

Nanomateriály pro bioaplikace a farmacii

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Fakulta chemické technologie
Ústav inženýrství pevných látek



„nano“ (řecky trpaslík)



VŠCHT PRAHA



Švorčík

8. Biomaterialy a jejich vývoj, charakteristika biomateriálů a jejich klasifikace.
9. Nanobiomateriály - nová generace biomateriálů, vliv „nanorozměru“.
10. Příprava biomateriálů.
11. Degradace biomateriálů a jejich vlastnosti.
12. Kovové a keramické biomateriály.
13. Polymerní a kompozitní biomateriály.
14. Nanobiomateriály pro tkáňové inženýrství.

Záruba

1. Nanočástice ve farmacii - cílený transport léčiv, fyzikálně-chemické charakteristiky.
2. Syntetické biodegradabilní polymerní nanočástice.
3. Nanočástice z přírodních biopolymerů (micely, liposomy, polysacharidy).
4. Nanočástice citlivé na změny teploty a pH.
5. Kvantové tečky - moderní fluorescenční markery.
6. Superparamagnetické nanočástice pro diagnostiku a terapii.
7. Nanotechnologie uhlíku pro transport léčiv (nanotuby, nanodiamanty).

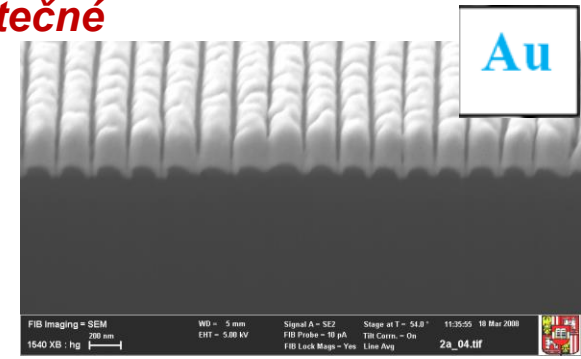
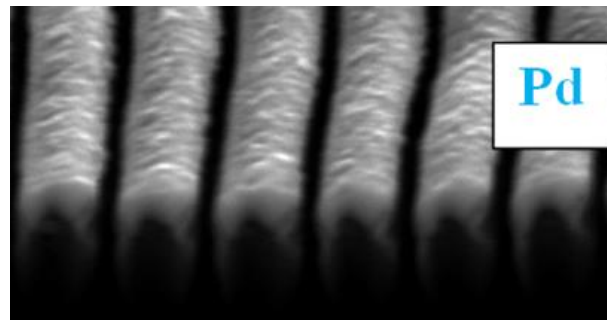


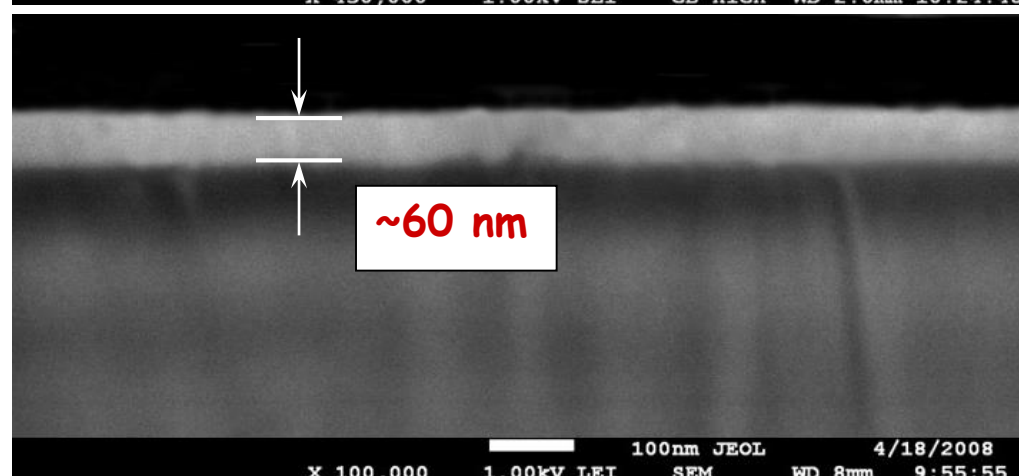
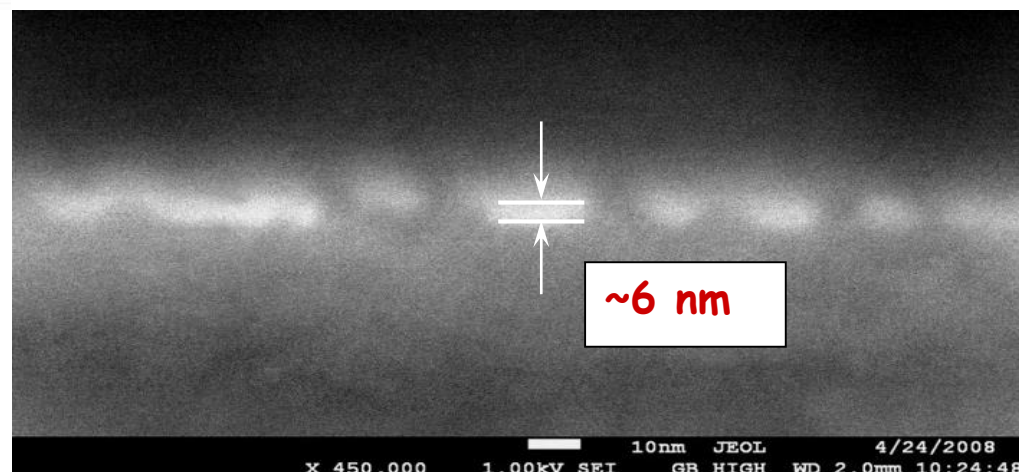
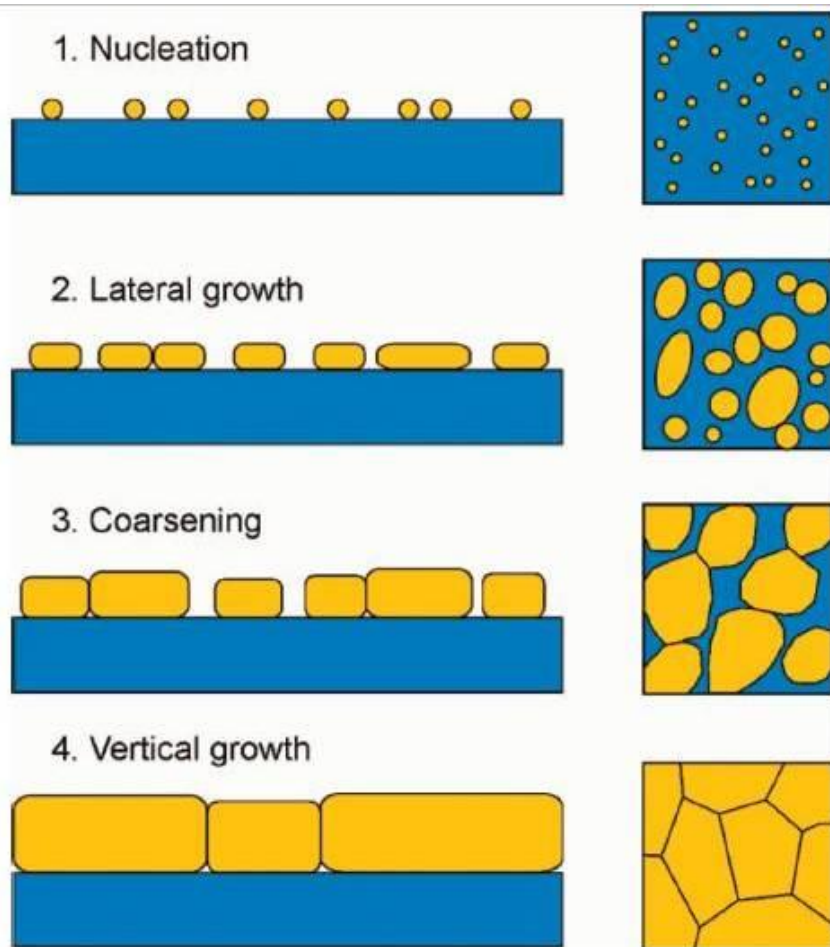
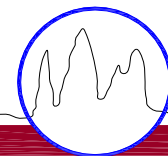
Vrásky jsou všude

Někdy jsou tyto struktury docela "otravné"



V jiných případech, vrásky/spony mohou být atraktivní nebo dokonce užitečné



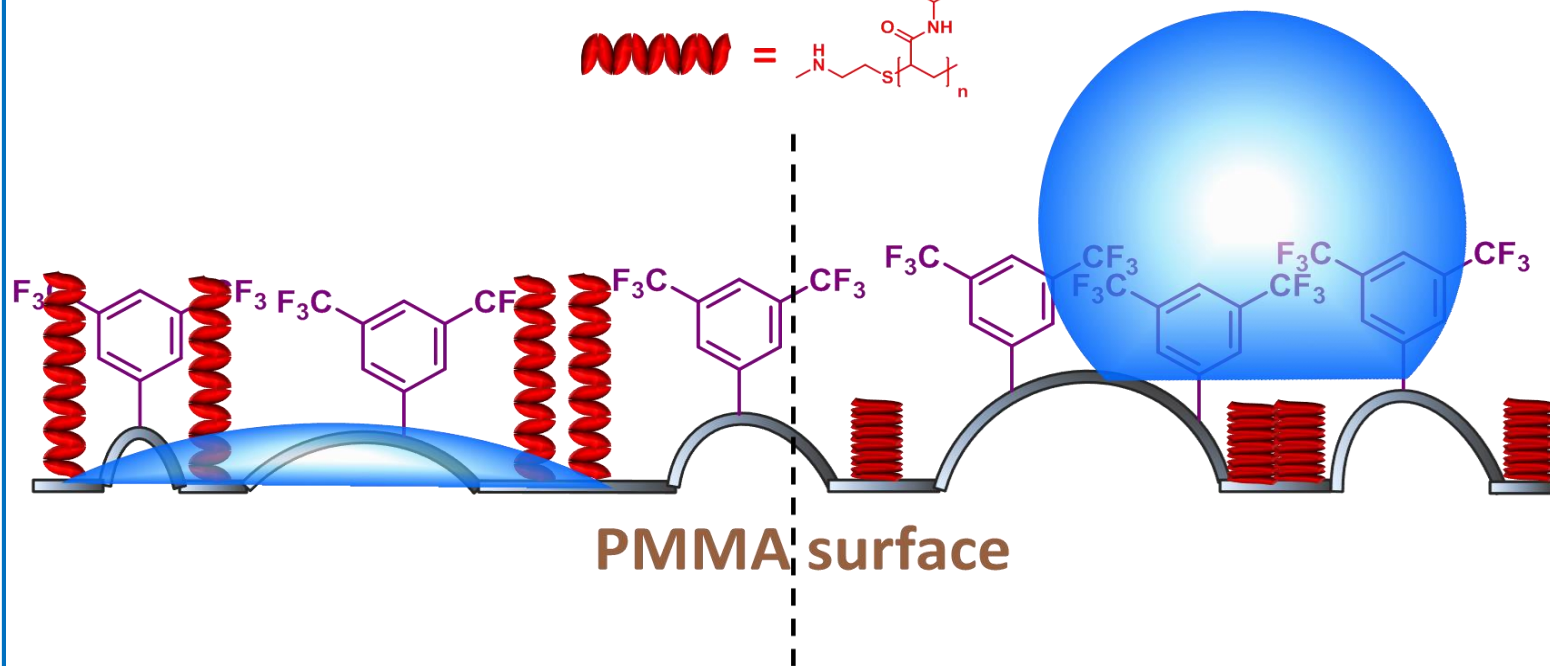
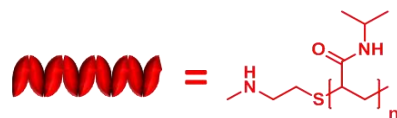


Kaune G. et al.,
Appl.Mater.Interf. 2009, 1, 353.

P.Slepička, Z.Kolská, J. Náhlík,
V.Hnatowicz, V.Švorčík, Surf.
Interf. Anal. 41, 741 (2009)



T>32°C



Hydrofilní povrch

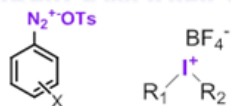
Hydrofóbní povrch

Micro-nano
structuring



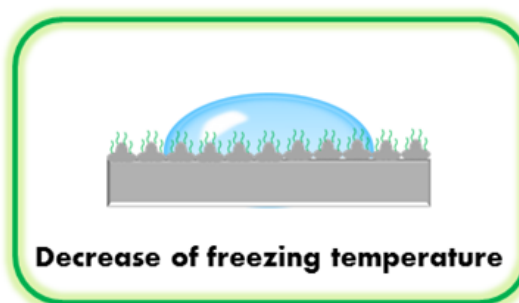
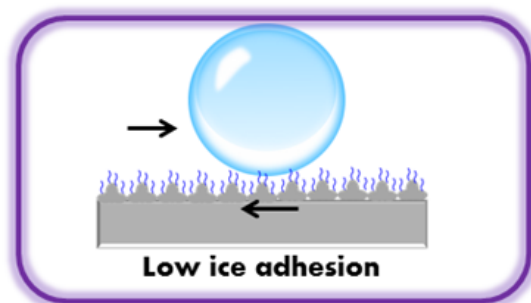
SURFACE MODIFICATION

A



Diazonium or iodonium salts

B

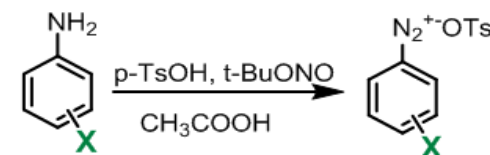


ICEPHOBIC SURFACE

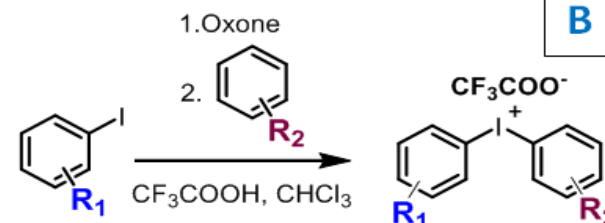


Pristine.mp4

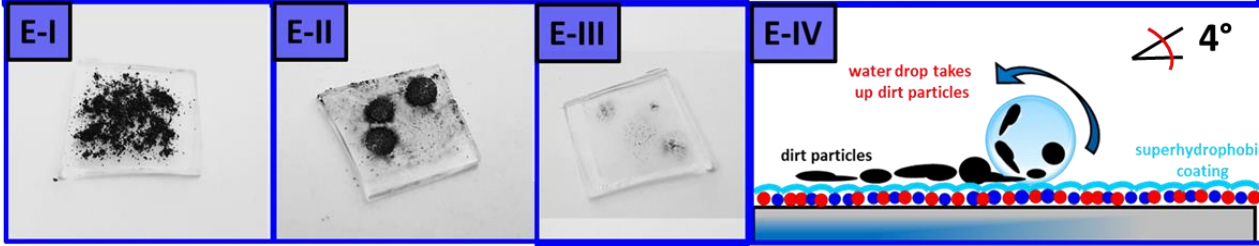
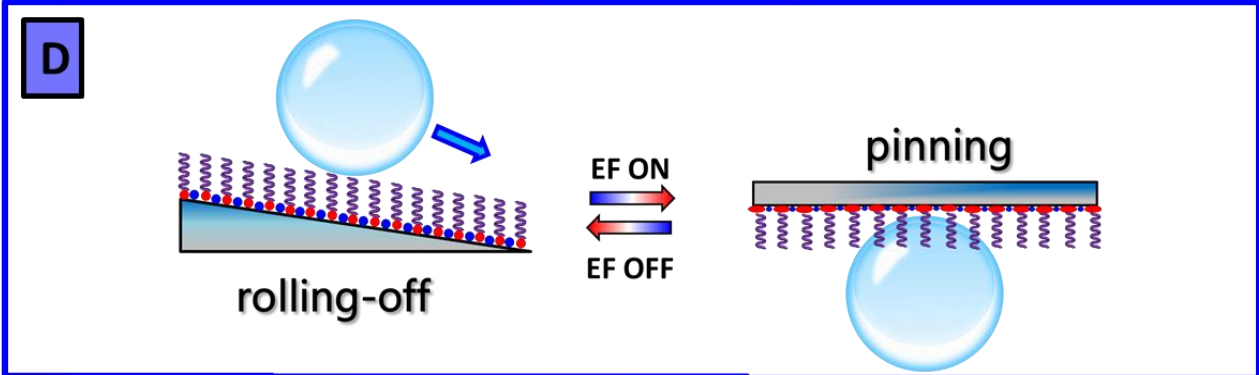
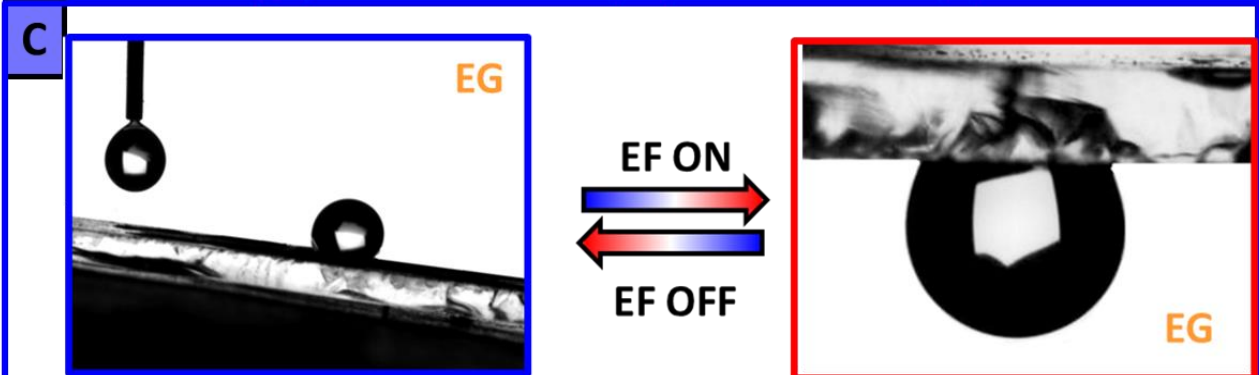
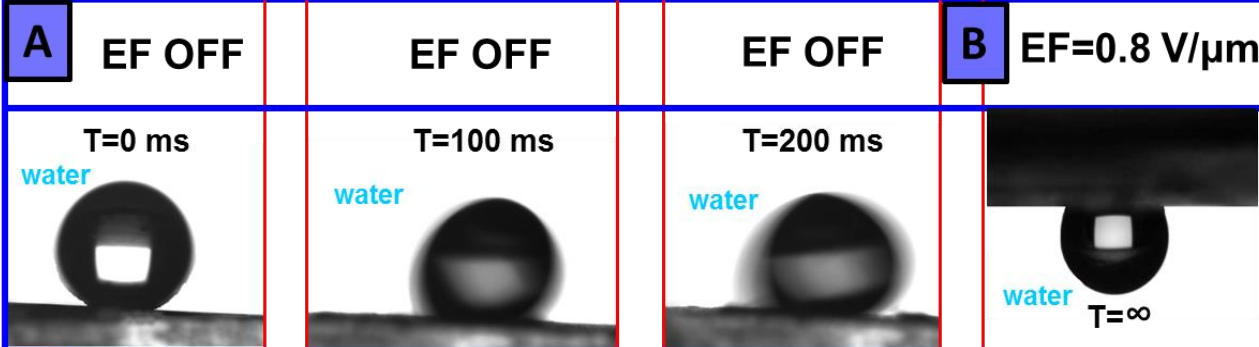
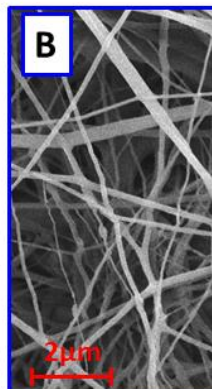
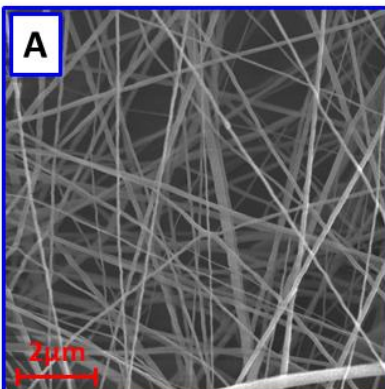
H. Idriss, O. Guselnikova, P. Postnikov, Z. Kolska, P. Haušild, J. Čech, O. Lyutakov, V. Švorčík, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2**, 977-986 (2020)



A

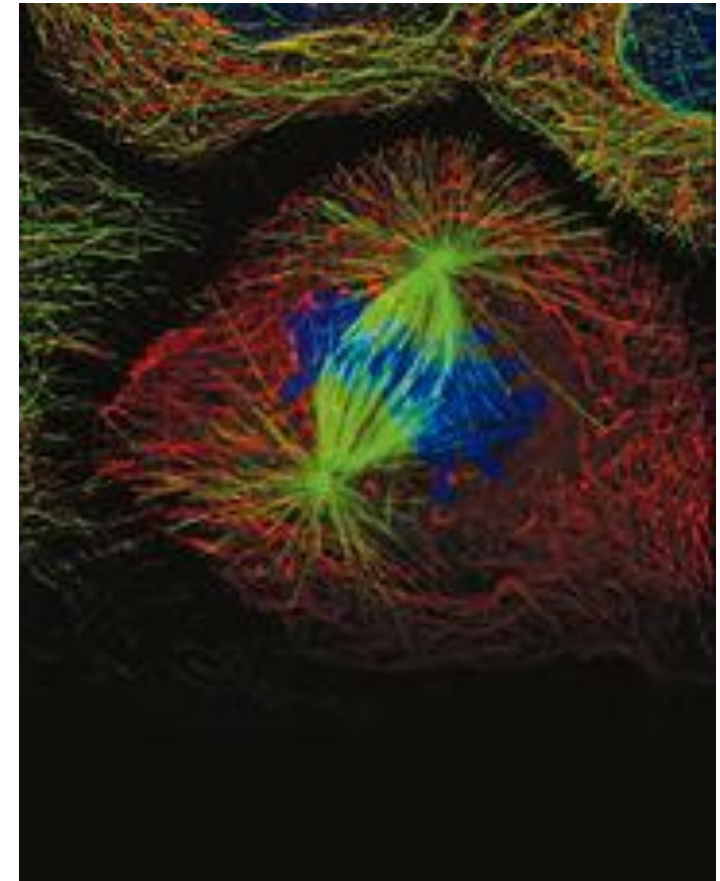
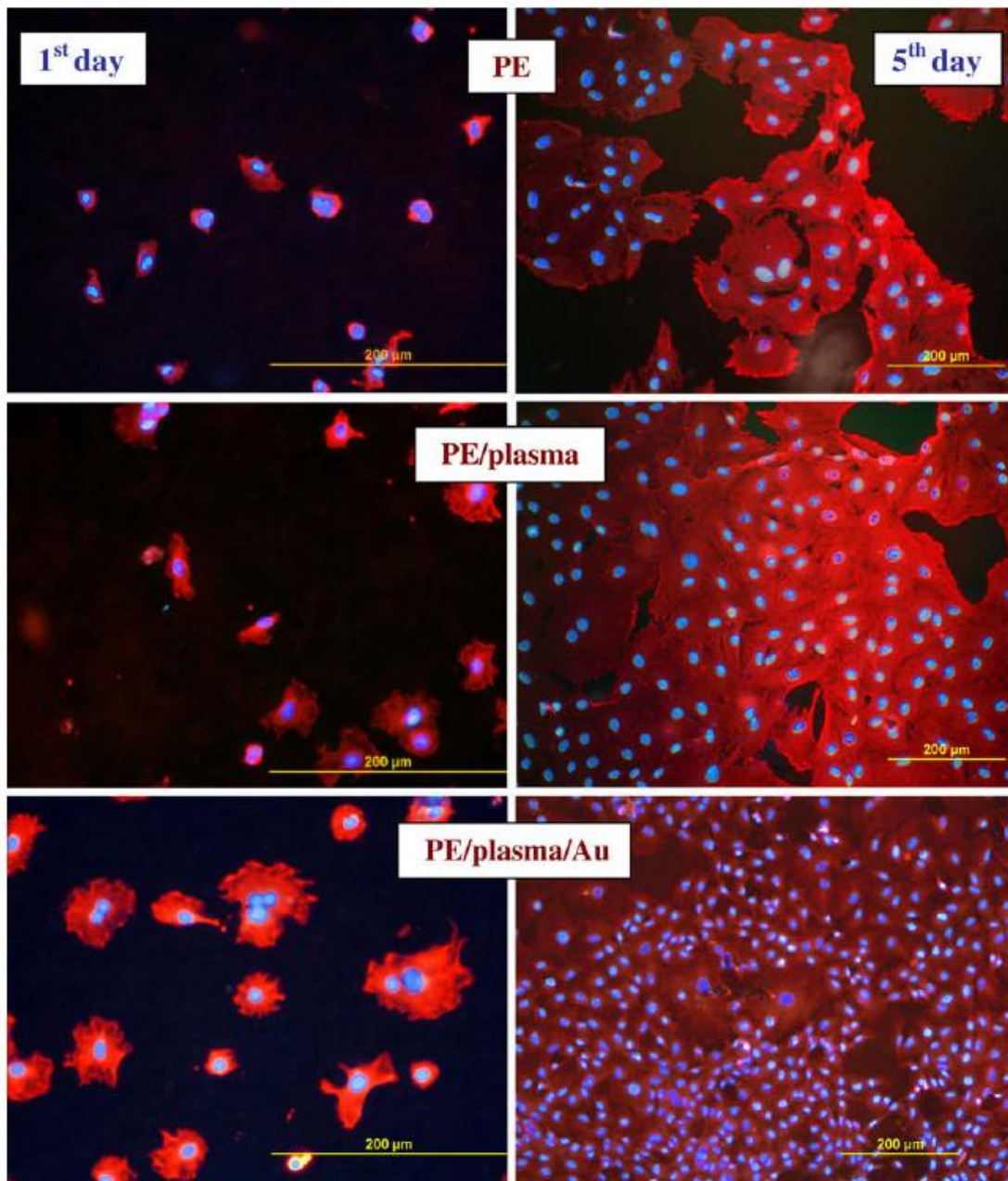


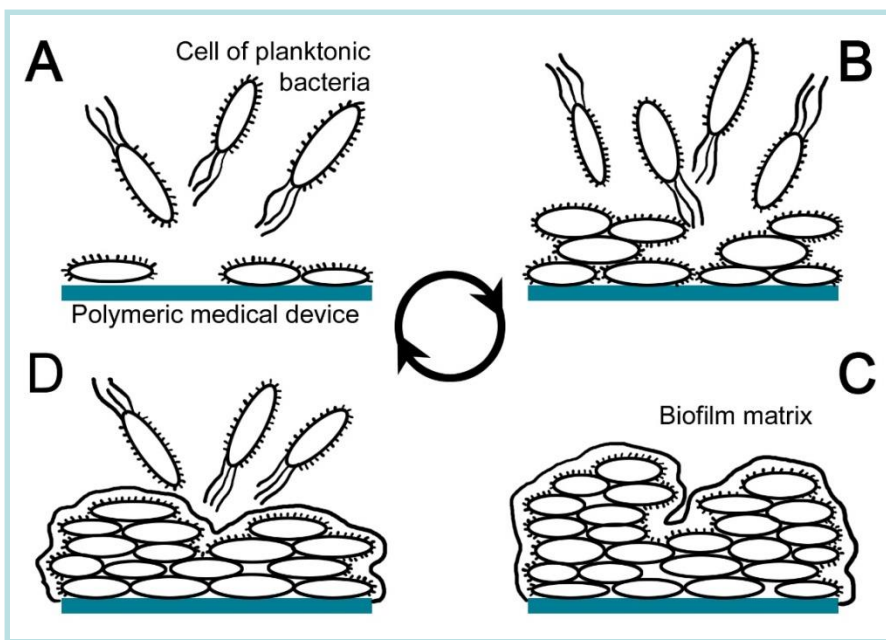
B



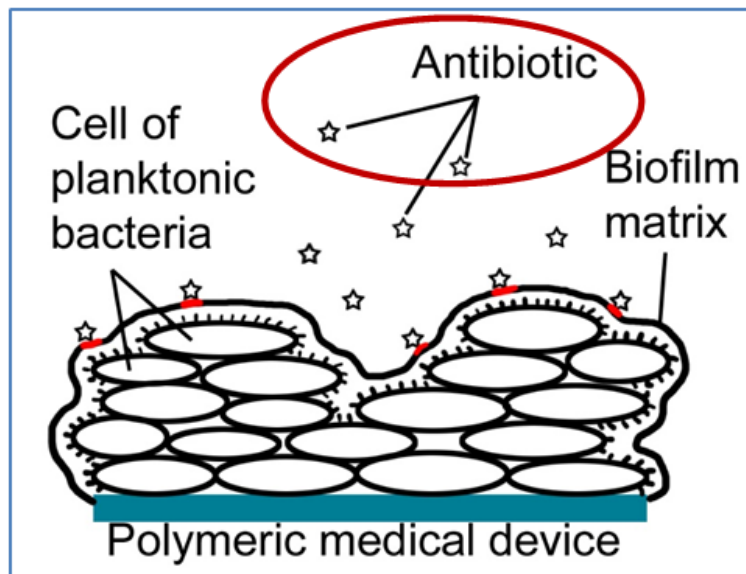
O.Guselnikova, R.Elashnikov,
P.Postnikov, V.Svorcik,
O.Lyutakov, ACS Appl. Mater.
Interf. 1801042, 1-8 (2018).

cytokompatibilita

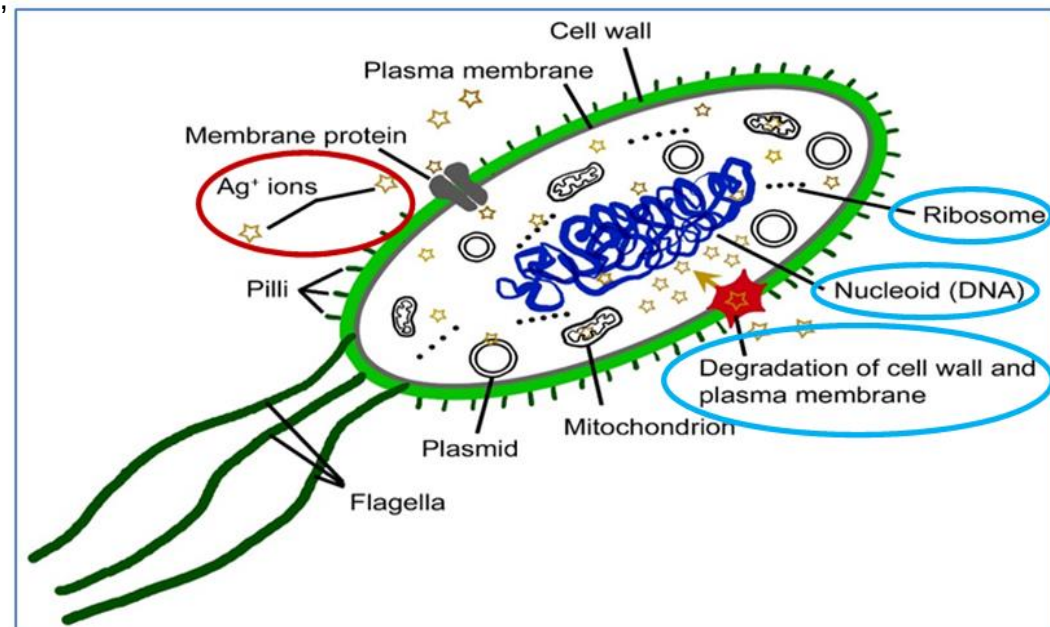




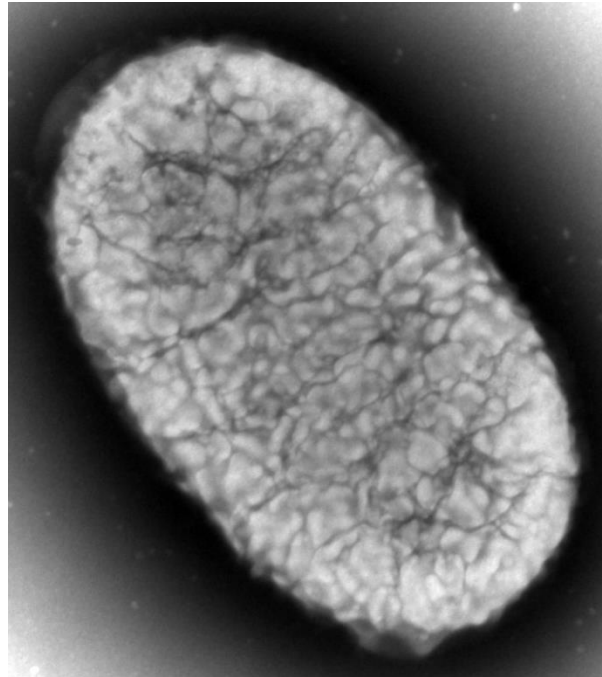
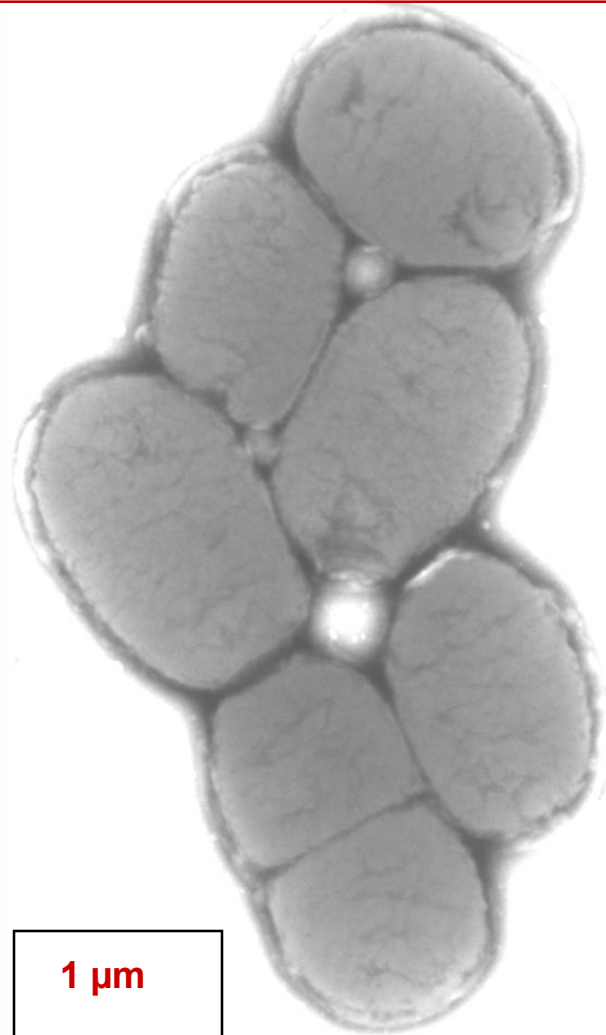
Phases of biofilm formation: A) attachment, B) expansion, C) maturation and D) dispersion



Bacterial resistance of biofilm

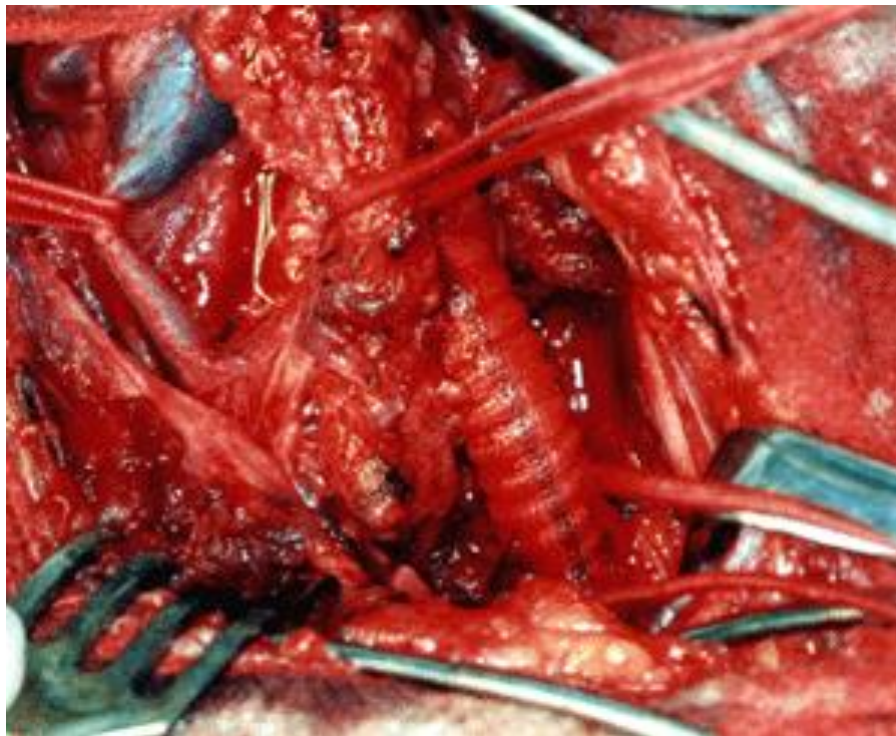
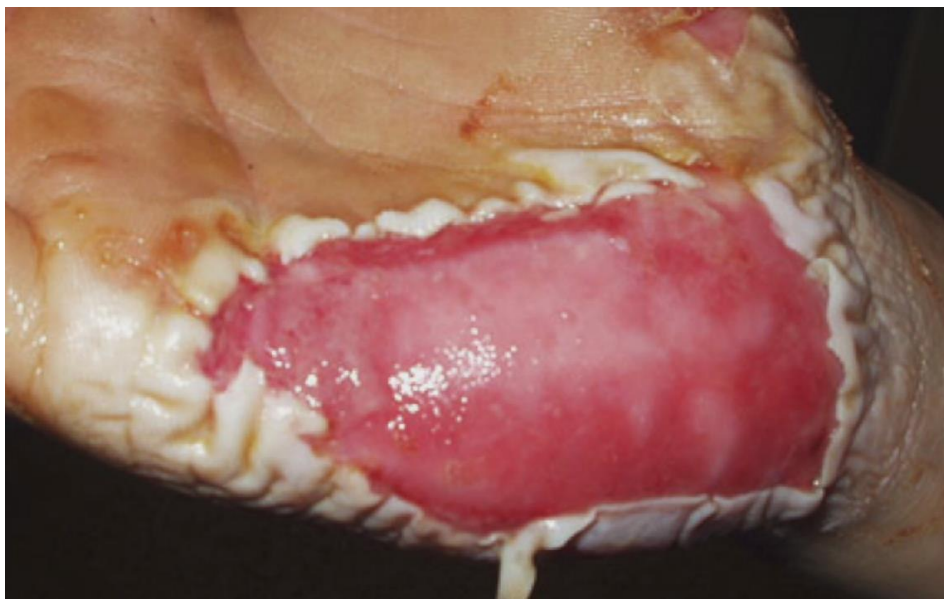


Multifaceted mechanisms of antibacterial action of silver ions.



P.Slepička, J.Siegel,
O.Lyutakov, N.Slepičková
Kasálková, Z.Kolská, L.Bačáková,
V.Švorčík, Biotechnol. Adv. 36,
839–855 (2018).





Chronické rány (nehojí se >6 týdnů)

bércový vřed žilního původu



bércový vřed tepenného původu



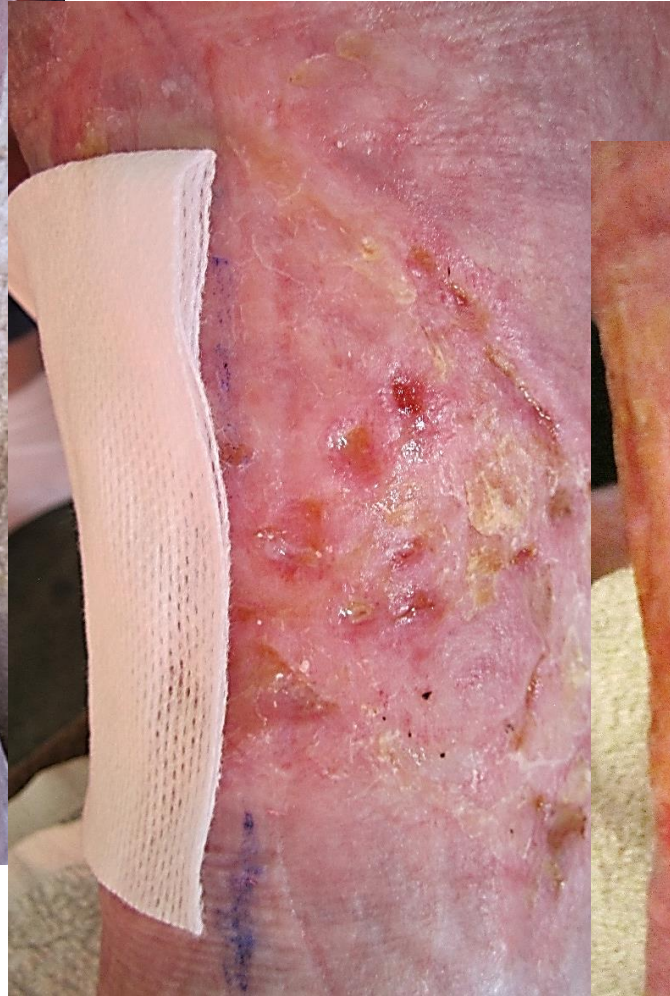
27.1.2016

AgNPs

V.Švorčík, vaclav.svorcik@vscht.cz

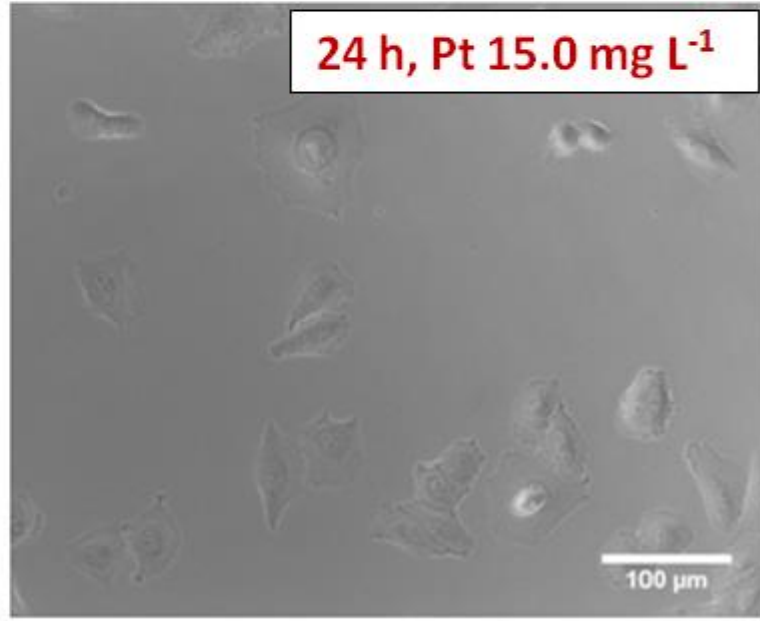
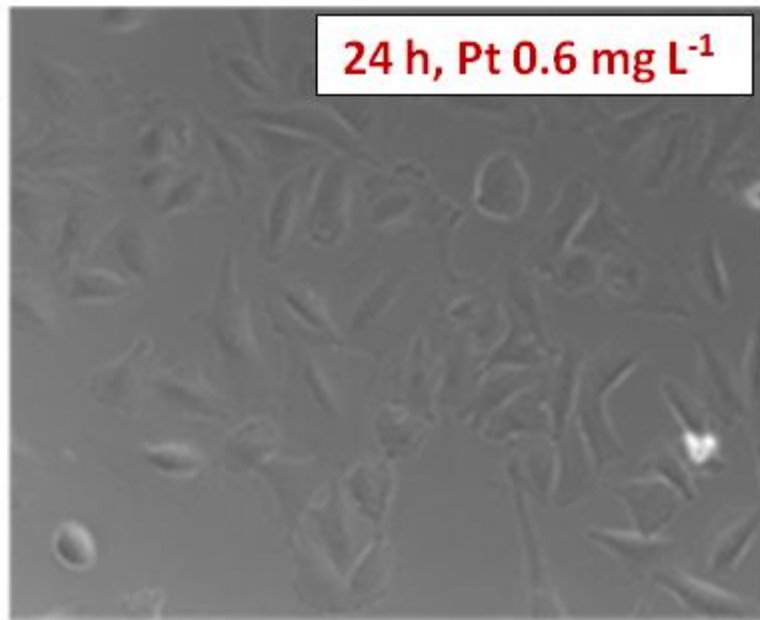
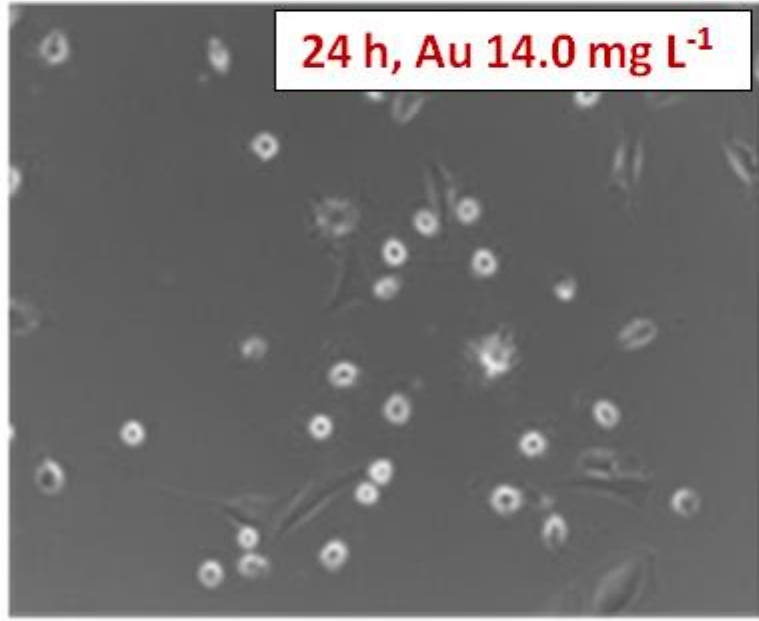
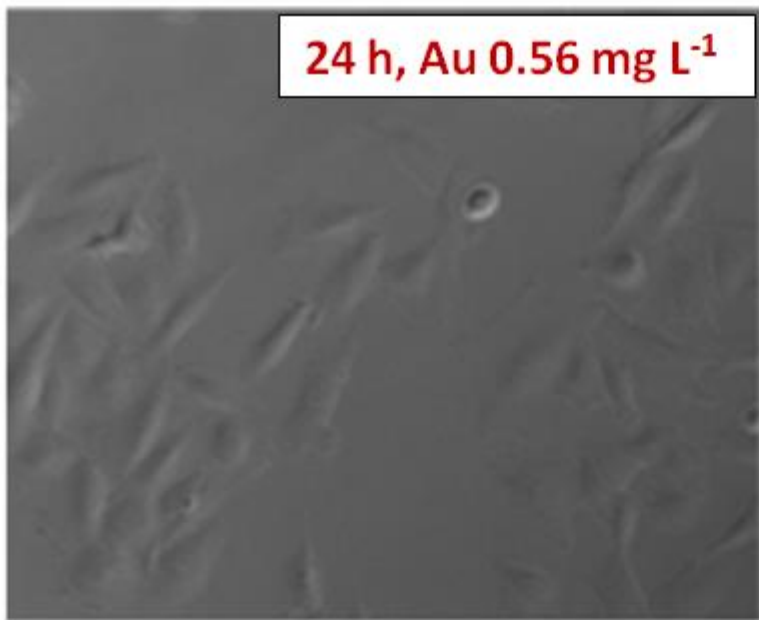
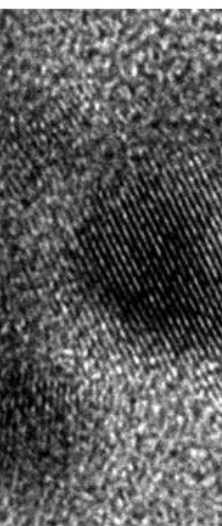
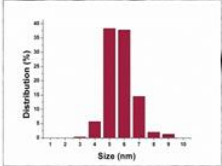
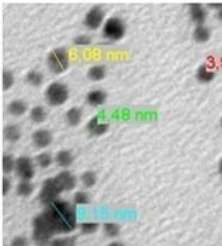
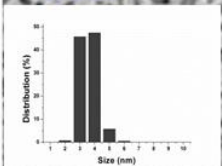
1.2.2016

5.2.2016



viditelné zlepšení

rány nejsou povleklé, některé se zmenšují, zacelují



— CTRL
— cytotoxic

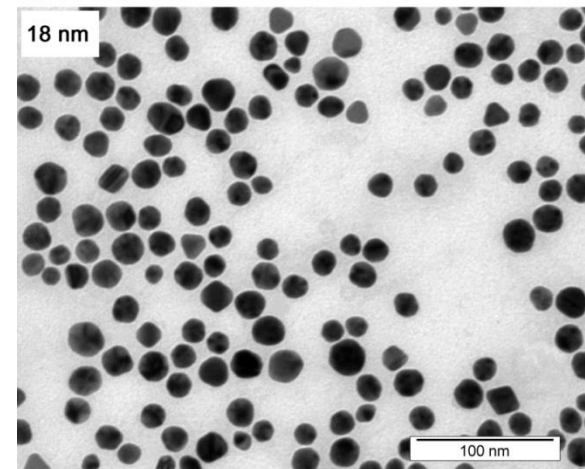
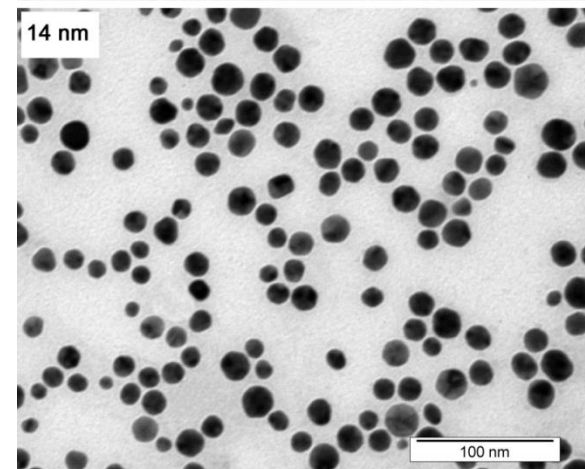
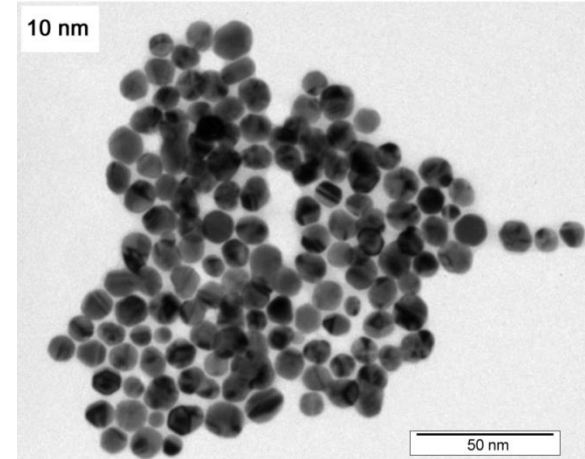
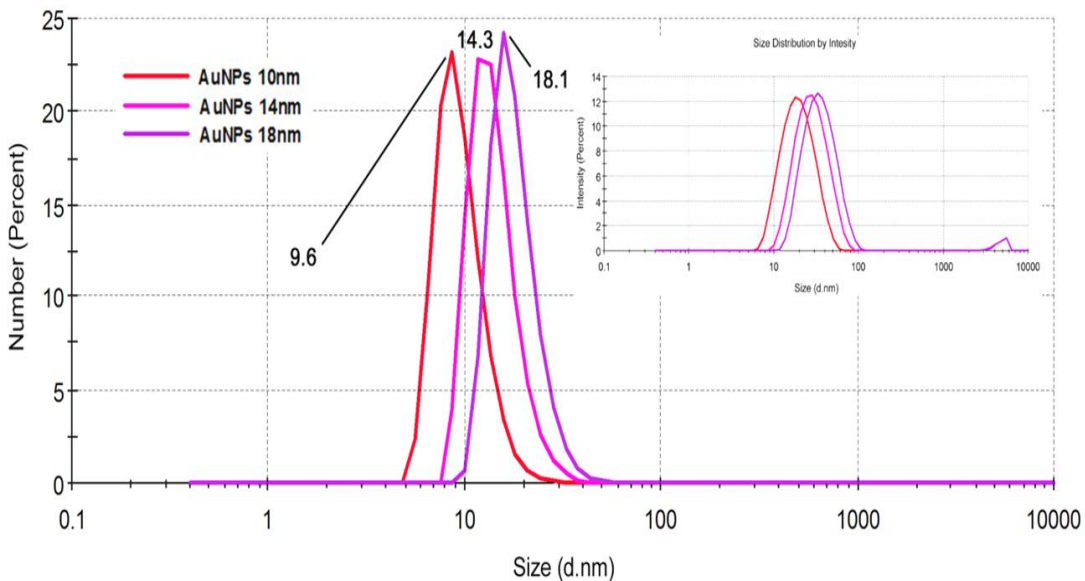
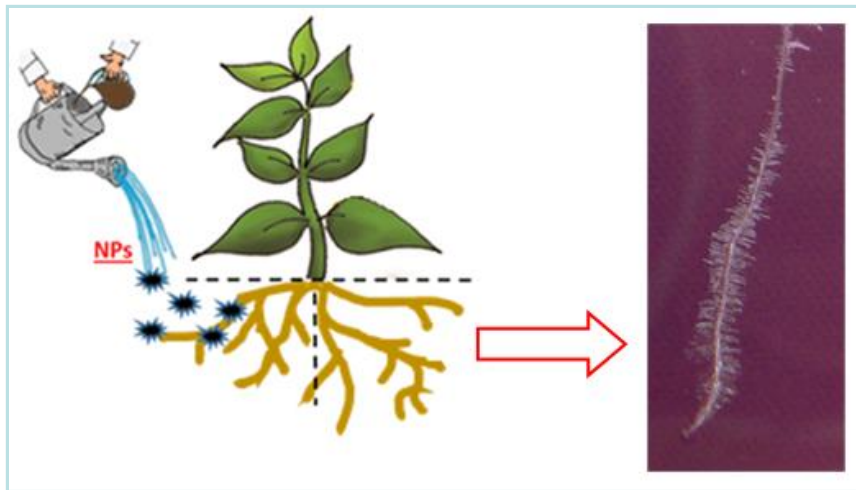


vička,
8)

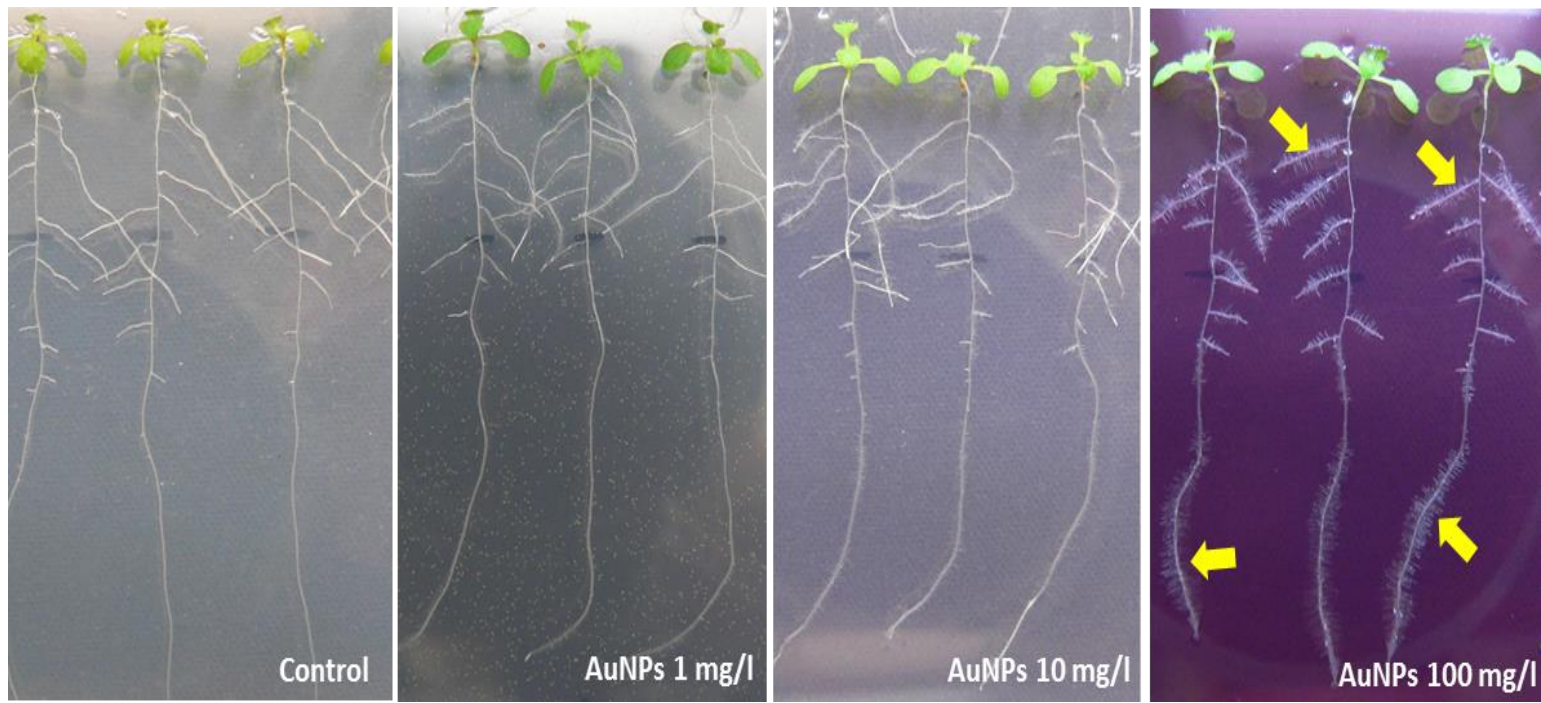
AuNPs vs. řepka

délka kořene vs. velikost NPs

tvar kořene vs. koncentrace



J.Siegel, K.Záruba, J.Martinec, L.Burkertová,
V.Svorcik, Nanoscale Res. Lett. 13, 95, 1-7 (2018).



**Au nanočástice
vs. řepka**



**Au nanočástice
vs. tabák**

**10 nm vs. 0-4
týdny**

Self-skládací film - jak ho udělat levně???

(i)



(ii)



(iii)

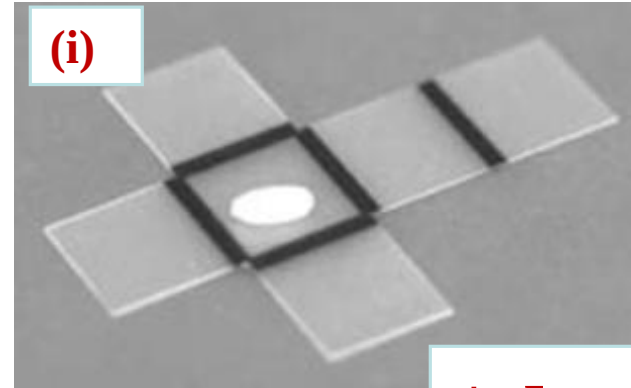


(iv)



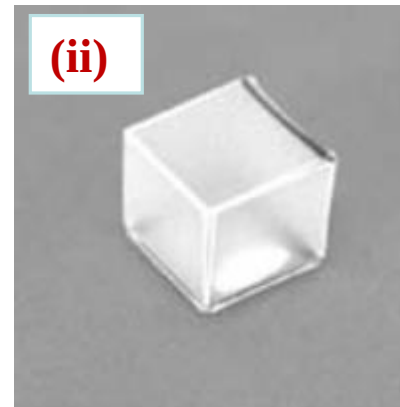
aktuátor

(i)



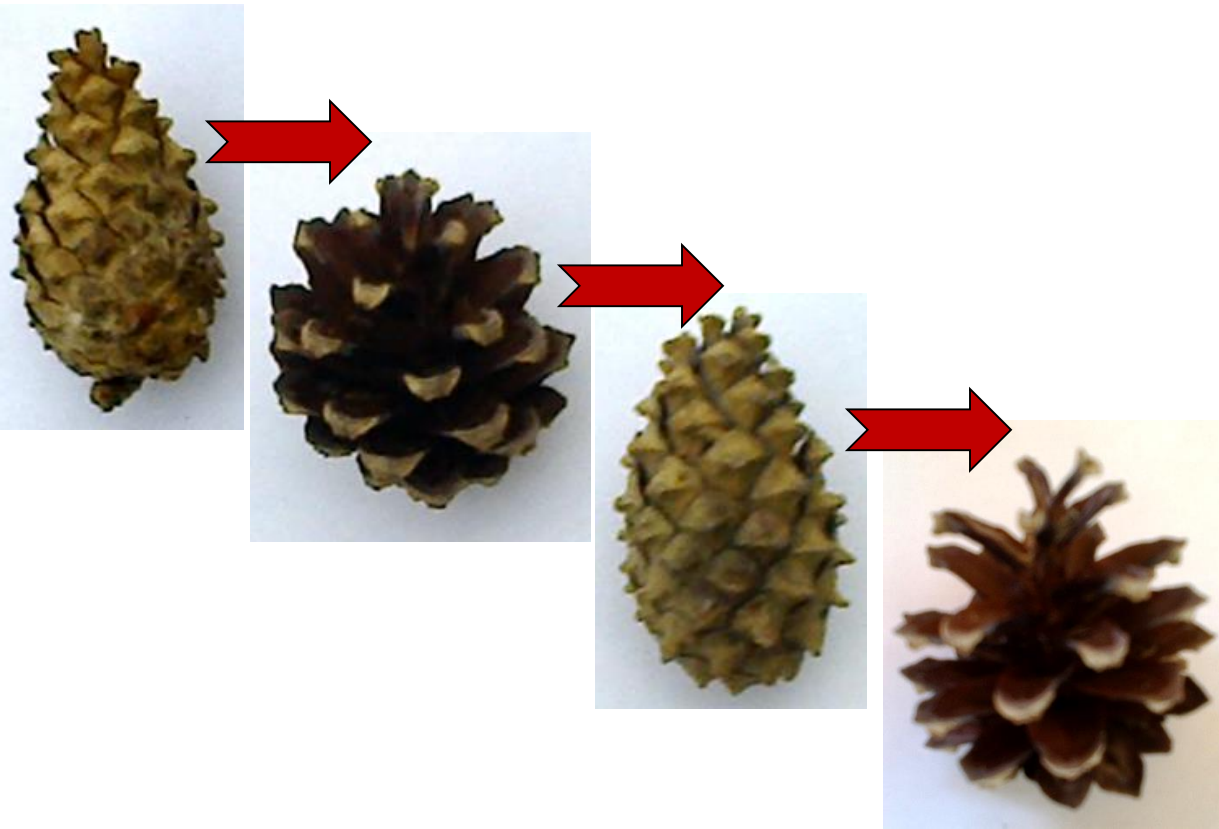
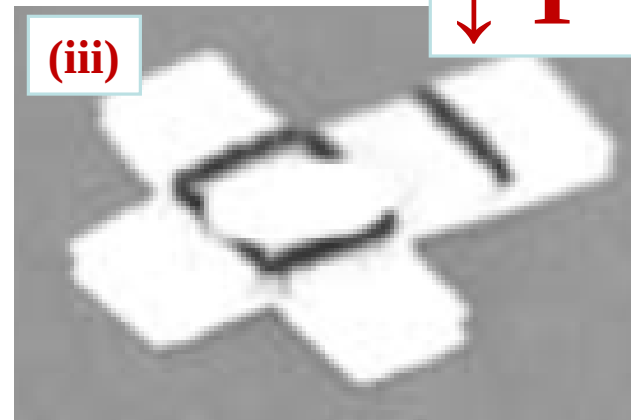
$\downarrow h\nu$

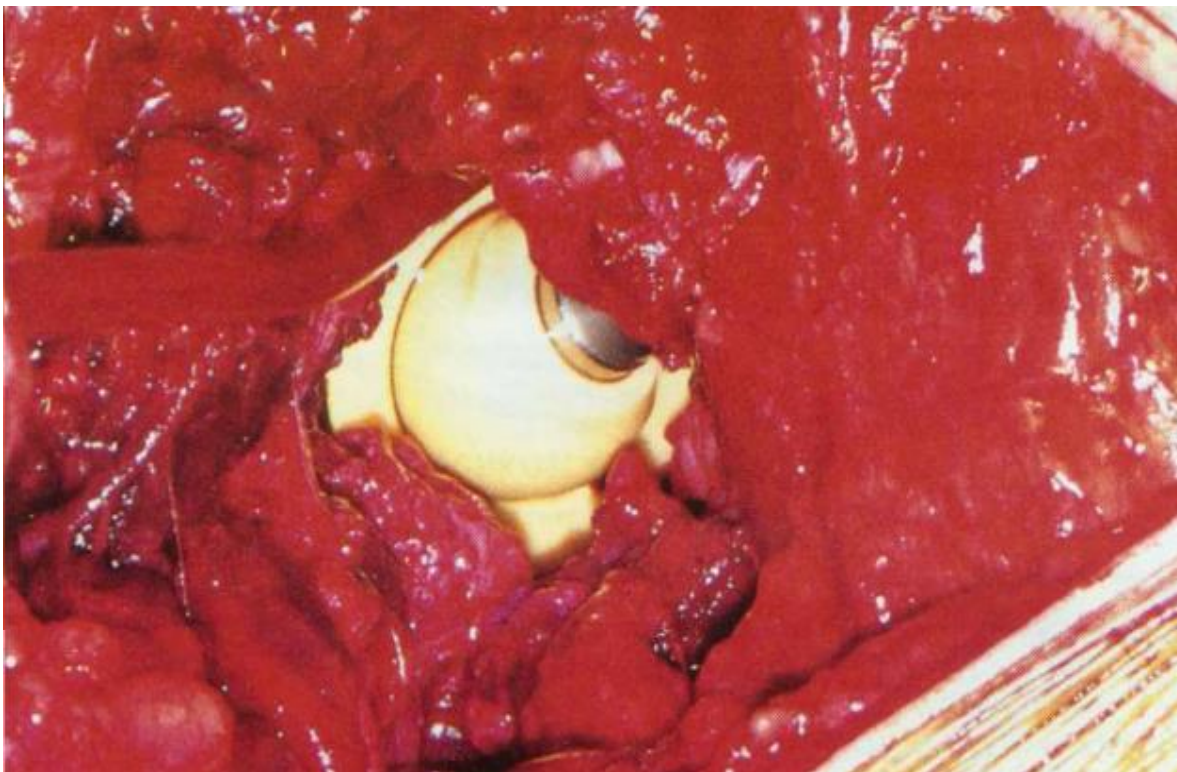
(ii)



$\downarrow T$

(iii)







Totální endoprotéza kyčelního kloubu

Buněčná biologie tkáňových systémů

- Buňka a její prostředí
- Buněčné kultivace, tkáně
- Transplantace a imunitní systém
- Kosti
- Klouby
- Kardiovaskulární systém
- Dýchací systém
- Trávicí systém, játra, ledviny
- Nervový systém
- Zuby
- Oko
- Kůže
- **Tkáňové inženýrství**

- Tvar, velikost a funkce buněk

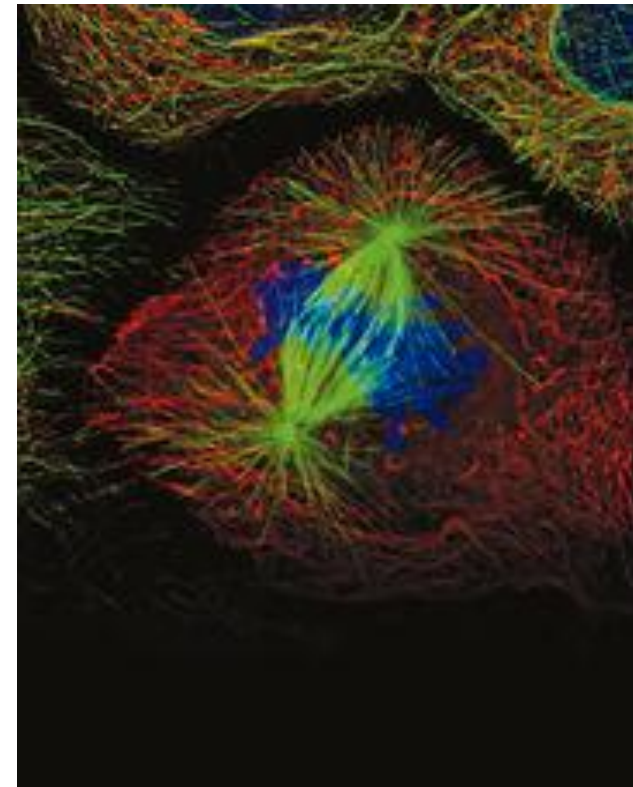
se liší podle okolních podmínek

- Základní tvar

kulovitý – jen při volném uložení – krvinky, vajíčka

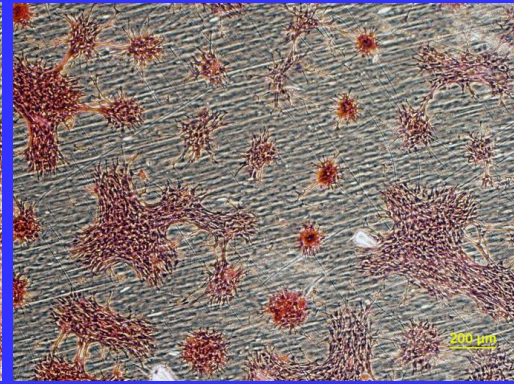
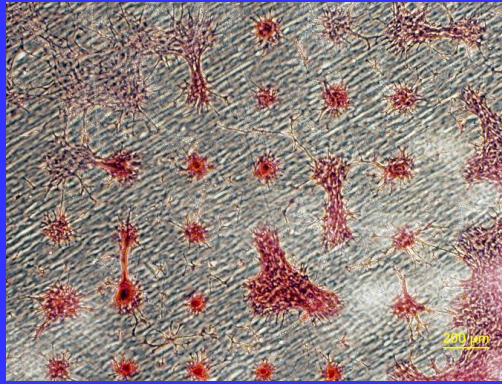
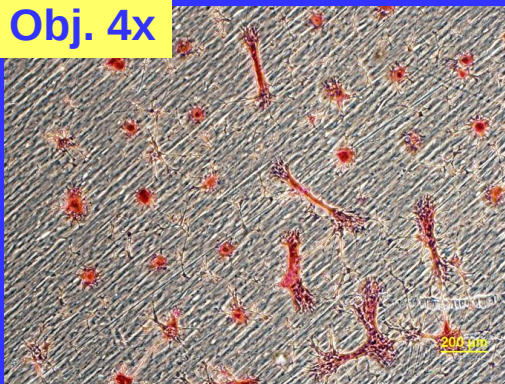
- Tvar buněk **podmíněný funkcí**

- mnohostranné – epitel
- vřetenovité – hladké svalové buňky
- oploštělý – vazivo
- rozvětvené – nervové buňky

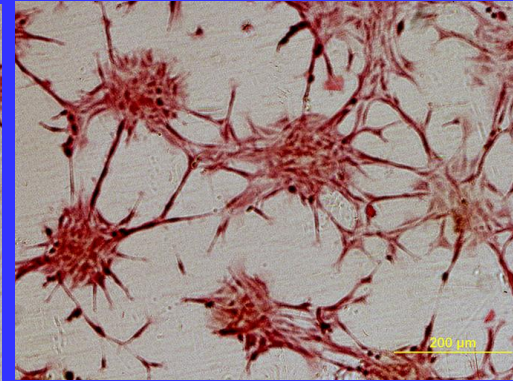
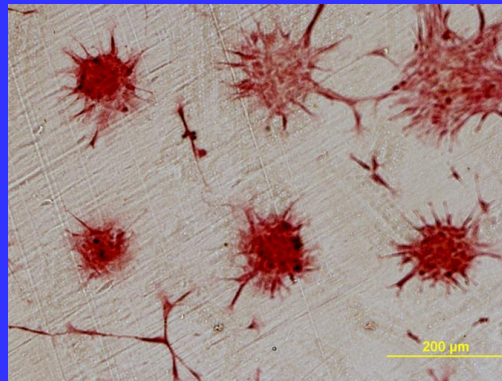
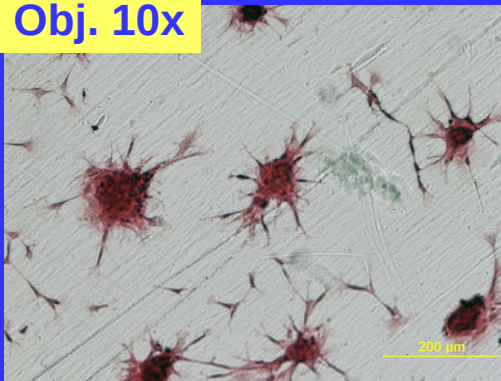


Morfologie buněk na PET modifikovaném UV zářením v NH_3 atmosféře – 3. den po nasazení

Obj. 4x



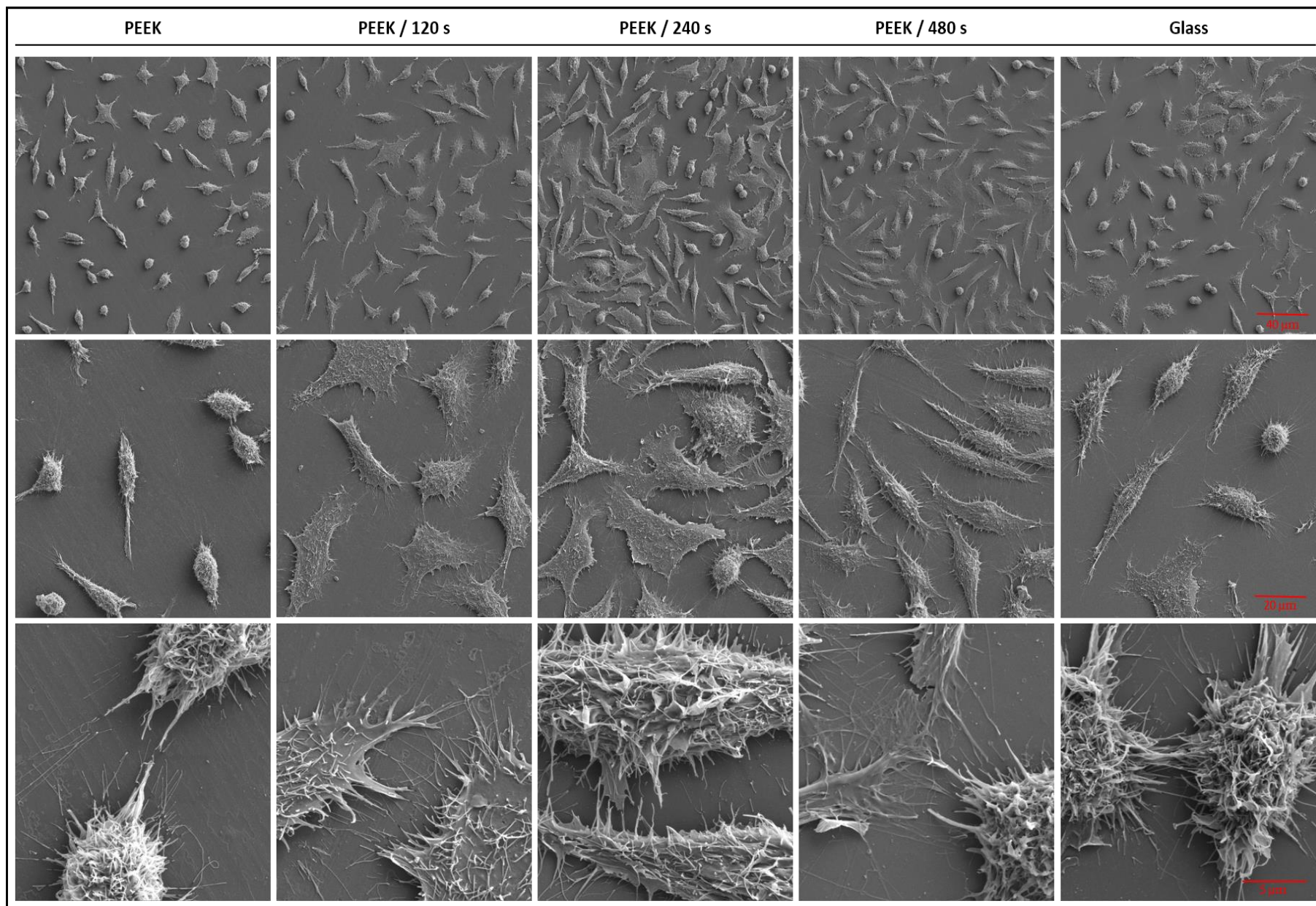
Obj. 10x



10 min

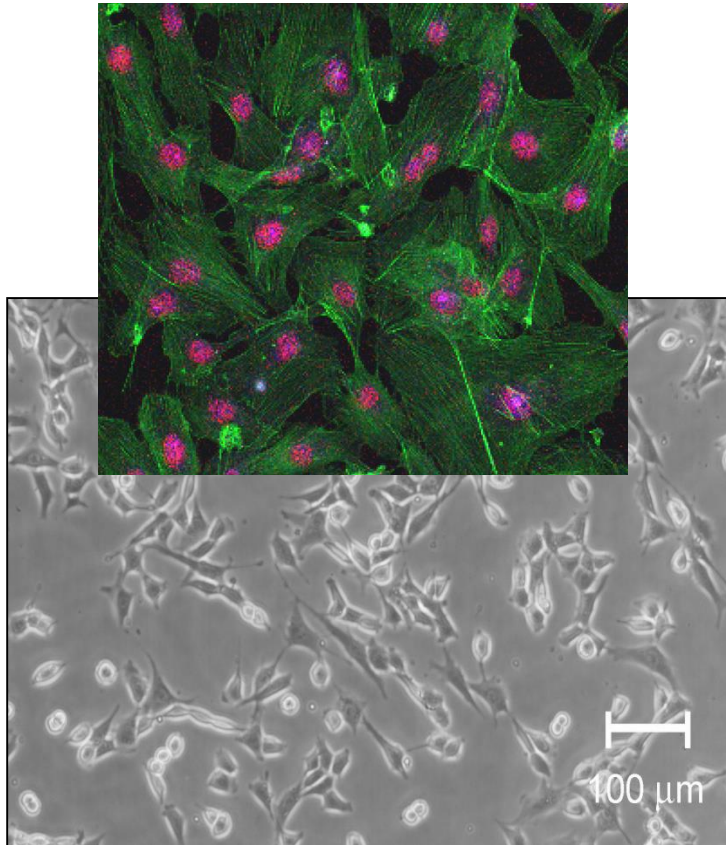
20 min

30 min

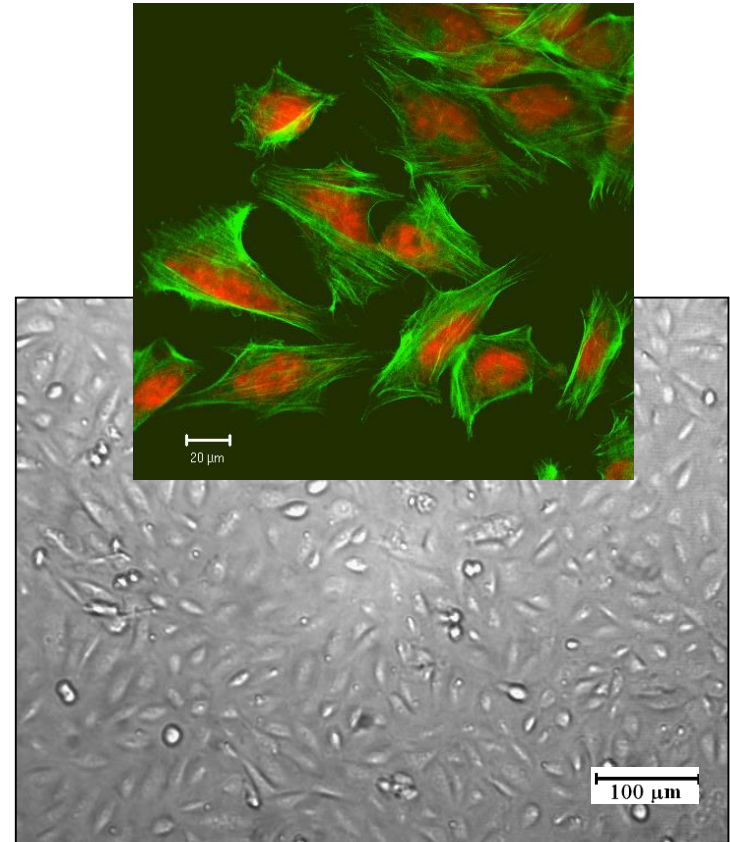


Cell interaction with carbon coatings *in vitro*

- mouse line 3T3 fibroblasts

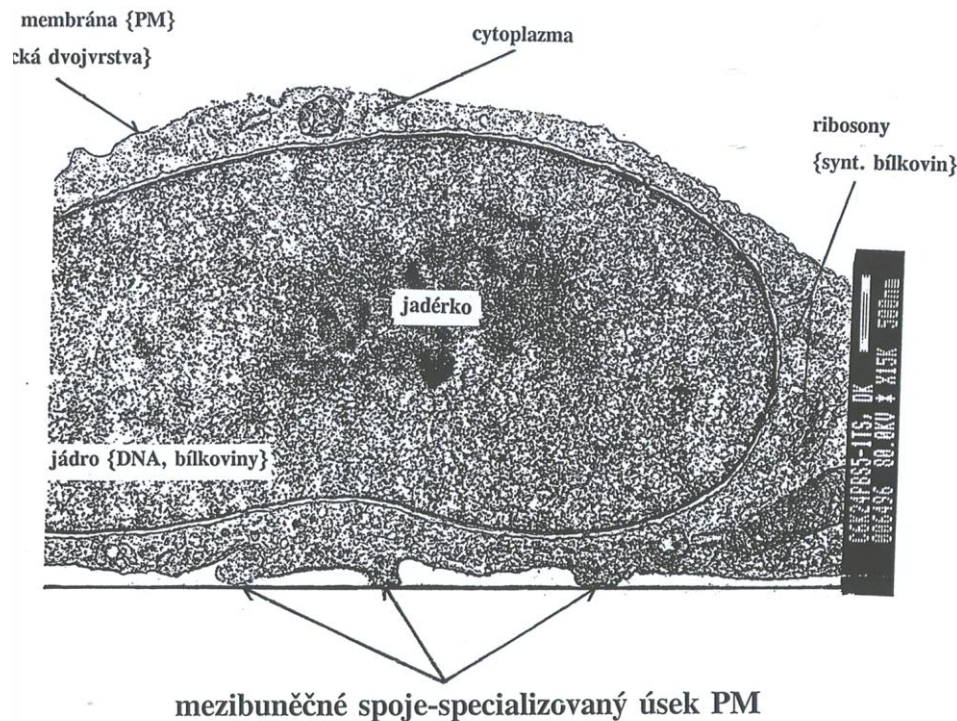


- endothelial (HUVEC) cells



Velikost buněk

- Nejmenší – v mozečku – 4 – 5 μm
- Červené krvinky - 7 – 8 μm
- Nervové buňky - až 100 μm
výběžky neuronů však mohou mít až 1 m
- Největší – vajíčko - 120 - 150 μm
- Buňky hladkého svalstva 6-8 x 20 μm



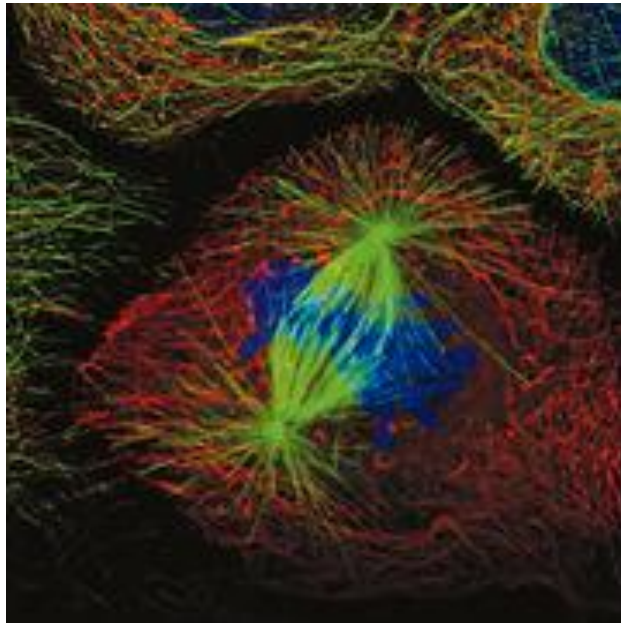
Mikrosnímek neuronové sítě.

Cytoplazma

- Vnitřní prostředí buňky
- Umožňuje součinnost všech organel buňky
- Tekutá hmota
- Voda, bílkoviny, tuky cukry a soli
- Bílkoviny tvoří koloidní soustavu – v různých funkčních stavech se může měnit viskozita cytoplazmy
- Studium proteinového složení vnitřního prostředí buňky -
proteomika

Cytoskelet

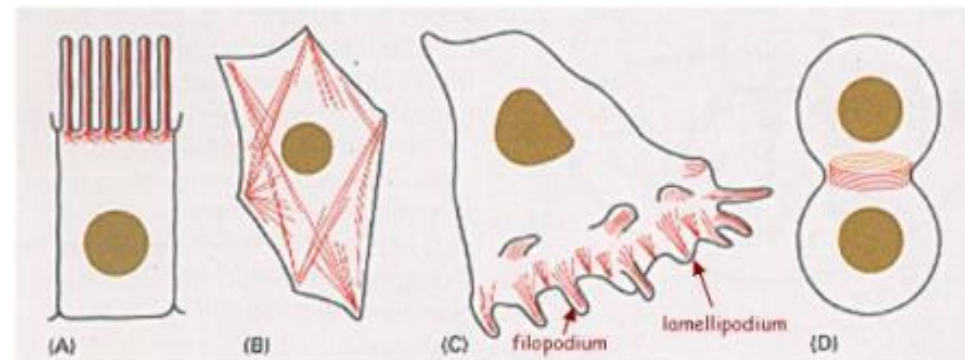
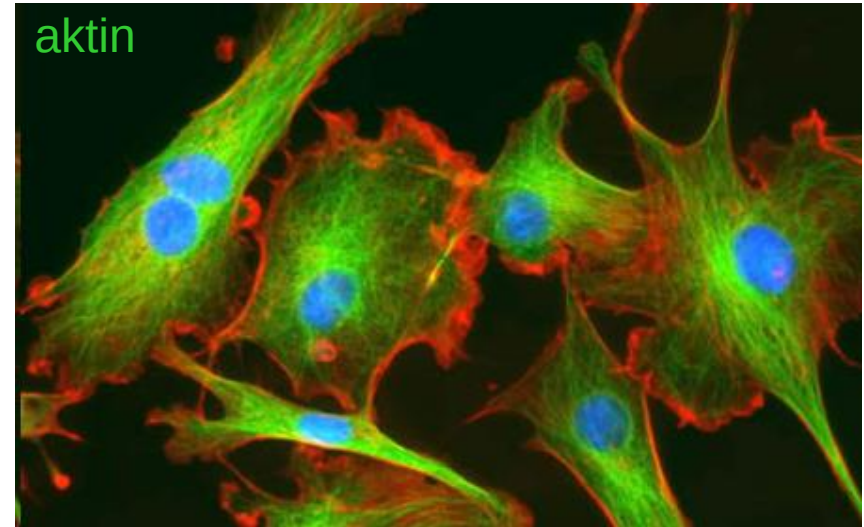
- Sít' proteinových vláken a tubulů
- Opora buňky- udržení tvaru
- Ukotvení buněčných organel
- Transport látek
- Účast při buněčném dělení



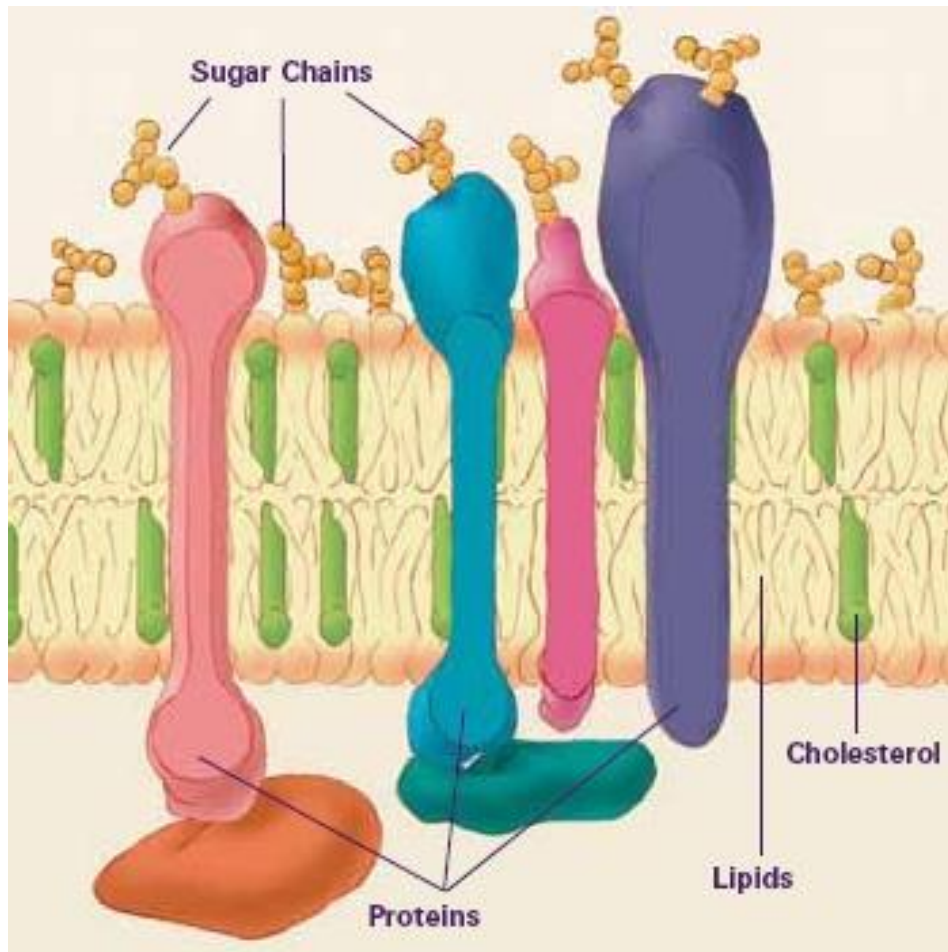
- **Mikrofilamenta** – vnitřní organizace buňky - aktin
- **Intermediární filamenta** - nejpevnější a nejodolnější – keratiny; vimentin + desmin; neurofilamenta; v jádře laminin

Mikrofilamenta

- 5 až 6 nm
- Slouží k pohybu buňky nebo váčků a struktur uvnitř buňky
 - pohyb cytoplasmy
 - pohyb svalový
- **Aktin**
 - mikrovilky enterocytů
 - hladká svalovina
 - buňky tvořící panožky
 - buněčném dělení
- **Myosin**
 - váže se na aktin a tvoří struktury schopné měnit polohu

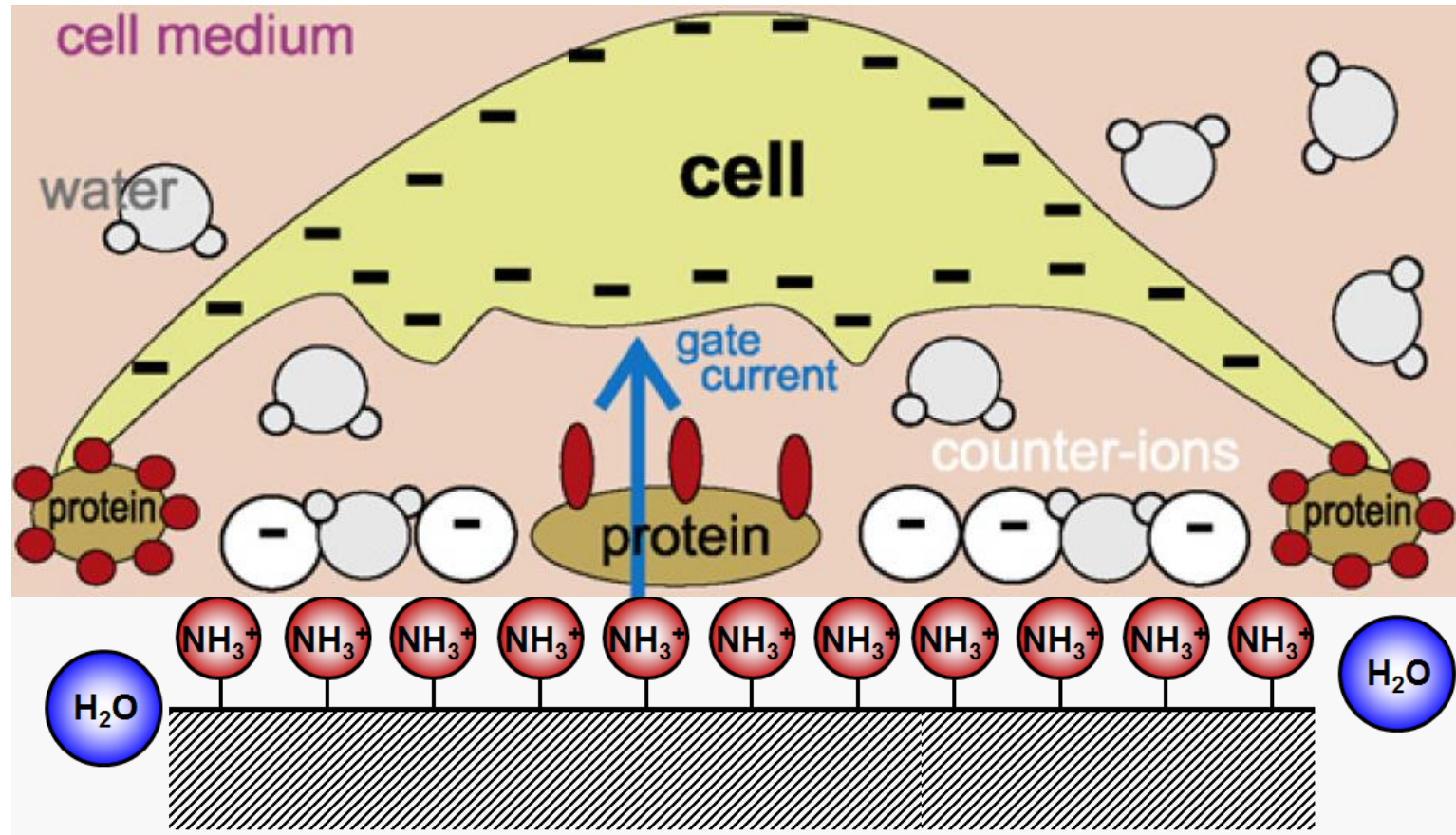


Cytoplazmatická membrána



- Dvě vrstvy fosfolipidů
- Fosfolipidové molekuly jsou bipolární – **hydrofilní konce jsou na povrchu** dvojvrstvy, **hydrofobní směřují dovnitř**
- Proteiny, cholesterol

Studie prokázaly, že buňky preferují pozitivně nabitě povrchy před negativně nabitými. Patrně právě díky záporně nabitým povrchům buněk.



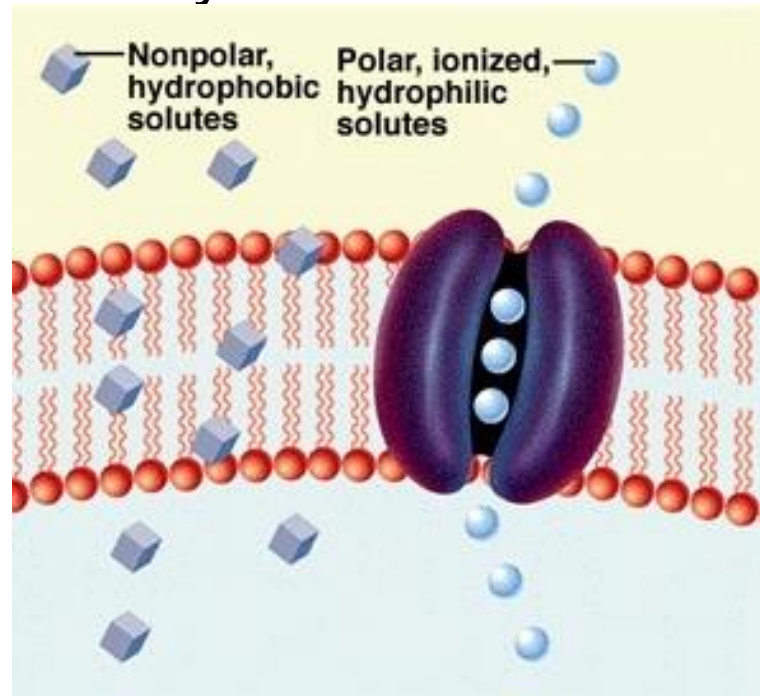
Průchod látek membránou

1. **Prostou difúzí** (buňka ji nereguluje) - po koncentračním spádu. Tímto způsobem pronikají přes CPM **plyny, molekuly lipofilní povahy, elektrolyty**.

Rychlost difúze určité látky závisí např.

- na jejím koncentračním spádu na obou stranách
- na teplotě nebo velikosti molekuly.

Difúze probíhá do vyrovnání koncentrace.



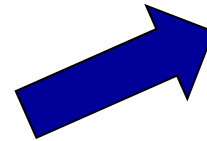
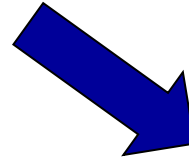
2. Usnadněnou difúzí

dochází k dočasnému **spojení** přenášené látky s tzv. "**nosičem**". Komplex je rozpustný v lipoidní vrstvě membrány, šíří se jí po koncentračním spádu bez potřeby energie, tak se přenášejí např. aminokyseliny, monosacharidy, disacharidy, fosfátové ionty. Přenos je někdy specifický, jindy nespecifický.

3. Aktivní transport

jsou přenášeny přes membrány látky proti koncentračnímu spádu za účasti transmembránového proteinu a za **spotřebu energie**. Působí v opačném směru než jednoduchá či usnadněná difúze a vysvětluje nerovnoměrné rozložení látek uvnitř a vně buněčné membrány. Jedná se o vysoce selektivní proces, který je omezen na určité úseky membrány.

Velká část objemu tkání je
mezibuněčný prostor vyplněný
složitou sítí makromolekul



Extracelulární matrix

Dříve se mu přisuzovala
pouze pasivní funkce

Pojivová tkáň – tvoří rámec celého těla
obsah extracelulární matrix je různý v různých orgánech

šlacha, kost

X

mozek, mícha

Extracelulární matrix

- Vznik extracelulární matrix má zcela zásadní pro evoluci mnohobuněčnosti, bez této hmoty by totiž buňky jen stěží mohly držet pospolu.
- Umožňuje uchycení buněk, mezibuněčnou komunikaci
- Funkce ve vývoji embrya a v diferenciaci buněk.

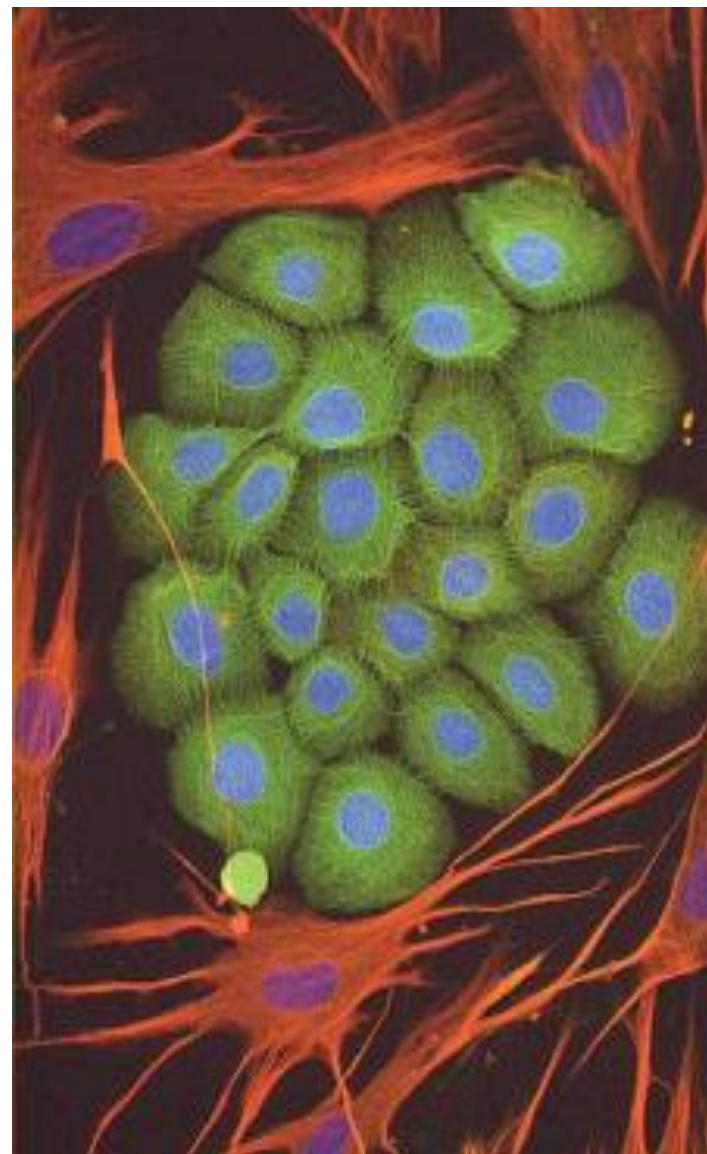


Extracelulární matrix

- Škála komponent i jejich uspořádání umožňuje velkou variabilitu ECM podle funkčních potřeb tkáně
- buňky pojivové tkáně produkující extracelulární matrix:
 - **fibroblasty** (většina pojivových tkání)
 - **keratinocyty** (kožní buňky)
 - **chondroblasty** (chrupavka)
 - **osteoblasty** (kost)

Tkáňové kultury

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

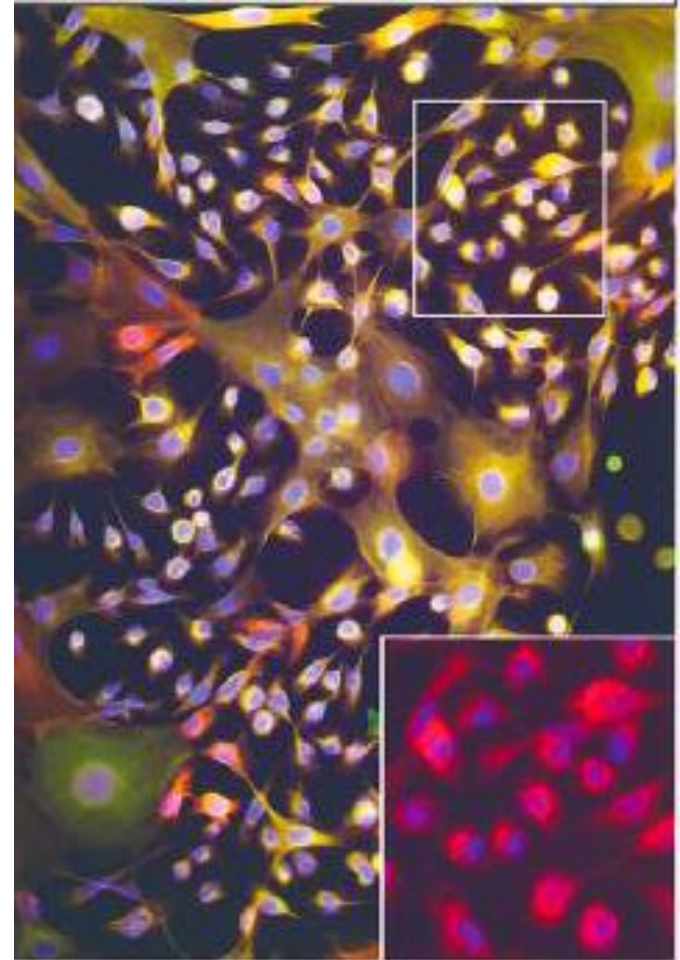


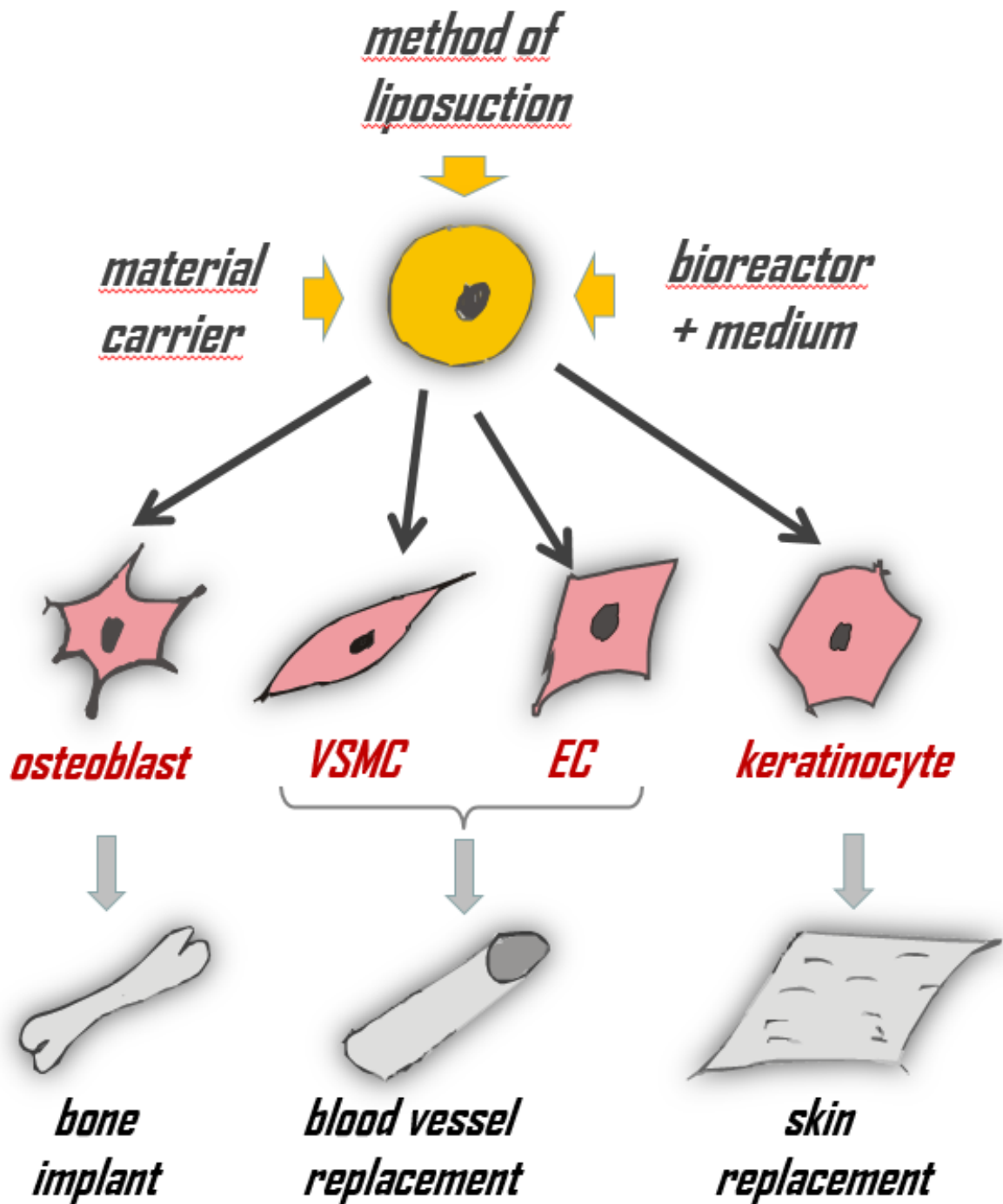
Kultivace buněk *in vitro*

- první pokusy – počátek 20. stol.
- 1943 – ustanovena 1. buněčná linie – myší fibroblasty
- 1952 – 1. lidská buněčná linie HeLa buňky
- 60.léta – pluripotence embryonálních buněk
- 80. léta – kultivace kožních štěpů
- 90. léta – průmyslová kultivace transfekovaných buněk pro výrobu biofarmak
- 1998 – chrupavka připravená z kultivovaných chondrocytů
- 1998 – kultivace lidských embryonálních buněk
- po roce 2000 – mohutný rozvoj **tkáňového inženýrství**

Buňky

- zdravé buňky
- nádorové buňky
- kmenové buňky
- primární kultury
- buněčné linie





HDPE

ASC HP

HDPE 20000

V.Švorčík, vaclav.svorcik@vscht.cz

200 μ m

200 μ m

HDPE

PLLA

ASC HP

PLLA 20000

200 μ m

200 μ m

200 μ m

PLLA

ASC LP

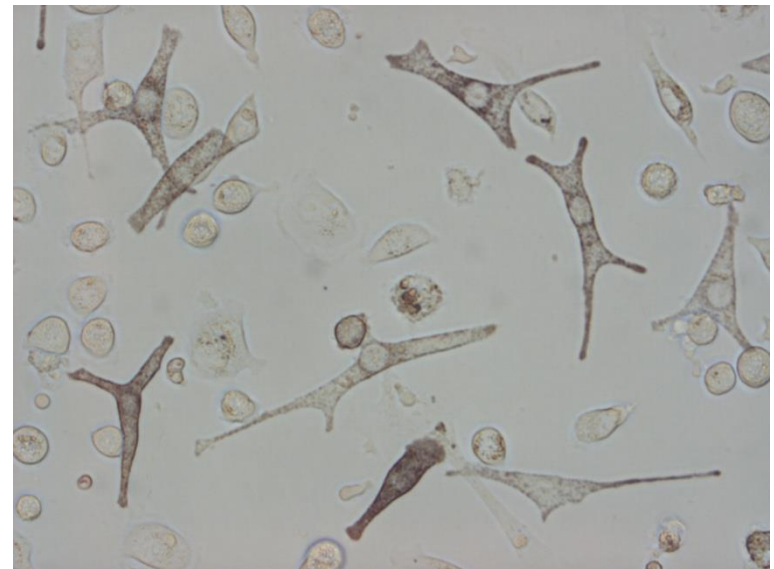
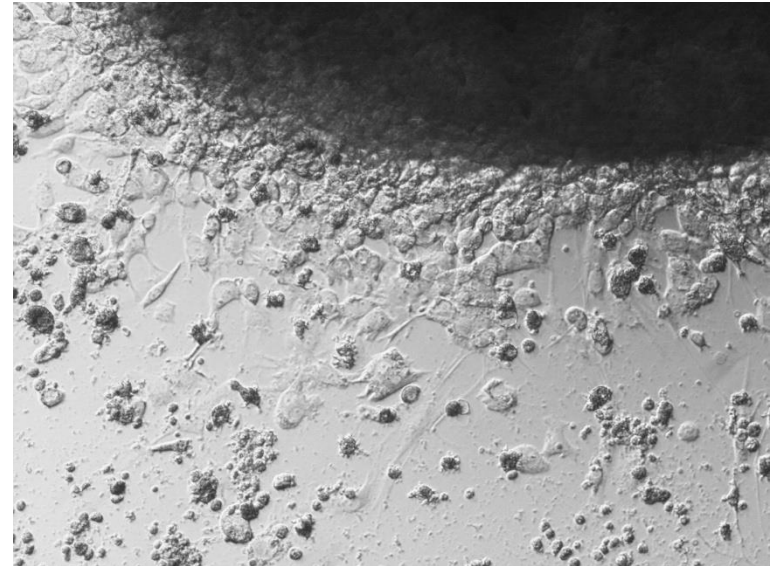
PLLA 20000

200 μ m

200 μ m

Kultivace buněk *in vitro*

- Zdroje buněk
 - izolace buněk z tkání
 - izolace z krve
 - buněčné linie







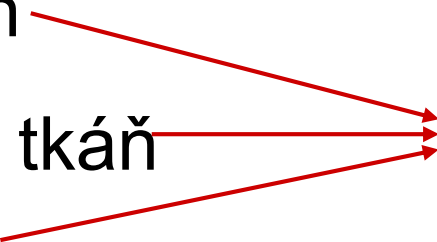
Kultivační média

- aminokyseliny
- anorganické soli Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^-
- vitaminy
- glukóza
- pufrovací systém – NaHCO_3 , HEPES
- pH indikátor – fenolová červeň
- antibiotika – PNC + Streptomycin
- sérum – nejčastěji fetální bovinní
- individuální přídavky



Tkáně lidského těla

- Epitely
- Vazivová tkáň
- Chrupavková tkáň
- Kostní tkáň
- Svalová tkáň
- Nervová tkáň
- Krev



POJIVA

Vazivo

- buněčná složka
 - buňky fixní – fibroblasty produkují mezibuněčnou hmotu, retikulární b., pigmentové b., tukové b.
 - b. bloudivé - makrofágy (nespecifická imunita),
- bezibuněčná hmota
 - vláknitá složka – kolagenní, elastická, retikulární
- obranná funkce – nespecifická a specifická obrana organismu

Kost

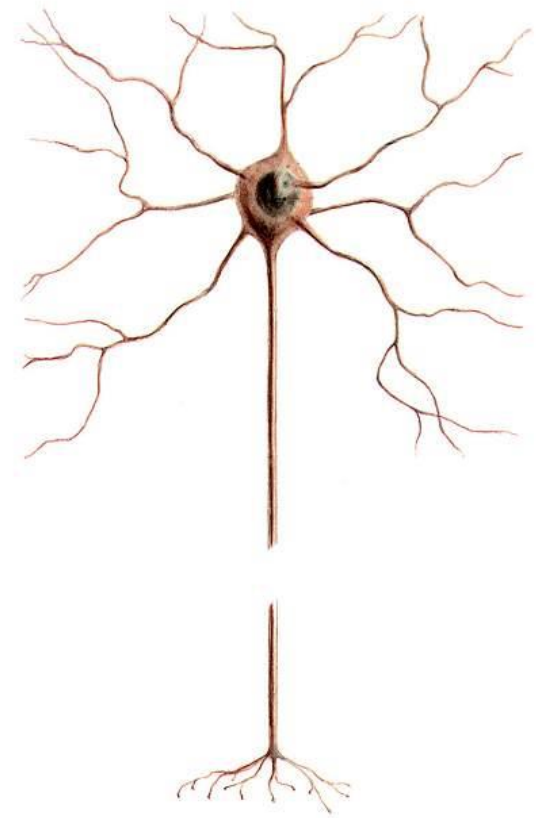
- buňky
 - osteocyty – zralé, uzavřené uvnitř
 - osteoblasty – na povrchu, dělí se a tvoří ECM
 - osteoklasty – **přestavba kosti**
- fibrily
- mezibuněčná hmota
 - organická složka ossein (komplex mezibuněčné hm. a kolagenních vláken)
 - anorganická složka – fosforečnan a uhličitan vápenatý

Svalová tkáň

- z jednotlivých svalových buněk
 - hladké svalstvo
 - příčně pruhované srdeční svalstvo
- ze svalových vláken
 - příčně pruhované kosterní svalstvo

Nervová tkáň

- nervové buňky – neurony
 - tělo + výběžky
 - dendrity – rozvětvené v., vzruch do buňky
 - axon – dlouhý v., vzruch z buňky
 - Propojení neuronů – synapse – vzruch se přenáší pomocí chemických látek – neurotransmiterů
- neuroglie – gliové buňky
 - podpůrné buňky
 - nejsou schopné přenášet nervový vzruch
 - podporují metabolismus neuronů
 - f-ci výživnou, podpůrnou a fagocytární

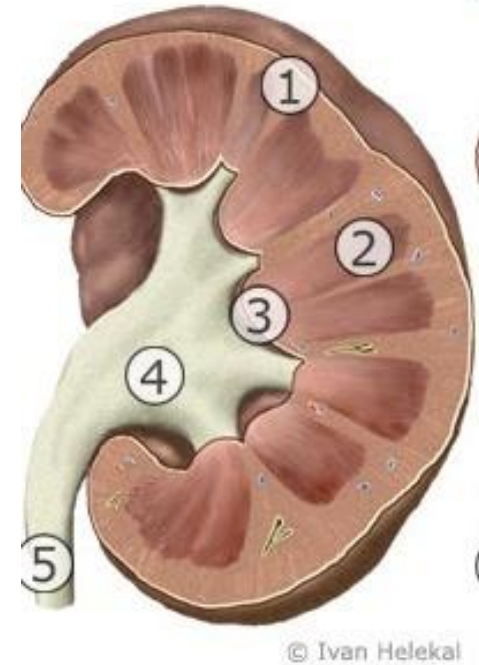


Historie transplantací

- Alexis Carrel (1873 – 1951) - **zakladatel cévní a transplantační chirurgie**. Zásoby tkání pro chirurgické účely, vědecký základ metodám konzervací tkání.
 - Specializované tkáňové banky
- 30. léta 20. stol – Filatov - prvním transplantovaným kadaverózním štěpem byla rohovka.
- v 50. letech 20. století vznikají první „vícetkáňové“ banky.
- objev cyklosporinu A - imunosupresivní léčba - zahájil tak začátkem osmdesátých let úspěšnou éru orgánových transplantací.

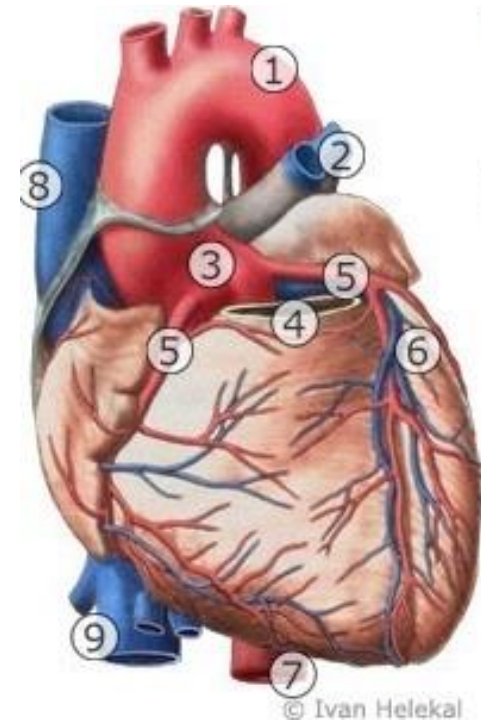
Transplantace ledviny

- v prosinci 1952 byla provedena 1. transplantace ledvin na světě (přenos matka- syn). Transplantovaná ledvina byla funkční, ale po 32 dnech pacient zemřel na její selhání-rejekce.
- prosinec 1954 – 1. úspěšná transplantace (jednovaječná dvojčata) – pacient žil 9 let
- transplantace od kadaverózních dárců neúspěšné
- 1. transplantace v Hradci Králové v roce 1961



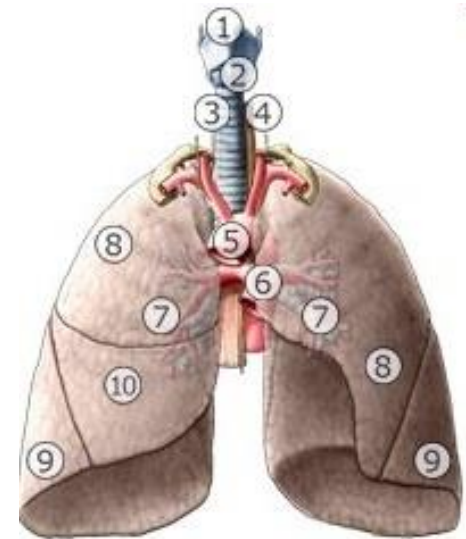
Transplantace srdce

- 1.transplantace srdce 9. prosince 1967 Christian Barnard v Kapském Městě; pacient zemřel 18. den po operaci; 2. pacient žil 18 měsíců.
- 1. transplantace srdce ČR provedl 9. července 1968 tým akademika Šišky. Pacientka po šesti hodinách zemřela.
- další transplantace až v 80. letech (cyklosporiny)
- v ČR nyní více než 800 pacientů po transplantaci srdce, jednoleté přežívání u 80%, desetileté u 50% pacientů



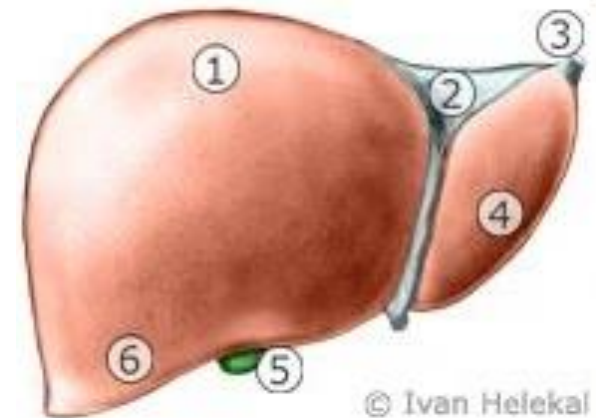
Transplantace plic

- první transplantaci plic provedl v USA James Hardy v roce 1963, pacient však zemřel po 18 dnech
- blok srdce – plíce byl poprvé úspěšně transplantován ve Stanfordu v roce 1980
- v ČR - program zahájen koncem roku 1997 na 3. chirurgické klinice 1. LF UK ve FN Motol
- ročně se ve světě provádí asi 1400 – 1500 transplantací plic



Transplantace jater

- v červenci r. 1967 - v Denveru uskutečněna poprvé úspěšná transplantace jater. Pacient s rozsáhlým hepatomem (nezhoubný nádor jater) přežíval od výkonu déle než 1 rok a zemřel na rekurenci (znovuvzplanutí) nádorového onemocnění
- v roce 1983 byla transplantace jater úspěšně provedena i poprvé v Československé republice v Brně týmem II. chirurgické kliniky
- v současnosti se v celém světě provádí přibližně 10 000 transplantací jater za rok.



Transplantace slinivky břišní

- pokusy již počátkem 20. stol. - léčba cukrovky
- 16. prosince 1966 v Minneapolis první kombinovaná transplantace pankreatu a ledviny u člověka, pacientka zemřela po 10 týdnech.
- 80. léta – rozvoj, u nás IKEM
- transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků – Edmonton r. 2000, jednorroční přetrvávání plné funkce může dosahovat až 80%, ale většinou se zatím pohybuje kolem 50%.

Kůže

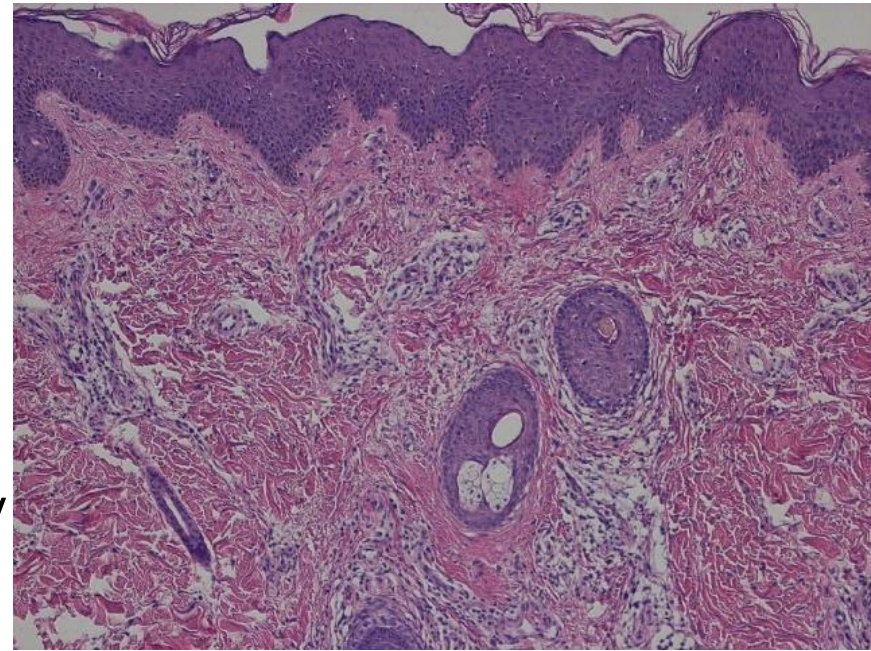
- největší orgán lidského těla
- průměr 1,7 m²
- dvě hlavní vrstvy – epidermis a dermis
- léčba rozsáhlých kožních ztrát představuje závažný lékařský problém



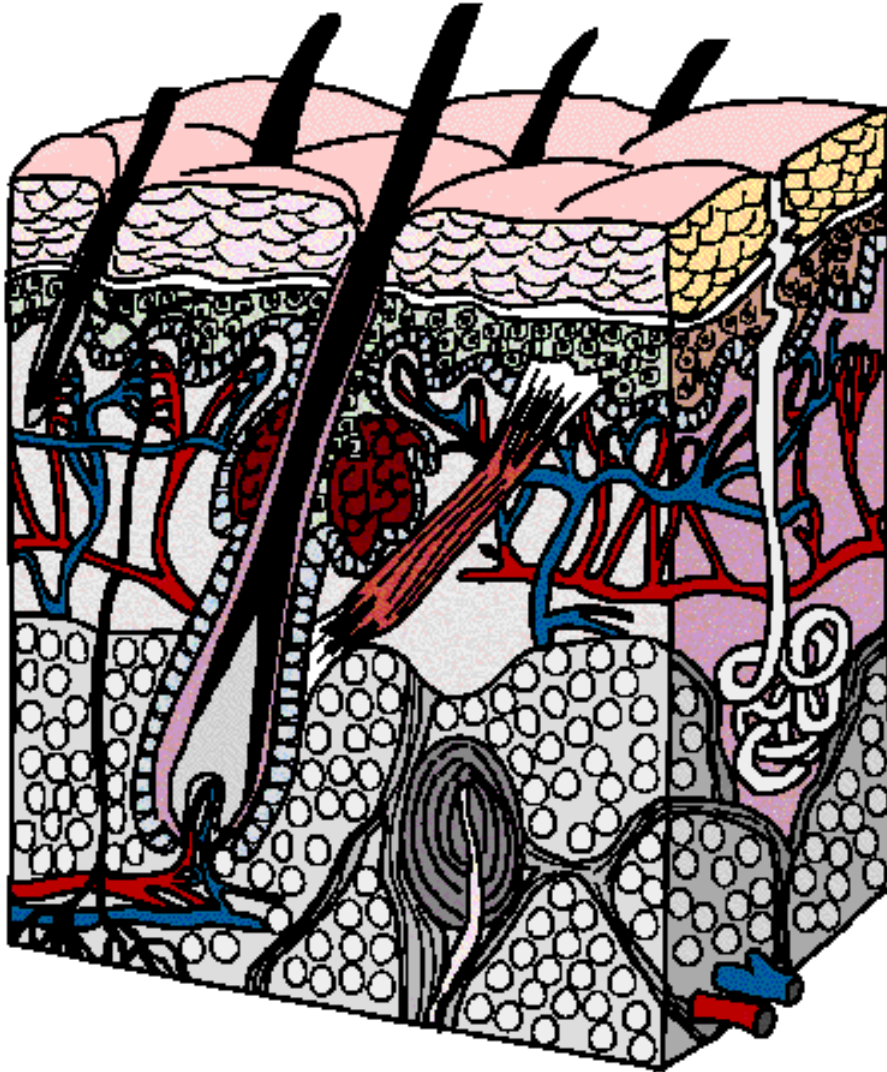
Anatomia del corpo humano Juan Valverde de Amusco (Rome, 1560)

Funkce lidské kůže

- ochranná funkce
 - mechanický úraz
 - ztráta tekutin
 - invaze patogenů
 - produkce cytokinů a interleukinů
- metabolická funkce
 - produkce vitaminu D
 - termoregulace – cévy, potní žlázy
- informační – receptory
- estetická funkce



Kůže se obecně dělí na **tenkou ochlupenou** (90%), která pokrývá většinu tělního povrchu, a **silnou neochlupenou** (10%), vyskytující se především na dlaních, ploskách nohou a flexorové straně prstů. Na silné neochlupené kůži se u člověka typicky vyskytují úchopové a hmatové lišty.



EPIDERMIS

**DERMIS
(KORIUM, ŠKÁRA)**

PODKOŽÍ

Proces hojení ran

- 1. fáze - hemostáza
- 2. fáze - akutní zánět
- 3. fáze - proliferace
- 4. fáze - remodelace

Podmínky pro kvalitní hojení

- včasné odstranění mrtvých tkání (toxiny)
- kontrola infekce
- rychlý uzávěr ranné plochy
- použití vhodných krytů
- u rozsáhlých defektu event. užití kultivovaných autologních či allogenních keratinocytů

Trvalý uzávěr ranné plochy

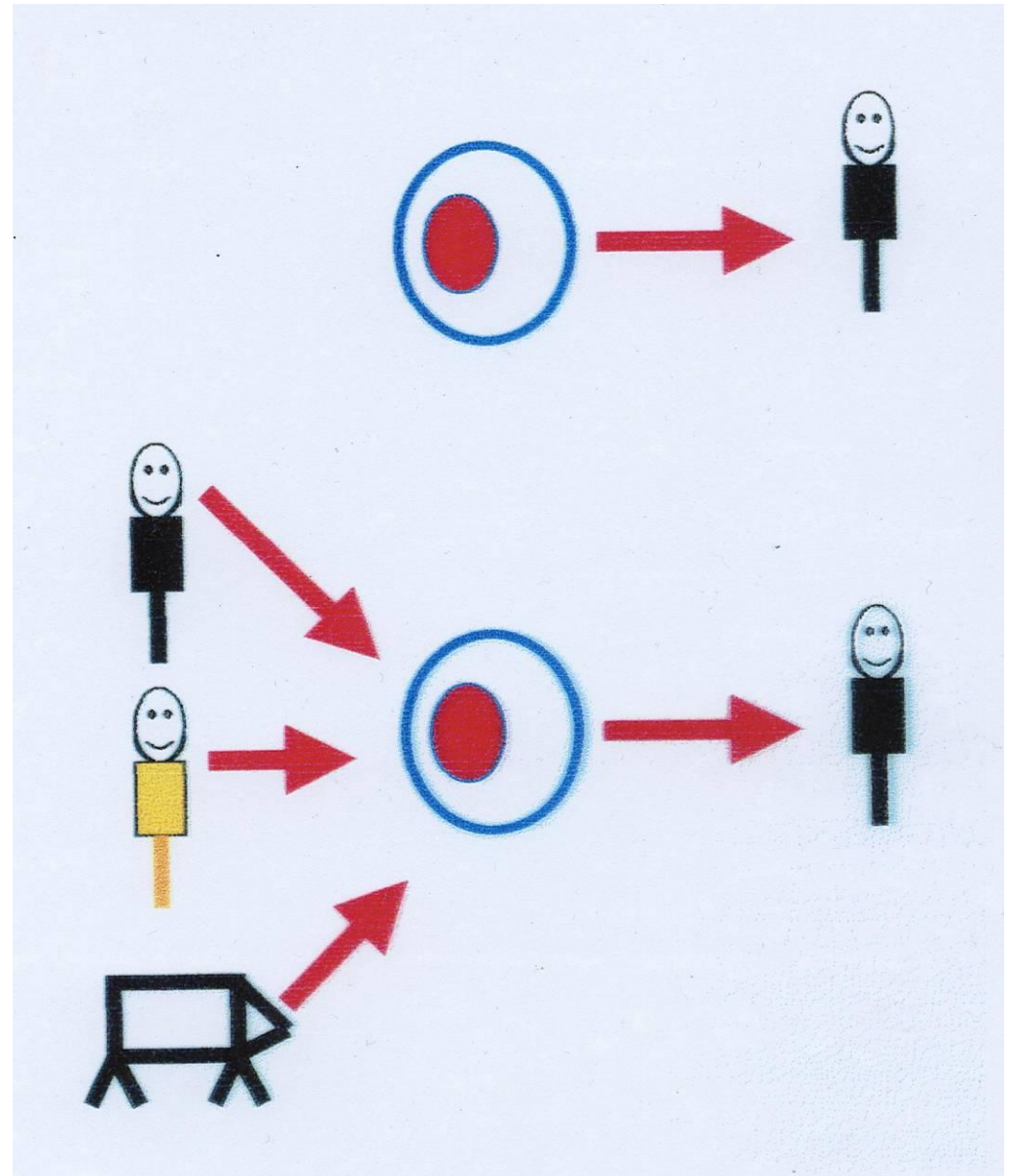
- samovolná epitelizace ze zachovaných hlubokých dermálních struktur (zbytkové keratinocyty) či z okrajů defektu
- autotransplantace
- isotransplantace - možné pouze u jednovaječných dvojčat
- autologní kultivované keratinocyty (souvislé štěpy, porost na nosiči, suspenze)

buněčná terapie

autologní

alogenní

xenogenní



Autotransplantace



Kryty kožních ztrát

- jedná se vždy o dočasnou náhradu chybějícího kožního krytu
- jsou vždy nahrazeny pacientovou vlastní kůží
 - samovolnou epitelizací
 - autotransplantací
- nejsou biodegradabilní

Vepřové xenotransplantáty

• Výhody

- podporuje hojení ranné plochy
- lze snadno získat velké množství
- levné

• Nevýhody

- nepřihojí se na rannou plochu
- ? možnost přenosu infekce ?

Klinické užití xenotransplantátů



- dočasný kryt na excidované plochy - podpora tvorby granulační tkáně

Epidermis – není vaskularizovaná

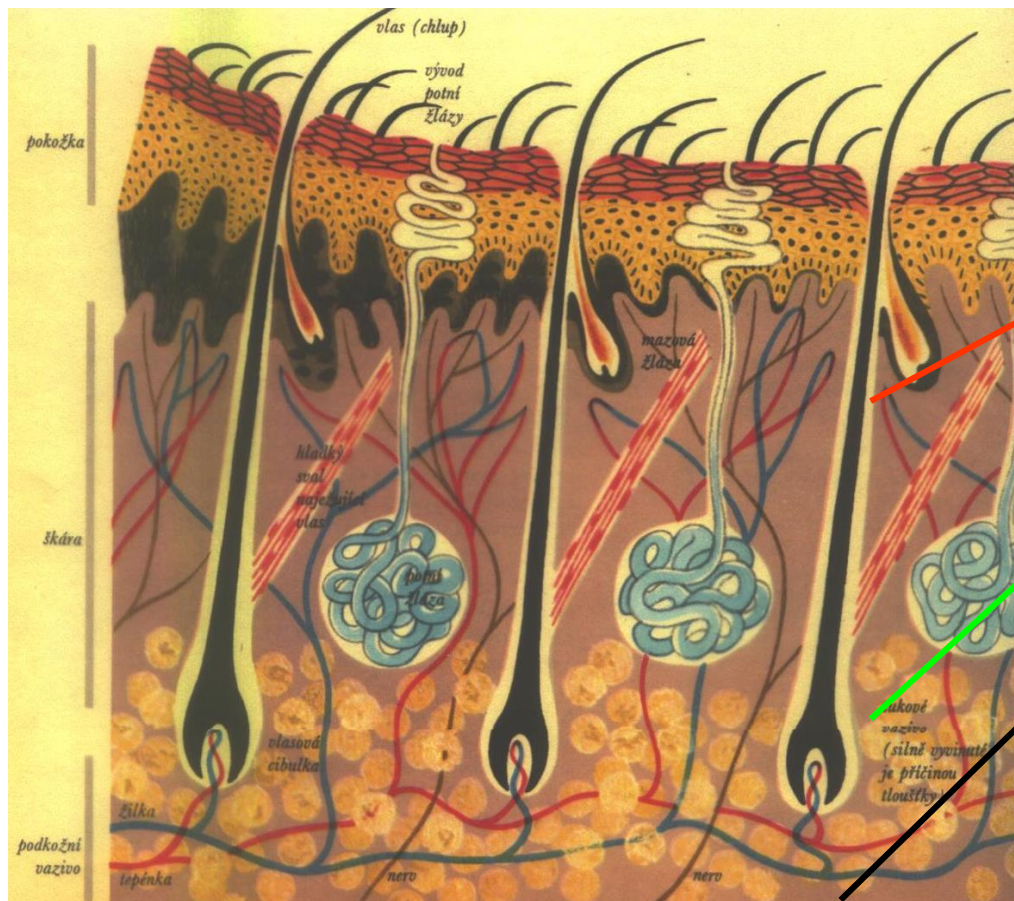
- buňky jsou vyživovány difúzí přes bazální membránu
- pouze jeden buněčný typ – keratinocyty – dostačuje pro její rekonstrukci



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

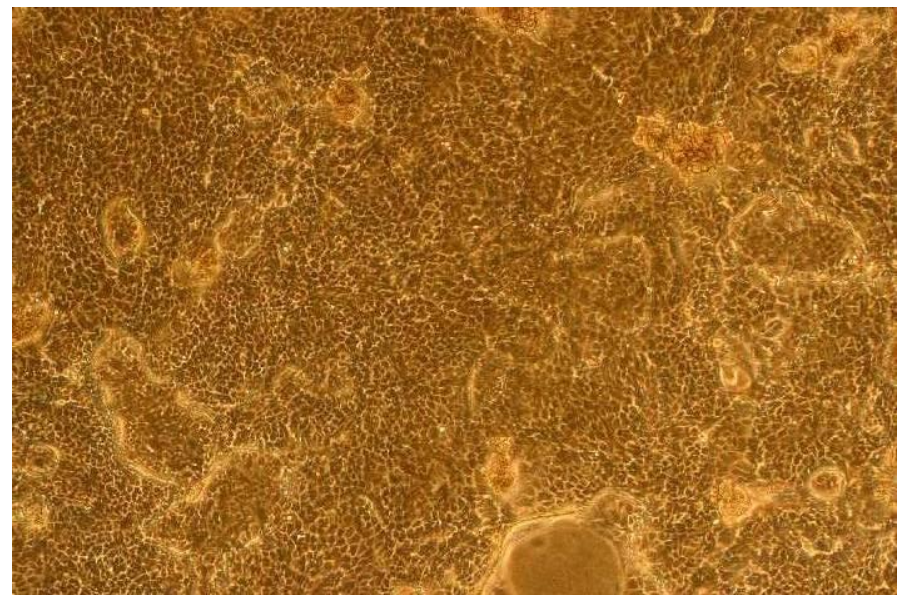
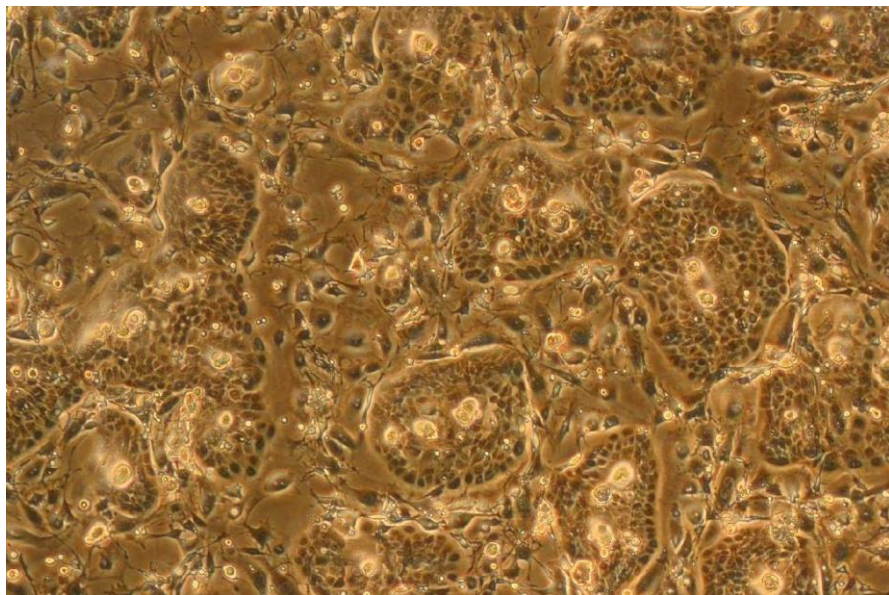
Autotransplantáty



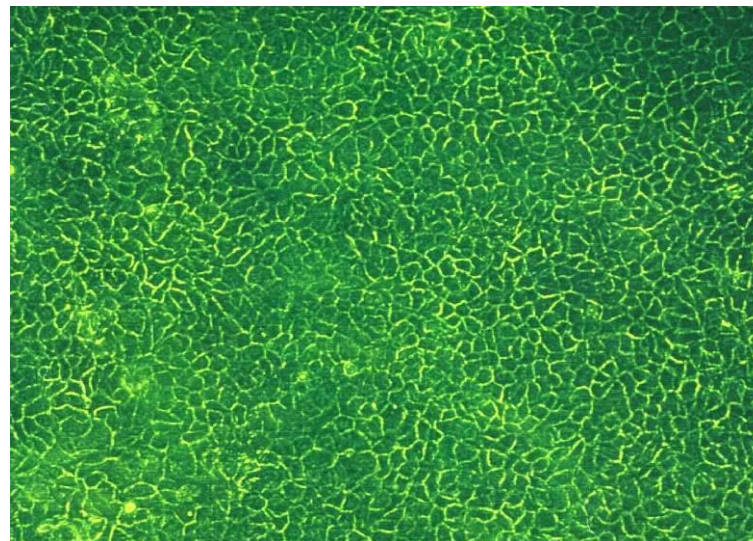
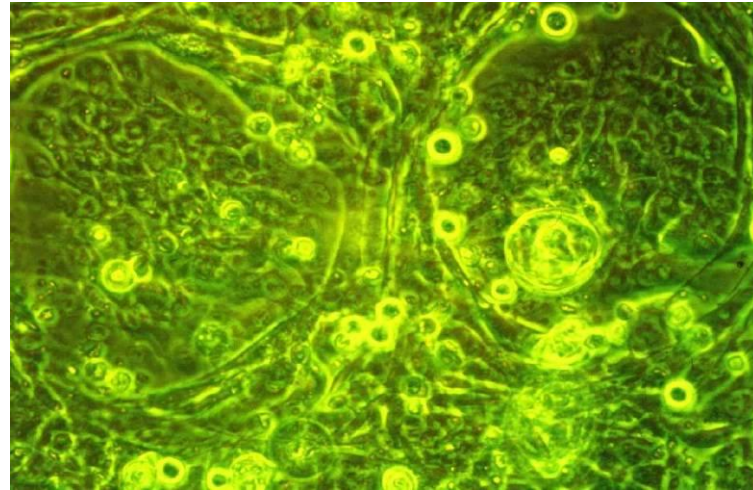
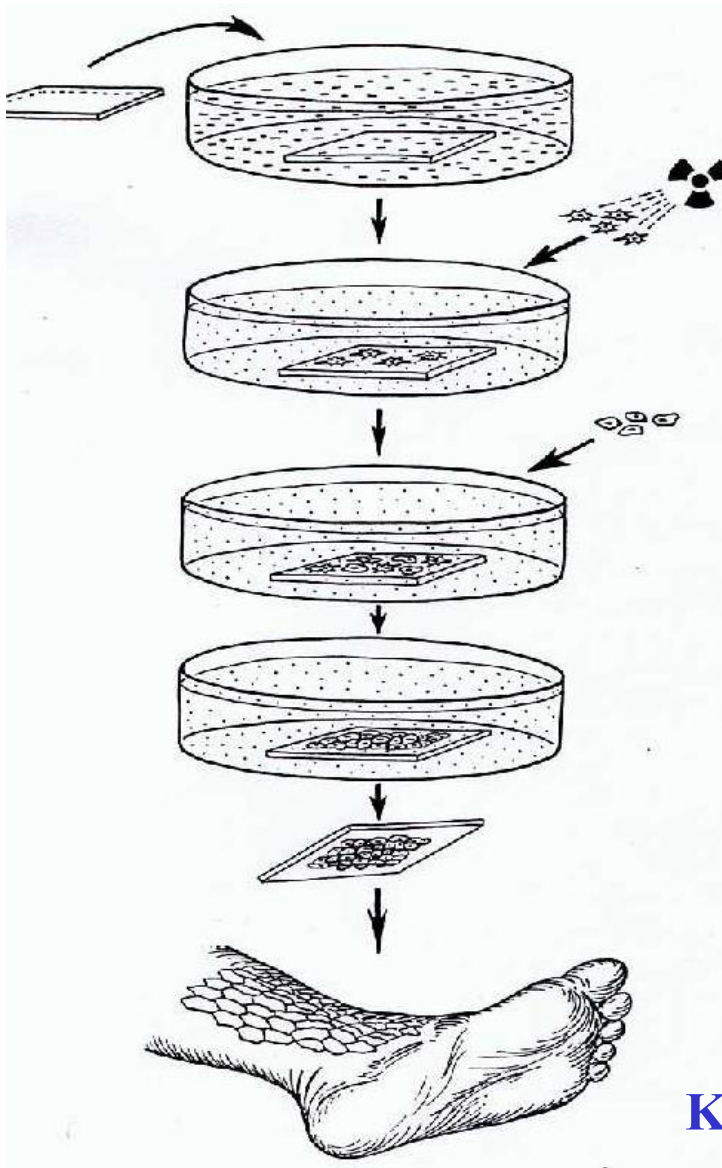
Kultivovaný epitel



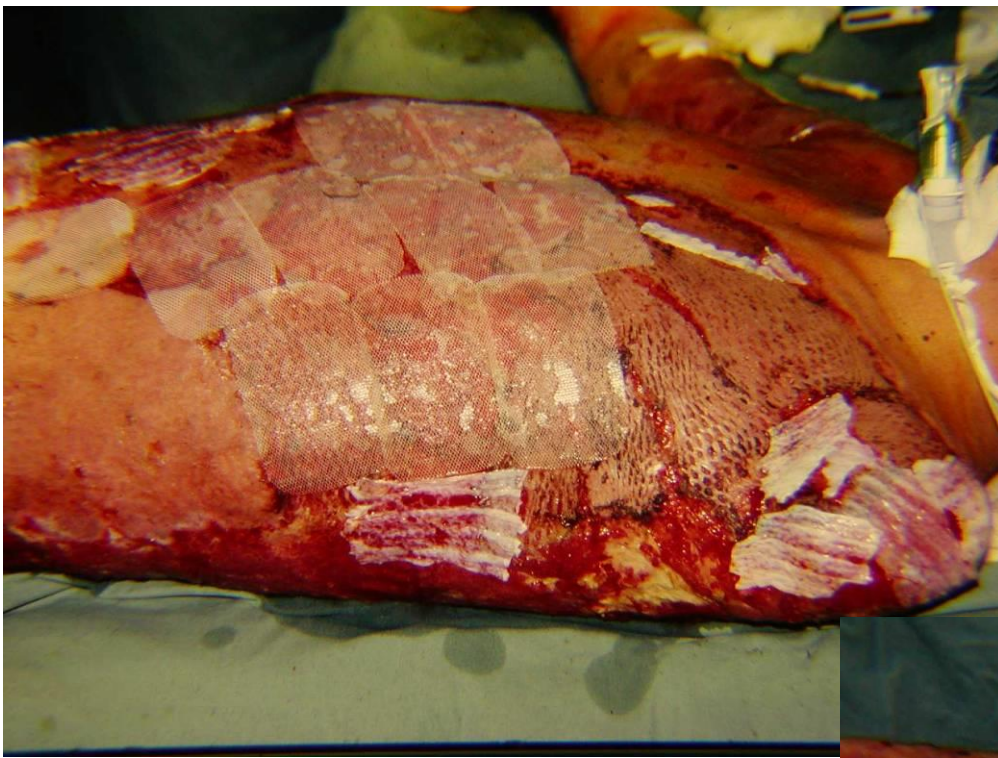
- autologní štěpy – jsou schopné vytvořit trvalý kryt
- léčba kožních ztrát v plné tloušťce
- odběr - dermo-epidermální štěp 2-5 cm²
- minimální doba přípravy cca 3 týdny
- možno připravit stovky cm² epidermálních štěpů



Kultivace keratinocytů při ztrátě kožního krytu



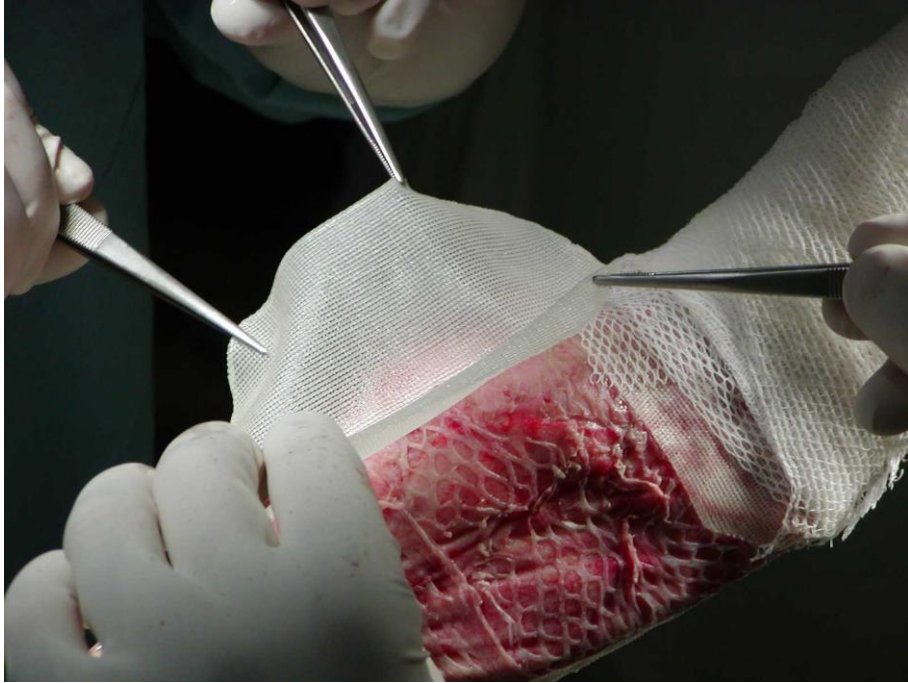
Keratinocyty po 4 dnech a jejich souvislý porost

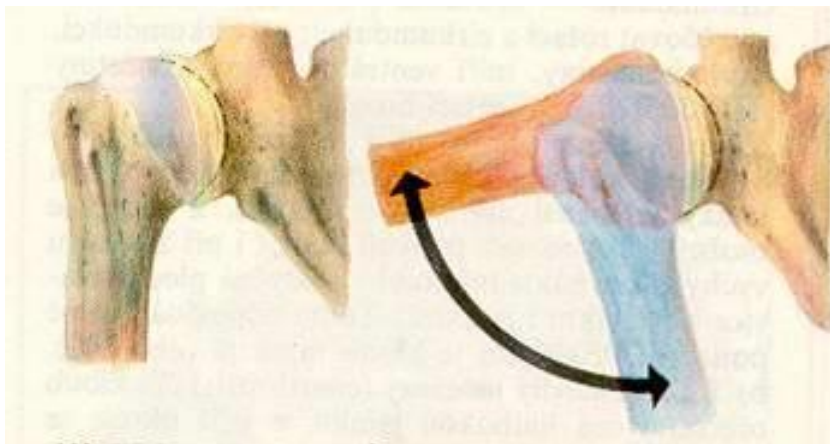


Stav transplantované plochy
(hrudníku) po 4 týdnech

Hrudník pacienta (popáleniny III. stupně na 80% povrchu těla) krytý síťovanými autotransplantáty v kombinaci s autologními kultivovanými epidermálními štěpy

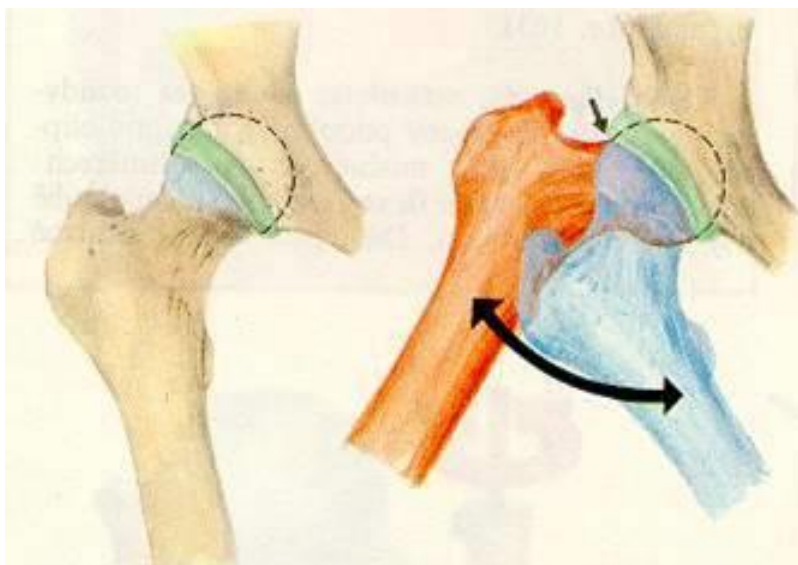






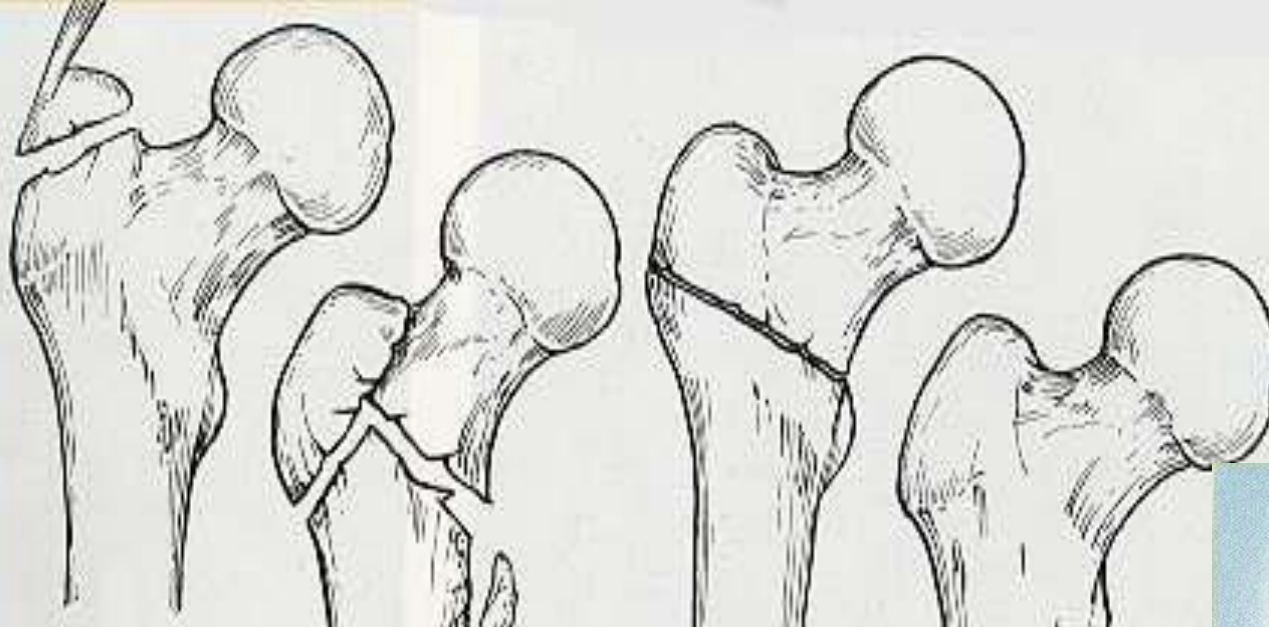
Kloub kulový volný

Ramenní kloub

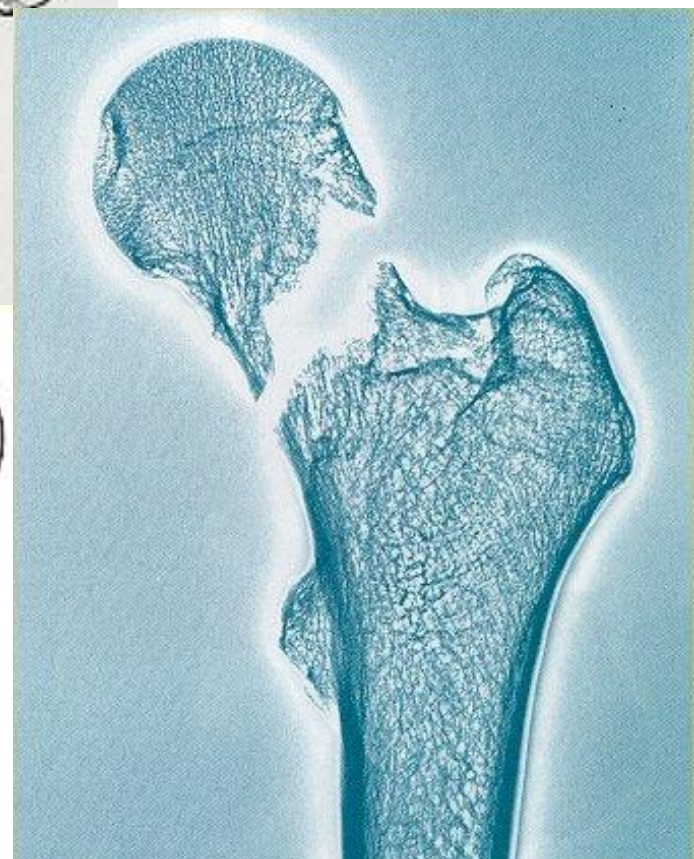
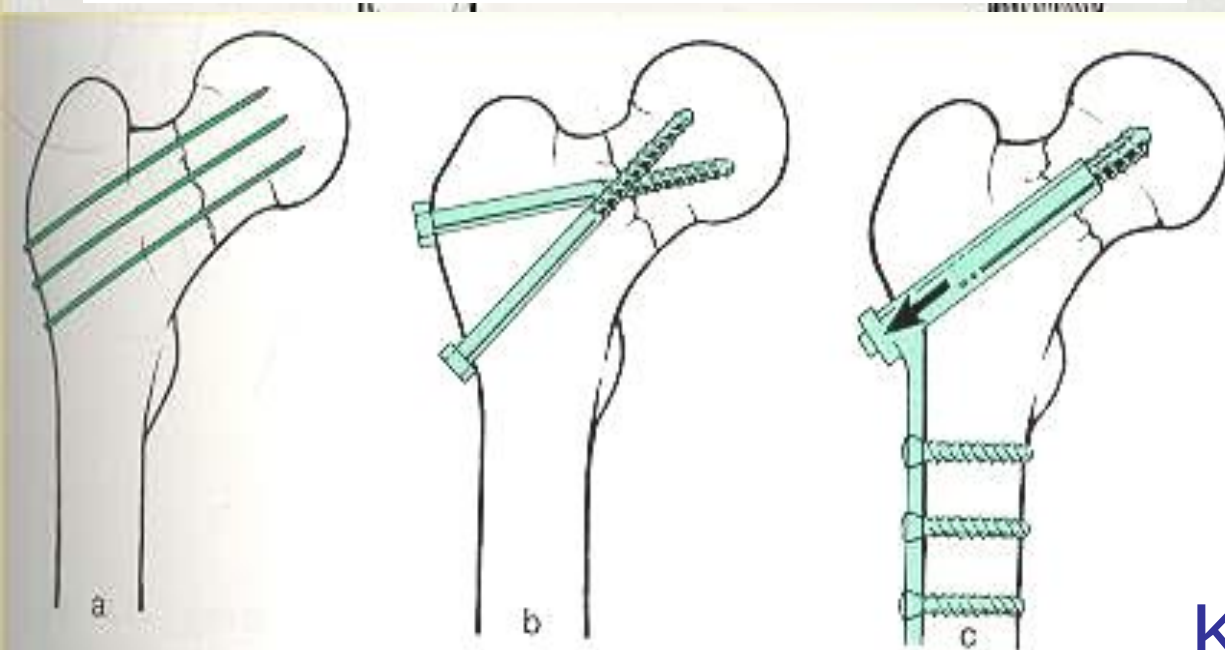


Kloub kulový s omezením

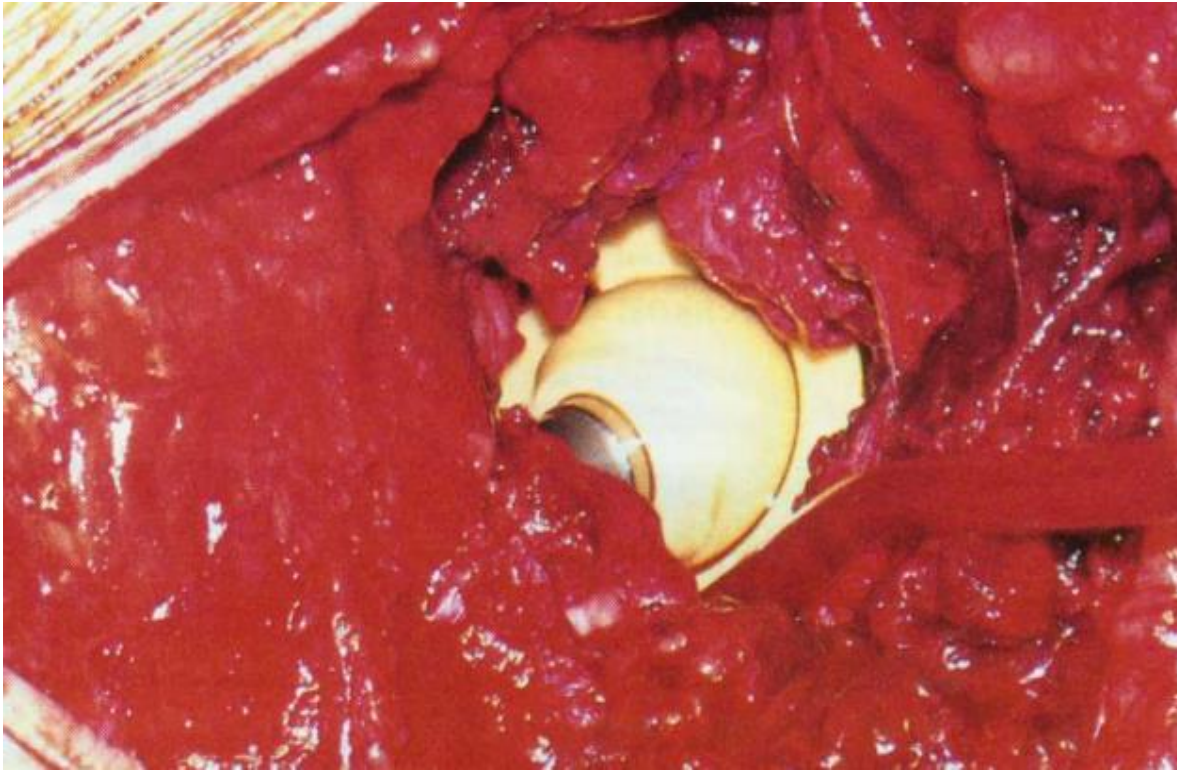
Kyčelní kloub



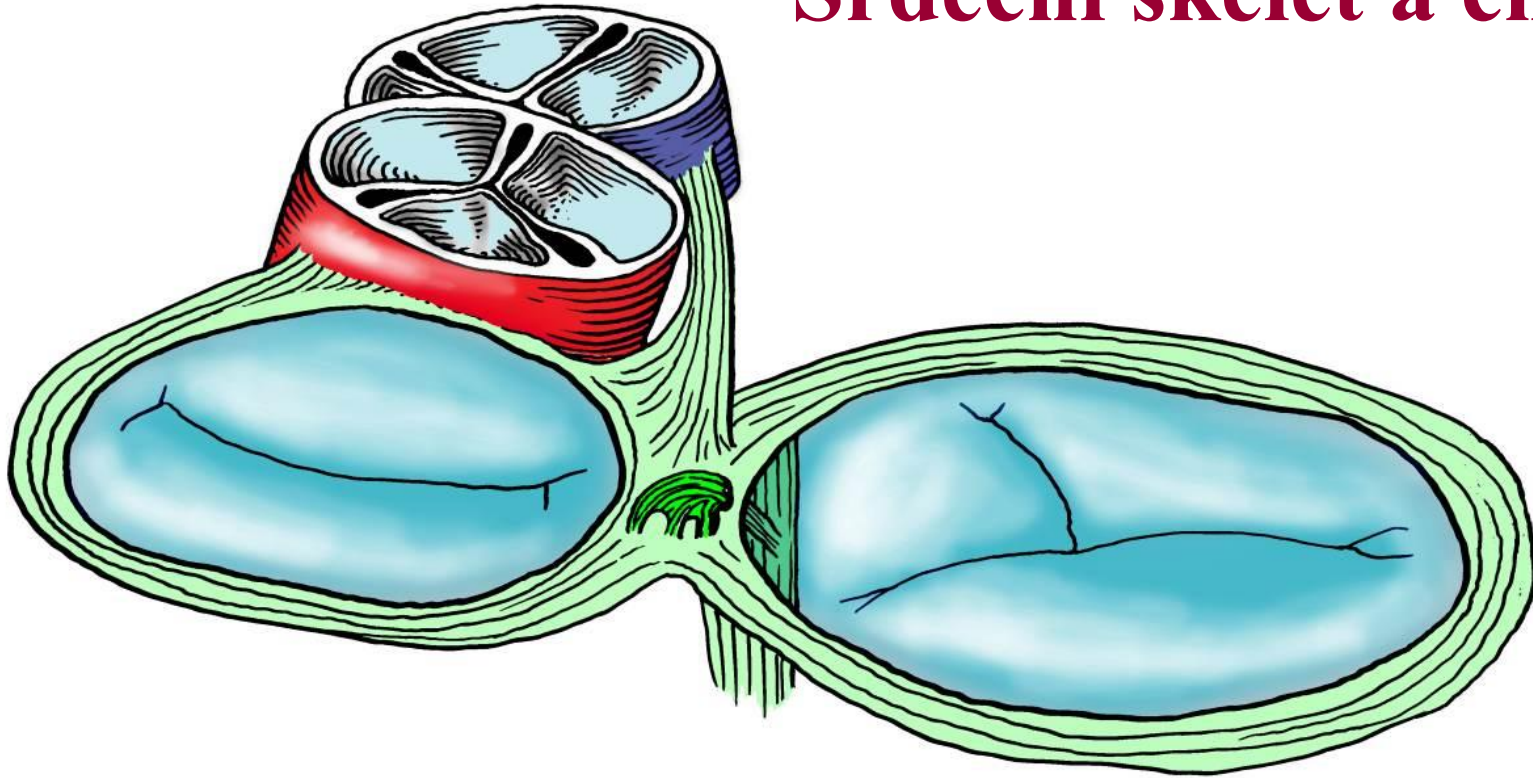
Typy zlomenin krčku femuru



Karel IV – 1316-78



Srdeční skelet a chlopně



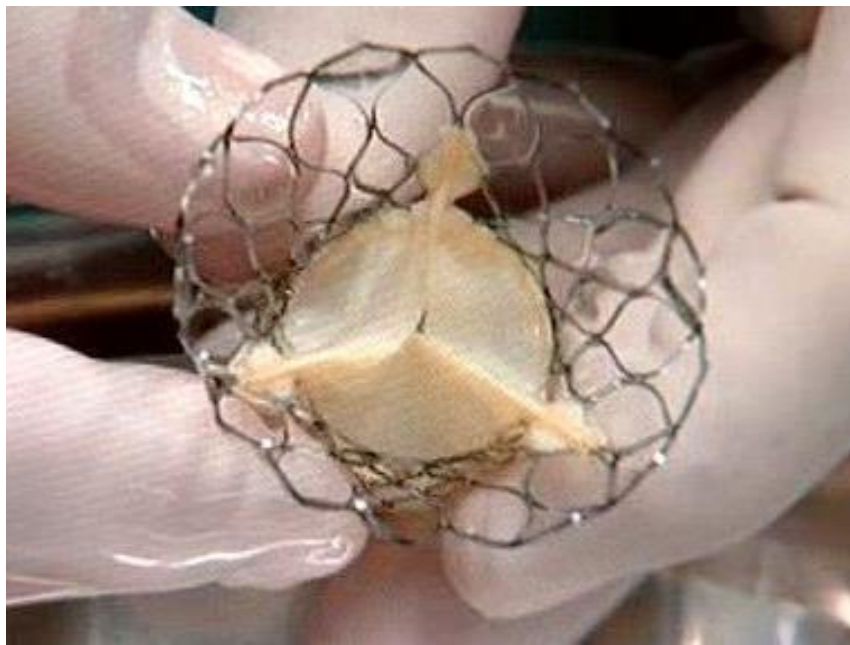
- mezi síněmi a komorami a komorami a velkými tepnami jsou chlopně – propouští krev pouze jedním směrem
- do pravé komory - trojcípá chlopeň
- pravé komory do plicnice – poloměsíčitá chlopeň
- do levé komory – dvojcípá (mitrální) chlopeň
- levé komory do aorty – aortální chlopeň



Normální proudění přes
aortální chlopeň v průběhu
systoly



Zpětný tok (regurgitace)
přes aortální chlopeň
v průběhu diastoly



Umělá srdeční chlopeň
zaváděná vpichem přes třísla



Operace **srdečních chlopní** představují zhruba polovinu všech kardiologických zákroků; druhá nejpočetnější skupina po operacích **bypassových**. Chlopenní vady bývají velmi nebezpečné, pokročilá stadia je třeba vždy řešit. Pacient dlouho bez příznaků, na srdci dochází ke změnám, které mohou vést ke smrti.

Cévní protéza (PET pletenina)

V.Švorčík, vaclav.svorcik@vscht.cz

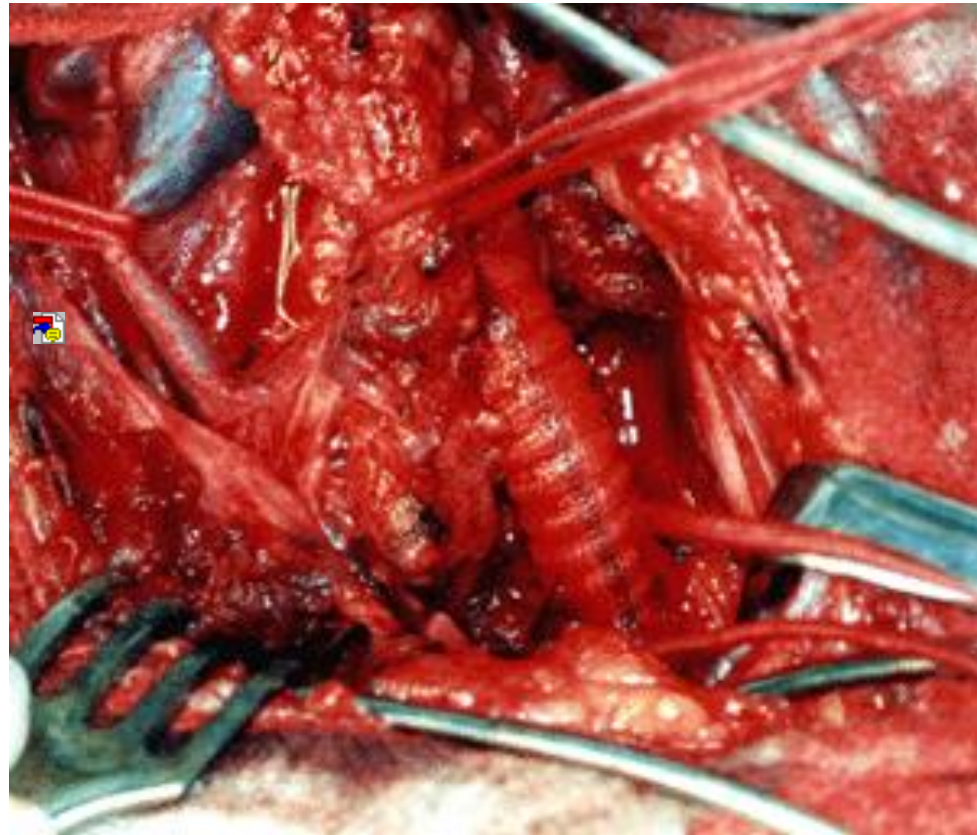
vlákna bez kolagenu

přidat kolagen nebo
expozice v pacientovi krvi

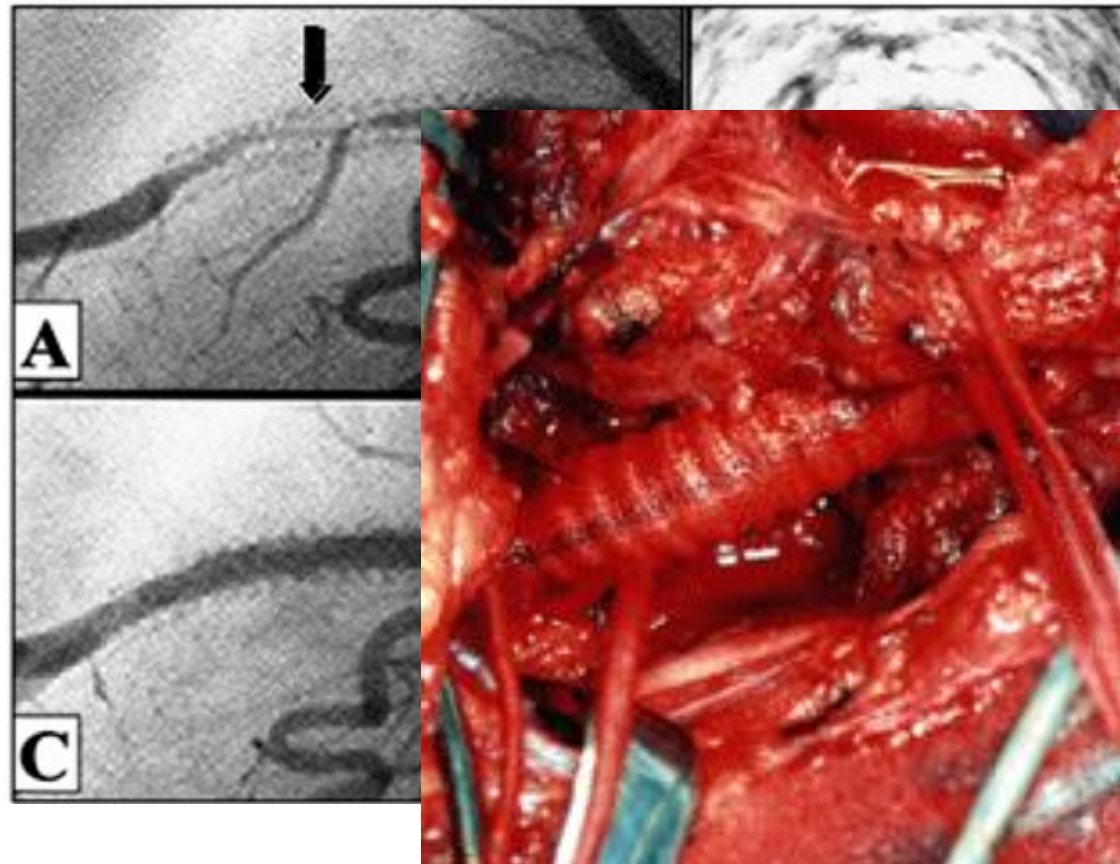
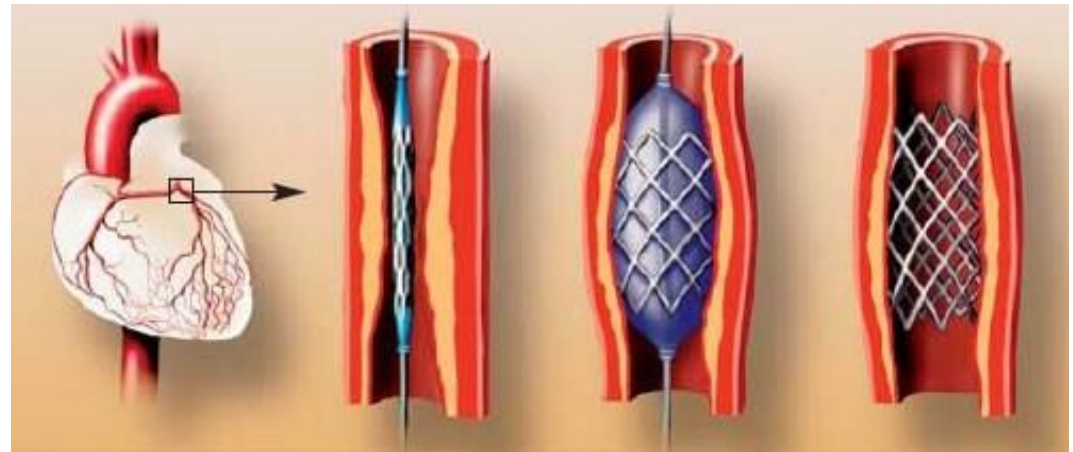
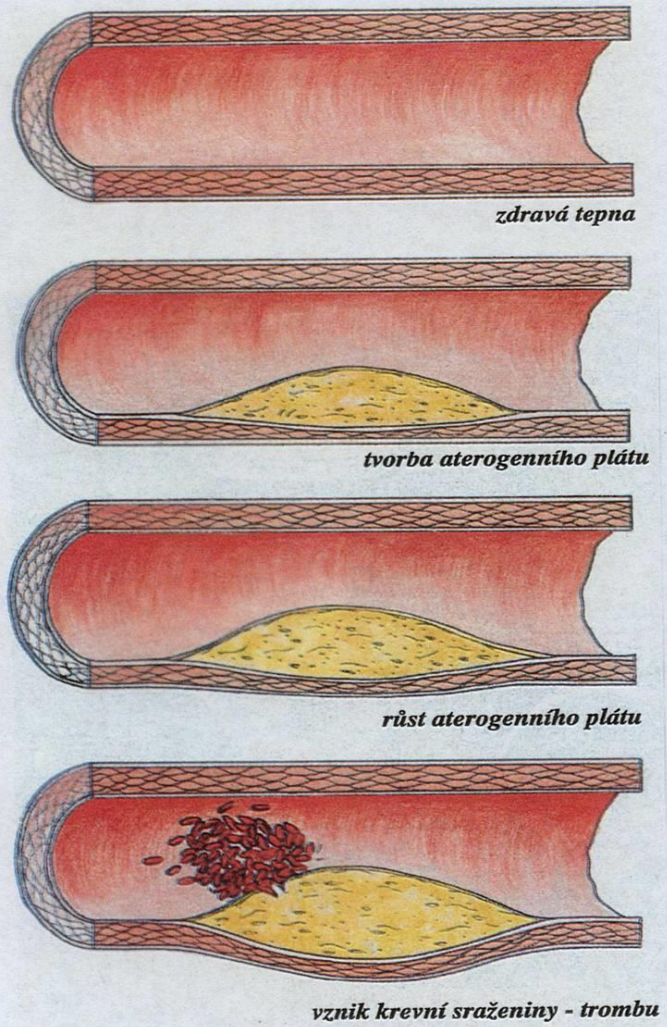


vlákna s kolagenem

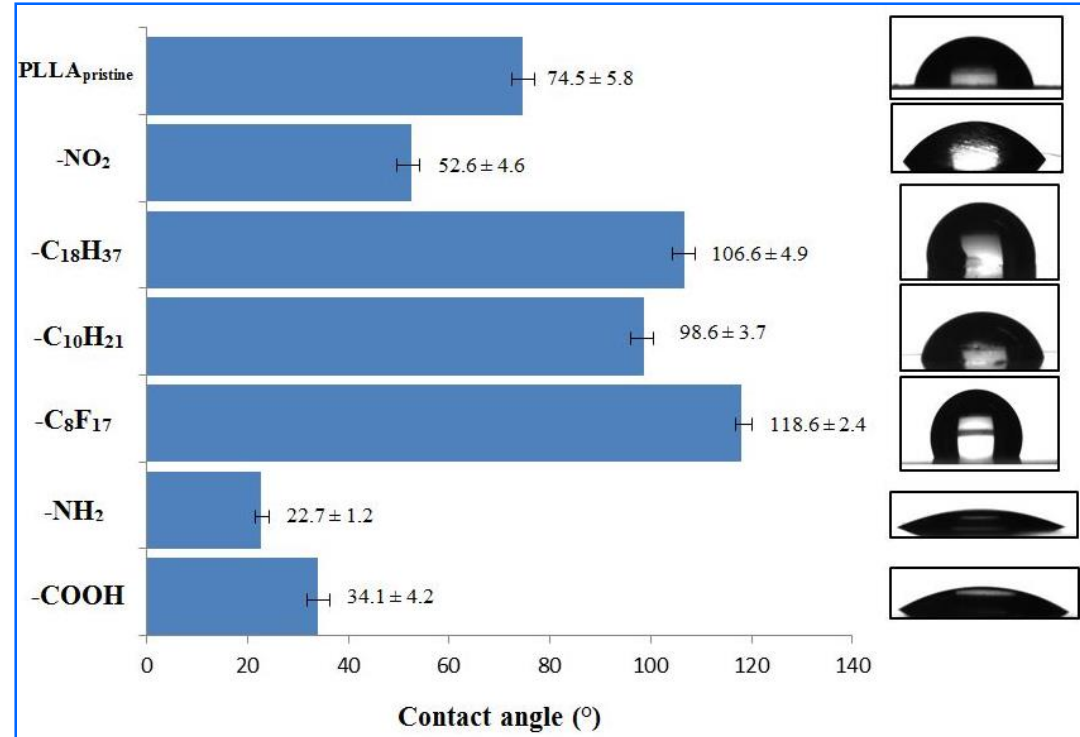
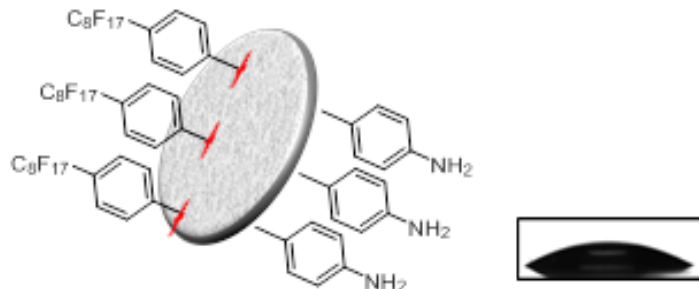
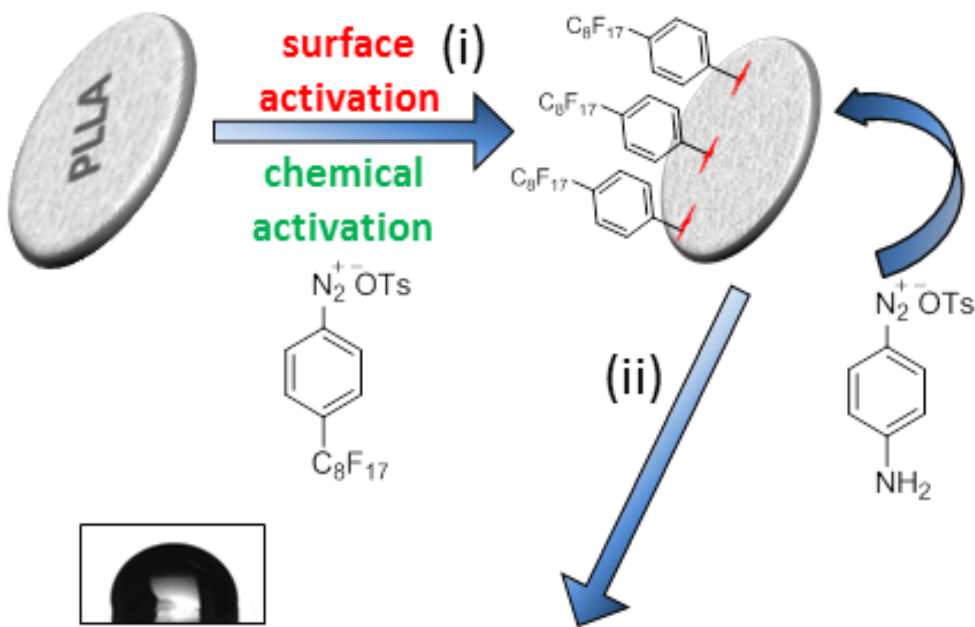
kolagen „ucpává“ tkaninu



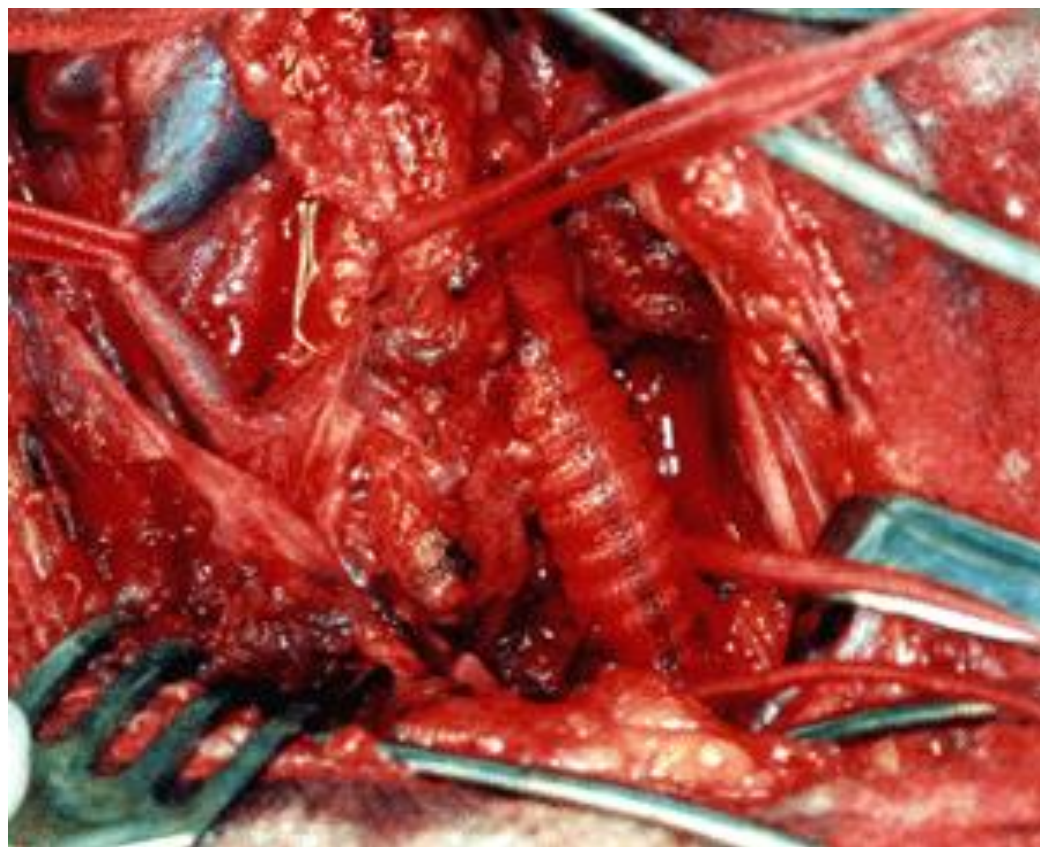
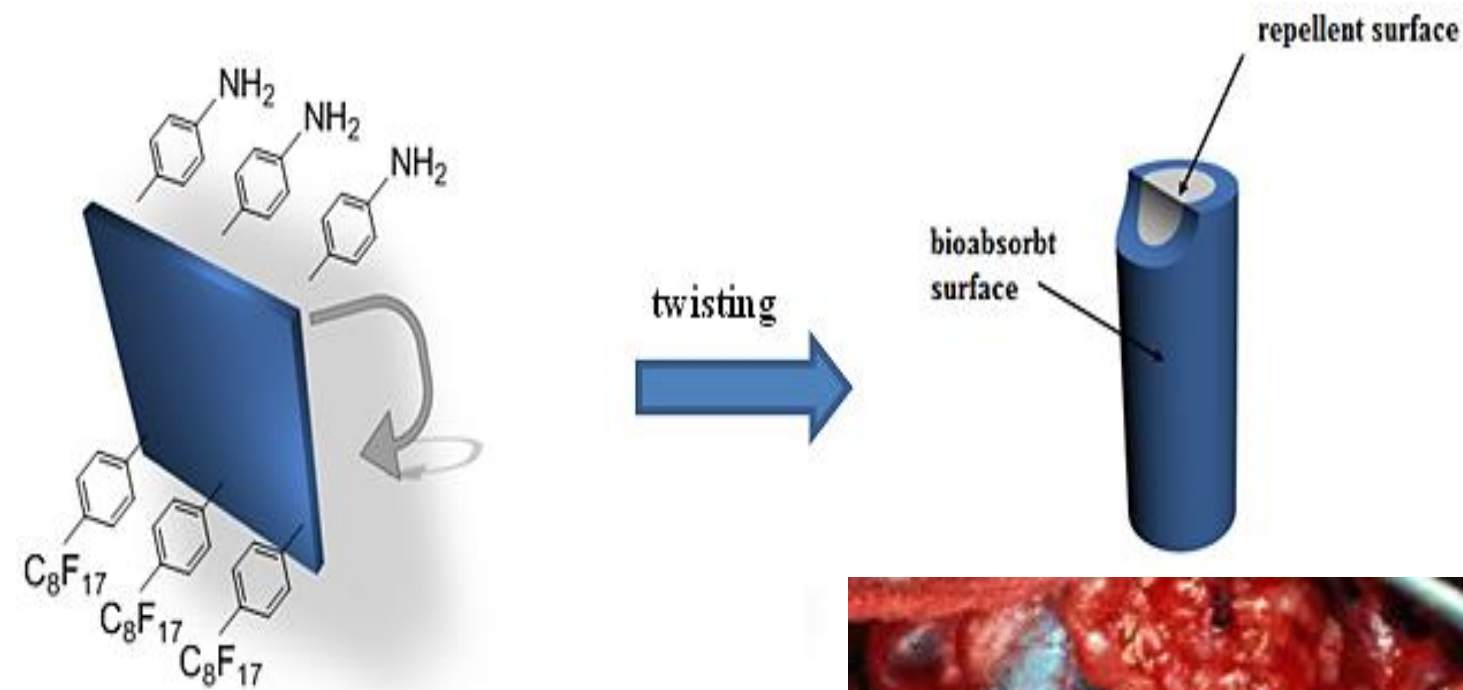
bílkoviny s vláknitou strukturou (např. keratin a kolagen)- skleroproteiny
hlavní součást vazivových a podpůrných tkání (kůže, vlasu, nehtů)



Aktivní nádrady cév



K.Bastekova, O.Guselnikova, P.Postnikov, R.Elashnikov, M.Kunes, Z.Kolska, V.Švorčík, O.Lyutakov, Appl. Surf. Sci. 397, 226-234 (2017).



K.Bastekova, O.Guselnikova, P.Postnikov,
R.Elashnikov, M.Kunes, Z.Kolska,
V.Švorčík, O.Lyutakov, Appl. Surf. Sci.
397, 226-234 (2017).