní diferenciace MSC. A, B – diferencované adipocyty jsou znázorněny pomocí specifické primární protilátky anti-mFABP4 (červená). Modře jsou dobarvena všechna buněčná jádra pomocí DAPI.

C, D – pomocí světelné mikroskopie jsou znázorněny lipidové vakuoly obarvené olejovou červení.



Obrázek 9 Osteogenní diferenciace MSC. Diferencované osteocyty jsou znázorněny pomocí specifické primární protilátky anti-osteokalcin (červená). Modře jsou dobarvena všechna buněčná jádra pomocí DAPI.

4.3 Produkce VEGF

VEGF jsme stanovovali u všech MSC ve druhé a třetí pasáži. Použili jsme k tomu komerčně dodávaný ELISA kit (RRV00; R&D Systems). Výsledky těchto měření jsou uvedeny v Tabulce 5. Z výsledků vyplývá, že je produkce VEGF vyšší ve druhé pasáži.

Tabulka 5 Produkce VEGF ve druhé a třetí pasáži. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty všech měření ± směrodatná odchylka.

	VEGF [pg/ml]	
	2.	3.
A	879,34 ± 40,28	829,02 ± 11,86
B	927,68 ± 29,64	616,31 ± 22,93
C	816,88 ± 10,34	632,23 ± 46,96
D	682,43 ± 63,08	544,14 ± 23,39
E	954,74 ± 84,49	713,73 ± 52,67
F	1194,65 ± 31,46	869,73 ± 86,80
G	368,26 ± 40,36	186,97 ± 13,26
H	184,06 ± 6,72	307,18 ± 7,66
I	257,45 ± 16,70	234,01 ± 7,42
J	230,01 ± 21,12	201,18 ± 22,41
K	171,85 ± 24,42	57,32 ± 8,64

Zajímalo nás, zda existuje souvislost mezi produkcí VEGF a kvalitou buněk. Rozhodovali jsme se, kterým parametrem kvalitu buněk zhodnotit, protože se lišil počet nasazených buněk do kultivačních lahví, tak i doba kultivace (resp. doba do dosažení téměř 100% konfluency buněk). Nakonec jsme se kvalitu buněk rozhodli spočítat pomocí času zdvojení buněk (tzv. doubling–time) a to podle vzorce viz. Rovnice 1, který zahrnuje jak dobu kultivace, tak i počáteční počet nasazených buněk. Výsledné časy zdvojení buněk jsou uvedeny v Tabulce 6.

Rovnice 1 Vzorec pro výpočet doubling–time.

$$T_d = \frac{t}{\log_2\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}$$

T_d ... doba, za kterou se počet buněk zdvojí [hod]

t ... doba kultivace [hod]

N_t ... konečný počet buněk

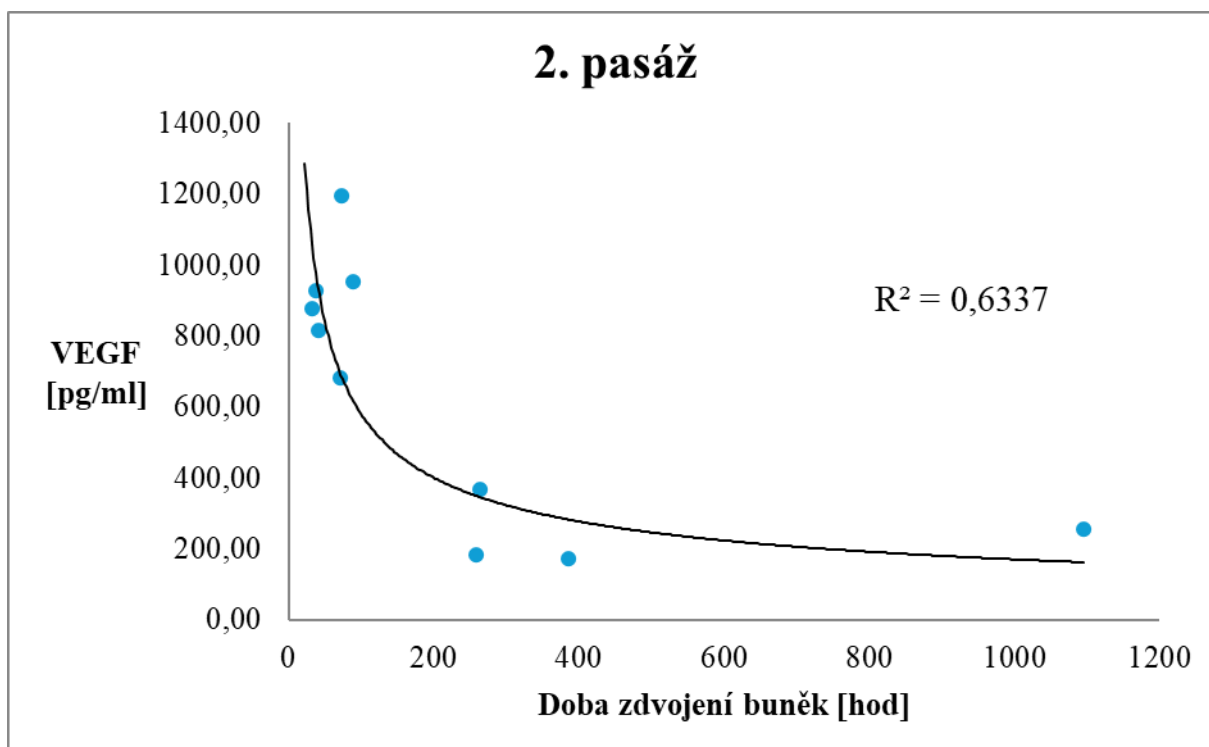
N_0 ... počáteční počet buněk

Tabulka 6 Hodnoty doubling–time mezi počátečním inokulem a první pasáží, mezi první a druhou pasáží a mezi druhou a třetí pasáží.

	Doba zdvojení buněk [hod]		
	0.	1.	2.
A	68	32	83
B	95	38	73
C	68	42	58
D	259	71	358
E	151	88	396
F	223	73	152
G	108	258	x
H	210	1095	x
I	118	x	x
J	138	386	x
K	108	265	x

Z výše uvedených výsledků doby zdvojení buněk je patrné, že buňky G – K se nám od určitého momentu již nepovedlo zdvojnásobit. Naopak došlo k poklesu jejich celkového počtu oproti výchozímu. Tento výsledek naznačuje, že buňky během kultivace z různých důvodů nepřežívaly nebo se nedělily v dostatečné míře. Z jakých důvodů k tomuto jevu došlo, není zřejmé. Kultivační podmínky i složení média zůstaly stejné. Je potřeba si ale uvědomit, že se jedná o živý biologický systém, který vykazuje značnou míru variability.

Výsledná data ze druhé pasáže jsme vložili do grafu (viz Graf 1) závislosti koncentrace VEGF na doubling–time. Potvrdili jsme, že mezi těmito dvěma údaji existuje určitá souvislost. V momentě, kdy doba zdvojení buněk byla dlouhá, buňky produkovaly málo VEGF.



Graf 1 Grafické znázornění závislosti koncentrace produkovaného VEGF na době zdvojení buněk.

R^2 – hodnota spolehlivosti.

4.4 Stimulace produkce VEGF chemicky navozenou hypoxií

Hypoxii jsme navodili chemicky přidavkem mimetika a to konkrétně CoCl_2 . CoCl_2 jsme přidávali ve třech různých koncentracích – 75, 100 a 125 μM . Všechny vzorky jsme dále kultivovali po dobu 24, 48 a 72 hodin. Spolu se vzorky s CoCl_2 jsme vždy za stejných kultivačních podmínek kultivovali kontrolní vzorek bez přidavku mimetika (tzn. koncentrace $\text{CoCl}_2 = 0 \mu\text{M}$). Chtěli jsme potvrdit, že chemicky navozená hypoxie stimuluje produkci VEGF v MSC. Experiment jsme prováděli na 4 různých MSC (u potkanů C, G, H a J).

Jak vyplývá z dat uvedených v Tabulce 7, chemicky navozená hypoxie skutečně stimuluje produkci VEGF v MSC. Produkce VEGF u buněk s přidavkem CoCl_2 je 1,5 – 3× vyšší než u kontrolních vzorků. V Grafech 2 – 5 je přehledněji znázorněn rozdíl mezi kontrolními vzorky a vzorky s CoCl_2 . Z naměřených dat dále vyplývá, že použitá koncentrace CoCl_2 , neměla vliv na produkci VEGF.

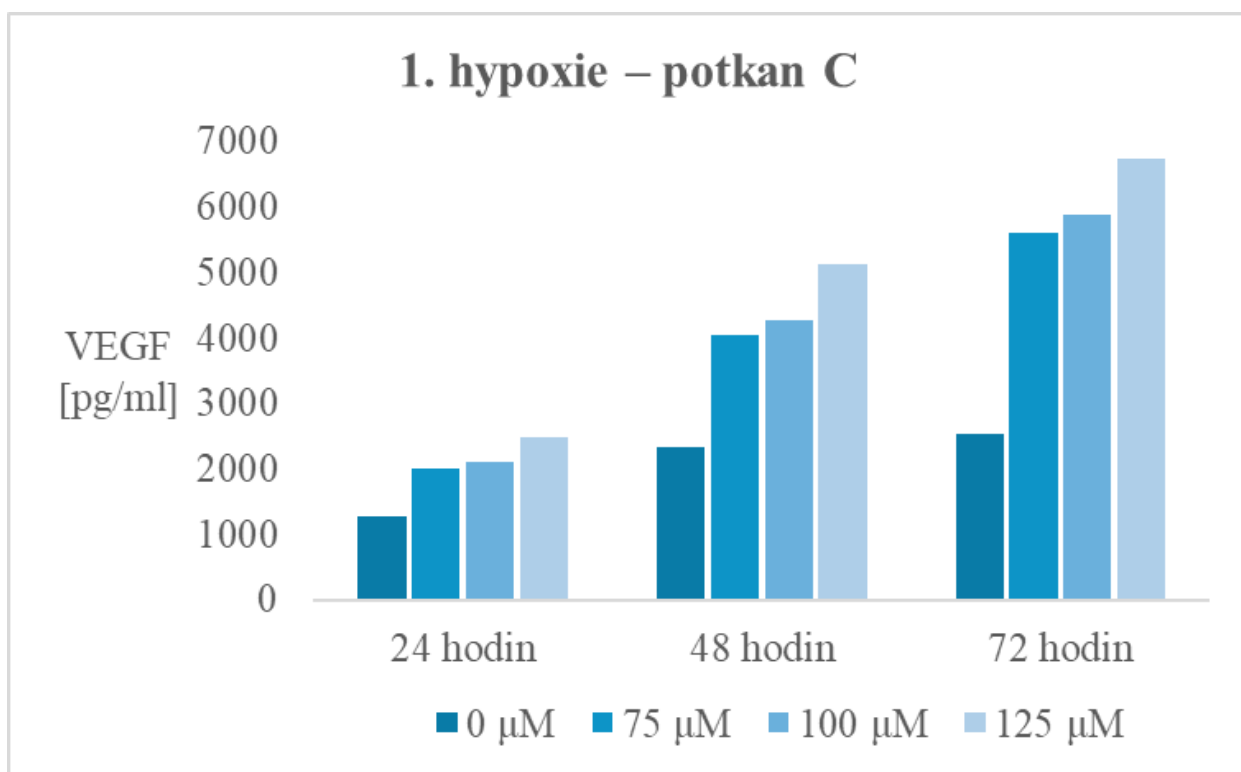
Tabulka 7 Koncentrace VEGF v kultivačním médiu u MSC v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem.

1. hypoxie – potkan C			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[pg/ml]	[pg/ml]	[pg/ml]
0 μM	1281,01	2326,95	2542,88
75 μM	2005,04	4048,97	5599,93
100 μM	2103,05	4272,90	5886,69
125 μM	2491,41	5135,17	6739,50

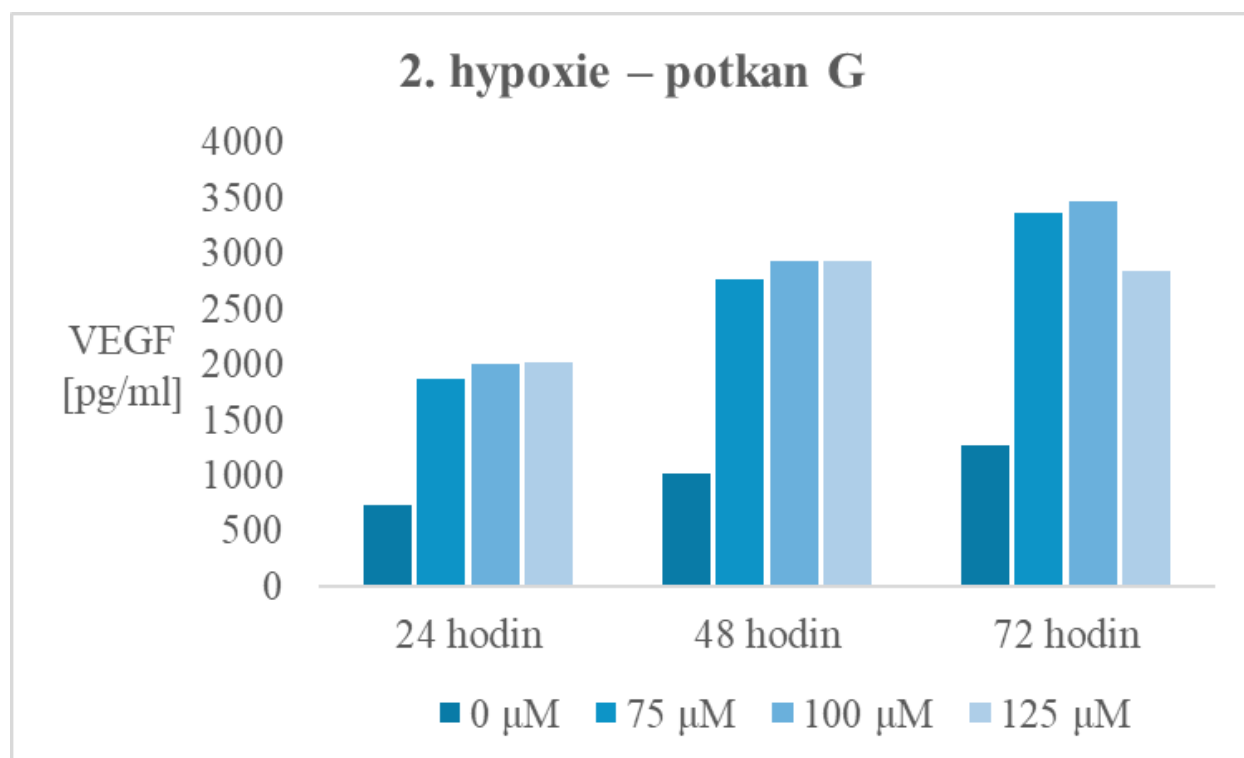
3. hypoxie – potkan H			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[pg/ml]	[pg/ml]	[pg/ml]
0 μM	345,92	617,07	739,33
75 μM	564,39	1234,16	1588,36
100 μM	544,14	928,86	1490,08
125 μM	614,56	901,76	1430,31

2. hypoxie – potkan G			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[pg/ml]	[pg/ml]	[pg/ml]
0 μM	730,71	1018,29	1277,88
75 μM	1875,27	2772,99	3375,39
100 μM	2011,99	2937,66	3473,29
125 μM	2027,16	2935,05	2844,55

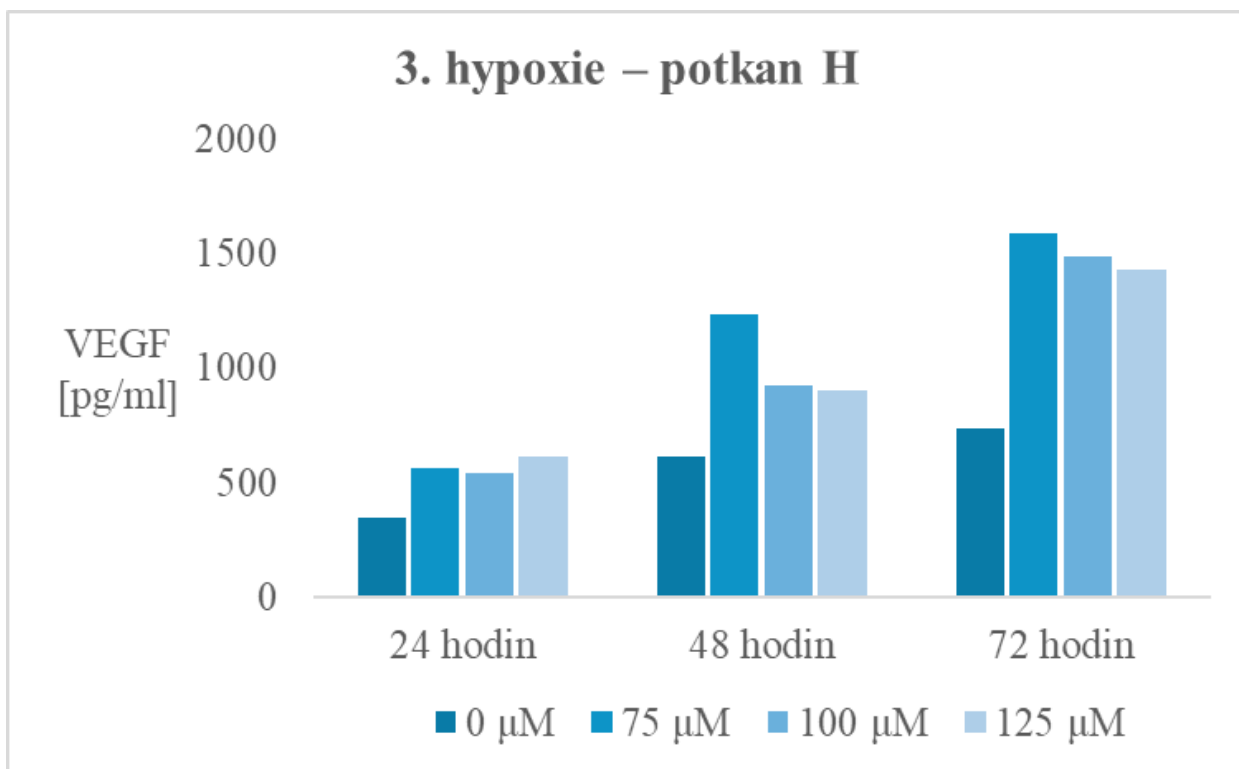
4. hypoxie – potkan J			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[pg/ml]	[pg/ml]	[pg/ml]
0 μM	429,83	594,37	886,22
75 μM	1091,27	1659,92	1966,78
100 μM	1137,72	1762,99	1973,92
125 μM	1188,52	1842,50	2310,15



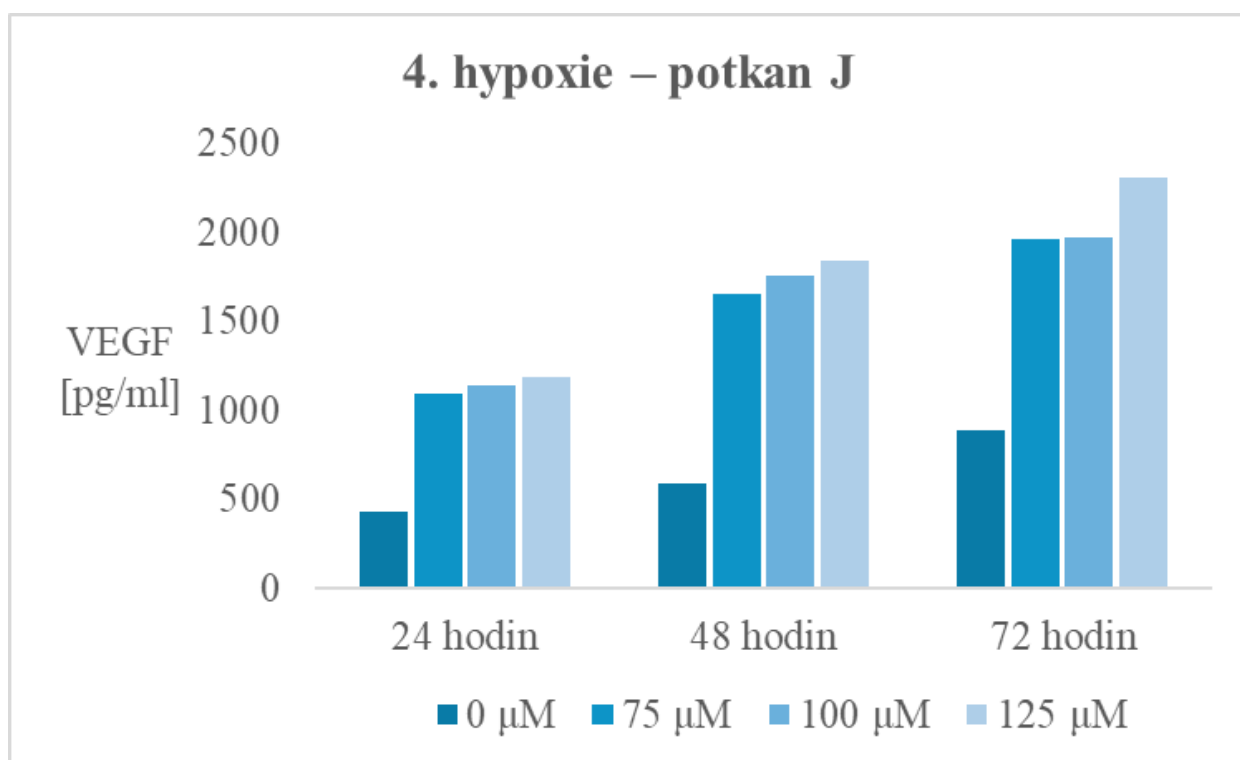
Graf 2 Znárodnění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 1. hypoxie (potkan C)



Graf 3 Znárodnění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 2. hypoxie (potkan G)

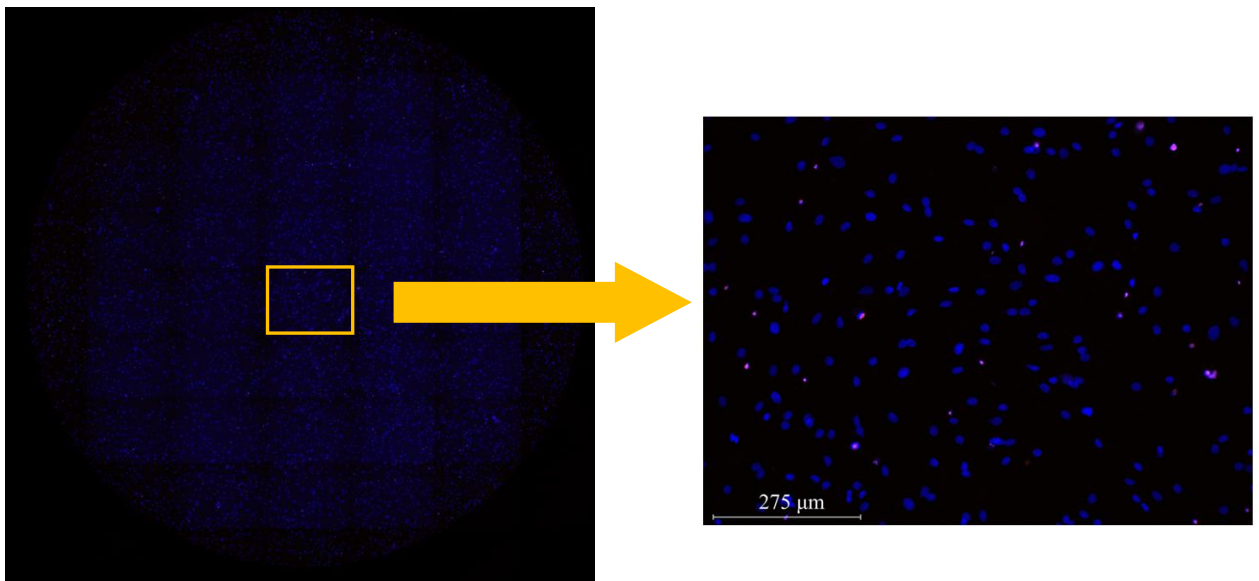


Graf 4 Znárodnění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 3. hypoxie (potkan H)



Graf 5 Znárodnění produkce VEGF v chemicky indukované hypoxii v porovnání s kontrolním vzorkem – vzorek 4. hypoxie (potkan J)

U buněk byla zároveň mikroskopicky testována i životnost (viz Obrázek 10). Chtěli jsme ověřit, že kultivace buněk s CoCl_2 nijak významně negativně MSC v tomto ohledu neovlivňuje. Všechny buňky jsme obarvili Hoechst 33342, mrtvé buňky propidium jodidem. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tabulce 8, CoCl_2 nemá na životnost buněk žádný vliv. V porovnání s kontrolním vzorkem mají ošetřené vzorky CoCl_2 v podstatě stejné procentuální zastoupení mrtvých buněk. Z technických důvodů nebyla životnost změřena u 1. hypoxie po 24 hodinách a u 2. hypoxie po 72 hodinách.



Obrázek 10 Mikroskopický snímek znázorňující životnost buněk. Modré buňky –jádra všech buněk obarvená barvivem Hoechst 33342; červené buňky – jádra mrtvých buněk obarvená propidium jodidem.

Tabulka 8 Procentuální zastoupení mrtvých buněk v jednotlivých časech a koncentracích CoCl₂.

1. hypoxie – potkan C			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[%]	[%]	[%]
0 μM	x	13,76	8,22
75 μM	x	11,74	10,70
100 μM	x	13,30	8,18
125 μM	x	17,58	9,62

3. hypoxie – potkan H			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[%]	[%]	[%]
0 μM	38,56	32,30	35,04
75 μM	31,32	29,09	31,47
100 μM	35,74	28,02	32,10
125 μM	34,77	24,45	32,64

2. hypoxie – potkan G			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[%]	[%]	[%]
0 μM	18,94	16,99	x
75 μM	17,70	27,10	x
100 μM	19,74	31,74	x
125 μM	15,67	29,22	x

4. hypoxie – potkan J			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	[%]	[%]	[%]
0 μM	15,97	11,20	10,26
75 μM	11,71	9,99	11,24
100 μM	12,27	11,35	11,65
125 μM	12,96	11,66	11,59

Z výše uvedených dat, lze také vypočítat určitou závislost mezi dobou zdvojení buněčné populace a životností nebo produkcí VEGF v hypoxii. U MSC, u kterých došlo k zastavení dělení (G – K), bylo procento mrtvých buněk mnohem vyšší než u buněk, kde byla doba zdvojení buněk relativně krátká. Lze z toho tedy vyhodnotit, že pokud buňkám trvá dlouhou dobu se rozdělit (pokud vůbec k tomu dojde), produkují málo VEGF, což se ani v hypoxickém prostředí nezlepší. Taková kultivace MSC není vhodná pro další experimenty.

ZÁVĚR

Zabývali jsme se studiem vlivu chemicky navozené hypoxie na produkci vaskulárního endotelového faktoru (VEGF), který je produkován mesenchymálními stromálními buňkami (MSC). MSC jsme enzymaticky izolovali z tukové tkáně odebrané z potkana kmene Lewis. Celkem jsme experiment provedli na 11 potkanech. V první části experimentu jsme se zabývali zejména samotnou charakterizací izolovaných buněk. Charakterizace MSC je poměrně složitá, protože buňky nemají žádný unikátní znak. Charakterizace tedy probíhá na základě kritérií vydaných ISCT. U buněk jsme sledovali jejich adhezi ke kultivační lahvi a současně s tím i změnu jejich tvaru. Dále jsme u buněk během kultivace sledovali i procento konfluence. V momentě, kdy buňky dosahovaly téměř 100% konfluence jsme procesem trypsinace buňky zpasážovali. Celkem jsme prováděli 3 pasáže. Dále jsme buňky charakterizovali pomocí průtokové cytometrie. Toto měření jsme u buněk prováděli ve druhé i ve třetí pasáži. Jako pozitivní markery jsme si zvolili CD29, CD44, CD73, CD90 a CD105. Markery CD29 a CD90 byli v obou pasážích jasně pozitivní (pozitivita byla potvrzena u více než 98 % buněk). Zbylé markery byly zachyceny na nižším procentu MSC. Jako negativní markery jsme si zvolili CD31, CD34 a CD45. Všechny vyšly jasně negativně u obou pasážích (pozitivita byla potvrzena u méně než 1 % buněk). Poslední bod, podle kterého jsme buňky charakterizovali byla jejich schopnost diferencovat se *in vitro* do adipocytů a osteocytů. Ve všech třech bodech jsme kultivované buňky charakterizovali jako MSC.

V další fázi experimentu jsme se věnovali produkci VEGF. Nejprve jsme u všech testovaných kultivací ve druhé a třetí pasáži měřili VEGF u nestimulovaných MSC pomocí metody ELISA. Poté jsme u čtyřech vybraných kultivací stimulovali produkci VEGF přidáním různých koncentrací CoCl_2 . Takto ošetřené buňky jsme kultivovali po různě dlouhá časová období. Současně se stimulovanými MSC jsme kultivovali i kontrolní vzorky, které byly bez jakéhokoli přídatku. Zjistili jsme, že produkce VEGF u stimulovaných buněk je zhruba 1,5 – 3× vyšší než u běžně kultivovaných MSC. Zároveň jsme u buněk testovali i jejich životnost pomocí fluorescenční mikroskopie v takto upraveném prostředí. V porovnání s kontrolními vzorky byla životnost buněk totožná.

Toto je pouze první část celého výzkumu potenciálního využití MSC spolu s Langerhansovými ostrůvky jako efektivnější léčba diabetu 1. typu. V dalších fázích je potřeba optimalizovat množství MSC i ostrůvků a vybrat vhodné metody pro plnění polymerních válečků touto buněčnou suspenzí.

Závěrem lze říct, že v rámci řešení diplomové práce jsem zvládla techniku izolace a kultivace mezenchymálních stromálních buněk z tuku laboratorního potkana a jejich charakterizaci doporučenými metodami. V druhé části práce jsem prokázala schopnost těchto buněk produkovat VEGF a možnost tuto produkci stimulovat modelově, a to chemicky navozenou hypoxií. Jako vedlejší nález bylo zjištěno, že při snížené schopnosti buněk proliferovat je současně snížena schopnost produkovat tento růstový faktor.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ALMALKI, Sami G. a Devendra K. AGRAWAL, 2016. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* [online]. 92(1-2), 41-51 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0301-4681. Dostupné z: doi:10.1016/j.diff.2016.02.005
2. AMBROSIO, Carlos, Helena ZOMER, Atanásio VIDANE a Natalia GONÇALVES, 2015. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* [online]. [cit. 2025-04-21]. ISSN 1178-6957. Dostupné z: doi:10.2147/SCCAA.S88036
3. AMORIN, Bruna, Ana Paula ALEGRETTI, Vanessa de Souza VALIM, Annelise Martins Pezzi da SILVA, Maria Aparecida Lima da SILVA, Felipe SEHN a Lucia SILLA, 2013. Characteristics of Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia. *CellBio* [online]. 02(01), 11-19 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2325-7776. Dostupné z: doi:10.4236/cellbio.2013.21002
4. ARFIANTI, Arfianti, Ulfah ULFAH, Leopold Sampetua HUTABARAT, Agnes Ivana G, Anisa Dwi BUDIARTI, Nabilla Sonia SAHARA a Nicko Pisceski Kusika SAPUTRA, 2023. Hipoxia modulates the secretion of growth factors of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BioMedicine* [online]. 13(3), 49-56 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2211-8039. Dostupné z: doi:10.37796/2211-8039.1416
5. BAHIR, Bushra, Mahmood S. CHOUDHERY a Ijaz HUSSAIN, 2020. Hypoxic Preconditioning as a Strategy to Maintain the Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells. In: S CHOUDHERY, Mahmood, ed. *Regenerative Medicine* [online]. IntechOpen [cit. 2025-04-21]. ISBN 978-1-83881-927-9. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.93217
6. BAO, Philip, Arber KODRA, Marjana TOMIC-CANIC, Michael S. GOLINKO, H. Paul EHRLICH a Harold BREM, 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research* [online]. 153(2), 347-358 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0022-4804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2008.04.023
7. BARTER, Matthew J, David A TURNER, Sarah J RICE, et al., 2024. SERPINA3 is a marker of cartilage differentiation and is essential for the expression of extracellular matrix genes during early chondrogenesis. *Matrix Biology* [online]. 133, 33-42 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0945-053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2024.07.004

8. BAYATI, Vahid, Mahmoud HASHEMITABAR, Roohollah GAZOR, Reza NEJATBAKHSH a Dariush BIJANNEJAD, 2013. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow – and adipose-derived stem cells: a comparative study. *Anatomy & Cell Biology* [online]. 46(2) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2093-3665. Dostupné z: doi:10.5115/acb.2013.46.2.113
9. BEREBICHEZ-FRIDMAN, Roberto a Pablo R. MONTERO-OLVERA, 2018. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal* [online]. 18(3), e264-277 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2075-0528. Dostupné z: doi:10.18295/squmj.2018.18.03.002
10. BIANCO, Paolo, Pamela Gehron ROBEY a Paul J. SIMMONS, 2008. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* [online]. 2(4), 313-319 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1934-5909. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2008.03.002
11. BOXALL, Sally A. a Elena JONES, 2012. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Stem Cells International* [online]. 2012, 1-12 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2012/975871
12. BUCEVIČIUS, Jonas, Gražvydas LUKINAVIČIUS a Rūta GERASIMAITĖ, 2018. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* [online]. 6(2) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors6020018
13. BUNNELL, Bruce A., 2021. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells* [online]. 10(12), 1-7 [cit. 2025-04-05]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10123433
14. BUSSER, Hélène, Cécile DE BRUYN, Frédéric URBAIN, et al., 2014. Isolation of Adipose-Derived Stromal Cells Without Enzymatic Treatment: Expansion, Phenotypical, and Functional Characterization. *Stem Cells and Development* [online]. 23(19), 2390-2400 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1547-3287. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2014.0071
15. CAPLAN, Arnold I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* [online]. 9(5), 641-650 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0736-0266. Dostupné z: doi:10.1002/jor.1100090504

16. CAPLAN, Arnold I., 2010. What's in a Name? *Tissue Engineering Part A* [online]. 16(8), 2415-2417 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1937-3341. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2010.0216
17. CAPLAN, Arnold I., 2017. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem Cells Translational Medicine* [online]. 2017-06-01, 6(6), 1445-1451 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2157-6564. Dostupné z: doi:10.1002/sctm.17-0051
18. DAMASCENO, Patricia Kauanna Fonseca, Thaís Alves DE SANTANA, Girlaine Café SANTOS, et al., 2020. Genetic Engineering as a Strategy to Improve the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2020-8-21, 8 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2020.00737
19. DING, Dah-Ching, Woei-Cherng SHYU a Shinn-Zong LIN, 2011. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation* [online]. 20(1), 5-14 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0963-6897. Dostupné z: doi:10.3727/096368910X
20. DOMINICI, Massimo, Kennek LE BLANC, I. MUELLER, et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [online]. 8(4), 315-317 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1465-3249. Dostupné z: doi:10.1080/14653240600855905
21. ELEUTERI, Sharon a Alessandra FIERABRACCI, 2019. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 20(18) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20184597
22. EL-SAWAH, Shady G., Hanan M. RASHWAN, Fayez ALTHOBAITI, Adil ALDHAHRANI, Eman FAYAD, El-Shaimaa SHABANA, Ehab I. EL-HALLOUS a Rehab M. AMEN, 2022. AD-MSCs and BM-MSCs Ameliorating Effects on The Metabolic and Hepato-renal Abnormalities in Type 1 Diabetic Rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 29(2), 1053-1060 [cit. 2025-04-30]. ISSN 1319-562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2021.09.067

23. FABRYOVA, Eva, Daniel JIRAK, Peter. GIRMAN, Klara ZACHAROVOVA, Andrea GALISOVA, Frantisek SAUDEK a Jan KRIZ, 2014. Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Vascularization of the Artificial Site for Islet Transplantation in Rats. *Transplantation Proceedings* [online]. 46(6), 1963-1966 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0041-1345. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2014.05.074
24. FERRONI, Letizia, Francesco DE FRANCESCO, Paolo PINTON, Chiara GARDIN a Barbara ZAVAN, 2022. Methods to isolate adipose tissue-derived stem cells. In: *Methods in Stem Cell Biology – Part B* [online]. Elsevier, s. 215-228 [cit. 2025-04-21]. *Methods in Cell Biology*. ISBN 978-0-323-90018-8. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mcb.2022.04.011
25. GHORBANI, Ahmad, Seyed Amir JALALI a Masoumeh VAREDI, 2014. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: A non-enzymatic method. *Tissue and Cell* [online]. 46(1), 54-58 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0040-8166. Dostupné z: doi:10.1016/j.tice.2013.11.002
26. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Alberto, Daniel GARCÍA-SÁNCHEZ, Monica DOTTA, José C RODRÍGUEZ-REY a Flor M PÉREZ-CAMPO, 2020. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells* [online]. 12(12), 1529-1552 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1948-0210. Dostupné z: doi:10.4252/wjsc.v12.i12.1529
27. GOSTIMSKAYA, Irina, 2022. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 87(8), 777-788 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297922080090
28. GROSS, Andre, Jonas SCHOENDUBE, Stefan ZIMMERMANN, Maximilian STEEB, Roland ZENGERLE a Peter KOLTAY, 2015. Technologies for Single-Cell Isolation. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 16(8), 16897-16919 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160816897
29. HADJIPANAYI, Ektoras, Robert A. BROWN, Vivek MUDERA, Dan DENG, Wei LIU a Umber CHEEMA, 2010. Controlling physiological angiogenesis by hypoxia-induced signaling. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010-09-15, 146(3), 309-317 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.05.037

30. HAO, Tianpao, Jingfeng CHEN, Shaoce ZHI, Qiyu ZHANG, Gang CHEN a Fuxiang YU, 2017. Comparison of bone marrow-vs. adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for attenuating liver fibrosis. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 2017-10-18, 14(6), 5956-5964 [cit. 2025-04-05]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2017.5333
31. HASS, Ralf, Cornelia KASPER, Stefanie BÖHM a Roland JACOBS, 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling* [online]. 9(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/1478-811X-9-12
32. HE, Qing, Zhaoyang YE, Yan ZHOU a Wen-Song TAN, 2018. Comparative study of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and adipose tissue. *Turkish Journal of Biology* [online]. 2018-12-10, 42(6), 477-489 [cit. 2025-04-05]. ISSN 1300-0152. Dostupné z: doi:10.3906/biy-1802-52
33. HERNIGOU, Philippe, 2015. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *International Orthopaedics* [online]. 39(4), 807-817 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0341-2695. Dostupné z: doi:10.1007/s00264-015-2716-8
34. HICKLIN, Daniel J. a Lee M. ELLIS, 2005. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2005-02-10, 23(5), 1011-1027 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2005.06.081
35. HILLARY, V. Edwin a S. Antony CEASAR, 2023. A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering. *Molecular Biotechnology* [online]. 65(3), 311-325 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-022-00567-0
36. HIRSILÄ, Maija, Peppi KOIVUNEN, Leon XU, Todd SEELEY, Kari I. KIVIRIKKO a Johanna MYLLYHARJU, 2005. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *The FASEB Journal* [online]. 2005-05-31, 19(10), 1308-1310 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.04-3399fje

37. HOLMES, David IR a Ian ZACHARY, 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* [online]. 6(2) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1465-6906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2005-6-2-209
38. HORWITZ, Edwin Mark, Kennek LE BLANC, Massimo DOMINICI, et al., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [online]. 7(5), 393-395 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1465-3249. Dostupné z: doi:10.1080/14653240500319234
39. HU, Kai a Bjorn R. OLSEN, 2017. Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Developmental Dynamics* [online]. 246(4), 227-234 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1058-8388. Dostupné z: doi:10.1002/dvdy.24463
40. HWANG, Nathaniel S., Chao ZHANG, Yong-Sung HWANG a Shyni VARGHESE, 2009. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *WIREs Systems Biology and Medicine* [online]. 1(1), 97-106 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1939-5094. Dostupné z: doi:10.1002/wsbm.26
41. CHAMBERLAIN, Giselle, James FOX, Brian ASHTON a Jim MIDDLETON, 2007. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* [online]. 2007-11-01, 25(11), 2739-2749 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2007-0197
42. CHEN, Guo, Shaohui DENG, Mingxiang ZUO, Jin WANG, Du CHENG a Bin CHEN, 2022. Non-viral CRISPR activation system targeting VEGF-A and TGF- β 1 for enhanced osteogenesis of pre-osteoblasts implanted with dual-crosslinked hydrogel. *Materials Today Bio* [online]. 16 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2590-0064. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtbio.2022.100356
43. CHEN, Hui, Xiao-Ning TAN, Shi HU, Ren-Qin LIU, Li-Hong PENG, Yong-Min LI a Ping WU, 2021. Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2021-5-28, 9 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.664168

44. CHEN, Michael J., Jonathan P. WHITELEY, Colin P. PLEASE, Andrea SCHWAB, Franziska EHLICKE, Sarah L. WATERS a Helen M. BYRNE, 2018. Inducing chondrogenesis in MSC/chondrocyte co-cultures using exogenous TGF- β : a mathematical model. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 439, 1-13 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0022-5193. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtbi.2017.11.024
45. CHEN, Qing, Peishun SHOU, Chunxing ZHENG, et al., 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death & Differentiation* [online]. 23(7), 1128-1139 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2015.168
46. CHEN, Siqu, Derek A WAINWRIGHT, Jennifer D WU, Yong WAN, Daniela E MATEI, Yi ZHANG a Bin ZHANG, 2019. Cd73: An Emerging Checkpoint for Cancer Immunotherapy. *Immunotherapy* [online]. 11(11), 983-997 [cit. 2025-04-05]. ISSN 1750-743X. Dostupné z: doi:10.2217/imt-2018-0200
47. CHUNG, Sook Hyun, Tzu-Ni SIN, Brian DANG, et al., 2022. CRISPR-based VEGF suppression using paired guide RNAs for treatment of choroidal neovascularization. *Molecular Therapy – Nucleic Acids* [online]. 28, 613-622 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2162-2531. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtn.2022.04.015
48. JEŽ, Mojca, Tuba BAS, Matija VEBER, Andrej KOŠIR, Tanja DOMINKO, Raymond PAGE a Primož ROŽMAN, 2013. The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 139(1), 195-204 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-012-1039-8
49. KARAOZ, Erdal, Ayça AKSOY, Selda AYHAN, Ayla Eker SARIBOYACI, Figen KAYMAZ a Murat KASAP, 2009. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 132(5), 533-546 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-009-0629-6
50. KHALILI, Amelia a Mohd AHMAD, 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 16(8), 18149-18184 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160818149

51. KISSELBACH, Lynn, Michael MERGES, Alexis BOSSIE a Ann BOYD, 2009. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* [online]. 59(1), 31-44 [cit. 2025-04-05]. ISSN 0920-9069. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-009-9190-3
52. KOBOLAK, Julianna, Andras DINNYES, Adnan MEMIC, Ali KHADEMHOSEINI a Ali MOBASHERI, 2016. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* [online]. 99, 62-68 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.016
53. KOU, Meng, Li HUANG, Jinjuan YANG, et al., 2022. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? *Cell Death & Disease* [online]. 13(7) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-022-05034-x
54. KRABBE, Christina, Jens ZIMMER a Morten MEYER, 2005. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. *APMIS* [online]. 113(11-12), 831-844 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0903-4641. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0463.2005.apm_3061.x
55. KRIZ, Jan, Daniel JIRAK, Greg J. VILK, Peter GIRMAN, David J. WHITE, Milan HAJEK a František SAUDEK, 2010. Vascularization of Artificial Beds for Pancreatic Islet Transplantation in a Rat Model. *Transplantation Proceedings* [online]. 42(6), 2097-2101 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0041-1345. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2010.05.088
56. KRIZ, Jan, Greg VILK, Delfina M. MAZZUCA, Philip M. TOLEIKIS, Paula J. FOSTER a David J.G. WHITE, 2012. A novel technique for the transplantation of pancreatic islets within a vascularized device into the greater omentum to achieve insulin independence. *The American Journal of Surgery* [online]. 203(6), 793-797 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0002-9610. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjsurg.2011.02.009
57. LEE, Cheng-Chia, Chao-Yi WU a Huang-Yu YANG, 2020. Discoveries of how cells sense oxygen win the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Biomedical Journal* [online]. 43(5), 434-437 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2319-4170. Dostupné z: doi:10.1016/j.bj.2020.05.019

58. LI, Jing, Shuangxi CHEN, Zhikai ZHAO, et al., 2017. Effect of VEGF on Inflammatory Regulation, Neural Survival, and Functional Improvement in Rats following a Complete Spinal Cord Transection. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2017-11-29, **11** [cit. 2025-04-29]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00381
59. LIU, Linqi, Jianhua GAO, Yi YUAN, Qiang CHANG, Yunjun LIAO a Feng LU, 2013. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biology International* [online]. 37(6), 551-560 [cit. 2025-04-10]. ISSN 1065-6995. Dostupné z: doi:10.1002/cbin.10097
60. LIU, Shan-Shan, Xiang FANG, Xin WEN, Ji-Shan LIU, Miribangvl ALIP, Tian SUN, Yuan-Yuan WANG a Hong-Wei CHEN, 2024. How mesenchymal stem cells transform into adipocytes: Overview of the current understanding of adipogenic differentiation. *World Journal of Stem Cells* [online], 16(3), 245-256 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1948-0210. Dostupné z: doi:10.4252/wjsc.v16.i3.245
61. LIU, Zhen-Ling, Huan-Huan CHEN, Li-Li ZHENG, Li-Ping SUN a Lei SHI, 2023. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 8(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-023-01460-1
62. LV, Feng-Juan, Rocky S. TUAN, Kenneth M.C. CHEUNG a Victor Y.L. LEUNG, 2014. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* [online]. 2014-06-01, 32(6), 1408-1419 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1681
63. MAHAJAN, Aditi a Shalmoli BHATTACHARYYA, 2023. Immunomodulation by mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation: Clinical implications during bone regeneration. *Molecular Immunology* [online]. 164, 143-152 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0161-5890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2023.11.006
64. MAHARLOOEI, Mohsen Khosravi, Mansooreh BAGHERI, Zhabiz SOLHJOU, et al., 2011. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* [online]. 93(2), 228-234 [cit. 2025-04-05]. ISSN 0168-8227. Dostupné z: doi:10.1016/j.diabres.2011.04.018

65. MAMACHAN, Merlin, Khan SHARUN, S. Amitha BANU, Sathish MUTHU, Abhijit M. PAWDE, Laith ABUALIGAH a Swapan Kumar MAITI, 2024. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration: Insights into molecular mechanism and therapeutic strategies. *Tissue and Cell* [online]. 88 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0040-8166. Dostupné z: doi:10.1016/j.tice.2024.102380
66. MARYCZ, Krzysztof, Justyna M. MEISSNER, Jakub GRZESIAK, Agnieszka ŚMIESZEK a Izabela KASPRZYK, 2016. Sphingosine-1-Phosphate Enhance Osteogenic Activity of Multipotent Stromal Cells Cultured in Biodegradable 3D Alginate Hydrogels. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* [online]. 2016-02-01, 6(2), 85-97 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2157-9083. Dostupné z: doi:10.1166/jbt.2016.1423
67. MAXSON, Scott, Erasmo A. LOPEZ, Dana YOO, Alla DANILKOVITCH-MIAGKOVA a Michelle A. LEROUX, 2012. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Translational Medicine* [online]. 2012-02-01, 1(2), 142-149 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2157-6564. Dostupné z: doi:10.5966/sctm.2011-0018
68. MCKINNON, Katherine M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* [online]. 120(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
69. MELINOVICI, Carmen Stanca, Adina Bianca BOȘCA, Sergiu ȘUȘMAN, et al., 2018. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 59(2), 455–467.
70. MITTAL, Balraj, 2019. Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. *Indian Journal of Medical Research* [online]. 149(5), 571-573 [cit. 2025-04-29]. ISSN 0971-5916. Dostupné z: doi:10.4103/ijmr.IJMR_1910_18
71. MOZAFFARI, Nima, Rahim MOHAMMADI, Nowruz DELIREZH, Rahim HOBENAGHI a Vahid MOHAMMADI, 2024. Effect of macrophages combined with supernatant of mesenchymal stem cell culture and macrophage culture on wound healing in rats. *Tissue and Cell* [online]. 90 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0040-8166. Dostupné z: doi:10.1016/j.tice.2024.102474

72. MUÑOZ-SÁNCHEZ, Jorge a María E. CHÁNEZ-CÁRDENAS, 2019. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 39(4), 556-570 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0260-437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.3749
73. MUSHAHARY, Dolly, Andreas SPITTLER, Cornelia KASPER, Viktoria WEBER a Verena CHARWAT, 2018. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A* [online]. 93(1), 19-31 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23242
74. MÚZES, Györgyi a Ferenc SIPOS, 2022. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells* [online]. 11(15) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11152300
75. NIE, Wen-Bo, Dan ZHANG a Li-Sheng WANG, 2020. Growth Factor Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 14, 1241-1256 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S243944
76. OTROCK, Zaher, Rami MAHFOUZ, Jawad MAKAREM a Ali SHAMSEDDINE, 2007. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 39(2), 212-220 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1079-9796. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcmed.2007.04.001
77. PANDEY, Arvind K., Eric K. SINGHI, Juan Pablo ARROYO, et al., 2018. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease. *Hypertension* [online]. 71(2) [cit. 2025-04-21]. ISSN 0194-911X. Dostupné z: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10271
78. PATEL, Deesha a Angela YULIA, 2022. Placental growth factor testing for pre-eclampsia. *Case Reports in Women's Health* [online]. 33 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2214-9112. Dostupné z: doi:10.1016/j.crwh.2022.e00387
79. PHAROUN, Jana, Jana BERRO, Jeanine SOBH, et al., 2024. Mesenchymal stem cells biological and biotechnological advances: Implications for clinical applications. *European Journal of Pharmacology* [online]. 977 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2024.176719

80. PITTENGER, Mark F., Alastair M. MACKAY, Stephen C. BECK, et al., 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* [online]. 1999-04-02, 284(5411), 143-147 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.284.5411.143
81. PRADO-YUPANQUI, Jhon W., Lourdes RAMÍREZ-ORREGO, Denny CORTEZ, Victor Juan VERA-PONCE, Stella M. CHENET, Juan R. TEJEDO a Rafael TAPIA-LIMONCHI, 2025. The Hidden Power of the Secretome: Therapeutic Potential on Wound Healing and Cell-Free Regenerative Medicine—A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 26(5) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms26051926
82. PULIDO-ESCRIBANO, Victoria, Bárbara TORRECILLAS-BAENA, Marta CAMACHO-CARDENOSA, Gabriel DORADO, María Ángeles GÁLVEZ-MORENO a Antonio CASADO-DÍAZ, 2022. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World Journal of Stem Cells* [online]. 2022-7-26, 14(7), 453-472 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1948-0210. Dostupné z: doi:10.4252/wjsc.v14.i7.453
83. RAMAKRISHNAN, Sundaram, Vidhu ANAND a Sabita ROY, 2014. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Hypoxia and Inflammation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* [online]. 9(2), 142-160 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1557-1890. Dostupné z: doi:10.1007/s11481-014-9531-7
84. RHEINLÄNDER, Andreas, Burkhard SCHRAVEN a Ursula BOMMARDT, 2018. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters* [online]. 196, 22-32 [cit. 2025-04-05]. ISSN 0165-2478. Dostupné z: doi:10.1016/j.imlet.2018.01.009
85. ROJEWSKI, Markus Thomas, Barbara Maria WEBER a Hubert SCHREZENMEIER, 2008. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 35(3), 168-184 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1660-3818. Dostupné z: doi:10.1159/000129013
86. ROSENBERG, Merilin, Nuno F. AZEVEDO a Angela IVASK, 2019. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports* [online]. 9(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-42906-3

87. SACHS, Patrick C., Michael P. FRANCIS, Min ZHAO, Jenni BRUMELLE, Raj R. RAO, Lynne W. ELMORE a Shawn E. HOLT, 2012. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell and Tissue Research* [online]. 349(2), 505-515 [cit. 2025-04-05]. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-012-1423-7
88. SAKAMOTO, Seiichi, Waraporn PUTALUN, Sornkanok VIMOLMANGKANG, Waranyoo PHOOLCHAROEN, Yukihiro SHOYAMA, Hiroyuki TANAKA a Satoshi MORIMOTO, 2018. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* [online]. 72(1), 32-42 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1340-3443. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-017-1144-z
89. SANDERSON, Michael J., Ian SMITH, Ian PARKER a Martin D. BOOTMAN, 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014(10) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795
90. SARJEANT, Kelesha a Jacqueline M. STEPHENS, 2012. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 4(9) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a008417
91. SENBANJO, Linda T. a Meenakshi A. CHELLAIAH, 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2017-03-07, 5(18), 1-6 [cit. 2025-04-05]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2017.00018
92. SHI, Zhen-Duo, Ying LIU, Zi-Qi TAO, et al., 2025. Apigenin Inhibits Recurrent Bladder Cancer Progression by Targeting VEGF- β . *Cancer Letters* [online]. [cit. 2025-04-06]. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2025.217676
93. SHIBUYA, Masabumi, 2012. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer* [online]. 2012-08-03, 2(12), 1097-1105 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1947-6019. Dostupné z: doi:10.1177/1947601911423031

94. SHOTORBANI, Behnaz Banimohamad, Effat ALIZADEH, Roya SALEHI a Abolfazl BARZEGAR, 2017. Adhesion of mesenchymal stem cells to biomimetic polymers: A review. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 71, 1192-1200 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.10.013
95. SONG, Haengseok a Keun-Hong PARK, 2020. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 67, 12-23 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2020.04.008
96. SONG, Lin a Rocky S. TUAN, 2004. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *The FASEB Journal* [online]. 2004-04-14, 18(9), 980-982 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.03-1100fje
97. STEFAŃSKA, Katarzyna, Rut BRYL, Lisa MONCRIEFF, Nelson PINTO, Jamil A. SHIBLI a Marta DYSZKIEWICZ-KONWIŃSKA, 2020. Mesenchymal stem cells – a historical overview. *Medical Journal of Cell Biology* [online]. 2020-09-05, 8(2), 83-87 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2544-3577. Dostupné z: doi:10.2478/acb-2020-0010
98. TETI, Gabriella, Stefano FOCAROLI, Viviana SALVATORE, Eleonora MAZZOTTI, Laura INGRA', Antonio MAZZOTTI a Mirella FALCONI, 2018. The Hypoxia-Mimetic Agent Cobalt Chloride Differently Affects Human Mesenchymal Stem Cells in Their Chondrogenic Potential. *Stem Cells International* [online]. 2018, 1-9 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2018/3237253
99. TOIVANEN, Pyry I., Tiina NIEMINEN, Johanna P. LAAKKONEN, Tommi HEIKURA, Minna U. KAIKKONEN a Seppo YLÄ-HERTTUALA, 2017. Snake venom VEGF Vammin induces a highly efficient angiogenic response in skeletal muscle via VEGFR-2/NRP specific signaling. *Scientific Reports* [online]. 7(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05876-y
100. TONG, Qiang, Gökhan DALGIN, Haiyan XU, Chao-Nan TING, Jeffrey M. LEIDEN a Gökhan S. HOTAMISLIGIL, 2000. Function of GATA Transcription Factors in Preadipocyte-Adipocyte Transition. *Science* [online]. 290(5489), 134-138 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.290.5489.134

101. VALENTI, Maria, Luca DALLE CARBONARE a Monica MOTTES, 2017. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 18(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18010041
102. VANCHINATHAN, Vijay, Neda MIZRAMANI, Ramya KANTIPUDI, Erich J. SCHWARTZ a Uma N. SUNDRAM, 2015. The Vascular Marker CD31 Also Highlights Histiocytes and Histiocyte-Like Cells Within Cutaneous Tumors. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 143(2), 177-185 [cit. 2025-04-05]. ISSN 1943-7722. Dostupné z: doi:10.1309/AJCPRHM8CZH5EMFD
103. VARKOUHI, Amir K., Ana Paula Teixeira MONTEIRO, James N. TSOPORIS, Shirley H. J. MEI, Duncan J. STEWART a Claudia C. DOS SANTOS, 2020. Genetically Modified Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Application in Critical Illness. *Stem Cell Reviews and Reports* [online]. 16(5), 812-827 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2629-3269. Dostupné z: doi:10.1007/s12015-020-10000-1
104. VATER, Corina, Philip KASTEN a Maik STIEHLER, 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia* [online]. 7(2), 463-477 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2010.07.037
105. WEGER, Meltem, Nicolas DIOTEL, Anne-Claire DORSEMANS, Thomas DICKMEIS a Benjamin D. WEGER, 2017. Stem cells and the circadian clock. *Developmental Biology* [online]. 431(2), 111-123 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2017.09.012
106. WENG, Zhijie, Yigan WANG, Takehito OUCHI, et al., 2022. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem Cells Translational Medicine* [online]. 11(4), 356-371 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2157-6564. Dostupné z: doi:10.1093/stcltm/szac004
107. WIENER, Diane M., Emily HUYNH, Ilakkiyan JEYAKUMAR, et al., 2024. An open-source FACS automation system for high-throughput cell biology. *PLOS ONE* [online], 19(3) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0299402

108. WISE, Lyn M., Marie K. INDER, Nicola C. REAL, Gabriella S. STUART, Stephen B. FLEMING a Andrew A. MERCER, 2012. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cellular Microbiology* [online]. 14(9), 1376-1390 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1462-5814. Dostupné z: doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01802.x
109. XU, Qi, Wenrun HOU, Baorui ZHAO, Peixin FAN, Sheng WANG, Lei WANG a Jinfang GAO, 2024. Mesenchymal stem cells lineage and their role in disease development. *Molecular Medicine* [online]. 30(1) [cit. 2025-04-21]. ISSN 1528-3658. Dostupné z: doi:10.1186/s10020-024-00967-9
110. YAMAZAKI, Yasuo, Koji TAKANI, Hideko ATODA a Takashi MORITA, 2003. Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) Exhibit Potent Activity through Their Specific Recognition of KDR (VEGF Receptor 2). *Journal of Biological Chemistry* [online]. 278(52), 51985-51988 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C300454200
111. YAMAZAKI, Yasuo, Yukiko MATSUNAGA, Yuko TOKUNAGA, Shinya OBAYASHI, Mai SAITO a Takashi MORITA, 2009. Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) Exclusively Vary Their Structures and Functions among Species. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 284(15), 9885-9891 [cit. 2025-04-21]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M809071200
112. YANG, Xu-Fang, Xu HE, Jian HE, et al., 2011. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science* [online]. 18(1), 1-9 [cit. 2025-04-05]. ISSN 1423-0127. Dostupné z: doi:10.1186/1423-0127-18-59
113. ZAKI, Abdel Kader A., Tariq I. ALMUNDARIJ a Faten A. M. ABO-AZIZA, 2020. Comparative characterization and osteogenic / adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from male rat hair follicles and bone marrow. *Cell Regeneration* [online]. 9(1), 1-14 [cit. 2025-04-05]. ISSN 2045-9769. Dostupné z: doi:10.1186/s13619-020-00051-7

114. ZHANG, Kexin, Xudong YANG, Qi ZHAO, Zugui LI, Fangmei FU, Hao ZHANG, Mingying ZHENG a Shiwu ZHANG, 2020. Molecular Mechanism of Stem Cell Differentiation into Adipocytes and Adipocyte Differentiation of Malignant Tumor. *Stem Cells International* [online]. 1-16 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8892300
115. ZHANG, Yongxin, Xu FENG, Bowen ZHENG a Yi LIU, 2024. Regulation and mechanistic insights into tensile strain in mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Bone* [online]. 187 [cit. 2025-04-21]. ISSN 8756-3282. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2024.117197
116. ZHONG, Chuanxin, Shan HE, Yuhong HUANG, Jianfeng YAN, Junqin WANG, Wentao LIU, Ju FANG a Fuzeng REN, 2024. Scaffold-based non-viral CRISPR delivery platform for efficient and prolonged gene activation to accelerate tissue regeneration. *Acta Biomaterialia* [online]. 173, 283-297 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2023.10.029
117. ZHOU, Xueke, Yimei HONG, Hao ZHANG a Xin LI, 2020. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2020-6-3, 8 [cit. 2025-04-21]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2020.00364
118. ŻUREK-BIESIADA, Dominika, Sylwia KĘDRACKA-KROK a Jurek W. DOBRUCKI, 2013. UV-activated conversion of Hoechst 33258, DAPI, and Vybrant DyeCycle fluorescent dyes into blue-excited, green-emitting protonated forms. *Cytometry Part A* [online]. 83A(5), 441-451 [cit. 2025-04-21]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22260