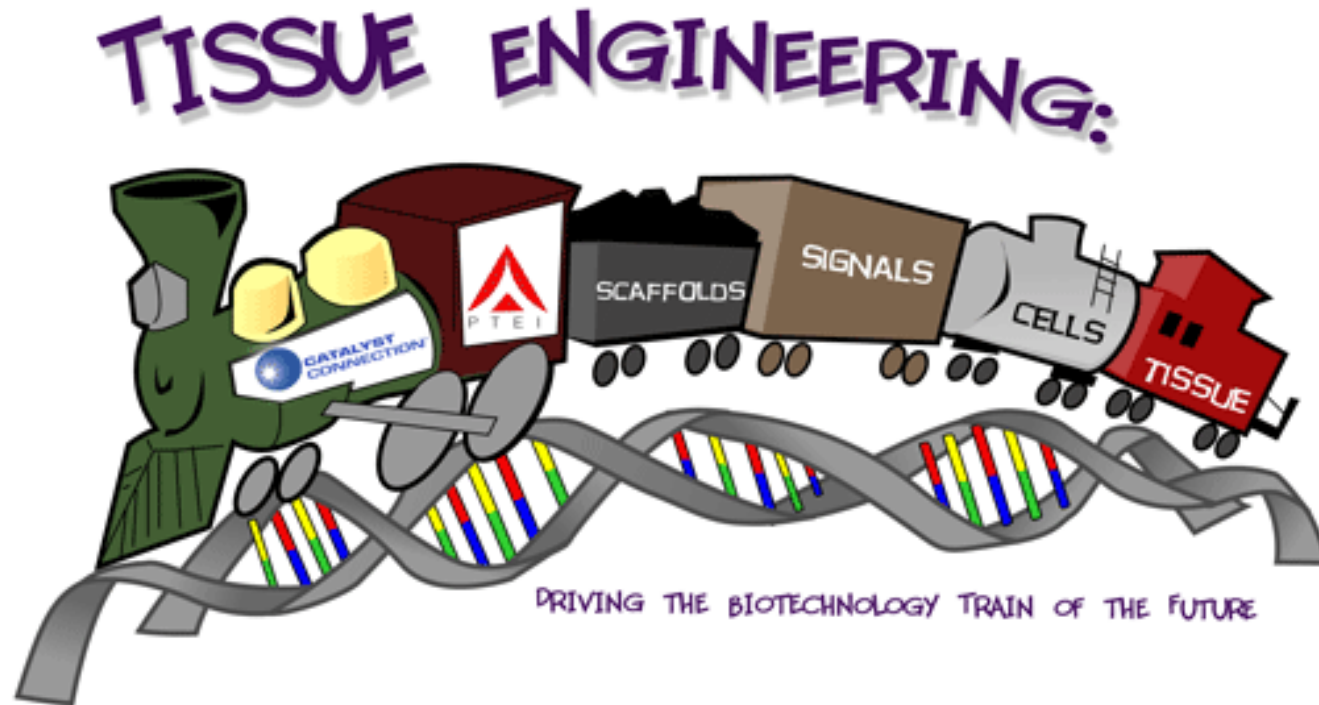




- multidisciplinární obor na pomezí medicíny, biologie a technických oborů, zejm. materiálových věd a biotechnologií
- vývoj postupů a biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání

Regenerace

- Regenerace představuje proces opravy poškozených tkání a nahrazení ztracených tkání, orgánů či končetin
- Fyziologická regenerace – proces obnovy v těle, probíhá celý život
- Reparativní – náhrada tkáně ztracené v důsledku úrazu, obecné označení hojení
 - Savci – mají omezené regenerační schopnosti, jsou pouze v embryonálním stavu
 - Člověk – např. žebra, špičky prstů, bubínek

<http://21stoleti.cz/2005/10/14/koncetiny-mohou-dorust/>



Naproti tomu např. mlokům mohou dorůstat končetiny i v dospělém věku

Jsou dva možné modely regenerace (hojení) v dospělém věku

Dospělé buňky dediferencují na kmenové



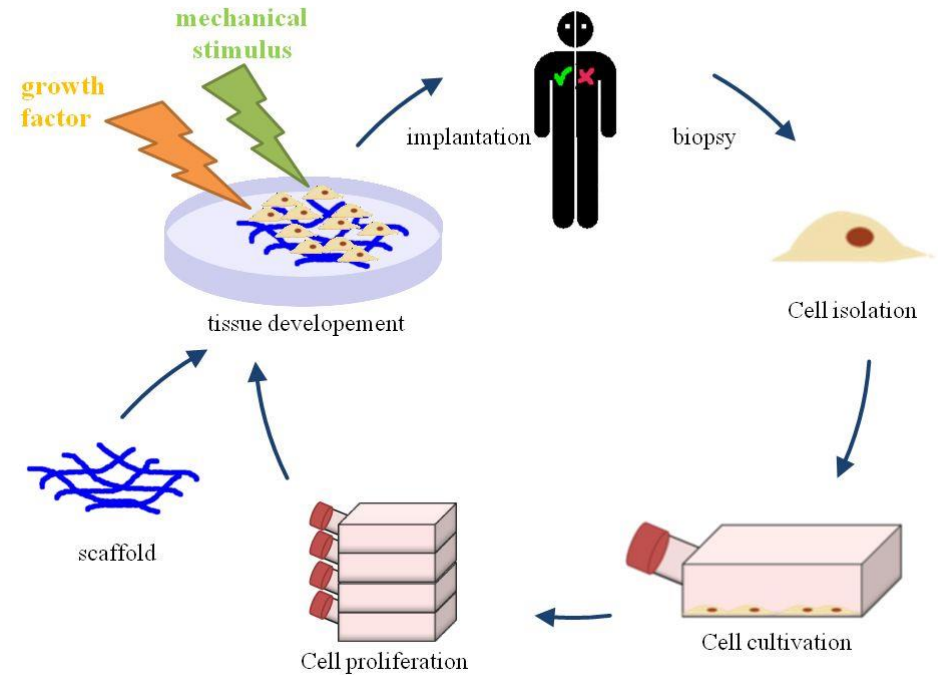
vývoj tkáně jako při růstu embrya

Skupiny nediferencovaných buněk



cirkulující kmenové buňky,
jsou vychytány v místě poranění a signály z okolní tkáně
jsou diferencovány do potřebných buněk

Tkáňové inženýrství



- Buňky – výběr vhodných buněk včetně metodiky kultivace; vhodný zdroj buněk
 - Autologní x alogenní x xenogenní
 - Kmenové x indukované kmenové x embryonální
- Biomateriál – vývoj materiálů „šitých na míru“ pro konkrétní aplikaci, aby plně podporoval
 - Růst, diferenciaci buněk, tvorbu funkční tkáně

Co musí zohlednit tkáňové inženýrství

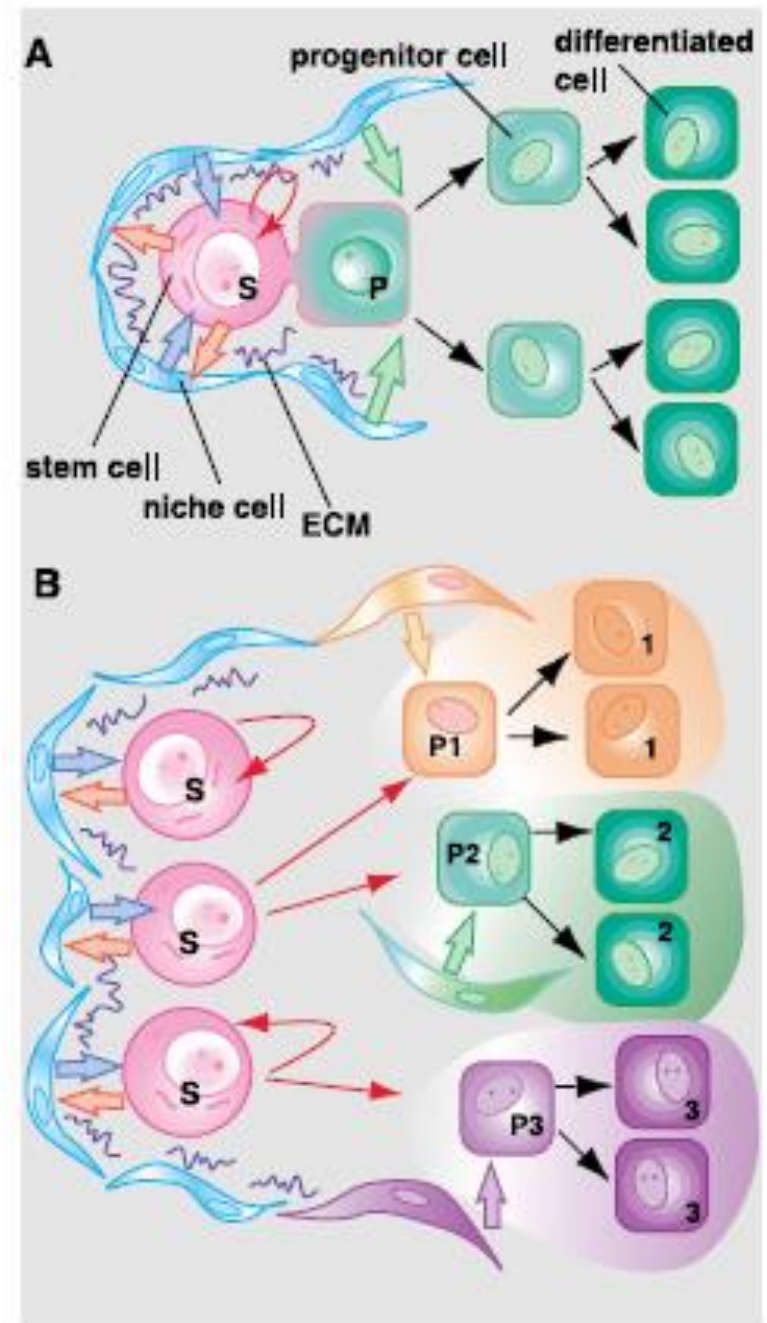
- Biomechanická hlediska – vlastnosti původní tkáně x co musí splňovat náhrada
- Technická hlediska
 - zda se jedná o přenos buněk -2-D systém,
 - či o vytvoření tkáně 3-D systém,
 - zda je potřeba bioreaktor, řešení vaskularizace
- Biomolekuly – volba vhodných
 - růstových faktorů
 - látek podporujících angiogenezi
 - diferenciačních faktorů

Buňky

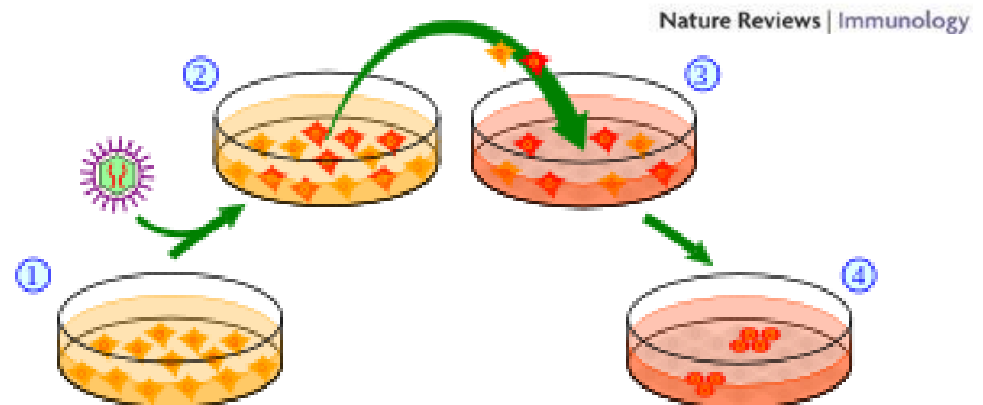
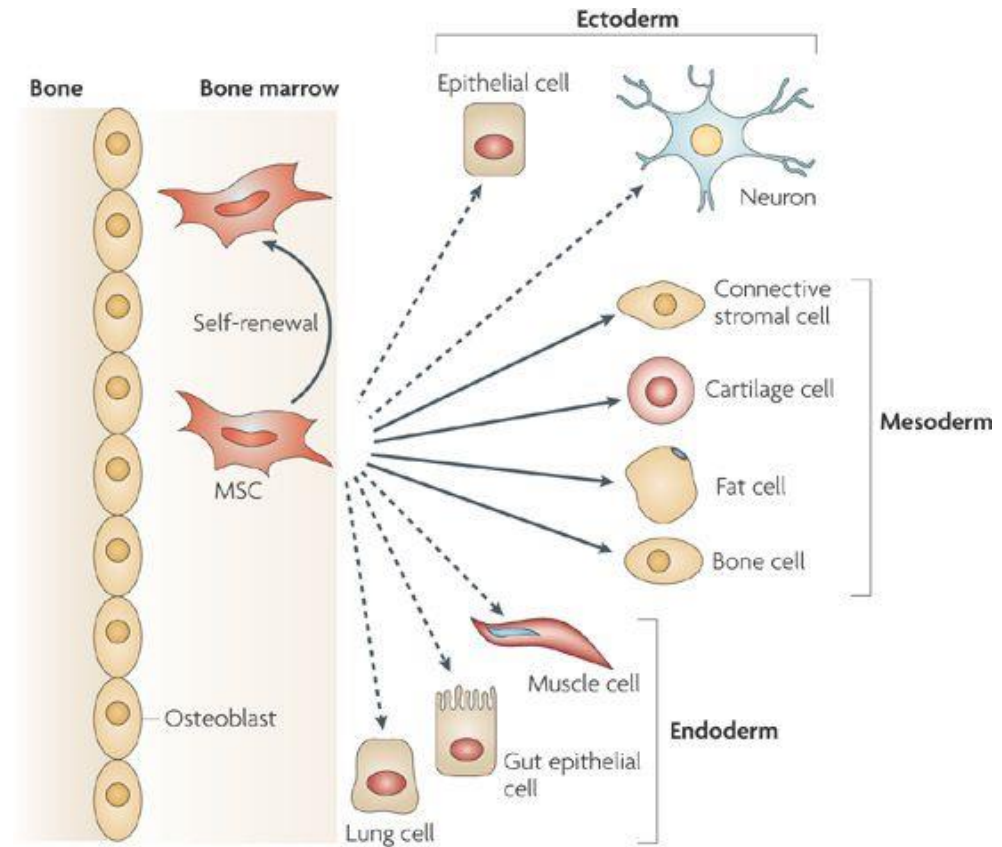
- Kmenové
 - Totipotentní
 - Pluripotentní
 - Multipotentní
 - Unipotentní - progenitorové
- Diferencované

Kmenové buňky

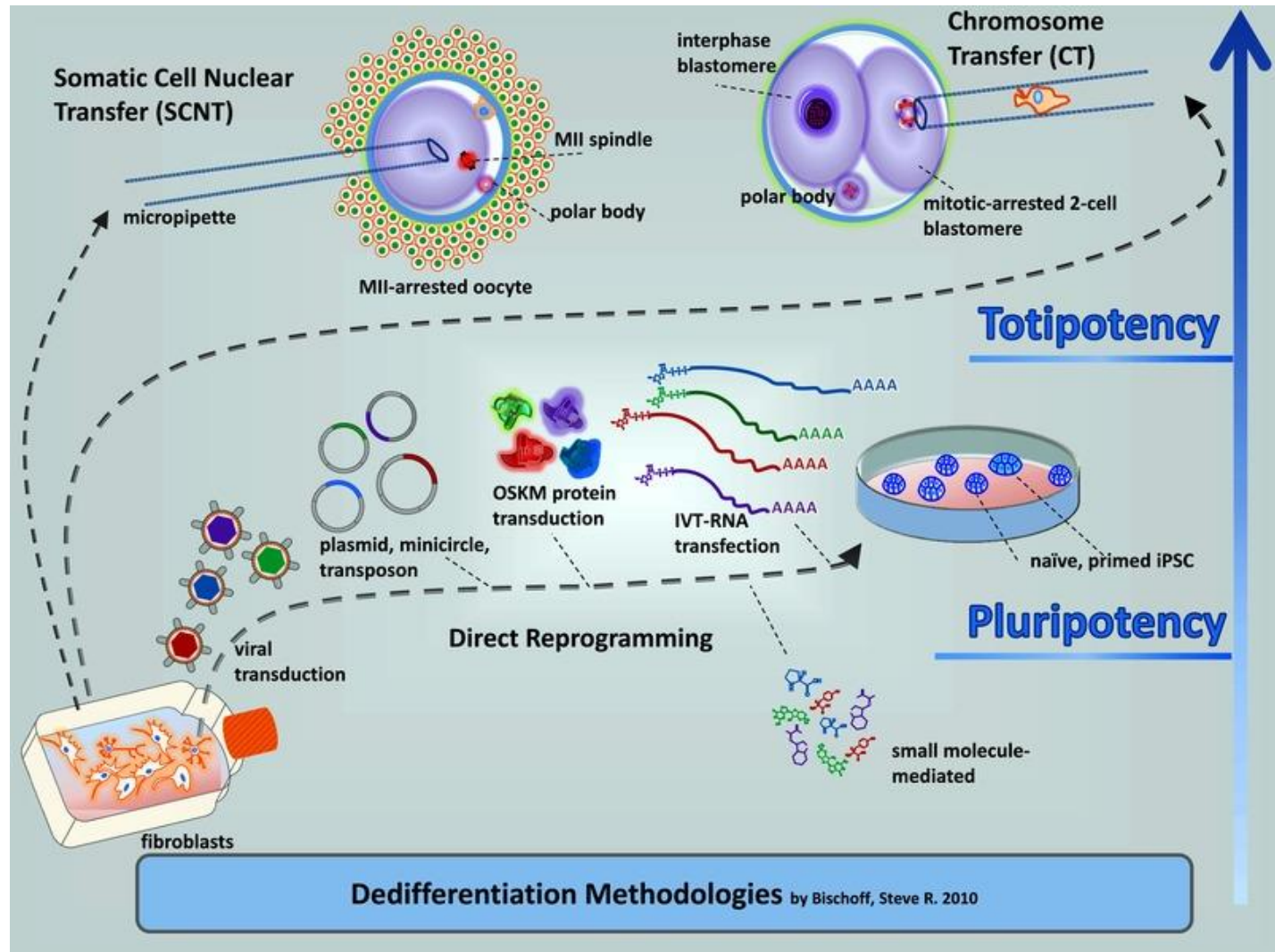
- Nesmrtelnost a schopnost nekonečného dělení
- Význam prostředí pro udržení „kmenovosti“ buněk
- Asymetrické dělení v závislosti na potřebách organismu



- Dospělé
 - Dospělé kmenové buňky
 - Mesenchymové kmenové buňky
 - Cirkulující kmenové buňky
 - Indukované pluripotentní kmenové buňky
 - Klonování
- Fetální
 - pupečnicková krev
- Embryonální - alo



Příprava pluripotentních buněk



Náhrady tkání

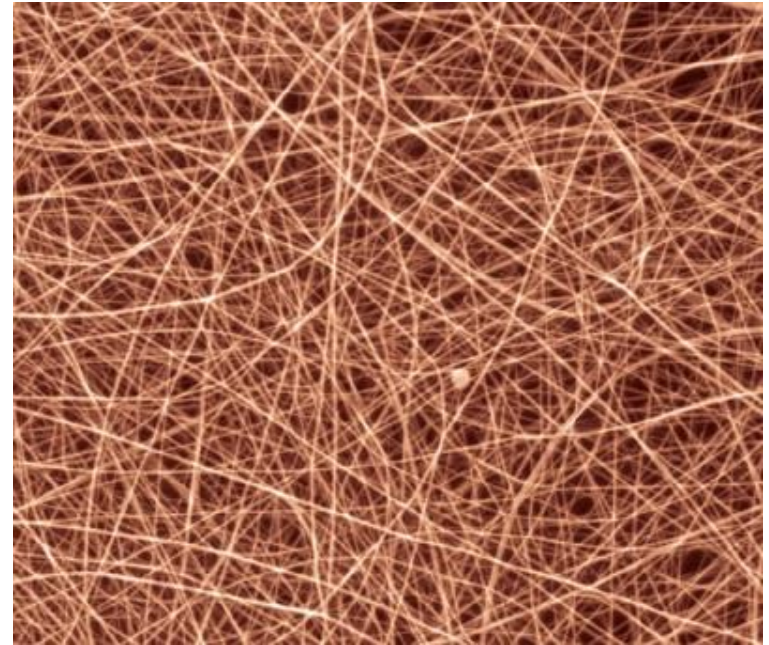
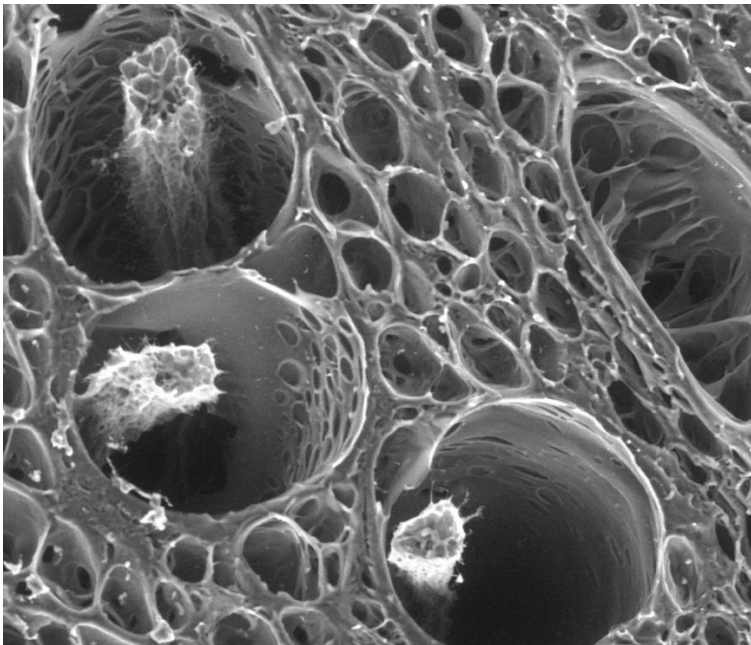
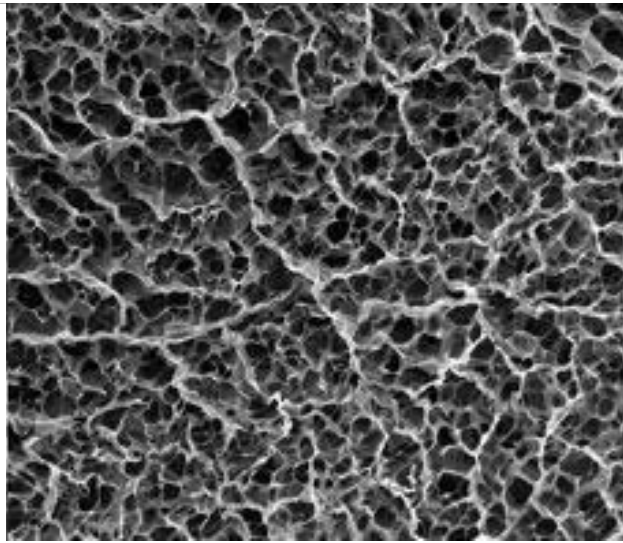
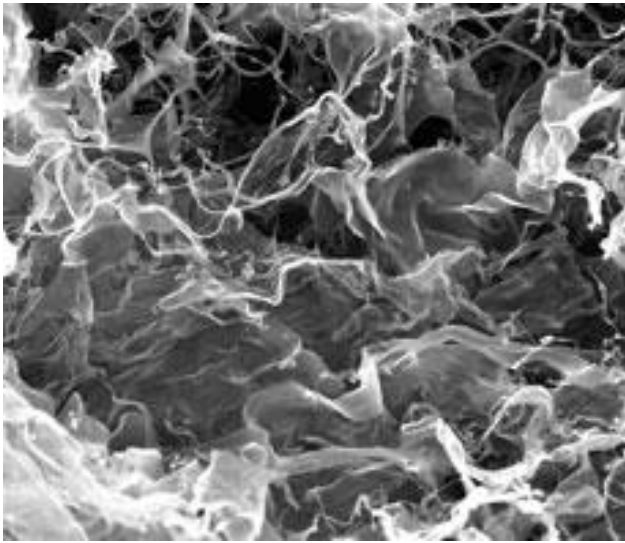
- Kůže
- Chrupavka
- Kost
- Šlacha
- Cévy, chlopně
- Langerhansovy ostrůvky
- Játra
- Mícha

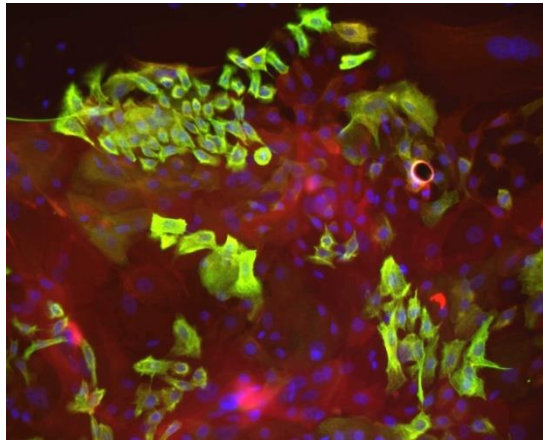
Nosiče buněk

- Netoxické
- Biokompatibilita
 - Reakce imunitního systému
- Biodegradabilita
- Biosorbovatelnost
- Mechanická pevnost
- Porozita
- Průhlednost
- Sterilizovatelnost
- Přirozené prostředí
- Přírodní
 - Kolagen
 - Želatina
 - Fibrin
 - Hyaluronová kyselina
 - Chitosan
- Syntetické
 - Hydrogely
 - PET, PTFE, PP
 - Biodegradabilní – PPLA, PGA

Nosiče buněk

- Fólie
 - Úprava povrchu
 - Laser skin
- Sítě
- Hydrogely s orientovanými póry
- Nanovlákná
- Enkapsulace buněk – uzavření buněk do mikropapky polymerního materiálu, který je prostupný pro proteiny

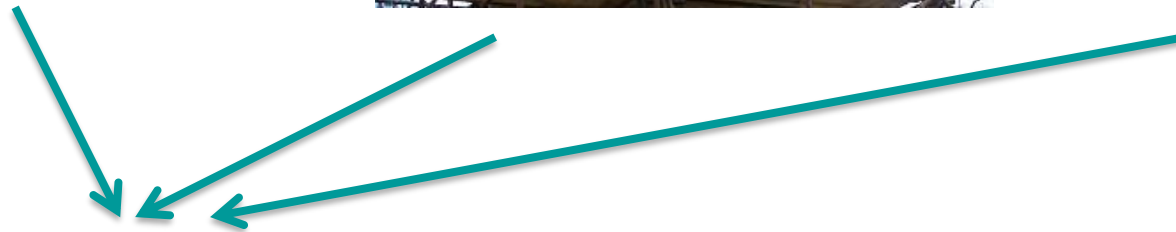
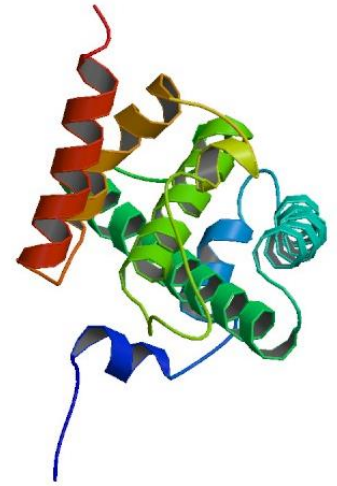




+



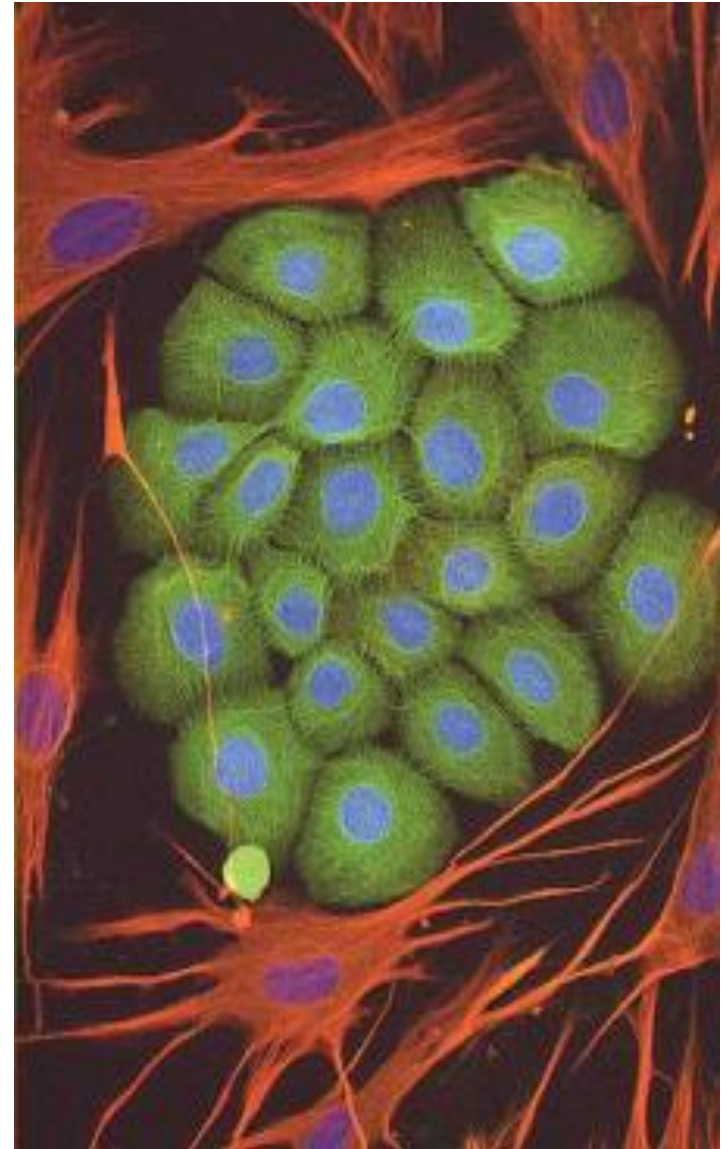
+

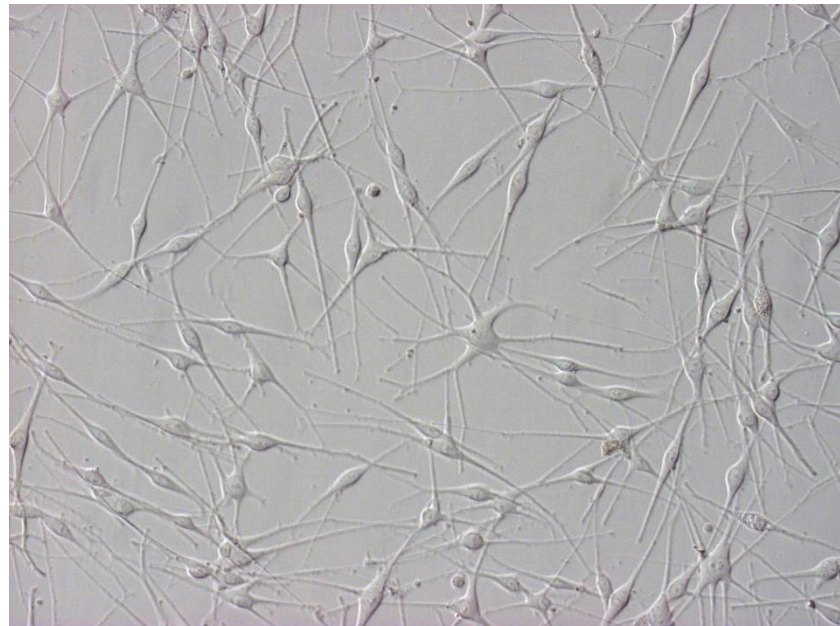
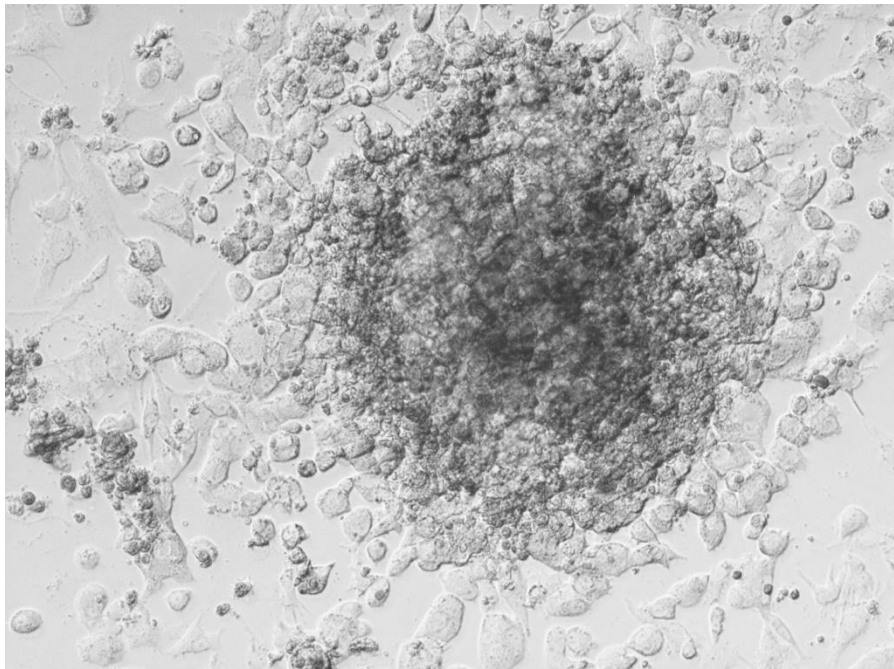
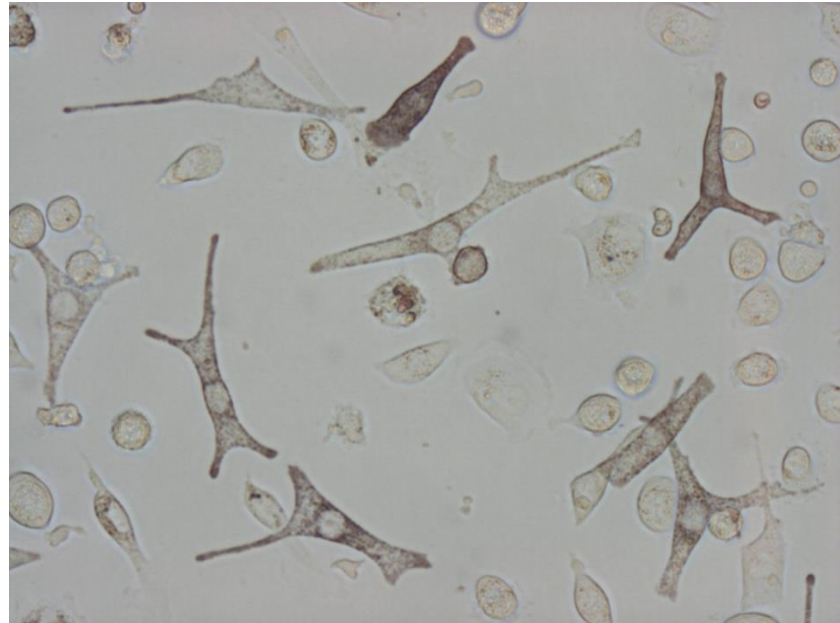
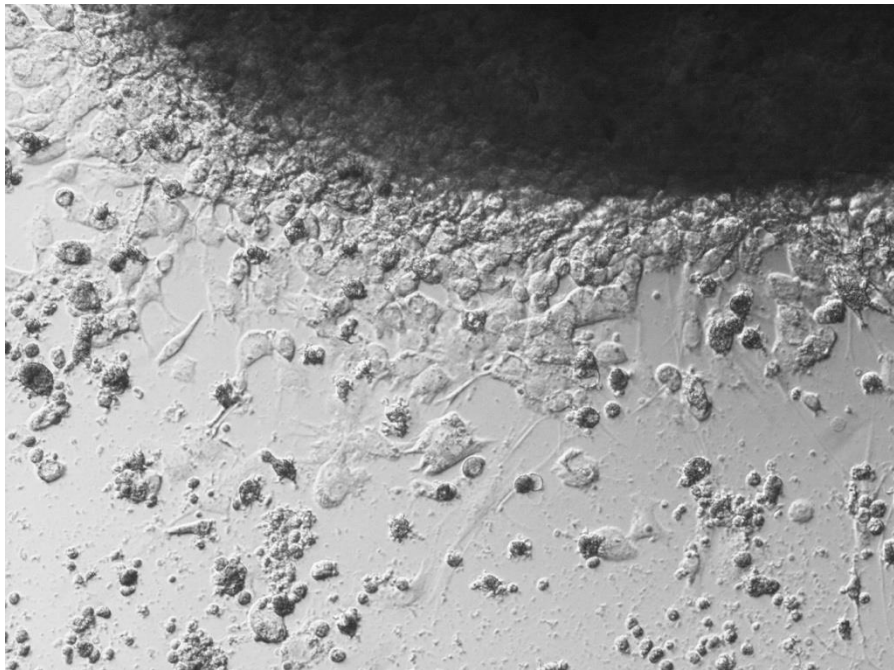


NÁHRADA

Tkáňové kultury

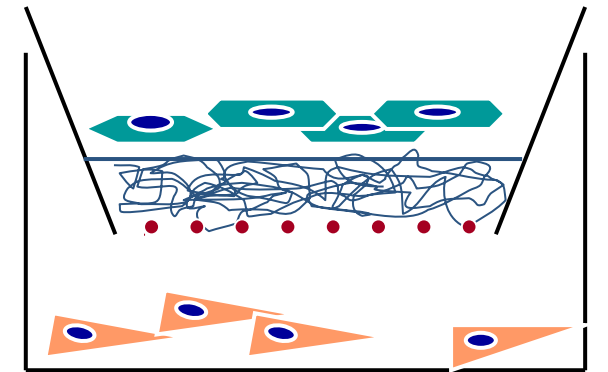
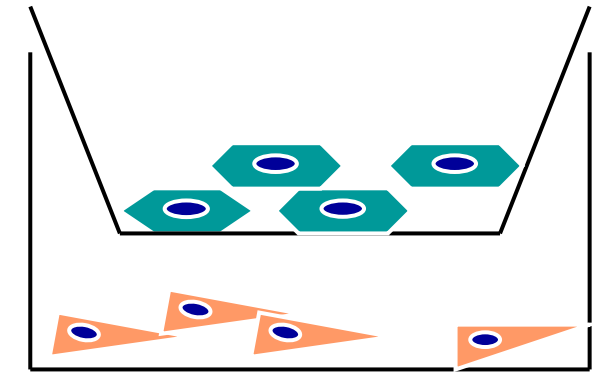
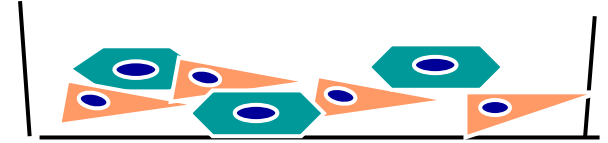
- Jako buněčné kultury jsou označovány rostlinné, živočišné nebo lidské buňky pěstované mimo tělo v laboratoři.
- Tato technika je nazývána *in vitro*.





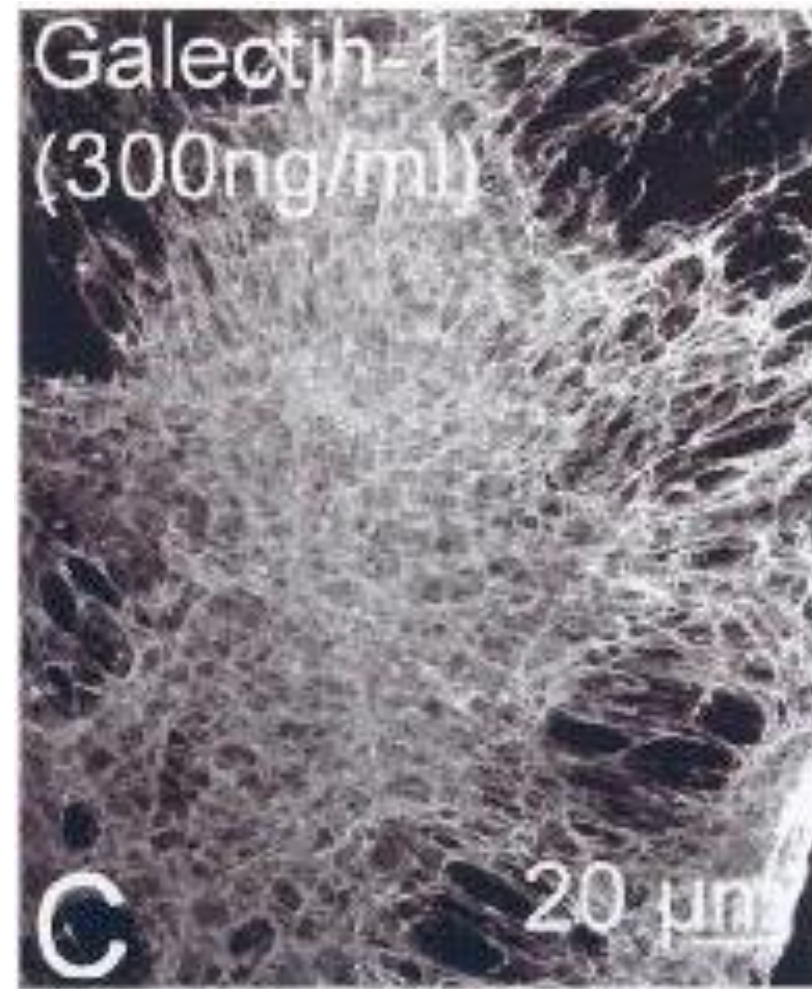
Vzájemné ovlivňování buněk

- Přímá kokultura více buněčných typů
- Insertový systém
- Kondicionovaná média
- Migrační testy



Interakce buněk s okolím

- 2D kultivace
 - tkáňový polystyren
 - sklo
 - povrch potažený proteinem
 - polymerní nosiče
- 3D kultivace
 - proteinové sítě
 - polymerní sítě
 - ECM – matrigel, vyrobené buňkami
- neadhezivní povrchy - sféry



Kultivované buňky

- Kůže
- Chrupavka
- Kost
- Šlacha
- Cévy, chlopně
- Langerhansovy ostrůvky
- Játra
- Mícha
- Mesenchymové kmenové buňky
- Buňky kostní dřeně
- *In vitro* fertilizace

Epidermis – není vaskularizovaná

- buňky jsou vyživovány difuzí přes bazální membránu
- pouze jeden buněčný typ – keratinocyty – dostačuje pro její rekonstrukci

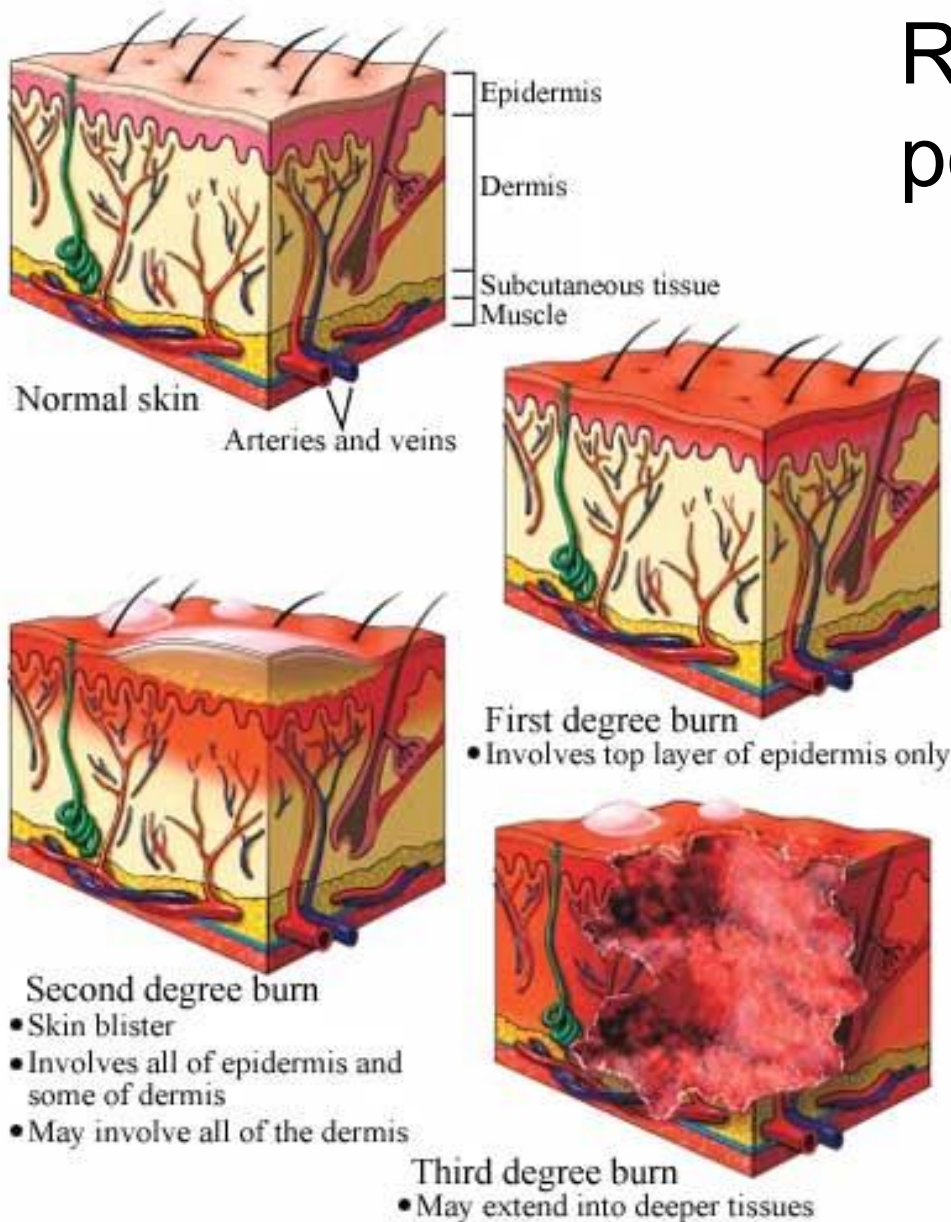


In vitro kultivace keratinocytů

- první lidská tkáň připravená v laboratoři (Rheinwald and Green), v klinické praxi použita poprvé v r. 1981
- určeno pro rozsáhle popálené pacienty s nedostatkem odběrových míst



Rozsáhlé popáleninové trauma



Popáleniny I.stupeň
II. stupeň
III. stupeň

Nutno hodnotit hloubku
termického úrazu i jeho
rozsah

Léčba popálenin

Xenotransplantáty

Alotransplantáty

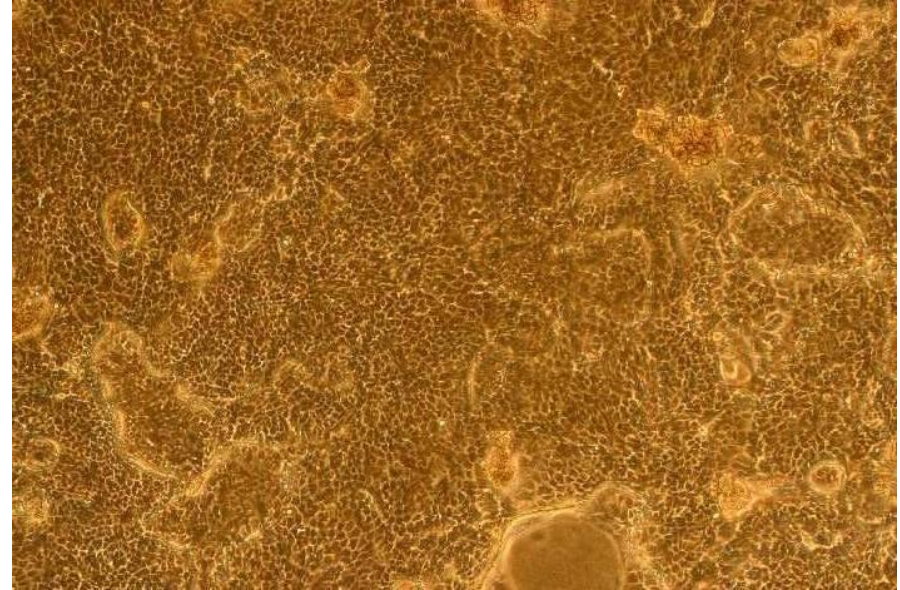
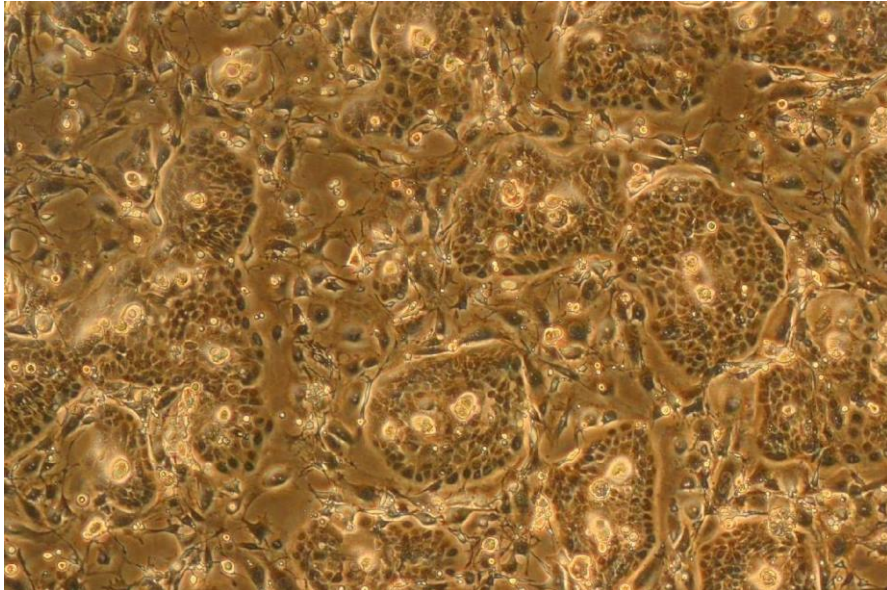
Autotransplantáty

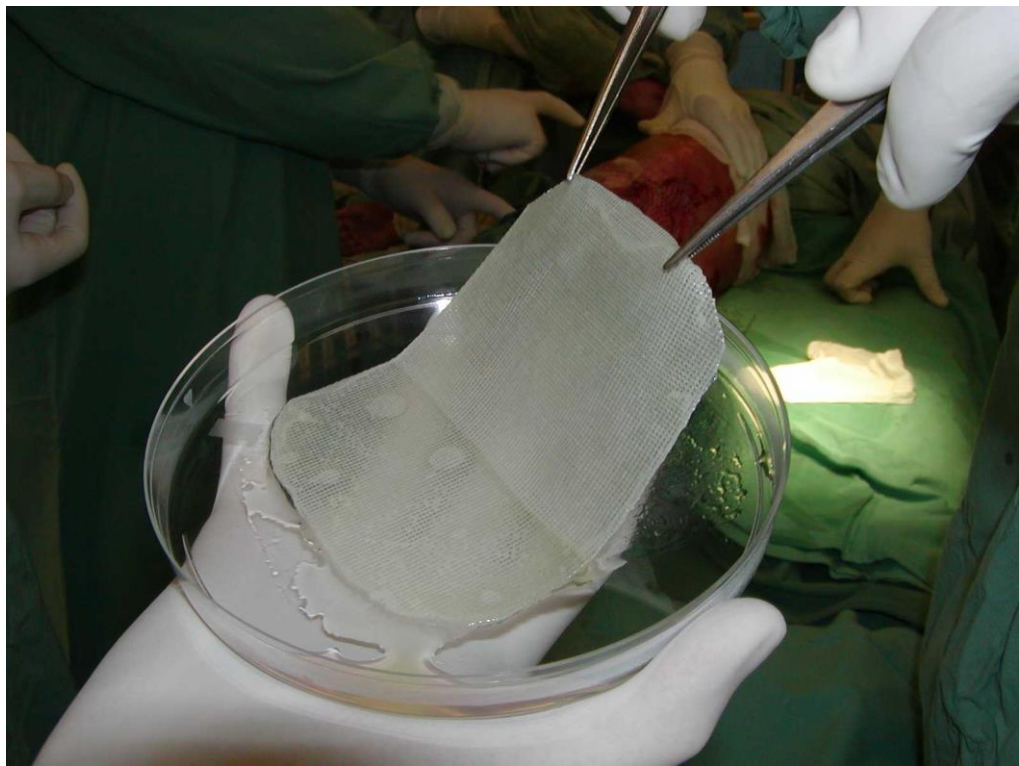
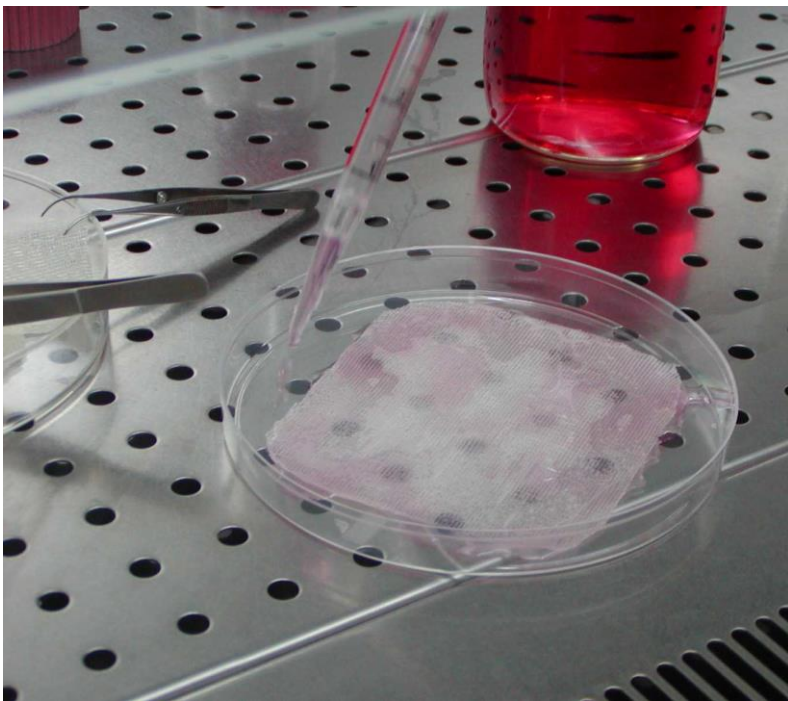
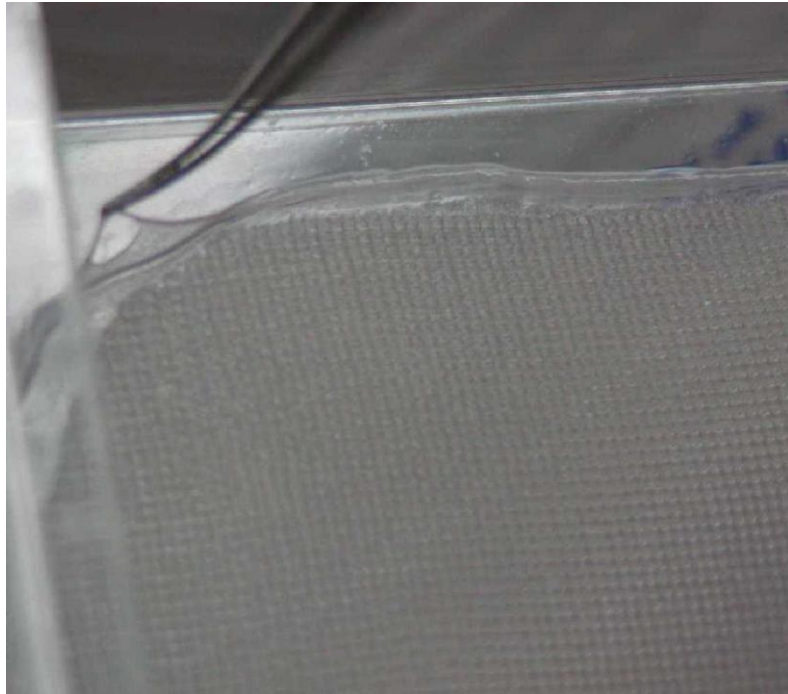


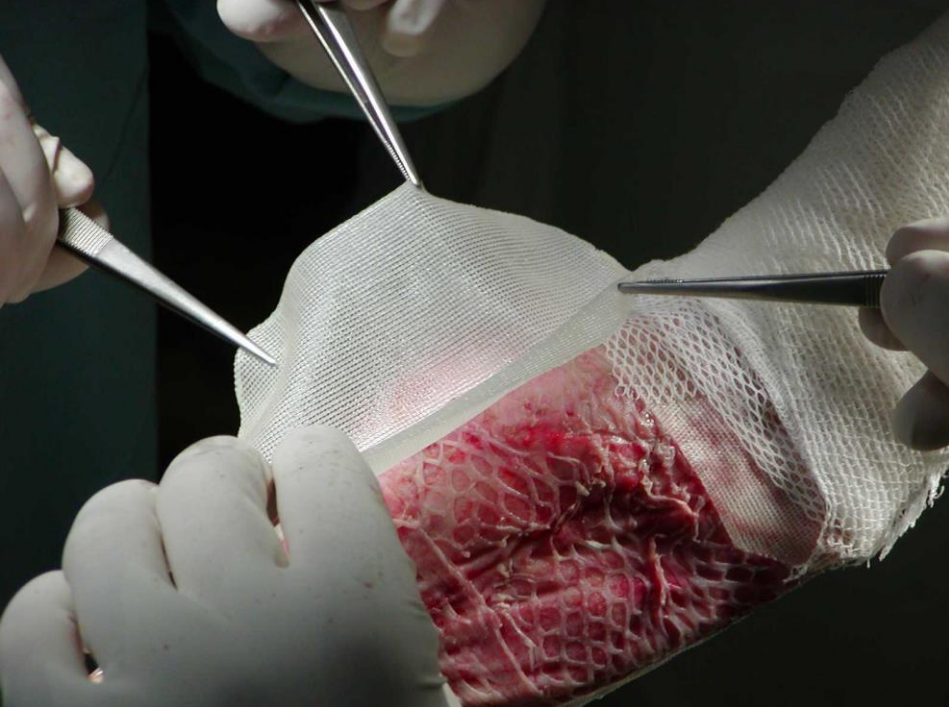
Kultivovaný epitel



- autologní štěpy – jsou schopné vytvořit trvalý kryt
- určeny pro léčbu rozsáhlých kožních ztrát v plné tloušťce
- odběr - dermo-epidermální štěp 2-5 cm²
- minimální doba přípravy cca 3 týdny
- možno připravit tisíce cm² epidermálních štěpů







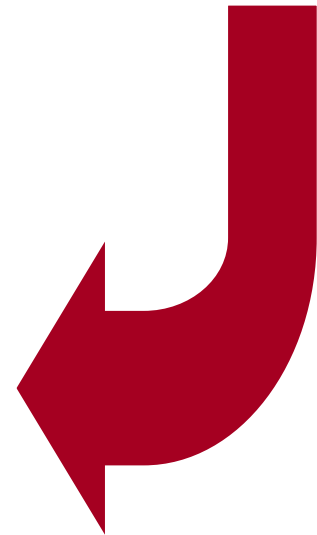
- allogení štěpy – nejsou schopné vytvořit trvalý kryt
- využívá se jejich stimulační účinek na hojení:
- otestování dárci – zbytková kůže z plastických operací



Kultivované štěpy na textilním nosiči

- velmi nízká úspěšnost přihojení těchto štěpů
- vysychání transplantovaných buněk
- častá mikrobiální kontaminace štěpu z ranné plochy
- enzymatické odvolnění štěpu snižuje viabilitu transplantovaných buněk

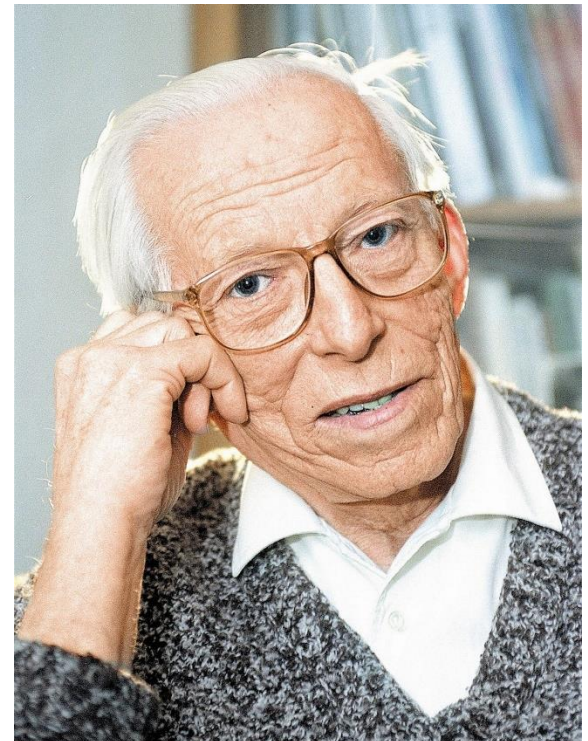
nový způsob přípravy
kultivovaných
epidermálních štěpů



Nový způsob kultivace keratinocytů

- kultivace buněk a jejich následná aplikace přímo na polymerním nosiči
- kultivační podložka (nosič) by měl tvořit optimální kryt pro transplantované buňky
- vyloučení feedrových buněk z kultivačního systému

polyHEMA poly(2-hydroxyetyl metakrylát)



Nový způsob kultivace keratinocytů

- kultivace buněk a jejich aplikace přímo na polymerním nosiči
- kultivační podložka (nosič) by měl tvořit optimální kryt pro transplantované buňky

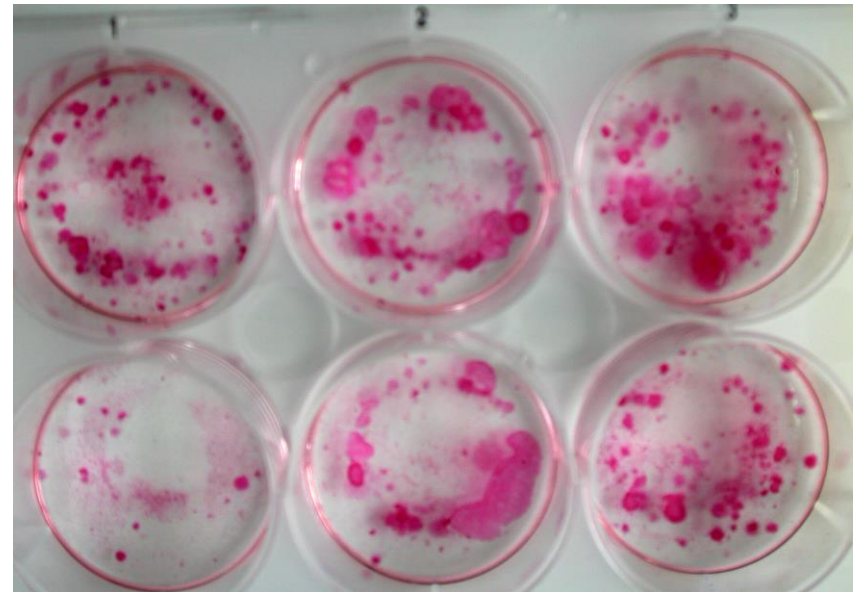
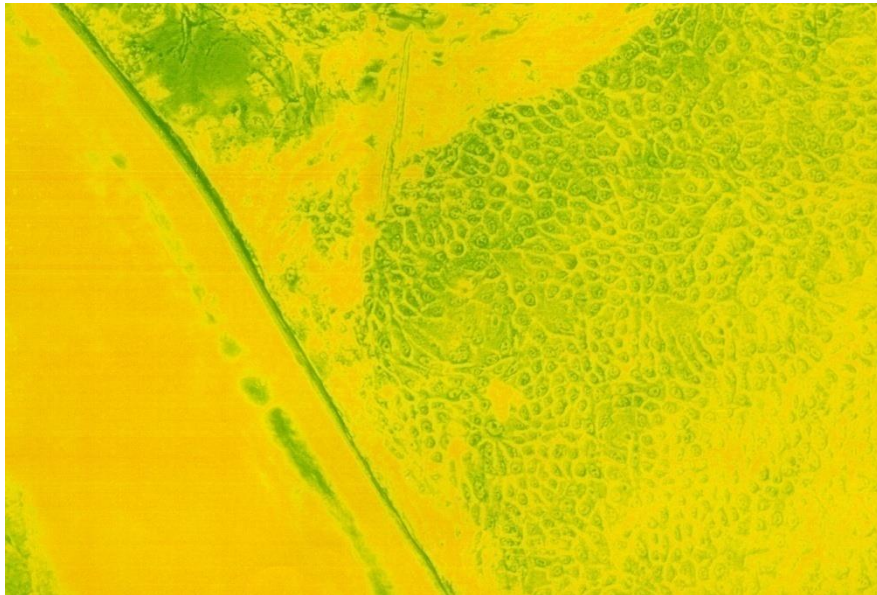


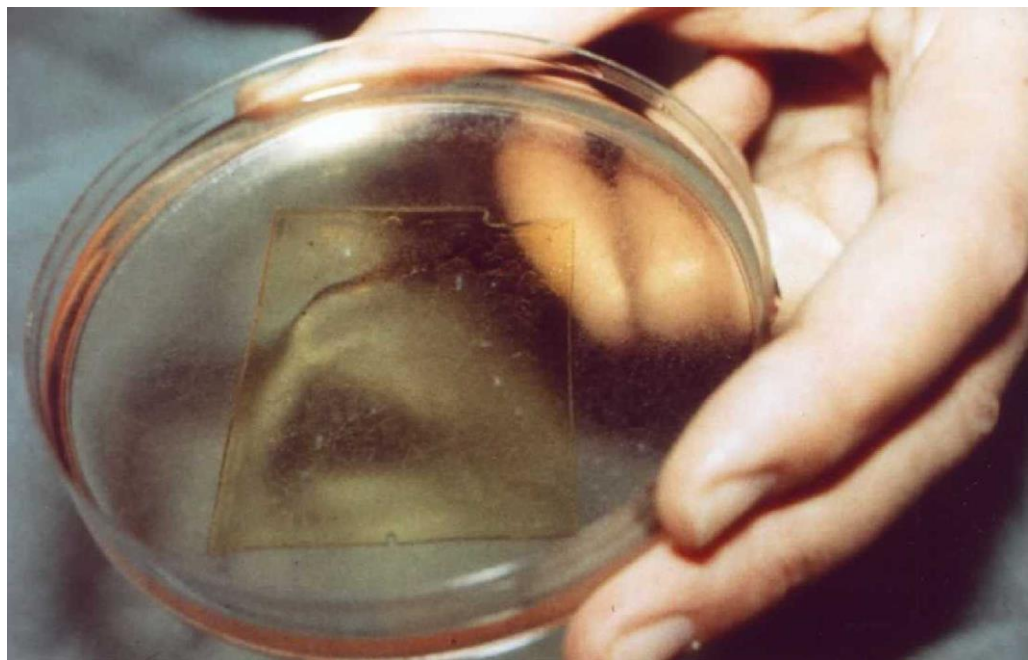
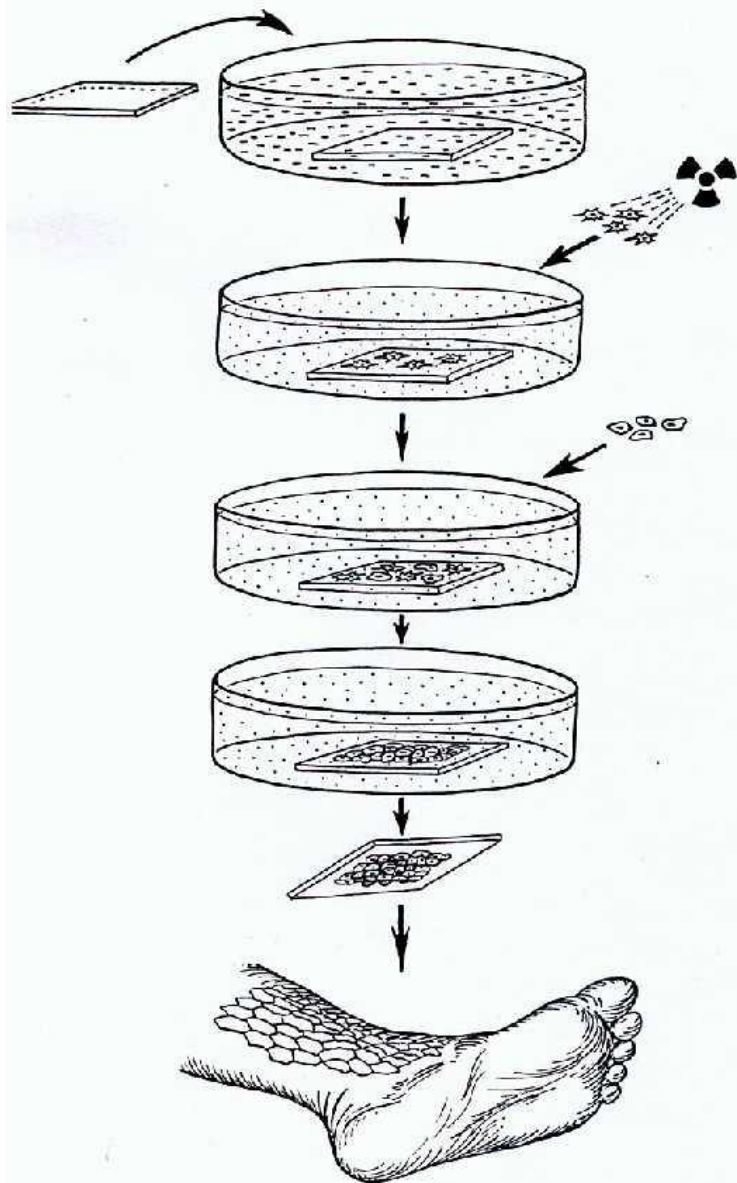
Tkáňové inženýrství

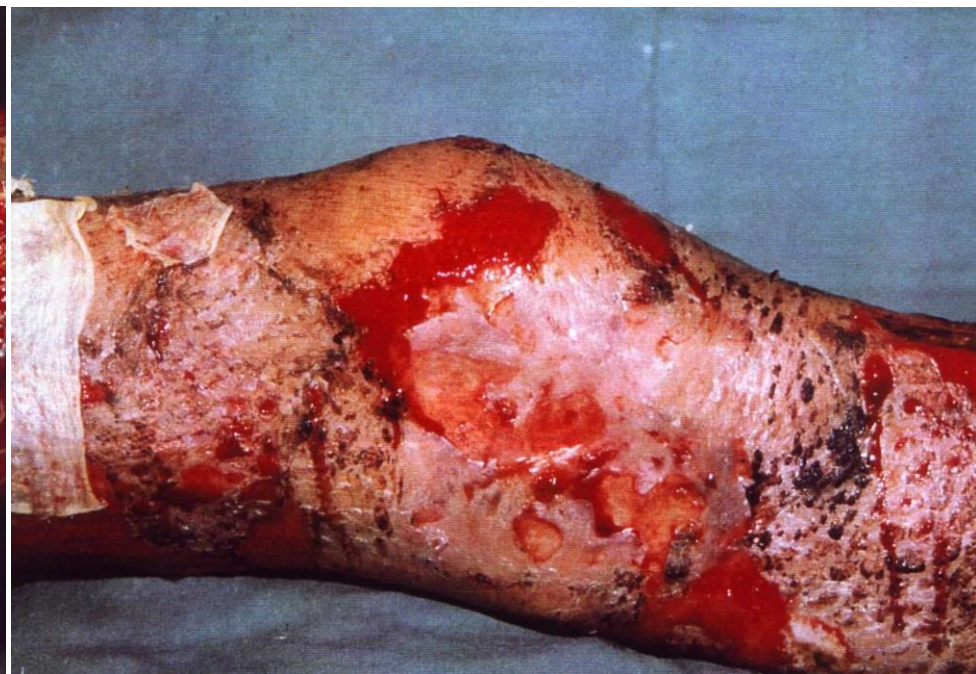
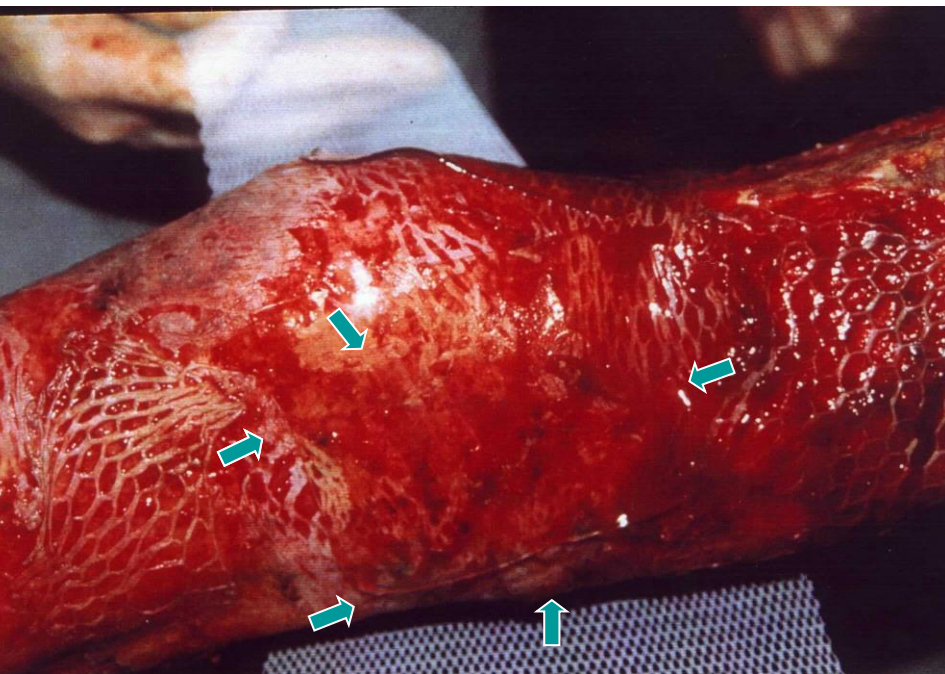
Krok 1 – vytvořit podmínky pro adhezi a proliferaci buněk na povrchu hydrogelu

Krok 2 – Keratinocyty na nosiči - „up side down“ aplikace

in vitro model aplikace



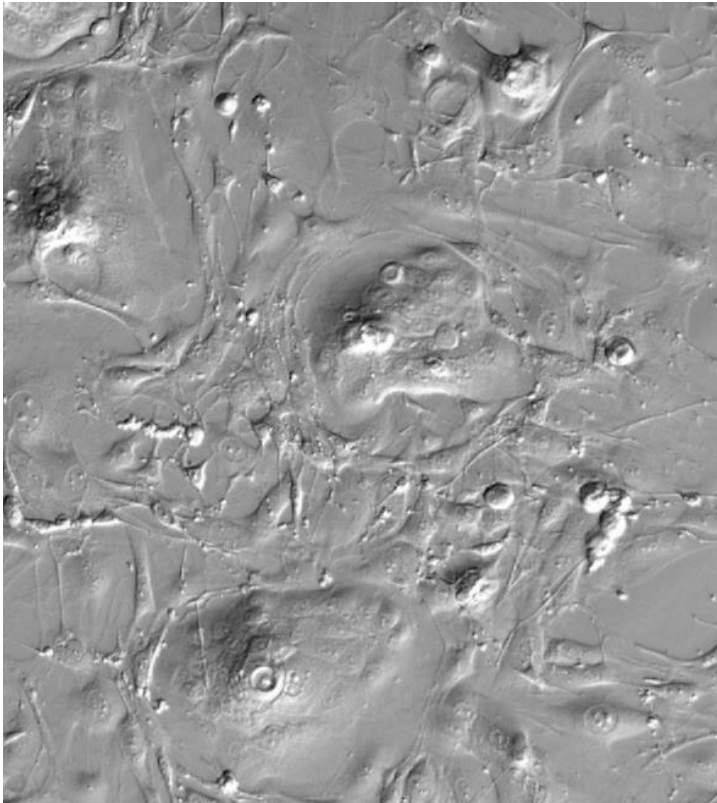




Krok 3 – vyloučení podpůrných buněk z kultivačního systému

Podpůrné buňky hrají důležitou roli v kultivaci keratinocytů

- podporují adhezi keratinocytů na kultivační povrch
- produkcí různých růstových faktorů a cytokinů stimulují růst keratinocytů

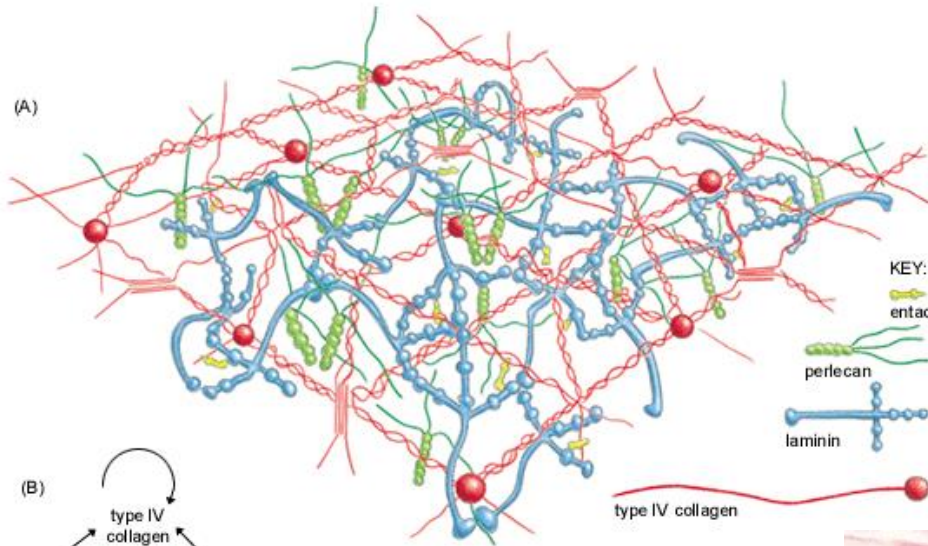


Keratinocyty na feedru

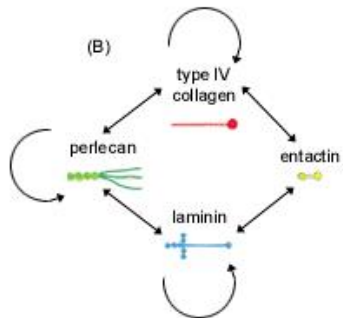


Keratinocyty bez podpůrných buněk

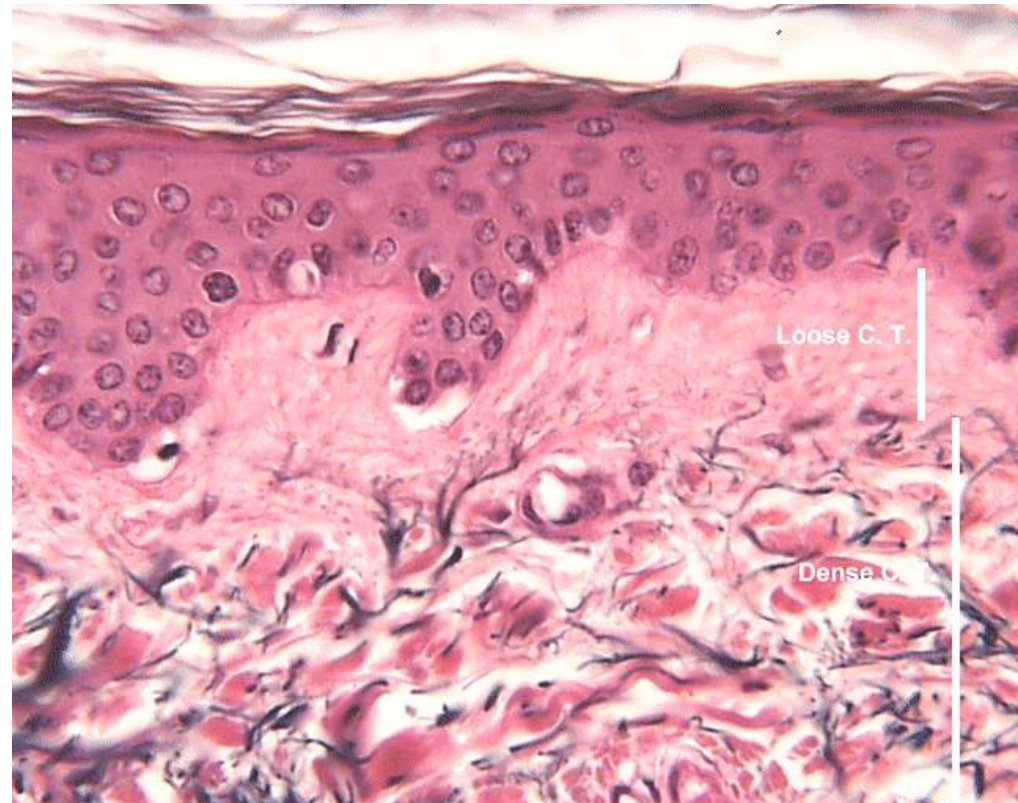
Bazální lamina



Laminin – bohatý na manózu



Alberts: Molecular biology of the cell

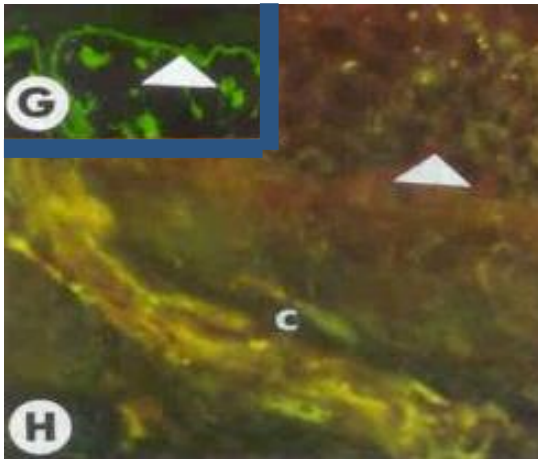


Detekce manóзовých skupin

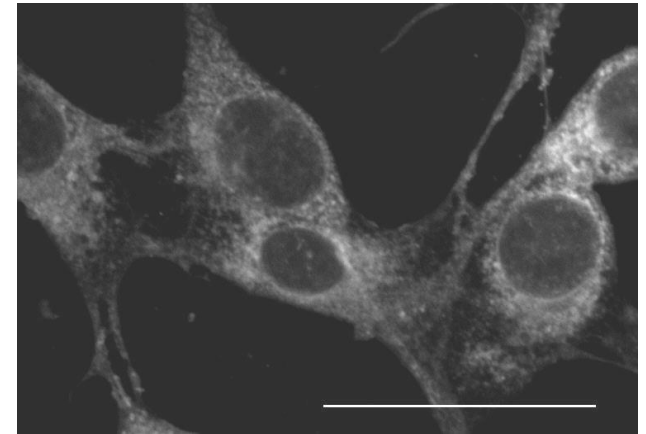
Concanavalin A (*Canavalia ensiformis*)



Svalová vlákna



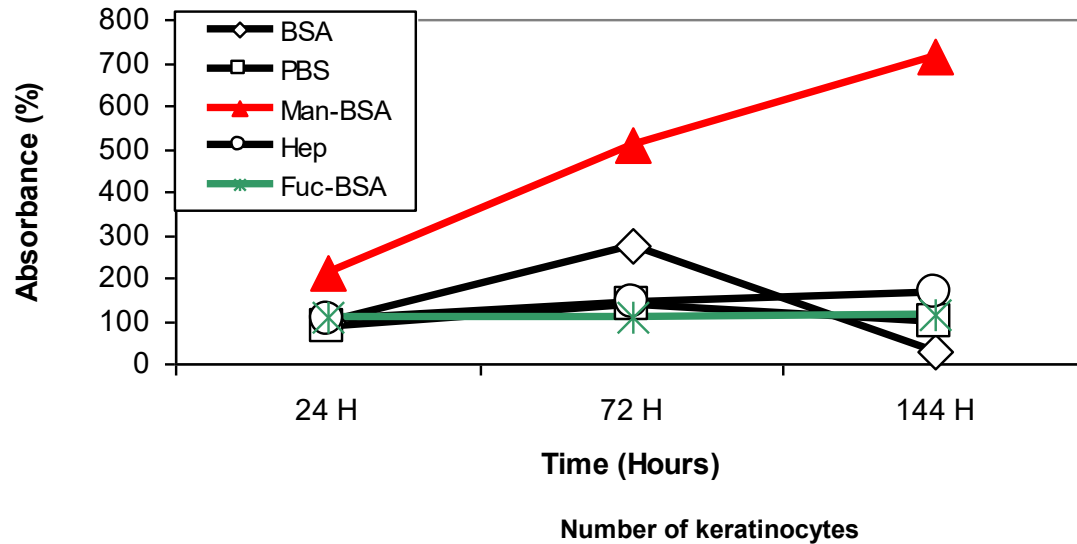
Epidermis



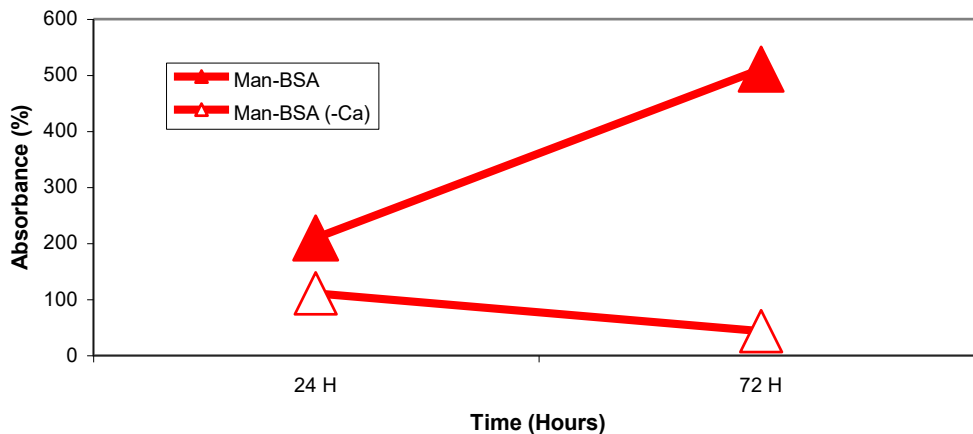
Podpůrné buňky 3T3 fibroblasty

Keratinocyty rozeznávají manóзовé skupiny

Růst keratinocytů na imobilizované manóze

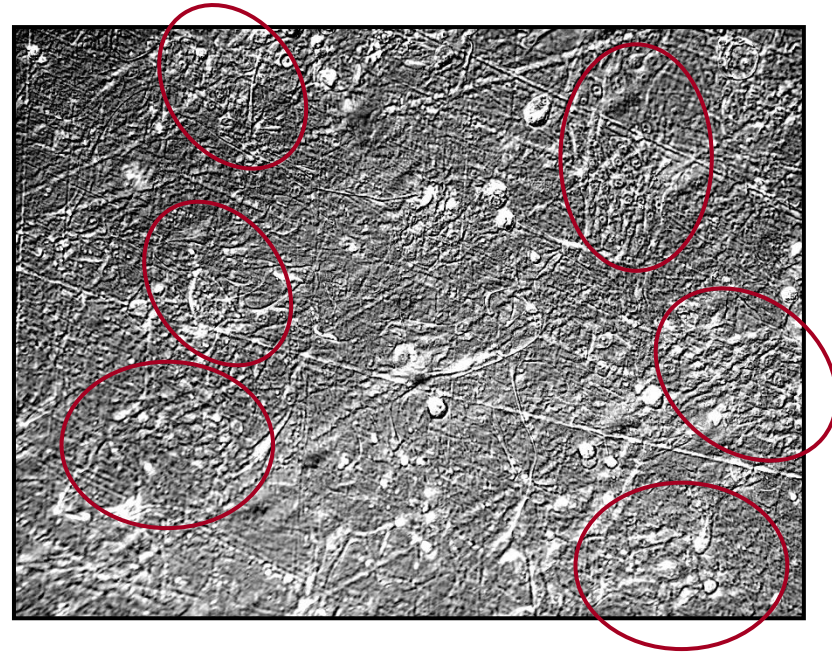
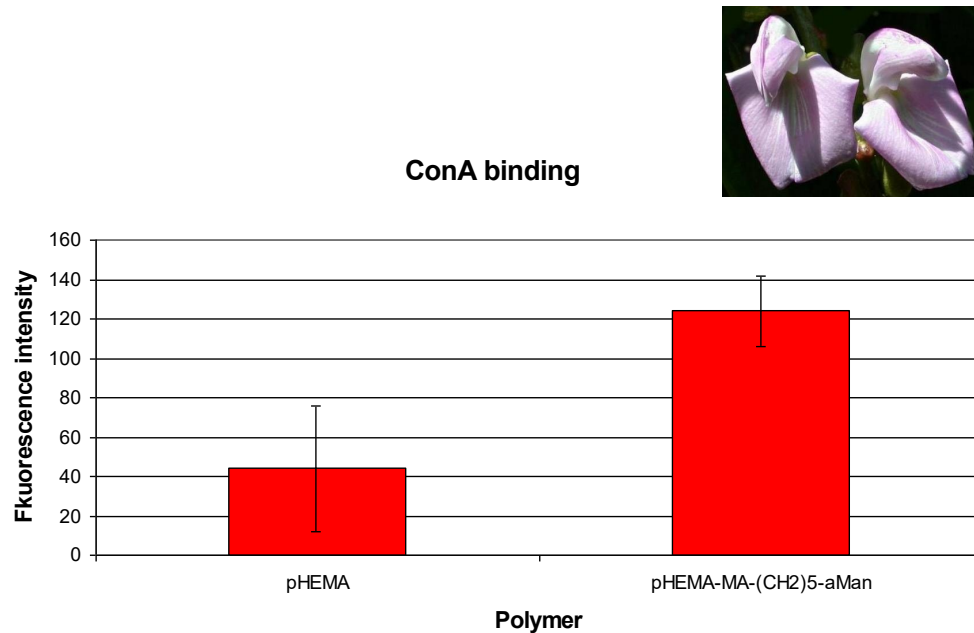


polystyren s
nasorbovaným
neoglykoligandem,
který obsahuje
manóзовé skupiny



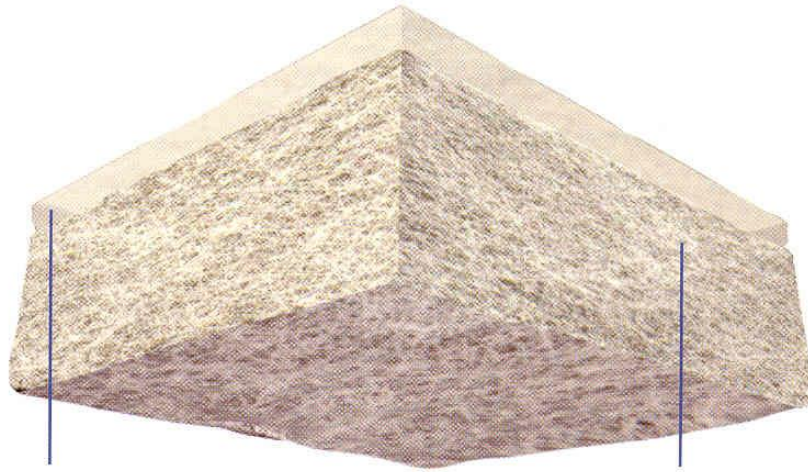
vliv přítomnosti Ca^{2+}
iontů

Polymerní nosič s navázanou manózou



Labský, J., Dvořánková, B., Smetana, K., Jr., Holíková, Z., Brož, L., Gabius, H-J.: Mannosides as crucial part of bioactive supports for cultivation of human epidermal keratinocytes without feeder cells. *Biomaterials*. 24: 863-872, 2003

Integra – náhrada dermis



Silicone layer

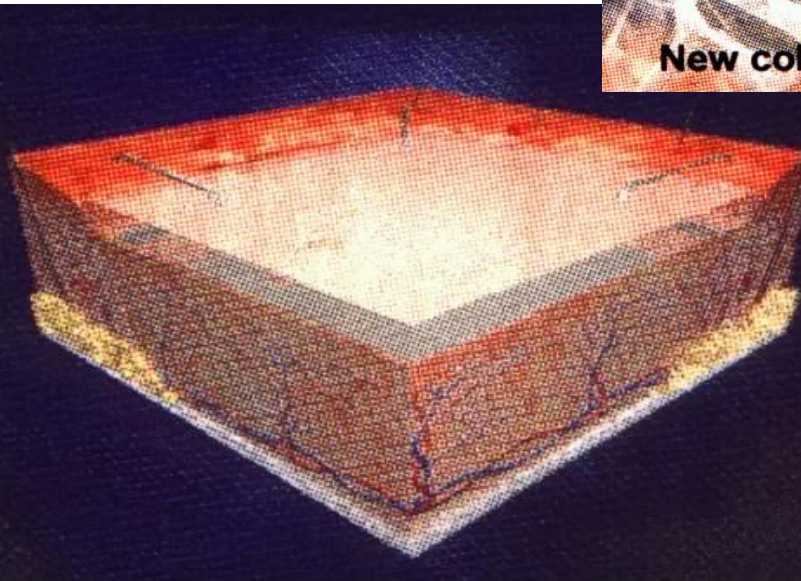
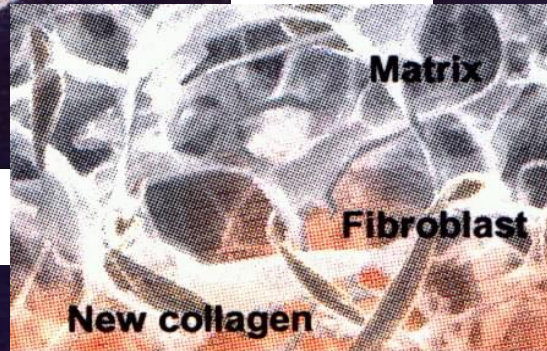
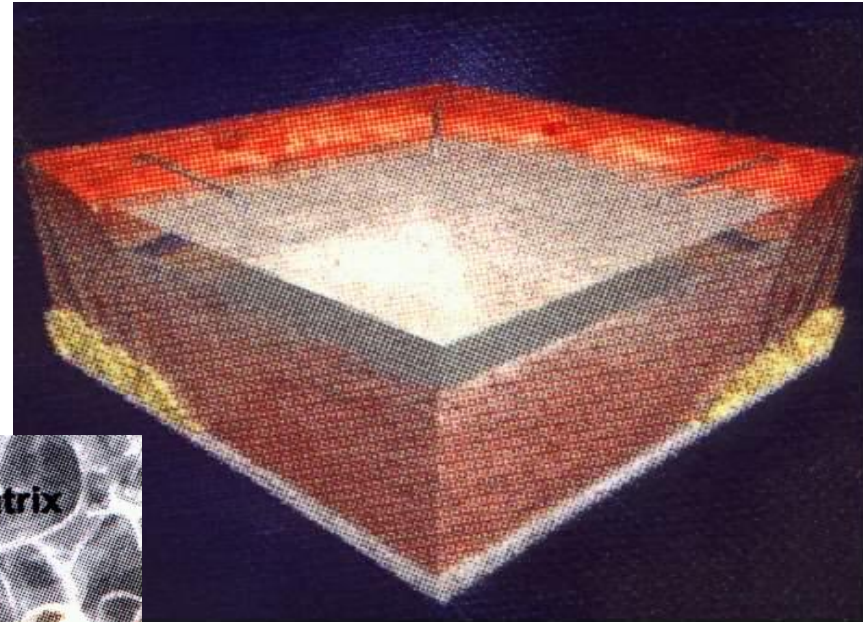
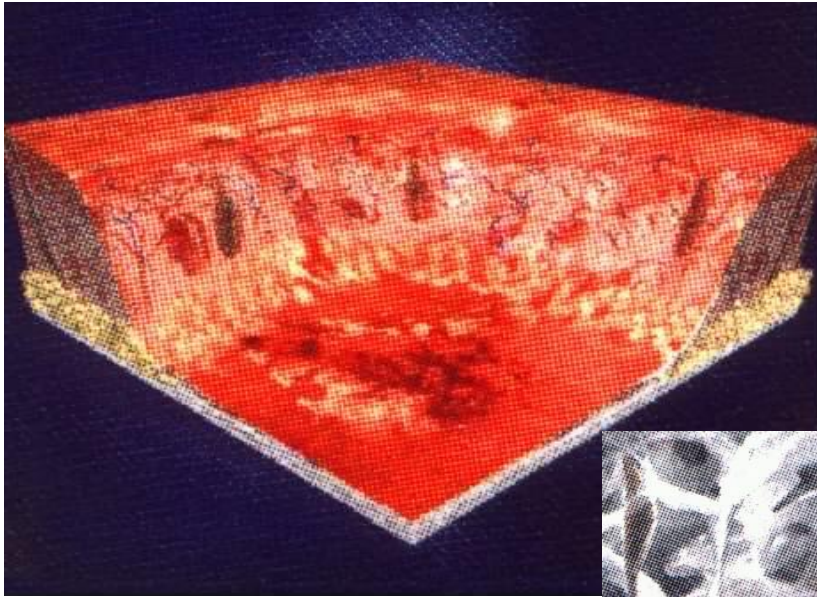
- Enables immediate wound closure
- Controls fluid loss
- Provides mechanical protection
- Provides a bacterial barrier
- Similar water vapour transmission rate as normal skin

3-Dimensional matrix layer

- Cross-linked collagen and glycosaminoglycan
- Functions as an extracellular matrix
- Promotes cellular in-growth and collagen synthesis
- Is biodegraded while being replaced by autologous dermal tissue

- Tento kryt byl vyvinut, aby nahradil dermální struktury při rozsáhlých kožních ztrátách
- Jedná se o telecí kolagen, upravený do 3D sítě tak, aby nebyl imunogenní. Je biodegradabilní (postupně se odbourává) a je rozložen v průběhu 2-3 měsíců
- Povrch této kolagenní sítě je kryt silikonovou fólií, která nahrazuje funkci epidermis
 - Bariéra proti infekci
 - Správná výměna plynů
 - Brání ztrátám tekutin
 - Mechanická ochrana
- Kryt je průhledný, aby bylo možno kontrolovat plochu

Integra - aplikace

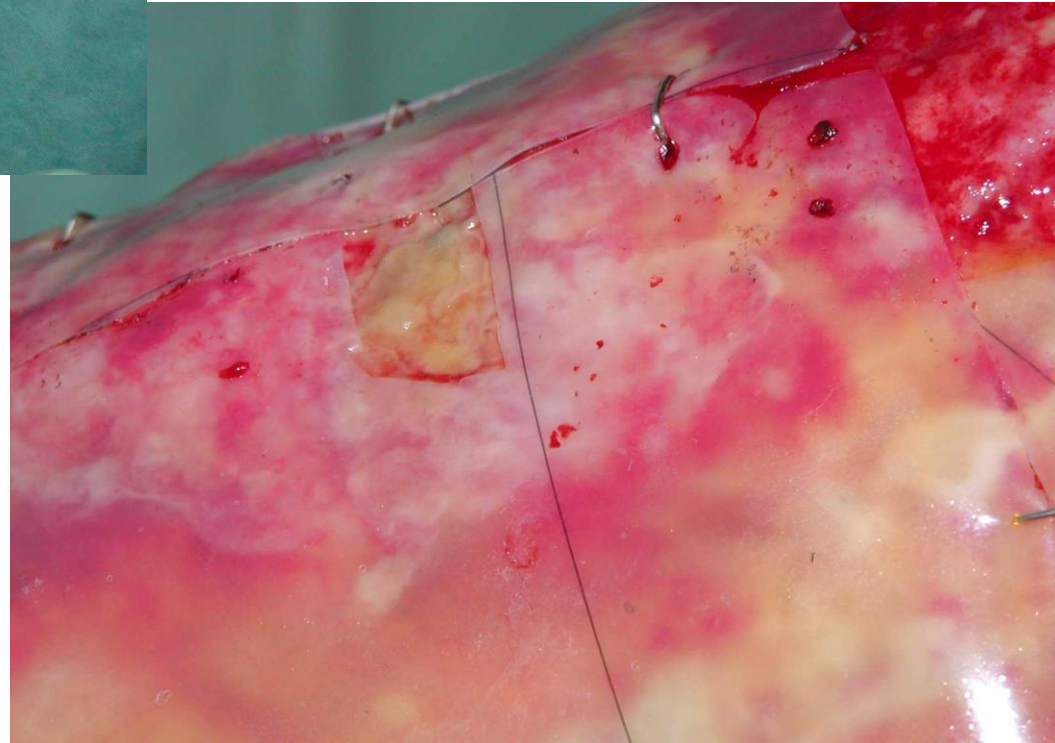


- rychlé překrytí velkých ploch, které může být i dlouhodobé
- nedochází k odhojení tohoto krytu
- získá se čas pro další transplantace, výhodné u rozsáhlých popálenin
- ke konečné transplantaci stačí velmi jemné kožní štěpy 0,1 - 0,2 mm
- velmi dobrý kosmetický a funkční efekt
- Integra“roste“ s pacientem – zhojená kůže je pružnější

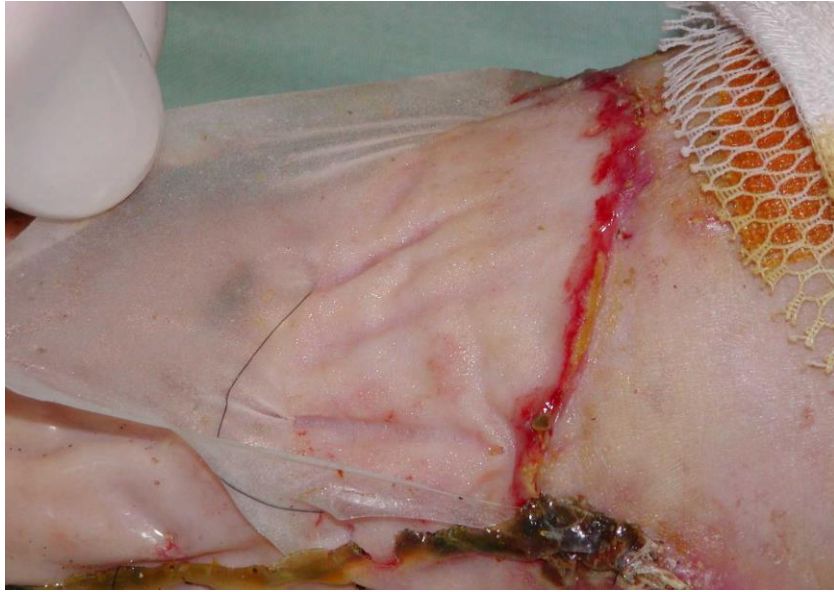
Výhody Integra



Klinická aplikace Integry



Transplantace Integrity



Postup léčby dolních končetin



Výsledek



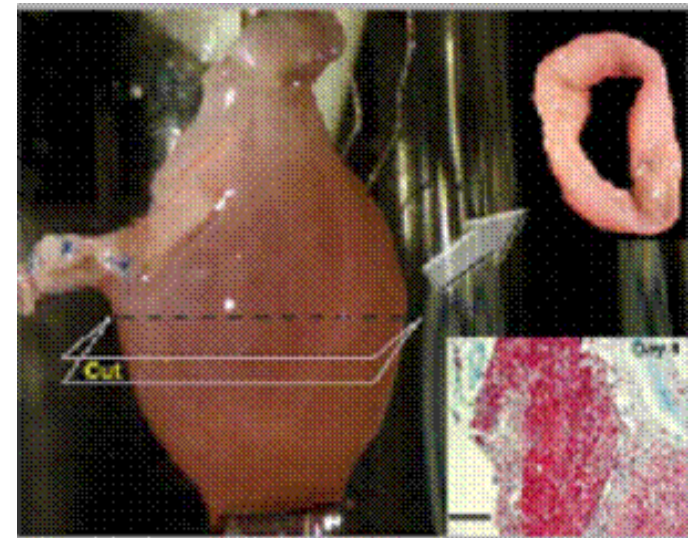
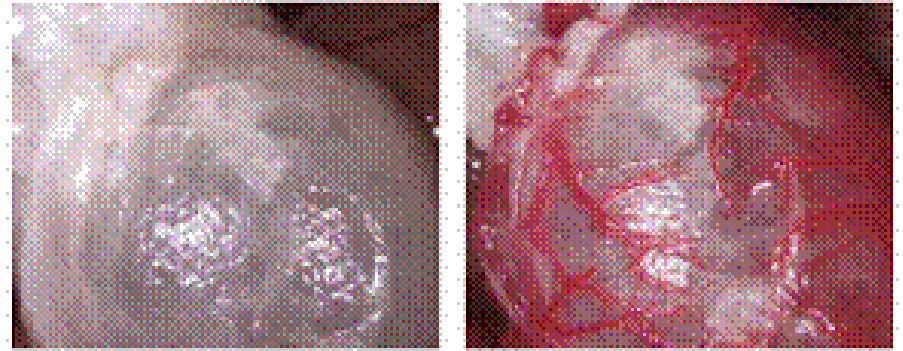
Náhrada chrupavky

- Transplantace kloubní chrupavky autologními chondrocyty + Tissucol – náhrada patelly
 - Contipro-group
- Chondrocyty + zvlákněné lešení z nanovláken
- Směs chondrocytů + kapalné ECM – tisk na 3D biotiskárně



Regenerace srdeční tkáně

- Použití izolovaných mezenchymových kmenových buněk pro léčbu infarktu myokardu
- Vytvoření náhrady srdce

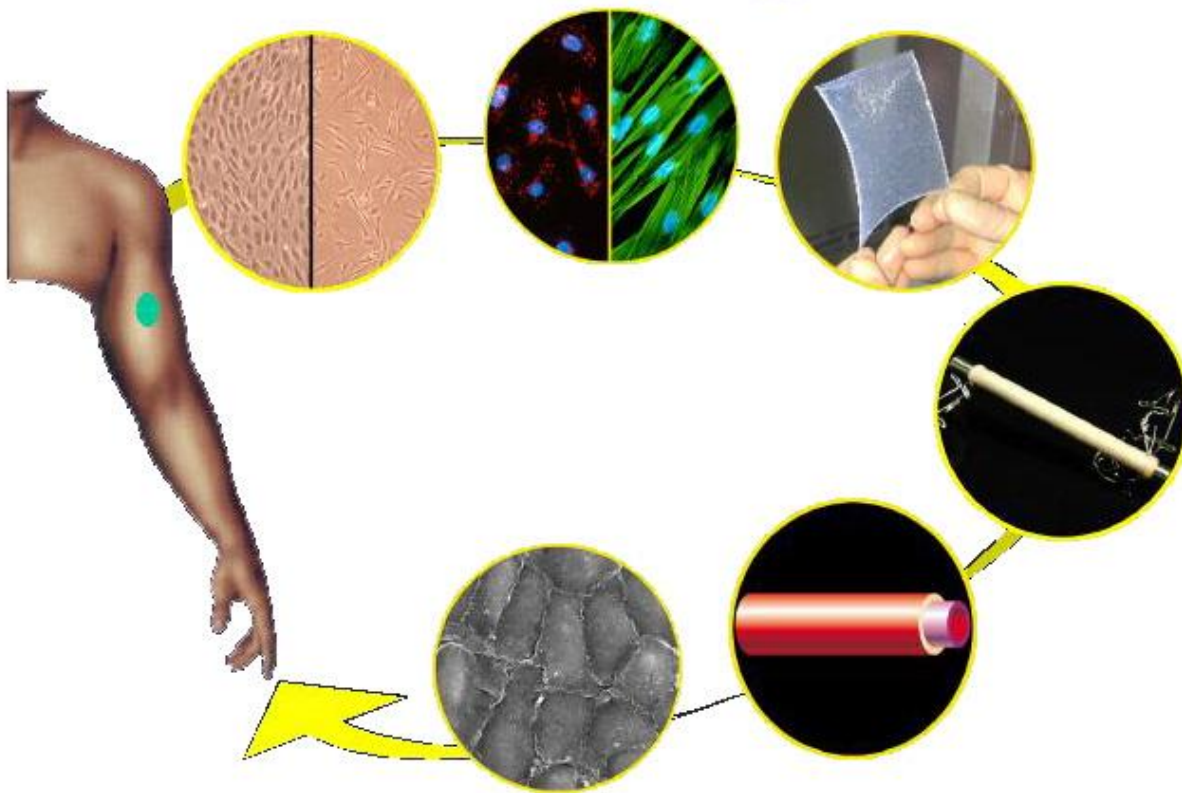


Regenerace nervového systému

- implantace vhodných buněk a biokompatibilních hydrogelů do mozku a míchy
- transplantace kmenových buněk do nervové tkáně
- přemostění míšního poranění

Vývoj

- „živá“ céva - „hadičky“ z biodegradabilních polymerů, zvenčí buňky hladké svaloviny a zevnitř buňky cévní výstelky - endotelie.
- Polymery sloužily jako dočasná kostra. Zůstala jen čistá „živá hmota“.
- Dosud nedořešeno - hodně křehké a praskají pod tlakem krve



- umělá céva bez polymeru a hladkosvalových buněk
- keratinocyty z lidské kůže; souvislý porost buněk, které vytváří extracelulární matrix
- „srolovaná“ do ruličky vytvoří základ budoucí cévy; vnitřní stranu osadit buňkami endotelu

