

Maturace kardiomyocytů

Tina Maloušková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Tina Maloušková
Osobní číslo: T21145
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Maturace kardiomyocytů

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Zpracujte literární přehled zaměřený na možnosti léčby kardiovaskulárních onemocnění.
Popište problematiku maturace kardiomyocytů odvozených z pluripotentních kmenových buněk.
Porovnejte fenotypy zralých a nezralých kardiomyocytů.

Praktická část:

Seznamte se s prací v biologických laboratořích.
Naučte se manipulaci s kmenovými buňkami.
Připravte embryoidní tělíska různými metodami (visící kapka suspenzní metoda atd.).
Proveďte kardiomyogenezi myších embryonálních kmenových buněk dle standardního protokolu.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] KARBASSI E. et al., "Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine", *Nat Rev Cardiol*, roč. 17, č. 6, s. 341–359, čer. 2020, doi: 10.1038/s41569-019-0331-x.
- [2] OLVERA LOPEZ E. et al. "Cardiovascular Disease", in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Viděno: 20. červen 2023. [Online]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/>.
- [3] MURPHY S. A. et al. "Maturing heart muscle cells: Mechanisms and transcriptomic insights", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, roč. 119, s. 49–60, lis. 2021, doi: 10.1016/j.semcdb.2021.04.019.
- [4] KUROSAWA H. "Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, roč. 103, č. 5, s. 389–398, kvě. 2007, doi: 10.1263/jbb.103.389.
- [5] JHALA D. a VASITA R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polymer Reviews*, 2015, 55 (4), pp 56182595, doi: <https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1040552>.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kateřina Skopalová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Tina Maloušková

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou spojenou s nedostatečnou regenerací srdce. Po jeho poškození dochází ke ztrátě kardiomyocytů, tedy buněk v srdci, které se vyvíjí především v embryonálním a časném postnatálním období, ale v dospělosti se již nedělí a nedochází k jejich obnově. Ztráta kardiomyocytů vede ke zhoršení funkce srdečního svalu a přispívá k rozvoji kardiovaskulárních chorob, které představují vážný zdravotní problém po celém světě. Navzdory pokrokům v medicíně zůstává regenerace srdce velmi problematickou oblastí, a proto je předložená práce zaměřena právě na maturaci kardiomyocytů, tedy na jejich proces zrání. Dobře maturované kardiomyocyty mají oproti nedozrálým buňkám lepší kontraktilní vlastnosti, ale také jsou schopny interagovat s okolními tkáněmi v srdci a aktivně se zapojovat do procesů změn ve struktuře srdce. Důležitým pomocníkem v této problematice mohou být také biomateriály, které poskytují buňkám ideální prostředí pro jejich růst a diferenciaci. To může pozitivně ovlivnit proces zrání buněk, a tím i regeneraci srdce. Praktická část práce pak byla zaměřena na tvorbu embryonálních tělísek metodou visících kapek, suspenzní metodou a pomocí mikrodestiček AggreWellTM800, následnou kardiomyogenezí a izolací kardiomyocytů.

Klíčová slova: maturace kardiomyocytů, regenerace srdce, kardiovaskulární onemocnění, kmenové buňky, kardiomyocyty

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the issue associated with insufficient heart regeneration. After its damage, there is a loss of cardiomyocytes, cells in the heart, that develop mainly in the embryonic and early postnatal period, but in adulthood they no longer divide and do not regenerate. Their loss leads to the deterioration of cardiac muscle function and contributes to the development of cardiovascular diseases, which represent a serious health problem worldwide. Despite advances in medicine, heart regeneration remains a very problematic area, and therefore, the presented work is focused on the maturation of cardiomyocytes, specifically on their maturation process. Well-matured cardiomyocytes have better contractile properties compared to immature cells, but they are also capable of interacting with surrounding tissues in the heart and actively participating in processes of changes in heart structure. Biomaterials can also be important aids in this issue, providing cells with an ideal environment for their growth and differentiation. This can positively influence the cell

maturation process and thus heart regeneration. The practical part of the thesis was focused on the formation of embryoid bodies using the hanging drop method, suspension method, and using AggreWell™800 microplates, followed by cardiomyogenesis and isolation of cardiomyocytes.

Keywords: cardiomyocyte maturation, heart regeneration, cardiovascular diseases, stem cells, cardiomyocytes

Ráda bych vyjádřila své upřímné poděkování paní Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. za její odborné vedení, vstřícný přístup a cenné rady v průběhu psaní mé bakalářské práce. Její motivace a podpora mi umožnila prohloubit mé znalosti a dovednosti v oblasti maturace kardiomyocytů.

Ráda bych poděkovala také své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

I	TEORETICKÁ ČÁST	11
1	KARDIOVASKULÁRNÍ CHOROBY	12
1.1	SRDEČNÍ ONEMOCNĚNÍ	15
1.2	PŘÍČINY A PŘÍZNAKY SRDEČNÍCH CHOROB	15
1.3	MOŽNOSTI LÉČBY SRDEČNÍCH CHOROB	15
2	ZÁKLADNÍ ANATOMIE A FYZIOLOGIE SRDCE.....	17
2.1	KARDIOMYOCYTY A JEJICH STRUKTURA	19
3	REGENERACE SRDCE	21
3.1	ROZDÍLY MEZI ZRALÝMI A NEZRALÝMI KARDIOMYOCYTY	21
3.1.1	Schopnost proliferace	22
3.2	BIOMATERIÁLY PODPORUJÍCÍ REGENERACI SRDCE	22
4	MATURACE KARDIOMYOCYTŮ	24
4.1	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MATURACI KARDIOMYOCYTŮ	25
4.1.1	Extracelulární matrix	25
4.1.2	Metabolický stav	26
4.1.3	Elektrické a mechanické signály	26
4.2	VÝZNAM ZRÁNÍ KARDIOMYOCYTŮ PRO VÝVOJ SRDCE.....	27
4.3	VYUŽITÍ KARDIOMYOCYTŮ PRO OBJEVOVÁNÍ LÉČIV A TESTOVÁNÍ TOXICITY	28
4.4	VYUŽITÍ KARDIOMYOCYTŮ PRO MODELOVÁNÍ CHOROB, VČETNĚ DĚDIČNÝCH SRDEČNÍCH CHOROB A SRDEČNÍHO SELHÁNÍ.....	28
5	KMENOVÉ BUŇKY	30
5.1	DĚLENÍ NA ZÁKLADĚ DIFERENCIAČNÍHO POTENCIÁLU	30
5.1.1	Totipotentní	30
5.1.2	Pluripotentní	30
5.1.3	Multipotentní	31
5.1.4	Unipotentní	31
5.2	DĚLENÍ NA ZÁKLADĚ ZDROJE BUNĚK	31
5.2.1	Embryonální kmenové buňky	31
5.2.2	Buňky dospělých tkání (multipotentní).....	32
5.2.3	Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC).....	33
II	PRAKTICKÁ ČÁST	34
6	CÍL PRÁCE	35
7	MATERIÁL A METODIKA	36
7.1	BUNĚČNÉ LINIE	36
7.2	KULTIVAČNÍ MÉDIUM.....	36
7.3	EXPERIMENT	37

7.3.1	Pasážování kmenových buněk	37
7.3.2	Počítání buněk přes Bürkerovu komůrku.....	38
7.3.3	Formace embryonálních tělísek	39
8	DISKUZE A VÝSLEDKY	45
8.1	FORMACE EMBRYONÁLNÍCH TĚLÍSEK METODOU VISÍCÍCH KAPEK	45
8.2	FORMACE EMBRYONÁLNÍCH TĚLÍSEK SUSPENZNÍ METODOU	46
8.2.1	Bakteriologický plastik	46
8.2.2	Bakteriologický plastik potažený agarem	48
8.2.3	Anti adhezivní plastik	48
8.3	METODA AGGREGWELL DESTIČEK.....	49
8.4	KARDIOMYOGENEZE	50
8.4.1	Kardiomyogeneze s buněčnou linií ESR1.....	50
8.4.2	Kardiomyogeneze s buněčnou linií HG8	53
8.4.3	Erytropoéza	54
8.5	IZOLACE KARDIOMYOCYTŮ	55
	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	65

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou po celém světě hlavní příčinou úmrtí a mají negativní vliv na lidské zdraví a kvalitu života jedinců. Problematikou spojenou s KVO je nedostatečná regenerace srdce. Lidské srdce se totiž potýká s překážkou, kdy po jeho poškození dochází pouze k omezené regenerační schopnosti, což vede k postupnému zhoršování jeho funkce a ústí v srdeční selhání. Například po srdečním infarktu dochází namísto obnovy funkčních kardiomyocytů ke tvorbě jizvy, čímž se snižuje výkonnost srdce a zhoršuje řada symptomů. (Steinhauser a Lee, 2011)

Za účelem opravy nebo náhrady poškozeného srdce se vkládá naděje do využití funkčních biomateriálů a biomimetických scaffoldů, ale vytvořit plně vyzrálé a funkční srdeční tkáň *in vitro* zůstává nadále velmi obtížné. (Tenreiro *et al.*, 2021)

Cestu k vyřešení tohoto problému komplikuje také nedostatek dárců pro transplantaci srdce (HT – Heart Transplant), což ovlivňuje široké spektrum faktorů včetně lékařských, právních, kulturních a etických aspektů. Je zapotřebí rozšířit nejen stávající, ale i nové strategie výběru dárců a zlepšit alternativní metody pro transplantaci. Nacházíme se v situaci, kdy poptávka po vhodných dárcích srdce převyšuje současnou nabídku, což může být důsledkem stárnutí populace, zlepšení celkového přežití po infarktu myokardu a pozitivnějších výsledků u pacientů, kteří trpí srdečním selháním. (Cameli *et al.*, 2022)

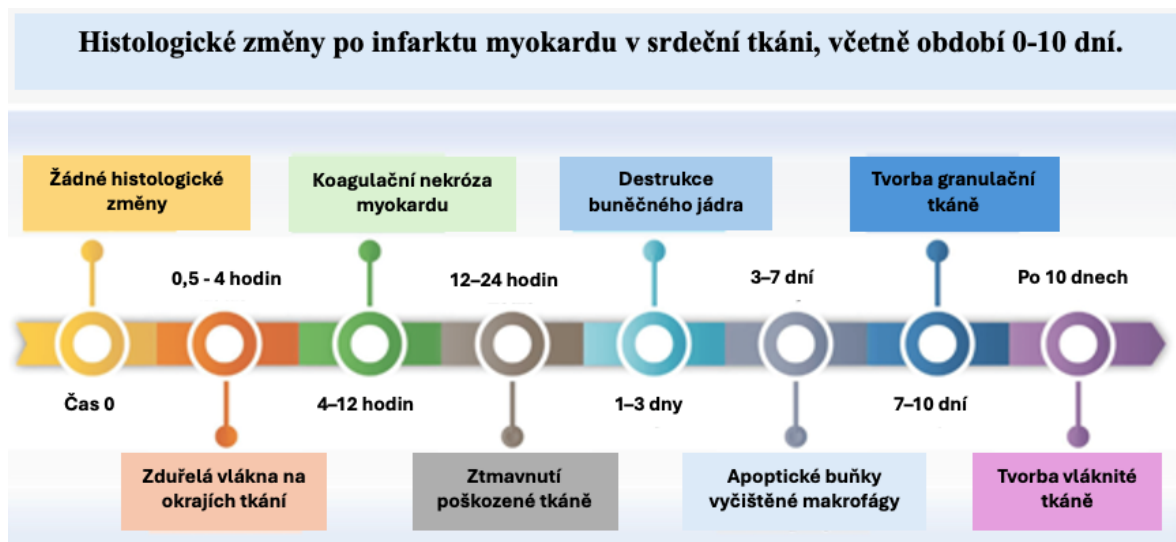
Teoretická část předložené práce se zaměřuje na kardiovaskulární onemocnění a jejich příčiny, příznaky a možnosti léčby. Abychom byli schopni vynalézt biomateriál podporující maturaci kardiomyocytů, je nejprve důležité porozumět základní anatomii a fyziologii srdce, které se věnuje druhá kapitola. Důležitou součástí je také regenerace srdce, struktura kardiomyocytů a jejich samotná maturace.

Praktická část práce je zaměřena na vytvoření kardiomyocytů z embryonálních kmenových buněk (ESC) prostřednictvím formace embryonálních tělísek (EBs), a to hned několika metodami (metodou visících kapek, suspenzní metodou a pomocí mikrodestiček AggreWellTM800).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KARDIOVASKULÁRNÍ CHOROBY

Navzdory pokroku v terapii a klinickém výzkumu představují KVO hlavní příčinu nemoci, ale také úmrtnosti po celém světě. Narozdíl od srdečního onemocnění (SO) představují KVO širší kategorii, která zahrnuje všechny typy onemocnění postihující srdce nebo cévy, zatímco SO představuje konkrétní podkategorii KVO. Tyto choroby mohou způsobit mrtvici, infarkt myokardu (IM), srdeční selhání nebo onemocnění periferních tepen. (Parrotta *et al.*, 2020) Ke vzniku srdečního selhání často přispívá IM a to tím, že způsobuje trvalou ztrátu kardiomyocytů, změnu struktury srdečního svalu, vznik jizev, ale také ztenčení a oslabení srdečních stěn a výskyt arytmií. Časové schéma histologických změn srdeční tkáně je zobrazeno na Obrázku 1. Téměř ihned po prodělaném infarktu nejsou pod mikroskopem viditelné žádné histologické změny, nicméně v prvních 30 minutách až 4 hodinách dochází na okrajích tkání k jejich zduření a ke ztrátě glykogenu. V průběhu nejbližších 8 hodin vzniká koagulační nekróza myokardu, která v postižené oblasti způsobuje otok. V rozmezí 12 až 24 hodin můžeme pozorovat, jak poškozené tkáně tmavnou a hromadí se neutrofily¹. Po uplynutí prvních 1 až 3 dnů je zničeno buněčné jádro, zatímco v období 3 až 7 dnů makrofágy odstraňují z dané oblasti buňky, které prošly procesem apoptózy. Ve dnech 7 až 10 probíhá tvorba granulační tkáně, po které následuje usazování kolagenu typu I v dané postižené oblasti. Nakonec se během 2 měsíců vytvoří fibrózní tkáň za účelem náhrady odumřelých buněk a vzniká jizva. (Scafa Udriște *et al.*, 2023)



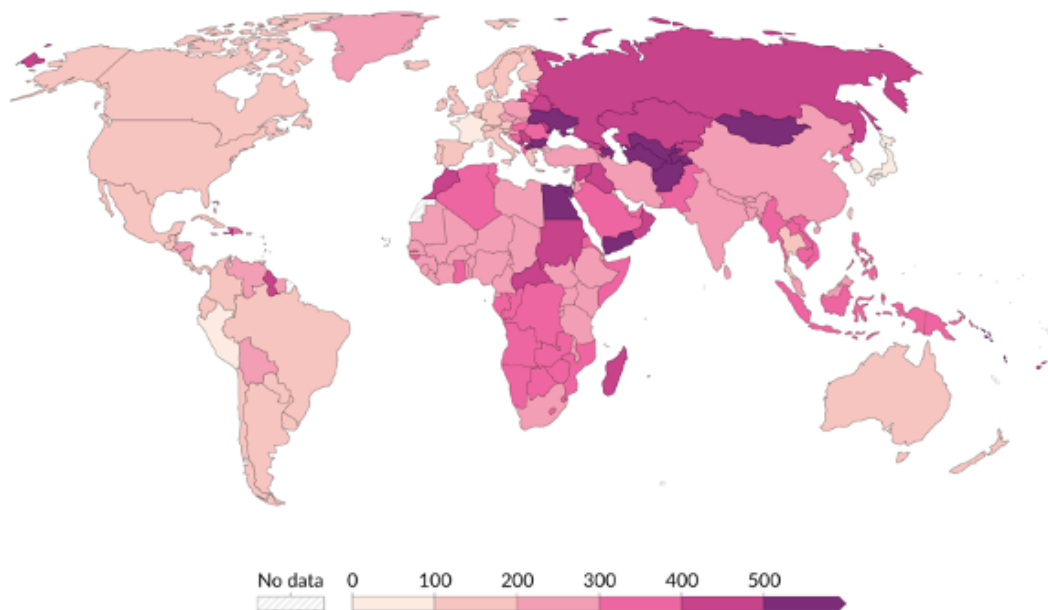
Obrázek 1 Histologické změny po MI na srdeční tkáni (Scafa Udriște *et al.*, 2023)

¹ Bílé krvinky, které bojují s infekcemi a cizorodými látkami v těle. Jsou schopny pohltit a zlikvidovat mikroorganismy, jako jsou bakterie nebo viry, a hrají klíčovou roli v imunitní reakci na infekce. (Malech, DeLeo a Quinn, 2014)

Zhodnocení úmrtnosti na KVO podle statistik IHME (Institute for Health Metrics a Evaluation), Globální zátěž nemocí z roku 2019 poskytuje pohled na zdravotní situaci ve světě. Tento trend lze sledovat pomocí přiložené mapy úmrtnosti na KVO, kde jsou jednotlivé země vyznačeny podle odstínu barev (Obrázek 2). Mapa je doprovázena legendou, která napomáhá interpretovat míru úmrtnosti v jednotlivých státech.

Úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění, 2019

Odhadovaná úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění¹ na 100, 000 obyvatel.



Zdroj dat: IHME, Globální zátěž nemocí (2019)

[OurWorldInData.org/causes-of-death](https://ourworldindata.org/causes-of-death) | CC BY

Poznámka: Pro možnost srovnání mezi zeměmi a v čase je tato metrika věkově standardizovaná².

1. Kardiovaskulární onemocnění: Kardiovaskulární onemocnění zahrnují všechna onemocnění srdce a cév – včetně infarktu a mrtvice, aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, hypertenzních chorob, kardiomyopatie, revmatických onemocnění srdce a dalších. Mají tendenci se rozvíjet postupně s věkem, zejména pokud mají lidé rizikové faktory, jako je vysoký krevní tlak, kouření, užívání alkoholu, špatná strava a znečištěné ovzduší.

2. Věková standardizace: Věková standardizace je úprava, která umožňuje porovnávat populace s různou věkovou strukturou tím, že je standardizuje na společnou referenční populaci.

Obrázek 2 Mapa úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění pro celý svět v roce 2019

(<https://ourworldindata.org/>)

Na jedné straně máme státy jako Peru, Francie, Japonsko a Jižní Korea, které mají relativně nízké úrovně úmrtnosti na KVO, konkrétně 77–95 úmrtí na 100.000 obyvatel. Na druhé straně jsou státy, jako je Mongolsko, Egypt, Ukrajina a Uzbekistán, které mají výrazně vyšší úmrtnost v důsledku těchto onemocnění, konkrétně 518-946 úmrtí na 100.000 obyvatel.

KVO jsou často spojena s životním stylem jednotlivců, jako je strava, fyzická aktivita, kouření a nadměrná konzumace alkoholu. Proto by se strategie snižování úmrtnosti

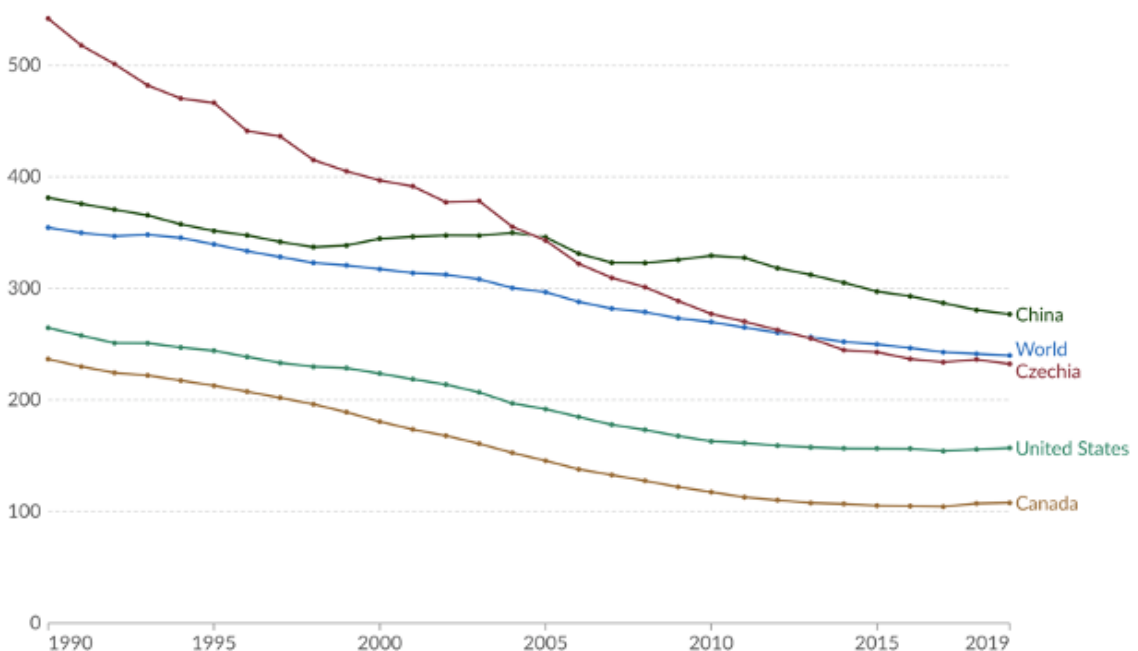
na tato onemocnění měly zaměřovat nejen na zlepšení přístupu ke zdravotní péči, ale také na edukaci veřejnosti a podporu zdravějšího životního stylu. (Stewart, Manmathan a Wilkinson, 2017)

Podle grafu (Obrázek 3) pak můžeme sledovat pokrok v úmrtnosti na KVO v České republice, kdy od roku 1990 bylo 541 úmrtí na 100.000 obyvatel, a současná úroveň z roku 2019 byla 232 úmrtí na 100.000 obyvatel. Tento pokles je důsledkem zlepšení zdravotní péče, prevence a zvýšeného povědomí veřejnosti o rizicích těchto onemocnění. Nicméně, KVO stále zůstávají hlavní příčinou úmrtí nejen v České republice, ale také ve světě. Proto je důležité pokračovat v úsilí o další snižování zátěže těmito chorobami prostřednictvím prevence, vzdělávání a poskytování moderní léčby.

Úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění, 2019

Odhadovaná úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění¹ na 100, 000 obyvatel.

Our World
in Data



Zdroj dat: IHME, Globální zatížení nemocí (2019)

[OurWorldInData.org/causes-of-death](https://ourworldindata.org/causes-of-death) | CC BY

Poznámka: Pro možnost srovnání mezi zeměmi a v čase je tato metrika věkově standardizovaná².

1. Kardiovaskulární onemocnění: Kardiovaskulární onemocnění zahrnují všechna onemocnění srdce a cév – včetně infarktu a mrtvice, aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, hypertenzních chorob, kardiomyopatie, revmatických onemocnění srdce a dalších. Mají tendenci se rozvíjet postupně s věkem, zejména pokud mají lidé rizikové faktory, jako je vysoký krevní tlak, kouření, užívání alkoholu, špatná strava a znečištěné ovzduší.

2. Věková standardizace: Věková standardizace je úprava, která umožňuje porovnávat populace s různou věkovou strukturou tím, že je standardizuje na společnou referenční populaci.

Obrázek 3 Graf úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění v roce 1990-2019
(<https://ourworldindata.org/>)

1.1 Srdeční onemocnění

SO je všeobecný termín, zahrnující celou řadu stavů, které ovlivňují strukturu a funkci srdce. Jedná se zejména o ischemickou chorobu srdeční², srdeční infarkt, nebo arytmií srdce³. Mezi další typické projevy patří srdeční dysfunkce a odumírání kardiomyocytů. Ztráta srdečních buněk představuje nevratný proces, který vede k fibróze a tvorbě jizev. Tato patologická změna následně vyvolává srdeční selhání s postupnými následky. (Parrotta *et al.*, 2020)

1.2 Příčiny a příznaky srdečních chorob

Přestože přesné příčiny vzniku a rozvoje SO nejsou dosud zcela objasněny, všeobecně se uznává, že na jejich vzniku se podílejí jak genetické faktory, tak faktory životního prostředí. Řada SO je způsobena rozsáhlým odumíráním kardiomyocytů, přičemž schopnost dospělého srdce nahradit nebo doplnit ztracené kardiomyocyty je velmi omezená. Z toho vyplývá, že taková ztráta nevratně poškozuje srdce, postupně zhoršuje jeho funkčnost a časem se vyvíjí v srdeční selhání. (Parrotta *et al.*, 2020)

Riziko SO může být dále zvýšeno některými faktory životního stylu a také zdravotním stavem, jako je vysoký krevní tlak, nadměrná hladina cholesterolu, kouření, nadměrná konzumace alkoholu, přebytná hmotnost a vysoká hladina cukru v krvi. Příznaky SO se mohou projevovat bolestí nebo nepříjemnými pocity na hrudi, bolestí horní části zad a krku, pálení žáhy, dušnost, nevolnost, silná únava, zažívací potíže, závratě, palpitace⁴, otoky na končetinách, břicho, nebo v oblasti krčních cév. (Stewart, Manmathan a Wilkinson, 2017)

1.3 Možnosti léčby srdečních chorob

Možnosti léčby SO závisí na typu a závažnosti onemocnění. Důležitou součástí léčby jsou zdravé životní návyky, jako je strava s nízkým obsahem tuků a soli, pravidelná fyzická aktivita, omezení kouření a kontrola hmotnosti. Tyto jednoduché změny mohou snížit riziko výskytu dalších příhod SO. V případě, že samotné změny nepřinášejí požadované výsledky, je zapotřebí nasadit léky k řízení příznaků SO a k prevenci komplikací, které mohou pomoci snížit hladinu špatného cholesterolu, snížit hromadění plaku v tepnách, ředit krev, zabránit vzniku krevních sraženin, zmírnit příznaky bolesti na hrudi a snížit krevní tlak. (Rippe, 2019)

² Ucpané cévy (Parrotta *et al.*, 2020)

³ Abnormální srdeční frekvence (Parrotta *et al.*, 2020)

⁴ Pocit chvění v hrudní oblasti (Rippe, 2019)

V některých případech je potřeba chirurgický zákrok, kdy zařízení, jako jsou kardiostimulátory a implantabilní kardiovertery-defibrilátory (ICD), mohou léčit abnormální srdeční rytmus. V některých případech mohou být nezbytné zákroky, jako je koronární bypass nebo HT. (Allen a Felker, 2008)

Léčba srdečního selhání pomocí transplantace je vhodnou cestou pro některé pacienty v pokročilém nebo konečném stádiu onemocnění. Statistiky z Globální observatoře dárcovství a transplantací ukazují, že koncem roku 2020 došlo k HT u 2081 pacientů v zemích Evropské unie, avšak během téhož roku bylo 6352 pacientů na seznamu čekatelů, z toho 435, tedy 7 %, zemřelo před získáním vhodného srdce. Za poslední dvě desetiletí se v Evropě zvýšil počet HT na milion obyvatel o 35 %. Poptávka po transplantacích stále převyšuje nabídku, a to zejména kvůli stárnutí populace, zvýšeného procenta přežití po srdečním infarktu a lepším prognózám pro pacienty se srdečním selháním. Nedostatek vhodných dárců pro transplantaci je komplexním problémem, který zahrnuje lékařské, právní, náboženské, kulturní a etické otázky. V současnosti se vynakládá značné úsilí k vylepšení stávajících postupů a zkoumání, jaké možnosti přináší nové technologie, kdy cílem je zlepšit bezpečnost během uchování a přepravy darovaného orgánu. Slibným objevem je možnost provádět dárcovství po oběhové smrti (DCD) a dalšími perspektivními směry výzkumu, jako je xenotransplantace⁵, se otevírají nové možnosti v řešení nedostatku dostupných dárců orgánů. (Cameli *et al.*, 2022)

⁵ Zákrok, při kterém se nefunkční orgán/tkáň příjemce nahrazuje zdravým orgánem/tkání od jiného živočišného druhu, než je příjemce. (Cooper, 2012)

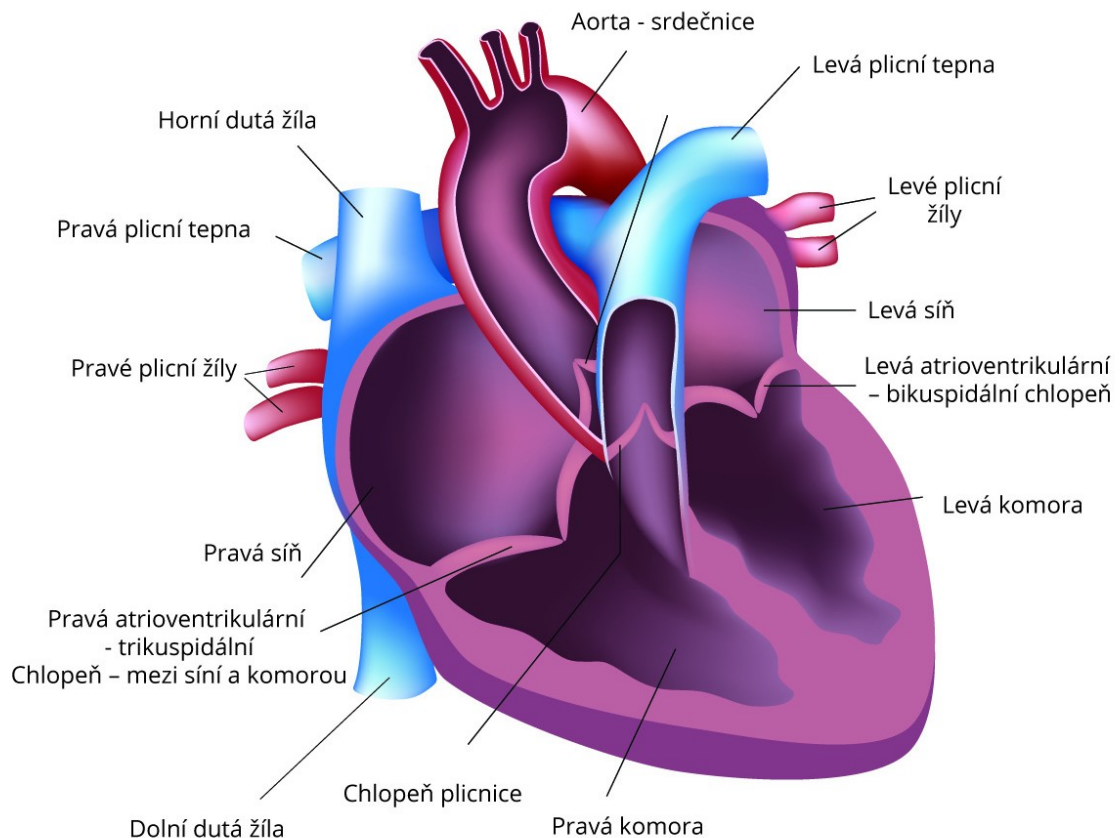
2 ZÁKLADNÍ ANATOMIE A FYZIOLOGIE SRDCE

Srdce a přilehlé cévy mají zásadní úlohu při transportu okysličené krve z plic do celého těla a při návratu odkysličené krve z těla do plic. Srdce má kuželovitou strukturu rozdělenou na dvě svalové komory a dvě chlopně, které koordinovaně regulují směr toku krve. Účinnost tohoto systému mohou narušit nebo snížit různé faktory, které ovlivňují nervy zásobující srdce, samotný srdeční sval a cévy, které podporují srdce a sousední tkáně. Pochopení základní struktury srdce slouží jako základ pro porozumění jeho fyziologických funkcí a vývoje kardiovaskulárních poruch. (Shah, Seydafkan a Sheps, 2022)

Již zmiňované cévy jsou důležitou součástí kardiovaskulárního systému, konkrétně tepny, které odvádějí krev ze srdce do těla, a žíly, které ji zase vracejí zpět do srdce. Tepny se skládají z vnitřní vrstvy endotelu, střední vrstvy hladké svaloviny a vnější vrstvy pojivové tkáně, což jim umožňuje přizpůsobovat se potřebám těla. Arterioly jsou menší tepny, které se dále dělí na kapiláry a umožňují výměnu látek mezi krví a tkáněmi. Tyto kapiláry se později spojují a vytvářejí venuly, které se postupně zvětšují a spojují v žíly vedoucí do pravé srdeční síně, odkud je krev přečerpávána do plic k okysličení. (Shah, Seydafkan a Sheps, 2022)

Srdce je obklopeno osrdečníkem, jinými slovy vazivovým vakem, který umožňuje pohyb srdce s minimálním třením, a dokáže díky několika spojům s okolní tkání udržet srdce na místě. Myokard neboli nejtlustší vrstva srdce, obsahuje svalovou tkáň zodpovědnou za vytváření stahů. Srdeční kostra, vláknitá struktura uvnitř srdce, slouží jako upevňovací bod pro chlopně a endokard obklopuje vnitřní stranu srdce a poskytuje hladký povrch pro průtok krve. Svalové stahy srdce jsou regulovány převodním systémem, který zahrnuje jednak sinoatriální (SA) uzel, ale také atrioventrikulární (AV) uzel, Purkyňova vlákna a Hisův svazek. SA uzel, který leží ve stěně pravé síně a má funkci jako kardiostimulátor, dokáže samostatně řídit frekvenci srdce, a především iniciuje elektrický impuls, který spouští srdeční stahy. Tento impuls se pak šíří přes síně, stimuluje AV uzel, Purkyňova vlákna i Hisův svazek, a nakonec vede ke koordinovaným stahům síní a komor. Tyto složky dohromady synchronizují rytmické pumpování komor a zaručují účinný průtok krve. Mezi jednotlivci existují značné rozdíly v délce srdečního cyklu (tj. v srdeční frekvenci), přičemž průměrná frekvence se pohybuje kolem 60 tepů za minutu.

Koronární tepny, které vycházejí z kořene aorty, zásobují srdeční sval kyslíkem a živinami. Na rozdíl od ostatních tělních tepen získávají koronární tepny krev z aorty, když je aortální chlopeň během diastoly uzavřena. Levá hlavní tepna se větví na levou přední sestupnou tepnu (LAD) a levou okružní tepnu (LCX), které zásobují především levou komoru. Pravá věnčitá tepna (RCA) zásobuje pravou komoru i AV uzel a posouvá krev směrem dozadu. (Shah, Seydafkan a Sheps, 2022)



Obrázek 4 Vnitřní anatomie srdce (<https://www.symptomy.cz/anatomie/srdce>)

Fyziologie srdce se zabývá jeho funkcí, a to včetně svalových stahů, elektrické aktivity a krevního oběhu. Zahrnuje také pochopení srdečního cyklu, který se skládá z fáze relaxace, tedy diastoly, a také z fáze kontrakce, tedy systoly. Díky tomu se srdeční komory rytmicky plní a vyprazdňují krví, aby byl zachován neustálý průtok okysličené krve z koronárních tepen pro udržení své činnosti. Tento průtok, nazývaný metabolická potřeba srdce, udržuje minimální srdeční výdej, tedy litry krve, které srdce čerpá za minutu. Srdeční výdej závisí na zdvihovém objemu, tedy na množství krve vypuzené z levé komory srdce při kontrakci, a srdeční frekvenci, tedy počtu srdečních stahů za minutu. Nedostatek minimálního srdečního výdeje může vést k problémům jako je srdeční selhání.

Zdvihový objem srdce je ovlivněn předtížením, dotížením a kontraktilitou. Předtížením označujeme množství krve v levé komoře před kontrakcí, obvykle umožňuje vyšší zdvihový objem. Kontraktilita, kterou určuje síla srdečního stahu, ovlivňuje zdvihový objem. Silnější kontrakce srdce vede k nižšímu koncovému systolickému objemu, což je množství krve zůstávající v srdci na konci kontrakce. (Shah, Seydafkan a Sheps, 2022)

2.1 Kardiomyocyty a jejich struktura

Kardiomyocyty představují svalové buňky srdce, které zodpovídají za stálou a rytmickou kontrakci srdce. Pro udržení jejich funkce je důležitý regulovaný a organizovaný cyklus kontrakce a relaxace, který vytváří tlak potřebný k pumpování krve do celého těla. Právě stahování kardiomyocytů probíhající uvnitř svalu v jednotném rytmu je důležité pro zajištění dostatečného prokrvení příslušných orgánů a tkání.

Struktura kardiomyocytů je jedinečná, vysoce specializovaná a komplexní. Kardiomyocyty dospělých jedinců obsahují centrálně umístěná jádra a ztrácí schopnost dělení, tedy při poškození srdce nejsou schopny sebeobnovy. Jsou to velké, válcovité, rozvětvené buňky, které jsou spojeny pomocí interkalárních destiček. Tyto destičky obsahují gap junctions neboli mezerovité spoje, které slouží pro rychlý přenos malých molekul, iontů a elektrických impulsů mezi sousedními buňkami, což umožňuje synchronizaci akčních potenciálů a koordinovanou kontrakci srdce. (Slaats, Schwach a Passier, 2020)

Zejména rodina proteinů gap junction konexinů (Cx) je ve vývoji srdce významná a poruchy regulace exprese Cx nebo posttranslační úpravy struktury mohou vést k fatálním arytmiím nebo perinatální úmrtnosti. (Stoppel, Kaplan a Black, 2016)

Struktura těchto buněk se skládá ze svazků myofibril, tedy tyčinkovitých jednotek uvnitř buňky, které jsou tvořeny opakujícími se úseky sarkomer z tlustých a tenkých vláken, tzv. myofilament, které se během kontrakce vzájemně pohybují. Řada tenkých vláken obsahuje bílkovinu aktin a řada silných vláken obsahuje myozin. (Slaats, Schwach a Passier, 2020) Jejich součástí jsou mimo jiné mitochondrie, které produkují značné množství adenosintrifosfátu (ATP) a myoglobinu, který uchovává energii potřebnou pro svalovou kontrakci. Každé narušení jejich struktury nebo funkce může vyvolávat širokou škálu patologických stavů, včetně selhání srdce.

Pokud jsou buňky izolovány, dochází k přerušení jejich spojení, což znamená, že jsou izolované buňky částečně propustné. Proto je potřeba kardiomyocyty z dospělého myokardu izolovat v médiu bez Ca^{2+} a posléze je v něm také udržovat, dokud se neopraví poškozené membrány. V opačném případě by hrozilo, že buňky budou přetíženy vysokým množstvím Ca^{2+} , což vede k hyperkontrakcím a následné smrti. Buňky si po izolaci zachovávají svou charakteristickou strukturu, ale pokud nejsou elektricky stimulovány, tak se začnou během několika dní v kultivovaném prostředí pozvolna zmenšovat. (Woodcock a Matkovich, 2005)

3 REGENERACE SRDCE

Regenerace srdce je zásadní oblastí pro léčbu SO, ale regenerační odezva je v porovnání s mnoha jinými tkáněmi, jako jsou játra, plíce, kosti nebo kůže velmi malá. Pochopení překážek tohoto procesu je klíčové, zejména proto, že srdce se po infarktu nebo jiném poškození nedokáže samo regenerovat. Hlavní příčinou srdečního selhání je právě odumírání kardiomyocytů, které má za následek snížení čerpací funkce srdce a významně přispívá k celosvětové úmrtnosti.

Ačkoli srdce savců má omezenou regenerační schopnost, nižší organismy, jako jsou například mloci, dokážou svá srdce regenerovat velmi účinně. U těchto organismů procházejí kardiomyocyty v blízkosti místa poranění procesem dediferenciace, po kterém následuje proliferace a diferenciaci v nové kardiomyocyty. Tyto nově vzniklé srdeční myocyty se začlení do stávajícího myokardu, což vede k úplné regeneraci srdce, případně na srdci zůstávají pouze lehké známky poranění. (Steinhauser a Lee, 2011)

Skutečnost, že srdce se po jeho poškození nedokáže samo regenerovat, přivedla vědce k intenzivnímu výzkumu, jehož cílem bylo obnovit trvale poškozenou srdeční tkáň. Slibným směrem v tomto regeneračním procesu je využití kmenových buněk (kterým bude věnována celá samostatná kapitola 5 KMENOVÉ BUŇKY) a bezbuněčných terapií. Další studie se zaměřují na interakce mezi buňkami, které tvoří jizvu a srdečními progenitory s cílem pochopit, jak jejich vzájemná komunikace ovlivňuje proces obnovy srdce. (Laflamme a Murry, 2011)

3.1 Rozdíly mezi zralými a nezralými kardiomyocyty

Zralé a nezralé kardiomyocyty se odlišují v mnoha ohledech, včetně struktury, funkce a metabolismu. Z hlediska morfologie jsou nezralé kardiomyocyty při kultivaci *in vivo* tyčinkovitého tvaru, obdobně jako jejich dospělé protějšky, zatímco při kultivaci *in vitro* mají nezralé kardiomyocyty zaoblený tvar a rozprostírají se všemi směry. Dospělé kardiomyocyty si v kultuře zachovávají válcovitou a protáhlou podobu. V obou případech je velikost buněk velmi důležitým parametrem, protože má vliv na šíření impulsu, maximální rychlost depolarizace akčního potenciálu a celkovou kontraktilní sílu.

Tuto morfologickou variabilitu provází také rozdíly ve struktuře sarkomer, přičemž zralé buňky mají vysoce organizovanou strukturu sarkomer, na rozdíl od neuspořádané struktury nezralých kardiomyocytů. Kromě toho mají zralé kardiomyocyty navíc T-tubuly,

které usnadňují elektrickou excitaci a iniciaci, což je odlišuje od jejich nezralých protějšků, které T-tubuly neobsahují.

Další významný rozdíl se projevuje v mitochondriálních vlastnostech, kde zralé kardiomyocyty mají pravidelně rozmístěné mitochondrie s větším objemem, což přispívá k jejich zvýšené metabolické kapacitě, oproti tomu nezralé kardiomyocyty obsahují nepravidelnou síť mitochondrií v cytoplazmě, která zabírá menší část objemu buňky.

Elektrofyzilogicky projevují zralé kardiomyocyty vyšší zdvihovou frekvenci, negativnější klidový membránový potenciál a vyspělejší systém spojení vzruchu a kontrakce, což vede k jejich vyšší kontrakční síle ve srovnání s nezralými kardiomyocyty. (Yang, Pabon a Murry, 2014)

3.1.1 Schopnost proliferace

Nezralé kardiomyocyty vykazují v raných fázích vývoje silnou schopnost proliferace a obnovy, což souvisí s jejich vysokou potřebou růstu a buněčného dělení. Naopak s postupným zráním tato schopnost proliferace klesá, a tak jsou zralé kardiomyocyty převážně v klidovém stavu a dělí se pouze zřídka. Tato omezená schopnost regenerace je klíčová, protože nedostatečná obnova poškozené srdeční tkáně může negativně ovlivnit kvalitu života pacientů s onemocněním srdce. (Yang, Pabon a Murry, 2014)

Pro regeneraci srdce je velmi důležité mít dobře maturované kardiomyocyty, které prošly procesem zrání a vývoje do stavu, kdy jsou plně funkční a schopny efektivně vykonávat svou úlohu v srdeční tkáni. Touto problematikou se podrobněji zabývám v kapitole 4 MATURACE KARDIOMYOCYTŮ.

3.2 Biomateriály podporující regeneraci srdce

V oblasti tkáňového inženýrství se využívá několik druhů biomateriálů, jako jsou scaffoldy, hydrogely nebo nosiče. Buňky využívají tyto biomateriály k obnově a regeneraci tkání, zatímco biomateriály poskytují podporu různých procesů, jako je adheze, proliferace a diferenciaci buněk.

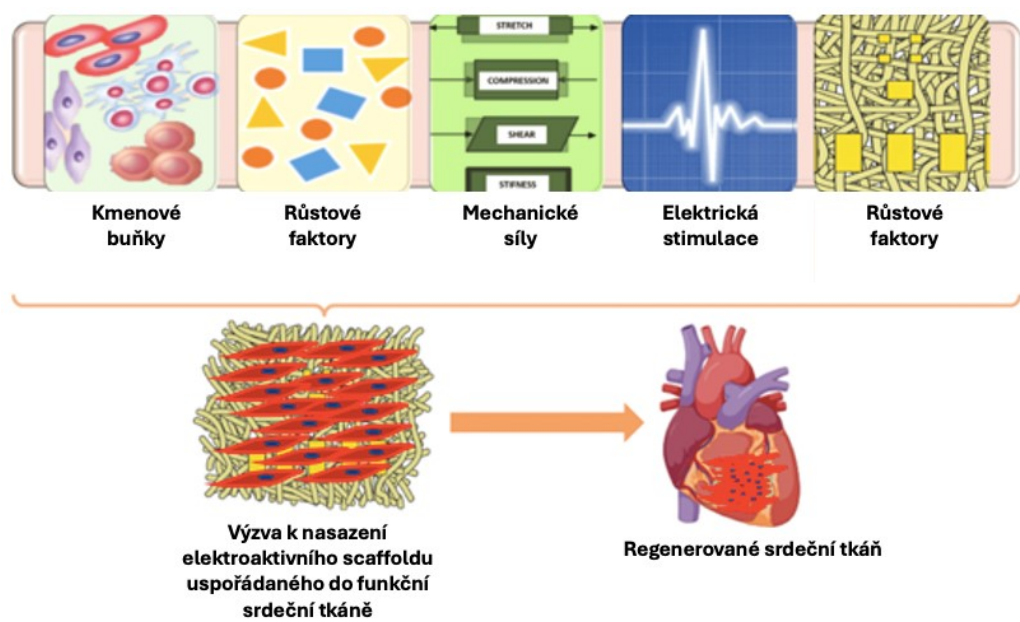
Při řešení problémů spojených s regenerací srdeční tkáně je důležité, aby struktura a vlastnosti materiálu co nejvíce napodobovaly přirozené vlastnosti srdeční extracelulární matrix (ECM), a vytvářely prostředí, které podporuje buněčnou životaschopnost. Biomateriály určené k léčbě srdce by měly být především biokompatibilní, tedy dobře

snášené tělem, a biodegradabilní, tedy schopné se postupně rozkládat, aby nezatěžovaly organismus. Dále by měly mít podobné mechanické vlastnosti jako nativní svalová tkáň, umožňovat integraci buněk a minimalizovat nepříznivé reakce okolního prostředí. Je také důležité, aby uvolňovaly bioaktivní látky v přiměřené rychlosti.

V současnosti jsou k dispozici různé přírodní (fibrin, algináty, kolagen, chitosan) a syntetické polymery (polyglykolová kyselina, polyuretan a jejich deriváty), které mají vlastnosti podobné těm, které jsou žádoucí pro srdeční tkáňové inženýrství. Tyto materiály splňují již zmiňovanou podmínku biokompatibility, mají vhodnou strukturu, mechanické vlastnosti a rozkládají se v těle přirozeným způsobem.

Kromě samotných biomateriálů se zkoumají jednak regenerační faktory, které se mohou navzájem kombinovat a podpořit tak léčbu srdeční tkáně, ale také faktory podporující přežití buněk v prostředí po infarktu. Důležitým aspektem je 3D struktura biomateriálu, která umožňuje přenos živin a kyslíku, tvorbu cévních struktur a podporuje přirozené procesy hojení tkáně.

Vzhledem k tomu, že je srdeční tkáň kvůli kontraktílním vlastnostem vystavena různým mechanickým silám, jako je stlačování a tah, je důležité, aby biomateriály odolávaly mechanickým deformacím. Mimo jiné by také měly být schopny vést elektrický proud, což je nezbytné pro správnou funkci srdce. (Scafa Udriște *et al.*, 2023)



Obrázek 5: Přehled klíčových faktorů pro regeneraci srdeční tkáně (Scafa Udriște *et al.*, 2023)

4 MATURACE KARDIOMYOCYTŮ

Maturace kardiomyocytů je dlouhodobý proces, označován jako poslední fáze vývoje srdce, kdy se fetální kardiomyocyty odvozené z lidských pluripotentních kmenových buněk (hPSC-CM) vyvíjejí v dospělé kardiomyocyty. Dochází ke změnám v genové expresi, buněčné morfologii, funkci a metabolismu. Všechny tyto transformace připravují srdce na efektivní, účinné a trvalé srdeční kontrakce po celou dobu života. (Guo a Pu, 2020)

Jednou ze změn v genové expresi je přepínání izoform, které mohou ovlivnit funkci a množství proteinů v buňce. Podle studií na modelech zvířat se během embryonálního vývoje kardiomyocyty vyznačují expresí pomalé izoformy kosterního svalu a následně po narození se přepínají na expresi izoformy srdeční, která byla rovněž prokázána i během vývoje lidského srdce. Nezbytnou součástí je také modulace nekódujících RNA, která sehrává roli v regulaci genové exprese a může ovlivňovat kontrolní mechanismy v průběhu vývoje a zrání kardiomyocytů. Regulace transkripčních faktorů je jednou z dalších změn, která ovlivňuje, jaké geny jsou v daném okamžiku aktivovány nebo potlačovány. Sekvenování RNA v jednotlivých buňkách umožnilo rozkrýt složitost a heterogenitu buněk během diferenciací a identifikovat transkripční faktory spojené s dozráváním (Karbassi *et al.*, 2020) mezi které řadíme například Gata4, Ha2, Mef2C, Nkx2-5 a Tbx5 (Dal-Pra, Hodgkinson a Dzau, 2019)

Morfologické změny se týkají přechodu od nezralé struktury k dospělé, včetně vývoje organizovanější a složitější sarkomerické struktury. Dospělé kardiomyocyty jsou vícejaderné buňky, které se prodlužují a stávají se cylindrickými s dobře organizovanými sarkomery a vyvinutým sarkoplazmatickým retikulem, zatímco fetální, nezralé kardiomyocyty jsou jednojaderné, menší a zaujímají spíše kulovitý tvar s neuspořádanými sarkomery. Rovněž nastává změna v uspořádání a velikosti buněčných komponent, jako je jádro, mitochondrie a již zmiňované sarkomery, které představují základní kontraktilní jednotky svalových buněk. (Karbassi *et al.*, 2020) K funkčnímu zrání patří vývoj kontraktilních vlastností, elektrofyziologických vlastností a schopnosti manipulace s vápníkem, která slouží k udržení síly a trvání srdeční kontrakce.

Metabolické zrání se během vývoje člověka výrazně mění. Důvodem je, že z počátku získávají nezralé kardiomyocyty energii z aktivní anaerobní glykolýzy, ale postupem času a s dozráváním kardiomyocytů využívají převážně β -oxidaci mastných kyselin, dýchací

řetězec a oxidativní fosforylaci, což vede ke zvýšené spotřebě kyslíku a produkci oxidu uhličitého. Mimo jiné se rozvíjí metabolismus lipidů a regulace biogeneze mitochondrií.

Vzhledem k tomu, že nepřetržité cyklické kontrakce kardiomyocytů jsou závislé na extrémně vysokém množství energie, je zřejmé, že se jedná o náročný proces. V srdci dospělého člověka se odhaduje denní obměna na 12 molů ATP, což odpovídá přibližně 6 kg molekul ATP, které je třeba denně syntetizovat pro zajištění normální funkce srdce. (Slaats, Schwach a Passier, 2020)

Této problematice je vzhledem k defektům zrání kardiomyocytů, jejich negativnímu vlivu na regeneraci myokardu a možnému podílu na vzniku srdečních onemocnění věnována zvýšená pozornost. (Karbassi *et al.*, 2020)

4.1 Faktory ovlivňující maturaci kardiomyocytů

Trvá roky, než lidské kardiomyocyty dozrají do dospělé formy, ať už jde o tvar, velikost, metabolické vlastnosti, složení molekul nebo fyzikální funkce *in vivo*. Existuje několik faktorů, které napomáhají a usnadňují zrání těchto buněk a jsou důležité pro jejich vývoj a funkčnost. (Yang, Pabon a Murry, 2014)

4.1.1 Extracelulární matrix

Interakce s ECM přispívá ke strukturálnímu, funkčnímu a elektrofyziologickému vývoji kardiomyocytů. ECM má jakožto základní složka srdeční tkáně podstatnou úlohu nejen při vývoji srdce, ale také při udržování homeostázy a odpovědi na poškození srdce. Mimo jiné byla ECM označena jako významný faktor během hypertrofie a maturace kardiomyocytů v neonatálním období, a stejně tak při vývoji plně vyvinutých kardiomyocytů v dospělosti. Při vytváření syntetických scaffoldů podporujících maturaci kardiomyocytů je důležité napodobovat jejich nativní prostředí, tedy ECM srdeční tkáně. Zajímavostí je, že měkčí ECM u synteticky vytvořených scaffoldů poskytuje větší a organizovanější gap junctions než tvrdší a tužší povrchy. (Herron *et al.*, 2016)

Dále bylo například zjištěno, že je na tuhých substrátech narušeno zrání neonatálních srdečních buněk, zatímco substrát s tuhostí podobné nativní tkáni podporoval proužkování ve svalových myotubulech. Tuhost ECM také ovlivňuje uchycení injektovaných kmenových buněk v poškozeném myokardu, což je spojené s jeho obnovením. (Forte *et al.*, 2012) Pokud se zvýší tuhost substrátu, na kterém jsou buňky kultivovány, může dojít ke zvýšené expresi

genů souvisejících se stárnutím srdce, čímž lze ovlivnit proces zrání kardiomyocytů. (Scuderi a Butcher, 2017)

4.1.2 Metabolický stav

Důsledkem environmentálních a buněčných změn dochází během embryonálního, fetálního a postnatálního vývoje k různým metabolickým stimulacím. Tyto změny mají vliv na metabolické procesy buněk, které mohou podpořit nebo dokonce iniciovat proces zrání kardiomyocytů. Pokud je vyvíjející se srdce vystaveno koncentracím metabolitů v děloze, které se v normálních fyziologických podmínkách nevyskytují v tak vysokých hodnotách, může to mít nepříznivý vliv na kardiomyocyty nebo celkovou funkci srdce v dospělosti. (Slaats, Schwach a Passier, 2020)

Metabolismus zajišťuje potřebnou energii pro vysoce aktivní kontraktilní kardiomyocyty, tedy pro takové, které zajišťují stah svalu. Vzhledem k tomu, že jednotlivé zásahy způsobují různé projevy zrání, lze předpokládat, že aktivací více signalizačních systémů dochází k posílení procesu zrání. (Karbassi *et al.*, 2020)

4.1.3 Elektrické a mechanické signály

Elektrické a mechanické stimule patří mezi přirozené mechanismy, které napomáhají k vývoji funkční, zralé srdeční tkáně a mimo jiné pomáhají řídit maturaci kardiomyocytů. Během vývoje jsou kardiomyocyty vystaveny stálým mechanickým podnětům, které působí na srdeční tkáň. Mezi takové podněty řadíme například plnění srdce a jeho postupné protahování, které podporuje vyrovnání kardiomyocytů a zlepšuje jejich kontraktilní funkci. Mezi další typy podnětů patří hemodynamické síly vyvolané průtokem krve a působení maturačních faktorů, což zahrnuje samovolné kontrakce cytoskeletu během srdečního výdaje. (Scuderi a Butcher, 2017)

Elektrická stimulace je v nativní tkáni řízena prostřednictvím výměny iontů mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím skrze napěťově řízené iontové kanály a může tak docházet k rozvoji fenotypu kardiomyocytů, který je obdobou fenotypu dospělého jedince. Ke stanovení zralosti kardiomyocytů v tkáni se uplatňují parametry, jako je elektrické šíření a síla kontrakce. (Stoppel, Kaplan a Black, 2016a) Elektrická stimulace *in vitro* vede k rychlejšímu dozrání kardiomyocytů odvozených z kmenových buněk během relativně krátké doby. Buňky mohou být elektricky stimulovány buďto během diferenciac

nebo až po jejím dokončení. Fenotyp kardiomyocytů je pak ovlivněn dobou a frekvencí elektrické stimulace. (Hong *et al.*, 2023)

V současnosti existují bioreaktory, které kombinací elektrické a mechanické stimulace napodobují komplexní signální prostředí vyskytující se *in vivo*, což může vést ke kardiomyocytům podobným jako u dospělého člověka.

Funkčnost kardiomyocytů odvozených z kmenových buněk však stále není srovnatelná s úrovní funkčnosti nativní srdeční tkáně. V důsledku toho mnoho kardiomyocytů odvozených z kmenových buněk vykazuje nezralý, fetální fenotyp. (Stoppel, Kaplan a Black, 2016)

Naděje na regeneraci dospělého lidského srdce po infarktu zůstává mizivá, protože obnova kardiomyocytů probíhá velmi pomalu. Slibným řešením pro léčbu poškozeného myokardu by mohlo být tkáňové inženýrství srdce. Kultivováním kmenových buněk na vodivých polymerech lze zvýšit jejich diferenciaci vzhledem k elektrickým vlastnostem těchto substrátů, což může vést k expresi klíčových srdečních proteinů, jako je Cx43, a následně usnadnit elektrické spojení a kontraktilitu buněk. Přestože jsou antibakteriální a antioxidační vlastnosti vodivých polymerů v oblasti tkáňového inženýrství lákavé, kvůli jejich nerozložitelnosti a potenciální cytotoxicitě při vysokých koncentracích jsou pro dlouhodobé použití nevhodné. Biologicky neodbouratelné zbytky mohou vyvolat zánětlivou reakci, která může vést k imunitnímu odmítnutí, a proto je nezbytné, aby byl vodivý polymer biodegradabilní, vnitřně vodivý a také možnost vodivosti polymeru přizpůsobit tak, aby co nejlépe napodoboval elektrické vlastnosti myokardu. Doposud nebyl vyvinut materiál, který by odolával neustálým cyklům kontrakce a relaxace po celou dobu své přirozené životnosti jako myokard. (Ul Haq *et al.*, 2021)

4.2 Význam zrání kardiomyocytů pro vývoj srdce

Proces zrání kardiomyocytů je kritický proces ve vývoji srdce, který připravuje orgán na výkonné a vytrvalé pumpování po celý život. Během vývoje srdce dochází k postupným změnám v úrovni exprese genů, umístění a funkci různých iontových kanálů v kardiomyocytech, které nakonec dosáhnou zralého stavu. (Guo a Pu, 2020)

Embryonální a fetální kardiomyocyty procházejí silnou proliferací, aby se vytvořily zralé srdeční komory schopné zvládnout náročné podmínky plodu v průběhu jeho vývoje. Naproti tomu postnatální kardiomyocyty se přestávají dělit a zahajují hypertrofický růst, kdy

se v případě vystavení zvýšené zátěže zvětšuje namísto počtu spíše velikost samotných kardiomyocytů. Tento proces ovlivňuje více signálních drah, které v této fázi řídí proliferaci kardiomyocytů. (Zhao *et al.*, 2020) V průběhu postnatálního zrání dochází k hlubokým morfologickým a funkčním změnám v srdci. I po delší kultivaci *in vitro* zůstávají kardiomyocyty odvozené z kmenových buněk fetální, a proto je hlavním cílem výzkumu, který se zabývá maturací, vyvinout takové metodiky, pomocí kterých by kardiomyocyty odvozené z kmenových buněk mohly dozrát a potenciálně regenerovat srdce, ale také aby byly užitečné pro modelování nemocí a screening léčiv. (Tampakakis a Mahmoud, 2021)

4.3 Využití kardiomyocytů pro objevování léčiv a testování toxicity

Vývoj kardiomyocytů odvozených z indukovaných kmenových buněk (iPSC) umožňuje modelování kardiotoxicity způsobené různými léčivy, což může vést k identifikaci pacientů náchylnějších k nežádoucím účinkům.

Aktuálně se mnoho výzkumů spoléhá na zvířecí modely, jako jsou geneticky modifikované myši. Avšak, při použití těchto modelů vznikají závažné druhové rozdíly, jelikož myší srdce bije až 10x rychleji než lidské a má kratší akční potenciály tvořené odlišnými iontovými kanály. Existuje tedy nenaplněná potřeba lepších modelových systémů pro lidská srdeční onemocnění, kde mohou iPSC hrát klíčovou roli a tuto mezeru zaplnit. Poskytují totiž neomezený zdroj zdravých i nemocných lidských kardiomyocytů, což umožňuje výzkumníkům studovat srdeční onemocnění na úrovni buněk. (Sinnecker, Laugwitz a Moretti, 2014)

4.4 Využití kardiomyocytů pro modelování chorob, včetně dědičných srdečních chorob a srdečního selhání.

Kardiomyocyty odvozené z iPSC jsou klíčové pro modelování srdečních onemocnění, včetně dědičných srdečních chorob a srdečního selhání, jako je arytmogenní kardiomyopatie pravé komory nebo syndrom dlouhého QT (LQTS) (Van Mil *et al.*, 2018), kdy QT je zkratka pro interval představující úsek na záznamu z elektrokardiogramu (EKG), který znázorňuje dobu, během které se srdeční sval dobíjí mezi jednotlivými údery. Právě u LQTS je tento časový interval prodloužený, což vede ke zvýšenému riziku nepravidelného srdečního rytmu a k možnému vzniku arytmií, které mohou ohrozit život. (Zareba a Cygankiewicz, 2008)

Využití iPSC přináší několik výhod, včetně schopnosti vytvářet srdeční buňky specifické pro pacienta, nesoucí mutace pro konkrétní onemocnění, což umožňuje propojení genotypu s fenotypem a vytváření personalizovaných platforem pro testování léčiv a individuální léčbu pacientů. Přestože mají odlišné vlastnosti ve srovnání s dospělými kardiomyocyty, iPSC-CM poskytují cenné nástroje pro studium srdečních chorob a zkoumání léčiv. V porovnání s lidskými embryonálními kmenovými buňkami nebo modely kmenových buněk odvozených z orgánů mají kardiomyocyty vytvořené z iPSC několik výhod, protože iPSC lze generovat z různých snadno dostupných buněčných zdrojů, včetně buněk z kůže, moči a krve. (Van Mil *et al.*, 2018)

Modelování lidských srdečních onemocnění *in vitro* umožňuje identifikovat molekulární a funkční mechanismy, které mohou vést k objevům nových terapeutických postupů. V roce 2008 byly vytvořeny první linie iPSC od pacientů s genetickými srdečními chorobami, což otevřelo možnosti vytváření *in vitro* modelů onemocnění. (Parrotta *et al.*, 2020)

5 KMENOVÉ BUŇKY

Jedná se o nevyvinuté buňky, které jsou schopny diferencovat ve specializované typy buněk a mají schopnost sebeobnovy prostřednictvím buněčného dělení. (Zakrzewski *et al.*, 2019) Dokážou také za vhodných podmínek regenerovat poškozenou tkáň, a díky tomu představuje výzkum kmenových buněk možnost pochopení základních mechanismů lidského vývoje a diferenciaci, a zároveň mají potenciál v léčbě srdečních onemocnění a poranění tím, že poskytnou zdroj nových kardiomyocytů pro regeneraci srdce. Lze je mimo jiné využívat k testování toxicity a objevování léčiv, což umožňuje přesnější a efektivnější testování. (Lo a Parham, 2009)

5.1 Dělení na základě diferenciačního potenciálu

5.1.1 Totipotentní

Totipotentní buňky mají na základě své schopnosti diferenciaci do všech typů buněk v těle nejvyšší potenciál ze všech kmenových buněk. Jediná buňka totiž dokáže vytvořit kompletní životaschopné embryo, včetně vlastního embrya, mimotělní tkáň, jako je placenta, a další extraembryonální podpůrné tkáň. Jednou z přirozených totipotentních buněk je pozdní zygota vznikající po oplození vajíčka spermií, ale také blastomery, které později tvoří blastocystu. V procesu vývoje kardiomyocytů nejsou tyto buňky přímo zapojeny, protože se vyskytují pouze v raných stádiích embryonálního vývoje, ale svou strukturou zároveň slouží jako zdroj pluripotentních buněk, které se do nich během embryonálního vývoje diferencují. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

5.1.2 Pluripotentní

Pluripotentní kmenové buňky jsou buňky se schopností sebeobnovy a diferenciaci do všech tří zárodečných vrstev, ale nedokážou se diferencovat v mimotělní tkáň, a tím pádem nemohou tvořit embryo. Patří mezi ně embryonální kmenové buňky (ESC), nebo také iPSC. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

Monovrstvy kardiomyocytů odvozených z lidských pluripotentních kmenových buněk (hPSC-CM), které byly dosud vytvořeny, vykazují nezralý strukturální a funkční fenotyp podobající se tomu embryonálnímu, a mají tak omezenou použitelnost pro výzkum a regeneraci srdce. (Herron *et al.*, 2016) Vědci zamýšlí, že díky diferenciaci pluripotentních buněk na specializované buňky by mohly být využity k transplantaci. (Volarevic *et al.*, 2018)

5.1.3 Multipotentní

Multipotentní kmenové buňky jsou buňky, které mají omezenější schopnost specializace než pluripotentní buňky, ale mohou se diferencovat do specifických typů buněk v rámci dané buněčné linie. Příkladem jsou hematopoetické kmenové buňky, které dávají za vznik různým typům krevních buněk. Jakmile se hematopoetická kmenová buňka začne diferencovat, stává se oligopotentní buňkou a její schopnost diferenciací je omezena na buňky určité linie.

Mají významnou roli ve vývoji, regeneraci a ochraně tkání. Používají se při léčbě onemocnění, jako jsou poranění míchy, zlomeniny kostí, autoimunitní choroby, problémy s tvorbou krve a zachování plodnosti. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

5.1.4 Unipotentní

Unipotentní kmenové buňky jsou buňky se schopností diferencovat pouze do jednoho konkrétního typu buněk a to opakovaně. Příkladem mohou být dermatocyty. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

5.2 Dělení na základě zdroje buněk

5.2.1 Embryonální kmenové buňky

ESC jsou specifickým typem pluripotentních kmenových buněk, které jsou odvozeny z vnitřní části embrya v raném stádiu blastocysty. Pro ESC je typická schopnost diferencovat se v jakýkoli typ buněk všech tří embryonálních zárodečných vrstev, kterými je endoderm, mezoderm a ektoderm. Tato unikátní vlastnost dělá embryonální kmenové buňky cennými pro vědecký a lékařský výzkum, a to zejména v oblasti regenerativní medicíny a modelování nemocí. (Rippon a Bishop, 2004)

Významnou vlastností je také samovolné obnovování, kdy ESC disponují schopností neomezeného růstu a množení bez procesu stárnutí, aniž by ztratily svůj nediferencovaný stav. Kromě toho byly ESC zkoumány pro svůj potenciál v oblasti klinických terapií, modelování genetických onemocnění a oprav buněk. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

5.2.1.1 Etický problém ESC

Etický problém spojený s ESC spočívá v tom, že proces jejich získávání zahrnuje destrukci lidských embryí. Tato skutečnost představuje hlavní omezení ve vývoji klinických terapií založených na lidských embryonálních kmenových buňkách. (Volarevic *et al.*, 2018)

Diskuze o začátku lidského života bývá obvykle doprovázena otázkami ohledně potratů. Potenciál embryí vyvinout se v lidskou bytost je spojen s procesem, kdy jsou embrya ve vhodné hormonální fázi implantována do dělohy ženy, což umožňuje, aby se embryo uhnízdlilo, vyvinulo se v plod, a nakonec se stalo živě narozeným dítětem.

Názory na morální status embrya jsou různorodé. Někteří považují embryo za osobu s rovnocennými zájmy a právy jako dospělý člověk či narozené dítě. Z tohoto hlediska může být odstranění blastocysty a vnitřní buněčné hmoty za účelem získání linie embryonálních kmenových buněk vnímáno jako forma vraždy.

Jiní věří, že morální významnost embrya se objevuje až v pozdějším stádiu vývoje než při oplodnění. Mnozí zastávají také názoru, že rané embryo si jako potenciální lidská bytost zaslouží zvláštní úctu, ale zároveň považují za přijatelné využít embrya pro určité typy výzkumu, a to za předpokladu, že existuje odpovídající vědecké odůvodnění, informovaný souhlas darovatele a pečlivý dohled. (Lo a Parham, 2009)

5.2.2 Buňky dospělých tkání (multipotentní)

Buňky dospělých tkání představují buňky přítomné v pupečníku či v placentě a mohou nést názvy jako somatické nebo postnatální kmenové buňky. (Pessina a Gribaldo, 2006) Mají schopnost procházet mnohonásobným buněčným dělením a zároveň si zachovávají nediferencovaný stav, což jim umožňuje se obnovovat.

Kromě schopnosti sebeobnovy hrají dospělé tkáňové buňky roli v přirozených opravných procesech organismu a přispívají k regeneraci poškozených nebo stárnoucích tkání. Jejich úlohou je mimo jiné udržovat tkáňovou homeostázu, a mohou vytvářet pouze omezené spektrum buněčných typů, které souvisejí s tkání, ze které pocházejí. (Gurusamy *et al.*, 2018)

Proliferační doba somatických kmenových buněk je oproti ESC delší a lze je zpětně převést do pluripotentního stavu. To je možné díky přenosu jádra dospělého jedince do cytoplazmy oocyty nebo také fúzí s pluripotentní buňkou. Na rozdíl od embryonálních

kmenových buněk však lze dospělé tkáňové buňky získat z vlastního těla nebo od dospělých dárců, což snižuje etické obavy spojené s výzkumem embryonálních kmenových buněk. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

Příkladem mohou být hematopoetické kmenové buňky umístěné v kostní dřeni, které mohou diferencovat do všech tří typů krevních buněk a také do nervových kmenových buněk, jaterních buněk a kardiomyocytů. V současnosti jsou tyto buňky využívány k léčbě hematologických zhoubných nádorů a ke zmírnění vedlejších účinků chemoterapie při léčbě rakoviny. (Lo a Parham, 2009)

Vzhledem k omezenému potenciálu diferenciaci jsou za optimální alternativu považovány indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC). (Volarevic *et al.*, 2018)

5.2.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

Mezi nedávné inovace patří vývoj indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) s vlastnostmi podobnými vlastnostem ESC. Vznikají převedením dospělých somatických buněk do stavu pluripotence a využívají genové úpravy k opravě genetických defektů v kmenových buňkách. Tato metoda se vyhýbá etickým obavám, které jsou spojeny s využíváním embryonálních kmenových buněk, protože iPSC nepředstavují ničení embryí. (Zakrzewski *et al.*, 2019)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

- Formace embryonálních tělísek z myších embryonálních kmenových buněk metodou visících kapek.
- Formace embryonálních tělísek z myších embryonálních kmenových buněk suspenzní metodou.
- Formace embryonálních tělísek z myších embryonálních kmenových buněk pomocí mikrodestiček AggreWell™800.
- Kardiomyogeneze myších embryonálních kmenových buněk.
- Izolace kardiomyocytů.

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Buněčné linie

Pro formaci EBs byla použita buněčná linie myších embryonálních kmenových buněk **ES R1**. (Nagy *et al.*, 1993) V rámci experimentu byla použita také geneticky modifikovaná linie buněk ES R1. Genetická modifikace představuje úpravu genetického materiálu organismu, například myši, prostřednictvím specifických změn v její DNA. Při tomto procesu může docházet k přidání, odebrání nebo úpravě specifických genů za účelem získání určitých vlastností nebo charakteristik. Geneticky modifikované organismy se často používají ve výzkumu ke studiu funkce genů, k modelování lidských genetických chorob a ke zkoumání různých biologických procesů. (Lin, 2008) Pro účely této bakalářské práce byly využívány buňky s označením **HG8**. Pro transfekci byl použit vektor (MHC-neor/pGK-hygro). Selekčním genem pro transfekované buněčné linie pro selekci kardiomyocytů byl gen pro enzym aminoglykosid fosfotransferázu umožňující rezistenci kardiomyocytů vůči antibiotiku G418. Všechny ostatní typy buněk v přítomnosti antibiotika umírají, proto jsou tedy HG8 vhodné pro izolaci diferencovaných kardiomyocytů. Takto izolované kardiomyocyty mohou být využity pro další studie.

Samotná transfekce neprobíhala na Centru polymerních systémů, ale modifikované buňky byly získány díky spolupráci s Přírodovědeckou fakultou Masarykovy univerzity v Brně.

7.2 Kultivační médium

ES médium (Embryonic Stem cell medium) je speciální kultivační médium, které se používá pro udržování a zároveň také diferenciaci embryonálních kmenových buněk (ES). Základem ES média jsou živiny a další látky potřebné pro růst buněk, jako jsou aminokyseliny, vitamíny, minerály, sacharidy a růstové faktory.

Linie ES R1 byla kultivována v *nediferencovaném stavu* na Petriho miskách pro tkáňové kultury potažených 0,1 % želatinou (Sigma Aldrich, USA). Pro kultivaci bylo použito kompletní ES medium se složením: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 15 % fetálního telecího séra, 100 U ml⁻¹ penicilinu, 0,1 mg ml⁻¹ streptomycinu, 100 mM roztoku neesenciálních aminokyselin (vše od Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 0,05 mM 2-merkapt ethanolu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 1000 U ml⁻¹ LIF (Leukemia inhibitory factor) (Gibco, MA, USA). V současnosti je LIF jedním z klíčových faktorů bránících

diferenciaci myších ESC. Na buňce se váže na heterodimerický receptor složený z LIF-receptoru a gp130. Po vazbě na receptor se aktivují signální dráhy, které hrají roli právě při udržování pluripotence. (Niwa, 2007)

Formace EBs byla provedena v kompletním ES médiu bez přítomnosti buněčného kultivačního média LIF. Bez přítomnosti tohoto faktoru začnou kmenové buňky spontánně diferencovat. Rovněž je LIF spojován i s inhibicí kardiomyogeneze. Proto je velmi důležité používat pro formaci EBs LIF free média. (Veselá *et al.*, 2010) Běžně je médium kombinováno s dalšími faktory, jako je například inzulin, který zvyšuje využitelnost kardiomyocytů pro výzkum léčiv a nemocí. (Guo a Pu, 2020)

Kultivace vytvořených EBs probíhala v médiu DMEM-F12 (1:1) bez přítomnosti séra s následujícím složením: 100 U ml⁻¹ penicilinu, 0,1 mg ml⁻¹ streptomycinu a doplněk inzulin-transferrin-selen (ITS) (vše od společnosti Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). ITS je hojně využívaný komerční doplněk pro udržování růstu, diferenciaci a regulaci proliferace kmenových buněk. (Liu *et al.*, 2019)

7.3 Experiment

7.3.1 Pasážování kmenových buněk

Pasážování buněk se používá k jejich přemístění z jedné kultivační nádoby do jiné, kdy cílem je udržet buňky v aktivním stavu a umožnit jejich další růst a vývoj. Jedná se o důležitou techniku při kultivaci kmenových buněk, protože umožňuje udržovat buněčnou kulturu v konstantním stavu a poskytuje dostatek buněk pro různé experimenty a aplikace.

Pro přípravu kmenových buněk pro další kultivaci je třeba postupovat podle určitého postupu. Nejprve bylo odstraněno staré kultivační médium z nádoby, ve které byly kmenové buňky umístěny. Důležitým krokem je opláchnutí buněk roztokem PBS o koncentraci 0,2 ml/cm² (fosfátový pufr), který zajistí odstranění zbytků starého média. Dále byl přidán enzymatický roztok trypsin-EDTA v koncentraci 0,1 ml/cm² který slouží k uvolnění buněk z povrchu kultivační nádoby, a po dobu cca 5 minut se nechal působit. Mezitím byla připravena nová Petriho miska s ES médiem, které bylo předeřháto na teplotu 37 °C. Do původní Petriho misky s buňkami bylo přidáno médium ve stejném nebo vyšším objemu, než byl přidán trypsin-EDTA a za pomoci automatické pipety byl obsah pečlivě promíchán.

Do nové misky byla přidán podíl buněčné suspenze a byla vložena do inkubátoru, kde se následně buňky nechají růst až do dosažení požadovaného stavu, kdy pokryjí téměř celý povrch kultivační nádoby (cca 80 % konfluence). Zbytek suspenze byl přenesen do zkumavky, která byla vložena na 200G a 4,5 minut do centrifugy. Po centrifugaci se buněčná suspenze rozdělí na dvě vrstvy, a to na supernatant, což je nadbytečná tekutina, a pellet, což je shromáždění buněk na dně zkumavky. Následně byl opatrně odsán supernatant a přidalo se určité množství nového média a opět byl obsah důkladně promíchán. Takto připravená buněčná suspenze byla následně využita pro formaci EBs.

7.3.2 Počítání buněk přes Bürkerovu komůrku

Bürkerova komůrka je laboratorní nástroj používaný pro počítání buněk a mikroskopickou analýzu buněčného růstu a dělení. Sklíčko je vyrobeno z průhledného skla nebo plastu a má malé komůrky, které jsou rozděleny pomocí mřížky. Tyto malé komůrky mají známý objem a lze je použít k určení buněčné koncentrace ve vzorku.

Při použití Bürkerovy komůrky byla připravená suspenze nejprve důkladně promíchána a za sklíčko byla přenesena suspenze. Samotné počítání buněk probíhalo pod mikroskopem, kde mřížka na sklíčku umožňuje snadné spočítání počtu buněk v daném objemu.

Na základě tohoto výpočtu byla vypočtena celková buněčná koncentrace v suspenzi.

$$b = \frac{n}{c * v * h} * z$$

b ... počet buněk na 1 μ l

n ... počet buněk

c ... počet čtverců (25)

v ... plocha čtverce (0,04 mm^3)

h ... hloubka komůrky (0,1 mm^2)

z ... objem média, které bylo přidáno

Tato metoda je velmi užitečná pro různé experimenty, kde je potřeba určit koncentraci buněk, například při testování účinnosti léků nebo při sledování buněčné proliferace a růstu. (Vojtek, b.r.)

7.3.3 Formace embryonálních tělísek

Embryonální tělíška (EBs) jsou trojrozměrné shluky buněk, které simulují ranou fázi vývoje embrya. Jsou zásadní pro diferenciaci ESC do různých buněčných typů, včetně kardiomyocytů. (Zeevaert *et al.*, 2020) Tato schopnost je klíčovým faktorem pro jejich využití v buněčné transplantaci a tkáňovém inženýrství. (Khoo *et al.*, 2005)

Diferenciace EBs začíná agregací ESC, kdy velikost tělíška závisí na množství buněk, které se zpočátku samovolně shlukují pomocí buněčných adhezních receptorů. Prvním znakem diferenciace je vytvoření vrstvy primitivního endodermu na povrchu EB. Buňky PE dále diferencují ve viscerální a parietální endoderm s bazální membránou, která odděluje PE vrstvu od nediferencovaných buněk uvnitř EBs a podporuje přežívání sousedních buněk. Buňky bez kontaktu s bazální membránou podléhají apoptóze, což vede k vytvoření cystických dutin ve většině EBs. (Bratt-Leal, Carpenedo a McDevitt, 2009)

Během embryonálního vývoje dochází k tvorbě embryonálních tělísek v procesu zvaném gastrulace. Gastrulace je proces, při kterém se dutá koule buněk, která tvoří blastulu, začíná diferencovat do specializovanějších buněk, které se rozvrstvějí napříč vyvíjejícím se embryem. (Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Somite.")

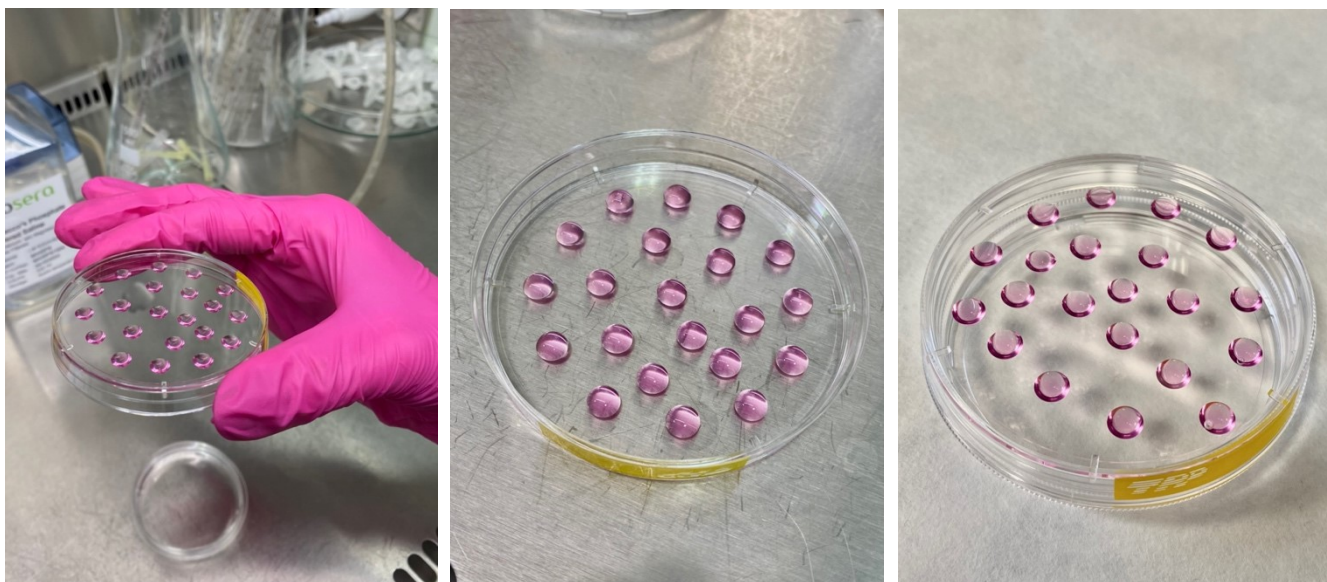
Dochází k vytvoření tří základních zárodečných vrstev, kterými jsou endoderm, ektoderm a mezoderm. Buňky migrují skrze primitivní pruh a pohybují se laterálně, aby vytvořily dvě nové vrstvy buněk. První vrstvou je endoderm, list buněk, který vytlačuje hypoblast a nachází se v sousedství žlutkového váčku. Druhá vrstva buněk, tedy mezoderm, je vyplní jako střední vrstva. Buňky epiblastu, které neprošly primitivním pruhem, se stávají ektodermem. Každá z těchto zárodečných vrstev dává za vznik určitým typům tkání a orgánů v těle. (Lumen Learning. "Embryonic Development.") Formace EBs může být provedena několika níže uvedenými způsoby.

7.3.3.1 Metoda visících kapek

Metoda visících kapek je jednou z technik vedoucích k vytvoření embryonálních tělísek. Embryonální kmenové buňky, které jsou suspendovány v kultivačním ES médiu bez obsahu LIF se přenáší v podobě kapiček na víčko Petriho misky, kdy koncentrace buněk je 400 buněk/35 μ l kapku. (Skopalová *et al.*, 2021) Tyto kapičky jsou následně pečlivě přeneseny nad PBS, které je na dně misky. Formace EBs probíhá po dobu 5 dní.

Morfologie tělísek je následně kontrolována pod mikroskopem. Buněčné interakce v jednotlivých kapkách jsou klíčové pro vytvoření trojrozměrné struktury, která simuluje právě embryonální tělísko.

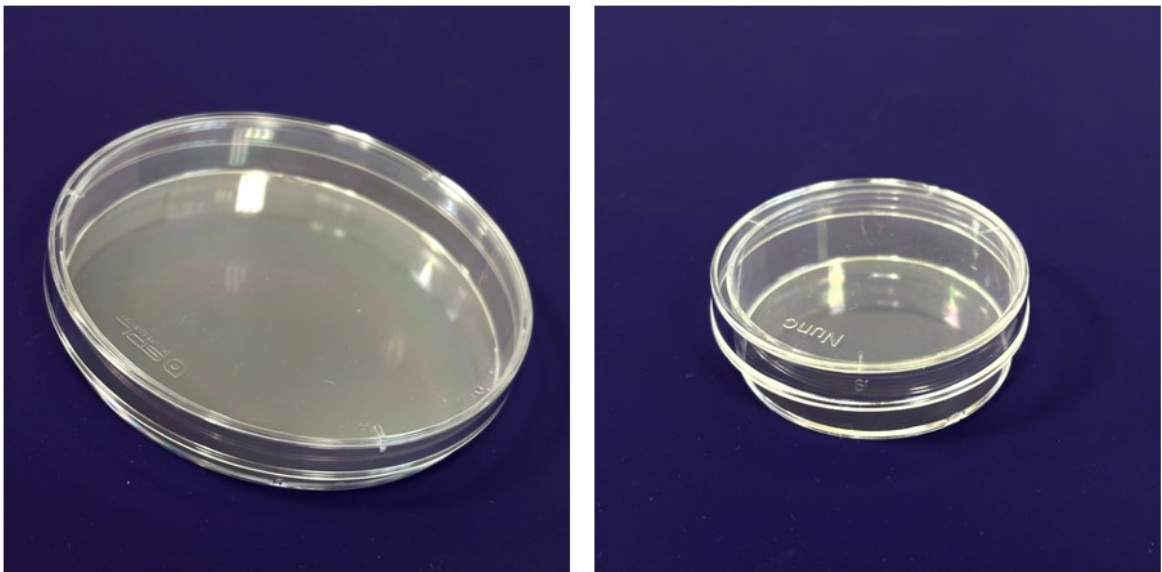
Tato metoda je vhodná pro výzkum regenerativní medicíny, kde jsou pluripotentní buňky využívány k náhradě poškozených tkání a orgánů. Výhodou této metody je, že umožňuje efektivní kultivaci pluripotentních buněk a vytváření tělísek s vysokou podobností s přirozenými embryonálními tělísky. Nicméně nevýhodou může být, že vytvoření vhodné kultury je náročné a vyžaduje pečlivou práci.



Obrázek 6 Formace EBs metodou visících kapek

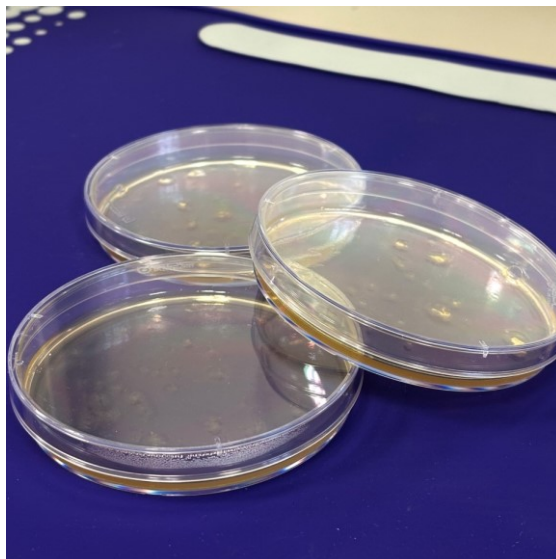
7.3.3.2 *Suspenzní metoda*

Další využívanou technikou pro tvorbu EBs je suspenzní metoda. Při tvorbě EBs touto metodou je důležité použít misky s hydrofobním povrchem, aby bylo zabráněno adhezi buněk na povrch. Často se pro tuto metodu využívají misky s bakteriální úpravou.



Obrázek 7 Bakteriologický plastik a antiadherentní Petriho misky

Další možností, jak zamezit adhezi buněk je potažení misky vrstvou agaru (0,5 %), který je využíván při mikrobiologických kultivacích. Pro vytvoření EBs suspenzní metodou byly použity i anti-adherentní misky Nunclon™ Sphera™ Dishes (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) určené speciálně pro formaci 3D struktur. V momentě, kdy není buňkám umožněno adherovat, začnou se přirozeně shlukovat a tvořit agregáty.



Obrázek 8 Bakteriologický plastik potažený vrstvou agaru

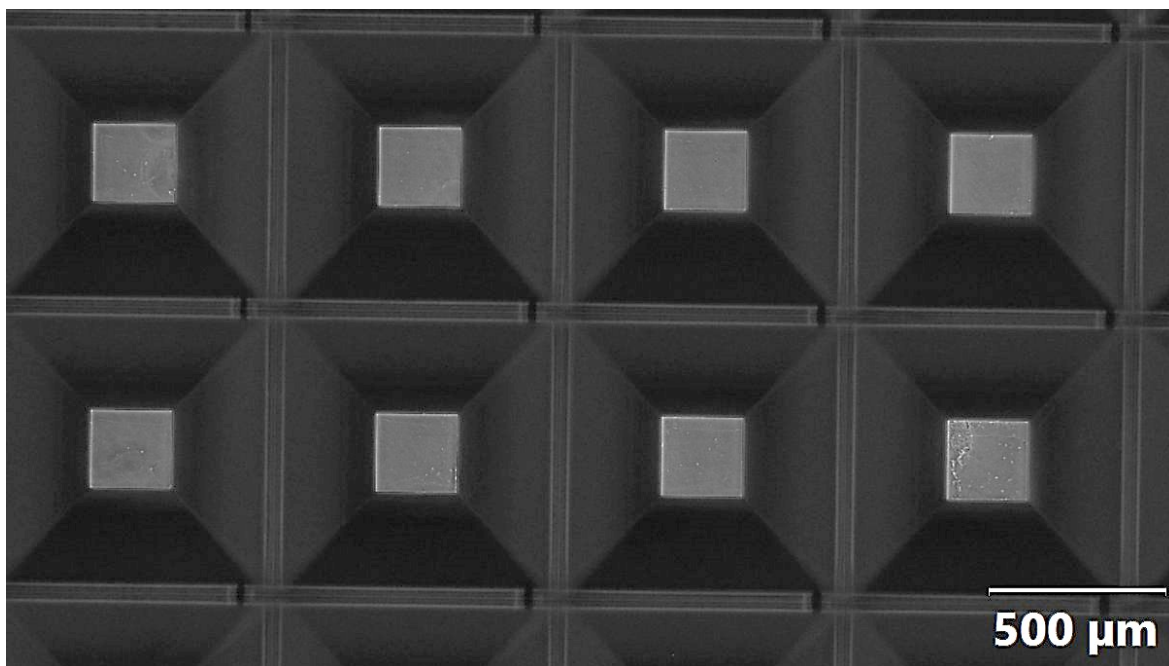
Tělíska se stejně jako v případě metody visících kapek formují po dobu 5 dnů v kultivačním ES médiu bez obsahu LIF. Každý druhý den je médium obměněno. Obecně se využívá koncentrace kmenových buněk o hustotě 10^3 - 10^6 buněk/ml. Pro formaci v suspenzní metodě v předložené práci byla využita koncentrace $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$ buněk/ml.

V porovnání s předchozí metodou umožňuje suspenzní metoda vytvořit větší množství tělísek, umožňuje jednodušší manipulaci a snadněji kontroluje proces tvorby tělísek. Nicméně, i tato metoda vyžaduje pečlivou manipulaci a sterilní podmínky během celého procesu, aby se zabránilo kontaminaci buněk. Nevýhodou oproti metodě visících kapek je pak vznik tělísek, které nemají homogenní velikost.

7.3.3.3 *AggreWell destičky*

AggreWell destičky představují inovativní nástroj ve formě neadhezivního plastiku, který umožňuje efektivní tvorbu EBs o požadované velikosti. Navíc jsou tyto destičky kompatibilní pro široké spektrum buněčných typů.

Proces tvorby EBs začíná běžným pasážováním buněk a výpočtem jejich množství pomocí Bürkerovy komůrky. Následně je na plastik přidáno 500 μ l antiadherentního roztoku, který napomáhá ke shlukování buněk a zabraňuje jejich přilnutí ke stěně jamky. Po 5 minutách je roztok odstraněn a je potřeba dbát na to, aby v jamkách nezůstaly žádné bubliny. Destičky obsahují 300 mikrojamek s tím, že v každé jedné mikrojamec je obsaženo 400 buněk společně s médiem, které je potřeba každý den vyměnit, aby byla zachována životaschopnost buněk. Celý tento proces trvá přibližně 5 dní, kdy výsledkem jsou embryonální tělíska, která jsou vhodná pro další výzkum a aplikace v oblasti testování léčiv, regenerativní medicíny a v oblasti buněčného vývoje. Oproti běžným metodám jsou destičky AggreWell navrženy tak, aby umožňovaly přesnou kontrolu tvorby EBs, což přispívá k tvorbě homogenních tělísek.



Obrázek 9 Prázdné mikrojamky AggreWell destičky, zvětšení 40x

7.3.3.4 Kardiomyogeneze

Po vytvoření EBs (proces zpravidla 5 dnů) se vysejí na tkáňový plastík potažený 0,1% želatinou. Z jedné misky (bakteriologická, bakteriologická s agarem a antiadherentí misky Nunclon™ Sphera™ Dishes) ve které byly tvořeny EBs se vytvoří 2 až 3 misky o stejné velikosti. V případě tělísek z AggreWell destičky se vždy tělíska z 1 strukturované jamky vysejí na 3,5 cm Petriho misku. První den se již hotová tělíska kultivují ve směsi ES média bez LIF a DMEM-F12 (1:1) s obsahem ITS. Následující den, po adhezi EBs, se médium vymění za čisté DMEM-F12 (1:1) s obsahem ITS. Médium se pak mění podle potřeby, zpravidla každý druhý den. Nejdříve po 12 až 13 dnech od počátku tvorby EBs (cca 7 dnů od vysetí EBs na tkáňový plastík) lze pod mikroskopem pozorovat tepající oblasti, což značí přítomnost kardiomyocytů. (Veselá *et al.*, 2010)

7.3.3.5 Purifikace kardiomyocytů

Během diferenciaci EBs nám vzniká různorodá populace buněk. (Murry a Keller, 2008) Diferenciací pomocí EBs vznikají kardiomyocyty, které lze detekovat podle jejich spontánní tepající aktivity, avšak nevýhodou je, že výtěžnost kardiomyocytů tohoto procesu je nízká, pro myši ESC se pohybuje okolo 1-3 % a pro lidské ESC dokonce <1 %. (Murry a Keller, 2008) Pro další využití vzniklých kardiomyocytů je potřeba vyselektovat jejich čistou populaci. Jednou z možností je vzniklé kardiomyocyty pod mikroskopem mechanicky oddělit. (Ban, Bae a Yoon, 2017) Tato metoda najde využití pro purifikaci kardiomyocytů

vytvořených z nemodifikované buněčné linie ES R1. Pro oddělení tepajících oblastí může být například využita špička od automatické pipety (200 μ l), kdy se mechanicky přeruší adhezivní spoje mezi buňkami a následně se oddělená část nasaje do pipety a přenese na novou misku s nachystaným médiem (Sýkorová, 2012)

Další možností pro purifikaci kardiomyocytů je izolace založená na genetické modifikaci. (Ban, Bae a Yoon, 2017) Tuto metodu využijeme pro GMO buňky HG8. Jak bylo zmíněno výše, linie HG8 je rezistentní vůči působení antibiotik G418. Po 14 dnech kultivace diferenciací EBs se do kultivačního media přidá 0,3-0,4 mg/ml G418. Selekcce trvá 6 dnů, přičemž médium se mění po 3 dnech, nebo v případě potřeby. Po 6denní selekci se odsaje médium a přidají se 2 ml 0,3 % roztoku kolagenázy (DMEM + antibiotika + kolagenáza) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) a kultivujeme 30 minut v inkubátoru. Poté se obsah lehce promíchá pipetou a převede do zkumavky. Buňky se nechají sedimentovat v inkubátoru po dobu 15-30 minut. Po sedimentaci se odsaje médium a pelet buněk se vyseje na misku potaženou 0,1 % želatinou do směsi DMEM-F12 s obsahem ITS a ES media bez LIF (v poměru 1:1). Adheze kardiomyocytů je kontrolována pod mikroskopem.

8 DISKUZE A VÝSLEDKY

Celosvětovým problémem ve zdravotnictví jsou právě kardiovaskulární poruchy, které jsou spojené s nedostatečnou regenerací srdce po jeho poškození. Namísto zregenerované funkční svaloviny dochází ke ztrátě kardiomyocytů a následné tvorby jizvení. (Steinhauser a Lee, 2011) Z toho důvodu je potřeba se touto problematikou více zabývat a v nejlepším případě připravit biomateriál, který podpoří maturaci kardiomyocytů a tím i regeneraci poškozeného srdce.

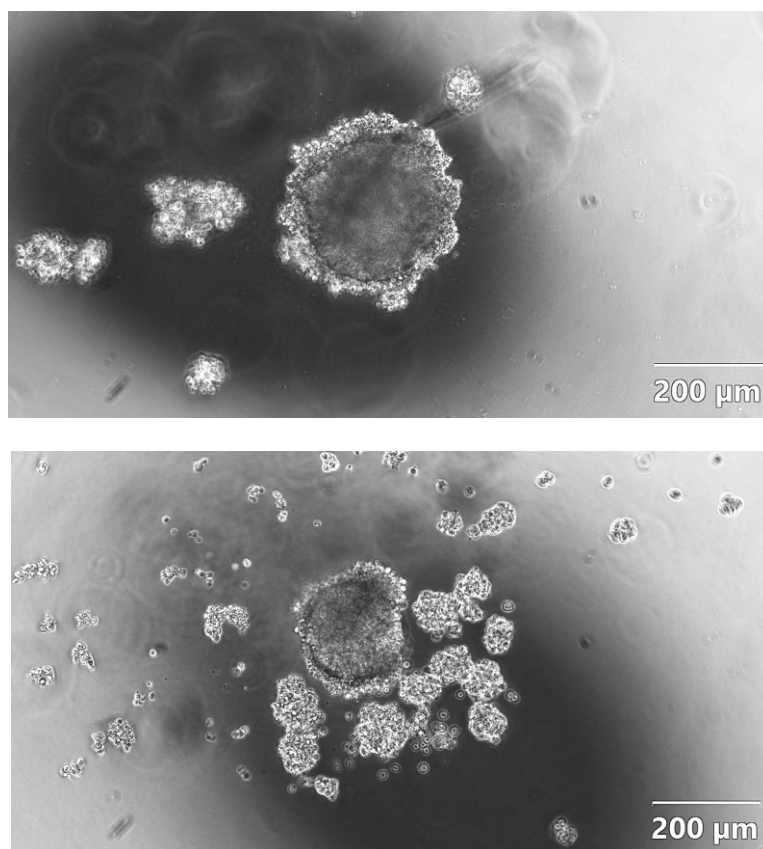
Cílem této práce bylo porozumět důležitosti maturace kardiomyocytů, která může potenciálně podpořit obnovu poškozené srdeční tkáně. Bylo provedeno několik metod formace EBs z myších embryonálních kmenových buněk. Následnou kardiomyogenezí získaných tělísek lze po úspěšném pokusu pozorovat tepající oblasti, které značí přítomnost kardiomyocytů. (vlastní slova) Kardiomyocyty lze pak izolovat a použít pro další experimenty, například pro sledování interakcí mezi kardiomyocyty a biomateriálem, což zahrnuje například vliv samotného biomateriálu na jejich adhezi či maturaci. V této práci bylo ale zatím primárním úkolem naučit se správnou manipulaci při práci s kmenovými buňkami a osvojit si techniky tvorby EBs. Všechny metody formace EBs byly provedeny minimálně ve třech opakováních. Úkolem bylo také vybrat nejvhodnější metodu pro formaci EBs. U tělísek, která se jevila jako nejlepší, byla sledována následná kardiomyogenez, tvorba erytroidních shluků a tepající oblasti.

8.1 Formace embryonálních tělísek metodou visících kapek

V oblasti formace embryonálních tělísek patří tato metoda mezi nejpoužívanější, i přesto, že se dá považovat za velmi obtížnou a problematickou. Bylo provedeno několik pokusů, při kterých byly objeveny výhody, jako je například možnost vytvořit homogenní tělíška právě díky vypočtenému množství buněk, které jsou obsaženy v jednotlivých kapkách zavěšených na víčku Petriho misky. Mimo jiné přináší tato metoda různá omezení a nevýhody, jako je například časová náročnost nebo potřeba precizní manipulace s kapičkami.

Cílem bylo vytvořit homogenní tělíška s dobrou morfologií, ale jak můžeme na Obrázku 10 pozorovat vzniklá EBs, toto očekávání nesplňují, protože nedrží celistvý tvar a poblíž vzniklého tělíška se vyskytují oddělené menší shluky buněk. To znamená, že se nám nepodařilo EBs formovat tak, aby mohly být využity k dalšímu postupu, což může být

způsobeno například nesprávnou a zdlouhavou manipulací s buněčnou suspenzí. Morfologie tělísek byla pozorována po 5 dnech pomocí inverzního mikroskopu.



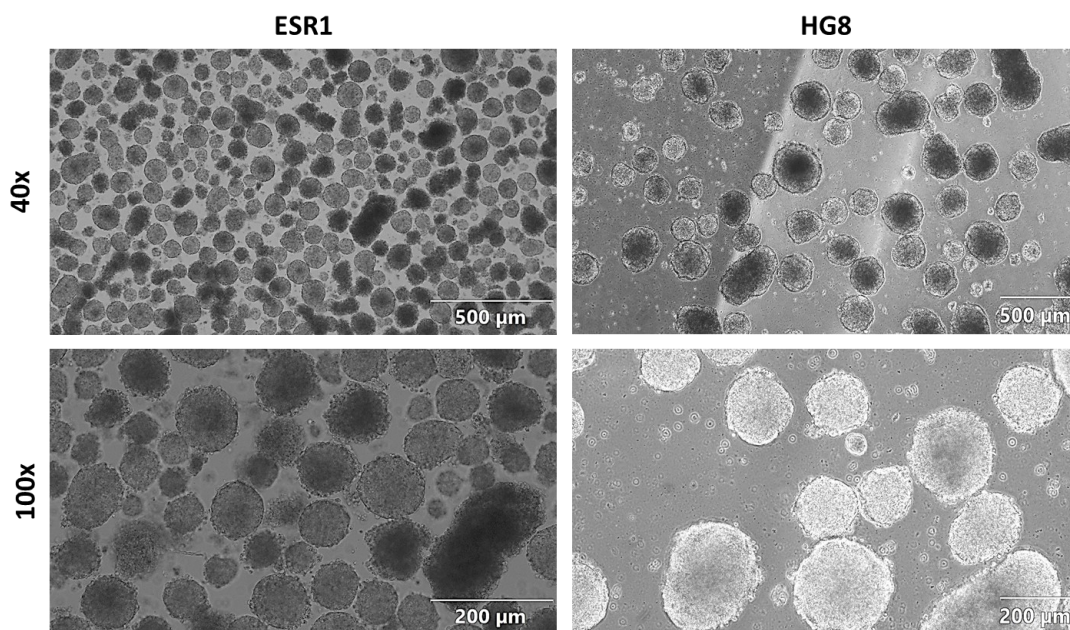
Obrázek 10 EBs vytvořená metodou visících kapek, linie ESR1, zvětšení 100x

8.2 Formace embryonálních tělísek suspenzní metodou

8.2.1 Bakteriologický plastik

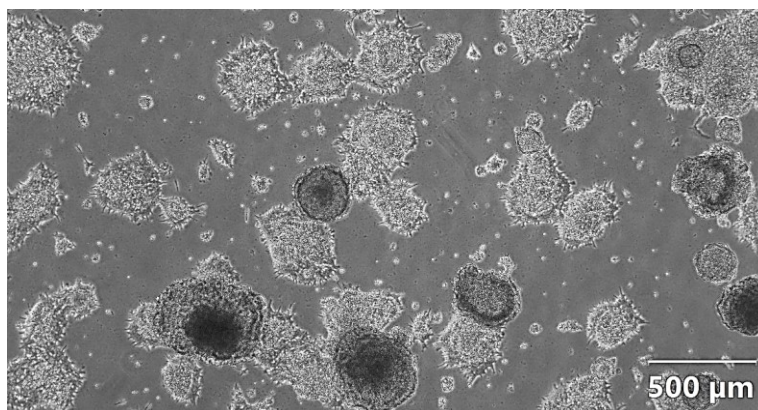
Tato metoda slouží jako vcelku jednoduchý nástroj pro formaci EBs. Mezi výhody patří možnost vytvořit poměrně velké množství tělísek, naopak nevýhodou je, že se buňky mohou rozložit nerovnoměrně, a tak často vznikají tělíska, která nejsou homogenní, tedy nemají stejný tvar a velikost.

Byly použity buněčné linie ESR1 a také HG8, kdy na obrázku 11 můžeme pozorovat vzniklá EBs po 5 dnech, při zvětšení 40x a 100x, která jsou sice v hojném počtu, ale nejsou homogenní.



Obrázek 11 Formace EBs vytvořená suspenzní metodou na bakteriologickém plastiku, linie ESR1 a HG8, zvětšení 40x a 100x

Správně by vytvořená EBs neměla adherovat na povrch bakteriologického plastiku. Na Obrázku 12 můžeme vidět, jak to vypadá, když buňky k povrchu přilnou.

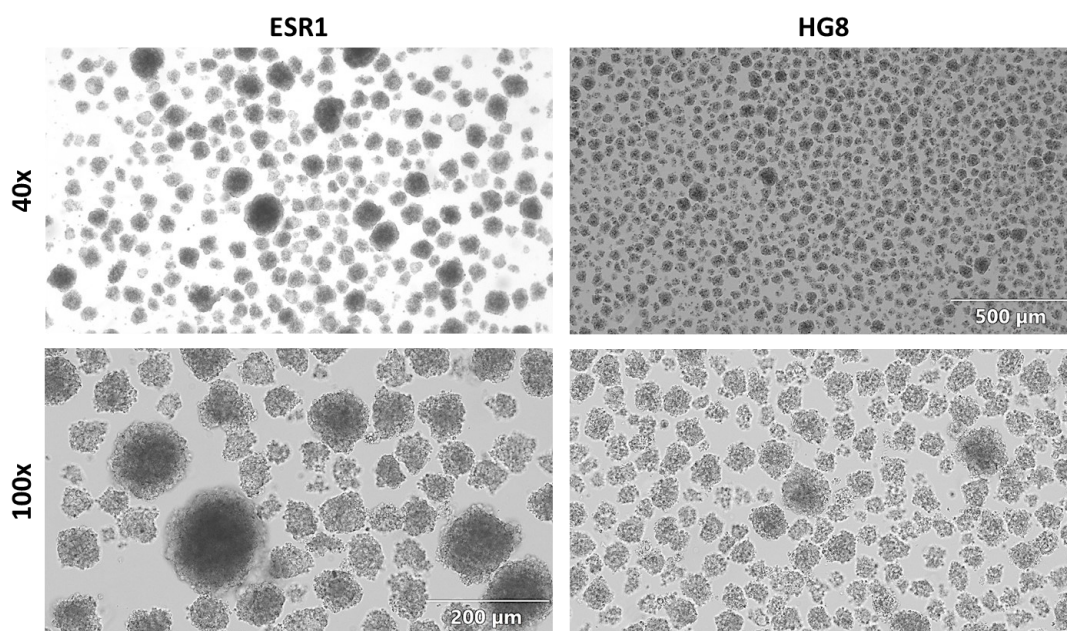


Obrázek 12 Troubleshooting – přilnutá EBs na bakteriologický plastik, zvětšení 40x

8.2.2 Bakteriologický plastik potažený agarem

Další z možností, jak zabránit buňkám, aby nepřilnuly na povrch bakteriologického plastiku je potažení povrchu 0,5% agarem, který zajistí, že se buňky na povrch nepřichytí a začnou se shlukovat, tím pádem budou tvořit EBs.

Na Obrázku 13 můžeme pozorovat buňky po 5 dnech, při zvětšení 40x a 100x, kdy opět vzniklo velké množství tělísek, která ale nejsou homogenní. Navíc tělíska vytvořená touthle metodou neměly hezky kulatý a kompaktní tvar, a tedy nebyly využity k dalšímu kroku.



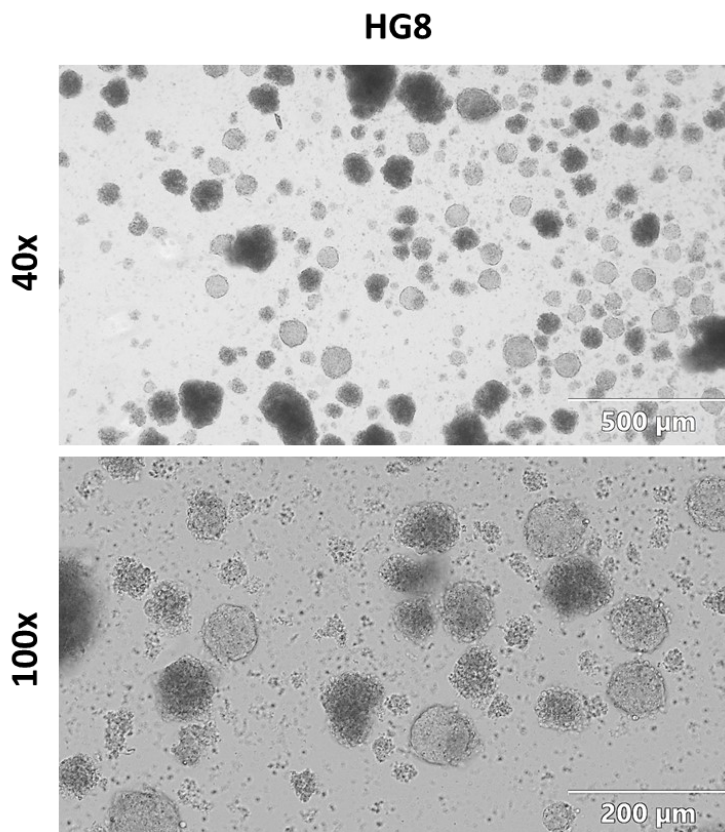
Obrázek 13 Formace EBs vytvořená suspenzní metodou na bakteriologickém plastiku potaženým agarem, linie ESR1 a HG8, zvětšení 40x a 100x

8.2.3 Anti adhezivní plastik

Stejným postupem byla provedena také formace EBs na anti adhezivním plastiku (Nunclon™ Sphera™ Dishes) s buněčnou linií ES R1 a HG8, který má speciální povrchovou úpravu, která by měla minimalizovat adhezi buněk k substrátu.

Na Obrázku 14 můžeme vidět mikrofotografii pořízenou po 5 dnech, kde je hned několik vytvořených EBs. Zveřejněny jsou pouze mikrofotografie pro EBs tvořená z linie HG8, jelikož u linie ES R1 překvapivě k žádné formaci ani shlukování nedošlo.

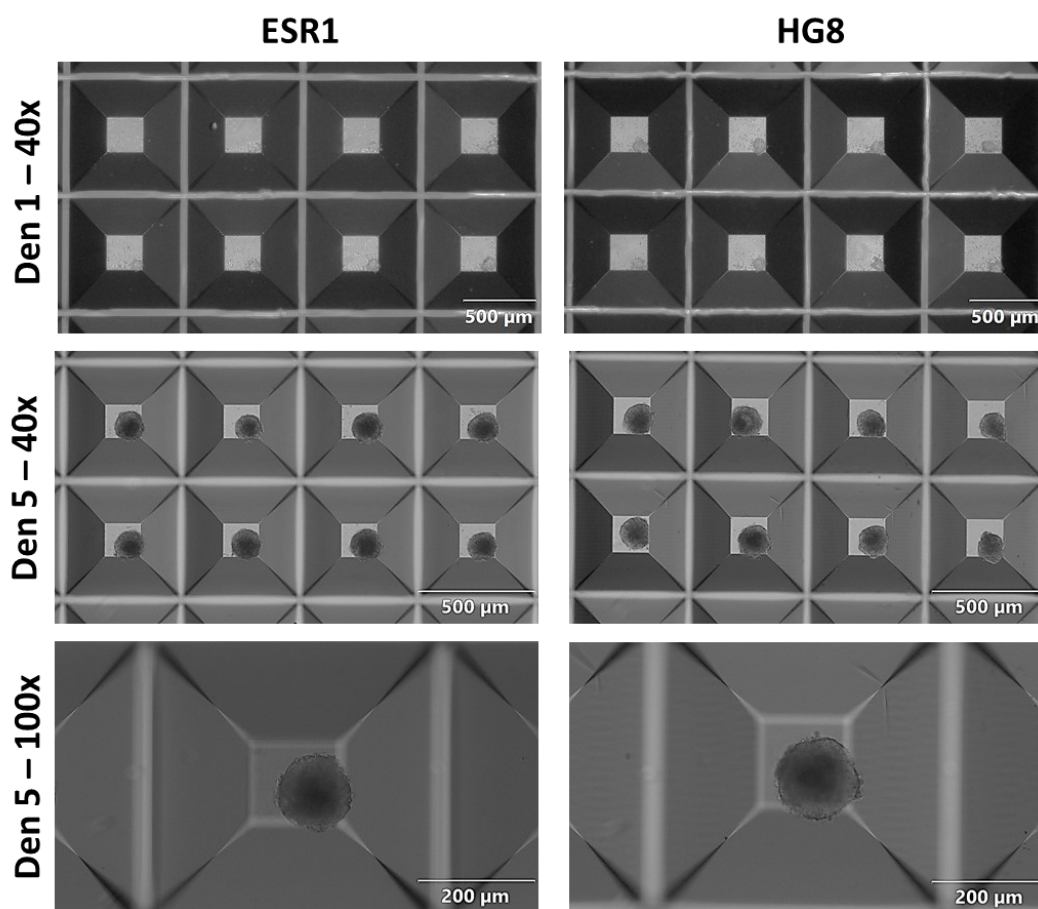
Do tvorby EBs na Nunclon™ Sphera™ Dishes byla vkládána velká naděje, jelikož zde nehrozí adheze buněk a manipulační postup je velmi jednoduchý. Nevýhodou je, že pořízení takto upraveného plastiku je poměrně nákladné a tvoří se nehomogenní tělíška.



Obrázek 14 Formace EBs vytvořená suspenzní metodou na anti adhezivním plastiku (Nunclon™ Sphera™ Dishes), linie HG8, zvětšení 40x a 100x

8.3 Metoda AggreWell destiček

I přes to, že tato metoda patří mezi ty nákladnější, zajišťuje nenáročnou manipulaci a usnadňuje práci. Jedna jamka destičky AggreWell obsahuje celkem 300 mikrojamek, kdy v každé z nich vznikají tělíška, která neadherují na stěnu jamky a jsou homogenní. Jak lze vidět na Obrázku 15, tělíška jsou homogenní. Tělíška vytvořená touto metodou byla vyhodnocena jako nejlepší a byla následně vyseta na poželatinovaný plastik. Naadherovaná tělíška byla pozorována každý den pod inverzním mikroskopem.



Obrázek 15 Formace EBs vytvořených pomocí AggreWell, linie ESR1 a HG8, zvětšení 40x a 100x

8.4 Kardiomyogeneze

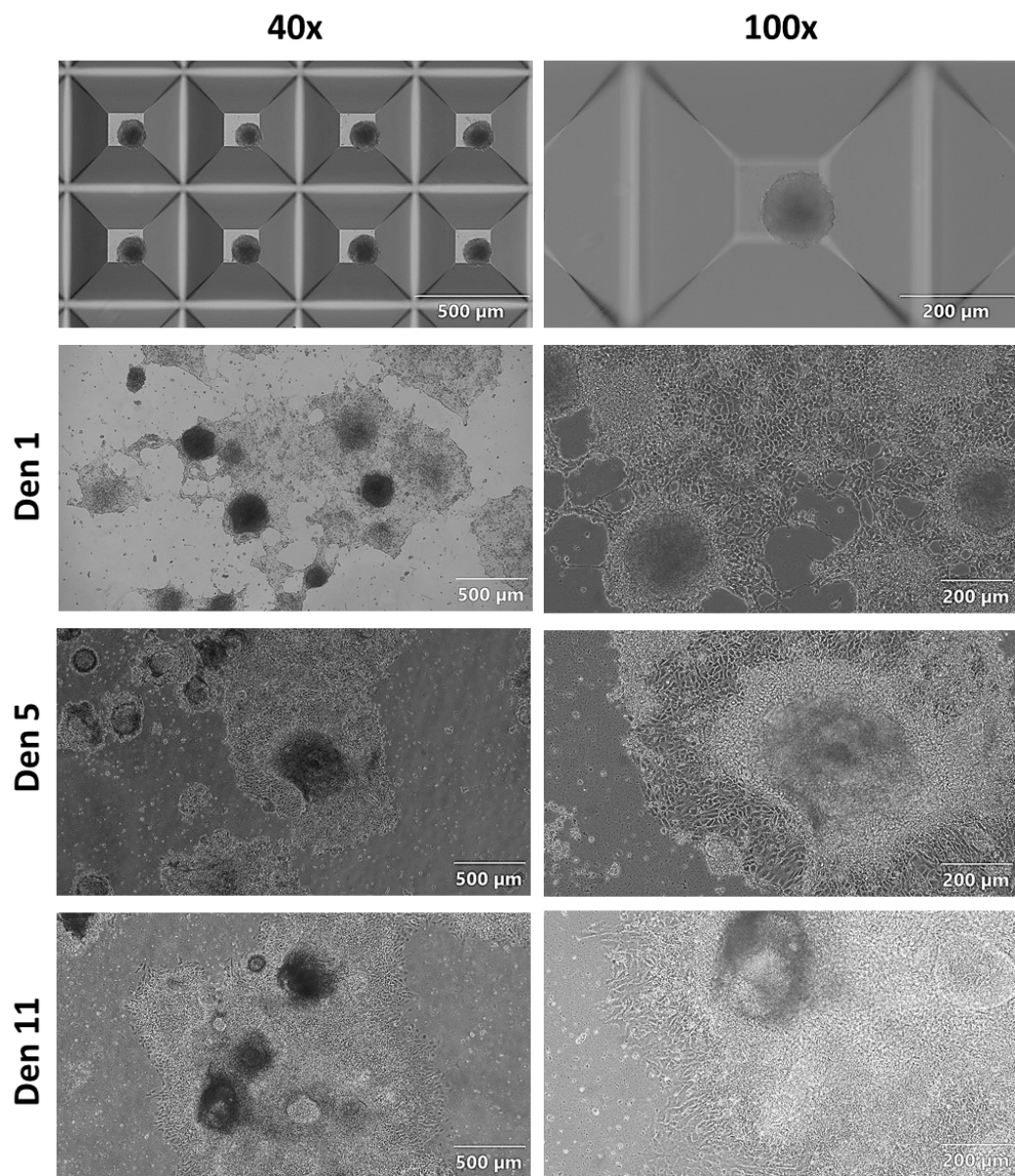
Srdce představuje první funkční orgán embrya obratlovců. Ačkoli se jeho vývoj zahajuje brzy, kardiogeneze je vysoce regulovaný proces, který zahrnuje diferenciaci buněk (kardiomyogenezi) a jejich následnou specializaci, prostorovou integraci a koordinaci pomocí několika signálních drah. Tyto dráhy ovlivňují jednotlivé fáze buněčné diferenciace, což má zásadní význam pro řízení vývoje kardiomyocytů z pluripotentních kmenových buněk. (Leitolis *et al.*, 2019)

8.4.1 Kardiomyogeneze s buněčnou linií ESR1

Pro sledování procesu kardiomyogeneze byly zvoleny EBs buněčné linie ESR1, vytvořená na AggreWell destičkách, jelikož se nám z morfolického hlediska jevila jako nejlepší. Zároveň je to velmi spolehlivá metoda a manipulace s vytvořenými EBs je příjemná a efektivní.

Na obrázku 16 vidíme snímky které byly pořízeny při různých zvětšeních, konkrétně 40x a 100x, a zachycují EBs v různých fázích procesu kardiomyogeneze. Tělíska začínají od prvního dne adherovat na povrch plastiku a postupně diferencují do různých typů buněk, včetně buněk srdeční svalové tkáně, tedy kardiomyocytů. Vytvořené kardiomyocyty se poté organizují do struktur, které jsou podobné srdeční tkáni a začínají se rytmicky stahovat. Právě tyto tepající oblasti jsou důkazem přítomnosti kardiomyocytů ve vytvořených EBs.

Celý proces trval dohromady 16 dní. Nejprve se po dobu 5 dnů tvořila EBs na již zmiňovaných AggreWell destičkách, následně byla přenesena na poželatinový plastik a začal proces kardiomyogeneze, který trval 11 dní. Pod mikroskopem byla EBs pozorována každý den a na Obrázku 16 můžeme pozorovat průběh kardiomyogeneze zaznamenaný ve dnech 1, 5 a 11. Poslední den tohoto procesu, tedy den 11, se očekávalo, že budeme moci pozorovat tepající oblasti.

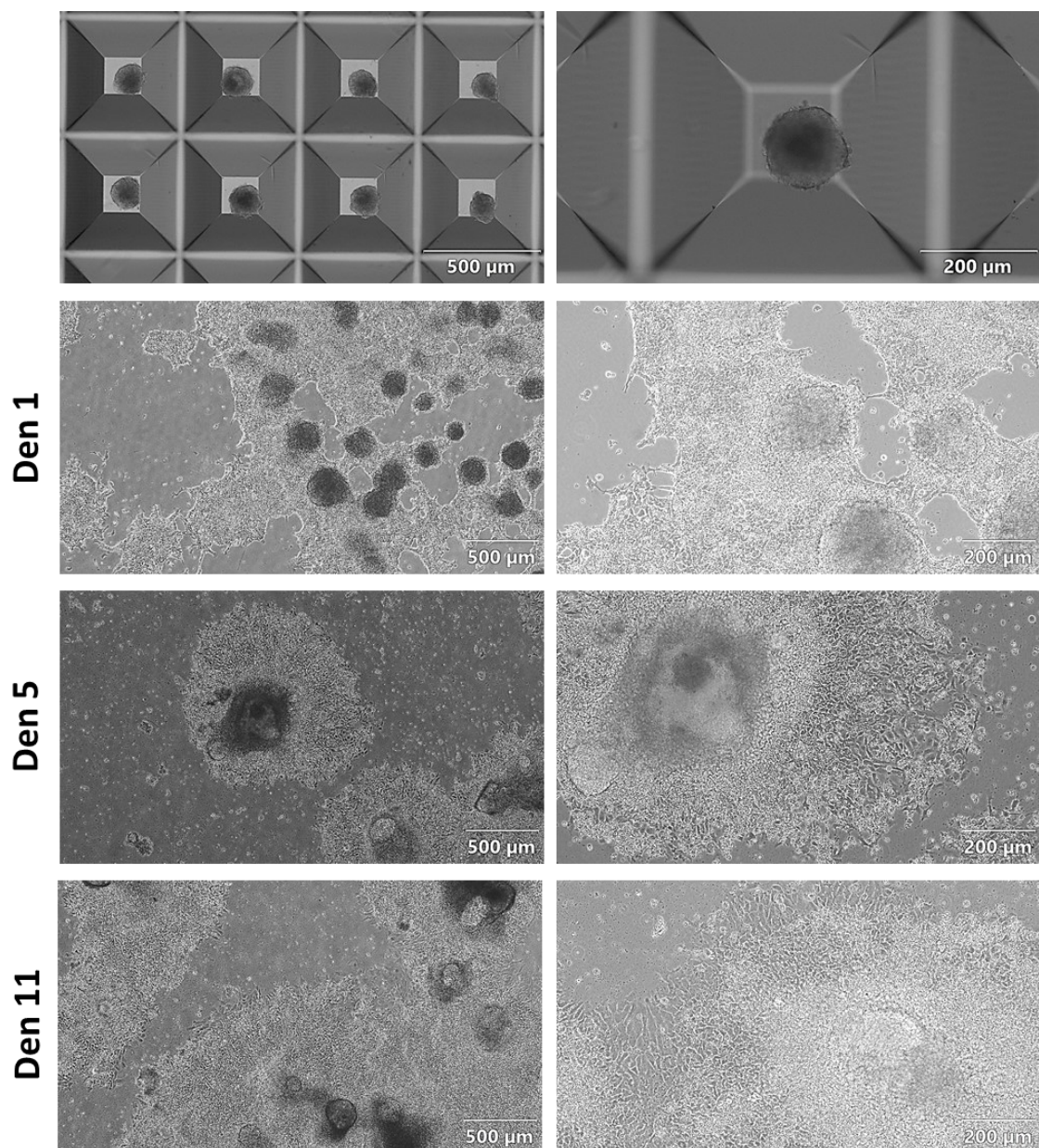


Obrázek 16 Sledování procesu kardiomyogeneze buněčné linie ESR1 v rozmezí 11 dnů při zvětšení 40x a 100x

8.4.2 Kardiomyogeneze s buněčnou linií HG8

V tomto případě byl postup stejný jako v předešlé kapitole 8.4.1, ale tentokrát s buněčnou linií HG8. Na Obrázku 17 můžeme pozorovat jednotlivé fáze kardiomyogeneze ve dnech 1,5 a 11 při zvětšení 40x a 100x.

Na vrchním snímku můžeme při zvětšení 40x vidět mikrodestičku AggreWell pod mikroskopem, na které jsou již vytvořena EBs. Při zvětšení 100x je patrné, že tělísko drží celistvý tvar. V průběhu procesu kardiomyogeneze se buňky postupně diferencují v různé typy buněk, včetně kardiomyocytů.



Obrázek 17 Sledování procesu kardiomyogeneze buněčné linie HG8 v rozmezí 11 dnů při zvětšení 40x a 100x

8.4.3 Erytropoéza

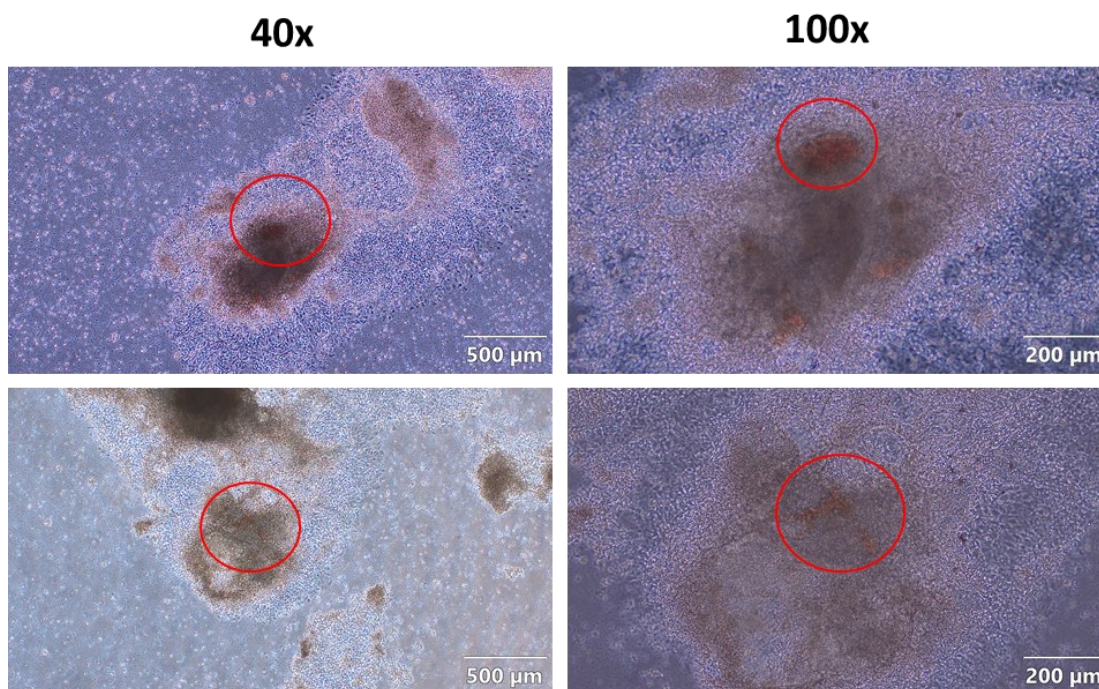
EBs jsou trojrozměrné agregáty diferencující do třech zárodečných listů, kterým je ektoderm, endoderm a mezoderm. Jelikož se vytvořená EBs diferencují do různých typů buněk, je velmi náročné určit přesný podíl jednotlivých typů buněk v tělískách. Kardiomyocyty tvoří pouze opravdu malou část z celkové buněčné populace v EBs, a to průměrně 3 %. To znamená, že většinu buněk v tělískách tvoří jiné typy buněk, například fibroblasty, endoteliální buňky nebo právě erytrocyty. (Zeevaert *et al.*, 2020)

V lidském těle se každou vteřinu odehrává proces zvaný erytropoéza, kdy se za takto krátký čas vytvoří 2 miliony nových červených krvinek neboli erytrocytů. Tento složitý proces se skládá z několika fází diferenciace a vývoje, dokud nedojde k vytvoření zralých erytrocytů. V poslední fázi dochází k výrazné transformaci membrány erytrocytů, která erytrocytům dává charakteristický bikonkávní tvar, a následně cirkulují tyto buňky krevním oběhem, dokud nejsou eliminovány systémem makrofágů. (Zivot *et al.*, 2018)

V kontextu s diferenciací EBs může být přítomnost červených shluků známkou, že diferenciace opravdu úspěšně probíhá. Erytrocyty postupně dozrávají a organizují se, což naznačuje posun diferenciace ke specializovaným buněčným typům. (Bratt-Leal, Carpenedo a McDevitt, 2009)

Tak, jako je tepající oblast ukazatelem kardiomyogeneze, tak je tvorba červených shluků ukazatelem erytropoézy. Pozorování tvorby erytroidních shluků může být jednou z možností, jak určit, zda nějaký materiál vykazuje embryotoxicitu. Například ve studii Humpolíček *et al.* sledovali vliv vodivých polymerů polyanilininu a polypyrrolu na EBs vytvořených z myších embryonálních kmenových buněk. Tímto dostali cenné informace o možném embryotoxickém efektu u materiálů, které mají vzhledem ke své vodivosti velký potenciál využití v tkáňovém inženýrství jako substrát pro kardiomyocyty. (Humpolíček *et al.*, 2018)

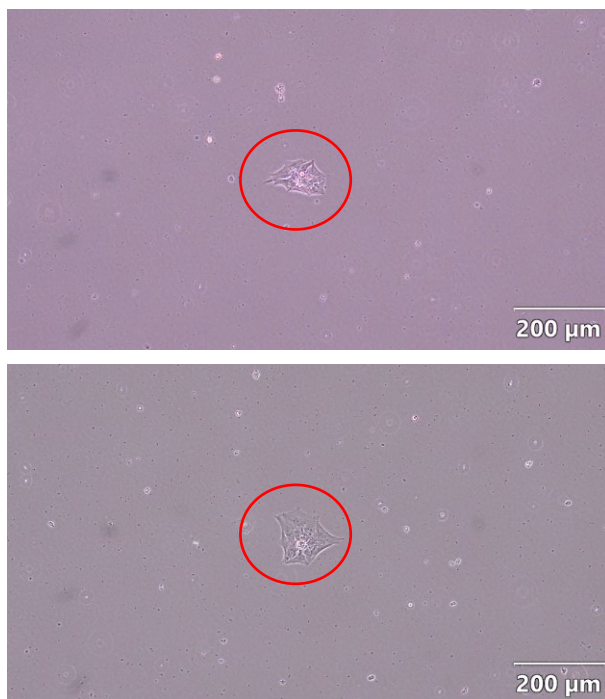
Na Obrázku 18 můžeme ve vyznačeném červeném kruhu sledovat tvorbu erytroidních shluků při zvětšení 40x a 100x, které značí přítomnost červených krvinek. Ke kultivaci byly použity EBs vytvořené z buněčné linie HG8 z AggreWell destiček, a k tvorbě shluků došlo 11. den od kultivace.



Obrázek 18 Tvorba červených erytroidních shluků, 11. den kultivace EBs z AggreWell, linie HG8.

8.5 Izolace kardiomyocytů

Proces kardiomyogeneze byl ukončen 16 den od počátku diferenciaci (5 dnů formace tělísek + 11 dnů kultivace naadherovaných tělísek v ITS médiu). Jelikož byly na kulturačních miskách pozorovány tepající oblasti, značící výskyt kardiomyocytů, přešlo se na samotný proces izolace a purifikace kardiomyocytů. Postup je podrobněji popsán v kapitole 7.3.3.5 Purifikace kardiomyocytů. Izolovány byly pouze kardiomyocyty vytvořené z GMO buněk HG8, jelikož je to manipulačně přívětivější než mechanické oddělení, které by muselo být provedeno v případě buněk ES R1. Vyselektované kardiomyocyty pak byly vysety na poželatinovanou Petriho misku a jejich adheze byla kontrolována pod mikroskopem. Jak již bylo zmíněno, výtěžnost kardiomyocytů je v tomto případě velmi nízká (1-3 %), proto tedy nebyl zaznamenán vysoký počet kardiomyocytů na misce. Na obrázku 19 můžeme vidět kardiomyocyty odvozené z HG8 po 1denní kultivaci.



Obrázek 19 Kardiomyocyty odvozené z buněk HG8, zvětšení 100x

ZÁVĚR

V rámci předložené práce jsme se zaměřili na problematiku nedostatečné regenerace srdce po jeho poškození, což je stav spojený se ztrátou kardiomyocytů. Tyto buňky, zodpovědné za kontrakci srdce, se v dospělosti již nedělí, což ztěžuje přirozenou regeneraci srdce a vede ke zhoršení srdeční funkce. Naším cílem bylo lépe porozumět procesu maturace kardiomyocytů, tedy zrání těchto buněk, který má na regeneraci srdce významný vliv. Dobře maturované kardiomyocyty se vyznačují nejen lepšími kontraktilními vlastnostmi ve srovnání s nedozrálými buňkami, ale také schopností interagovat s okolními tkáněmi v srdci a aktivně se zapojovat do procesů, které ovlivňují strukturu srdce.

Praktická část práce byla zaměřena na formaci embryonálních tělísek (EBs) z buněčné linie ES R1 a HG8 pomocí metody visících kapek, suspenzní metody a metody mikrodestiček AggreWellTM800. Metodu visících kapek lze považovat za obtížnější z důvodu potřeby precizní manipulace, ale výhodou této metody je, že umožňuje tvorbu homogenních tělísek díky přesnému dávkování buněk v jednotlivých kapkách. Naopak suspenzní metoda umožňuje vytvořit větší množství tělísek, ale spíše s nehomogenní morfologií. Za nejefektivnější metodu byla označena metoda formace EBs pomocí mikrodestiček AggreWellTM800, které umožňovaly poměrně snadnou manipulaci a výsledkem byla homogenní a celistvá tělíška, která byla následně využita k dalšímu postupu.

Po vytvoření homogenních EBs byl sledován proces kardiomyogeneze, kdy se buňky diferencovaly do mnoha typů buněk, včetně kardiomyocytů. Tento proces trval dohromady 16 dní, kdy prvních 5 dní se formovaly tělíška na mikrodestičkách AggreWell, následně byla přenesena na želatinový plastik a byl sledován proces kardiomyogeneze. Po uplynutí 11 dní byl experiment ukončen, kdy tepající oblasti vytvořených EBs byly důkazem přítomnosti kardiomyocytů, které byly následně purifikovány a izolovány.

Izolovány byly kardiomyocyty z geneticky modifikovaných buněk HG8, které byly vysazeny na Petriho misku s poželatinovaným povrchem a sledovala se jejich adheze pod mikroskopem. Vzhledem k nízkému výtěžku kardiomyocytů, které činí zhruba 1-3 % nebylo zaznamenáno velké množství buněk na misce. Mimo jiné bylo možno v průběhu kardiomyogeneze pozorovat shluky červených krvinek, které jsou důkazem úspěšného procesu diferenciaci buněk.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Allen, L.A. a Felker, G.M. (2008) 'Advances in the surgical treatment of heart failure', *Current Opinion in Cardiology*, 23(3), pp. 249–253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e3282f54fea>.
2. Ban, K., Bae, S. a Yoon, Y. (2017) 'Current Strategies a Challenges for Purification of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells', *Theranostics*, 7(7), pp. 2067–2077. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.19427>.
3. Bratt-Leal, A.M., Carpenedo, R.L. a McDevitt, T.C. (2009) 'Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation', *Biotechnology Progress*, 25(1), pp. 43–51. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/btpr.139>.
4. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Somite." Encyclopaedia Britannica, Encyclopaedia Britannica, Inc., 24 Sep. 2023, Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/somite-germ-layer>.
5. Cameli, M. *et al.* (2022) 'Donor shortage in heart transplantation: How can we overcome this challenge?', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, p. 1001002. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1001002>.
6. Cooper, D.K.C. (2012) 'A Brief History of Cross-Species Organ Transplantation', *Baylor University Medical Center Proceedings*, 25(1), pp. 49–57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/08998280.2012.11928783>.
7. Dal-Pra, S., Hodgkinson, C.P. a Dzau, V.J. (2019) 'Induced cardiomyocyte maturation: Cardiac transcription factors are necessary but not sufficient', *PLOS ONE*. Edited by G.-C. Fan, 14(10), p. e0223842. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223842>.
8. Forte, G. *et al.* (2012) 'Substrate Stiffness Modulates Gene Expression a Phenotype in Neonatal Cardiomyocytes *In Vitro*', *Tissue Engineering Part A*, 18(17–18), pp. 1837–1848. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0707>.
9. Guo, Y. a Pu, W.T. (2020) 'Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development', *Circulation Research*, 126(8), pp. 1086–1106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315862>.

10. Gurusamy, N. *et al.* (2018) ‘Adult Stem Cells for Regenerative Therapy’, in *Progress in Molecular Biology a Translational Science*. Elsevier, pp. 1–22. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.009>.
11. Herron, T.J. *et al.* (2016) ‘Extracellular Matrix–Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiac Monolayer Structure a Electrophysiological Function’, *Circulation: Arrhythmia a Electrophysiology*, 9(4), p. e003638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.003638>.
12. Hong, Y. *et al.* (2023) ‘Engineering the maturation of stem cell-derived cardiomyocytes’, *Frontiers in Bioengineering a Biotechnology*, 11, p. 1155052. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1155052>.
13. Humpolíček, P. *et al.* (2018) ‘The biocompatibility of polyaniline a polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity a impurity profile’, *Materials Science a Engineering: C*, 91, pp. 303–310. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.037>.
14. Karbassi, E. *et al.* (2020) ‘Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge a implications for regenerative medicine’, *Nature Reviews Cardiology*, 17(6), pp. 341–359. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>.
15. Khoo, M.L.M. *et al.* (2005) ‘Growth a Differentiation of Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells: Effect of Glucose a Basic Fibroblast Growth Factor1’, *Biology of Reproduction*, 73(6), pp. 1147–1156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036673>.
16. Laflamme, M.A. a Murry, C.E. (2011) ‘Heart regeneration’, *Nature*, 473(7347), pp. 326–335. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature10147>.
17. Leitolis, A. *et al.* (2019) ‘Cardiomyogenesis Modeling Using Pluripotent Stem Cells: The Role of Microenvironmental Signaling’, *Frontiers in Cell a Developmental Biology*, 7, p. 164. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00164>.
18. Libor Vojtek. (b.r.). Studijní materiály k předmětu Vývojová a srovnávací imunologie, MUNI. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/Bi8250c/um/52663438/54012848/Pocitani_v_Burkerove_komurce.pdf

19. Lin, J. (2008) ‘Applications a Limitations of Genetically Modified Mouse Models in Drug Discovery a Development’, *Current Drug Metabolism*, 9(5), pp. 419–438. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/138920008784746355>.
20. Liu, X. *et al.* (2019) ‘Insulin-Transferrin-Selenium as a Novel Serum-free Media Supplement for the Culture of Human Amnion Mesenchymal Stem Cells’, *Annals of Clinical a Laboratory Science*, 49(1), pp. 63–71.
21. Lo, B. a Parham, L. (2009) ‘Ethical Issues in Stem Cell Research’, *Endocrine Reviews*, 30(3), pp. 204–213. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/er.2008-0031>.
22. Lumen Learning. "Embryonic Development." Anatomy a Physiology II, 21 Sep. 2023, Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/embryonic-development/>.
23. Malech, H.L., DeLeo, F.R. a Quinn, M.T. (2014) ‘The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview’, in M.T. Quinn a F.R. DeLeo (eds) *Neutrophil Methods a Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 3–10. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-845-4_1.
24. Murry, C.E. a Keller, G. (2008) ‘Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development’, *Cell*, 132(4), pp. 661–680. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.008>.
25. Nagy, A. *et al.* (1993) ‘Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), pp. 8424–8428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8424>.
26. Niwa, H. (2007) ‘How is pluripotency determined a maintained?’, *Development*, 134(4), pp. 635–646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.02787>.
27. Parrotta, E.I. *et al.* (2020) ‘Modeling Cardiac Disease Mechanisms Using Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Progress, Promises a Challenges’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), p. 4354. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21124354>.
28. Pessina, A. a Gribaldo, L. (2006) ‘The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives’, *Current Medical Research a Opinion*, 22(11), pp. 2287–2300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1185/030079906X148517>.

29. Rippe, J.M. (2019) 'Lifestyle Strategies for Risk Factor Reduction, Prevention, a Treatment of Cardiovascular Disease', *American Journal of Lifestyle Medicine*, 13(2), pp. 204–212. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1559827618812395>.
30. Rippon, H.J. a Bishop, A.E. (2004) 'Embryonic stem cells', *Cell Proliferation*, 37(1), pp. 23–34. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2004.00298.x>.
31. Scafa Udriște, A. *et al.* (2023) 'Progress in Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering a Regeneration', *Polymers*, 15(5), p. 1177. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15051177>.
32. Scuderi, G.J. a Butcher, J. (2017) 'Naturally Engineered Maturation of Cardiomyocytes', *Frontiers in Cell a Developmental Biology*, 5, p. 50. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00050>.
33. Shah, A., Seydafkan, S. a Sheps, D. (2022) 'Introduction to Cardiac Anatomy, Physiology, a Pathophysiology', in S.R. Waldstein *et al.* (eds) *Handbook of Cardiovascular Behavioral Medicine*. New York, NY: Springer New York, pp. 23–44. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-0-387-85960-6_2.
34. Sinnecker, D., Laugwitz, K.-L. a Moretti, A. (2014) 'Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug development a toxicity testing', *Pharmacology & Therapeutics*, 143(2), pp. 246–252. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.004>.
35. Skopalová, K. *et al.* (2021) 'Modulation of Differentiation of Embryonic Stem Cells by Polypyrrole: The Impact on Neurogenesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), p. 501. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22020501>.
36. Slaats, R.H., Schwach, V. a Passier, R. (2020) 'Metabolic environment in vivo as a blueprint for differentiation a maturation of human stem cell-derived cardiomyocytes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), p. 165881. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165881>.
37. Steinhauser, M.L. a Lee, R.T. (2011) 'Regeneration of the heart', *EMBO Molecular Medicine*, 3(12), pp. 701–712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/emmm.201100175>.

38. Stewart, J., Manmathan, G. a Wilkinson, P. (2017) 'Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance a literature', *JRSM Cardiovascular Disease*, 6, p. 204800401668721. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2048004016687211>.
39. Stoppel, W.L., Kaplan, D.L. a Black, L.D. (2016) 'Electrical a mechanical stimulation of cardiac cells a tissue constructs', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 96, pp. 135–155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.07.009>.
40. SÝKOROVÁ, Dominika. *Kardiomyogeneze u embryonálních kmenových buněk*. Online. Master's thesis. Brno: Masaryk University, Faculty of Science. 2012. Dostupné z: <https://theses.cz/id/vqcm8g/>.
41. Tampakakis, E. a Mahmoud, A.I. (2021) 'The role of hormones a neurons in cardiomyocyte maturation', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 118, pp. 136–143. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2021.03.026>.
42. Tenreiro, M.F. *et al.* (2021) 'Next generation of heart regenerative therapies: progress a promise of cardiac tissue engineering', *npj Regenerative Medicine*, 6(1), p. 30. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00140-4>.
43. Ul Haq, A. *et al.* (2021) 'Intrinsically Conductive Polymers for Striated Cardiac Muscle Repair', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), p. 8550. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22168550>.
44. Van Mil, A. *et al.* (2018) 'Modelling inherited cardiac disease using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: progress, pitfalls, a potential', *Cardiovascular Research*, 114(14), pp. 1828–1842. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy208>.
45. Veselá, I. *et al.* (2010) 'Leukaemia inhibitory factor inhibits cardiomyogenesis of mouse embryonic stem cells via STAT3 activation', *Folia Biologica*, 56(4), pp. 165–172.
46. Volarevic, V. *et al.* (2018) 'Ethical a Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy', *International Journal of Medical Sciences*, 15(1), pp. 36–45. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>.
47. Woodcock, E.A. a Matkovich, S.J. (2005) 'Cardiomyocytes structure, function a associated pathologies', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,

- 37(9), pp. 1746–1751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.04.011>.
48. Yang, X., Pabon, L. a Murry, C.E. (2014) ‘Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes’, *Circulation Research*, 114(3), pp. 511–523. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>.
49. Zakrzewski, W. *et al.* (2019) ‘Stem cells: past, present, a future’, *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), p. 68. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
50. Zareba, W. a Cygankiewicz, I. (2008) ‘Long QT Syndrome a Short QT Syndrome’, *Progress in Cardiovascular Diseases*, 51(3), pp. 264–278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2008.10.006>.
51. Zeevaert, K. *et al.* (2020) ‘Cell Mechanics in Embryoid Bodies’, *Cells*, 9(10), p. 2270. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells9102270>.
52. Zhao, M.-T. *et al.* (2020) ‘Cardiomyocyte Proliferation a Maturation: Two Sides of the Same Coin for Heart Regeneration’, *Frontiers in Cell a Developmental Biology*, 8, p. 594226. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.594226>.
53. Zivot, A. *et al.* (2018) ‘Erythropoiesis: insights into pathophysiology a treatments in 2017’, *Molecular Medicine*, 24(1), p. 11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

KVO	Kardiovaskulární onemocnění
HT	Heart Transplant (transplantace srdce)
ESC	Embryonální kmenové buňky
EBs	Embryonální tělíska
SO	Srdeční onemocnění
IM	Infarkt myokardu
IHME	Institute for Health Metrics a Evaluation
ICD	Implantabilní kardiovertery-defibrilátory
DCD	Dárcovství po oběhové smrti
SA	Sinoatriální uzel
AV	Atrioventrikulární uzel
LAD	Levá přední sestupná tepna
LCX	Levá okružní tepna
RCA	Pravá věnčitá tepna
Cx	Gap junction konexinů
ATP	Adenosintrifosfát
ECM	Extracelulární matrix
hPSC-CM	Kardiomyocyty odvozené z lidských pluripotentních kmenových buněk
iPSC	Kardiomyocyty odvozené z indukovaných pluripotentních kmenových buněk
LSQT	Syndrom dlouhého QT
EKG	Elektrokardiogram
LIF	Leukemia inhibitory factor
ITS	Inzulín-transferrin-selen
PBS	Fosfátový pufr
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Histologické změny po MI na srdeční tkáni (Scafa Udriște et al., 2023).....</i>	12
<i>Obrázek 2 Mapa úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění pro celý svět v roce 2019 (https://ourworldindata.org/).....</i>	13
<i>Obrázek 3 Graf úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění v roce 1990-2019 (https://ourworldindata.org/).....</i>	14
<i>Obrázek 4 Vnitřní anatomie srdce (https://www.symptomy.cz/anatomie/srdce).....</i>	18
<i>Obrázek 5: Přehled klíčových faktorů pro regeneraci srdeční tkáně (Scafa Udriște et al., 2023).....</i>	23
<i>Obrázek 6 Formace EBs metodou visících kapek.....</i>	40
<i>Obrázek 7 Bakteriologický plastik a antiadherentní Petriho misky.....</i>	41
<i>Obrázek 8 Bakteriologický plastik potažený vrstvou agaru.....</i>	41
<i>Obrázek 9 Prázdné mikrojamky AggreWell destičky, zvětšení 40x.....</i>	43
<i>Obrázek 10 EBs vytvořená metodou visících kapek, linie ESR1, zvětšení 100x.....</i>	46
<i>Obrázek 11 Formace EBs vytvořená suspenzní metodou na bakteriologickém plastiku, linie ESR1 a HG8, zvětšení 40x a 100x.....</i>	47
<i>Obrázek 12 Troubleshooting – přilnutá EBs na bakteriologický plastik, zvětšení 40x.....</i>	47
<i>Obrázek 13 Formace EBs vytvořená suspenzní metodou na bakteriologickém plastiku potaženým agarem, linie ESR1 a HG8, zvětšení 40x a 100x.....</i>	48
<i>Obrázek 14 Formace EBs vytvořená suspenzní metodou na anti adhezivním plastiku (Nunclon™ Sphera™ Dishes), linie HG8, zvětšení 40x a 100x.....</i>	49
<i>Obrázek 15 Formace EBs vytvořených pomocí AggreWell, linie ESR1 a HG8, zvětšení 40x a 100x.....</i>	50
<i>Obrázek 16 Sledování procesu kardiomyogeneze buněčné linie ESR1 v rozmezí 11 dnů při zvětšení 40x a 100x.....</i>	52
<i>Obrázek 17 Sledování procesu kardiomyogeneze buněčné linie HG8 v rozmezí 11 dnů při zvětšení 40x a 100x.....</i>	53
<i>Obrázek 18 Tvorba červených erytroidních shluků, 11. den kultivace EBs z AggreWell, linie HG8.....</i>	55
<i>Obrázek 19 Kardiomyocyty odvozené z buněk HG8, zvětšení 100x.....</i>	56