



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROTEOMICKÁ ANALÝZA INŽENÝROVANÉ HYALINNÍ CHRUPAVKY

PROTEOMIC ANALYSIS OF ENGINEERED HYALINE CARTILAGE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Kaňovská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Irena Koutná, Ph.D

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1781/2022 Akadematický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Zuzana Kaňovská**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Irena Koutná, Ph.D**

Název diplomové práce:

Proteomická analýza inženýrované hyalinní chrupavky

Zadání diplomové práce:

1. literární rešerše na zadané téma
2. izolace, kultivace a expanze chondrocytů
3. příprava vzorků pro proteomickou analýzu.
4. analýza vzorků s využitím vybraných instrumentálních metod

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Zuzana Kaňovská
studentka

doc. RNDr. Irena Koutná, Ph.D
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo sledovat expanzi chondrocytů, specializovaných buněk chrupavky, *in vitro* v kultivačním médiu s obsahem plazmy bohaté na krevní destičky, zhodnotit vliv přídavku růstových faktorů TGF- β 1 a IGF-1 do média a prozkoumat možnosti aplikace proteomické analýzy ve vývoji chrupavkových kloubních náhrad. Chondrocyty byly izolovány ze vzorků kloubních hyalinních chrupavek získaných ve spolupráci s FN Brno a expandovány v médiích. Vzniklé konstrukty byly následně analyzovány pomocí imunocytochemické metody, průtokové cytometrie a proteomické analýzy s využitím LC-MS/MS.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to observe the expansion of chondrocytes, specialized cartilage cells, *in vitro* in culture medium containing platelet rich plasma, to evaluate the effect of the addition of growth factors TGF- β 1 and IGF-1 to the medium and to explore the possibility of proteomic analysis application in the development of cartilage joint replacements. Chondrocytes were isolated from articular hyaline cartilage samples acquired in collaboration with the FN Brno and expanded in media. The resulting constructs were subsequently analyzed by immunocytochemical method, flow cytometry and proteomic analysis using LC-MS/MS.

KLÍČOVÁ SLOVA

chrupavka, inženýrství chrupavky, chondrocyt, plazma bohatá na krevní destičky, imunocytochemie, průtoková cytometrie, proteomická analýza, extracelulární matrix

KEYWORDS

cartilage, cartilage engineering, chondrocyte, platelet rich plasma, immunocytochemistry, flow cytometry, proteomic analysis, extracellular matrix

KAŇOVSKÁ, Zuzana. *Proteomická analýza inženýrované hyalinní chrupavky*. Brno, 2023.
Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148808>. Diplomová práce.
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
Vedoucí práce doc. RNDr. Irena Koutná, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí práce doc. RNDr. Ireně Koutné, Ph.D., konzultantce Mgr. Slavomíře Dluhošové a týmu prof. RNDr. Zbyňka Zdráhala, Dr. za skvělé vedení, pomoc a rady při řešení práce. Poděkovat chci také prof. RNDr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za ochotu a vstřícný přístup.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Chrupavčitá tkáň	9
2.1.1	Vznik a vývoj chrupavky	9
2.1.2	Chondrocyty	10
2.2	Hyalinní chrupavka	11
2.2.1	Extracelulární matrix hyalinní chrupavky	11
2.2.2	Změny chrupavky při osteoartróze	16
2.3	Kultivace chondrocytů in vitro	17
2.3.1	Složky použitých kultivačních médií	18
2.4	Průtoková cytometrie	19
2.4.1	Povrchové markery chondrocytů	20
2.5	Proteomická analýza chrupavky	21
2.5.2	Lýza vzorků	23
2.5.3	FASP	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Cíle práce	27
3.2	Použité chemikálie	27
3.3	Přístroje a pomůcky	28
3.4	Zpracování vzorků chrupavky	29
3.5	Izolace chondrocytů	29
3.6	<i>In vitro</i> kultivace buněk	30
3.7	Imunocytochemie	31
3.8	Průtoková cytometrie	32
3.9	Příprava vzorků pro proteomickou analýzu	33
3.9.1	Lýza vzorku	33

3.9.2	FASP.....	34
3.9.3	Ethylacetátová extrakce.....	34
3.9.4	Kyselá extrakce.....	35
3.10	Proteomická analýza.....	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
4.1	Kultivace.....	36
4.2	Imunocytochemie.....	36
4.3	Průtoková cytometrie.....	38
4.4	Proteomická analýza.....	39
5	ZÁVĚR A DISKUZE.....	46
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	50
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	64

1 ÚVOD

Degenerativní změny a zranění chrupavky jsou velmi častým problémem, vyžadujícím lékařskou intervenci. Ať už při poškození úrazem nebo při degenerativních onemocněních, zralá kloubní chrupavka se nedokáže sama dostatečně regenerovat, což má za následek nekrotické a transdiferenční procesy chrupavkové tkáně a nevyhnutelné selhání kloubu. U starších pacientů většinou dochází až k chirurgické výměně, a to především kyčelního a kolenního kloubu. U mladších pacientů však životnost kloubní náhrady nespĺňuje požadavky na aktivní životní styl a biomechanické ukotvení v kosti selhává, přičemž následné opravné reoperace jsou velmi obtížné a vzniká mnoho komplikací. Proto je potřeba využít slibných inovativních přístupů k léčbě, a tkáňové inženýrství se jeví být jedním z nich. Tkáňové inženýrství by umožnilo využít vlastní biologický materiál k vytvoření nové tkáně, která by sloužila k opravě či nahrazení opotřebované nebo poškozené plochy kloubní chrupavky. K vývoji plně funkčních tkáňových konstruktů je ale nutné zachovat fenotyp buněk a zajistit správnou stavbu a složení syntetizované tkáně s důrazem na extracelulární matrix, jejíž molekuly určují strukturu konstruktů, a definují jeho mechanické vlastnosti. Kultivace funkční chrupavčité tkáně s plně syntetizovanou a správně organizovanou mezibuněčnou hmotou je aktuálním problémem.

V této práci byly izolovány chondrocyty ze vzorků chrupavek získaných, v souladu s informovaným souhlasem, z nezátěžových zón chrupavek zdravých dárců po úrazu kolene a z hlavic velkých kloubů dárců, kteří podstoupili výměnu kloubu v důsledku artrotických změn. Následně byla provedena kultivace ve dvou variantách složení kultivačního média vhodných pro klinické aplikace, přičemž jako alternativa ke kontroverznímu fetálnímu bovinnímu séru byla použita plazma bohatá na krevní destičky v kombinaci s růstovými faktory (TGF- β 1 a IGF-1). Konstrukty byly analyzovány pomocí imunocytochemických metod, průtokové cytometrie a LC-MS/MS proteomický analýzy.

Srovnáním výsledků analýzy buněk, extracelulární matrix a srovnáním s nativní tkání bylo posouzeno, zda přídavek růstových faktorů do média napomáhá udržení buněčného typu funkčních chondrocytů a produkci klíčových složek matrix v nově syntetizované tkáni. Tato práce slouží také k posouzení možností aplikace proteomické analýzy v této oblasti. Úspěšná aplikace proteomické analýzy ve spojení s imunocytochemickou metodou a průtokovou cytometrií znamená pokrok ve vývoji *in vitro* kultivovaných chrupavkových

kloubních náhrad, přičemž metodika vypracovaná ve spolupráci s týmem pracovníků Centrální laboratoře Proteomiky pod vedením prof. RNDr. Zbyňka Zdrálaha, Dr. pro tuto práci bude sloužit dalšímu výzkumu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chrupavčitá tkáň

Chrupavka je specializovaným druhem polotuhé vazivové tkáně s velkým množstvím mezibuněčné hmoty. Tato hmota činí chrupavku pružnou a odolnou vůči mechanickému stresu. [1][2] Hlavní funkcí chrupavky je podpora měkkých tkání. Vedle své podpůrné funkce je úzce spojena s vývojem dlouhých kostí, které se většinou vyvíjí na základě chrupavčitého modelu. [2] Chrupavku tvoří buňky (chondrocyty) a velké množství mezibuněčné matrix (ECM), složené z vláken a základní hmoty. [3] Hojné zastoupení hydrofilních molekul v ECM zajišťuje vysokou hydrataci, což dodává chrupavce vysokou odolnost v tlaku při současné polotuhé konzistenci. Na základě různého zastoupení glykosaminoglykanů, proteoglykanů, elastických a kolagenních vláken v extracelulární matrix rozlišujeme tři druhy chrupavek, a to hyalinní, elastickou a vazivovou. Všechny tři typy postrádají krevní zásobení, lymfatické cévy i inervaci. [1][2][3] Jelikož jsou avaskulární, buňky jsou vyživovány buď difúzí z kapilár vazivového pouzdra (perichondria), nebo v případě kloubních chrupavek, které perichondrium postrádají, prostřednictvím synoviální tekutiny. [1][2] [3]

Hyalinní chrupavka, které se věnuje tato práce, je v detailu diskutována v kapitole 2.2.

2.1.1 Vznik a vývoj chrupavky

Chrupavka vzniká z třetího zárodečného listu mezodermy a jeho derivátu mezenchymu. Mitotické dělení nediferencovaných kmenových buněk mezenchymu vede k jeho zahuštění, kdy se progenitorové buňky hromadí v místě budoucí tkáně. [3][4] Z nich pak diferencují zaoblené chondroblasty, jenž se množí a tvoří hojnou mezibuněčnou hmotu. S přibývajícím množstvím mezibuněčné hmoty se od sebe chondroblasty vzdalují, a v případě hyalinní chrupavky vytváří izogenetické skupiny 2–4 buněk. [3] Jak růst chrupavky pokračuje, dochází k diferenciaci chondroblastů v chondrocyty, nakonec se buňky dostávají do stádia hypertrofického. [5] Hypertrofie chondrocytů je proces, při kterém buňky procházejí 10 až 20násobným zvětšením v důsledku metabolických změn. Pozoruhodné je, že hypertrofické chondrocyty mohou mít vrozený potenciál plasticity, znovu vstoupovat do buněčného cyklu a diferencovat v osteoblasty a jiné typy mezenchymálních buněk v prostoru kostní dřene. [6] Diferenciace chrupavky probíhá směrem od centra k periférii,

proto blíže středu umístěné buňky mohou již mít charakter chondrocytů, zatímco na povrchu nacházíme typické chondroblasty. Povrchový mezenchym se mění v chondroblasty a fibroblasty perichondria. [2]

Růst chrupavky probíhá dvěma procesy: intersticiálním a apozičním růstem. Zatímco intersticiální růst je založen na mitotickém dělení stávajících chondrocytů, apoziční růst souvisí s diferenciací buněk perichondria. V obou případech chondrocyty v chrupavce syntetizují kolagenní fibrily a ostatní složky matrix, přičemž zvýšení jejího množství vede k růstu chrupavky. Intersticiální růst je méně významným z obou procesů. Uplatňuje se pouze v časných fázích vývoje chrupavky a u chrupavek kloubních. [2] Kloubní chrupavka, která se skládá z klidových stádií chondrocytů, musí být obnovována zevnitř, neboť zde chybí perichondrium, které by doplňovalo buňky apoziční. [2][5] Tento způsob regenerace je však velice omezený, a se stoupajícím věkem prakticky zaniká.

2.1.2 Chondrocyty

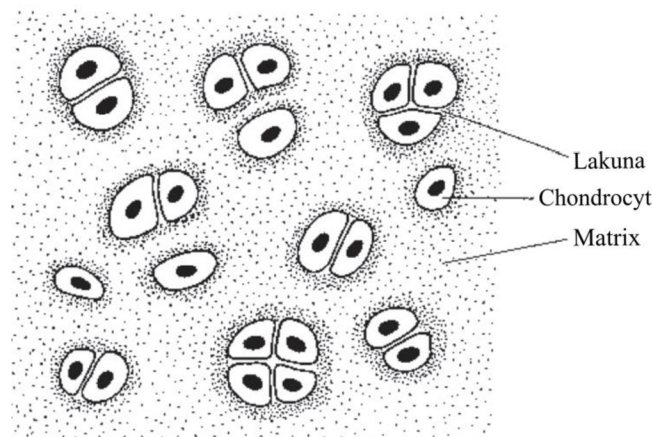
Chondrogenní buňky, tedy chondroblasty, resp. chondrocyty, jsou hlavním typem buněk chrupavky. Chondroblasty jsou metabolicky aktivní buňky nacházející se v perichondriu, produkující ECM a umožňující apoziční růst chrupavky. Chondroblasty postupně dozrávají v chondrocyty, které zůstávají jediným specializovaným typem buněk kloubní chrupavky. [7][8] Zralé chondrocyty mají kulový nebo oválný tvar, v místech vzájemného kontaktu se často přizpůsobují zploštěním. [3] Jejich velikost se pohybuje mezi 7 a 30 μm . Stejně jako tvar buněk, i jejich velikost závisí na hloubce vrstvy tkáně ve které se nachází. [8]

Jedním z typických rysů chrupavky je hypocelularita, obsah buněk v tkáni se pohybuje pouze okolo 1 až 2 %. [8] Chondrocyty jsou relativně metabolicky neaktivní, což je způsobeno absencí krevního zásobení a inervace tkáně. Metabolismus probíhá za nízkého tlaku kyslíku, který se pohybuje od 10 % na povrchu po méně než 1 % v hlubokých zónách. [9] Chondrocyty jsou zodpovědné za obrát matrix a udržování homeostázy tkáně, díky schopnosti reagovat na cytokiny, růstové faktory a mechanické podněty. [10][11] Změny ve funkci chondrocytů mohou způsobit degradaci matrix a ztrátu integrity kloubní chrupavky, což vede k rozvoji a progresi osteoartrózy. [10]

2.2 Hyalinní chrupavka

Hyalinní chrupavka je nejběžnějším typem chrupavky. Je přítomna na artikulačních plochách pohyblivých kloubů, tvoří žeberní chrupavky, chrupavky nosu, hrtanu, průdušek a průdušnice. [12] Strukturně jde o mléčně bílé ploténky pokryté vaskularizovaným hustým vazivem, tj. perichondriem, které však chybí u kloubních chrupavek. [2]

Důležitou vlastností zdravé kloubní chrupavky je, že je odolná vůči endochondrální osifikaci. Endochondrální osifikace včetně zrání chondrocytů a apoptózy je nezbytným procesem pro vývoj a růst skeletu, ale za fyziologických podmínek by neměla probíhat u kloubní chrupavky, která je chrupavkou trvalou a není určena k nahrazení kostí. Tato odolnost mizí u degenerativních onemocnění kloubů, jako je osteoartróza. [13]



Obrázek 1: Typická struktura chrupavky, upraveno podle [12]

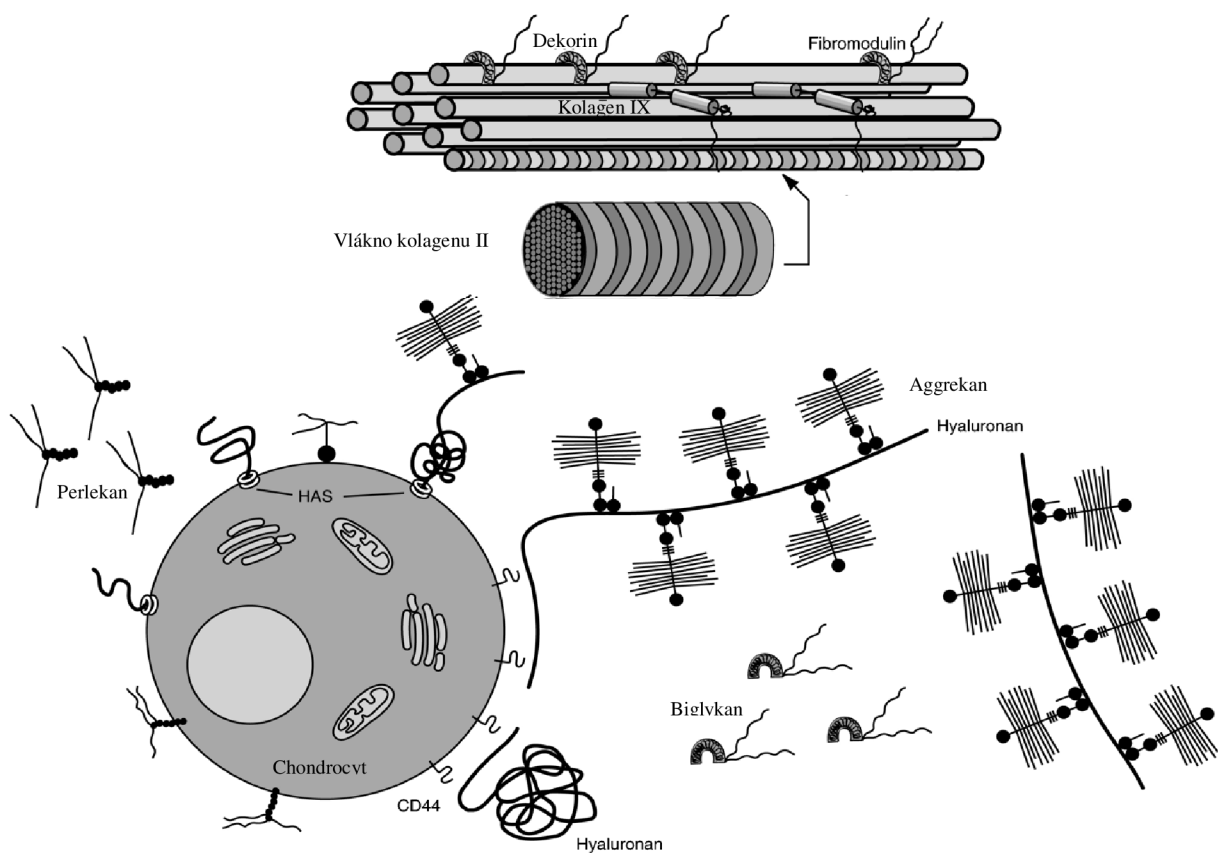
2.2.1 Extracelulární matrix hyalinní chrupavky

Mezibuněčná hmota chrání buňky před poškozením při namáhání kloubů, určuje typ a koncentraci látek dostupných pro buňky, a napomáhá zachovat fenotyp chondrocytů. Je tvořena amorfni a vláknitou složkou. Vlákniťou složku reprezentuje kolagen typu II. V amorfni složce můžeme najít celou řadu proteinů, jako jsou např. glykosaminoglykany (GAGs) či proteoglykany. Kolagenová struktura dává chrupavce její tvar a mechanické vlastnosti. Proteoglykany a další proteiny pomáhají stabilizovat strukturu, a připojují chondrocyty ke kolagenové síti. [14][15]

Aggrekan a vlákna kolagenu typu II jsou nejhojněji zastoupenými složkami ECM. Jsou vzájemně propojeny řadou proteinů vážících kolagen, včetně proteinu oligomerní matrix chrupavky (COMP), chondroadherinu a minoritních kolagenů. [16] Skrze spojovací protein je

aggrekan připojen na hyaluronan, čímž vznikají objemné agregáty zodpovědné za udržení vysoké hydratace tkáně. [9] Názory na přesné fungování obsažené vody v mechanické odolnosti chrupavky se různí. [17][18] Agregáty obsahují také řadu malých proteoglykanů bohatých na leucin (SLRPs), které pomáhají udržovat integritu tkáně a regulovat její metabolismus. [16] Jedinečná směs proteoglykanů a jejich upořádání v matrix dává chrupavce schopnost odolávat nadměrnému zatížení a zajišťovat pohyb kloubů bez tření. [19]

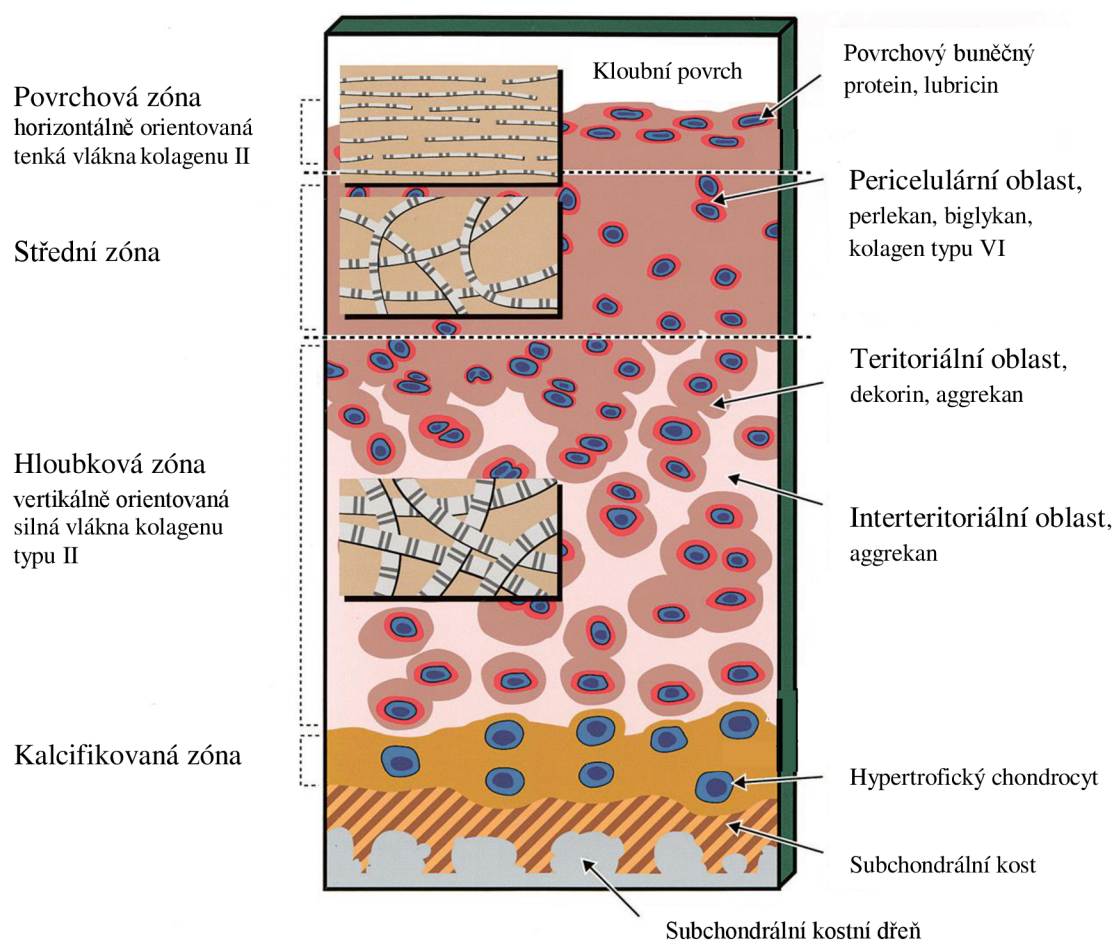
Kromě interakce s makrofibrilární kolagenovou sítí se hyaluronan váže také k buňkám pomocí povrchového buněčného receptoru CD44. Tento strukturální vztah buňky s její extracelulární matrix hraje důležitou roli v propojení metabolismu chondrocytů s obratem matrix. [20]



Obrázek 2: Uspořádání proteoglykanů v chrupavce. Zobrazen je chondrocyt. S povrchem buňky jsou spojeny proteoglykany a dva typy hyaluronanu: hyaluronan vázaný na hyaluronan syntázu (HAS) a hyaluronan vázaný na marker CD44. Aggrekan se váže na molekuly hyaluronanu vázané k buňce i uvolněné do matrix. Dekorin a fibromodulin jsou napojeny na síť kolagenu typu II. Upraveno podle [19].

Normální kloubní chrupavka je tvořena povrchovou, střední, neboli přechodnou, hloubkovou a kalcifikovanou zónou. [16] ECM obklopující chondrocyty se navíc dělí do zón podle vzdálenosti od buňky. Lze rozlišit tři oblasti – pericelulární, teritoriální a interteritoriální oblast. [21] Jednotlivé chondrocyty či izogenetické skupiny se společně s pericelulární matrix, která je

obklopuje, nazývají chondrony. [22] Pericelulární matrix je chemicky definována zejména přítomností perlekanu a jemné sítě vláken kolagenu typu VI, obecněji také vysokou koncentrací proteoglykanů, fibronektinu a vláken kolagenu typů II a IX. [22][23] Pericelulární matrix slouží jako přenašeč biomechanických signálů do chondrocytu, a vzhledem k avaskulární povaze chrupavky hraje zřejmě klíčovou roli v regulaci buněčné aktivity. [23]



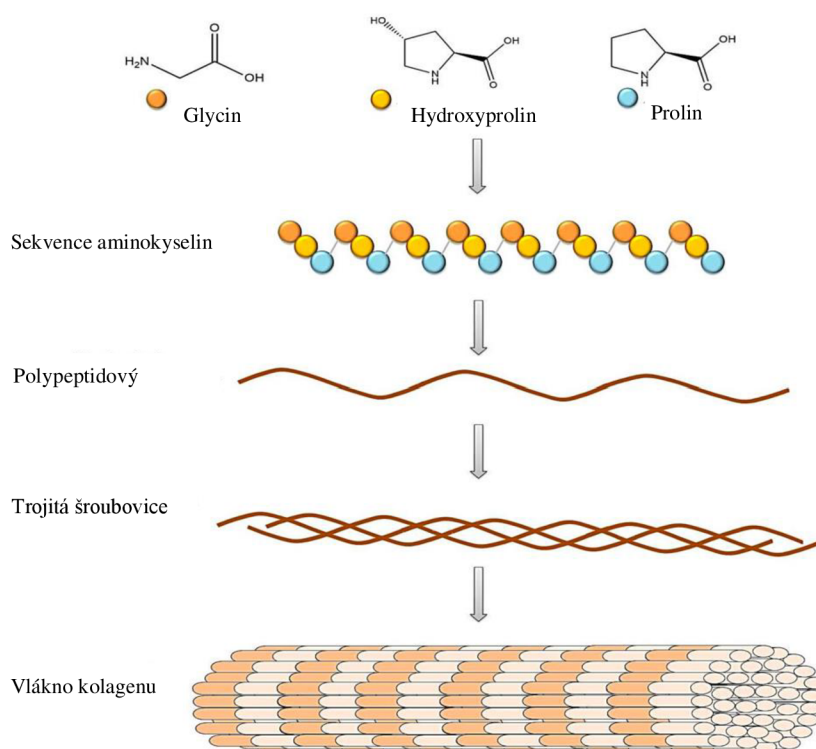
Obrázek 3: Struktura dospělé kloubní chrupavky zobrazující zóny a oblasti chrupavky, a vztah k subchondrální kosti. Upraveno podle [20].

2.2.1.1 Kolagen

Skupina kolagenních proteinů se vyznačuje vysokou rozmanitostí, pokud jde o strukturu, výskyt a funkci. Doposud bylo kvalifikováno 29 typů kolagenů. Nejdůležitější společnou vlastností je nadprůměrná mechanická pevnost, která vyplývá přímo z prostorové struktury. [24] Zásadní význam kolagenu jako scaffoldu mezibuněčné hmoty leží také v dalších

vlastnostech, jako jsou tepelná stabilita a schopnost specifických interakcí s jinými biomolekulami. [25]

Základní molekulární struktura je pravotočivá trojitá šroubovice složená ze tří levotočivých polypeptidových řetězců. Kolagenová vlákna se pak skládají z vysoce organizovaných trojitých šroubovic. [26] Vlákna vznikají agregací molekul kolagenu pomocí elektrostatických a hydrofobních interakcí. Další agregací vznikají příčné vazby, jako jsou kovalentní nebo nekovalentní vazby mezi dvojicemi aminokyselin ve vláknech. [27][28] Složení aminokyselin a jejich množství v polypeptidových řetězcích se u různých typů kolagenů liší. [27]



Obrázek 4: Schématické vyjádření struktury kolagenu. Upraveno podle [29].

Kolagen tvoří dvě třetiny suché hmotnosti dospělé kloubní chrupavky. Nachází se zde mnoho typů kolagenu, ale páteřní síť tvoří vlákna kolagenu typu II, což jsou heteropolymerní struktury s kovalentně navázanými molekulami kolagenu typu IX. Kolagen typu XI tvoří vnitřní vláknitou šablonu celé fibrily. [30] Předpokládá se, že základní NC4 doména kolagenu IX umožňuje interakce mezi ostatními fibrilami i dalšími makromolekulami matrix. [31] Kolagen typu IV se nachází v pericelulární matrix a umožňuje chondrocytům vnímat změny v okolní matrix a reagovat na ně. [23][32] Mezi další kolageny vyskytující se v kloubní chrupavce patří typ I, III, X, XI, XII a XIV. [30]

Orientace vláken kolagenu II, je v povrchové zóně chrupavky horizontální, a vlákna jsou tenká. V přechodné zóně je uspořádání vláken více nahodilé a je zde širší rozptyl průměrů. [20][30] V zóně hloubkové jsou pak fibrily orientovány vertikálně. Silná vlákna jsou orientována paralelně se shluky chondronů, obsah proteoglykanů je zde nejvyšší a obsah vody naopak nejnižší. [33] Toto uspořádání dává kloubní chrupavce anizotropní charakter, a umožňuje tak přenášet mechanické síly do celé tkáně, bez poškození chondrocytů. [20][33]

2.2.1.2 Aggrekan

Aggrekan je proteoglykan s mnoha funkčními doménami, které hrají důležitou roli při udržování normální funkce chrupavky. [19][34] Hraje prvořadou roli v zajištění osmotické odolnosti chrupavky, která je nezbytná pro vysokou odolnost k tlakovému zatížení tkáně. [19] Jedná se o objemný proteoglykan s četnými řetězci GAGs chondroitinsulfátu a keratansulfátu. [18] Celkový podíl sacharidové složky může představovat až 95 % hmotnosti. [17] Po sekreci dochází k samouspořádání do supramolekulární struktury s až 50 jednotkami navázanými na vlákno hyaluronanu. [19] Nekovalentní vazba je stabilizována spojovacím proteinem. [17] Proteinové jádro aggrekanu se skládá ze tří globulárních oblastí [35], a to G1, G2 a G3, z nichž každá obsahuje cysteinové zbytky podílející se na tvorbě disulfidických vazeb. [36] Oblasti G1 a G2 jsou odděleny krátkou interglobulární doménou a oblasti G2 a G3 jsou odděleny dlouhou doménou sloužící pro připojení GAGs. [37] Jejich dlouhé řetězce vytvářejí „bottle-brush“ strukturu. Jsou tedy uspořádány velmi hustě nejen vůči sobě, ale i vůči sousedním proteinovým jádrům. [38]

Struktura aggrekanu se v průběhu života mění v důsledku změn v jeho syntéze i degradaci. [18][19] Změnami v syntéze se mění struktura řetězců chondroitinsulfátu i keratansulfátu, zatímco při degradaci dochází ke štěpení všech složek agregátu. [18][34] Tyto změny negativně ovlivňují funkci chrupavky a vedou k úbytku aggrekanu. [34] Degradace aggrekanu může být také vyvolána přetížením a zánětem kloubu, a tento negativní efekt je dále zesílen u osteoartrické chrupavky. [18][19] Zvýšené hladiny fragmentů aggrekanu v synoviální tekutině se používají jako marker probíhající destrukce chrupavky u osteoartrózy. Pochopení struktury a funkce aggrekanu je klíčové pro vývoj efektivních léčebných metod. [18] Správná produkce Aggrekanu chondrocyty kultivovanými *in vitro* je jedním z klíčových předpokladů pro techniky obnovy chrupavky pomocí tkáňového inženýrství. [18]

2.2.1.3 Perlekan

Perlekan je objemný proteoglykan nesoucí heparansulfátové řetězce. [39] Jeho proteinové jádro je rozděleno do několika strukturních oblastí, které propůjčují perlekanu unikátní biofunkční diverzitu. [40] Perlekan se vyskytuje u povrchu buněk. [20] Je schopen interagovat s růstovými faktory i s povrchem buněk, a právě kombinací těchto interakcí koordinuje aspekty vývoje chrupavky a zprostředkovává adhezi matrix k buňkám. [39][20] Jeho role při vývoji chrupavky je klíčová a nepostradatelná pro správný vývoj, jelikož má jak funkci strukturní, tak funkci signálního uzlu. [40] Dokáže také nastartovat chondrogenní diferenciaci multipotentních buněk a udržovat fenotyp zralých chondrocytů *in vitro*. [39]

2.2.1.4 SLRPs

Malé proteoglykany bohaté na leucin, označované jako SLRPs (small leucin-rich proteoglycans), lze rozdělit do tří tříd, přičemž zástupce každé třídy můžeme v chrupavce identifikovat. [41] Třída I zahrnuje dekorin a biglykan, které oba vážou transformující růstový faktor beta 1 (TGF- β 1). [42] V dospělé kloubní chrupavce je dekorin přítomen v interteritoriální matrix, zatímco biglykan se nachází v matrix pericelulární. Dekorin je spojen s kolagenními fibrilami a nese jeden postranní řetězec chondroitinsulfátu nebo dermatansulfátu. [43] Podkovovitý tvar a rozměry dekorinu podporují jeho interakce s trojitou šroubovicí kolagenu. [44] Biglykan je objemnějším, méně prozkoumaným proteoglykanem. Nese po dvou postranních řetězcích chondroitinsulfátu a dermatansulfátu. [45]

Mezi SLRPs třídy II exprimované v chrupavce patří fibromodulin, lumikan a protein známý jako PRELP (proline arginine-rich end leucin-rich repeat protein). [46] Hladiny fibromodulinu a lumikanu narůstají s rostoucím stářím chrupavky. Fibromodulin má schopnost vázat se na povrch kolagenních vláken, a tím regulovat průměr fibril. [43] PRELP je pravděpodobně proteinem se schopností organizace matrix. [47]

Ze třídy III se v chrupavce nachází epiphykan. [48] Jeho význam leží nejspíše v organizaci matrix růstové ploténky. [19]

2.2.2 Změny chrupavky při osteoartróze

Osteoartróza je degenerativní onemocnění kloubů, které postihuje více než 250 miliónů lidí po celém světě, a způsobuje bolest, ztuhlost a poruchy pohybu. [49][50] Poškození chrupavky

při tomto typu onemocnění je nevratné. Cílem terapeutického výzkumu je tedy předejít poškození nebo podpořit přirozenou opravu tak, aby se obnovily fyziologické a funkční vlastnosti chrupavky. [51]

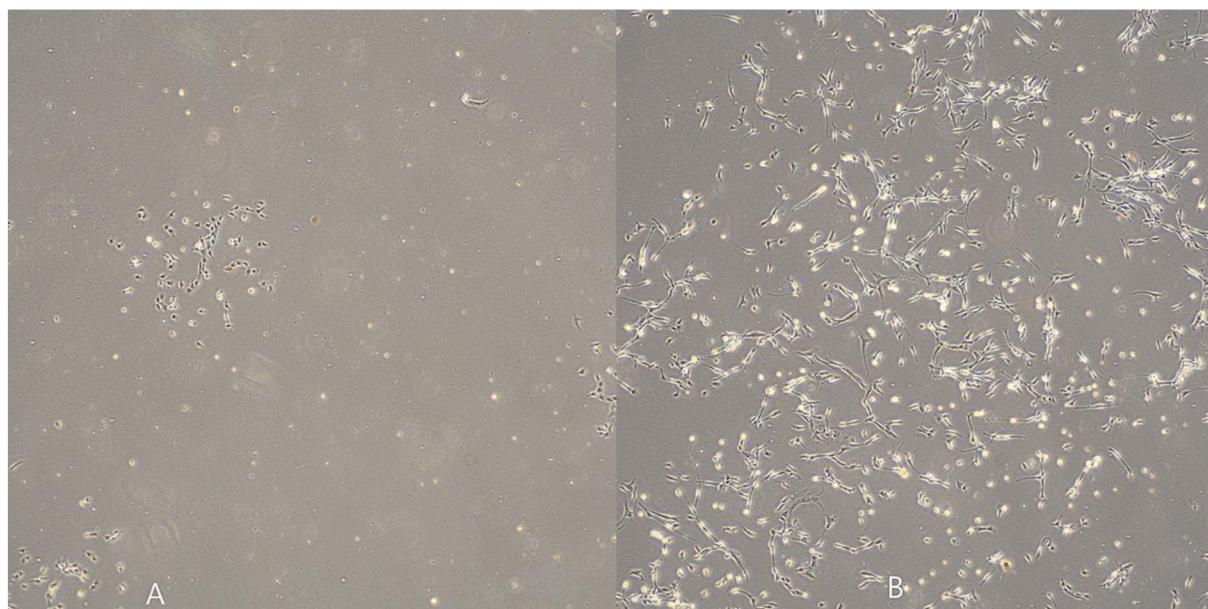
Osteoartróza (OA) se nejčastěji vyskytuje v kolenních a kyčelních kloubech a v kloubech na ruce, může ale postihnout i další oblasti. [50][52] Onemocnění je charakterizováno postupnou ztrátou chrupavky, což narušuje hladký souhyb protilehlých kostí v kloubu. K degeneraci kloubu přispívá i přestavba subchondrální kosti (včetně sklerózy a tvorby osteofytů) a dalších kloubních tkání (menisků, vazů, ad.). [53][54]

Ve zdravé chrupavce je anabolická syntéza a katabolická degradace složek ECM v rovnováze tak, aby byla zachována homeostáza kloubu. U OA změny mechanického prostředí kloubu, v důsledku stárnutí či poranění, tuto rovnováhu posouvají směrem k degradaci, přičemž rozklad kolagenu typu II a agrekanu metaloproteázami vede k progresivní degradaci kloubu. [55][56] Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou enzymy rozkládající ECM, čímž poškozují chrupavku a mění její biomechanické vlastnosti. MMP štěpí všechny typy makromolekul ECM. [57] Exprese genů kódujících MMP je přísně regulována. V normální chrupavce se MMP podílí na obratu matrix, zvýšená exprese je ale žádoucí pouze v procesu embryonálního vývoje a při hojení ran, kdy je produkce MMP základem pro proces remodelace a obnovy chrupavky. [57][58] MMP jsou vylučovány mnoha typy buněk včetně leukocytů, fibroblastů a chondrocytů. [59][60] Exprese některých z těchto metaloproteináz, stejně jako prozánětlivých mediátorů, je indukována mechanickou destabilizací kloubu. [55] Další faktory jako senescence stárnoucích chondrocytů [61], oxidační stres a zánět mohou rovněž zvýšit expresi MMP. Jako příklad působení metaloproteináz lze uvést kolagenázy (např. MMP-13) štěpící strukturní molekuly kolagenu typu II, a agrekanázy (např. ADAMTS-5) řídící degradaci agrekanu. [62] Degradaci ECM lze rozdělit do dvou fází. V degradační fázi metaloproteinázy tráví ECM za přítomnosti prozánětlivých cytokinů. Poté v kompenzační biosyntetické fázi dojde k proliferaci chondrocytů, s cílem opravit poškozenou ECM. Kompenzace je však narušena prozánětlivými cytokiny, a následně dojde k urychlení eroze chrupavky produkcí degradačních enzymů větším počtem chondrocytů. [63]

2.3 Kultivace chondrocytů *in vitro*

Po enzymatickém rozkladu tkáně z biopsie chrupavky, následné adhezi na kultivační povrch a expanzi *in vitro*, se v chondrocytech znovu rozbíhá buněčný cyklus, buňky proliferují a časem

získávají fenotyp buněk podobným fibroblastům. [64][65][66][67] Genetický expresní profil buněk je také hluboce změněn. Endogenní produkce kolagenu typu II a proteoglykanů je výrazně snížena a převážně nahrazena kolagenem typu I. [65][68] Hlavní metabolická aktivita těchto dediferencovaných buněk je zaměřena na proliferaci. [67][68] S každou další pasáží je dediferenciace výraznější, což znemožňuje získat cílové chondrocyty v dostatečném množství, a jde o hlavní překážku v buněčné terapii defektů chrupavky. Změna je dobře pozorovatelná na tvaru buněk. Chondrocyty mají zaoblený až polygonální tvar, zatímco fibroblastům podobné buňky jsou tvarově variabilní, často mají vřetenovitý či hvězdicovitý tvar, nebo podobu dlouhých vláken. [69] Bylo zkoumáno mnoho přístupů ke snížení dediferenciace během expanze in vitro, jako přidávání růstových faktorů do média, společná kultivace chondrocytů s mezenchymálními stromálními buňkami, kultivace v hypoxii nebo 3D kultivace. Tyto metody částečně snižují dediferenciaci, ale žádné řešení zatím není dostatečně uspokojivé. [68][70]



Obrázek 5: Dediferenciace chondrocytů při expanzi in vitro. A: Kultura chondrocytů v pasáži 0, je viditelný typický malý kulatý tvar buněk. B: Dediferencované buňky v kultuře v pasáži, protáhlý, hvězdicovitý tvar. Foto Mgr. Slavomíra Dluhošová.

2.3.1 Složky použitých kultivačních médií

Fetální bovinní sérum (fetal bovine serum, FBS) je univerzálním růstovým doplňkem médií pro buněčné a tkáňové kultury. FBS je přirozený koktejl většiny faktorů potřebných pro uchycení, růst a proliferaci buněk, účinný pro většinu typů živočišných buněk.

Použití séra v buněčných kulturách má však také řadu nevýhod. Jednak jde o špatně definovanou směs složek v kultivačním médiu s rozdíly mezi jednotlivými šaržemi. Sérum také

může obsahovat toxiny, viry, mykoplazmata a další nežádoucí xeno složky, které mohou vyvolat imunogenicitu. [71] Použití FBS není vhodné pro expanzi buněk určených pro klinické aplikace, protože hrozí riziko přenosu živočišných patogenů a proteinů na hostitele. [72] V neposlední řadě jsou zde etické argumenty týkající se získávání FBS z plodů skotu. [71] Proto se v této práci snažíme prozkoumat alternativní suplementy kultivačního média.

Jako alternativa k FBS byla v práci testována plazma bohatá na krevní destičky (platelet rich plasma, PRP). Plazma bohatá na krevní destičky (PRP) je koncentrovaný koktejl růstových faktorů a modulátorů zánětu, a je považována za potenciálně účinnou pro obnovu chrupavky. Ve velkém množství publikovaných studií byl prokázán pozitivní účinek PRP na proliferaci chondrocytů *in vitro*. Výsledky studií zaměřených na vliv PRP na diferenciaci chondrocytů se však od sebe velmi liší. [73][74]–[78]

Po aktivaci dokážou destičky v PRP uvolnit široké spektrum růstových faktorů. Mnoho z těchto anabolických cytokinů, jako jsou transformující růstový faktor beta 1 (TGF- β 1), inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a destičkový růstový faktor (PDGF), které podporují růst chondrocytů a působí protektivně. [79][80][81] Konkrétně mohou stimulovat proliferaci chondrocytů, podporovat syntézu aggrecanu a kolagenu typu II, zabraňovat apoptóze a snižovat katabolické účinky zánětlivých cytokinů a matrixových metaloproteináz. [82] Jedním z nejzajímavějších faktorů pro regeneraci chrupavčité tkáně je TGF- β 1, který je známý pro svoji roli v anabolických a regeneračních procesech, stimulaci proliferace a modulaci protizánětlivých procesů. [83][84][85]

2.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která umožňuje rychlou analýzu několika intra či extracelulárních markerů zároveň na úrovni jednotlivých buněk v roztoku. [86] Je možné analyzovat buňky rychlostí několika tisíců buněk za sekundu. [87] Průtoková cytometrie umožňuje jednak současnou charakterizaci smíšených populací různých typů buněk, zároveň ale i třídění buněk pro další analýzu. [86]

Při provádění analýzy je nutné nejprve z buněk vytvořit suspenzi. Suspenze buněk je přiváděna kapilárou do průtokové komory. Okolo kapiláry přitéká nosná kapalina, přičemž nejvyšší rychlost toku je uprostřed sloupce kapaliny, tedy u ústí kapiláry. Nosná kapalina je tak schopna strhávat jednotlivé buňky z jádra, uvádět je do pohybu, a tím je fokusovat. [87] Fokusované buňky jsou pak ozářeny laserem, sloužícím jako zdroj světla. [86]

U každé částice se analyzuje rozptyl viditelného světla a jeden nebo více fluorescenčních parametrů. Rozptyl viditelného světla se měří ve dvou různých směrech, v přímém směru 160–180° (Forward Scatter Channel neboli FSC), který může indikovat relativní velikost buňky, a v úhlu 90° (Side Scatter Channel neboli SSC), který indikuje vnitřní složitost nebo zrnitost buňky. Rozptyl světla je nezávislý na fluorescenci. [86][87]

Pro měření fluorescence je nutné vzorky obarvit pomocí fluorescenčních sond. Používají se fluorescenčně konjugované protilátky, fluorescenční barviva nebo transfekce buněk a následná exprese fluorescenčních proteinů. [86]

Světlo vyzařované fluorofory obsahuje spektrum vlnových délek, takže kombinací více fluoroforů může docházet k překrývání. Pro zvýšení specifičnosti se používají optické filtry a dichroická zrcadla, které filtrují a posouvají světlo k detektorům. [88] K detekci jsou nejčastěji využívány fotodiody nebo fotonásobiče. Signály jsou pak analyzovány počítačem a zapsány do datového souboru ve standardizovaném formátu. [86]

Průtoková cytometrie je výkonný nástroj, který nachází uplatnění v imunologii, molekulární biologii, bakteriologii, virologii, biologii rakoviny a monitorování infekčních onemocnění. Za posledních 30 let zaznamenala dramatický pokrok, který umožňuje precizní studium celého spektra markerů biologických buněčných procesů. [86]

2.4.1 Povrchové markery chondrocytů

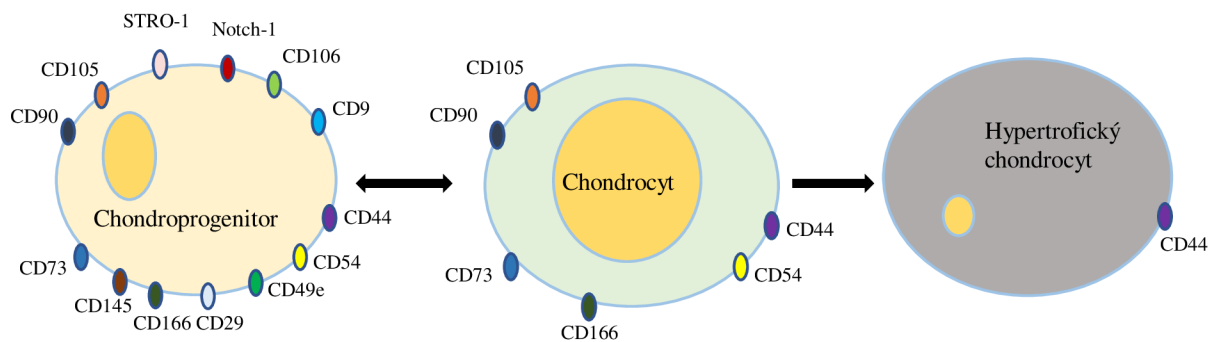
V této práci byly analyzovány povrchové markery CD44, CD54 a CD90.

CD44 (Hermesův antigen) a CD54 (intercelulární adhezivní molekula, ICAM-1) jsou markery chondrocytů a bylo prokázáno, že modulují jejich metabolismus. [89] Oba receptory tvoří propojení mezi povrchem chondrocytů a hyaluronan-proteoglykanovými agregáty v mezibuněčné hmotě. [21][34] Jde o markery specificky exprimované chondrocyty, slouží proto k jejich identifikaci. Poměr CD54/CD44 těchto markerů také může napovědět, v jakém stádiu dediferenciace se buňky v kultuře nacházejí. [90][91]

CD44 je buněčný povrchový protein umožňující navázání hyaluronanu, růstových faktorů a cytokinů, a má důležitou funkci při regulaci buněčné signalizace, proliferaci a migraci buněk. [92] Je nezbytný pro udržení homeostázy chrupavky. [93] Vysoká hladina exprese markeru CD44 je přímo spojena s dobrou chondrogení kapacitou buněk a se schopností produkovat matrix s vysokým obsahem glykosaminoglykanů a kolagenu typu II. [94]

CD54 neboli intracelulární adhezní molekula ICAM-1, je povrchový buněčný glykoprotein a adhezivní receptor. CD54 reguluje migraci leukocytů z cirkulace do místa zánětu, a zvýšená exprese tohoto markeru je proto spojena s reakcí na zánětlivou stimulaci. [95] Při absenci zánětlivé reakci je buněčná distribuce tohoto markeru snižena, v nepoškozené chrupavce nebyla exprese tohoto markeru vůbec zjištěna. [95][96]

CD90 je jedním z markerů mezenchymálních kmenových buněk a dalších buněk z nich diferencovaných. Jelikož z těchto buněk vznikají i chondroblasty, potažmo chondrocyty, slouží k potvrzení mezenchymálního původu buněk. [94][97][98] Vysoká exprese markeru CD90 také souvisí s dobrou chondrogenní kapacitou buněk. [94]



Obrázek 6: Rozdíl povrchových markerů mezi chondroprogenitorovými buňkami, chondrocyty a hypertrofickými chondrocyty. Chondroprogenitorové buňky diferencují v chondrocyty, které buď zůstávají v klidu, zpětně dediferencují nebo se terminálně diferencují v hypertrofické chondrocyty. Ty dále podléhají vaskularizaci a endochondrální osifikaci v kost. Upraveno podle [91].

2.5 Proteomická analýza chrupavky

Proteomická analýza založená na hmotnostní spektrometrii se stává stále výkonnější technologií nejen pro identifikaci velkého množství proteinů, ale také pro jejich kvantifikaci. [99] Jde o ekonomickou a účinnou metodu, umožňující sledování kompletního profilu molekul nejen v extracelulární matrix. Porovnáním profilů nově kultivovaných tkání s tkání nativní lze posoudit, jak moc se dokážeme profilu nativní tkáně přiblížit. [100] V žádné z dostupných studií zatím nebylo provedeno srovnání těchto proteomických profilů se zaměřením na ECM, navíc se srovnáním tkání pocházejících od dárců zdravých a dárců trpících osteoartrózou. Hlavními oblastmi, na které se ve velkém zaměřují studie s využitím proteomické analýzy chrupavky, jsou výzkum osteoartrózy a chondrogenese.

Pro přesné stanovení složení tkáně pro kontrolu kvality tkáňových implantátů je nutné kvantifikovat velké množství proteinů v malém objemu vzorku. Výkonné techniky „shotgun“

proteomiky umožňují simultánní identifikaci a kvantifikaci tisíců proteinů v biologických vzorcích, například v extracelulární matrix chrupavky. [101] Při typickém shotgun experimentu je generována směs peptidů enzymatickou digescí proteinů v roztoku nejčastěji s využitím trypsinu, která je následně podrobena LC-MS/MS analýze. [102][103] Identifikace peptidů se dosáhne porovnáním tandemových spekter získaných z fragmentace peptidů s databázemi, a odvození proteinů se provádí přiřazením peptidových sekvencí k proteinům. [103]

Opačný přístup je využíván u technik „top-down“, která se využívá k charakterizaci neporušených proteinů. Metoda top-down má však ve srovnání se shotgun proteomickou značná omezení, která jsou způsobena obtížemi s frakcionací, ionizací a fragmentací proteinů. Shotgun proteomiku lze proto pro analýzu proteinů využít univerzálněji. [103]

2.5.1.1 LC-MS/MS

Hmotnostní spektrometrie je založena na separaci iontů na základně poměru hmotnosti a náboje (m/z). Analyt je ionizován, ionty jsou rozděleny v hmotnostním analyzátoru dle m/z a zaznamenány detektorem. Výstupem je hmotnostní spektrum zobrazující závislost intenzity iontů na m/z . Existuje řada přístupů k vytvoření iontů analytu v plynné fázi, jako jsou například elektronová ionizace (EI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace elektrosprejem (ESI), fotoionizace (APPI), ionizace indukčně vázaným plazmatem (ICP) či laserem za asistence matrice (MALDI). [104] Používá se několik typů hmotnostních analyzátorů jako jsou kvadrupól (Q), magnetický analyzátor, iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF), Orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR). Jako detektory se využívají elektronové násobiče, fotonásobiče nebo faradayovy klece. [105]

Kombinací hmotnostních analyzátorů lze provádět tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). Dvě hmotnostní analýzy probíhají v sérii, často s fragmentačním krokem mezi nimi. Kombinovat lze analyzátoři stejného typu, například trojitý kvadrupólový analyzátor nebo analyzátor TOF/TOF, i různého typu, kombinace Q-TOF či Q-Trap. [106]

Předností LC-MS/MS je vysoká analytická selektivita. Předpřipravený vzorek se dávkuje do systému kapalinové chromatografie, která slouží k separaci peptidů. Eluent s analytem pokračuje do iontového zdroje, nejčastěji ESI, kde jsou vytvořeny ionty v plynné fázi. První hmotnostní analyzátor filtruje přicházející ionty a umožňuje selektivní vstup iontů do kolizní cely, kde jsou prekurzorové ionty fragmentovány na ionty produktové, které jsou následně analyzovány v posledním stupni tandemového hmotnostního spektrometru. [106]

2.5.2 Lýza vzorků

Prvním krokem proteomický analýzy je lýza buněk, při níž se naruší nebo zničí buněčná membrána, v tomto případě s cílem uvolnit bílkoviny z buňky. Běžně se využívají fyzikální (mechanické a tlakové homogenizátory, sonikace, opakované mražení a rozmrazování), chemické (detergenty, osmotický tlak) a enzymatické metody.

Detergenty, nazývané také povrchově aktivní látky, mají schopnost narušovat hydrofobně-hydrofilní interakce. Vzhledem k tomu, že buněčná membrána je z velké části tvořena dvojvrstvou amfifilních fosfolipidů, lze detergenty využít k jejímu rozrušení. [107] Iontový detergent dodecylsírán sodný (SDS) je široce využíván k lýze buněk díky vysoké afinitě k vazbě k proteinům a jejich rychlé a účinné solubilizaci. [107][108] Použití povrchově aktivních látek, a to i v malých koncentracích, může znemožnit enzymatické štěpení a výrazně zhoršit citlivost LC-MS/MS analýzy kvůli jejich snadné ionizovatelnosti a vysoké koncentraci ve srovnání s peptidy, proto je potřeba do protokolu zahrnout purifikační kroky, sloužící k jejich odstranění. [103][109][110]

2.5.3 FASP

Široce využívanou metodou k odstraňování detergentů, solí a redukčních činidel pro analýzu LC-MS/MS je příprava vzorku za pomoci filtru (FASP), [111] která současně slouží ke generování peptidů digescí surových lyzátů. Metoda umožňuje analýzu buněk a tkání lyzovaných detergentem, a je tedy vhodná pro studium celých proteomů a frakcí obsahujících biologické membrány. Mezi hlavní výhody metody patří, že poskytuje vzorky bez nukleových kyselin, lze ji použít pro vysoké koncentrace detergentů, nedochází ke srážení a koncentrace vzorku zůstává vysoká. [112]

Při této přípravě se vzorky proteinů obsahující SDS nanasou na filtr a promyjí se roztokem močoviny, aby se rozrušily vzniklé SDS micely. Na filtrační jednotce se pak odehrává odstranění detergentů, výměna pufru, redukce a alkylace cysteinových zbytků pomocí jodacetamidu a enzymatická digesce trypsinem. [111] Proteiny jsou redukovány, aby došlo k rozrušení disulfidických vazeb, a následně alkylovány, na cysteinových -SH skupinách, aby nedocházelo k vytváření nežádoucích nových disulfidických vazeb. [113] Vzhledem k tomu, že schopnost filtrační membrány zadržet vysokomolekulární látky (proteiny

a DNA) a propustit nízkomolekulární látky (nečistoty a natrávené peptidy) při eluci je klíčová pro průběh metody, výběr filtru s požadovanými separačními vlastnostmi je zásadní. [110]

Proteinový lyzát je vysoce heterogenní směs peptidů s různými vlastnostmi. Selektivní štěpení napomáhá normalizaci biochemické heterogenity proteinů, a tvoří méně heterogenní směs peptidů. Při vícenásobném zastoupení proteinu ve formě dílčích peptidů se také zvyšuje pravděpodobnost identifikace peptidů, a tím i proteinů, s nízkou abundancí. [103]

Trypsin se stal standardem pro štěpení proteinů na peptidy pro shotgun proteomiku. Trypsin je serinová proteáza, která hydrolyticky štěpí za C-konci zbytků argininu a lysinu. Tato sekvenčně specifická informace je použita k filtrování identifikovaných peptidů. [103][114]

Vzhledem ke střednímu obsahu lysinu a argininu ve většině proteinů jsou tryptické peptidy obvykle relativně krátké, ale dostatečně jedinečné na to, aby nesly sekvenční informaci. [115]

Pro citlivou detekci peptidů je nutné detergenty dokonale odstranit, k čemuž slouží kromě FASP i další krok přípravy vzorku extrakce ethylacetátem, který účinně odstraňuje zbytkový SDS a separuje jej od peptidové fáze. [116]

Kyselá extrakce je posledním krokem přípravky vzorku před měřením. Suché peptidy jsou rozpuštěny v acetonitrilu a kyselině mravenčí, které slouží jako mobilní fáze v navazující kapalinové chromatografii.

2.5.3.1 UHPLC

Kapalinová chromatografie je variantou kolonové chromatografie. K separaci sloučenin dochází na základě různé retence v chromatografickém systému, na základě interakcí se stacionární a mobilní fází. V proteomickém výzkumu se využívají přístupy vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Instrumentace se skládá ze zásobníků mobilních fází, odplynovače, směšovače, vysokotlakého čerpadla, dávkovače vzorku, náplňové kolony umístěné v termostatu, detektoru a sběrače frakcí. [117]

Pro proteomickou analýzu a další aplikace pracující s velmi komplexními vzorky, jako jsou tryptické peptidy, je nezbytná vysoce účinná separace složek na začátku analýzy. U takto složitých vzorků nestačí konvenční systémy vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC), ale využívají se strategie umožňující rychlejší separaci s vyšším rozlišením, jako například extrémně vysokotlaká kapalinová chromatografie (UHPLC). [120] UHPLC využívá k separaci kolony s menšími částicemi (<2 μm) a trojnásobný tlak (1500 bar) oproti HPLC (2,5–5 μm , 400 bar). Vyšší tlak v systému umožňuje využití kolon plněných

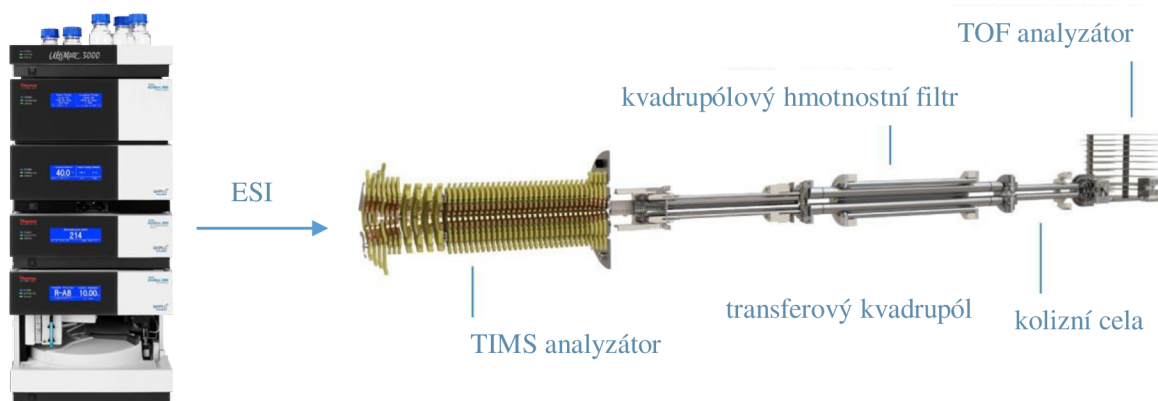
menšími částicemi, a tím i rychlejší a účinnější analýzy a separace složitých vzorků s dobrým rozlišením. [118][119] Spojení UHPLC a hmotnostní spektrometrie se zdá být nejlepším přístupem z hlediska citlivosti a selektivity pro stanovení analytů v nízkých koncentracích ve složitých vzorcích. Tato strategie se stala široce používanou v mnoha oblastech, nejen v proteomické analýze. Využití UHPLC však vyžaduje MS instrumentaci nejnovější generace. [120]

2.5.3.2 TimsTOF

V této práci proběhla analýza na přístroji TimsTOF Pro, který se skládá z elektrospreje, duálního TIMS (Iontová mobilní spektrometrie se záchytem iontů) analyzátoru, transferového kvadrupólu, kvadrupólového hmotnostního filtru, kolizní cely a TOF analyzátoru. TIMS je především separační technikou v plynné fázi, která přidává další separační krok k UHPLC, a slouží také k akumulaci a koncentraci iontů, což umožňuje zvýšení citlivosti a rychlosti analýzy vysoce komplexních vzorků. [121]

Elektrosprej je ionizační technika umožňující propojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Za využití elektrické energie převádí ionty z roztoku do plynné fáze. Vložení vysokého napětí (jednotky kV) mezi sprejovací kapiláru a vstup do vakuované části hmotnostního spektrometru vzniká elektrické pole o vysoké intenzitě. Kapilárou je přiváděn roztok vzorku z kapalinové chromatografie. Elektrické pole způsobuje polarizaci rozpouštědla a hromadění iontů se stejným nábojem v blízkosti menisku kapaliny na špičce sprejovací kapiláry. Ionty s opačným nábojem se od něj vzdalují, dochází k deformaci menisku kapaliny a tvoří se tzv. Taylorův kužel. Z jeho vrcholu tryská jemný proud kapaliny, který se rozpadá na primární nabitě kapky, jež se vzájemně odpuzují a tvoří jemný sprej. [122] Ionty generované elektrosprejem jsou přeneseny do vakuového systému skrze skleněnou kapiláru, vychýleny o 90° a vstupním trychtýřem soustředěny do tunelu TIMS. Tunel se skládá z dvojic na sobě umístěných elektrod, na které je aplikováno radiofrekvenční pole, které je překrýváno stejnosměrným polem v podélném směru. Plyn vycházející z kapiláry proudí uzavřeným tunelem pod tlakem. Ionty vstupující do tunelu jsou zadrženy proudem plynu a protisměrným elektrickým polem. Pohyb iontů se zastaví v místě, kde se tyto dvě síly vyrovnají. Protože odpor proti plynu je úměrný koliznímu průřezu iontů, jsou ionty s různou pohyblivostí zadrženy v různých polohách v délce tunelu. Ionty s vysokou pohyblivostí jsou u vstupu a ionty s nízkou pohyblivostí u výstupu z tunelu. Po uplynutí požadované doby

zadržení jsou ionty eluovány snížením intenzity elektrického pole. Eluované ionty jsou fokusovány výstupním trychtýřem a prochází transferovým kvadrupólem. Prekurzorové ionty jsou k fragmentaci v kolizní cele selektovány kvadrupólovým hmotnostním filtrem. [123][124] Fragmentové ionty jsou v analyzátoru doby letu urychleny elektrickým polem směrem k detektoru. Je měřena doba průletu iontu letovou trubicí, která závisí na poměru m/z , přičemž ionty s nejmenším m/z jsou detekovány jako první. Doba přiletu iontů je převedena planárním detektorem na elektrický signál. [125] TOF analyzátor se v tomto uspořádání využívá kvůli vysoké rychlosti záznamu dat. [126]



Obrázek 7: Schéma instrumentace. UHPLC, ESI, TimsTOF. Upraveno podle [121][127].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíle práce

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Izolace, kultivace a expanze chondrocytů
3. Příprava vzorků pro proteomickou analýzu
4. Analýza vzorků s využitím vybraných instrumentálních metod

3.2 Použité chemikálie

- Acetonitril (34851, Sigma-Aldrich)
- Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies)
- Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (Cell Signaling)
- Anti-Collagen II Antibody, ab34712, rabbit polyclonal (Abcam)
- Anti-Hu CD44 (Invitrogen)
- Anti-Hu CD54 (ICAM-1) (Invitrogen)
- Anti-Hu CD90 (Thy-1) (Invitrogen)
- BD Perm/Wash Buffer (BD Biosciences)
- BD Permeabilization/Fixation Solution (BD Biosciences)
- Collagenase Type II, 270-280 U/ml (Gibco™)
- DMEM/F12 (1:1) (Gibco™)
- DTT (dithiothreitol, R0861, Thermo Fisher Scientific)
- Ethyl acetate (34858, Sigma-Aldrich)
- Fibronectin Human Plasma (Sigma-Aldrich)
- Heparin (Zentiva)
- Human Pro Collagen 1 alpha 1 Antibody, mouse monoclonal IgG2b (R&D SYSTEMS)
- IGF1 (Recombinant Human IGF1 Protein, Abcam)
- Iodoacetamid (iodoacetamide, I1149, Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (7647-01-0, PENTA)
- Kyselina mravenčí (85178, Thermo Fisher Scientific)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)

- PBS (phosphate buffer saline, Gibco™)
- Penicilin-Streptomycin, 5000 U/ml (Gibco™)
- Persíran amonný (A3678, Sigma-Aldrich)
- Polyethylenglykol, 95172 (Sigma-Aldrich)
- PRP (TO FNUSA/CTEF FNUSA)
- Recombinant human IGF1 Active (Insulin-like Growth Factor, Abcam)
- Sodium dodecyl sulfát (20765.03, SERVA)
- TGF- β (Abcam)
- Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 37190.02, SERVA)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Trypan Blue Stain 0,4% (Invitrogen™)
- Trypsin (EMS0005, Sigma-Aldrich)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich)
- Uhličitan amonný (A6141, Sigma-Aldrich)
- Urea (urea, U5128, Sigma-Aldrich)
- ZellShield® (BioConsult)

3.3 Přístroje a pomůcky

- Analytická váha ABJ 120-4M (KERN)
- Aurora C18, ID 75 μ m, 250 mm (Ion Opticks)
- Butterfly Heater (Phoenix S&T)
- CaptiveSpray (Bruker)
- Cellcounter Countess II (Invitrogen™)
- Centrifuga BR4i (Jouan)
- Fluorescenční mikroskop Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)
- Inkubátor Sanyo MCO-19AIC (UV) CO2 Incubator
- Inverzní mikroskop Olympus CKX53
- Laminární box CleAir® Biological Safety Cabinet (CHC LAB)
- Microcon-30kDa Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore)
- Průtokový cytometr CytoFLEX B5-R3-V2 (Beckman Coulter)
- SpeedVac concentrator (e.g. SPD130DLX – Thermo Fisher Scientifics)

- Spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific)
- Termoblok EAST (Biosan)
- Thermomixer C (Eppendorf)
- TimsTOF Pro System (Bruker)
- UltiMate™ 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific)
- Vortex V-1 plus (Biosan)

3.4 Zpracování vzorků chrupavky

Princip: Vzorky chrupavčité tkáně musí být mechanicky upraveny pro následnou izolaci chondrocytů. Zároveň bylo také nutné odebrat část nativní tkáně pro proteomickou analýzu.

Vzorky chrupavky byly získány od pacientů Ortopedické kliniky FN Brno. Vzorky pocházely z kolenních nebo kyčelních kloubů. Byly odebrány dvěma typům pacientů. První skupinu vzorků tvoří chirurgické resekáty pocházející od pacientů s indikovaným pokročilým stádiem OA, kteří podstoupili operaci totální endoprotézy. Druhá skupina vzorků pochází od dárců po úrazu, bez diagnózy OA. Tyto vzorky byly získány při artroskopických zákrocích, proto bylo menší množství materiálu.

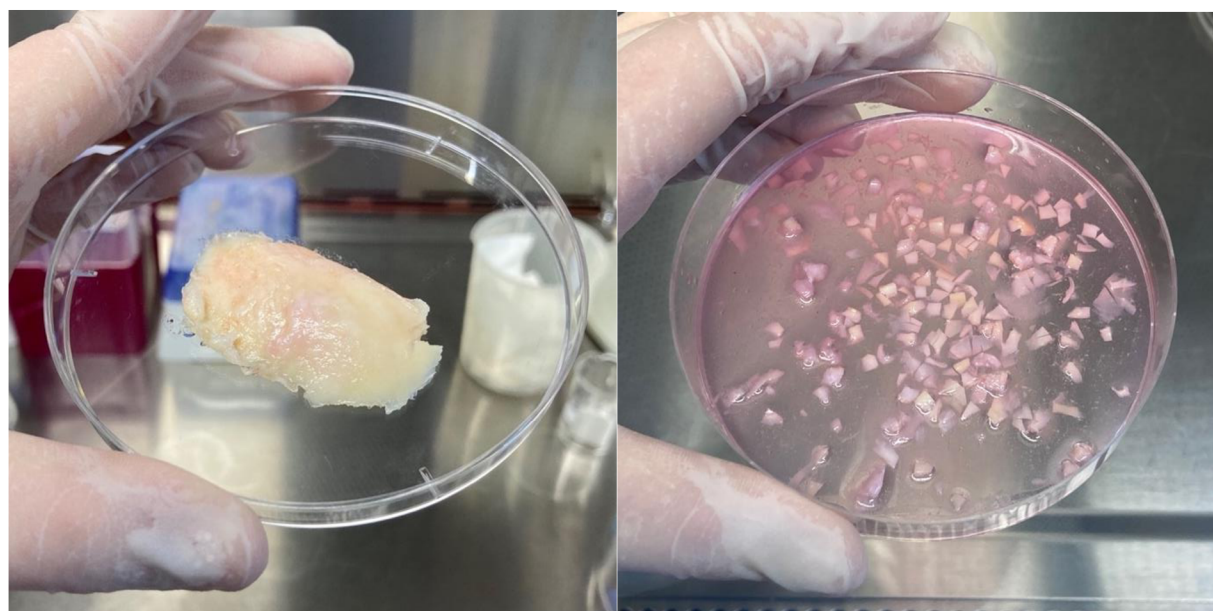
Postup: Získaný biologický materiál byl vložen do sterilního transportního boxu s roztokem fosfátového pufru (PBS) a přísadkem antibiotického roztoku Penicillin-Streptomycin. V co nejkratším čase byl materiál transportován do laboratoře a ihned zpracován.

Práce probíhala ve sterilním boxu. Vzorek přijatý v transportním boxu byl přenesen na Petriho misku a rozkrájen sterilním skalpelem na tenké plátky. Jednotlivé plátky byly rozkrájeny na kousky o velikosti přibližně 2 x 2 mm. V průběhu krájení byla chrupavka zvlhčována PBS, aby nedošlo k vyschnutí, a aby byla odstraněna krev.

3.5 Izolace chondrocytů

Princip: Tkáň byla enzymaticky rozrušena kolagenázou II, která hydrolyticky štěpí kolagen typu II, hlavní strukturní složku chrupavčité tkáně. Po provedení hydrolýzy byly uvolněné buňky převedeny do kultivačního média.

Postup: Roztok kolagenázy II byl připraven rozpuštěním komerčně dostupné práškové formy v kultivačním médiu na koncentraci 0,2 % roztok. Roztok byl poté přefiltrován přes 0,2 μm filtr. Předpřipravený vzorek byl zvážen, a podle hmotnosti byl přidán roztok kolagenázy II v množství 1 ml/g chrupavky. Misky se vzorky artrotických chrupavek byly inkubovány 20 h při 37 °C, 5 % CO₂. Vzorky chrupavek od dárců po úrazu byly vystaveny působení kolagenázy po dobu 3 h, jelikož množství tkáně bylo výrazně menší. Misky byly průběžně promíchávány. Buněčná suspenze byla přefiltrována do 50 ml zkumavky pomocí 70 μm cell strainer filtru a stočena na centrifuze po dobu 4 min při 300 G. Supernatant byl odlit a sediment byl promyt 20 ml PBS. Centrifugace a promývání bylo opakováno třikrát. Nakonec byly k sedimentu přidány 2 ml přehřátého DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).



Obrázek 8: Chirurgický resekát přijatý z FN Brno (vlevo) a mechanicky předpřipravený vzorek s roztokem kolagenázy II, připravený k inkubaci. Foto autor.

3.6 *In vitro* kultivace buněk

Princip: Buňky jsou přeneseny do kultivačního média obsahujícího potřebné živiny, které je periodicky měněno každé 2–3 dny. Kultivace probíhá v inkubátoru v kontrolované atmosféře. Při dosažení konfluency přibližně 85 % byla kultivace ukončena.

Další složky médií (viz Tabulka 1: Složení kultivačních médií a 2.3.1):

- PRP – plazma bohatá na krevní destičky

- DMEM/F-12 – Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), základní médium pro růst savčích buněk [128]
- heparin – složka bezsérových médií k zabránění agregace buněk a tvorby gelu
- ZellShield – přípravek určený pro ochranu kultur před širokou škálou kontaminantů jako jsou bakterie, plísně, kvasinky a mykoplazmy [129]
- GlutaMAX – suplement L-glutaminu běžně dodávaného savčím buňkám [130]

Postup: Při nasazování buněk do pasáže p0 (z jedné Petriho misky) byly do jamek označené 6-jamkové kultivační destičky přidány 2 ml kultivačního média. Buněčná suspenze z izolace buněk byla zcentrifugována, a peleta buněk následně rozsuspendována v malém množství kultivačního média. Následně byly buňky přeneseny pipetou do jamek destičky. Kultivace probíhala při 37 °C, 5 % CO₂. Periodicky bylo měněno médium.

Tabulka 1: Složení kultivačních médií

označení média	DMEM/F-12 (ml)	heparin (IU/ml)	ZellShield (ml)	GlutaMA X (ml)	PRP (ml)	IGF-1 (µg)	TGF-β1 (µg)
PRP	220	3,3	2,5	2,5	25	-	-
PRP-F	220	3,3	2,5	2,5	25	5	3,75

3.7 Imunocytochemie

Princip: Imunocytochemické barvení buněk bylo použito na vizualizaci složek ECM. Buňky jsou adherovány na krycí sklíčko za pomoci fibronektinu a zafixovány studeným formaldehydem. Následně jsou buňky permeabilizovány Tritonem X, poté jsou blokována nespecifická vazebná místa enzymů, která by poskytovala falešnou pozitivitu, a dále jsou buňky vystaveny primárním protilátkám. Nakonec je provedena inkubace se sekundárními protilátkami, které se navazují na protilátky primární, a slouží k vizualizaci výsledků.

Byla provedena vizualizace pomocí protilátek na kolageny typů I a II. Obrazový materiál byl vyhotoven pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axiovert 200M a software Acquarium.

Použité protilátky:

- 1° Human Pro Collagen 1 alpha 1 Antibody, mouse monoclonal IgG2b (R&DSYSTEMS)
- 1 ° Anti-Collagen II Antibody, ab34712, rabbit polyclonal (Abcam)
- 2° Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies)
- 2° Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (Cell Signaling)

Postup: Mikrosklíčka byla potažena 0,1 % fibronektinem. Buňky byly nasazeny v koncentraci 5000 buněk/cm² na mikrosklíčko, umístěné do 4-jamkové kultivační destičky (2 cm²), kde probíhala kultivace do dosažení 85% konfluence. Buňky byly poté 3x promyty 350 µl studeného formaldehydu po dobu 15 min. Poté byly 3 x promyty PBS. Následně byly po dobu 30 min vystaveny působení 350 µl Tritonu X, pak promyty 0,1 % roztokem PBST. Po blokování po dobu 1 h v 500 µl blokovacího pufru (2,5 % BSA v PBST) byla sklíčka inkubována s 50 µl roztoků primárních protilátek ve vlhké komůrce. Protilátky byly ředěny blokovacím pufrem dle pokynů výrobců. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Sklíčka byla poté 3x opláchnuta 0,1 % PBST, a následně obdobně vystavena působení sekundárních protilátek ve vlhké komůrce. Inkubace proběhla ve tmě po dobu 1 h. Sklíčka byla znovu promyta PBST, upevněna na krycí sklíčko a poté byl vyhotoven obraz.

Příprava roztoků:

- PBS (phosphate buffer saline, Gibco™)
- PBST (phosphate buffer saline-tween): 0,1 % Tween v PBS
- 0,2 % Triton X-100 v PBST
- Blokovací pufr: 0,25 % BSA v PBST
- 4 % Formaldehyd, pH = 6,9: 50 ml PBS bylo zahřáto na 60 °C a smícháno s 2 g paraformaldehydu. pH bylo upraveno na 6,9 1M NaOH, Nakonec zmrazeno při -20 °C.

3.8 Průtoková cytometrie

Princip: Pro každý marker byl vybrán systém značení založený na vzájemně minimálně se překrývajících fluorescenčních spektrech sond. Byly stanoveny izotypové kontroly a nebarvené buňky sloužily jako neznačená kontrola.

Bylo provedeno měření 10000 buněk v označené populaci ve třech paralelních stanoveních. Průtokový cytometr CytoFLEX B5-R3-V2 vybavený třemi lasery (405 nm, 488 nm, 638 nm) a třinácti pásmovými filtry. Výsledky byly získány pomocí programu CytExpert, v. 2.5.0.77.

Vzorky byly značeny pomocí konjugovaných protilátek (viz 2.4.1):

- CD90 – allofukocyanin (APC), (Invitrogen), filtr 660/10
- CD44 – fluorescein-5-isothiokyanát (FITC), (Invitrogen), filtr 525/40
- CD54 – fykoerythrin (PE), (Invitrogen), filtr 585/42

Postup: Suspenze buněk byla rozdělena do čtyř zkumavek, které byly centrifugovány. Centrifugace vždy probíhala při 1700 rpm, 4 °C po dobu 5 min. Každá peleta buněk byla

dvakrát promyta 1 ml pufru BD Perm/Wash Buffer (dále jen „pufr“). Protilátky byly pufrům naředěny dle pokynů výrobců. Do každé zkumavky bylo přidáno 50 µl roztoku příslušné protilátky. Inkubace proběhla při 4 °C po dobu 30 min. Po následné centrifugaci byla peleta buněk 2 x promyta 1 ml pufru, poté ponechána ve 300 µl pufru.

S kontrolními nebarvenými vzorky byly prováděny stejné úkony vyjma přidání protilátek. Fixace vzorků nebyla nutná, jelikož měření proběhlo okamžitě po přípravě vzorků.

Bylo provedeno měření 10 000 buněk ve vybrané populaci.

3.9 Příprava vzorků pro proteomickou analýzu

3.9.1 Lýza vzorku

Princip: Vzorek je vystaven působení SDT lyzačního pufru. Tris-HCl slouží k udržení konstantního pH a osmolarity pufru a lyzátu. Obsažený anionický surfaktant SDS slouží k rozrušení membránových struktur. Rozrušením nekovalentních interakcí dochází k linearizaci proteinů, které zároveň získávají záporný náboj. Molekuly proteinů ale mohou stále obsahovat disulfidické můstky, které jsou interakcemi kovalentními. K jejich redukci slouží redukční agent DTT (dithiothreitol). Zabraňuje také opětovnému vzniku intra- i intermolekulárních disulfidických můstků mezi cysteinovými zbytky.

Postup: Byl namíchán lyzační pufr (viz. Tabulka 2: Složení lyzačního pufru). Ke vzorku ve vialce bylo přidáno 100 µl předehřátého pufru a krátce zvortexováno. Poté byl vzorek inkubován v termomixéru po dobu 2 h při 2000 rpm a 95 °C. Vzorek byl ochlazen na laboratorní teplotu a centrifugován po dobu 15 min při 20 000 G. Supernatant byl přenesen do čisté vialky.

Tabulka 2: Složení lyzačního pufru

Složka	obsah v 50 ml roztoku:
4 % SDS	4 g
0,1 M Tris-HCl, pH 7,6	10 ml
MQ H ₂ O	40 ml
0,1 M DTT	1,5425 g

3.9.2 FASP

Princip: Příprava vzorků za pomoci filtru (FASP) je metoda pro generování peptidů ze surových lyzátů pro analýzu LC-MS a slouží zejména k odstranění SDS obsaženého v lyzovaných vzorcích pomocí močoviny. Jodacetamid slouží pro redukci a alkylation cysteinových zbytků. Pro enzymatickou digesci proteinů byl použit trypsin.

Postup: Bylo smícháno 40 μ l směsi solubilizovaných bílkovin s 200 μ l močoviny v TrisHCl, pH 8,5 (UA) ve filtrační jednotce (30 kDa cut-off filtr) a odstředěno při 7000xG po dobu 15 min. Průtok ze sběrné zkumavky byl zlikvidován. Bylo přidáno 200 μ l UA a odstředěno při 14000 x g po dobu 5 min. Průtok ze sběrné zkumavky byl zlikvidován. Bylo přidáno 100 μ l jodacetamidu. Směs byla míchána při 600 rpm v termomixéru po dobu 1 min, poté byla inkubována po dobu 20 min ve tmě. Průtok ze sběrné zkumavky byl zlikvidován. Poté bylo přidáno 100 μ l UA, odstředěno při 14000 x g po dobu 5 min a průtok ze sběrné zkumavky byl zlikvidován, tento krok byl opakován třikrát. Poté bylo přidáno 50 μ l roztoku obsahujícího 0,5 μ g trypsinu a 50 mM uhličitan amonný, inkubace proběhla při 37 °C po dobu 18 h. Poté byly filtrační jednotky přeneseny do nových sběrných zkumavek a odstředěny při 14000 x g po dobu 10 min. Bylo přidáno 50 μ l roztoku 50 mM uhličitanu amonného a odstředěno při 14000 x g po dobu 10 min. Eluáty byly sbírány do jedné zkumavky, konečný objem byl přibližně 150 μ l.

3.9.3 Ethylacetátová extrakce

Princip: Pro citlivou detekci peptidů pomocí MS je proto nutné detergenty dokonale odstranit, k čemuž slouží kromě FASP i ethylacetátová extrakce. [116]

Postup: Příprava vodou nasyceného ethylacetátu: Do skleněné odměrné baňky bylo přidáno přibližně 10 ml vody a 80 ml ethylacetátu. Baňka byla třepána po dobu 1 min při laboratorní teplotě, poté ponechána 5 min v klidu. Třepání bylo opakováno třikrát. Roztok byl přelit do skleněné lahve a ponechán 30 min v klidu.

K roztoku peptidů z FASP byl přidán 1 ml vodou nasyceného ethylacetátu. Vzorek byl 1 min protřepáván a poté 2 min odstředován při 13400 rpm. Byla odsáta horní ethylacetátová vrstva pomocí pipety. Postup byl třikrát opakován. Nakonec byl roztok odpařen do sucha ve SpeedVac.

3.9.4 Kyselá extrakce

Princip: Kyselá extrakce je posledním krokem přípravy vzorku před měřením. Suché peptidy jsou rozpuštěny v acetonitrilu a kyselině mravenčí. Je také použit polyethylenglykol (PEG), kvůli zmenšení ztrát způsobených adsorpcí vzorku na povrchu. [132]

Postup: Vzorek z ethylacetátové extrakce byl přemístěn do vialky s 1,5 µl 0,01 % PEG. Bylo přidáno 25 µl 2,5 % kyseliny mravenčí a 25 µl 50 % acetonitrilu. Směs byla zvortexována a přenesena do nové vialky. Bylo přidáno 100 µl 100 % acetonitrilu a znovu zvortexováno. Směs byla přenesena do nové vialky. Poté proběhlo zakoncentrování a vysušení ve SpeedVac. Nakonec byl objem vzorku peptidů doplněn MQ H₂O na 15 µl.

3.10 Proteomická analýza

Princip: LC-MS/MS analýza za použití ultra vysokoučinného kapalinového chromatografu (UHPLC) UltiMate™ 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) online připojeného k hmotnostnímu spektrometru TimsTOF Pro System (Bruker). Pro analýzu byla využita analytická kolona (Aurora C18, 75 µm, délka 250 mm, 1,6 µm částice, teplota 50 °C) a 90 min lineární gradient mobilní fáze: (3–42 % mobilní fáze B; mobilní fáze A: 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě, mobilní fáze B: 0,1 % kyselina mravenčí v acetonitrilu). Analytická kolona byla umístěna do ohříváče Butterfly Heater (Phoenix S&T) a její emitorová strana byla instalována do iontového zdroje CaptiveSpray (Bruker) podle pokynů výrobce s teplotou nastavenou na 50 °C. MS and MS/MS spektra byla zaznamenána na analyzátoru doby letu (TOF) za použití iontové mobilní spektrometrie se záchytem iontů (TIMS) v rozmezí prekurzorů m/z 400-1000. Byl využit mód datově nezávislého sběru dat (DIA-NN, verze 1.8), databáze cRAP contaminant database (v. 170518) a UniProtKB-Human (v. 16.10.2022). Label-free kvantifikace, MaxQuant. Statistické vyhodnocení pomocí modifikovaného t-testu, úprava p-hodnot při testování vícenásobných hypotéz byla provedena pomocí metody Benjamini & Hochberg. Všechny směsi peptidů byly analyzovány odděleně, randomizovaně, proložené blanky. Měření proběhlo v biologických tripletech vzorků.

Postup: Měření bylo provedeno pracovníky Centrální laboratoře Proteomiky pod vedením prof. RNDr. Zbyňka Zdrálaha, Dr.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kultivace

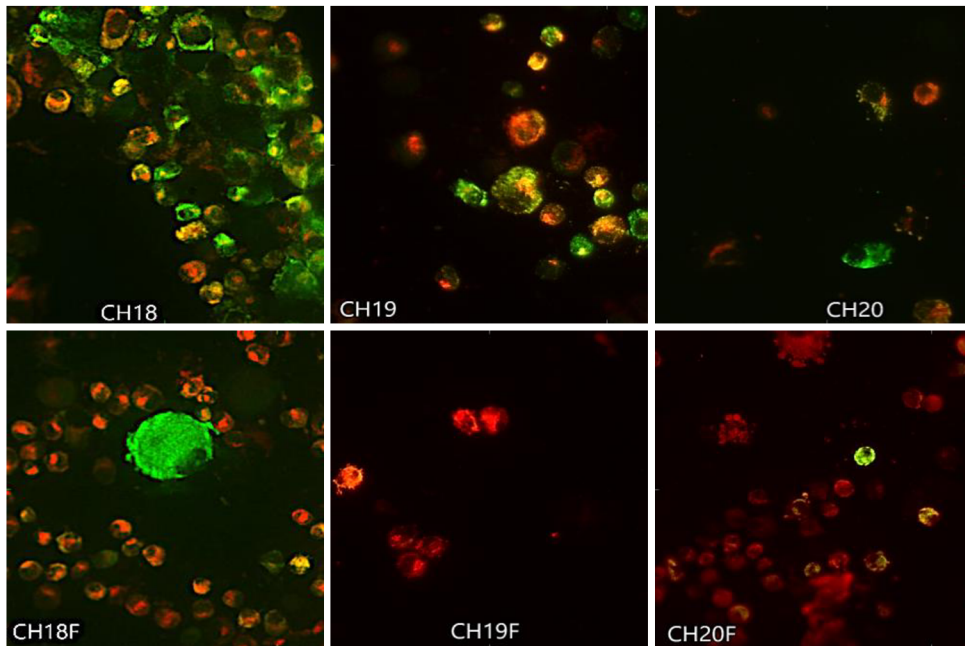
Vzorky pocházely z kolenních nebo kyčelních kloubů. Byly získány od dvou typů dárců. První skupinu dárců, s indikovaným pokročilým stádiem OA, tvoří lidé průměrně vyššího věku (medián 64 let). Druhá skupina vzorků pochází od dárců po úrazu. U této skupiny lidí je medián věku 50 let. Kultivace byla ukončena v pasáži 0 po dosažení 85% konfluencie, kdy množství buněk ve všech vzorcích bylo mezi 10^6 – $1,2 \cdot 10^6$ buněk.

Tabulka 3: Seznam vzorků získaných po kultivaci

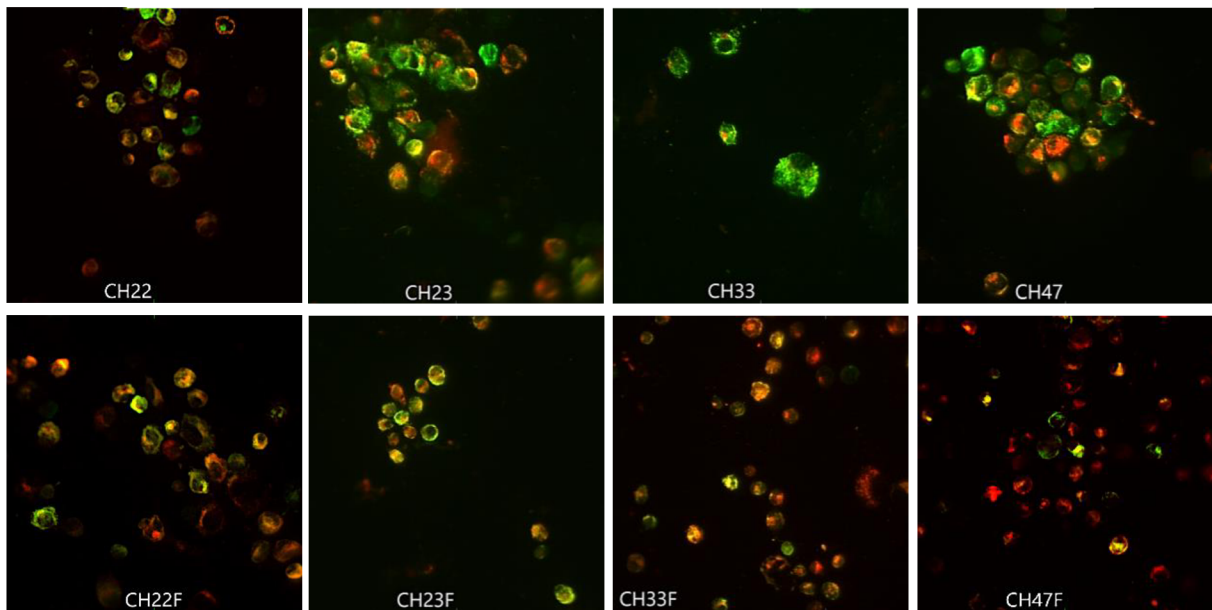
Označení chrupavky	Pohlaví dárce	Věk dárce	Indikace	Médium	Název vzorku
18	žena	67	OA	PRP	CH18
				PRP-F	CH18F
19	žena	57	OA	PRP	CH19
				PRP-F	CH19F
20	muž	64	OA	PRP	CH20
				PRP-F	CH20F
22	muž	49	úraz	PRP	CH22
				PRP-F	CH22F
23	muž	58	úraz	PRP	CH23
				PRP-F	CH23F
33	žena	51	úraz	PRP	CH33
				PRP-F	CH33F
47	muž	43	úraz	PRP	CH47
				PRP-F	CH47F

4.2 Imunocytochemie

V pasáži 0 byly u kultivovaných buněk imunocytochemicky sledován obsah kolagenu typu II (zelená fluorescence), žádoucí složky ECM a markeru chondrocytů, a kolagenu typu I (červená fluorescence), markeru dediferenciace na fibroblastům podobný typ buněk.



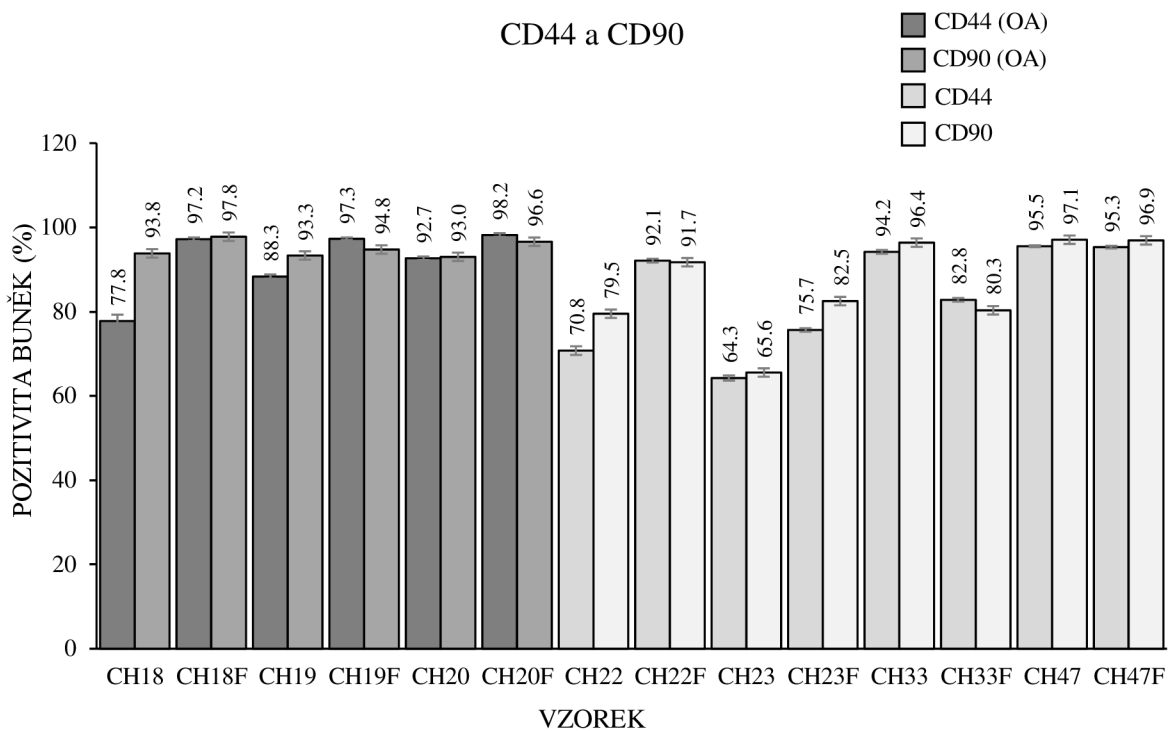
Obrázek 9: PRP, PRP-F, OA



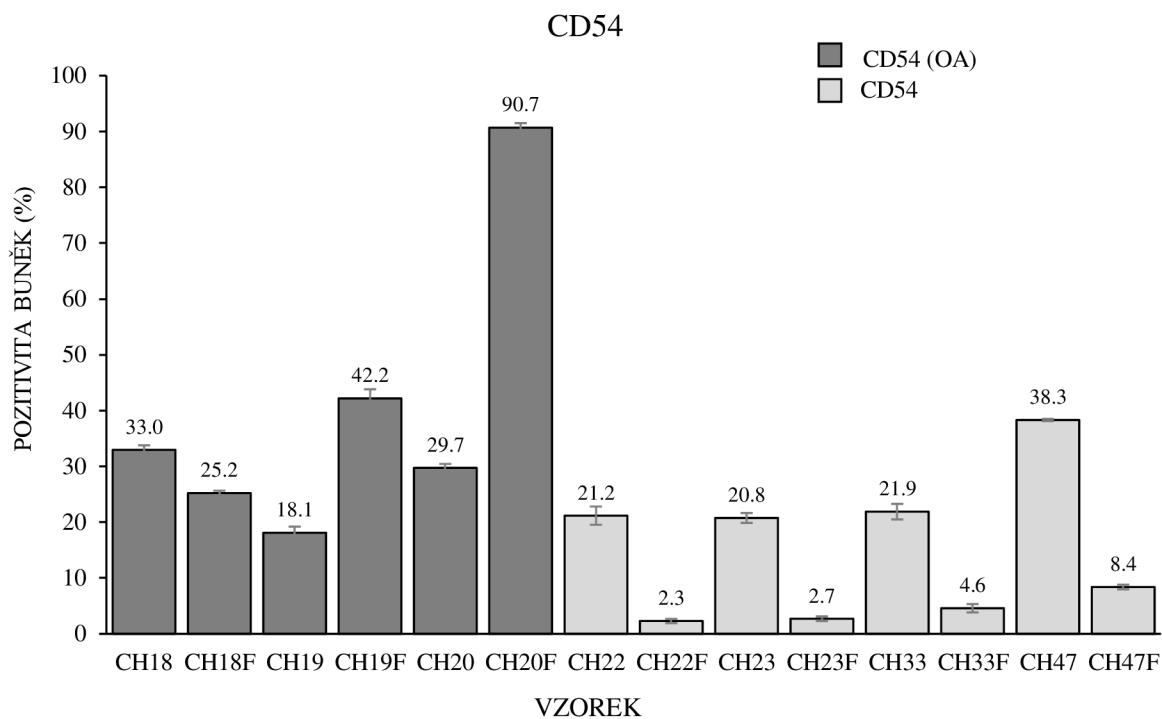
Obrázek 10: PRP a PRP-F, po úrazu

Ve vzorcích byla identifikována produkce obou stanovovaných typů kolagenu. Produkce kolagenu typu II vypovídá o žádoucí přítomnosti funkčních chondrocytů. [65][68] Z výsledků není patrný žádný rozdíl mezi vzorky pocházejícími od dárců po úrazu a vzorky pocházejícími od dárců trpících osteoartrózou. Imunocytochemická metoda samostatně není dostatečně přesná na posouzení rozdílů mezi médii PRP a PRP-F.

4.3 Průtoková cytometrie



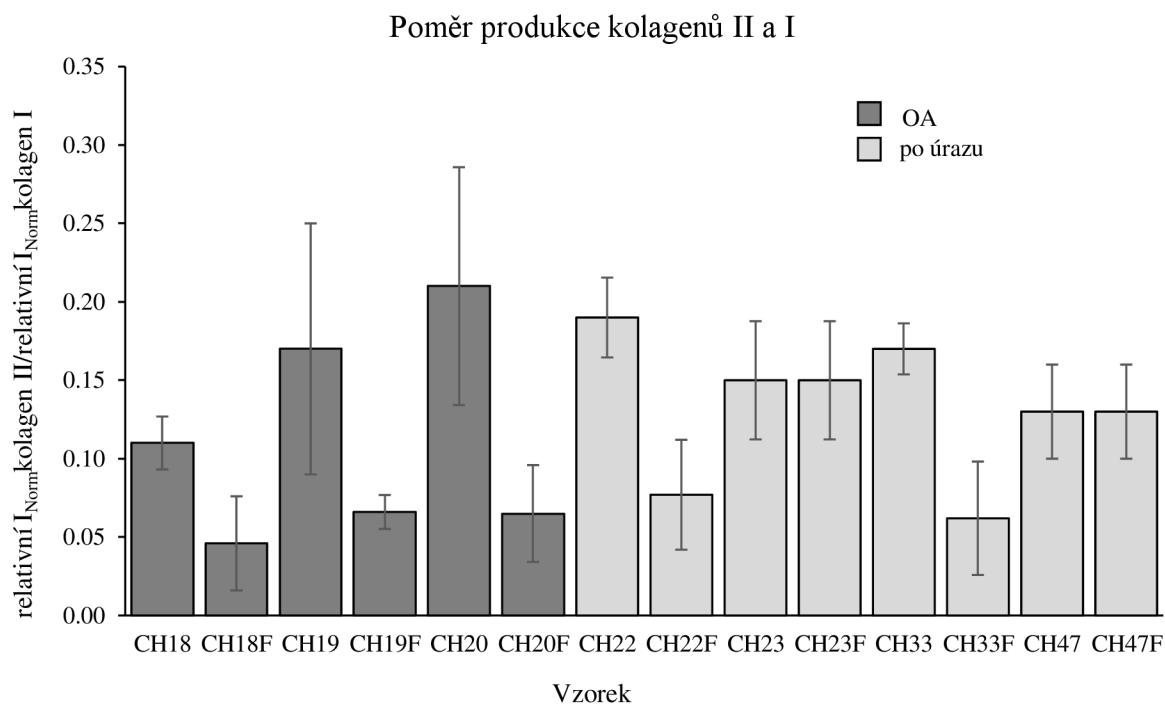
Obrázek 11: Procentuální zastoupení buněk pozitivních na přítomnost CD90 a CD44 ve vzorcích.



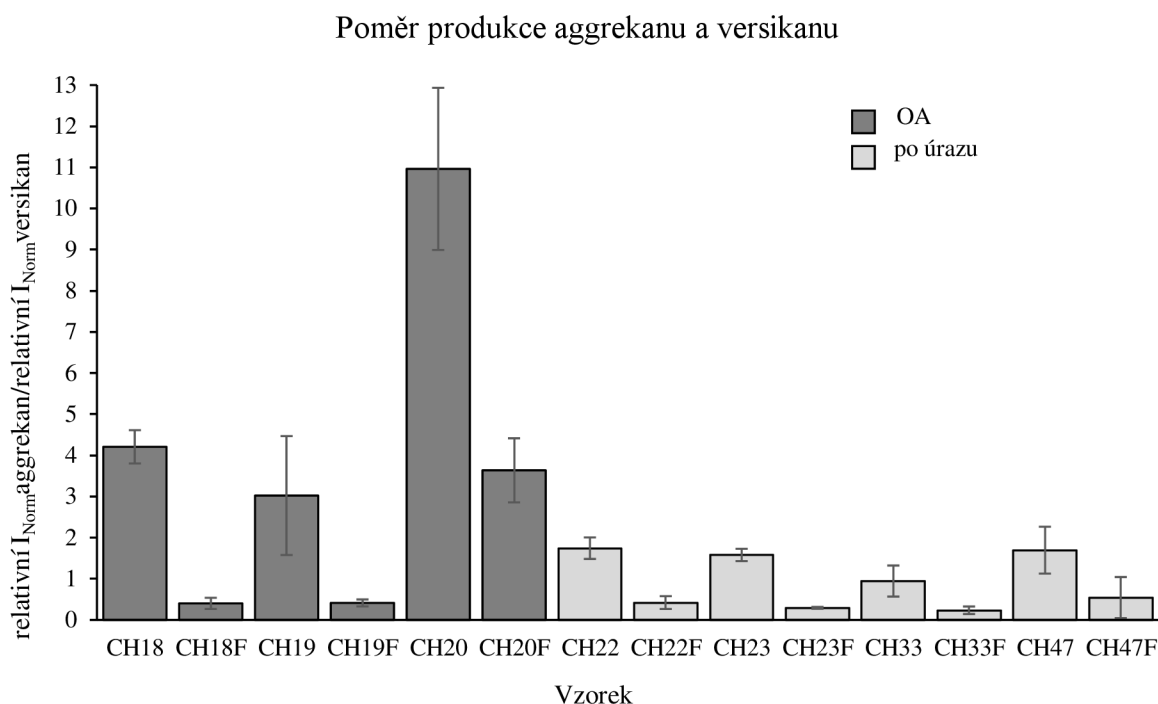
Obrázek 12: Procentuální zastoupení buněk pozitivních na přítomnost CD54 v jednotlivých vzorcích.

Výsledky analýzy markerů CD44 a CD90 spolu korelují. Všechny vzorky vykazovaly relativně vysokou pozitivitu na oba markery, procentuální zastoupení pozitivních buněk se pohybovalo mezi 64,3–98,2 %. Vzorky kultivované z buněk pocházejících od dárců trpících osteoartrózou vykazovaly průměrně vyšší hodnoty positivity na marker CD44 (77,8–98,2 % pozitivních buněk) i marker CD90 (93,0–97,8 % pozitivních buněk), než vzorky kultivované z buněk od dárců po úrazu (CD44: 64,3–95,5 % pozitivních buněk, CD90: 65,6–97,1 % pozitivních buněk). Pozitivita na marker CD54 byla nižší u vzorků kultivovaných z buněk od dárců po úrazu. Ve vzorcích CH22–CH47F kultivovaných byly stanoveny konstantní výsledky, přičemž exprese markeru CD54 je u těchto vzorků výrazně nižší při kultivaci v médiu PRP-F. V médiu PRP byly výsledky analýzy markeru CD54 u všech vzorků stabilnější (26±8 %), než u média PRP-F (30±30 %). Výrazně zvýšená exprese CD54 je u vzorku CH20F. CD54 je jako jediný z trojice testovaných markerů specifický také pro hypertrofické chondrocyty. [91] Jestli ale zvýšená exprese tohoto markeru souvisí s přítomností vyššího množství buněk tohoto typu nelze stanovit pouze z výsledků analýzy průtokovou cytometrií (viz Proteomická analýza).

4.4 Proteomická analýza



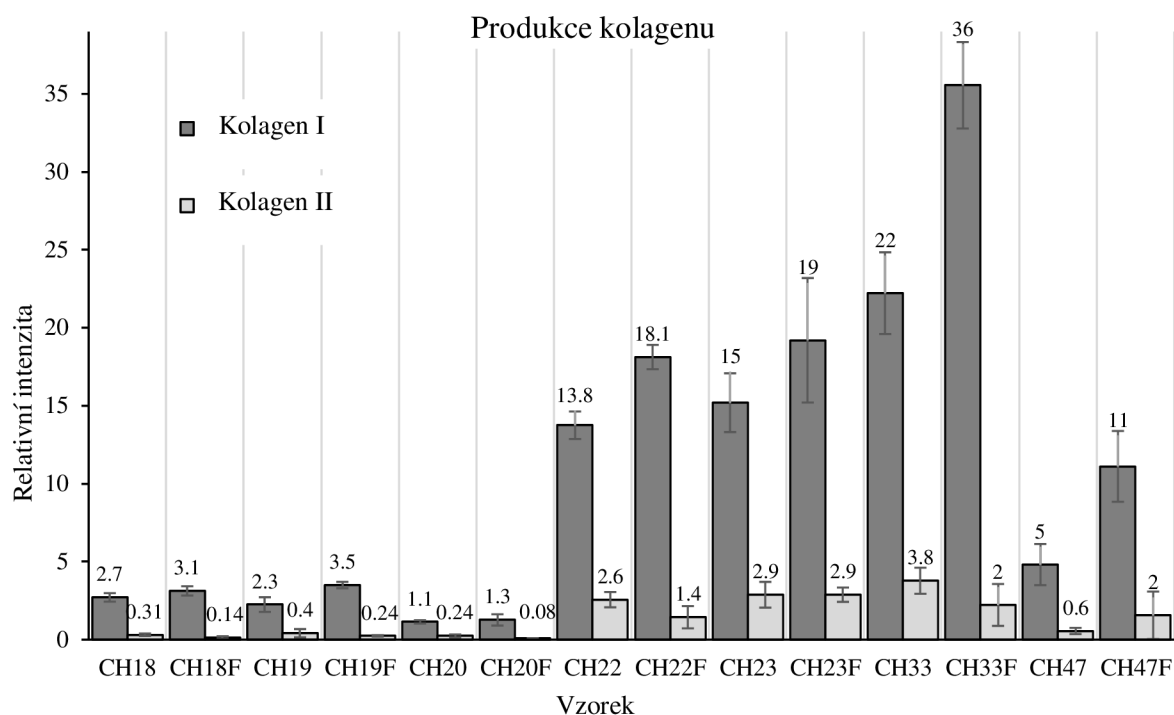
Obrázek 13: Poměr produkce kolagenu typu II ku kolagenu typu I. Normalizováno na 1 g tkáň. Pro všechna data je hodnota adj. p-value = (0,01–0,05).



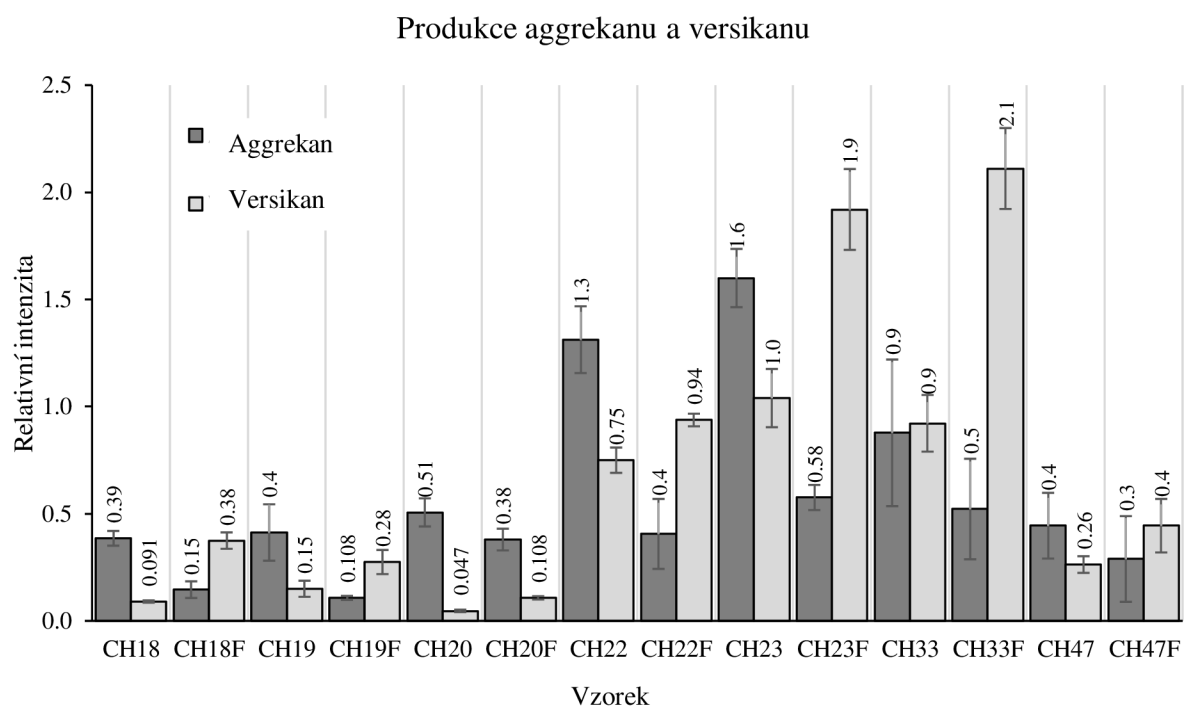
Obrázek 14: Poměr produkce agrekanu ku versikanu. Normalizováno na 1 g tkáně. Pro všechna data je hodnota adj. p-value = (0,01–0,05).

Produkce kolagenu typu II vypovídá o žádoucí přítomnosti funkčních chondrocytů a produkce kolagenu typu I vypovídá o přítomnosti buněk dediferencovaných ve fibroblastům podobný buněčný typ. Poměr těchto kolagenů se proto dá využít k odhadu zastoupení příslušných buněčných typů. Obdobně je to s produkcí objemných proteoglykanů agrekanu a versikanu a jejich vzájemným poměrem. [133][134][135] Aggrekan je produkován funkčními chondrocyty, zatímco versikan je produkován fibroblasty, a ve zdravé chrupavce se nachází jen v malém množství. [136][137]

U všech analyzovaných vzorků byl poměr kolagenů mezi 0,05 a 0,21, což vypovídá o přítomnosti obou buněčných typů, avšak s převahou fibroblastům podobných buněk. U většiny vzorků byl poměr nižší při kultivaci v médiu s přidavkem faktorů. Obdobný trend byl stanoven i u poměru agrekanu a versikanu, kdy u vzorků pocházejících od jednoho dárce byl poměr nižší při kultivaci v médiu PRP-F. V médiu PRP převažovala produkce agrekanu nad produkcí versikanu, v médiu PRP-F tomu bylo naopak s výjimkou vzorku CH20F.

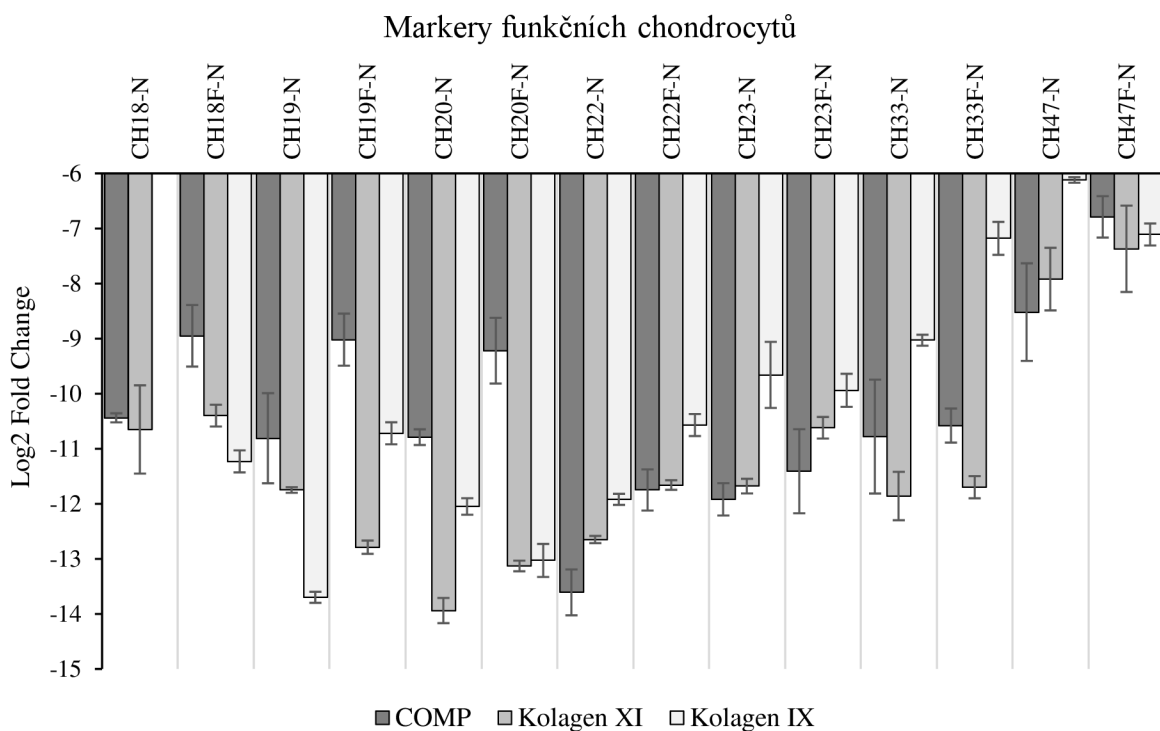


Obrázek 15: Produkce kolagenu. Data jsou vyjádřena jako intenzita normalizovaná na 1 gram tkáně a počet buněk nasazených ke kultivaci. Pro všechna data je hodnota adj. p-value = (0,01–0,05).



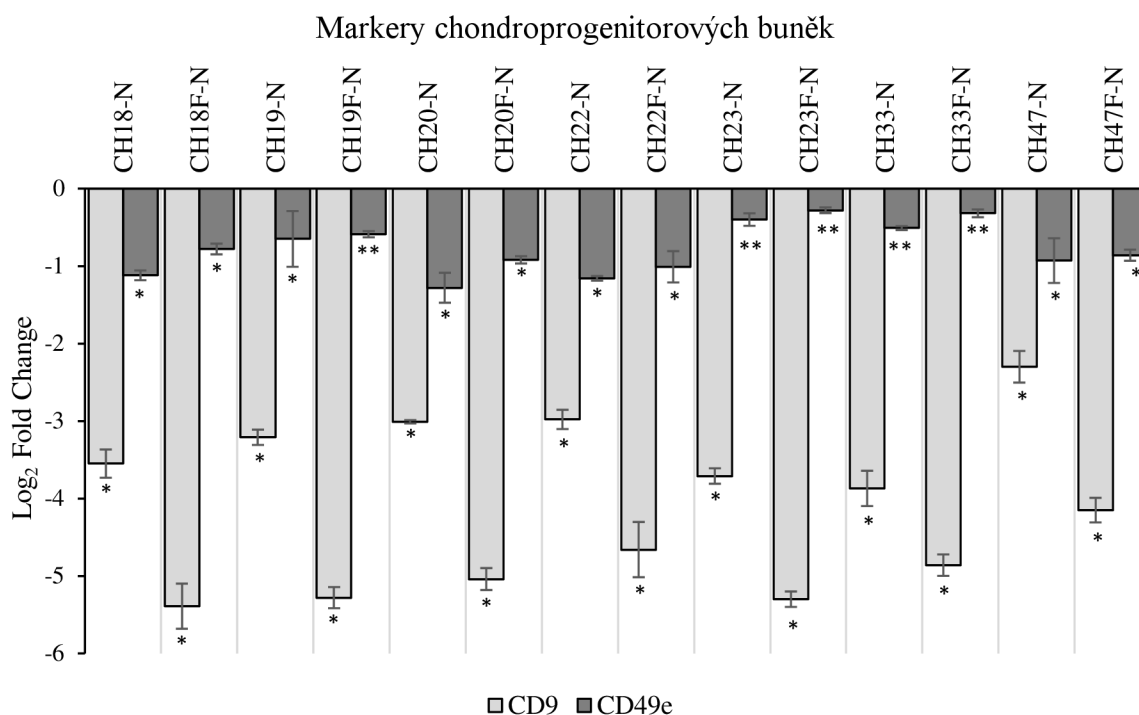
Obrázek 16: Produkce agrekanu a versikanu. Data jsou vyjádřena jako intenzita normalizovaná na 1 gram tkáně a počet buněk nasazených ke kultivaci. Pro všechna data je hodnota adj. p-value = (0,01–0,05).

Pohled na produkci kolagenu, agrekanu a versikanu buňkami nabízí data vztažená k počátečnímu množství buněk, které byly nasazeny ke kultivaci. Touto normalizací je možné vzájemně porovnat produkční kapacitu buněk. Buňky pocházející ze vzorků tkáně od dárců trpících OA měly výrazně nižší produkční kapacitu než buňky pocházející od dárců po úrazu. I přes nízkou produkční schopnost je však pozitivním výsledkem, že se i z osteoartrózou poškozené tkáně podařilo získat buňky, které dokáží syntetizovat kolagen typu II a agrekan. Pro bližší prozkoumání přítomných buněčných typů byla vyhodnocena exprese specifických markerů, vyjádřená pomocí násobné změny (fold change) ve vztahu k příslušné nativní tkáni. Hodnota např. fold change = 2 tedy znamená, že v kultivovaném vzorku byla intenzita daného proteinu dvojnásobná oproti nativní tkáni. Vyjádřením hodnot pomocí logaritmu je umožněna vizualizace změny, kdy kladné hodnoty logaritmu vyjadřují nárůst v kultivaci oproti nativu, zatímco záporné vyjadřují úbytek. Data jsou normalizována na gram tkáně.



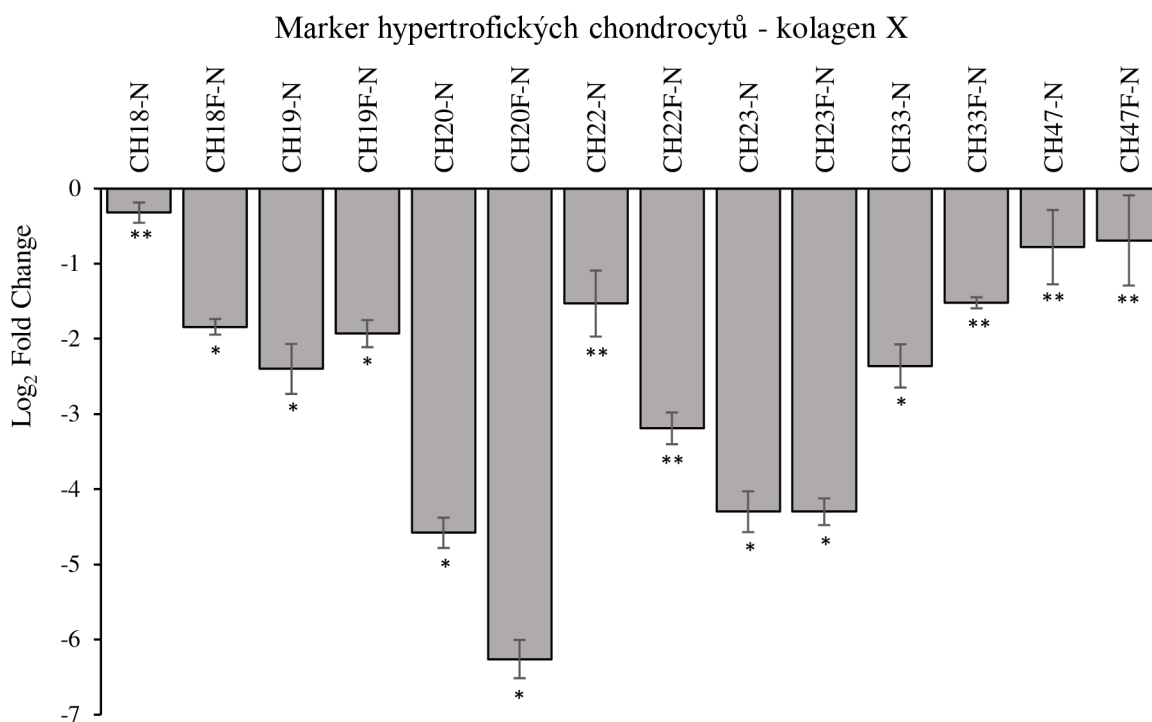
Obrázek 17: Změna v hladině markery funkčních chondrocytů vzhledem k nativní tkáni. Pro všechna data je hodnota adj. p-value = (0,01–0,05).

Z analýzy markerů specifických pro funkční chondrocyty, tedy COMP a kolagenů typů XI a IX, [138][139] je patrné, že ve všech vzorcích došlo oproti nativní tkáni k úbytku všech tří markerů. Lze tedy předpokládat, že funkční chondrocyty změnilý svůj buněčný typ.



Obrázek 18: Změna v hladině markerů chondroprogenitorových buněk ve srovnání s nativní tkání. * adj. p -value = (0,01–0,05); ** adj. p -value > 0,05.

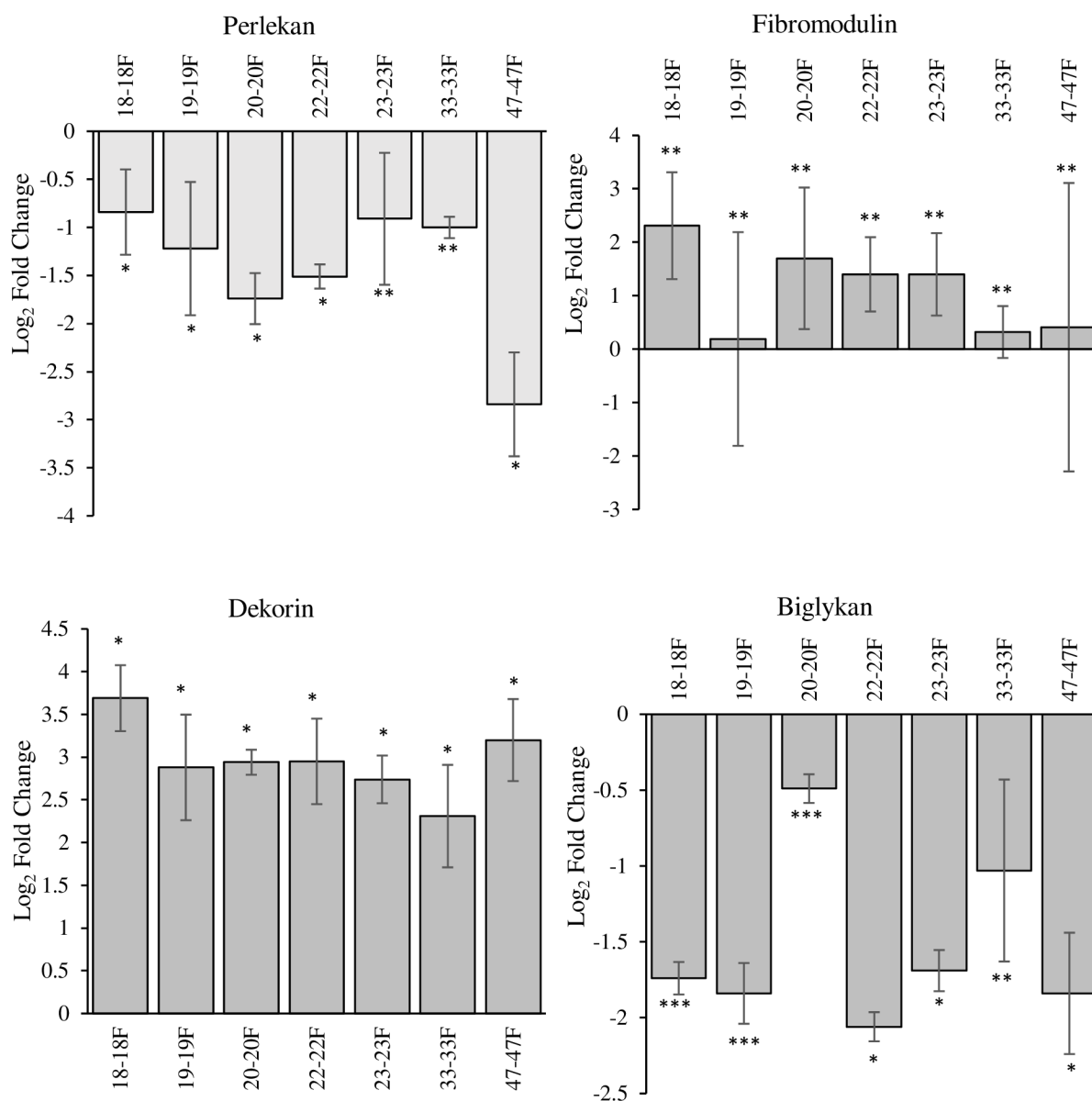
Dalším buněčným typem přítomným v chrupavčité tkáni jsou chondroprogenitorové buňky, které proliferují a diferencují ve funkční chondrocyty. Funkční chondrocyty mohou také zpětně dediferencovat v chondroprogenitory. Ke stanovení změny v množství progenitorových buněk byly zkoumány jejich markery CD9 a CD49e, které jsou pro ně specifické. [91] Ve všech vzorcích byla v kultivovaných vzorcích stanovena nižší hladina těchto markerů než ve vzorcích nativní tkáně. Úbytek těchto markerů může značit, že progenitorové buňky diferencovaly ve funkční chondrocyty potažmo ve fibroblastům podobné buňky, a zároveň že nedošlo ke zpětné dediferenciaci funkčních chondrocytů v progenitory. Je patrné, že k většímu úbytku došlo v médiu s obsahem faktorů.



Obrázek 19: Změna v hladině markerů hypertrofických chondrocytů ve srovnání s nativní tkání. * adj. p -value = (0,01–0,05); ** adj. p -value > 0,05.

Při analýze průtokovou cytometrií byla stanovena zvýšená pozitivita na marker CD54, který je také markerem hypertrofických chondrocytů, a jeho zvýšená hladina by tedy mohla znamenat zvýšenou přítomnost tohoto buněčného typu. Prozkoumána tedy byla produkce kolagenu typu X, který je specifickým produktem hypertrofických chondrocytů. [6][140] Ve všech vzorcích byl kolagen typu X přítomen v nižším množství ve srovnání s nativem. Zvýšená hladina markeru CD54 tedy v tomto případě pravděpodobně nesouvisí se zvýšeným množstvím hypertrofických chondrocytů, ale vztahuje se pouze k zánětlivým projevům v tkáni. Snížená exprese tohoto markeru také značí, že v kulturách nedošlo k diferenciaci funkčních chondrocytů v hypertrofický typ.

Pro další srovnání vlivu přidavku faktorů do kultivačního média byly sledovány hladiny vybraných proteoglykanů perlekanu, dekorinu, biglykanu a fibromodulinu. Ve vzorcích kultivovaných v médiu bez přidavku faktorů byla vyšší přítomnost dekorinu než u vzorků pro jejichž kultivaci bylo použito médium PRP-F. Naopak perlekan a biglykan byly ve větším množství přítomny ve vzorcích kultivovaných v médiu PRP-F. Výsledky stanovení fibromodulinu nesplňují statistická kritéria.



Obrázek 20: Srovnání vlivu přidavku faktorů do média na produkci proteoglykanů. * adj. p-value = (0,01–0,05); ** adj. p-value > 0,05; *** adj. p-value < 0,01.

5 ZÁVĚR A DISKUZE

Tato práce si kladla za cíl sledovat expanzi chondrocytů *in vitro* v kultivačním médiu s obsahem plazmy bohaté na krevní destičky a zhodnotit, zda přídavek růstových faktorů do média napomáhá udržení buněčného typu funkčních chondrocytů a produkci klíčových složek matrix v nově syntetizované tkáni. Dalším cílem práce je prozkoumat možnosti aplikace proteomické analýzy ve vývoji chrupavkových kloubních náhrad. Cílů bylo dosaženo srovnáním výsledků analýzy buněk, extracelulární matrix a porovnáním s nativní tkání.

Pro tuto práci byly od pacientů Ortopedické kliniky FN Brno, v souladu s informovaným souhlasem, získány vzorky chrupavky, pocházející z kolenních nebo kyčelních kloubů. Vzorky byly odebrány dvěma typům pacientů. První skupinu vzorků tvořily chirurgické resekáty pocházející od pacientů s indikovaným pokročilým stádiem osteoartrózy, kteří podstoupili totální endoprotézu. Druhá skupina vzorků byla odebrána pacientům po úrazu při artroskopických zákrocích.

Ze vzorků byly vyizolovány buňky, které byly následně kultivovány v médiích s obsahem plazmy bohaté na krevní destičky. První varianta média neobsahovala přídavek růstových faktorů (médiu PRP), do druhé varianty média byly přidány růstové faktory TGF- β 1 a IGF-1 (médiu PRP-F). Byl získán soubor čtrnácti vzorků, u nichž byla kultivace ukončena v pasáži 0 po dosažení konfluencie 85 %.

Hlavním problémem při kultivaci chondrocytů *in vitro* je dediferenciace funkčních chondrocytů ve fibroblastům podobné buňky, čímž dochází ke ztrátě schopnosti produkovat klíčovou mezibuněčnou hmotu správného složení a organizace. Tím mizí i potenciál využití nově vytvořené tkáně pro opravu či nahrazení opotřebované nebo poškozené plochy kloubní chrupavky. Proto byla v kultivovaných vzorcích analyzována přítomnost různých buněčných typů vyskytujících se v chrupavce a byl sledován obsah žádoucích složek mezibuněčné hmoty. Imunocytochemickou analýzou byly ve vzorcích vizualizovány kolageny typu I a II. Ve vzorcích byly nalezeny oba typy kolagenu, což značí přítomnost jak funkčních chondrocytů produkujících kolagen typu II, tak buněk podobných fibroblastům produkujících kolagen typu I. Přítomnost obou typů kolagenu byla potvrzena výsledky proteomické analýzy.

Průtokovou cytometrií byly analyzovány povrchové markery chondrocytů CD44, CD54 a CD90. Výsledky analýzy markerů CD44 a CD90 spolu korelují. Všechny vzorky poskytly relativně vysokou pozitivitu na tyto dva markery, přičemž nebyly patrné výrazné rozdíly

mezi skupinami vzorků. Pozitivita na marker CD90 vypovídá o mezenchymálním původu buněk, a společná pozitivita na markery CD44 a CD90 značí dobrou chondrogenní kapacitu buněk.

Výsledky analýzy markeru CD54 byly rozmanitější. Expresí CD54 je zvýšená při zánětlivých projevech v tkáni. Pozitivita na tento marker byla dle očekávání průměrně vyšší u vzorků pocházejících od dárců trpících OA. U vzorků od dárců s OA bylo vyšší množství pozitivních buněk při kultivaci v médiu s přidavkem faktorů, je tedy možné, že růstové faktory podporují další rozvoj nežádoucích zánětlivých procesů a případnou dediferenciaci v postižených chondrocytech. Ve skupině vzorků kultivovaných od dárců po úrazu je patrný opačný trend, kdy při využití média PRP-F klesalo množství buněk vykazujících zvýšenou expresi CD54, což je ve shodě s jejich pro regeneračním potenciálem oproti OA chrupavce, kde již probíhá degenerativní zánět.

Pomocí LC-MS/MS proteomické analýzy byly stanoveny poměry intenzit kolagenu typu II/kolagenu typu I a agrekanu/versikanu. Tyto poměry vypovídají o míře nežádoucí dediferenciace funkčních chondrocytů ve fibroblastům podobné buňky. Vyšší hodnoty obou poměrů byly stanoveny při použití média PRP což značí, že médium PRP-F více podpořilo dediferenciaci buněk. Nízký poměr kolagenů (0,05–0,21) vypovídá o převaze kolagenu typu I, a tím i o převládnutí fibroblastům podobného buněčného typu. To je potvrzeno i trendy v hodnotách poměru agrekan/versikan, kdy v médiu PRP převažovala produkce žádoucího agrekanu, a naopak v médiu PRP-F převažoval versikan. U vzorků pocházejících od dárců po úrazu byly hodnoty poměru agrekan/versikan stabilní, u druhé skupiny vzorků byla vyšší variabilita výsledků.

Bližší pohled na produkci žádoucích složek extracelulární matrix kolagenu typu II a agrekanu nabízí data vztažená k počtu buněk nasazených ke kultivaci. Touto normalizací je možné vzájemně porovnat produkční kapacitu buněk. U buněk pocházejících ze vzorků tkáně od dárců trpících OA byla stanovena výrazně nižší produkční kapacita než u buněk pocházejících od dárců po úrazu, které vykazaly vyšší produkci jak kolagenu typu II, tak i agrekanu. I přes nízkou produkční schopnost je však pozitivním výsledkem, že se i z osteoartrózou těžce poškozené tkáně podařilo získat buňky, které dokáží syntetizovat kolagen typu II a agrekan. V produkci kolagenu typu II byl rozdíl mezi skupinami vzorků výraznější než u agrekanu.

Buňky chrupavky mohou za určitých podmínek přecházet mezi různými buněčnými typy. Například chondroprogenitorové buňky mohou diferencovat ve funkční chondrocyty,

kteře mohou dále diferencovat v chondrocyty hypertrofické. Funkční chondrocyty mohou také zpětně přecházet v chondroprogenitorové buňky, nebo dediferencovat ve fibroblastům podobný buněčný typ. Pro bližší prozkoumání přítomného typu buněk v *in vitro* kulturách proto byly sledovány specifické markery pro tyto typy buněk. Normalizovaná data byla vyjádřena ve vztahu k výsledkům proteomické analýzy nativní tkáňe, ze které pocházely buňky použité pro kultivaci příslušného vzorku.

Z analýzy markerů specifických pro funkční chondrocyty, tedy COMP a kolagenů typů XI a IX, je patrné, že ve všech vzorcích došlo oproti nativní tkáni k úbytku všech tří markerů. Lze tedy předpokládat, že funkční chondrocyty změnilы svůj buněčný typ v důsledku 2D kultivace, která nepodporuje udržení fenotypu chondrocytů.

Ve všech vzorcích došlo při kultivaci také k poklesu markerů chondroprogenitorových buněk CD9 a CD49e oproti nativní tkáni, což může značit, že progenitorové buňky diferencovaly ve funkční chondrocyty potažmo ve fibroblastům podobné buňky nebo hypertrofické chondrocyty, a zároveň že nedošlo ke zpětné dediferenciaci funkčních chondrocytů v progenitory.

Marker CD54 je markerem také hypertrofických chondrocytů. Jeho nárůst v některých vzorcích by tedy hypoteticky mohl znamenat nárůst v množství buněk tohoto typu. Proto byla vyhodnocena přítomnost kolagenu typu X, který je specificky produkován hypertrofickými chondrocyty. Ve všech vzorcích došlo při kultivaci k poklesu tohoto markeru oproti nativní tkáni, což značí že nedošlo ke zvýšené diferenciaci chondrocytů v hypertrofický typ, a zvýšená hladina markeru CD54 se tedy v tomto případě pravděpodobně vztahuje pouze k zánětlivým projevům v tkáni.

Pro další srovnání vlivu přídavku faktorů do kultivačního média byly sledovány hladiny vybraných proteoglykanů perlekanu, dekorinu a biglykanu. Ve vzorcích kultivovaných v médiu bez přídavku faktorů byla vyšší přítomnost dekorinu než u vzorků pro jejichž kultivaci bylo použito médium PRP-F. Naopak perlekan a biglykan byly ve větším množství přítomny ve vzorcích kultivovaných v médiu PRP-F. Z pohledu produkce těchto látek tedy pravděpodobně nelze odvodit, která varianta média je vhodnější.

Ze shrnutí výsledků plyne, že v kulturách se nacházely jak funkční, tak dediferencované chondrocyty, s výraznou převahou fibroblastům podobných dediferencovaných buněk. V kulturách se nacházely také chondroprogenitorové buňky a hypertrofické chondrocyty přirozeně se vyskytující v chrupavce, avšak jejich množství se kultivací snížilo. Jelikož došlo

k současnému poklesu markerů specifických pro funkční chondrocyty je pravděpodobné, že tyto buněčné typy také dediferencovaly do fibroblastům podobných buněk.

Při celkovém hodnocení vlivu přidavku faktorů TGF- β 1 a IGF-1 v dané koncentraci do kultivačního média jsou patrné negativní účinky na expanzi chondrocytů *in vitro*.

U obou skupin vzorků byly při srovnání odpovídajících si vzorků nižší poměry kolagenu typu II/typu I a aggrekanu/versikanu, což vypovídá o vyšší míře dediferenciace funkčních chondrocytů. Nižší bylo také množství kolagenu typu II i aggrekanu vyprodukovaného buňkami. Celková produkční schopnost buněk od dárců trpících OA byla nižší, pozitivním výsledkem však je, že se i z těžce poškozené tkáně se podařilo získat buňky, které dokáží syntetizovat kolagen typu II a aggrekan.

Použití média s obsahem PRP nedokázalo zabránit dediferenciaci buněk ve 2D kultuře. Jelikož je ale plazma bohatá na krevní destičky ekonomicky výhodnou a snadno dostupnou xeno-free složkou média, tak se využití PRP nadále jeví jako možný postup pro *in vitro* expanzi chondrocytů. V navazujícím výzkumu je však nutné prozkoumat vliv tohoto média na kultivaci chondrocytů v trojrozměrné struktuře na specializovaném nosiči, čímž bude dosaženo podmínek výrazně bližších *in vivo* prostředí z pohledu fyzikálních a chemických vlastností funkční extracelulární matrix. Ve výzkumu navazujícím na tuto práci bude dále využívána stanovená metodika proteomické analýzy, která je cenným nástrojem poskytujícím přesné a detailní informace při kvalitativním hodnocení tkáňových náhrad. Výsledky této diplomové práce budou součástí publikace připravované do časopisu kategorie Jimp.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SLÍPKA, Jaroslav a Zbyněk TONAR. *Základy histologie*. 2. Praha: Karolinum Press, 2018. ISBN 978-80-246-3983-3.
- [2] JUNQUERIA, L. Carlos, Robert O. KELLEY a José CARNEIRO. *Základy histologie*. 7. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- [3] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 2. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [4] GILLIS, Andrew. The Development and Evolution of Cartilage. In: *Reference Module in Life Sciences*. 1. Cambridge: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-12-809633-8. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.90770-2.
- [5] HALLETT, Shawn. A., Wanida ONO a Noriaki ONO. Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(23), 6009. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20236009.
- [6] HALLETT, Shawn A., Wanida ONO a Noriaki ONO. The hypertrophic chondrocyte: To be or not to be. *Histol Histopathol*. 2021, 36, 1021–1036. Dostupné z: doi:10.14670/HH-18-355.
- [7] OVALLE, William K. a Patrick C. NAHIRNEY. *Netter's essential histology: with correlated histopathology*. 3. Philadelphia: Elsevier, 2020. ISBN 978-0-323-69464-3.
- [8] SENOL, Mehmet Selcuk a Hamza ÖZER. Architecture of cartilage tissue and its adaptation to pathological conditions. *Comparative Kinesiology of the Human Body*. 2020, 91–100. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-812162-7.00007-2.
- [9] GOLDRING, M. B. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 2006, 20(5), 1003–1025. Dostupné z: doi:10.1016/j.berh.2006.06.003.
- [10] CASSIDY, James T., Ross. E. PETTY, Ronald M. LAXER a Carol B. LINDSLEY. *Textbook of Pediatric Rheumatology*. 5. Philadelphia: W.B. Saunders, 2005. ISBN 978-1-4160-0246-8.
- [11] WANG, Yun, Liang-Yu CHEN a Ru LIU-BRYAN. Mitochondrial Biogenesis, Activity and DNA Isolation in Chondrocytes. *Methods in molecular biology*. 2021, 2245, 195–213. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-1119-7_14.

- [12] WATKINS, J. Biomechanics of Musculoskeletal Adaptation. *Comprehensive Biomedical Physics*. 2014, 10, 1–37. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53632-7.01002-9.
- [13] KAWAGUCHI, Hiroshi. Regulation of Osteoarthritis Development by Wnt-b-catenin Signaling Through the Endochondral Ossification Process. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009, 24, 8–11. Dostupné z: doi:10.1359/jbmr.081115.
- [14] HEIJINK, Andras, et al. Biomechanics considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surgery Sports Traumatol Arthosc*. 2012, 20(3). Dostupné z: doi:10.1007/s00167-011-1818-0.
- [15] SILVER, F. H., G. BRADICA a A. TRIA. Relationship among biomechanical, biochemical and cellular changes associated with osteoarthritis. *Crit Rev Biomed Eng*. 2001, 29(4), 373–91.
- [16] GARCÍA-CARVAJAL, Z., D. GARCIADIEGO-CÁZARES, C. PARRA-CID, R. AGUILAR-GAYTÁN, C. VELASQUILLO, C. IBARRA, a S. CASTRO CARMONA. Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. 1. Málaga: InTech, 2013, 868. ISBN 978-953-51-1108-5. Dostupné z: doi:10.5772/55917.
- [17] RODWELL, Victor, David BENDER, Kathleen BOTHAM, Peter KENNELLY a Anthony WEIL. *Harpers illustrated biochemistry*. 31. vyd., New York: Lange medical book McGraw Hill education, 2018. ISBN: 978-1-259-83793-7.
- [18] ROUGHLEY, Peter J. and John S. MORT. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2014, 1(8). Dostupné z: doi:10.1186/s40634-014-0008-7.
- [19] KNUDSON, Cheryl B. a Warren KNUDSON. Cartilage proteoglycans. *Cell and Developmental Biology*. 2001, 12, 69–78. Dostupné z: doi: 10.1006/scdb.2000.0243
- [20] POOLE, A. Robin, Toshi KOJIMA, Tadashi YASUMA, Fackson MWALE, Masahiko KOBAYASHI a Sheila LAVERTY. Composition and Structure of Articular Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2001, 391, 26–33. Dostupné z: doi:10.1097/00003086-200110001-00004.
- [21] SOPHIA FOX, A. J., A. BEDI a S. A. RODEO. The basic science of articular cartilage: structure, composition and function. *Sports Health*. 2009. 1(6), 461–468. Dostupné z: doi:10.1177/1941738109350438

- [22] GUILAK, F., et al. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, 68, 498–512. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1346.011
- [23] WILUSZ, R. E., J. SANCHEZ-ADAMS. a F. GUILAK. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology*. 2014, 39, 25–32. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2014.08.009.
- [24] OWCZARZY, A., R. KURASIŃSKI, K. KULIG, W. ROGÓZ, A. SZKUDLAREK a M. MACIAZEK-JURCZYK. Collagen – structure, properties and application. *Engineering of Biomaterials*. 2020, 156, 17–23. Dostupné z: doi:10.34821/eng.biomat.156.2020.17-23.
- [25] SHOULDERS, M. D. a R. T. RAINES. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*. 2009, 78, 929–958. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [26] GOLDBERGA, Ieva, Li RUI a Melinda J. DUER. Collagen Structure – Function Relationships from Solid-State NMR Spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*. 2018, 51(7), 1621–1629. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.8b00092.
- [27] MEYER, M. Processing of collagen based biometrerials and the resulting materials properties. *BioMedical Engineering OnLine*. 2019, 18, 24. Dostupné z: doi:10.1186/s12938-019-0647-0.
- [28] DOMENE, C., C. JORGENSEN a S. WAJID ABBASI. A perspective on structural and computational work on collagen. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, 18, 24802–24811. Dostupné z: doi:10.1039/C6CO03403A.
- [29] SOBCZAK-KUPIEC, A., A. DRABCZYK, W. FLORKIEWICZ, M. GLAB, S. KUDLACIK-KRAMARCZYK, D. SLOTA, A. TOMALA a B. TYLISZCZAK. Review of the Applications of Biomedical Compositions Containing Hydroxyapatite and Collagen Modified by Bioactive Components. *Materials*. 2021, 14, 2096. Dostupné z: doi:10.3390/ma14092096.
- [30] EYRE, D. R., M. A. WEIS a J. J. WU. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *European cells and materials*. 2006, 12, 57–63. Dostupné z: doi:10.22203/ecm.v012a07.
- [31] OLSEN, B. R. Collagen IX. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1997;29(4):555–8.

- [32] MELROSE, J., C. SHU, J. M. WHITELOCK a M. S. LORD. The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. *Matrix Biology*. 2016;52–54:363–383. Dostupné z: doi: 10.1016/j.matbio.2016.01.008.
- [33] ARMIENTO, A. R., M. J. STODDART, M. ALINI a D. EGLIN. Biomaterials for Articular Cartilage Tissue Engineering: Learning from Biology. *Acta Biomaterialia*. 2017. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2017.11.021.
- [34] ROUGHLEY, Peter J. The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells and Materials*. 2006, 12, 92–101. Dostupné z: doi:10.22203/eCM.v012a11
- [35] DOEGE, K. J., M. SASAKI, T. KIMURA a Y. YAMADA. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglykan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem*. 1991, 266, 894–902.
- [36] SANDY, J. D., C. R. FLANNERY, R. E. BOYNTON a P. J. NEAME. Isolation and characterization of disulfide-bonded peptides from the three globular domains of aggregating cartilage proteoglykan. *J Biol Chem*. 1990, 265, 21109–21113.
- [37] WATANABE, H., S. C. CHEUNG, N. ITANO, K. KIMATA a Y. YAMADA. Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. *J Biol Chem*. 1997, 272, 28057–28065.
- [38] KRISHNAN, Yamini a Alan J. GRODZINSKY. Cartilage Diseases. *Matrix Biol*. 2018, 71-72, 51–69. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2018.05.005
- [39] GOMES, R., C. KIRN-SAFRAN, M. C. FARACH-CARSON a D. D. CARSON. Perlecan: an important component of the cartilage pericellular matrix. *Journal of musculoskeletal and neuronal interactions*. 2002, 2(6), 511–516.
- [40] GUBBIOTTI, M. A., T. NEILL a R. V. IOZZO. A current view of perlecan in physiology and pathology: a mosaic of functions. *Matrix biology* 2017, 57-58. 285–298. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2016.09.003.
- [41] IOZZO, R. V. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, 18843–18846.
- [42] BIANCO, P., L. W. FISCHER, M. F. YOUNG, J. D. TERMINE a R. G. ROBEY. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1990, 38, 1549–1563.

- [43] MELCHING, L. I. a P. J. ROUGHLEY. The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage. *Biochemical journal*. 1989, 261, 501–508.
- [44] DANIELSON, K. G., H. BARIBAUT, D. F. HOLMES, H. GRAHAM, K. E. KADLER a R. V. IOZZO. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *Journal of Cell Biology*. 1997, 136, 729–743.
- [45] XU, T., et al. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nature Genetics*. 1998, 20, 78–82.
- [46] PLAAS, A. H., P. J. NEAME, C. M. NIVENS a L. REISS. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265, 20634–20640.
- [47] BENGTTSSON, E., P. J. NEAME, D. HEINEGARD a Y. SOMMARIN. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, 25639–25644.
- [48] JOHNSON, J., T. SHINOMURA, H. EBERSPEACHER, G. PINERO, B. DECROBRUGGHE a M. HOOK. Expression and localization of PGLb/epiphygan during mouse development. *Developmental dynamics*. 1999, 216, 499–510.
- [49] JAMES, S. L., D. ABATE, K. H. ABATE, S. M. ABAY, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018, 392, 1789–1858.
- [50] HUNTER, D. J. a S. BIERMA-ZEINSTRA. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019, 393, 1745–1759.
- [51] GOLDRING, Mary. B. Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *HSS Journal*. 2012, 8(1), 7–9. Dostupné z: doi:10.1007/s11420-011-9250-z.
- [52] PRIETO-ALHAMBRA, D., A. JUDGE, M. K. JAVAID, C. COOPER, A. DIEZ-PEREZ a N. K. ARDEN. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: Influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann. Rheum. Dis*. 2014, 73, 1659–1664.
- [53] DONELL, S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Opev review*. 2019, 4, 221–229.

- [54] ENGLUND, M., A. GUERMAZI a S. L. LOHMANDER. The Role of the Meniscus in Knee Osteoarthritis: A Cause or Consequence? *Radiol. Clin. N. Am.* 2009, 47, 703–712.
- [55] BURLEIGH, A., A. CHANALARIS, M. D. GARDINER, C. DRISCOLL, O. BORUC, J. SAKLATVALA a T. L. VINCENT. Joint immobilization prevents murine osteoarthritis and reveals the highly mechanosensitive nature of protease expression in vivo. *Arthritis Rheumatol.* 2012, 64, 2278–2288.
- [56] TROEBERG, L. a H. NAGASE. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012, 1824, 133–145.
- [57] MIXON, A., A. S. BAHAR-MONI a T. R. FAISAL. Mechanical characterization of articular cartilage degraded combinedly with MMP-1 and MMP-9. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2022, 129. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2022.105131.
- [58] ROSE, Brandon J. a David L. KOOYMAN. A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Disease Markers.* 2016. Dostupné z: doi:10.1155/2016/4895050.
- [59] WANG, Xi a Raouf A. KHALIL. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol.* 2018, 81, 241–330. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apha.2017.08.002.
- [60] TETLOW, L. C., D. J. ADLAM a D. E. WOOLLEY. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 2001, 44(3), 585–594. Dostupné z: doi:10.1002/1529-0131(200103)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C.
- [61] CORYELL, P. R., B. O. DIEKMAN a R. F. LOESER. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2020, 17, 47–57.
- [62] MCCLURG, O., R. TINSON, L. TROEBERG. Targeting Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Pharmaceuticals.* 2021, 14(2), 126. Dostupné z: doi:10.3390/ph14020126.
- [63] LI, S.-H. a Q.-F. WU. MicroRNAs target on cartilage extracellular matrix degradation of knee osteoarthritis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2021, 25(3), 1185–1197. Dostupné z: doi:10.26355/eurrev_202102_24821.
- [64] SCHNABEL, M., S. MARLOVITS, G. ECKHOFF, I. FICHTEL, L. GOTZEN, V. VÉCSEI a J. SCHLEGEL. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2002, 10, 62–70. Dostupné z: doi:10.1053/joca.2001.0482.

- [65] DARLING, Eric M. a Kyriacos A. ATHANASIOU. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005, 23(2), 425–432. Dostupné z: doi:10.1016/j.orthres.2004.08.008.
- [66] BENYA, Paul D. a Joy D. SHAFFER. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982, 30(1), 215–224. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(82)90027-7.
- [67] DIAZ-ROMERO, J., J. P. GAILLARD, S. P. GROGAN, D. NESIC, T. TRUB a P. MAINIL-VARLET. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: Changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *Journal of Cellular Physiology*. 2004, 202(3), 731–742. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.20164.
- [68] MAO, Yong, Travis BLOCK, Anya SINGH-VARMA, Anne SHELDRAKE, Rachel LEETH, Sy GRIFFEY a Joachim KOHN. Extracellular matrix derived from chondrocytes promotes rapid expansion of human primary chondrocytes *in vitro* with reduced dedifferentiation. *Acta Biomaterialia*. 2019, 85, 75–83. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2018.12.006.
- [69] HEIDARI, Mahnaz, Mohammad TAHMASEBI, Samar ETEMAD, Sheida SALEHKOU, Hamed HEIDARI-VALA a Mohammad AKHONDI. In vitro Human Chondrocyte Culture; A Modified Protocol. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2011, 9, 102–109.
- [70] PAN, D., B. QIAN, D. ZHAO. Nfib protomotes chondrocyte proliferation and inhibits differentiation by mildly regulating Sox9 and its downstream genes. *Mol Biol Rep*. 2021, 48, 7487–7497. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-021-06767-2.
- [71] GSTRAUNTHALER, Gerhard, Toni LINDL a Jan VAN DER VALK. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*. 2013, 65(5), 791–793. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-013-9633-8.
- [72] LIAU, L. L., M. N. F. BIN HASSAN, Y. L. TANG, M. H. NG a J. X. LAW. Feasibility of Human Platelet Lysate as an Alternative to Foetal Bovine Serum for In Vitro Expansion of Chondrocytes. *Int J Mol Sci*. 2021, 22(3), 1269. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22031269.
- [73] KAPS, C., A. LOCH, A. HAISCH, H. SMOLIAN, G. R. BURMESTER, T. HAUPL a M. SITTINGER. Human Platelet Supernatant Protomotes Proliferation but Not Differentiation of Articular Chondrocytes. *Med Biol Eng Comput*. 2002, 40, 485–490. Dostupné z: doi:10.1007/BF02345083.

- [74] AKEDA, K., H. S. AN, M. OKUMA, M. ATTAWIA, K. MIYAMOTO, E. J. THONAR, M. E. LENZ, R. L. SAH a K. MASUDA. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006, 14, 1272–1280. Dostupné z: doi:10.1016/j.joca.2006.05.008.
- [75] CHIEN, C. S., H. O. HO, Y. C. LIANG, P. H. KO, M. T. SHEU, C. H. CHEN. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012, 11, 948–955.
- [76] SPREAFICO, A., F. CHELLINI, B. FREDIANI, G. BERNARDINI, S. NICCOLINI, T. SERCHI, G. COLLODEL, A. PAFFETTI, V. FOSSOMBRONI, M. GALEAZZI, R. MARCOLONGO a A. SANTUCCI. Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes. *J Cell Biochem*. 2009, 108, 1153–1165. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.22344.
- [77] GAISSMAIER, C., J. FRITZ, T. KRACKHARDT, I. FLESCHE, W. K. AICHER a N. ASHAMMAKHI. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*. 2005, 26, 1953–1960. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.031.
- [78] DRENGK, A., A. ZAPF, E. K. STURMER, K. M. STURMER a K. H. FROSCHE. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2009, 189, 317–326. Dostupné z: doi:10.1159/000151290.
- [79] BRANDL, A., P. ANGELE, C. ROLL, L. PRANTL, R. KUJAT a B. KINNER. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J Orthop Res*. 2010, 28, 354–360.
- [80] FORTIER, L. A., H. O. MOHAMMED, G. LUST a A. J. NIXON. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 2002, 84: 276–288. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.84B2.11167.
- [81] STEWART, A. A., C. R. BYRON, H. PONDENIS a M. C. STEWART. Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am J Vet Res*. 2007, 68: 941–945. Dostupné z: doi:10.2460/ajvr.68.9.941.
- [82] XIE, Xuetao, ZHANG, Changqing a Rocky S. TUAN. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research and Therapy*. 2014, 16, 204. Dostupné z: doi:10.1186/ar4493.

- [83] SAKATA, R. a A. H. REDDI. Platelet-rich plasma modulates actions on articular cartilage lubrication and regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2016, 22, 408–419.
- [84] ROMAN-BLAS, J. A., D. G. STOKES a S. A. JIMENEZ. Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 2007, 15, 1367–1377.
- [85] LANGENMAIR, E. R., E. J. KUBOSCH, G. M. SALZMANN, S. BECK a H. SCHMAL. Clinical trial and in vitro study for the role of cartilage and synovia in acute articular infection. *Mediators Inflamm.* 2015.
- [86] MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology.* 2018, 120. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
- [87] MACEY, Marion G. Flow cytometry: principles and applications. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007. ISBN 1597454516
- [88] COSSARIZZA, A., H. D. CHANG, A. RADBRUCH, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology.* 2017, 47(10), 1584–1979. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201646632
- [89] KNUDSON, C. B. a W. Knudson. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. 2004, 427, 152–162.
- [90] HAMADA, T., T. SAKAI, H. HIRAIWA, M. NAKASHIMA, Y. ONO, H. MISTUYAMA a N. ISHIGURO. Surface markers and gene expression to characterize the differentiation of monolayer expanded human articular chondrocytes. *Nagoya journal of medical science.* 2013, 75(1-2), 101–111.
- [91] VINOD, E., P. R. J. V. C. BOOPALAN a S. SATHISHKUMAR. Reserve of Resident Progenitors in Cartilage? Comparative analysis of Chondrocytes versus Chondroprogenitors and Their Role in Cartilage Repair. *Cartilage.* 2017, 9, 2. Dostupné z: doi:10.1177/1947603517736108.
- [92] MORATH, I., T. N. HARTMANN a V. ORIAN-ROUSSEAU. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016, 81, 166–173. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2016.09.009.
- [93] KNUDSON, C. B. Hyaluronan and CD44: Strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003, 69, 174–196. Dostupné z: doi:10.1002/bdrc.10013.

- [94] GROGAN, S. P., A. BARBERO, J. DIAZ-ROMERO, A. M. CLETON-JANSEN, S. SOEDER, et al. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis Rheum.* 2007, 56, 586–595. Dostupné z: doi:10.1002/art.22408.
- [95] BUI, T. M., H. L. WIESOLEK a R. SUMARGIN. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of leukocyte biology.* 2020, 108(3), 787–799. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.2MR0220-549R.
- [96] DAVIES, M. E., H. SHARMA a R. PIGOTT. ICAM-1 expression of chondrocytes in rheumatoid arthritis: induction by synovial cytokines. *Mediators Inflamm.* 1992, 1, 71–74.
- [97] MORAES, D. A., T. T. SIBOV, L. F. PAVON, et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy.* 2016, 7, 97. Dostupné z: doi:10.1186/s13287-016-0359-3.
- [98] CAMPBELL, D. D. a M. PEI. Surface markers for chondrogenic determination: a highlight of synovium-derived stem cells. *Cells.* 2012, 2(4), 1107–1120. Dostupné z: doi:10.3390/cells1041107.
- [99] COX, J., M. Y. HEIN, C. A. LUBER, I. PARON, N. NAGARAJ a M. MANN. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular and Cellular Proteomics.* 2014, 13. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M113.031591.
- [100] PU, X. a J. T. OXFORD. Proteomic Analysis of Engineered Cartilage. *Methods in molecular biology.* 2015, 1340, 263–278. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2938-2_19.
- [101] BILAJEW, B. J., R. P. DONAHUE, E. K. LAMKIN, J. C. HU, V. C. HASCALL a K. A. ATHANASIOU. Proteomic, mechanical, and biochemical development of tissue-engineered neocartilage. *Biomaterials Research.* 2022, 26, 34. Dostupné z: doi:10.1186/s40824-022-00284-4.
- [102] CHAIT, B. T. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science.* 2006, 314(5796). 65-66. Dostupné z: doi:10.1126/science.1133987.
- [103] ZHANG, Y., B. R. FONSLow, B. SHAN, M. C. BAEK a J. R. YATES. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* 2013, 113(4), 2343-2394. Dostupné z: doi:10.1021/cr3003533.

- [104] CHARDWAJ, C. a L. HANLEY. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. *Nat. Prod. Rep.* 2014, 31, 756-767. Dostupné z: doi:10.1039/C3NP70094A.
- [105] HAAG, A. M. Mass analyzers and mass spectrometers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 919, 157–169. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41448-5_7.
- [106] THOMAS, S. N., D. FRENCH, P. J. JANNETTO, B. A. RAPPOLD a W. A. CLARKE. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primers.* 2022, 2(1), 96. Dostupné z: doi:10.1038/s43586-022-00175-x.
- [107] ISLAM, M. S., A. ARYASOMAYAJULA a P. R. SELVAGANAPATHY. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines.* 2017, 8(3), 83. Dostupné z: doi:10.3390/mi8030083.
- [108] MATSUDA, T., M. TOMITA a Y. ISHIHAMA. Phase Transfer Surfactant-Aided Trypsin Digestion for Membrane Proteome Analysis. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 731–740. Dostupné z: doi:10.1021/pr700658q.
- [109] SHARMA, R., B. D. DILL, K. CHOUREY, M. SHAH, N. C. VERBERKMOES a R. L. HETTICH. Coupling a detergent lysis/cleanup methodology with intact protein fractionation for enhanced proteome characterization. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 6008–6018. Dostupné z: doi:10.1021/pr300709k.
- [110] WIŚNIEWSKI, J. R., A. ZOUGMAN, N. NAGARAJ a M. MANN. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods.* 2009, 6(5), 359–362. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1322.
- [111] LUDWIG, K. R., M. M. SCHROLL a A. B. HUMMON. Comparison of In-Solution, FASP, and S-Trap Based Digestion Methods for Bottom-Up Proteomic Studies. *J Proteome Res.* 2018, 17(7), 2480–2490. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.8b00235.
- [112] WIŚNIEWSKI, J. R. Filter Aided Sample Preparation – A Tutorial. *Analytica chimica acta.* 2019, 1090, 23–30. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.08.032.
- [113] MÜLLER, Torsten a Dominic WINTER. Systematic Evaluation of Protein Reduction and Alkylation Reveals Massive Unspecific Side Effects by Iodine-containing Reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2017, 16(7), 1173–1187. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M116.064048.
- [114] DAU, T., G. BARTOLOMUCCI a J. RAPPILBER. Proteomics Using Protease Alternatives to Trypsin Benefits from Sequential Digestion with Trypsin. *Analytical Chemistry.* 2020, 92, 14, 9523–9527. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.0c00478.

- [115] SAMODOVA, D., C. M. HOSFIELD, C. N. CRAMER, M. V. GIULI, E. CAPPELLINI, G. FRANCIOSA, M. M. ROSENBLATT, C. D. KELSTRUP a J. V. OLSEN. ProAlanase is an Effective Alternative to Trypsin for Proteomics Applications and Disulfide Bond Mapping. *Mol Cell Proteomics*. 2020, 19(12), 2139–2156. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.TIR120.002129.
- [116] YEUNG, Yee-Guide a E. Richard STANLEY. Rapid Detergent Removal From Peptide Samples With Ethyl Acetate for Mass Spectrometry Analysis. *Curr Protoc Protein Sci*. 2010, 16. Dostupné z: doi:10.1002/0471140864.ps1612s59.
- [117] ALI, A. H. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Ann Adv Chem*. 2022, 6, 010–020. Dostupné z: doi:10.29328/journal.aac.1001026.
- [118] WALTER, T. H. a R. W. ANDREWS. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014, 63, 14–20. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.07.016.
- [119] DONG, Michael. *HPLC and UHPLC For Practicing Scientists*. 2. John Wiley and Sons, 2019. ISBN: 978-1-119-31376-2.
- [120] GUILLARME, D. a J. L. VEUTHEY. Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS. *Handbook of Advanced Chromatography/MSTechniques*. 2017, 1–38. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-811732-3.00001-7.
- [121] *TimsTOF Pro* [online]. Korea: Bruker, 2023 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://www.bruker.com/content/bruker/int/ko/products-and-solutions/mass-spectrometry/timstof/timstof-pro.html?q=%7B%7Bspellcheck%7D%7D>.
- [122] LEMR, K. a L. BOROVCOVÁ. Ionizace elektrosprejem. *Chemické listy*. 2020, 114(3), 169-178. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3559>.
- [123] MEIER, F., S. BECK, N. GRASSL, M. LUBECK, M. A. PARK, O. RAETHER a M. MANN. Parallel Accumulation–Seriál Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped Ion Mobility Device. *J Proteome Res*. 2015, 14, 12, 5378–5387. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.5b00932.
- [124] MEIER, F., A. D. BRUNNER, S. KOCH, H. KOCH, M. LUBECK, M. KRAUSE, N. GOEDECKE, J. DECKER, T. KOSINSKI, M. A. PARK, N. BACHE, O. HOERNING, J. COX, O. RATHER a M. MANN. Online Parallel Accumulation–Seriál Fragmentation (PASEF)

with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2018, 17, 2534–2545. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.TIR118.000900.

[125] GUILHAUS, M. Mass Spectrometry, Time-of-Flight. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2005, 412-423. Dostupné z: doi:10.1016/b0-12-369397-7/00347-2.

[126] RIDGEWAY, M. E., M. LUBECK, J. JORDENS, M. MANN, M. A. PARK. Trapped ion mobility spektrometry: A short review. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2018, 425, 22–35. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2018.01.006.

[127] *Thermo Scientific UltiMate 3000 RSLCnano UHPLC System* [online]. USA: ThermoFisher Scientific, 2018 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/PS-71899-LC-UltiMate-3000-RSLCnano-PS71899-EN.pdf>.

[128] *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12)* [online]. USA: Thermo Fisher Scientific, 2023 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media.htmlv>

[129] *Zell Shield TM Cell Culture Contamination Preventive (50 ml)* [online]. Praha: BioConsult, 2023 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://bioconsult.cz/cs/280-zell-shield-tm-cell-culture-contamination-preventive-50-ml.html>

[130] *GlutaMAX Supplement and L-Glutamine for Cell Culture* [online]. USA: Thermo Fisher Scientific, 2023 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements.html>

[131] GALLAGHER, S. R. a E. A. WILEY. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2. USA: John Wiley, 2012. ISBN 9780470942413.

[132] STEJSKAL, Karel, David POTĚŠIL a Zbyněk ZDRÁHAL. Suppression of Peptide Sample Losses in Autosampler Vials. *J Proteome Res*. 2013, 12, 3057–3062. Dostupné z: doi:10.1021/pr400183v.

[133] WUEST, S. L., M. CALIO, T. WERNAS, S. TANNER, C. GIGER-LANGE, F. WYSS, F. ILLE, B. GANTENBEIN a M. EGLI. Influence of Mechanical Unloading on Articular Chondrocyte Dedifferentiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19,1289. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19051289.

[134] MARTIN, I., M. JAKOB, D. SCHÄFER, W. DICK, G. SPAGNOLI a M. HEBERER. Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and

osteoarthritic joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001, 9(2), 112–8. Dostupné z: doi:10.1053/joca.2000.0366.

[135] DIAZ-ROMERO, J., D. NESIC, S. P. GROGAN, P. HEINI a P. MAINIL-VARLET. Immunophenotypic changes of human articular chondrocytes during monolayer culture reflect bona fide dedifferentiation rather than amplification of progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2008, 214(1), 75–83. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.21161.

[136] OLIN, A. I., M. MORGELIN, T. SASAKI, R. TIMPL, D. HEINEGARD a A. ASPBERG. The Proteoglycans Aggrecan and Versican Form Networks with Fibulin-2 through Their Lectin Domain Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276, 1253–1261. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M006783200.

[137] GROVER, J. a P. J. ROUGHLEY. Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA variation with aggrecan. *Biochem J*. 1993, 291, 361–367. Dostupné z: doi:10.1042/bj2910361.

[138] CHEN, Y., B. WU, J. LIN, D. YU, X. DU. Z. SHENG, et al. High-Resolution Dissection of Chemical Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts into Fibrocartilaginous Cells. *Stem Cell Reports*. 2020, 14, 3, 478–492. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2020.01.013.

[139] DE CROMBRUGGHE, B., V LEFEBRE, R. R. BEHRINGER, W. BI, S. MURAKAMI a W HUANG. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*. 2000, 19(5), 389–394. Dostupné z: doi:10.1016/s0945-053x(00)00094-9.

[140] PARK, S., A. BELLO, Y. ARAI, J. AHN, D. KIM, K.-Y. CHA, I. BAEK, H. PARK a S.-H. LEE. Functional Duality of Chondrocyte Hypertrophy and Biomedical Application Trends in Osteoarthritis. *Pharmaceutics*. 2021, 13(8), 1139. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13081139.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- APC – allofykocyanin
- APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku
- APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku
- bFGF – základní fibroblastový růstový faktor
- COMP – spojovací protein chrupavky
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMEM/F-12 – Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12
- DTT - dithiothreitol
- ECM – extracelulární matrix
- EI – elektronová ionizace
- ESI – ionizace elektrosprejem
- FASP – příprava vzorku za pomoci filtru
- FBS – fetální bovinní sérum
- FC – fold change
- FCH – Fakulta chemická
- FITC – fluorescein-5-isothiokyanát
- FN – fakultní nemocnice
- GAGs – glykosaminoglykany
- HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie
- IGF-1 – inzulínu podobný růstový faktor 1
- ICP – ionizace indukčně vázaným plazmatem
- ICR – iontová cyklotronová rezonance
- IT – iontová past
- LC-MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií
- MALDI – ionizace laserem za asistence matrice
- MMP – matrixové metaloproteinázy
- MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie
- OA – osteoartróza
- PBS – phosphate buffer saline
- PBST – phosphate buffer saline – Tween

PDGF – destičkový růstový faktor

PE – fykoerythrin

PRELP – proline arginine-rich end leucin-rich repeat protein

PRP – plazma bohatá na krevní destičky, médium bez přídavku růstových faktorů

PRP-F – médium s přídavkem růstových faktorů

Q – kvadrupól

SDS – dodecylsírán sodný

SLRPs – malé proteoglykany bohaté na leucin

TGF- β 1 – transformující růstový faktor beta 1

TIMS – iontová mobilní spektrometrie se záchytem iontů

TOF – analyzátor doby letu

UA – močovina v TrisHCl

UHPLC – extrémně vysokotlaká kapalinová chromatografie

VUT – Vysoké učení technické