



# Biomateriály, hydrogely, 3D biotisk a dynamické kultivační systémy

v aplikaci pro cévní a tkáňové náhrady

doc. Ing. Roman Matějka, Ph.D.

[roman.matejka@cvut.cz](mailto:roman.matejka@cvut.cz)

BSC – biosystém člověka

Inovováno za podpory projektu IP – „Inovace a propojení výuky zaměřené na metody testování biofyzikálních vlastností živých tkání a buněk“

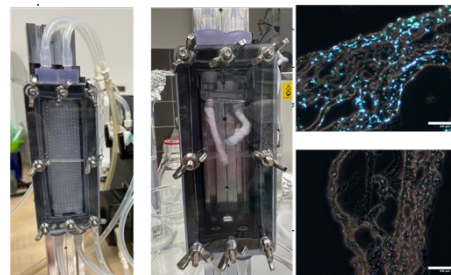
V prezentaci jsou použity ilustrační výsledky které vznikly v rámci spolupráce dalších pracovišť



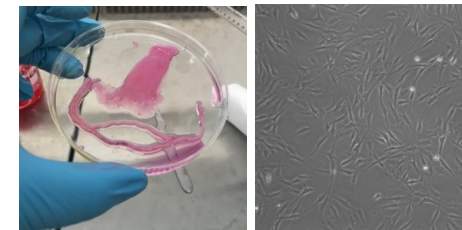
# Příklad využití biomateriálů – cévní náhrady

- Potřeba **cévních náhrad a záplat**
  - Zlatý standard – autologní tkáň – nedostatek
  - Alogenní ze zemřelých dárců – nedostupné k okamžitému použití
  - Syntetické náhrady – limitace u malých průměru
- Využití vhodného biomateriálu -> **decelularizovaná tkáň**
  - Minimální imunogenicita
  - Zachování mikrostruktury ECM
- Modifikace substrátu -> **osídlení imunoprivilegovanou kulturou kmenových buněk**
  - Minimalizace trombogenicity
  - Schopnost remodelace
- **Ověření v animálním modelu**

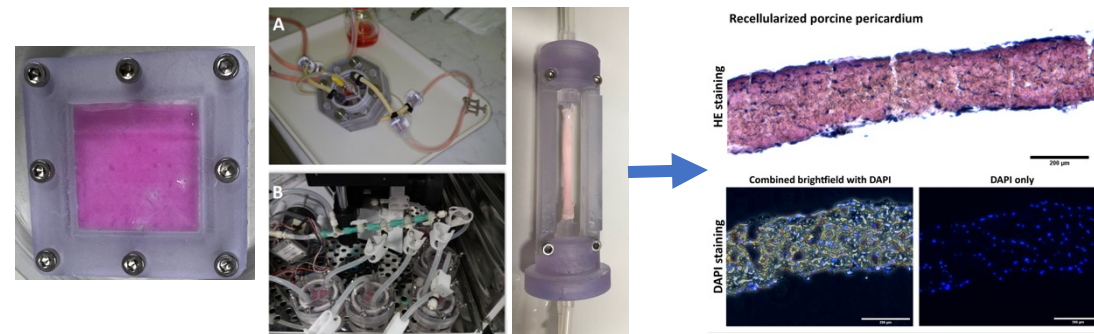
## Decelularizace tkání



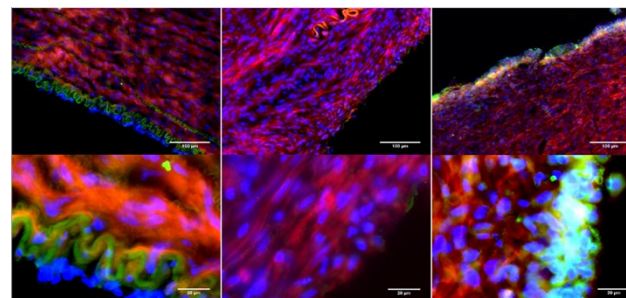
## Kmenové a stromální buňky



## Rekolonizace v bioreaktoru a příprava implantabilní záplaty



## Hodnocení histologie

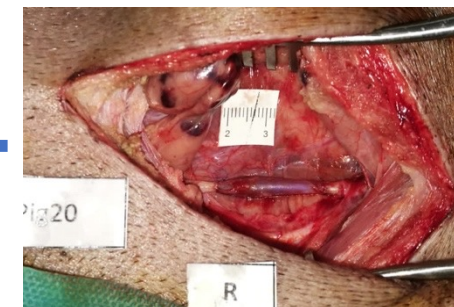


Nativní

Decel.

Rekolon.

## Ověření v animálním modelu



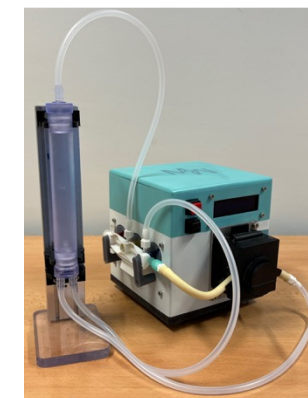
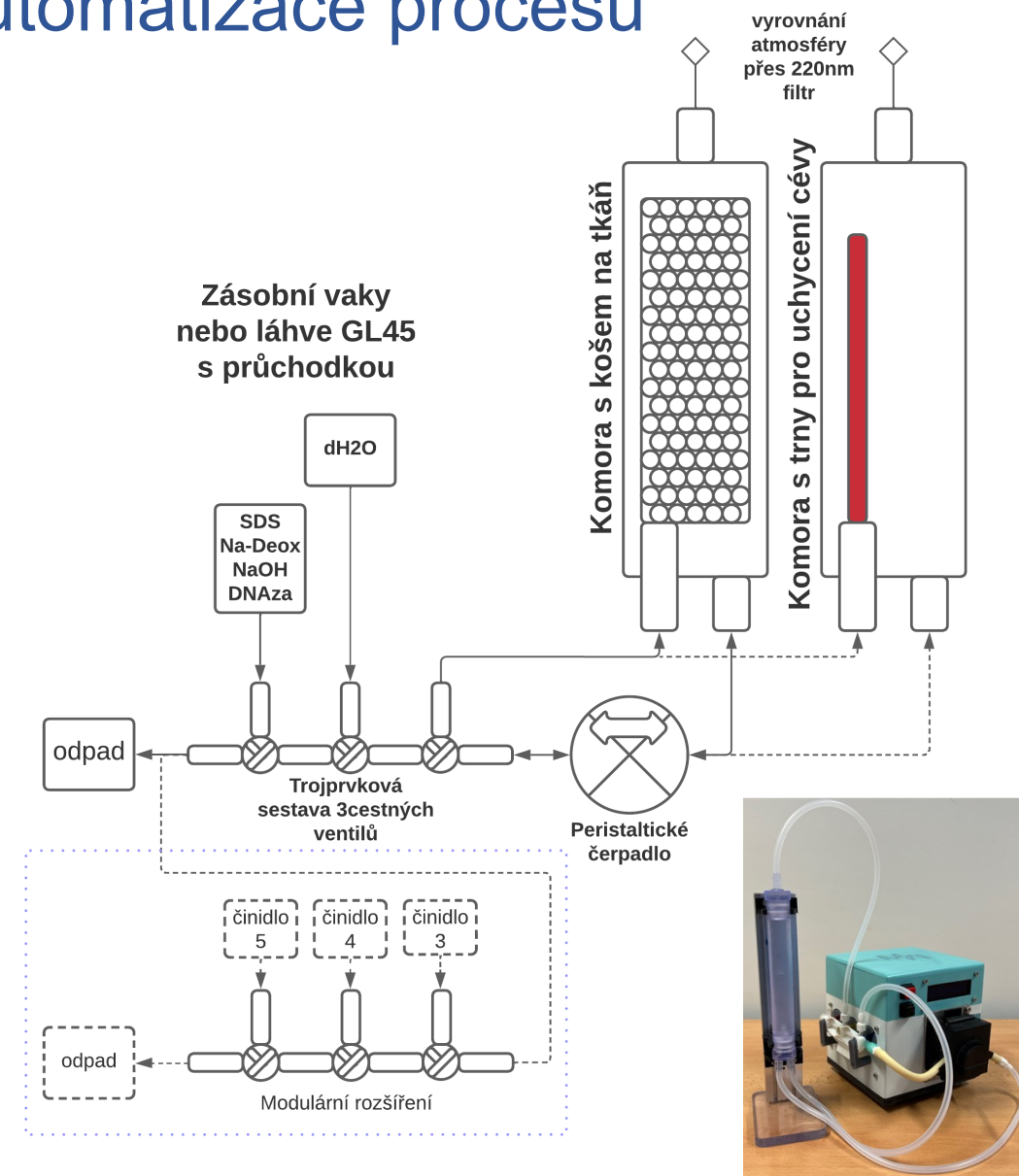
# Decelularizace tkání a automatizace procesu

- Odstranění původní buněčné hmoty a minimalizace imunogenicity konstruktu při zachování mikrostruktury ECM
- Automatizace procesu v systému se speciální komorou vzhledem k časové náročnosti 24 – 72 hodin dle typu tkáně
- Optimalizováno pro perikard a cévní tkáň
- Ověření reziduí zbytkové RNA a DNA z lyzátů sušiny tkání
- Testy sterility pomocí BACTEC a Ph.Eur 4

## Srovnání množství DNA v nativní a decelularizované tkáni

(analýza forenzním kitem na lyofilizované tkáni, vztaženo na sušinu, n=10)

Tkáň	Nativní tkáň		Decelularizovaná	
	DNA v ng/mg tkáně		DNA v ng/mg tkáně	
	Střední hodnota	Směr. odch.	Střední hodnota	Směr. odch.
Prasečí perikard	3563	324	29	4
Prasečí a. carotis	4486	568	38	5
Prasečí v. jugularis	3926	421	32	4
Prasečí n. vagus	3217	620	81	18

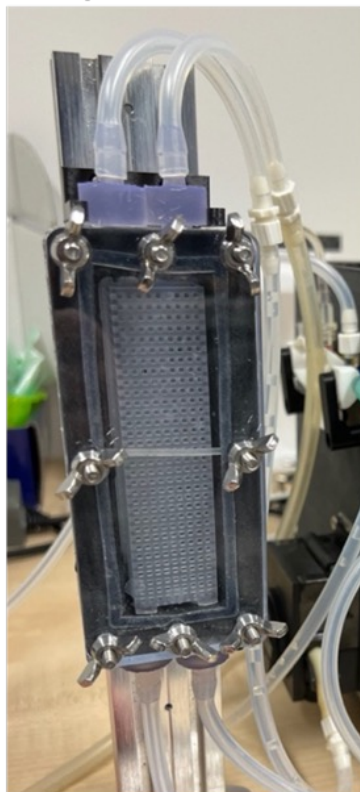






# Decelularizace tkání - perikard

Komora s košem  
pro tkáň

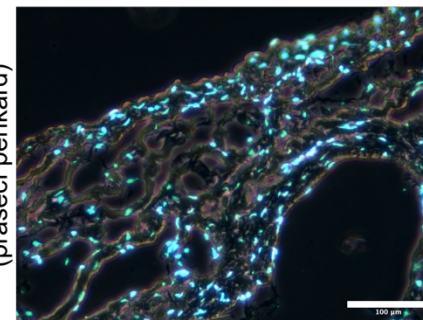


Komora s  
průtočnými trny  
pro cévy

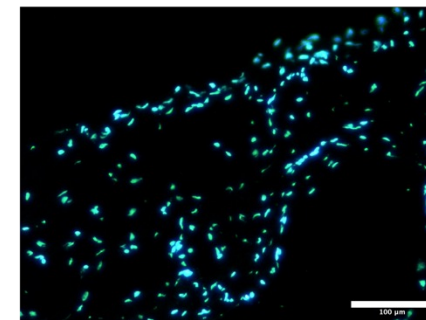


Snímek kombinující světlé pole a  
fluorescenci DAPI

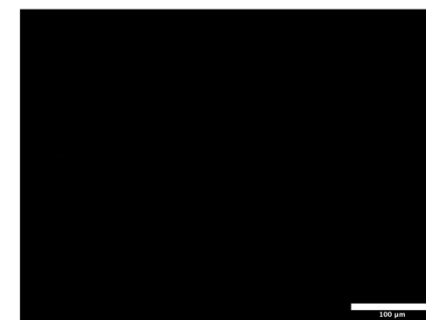
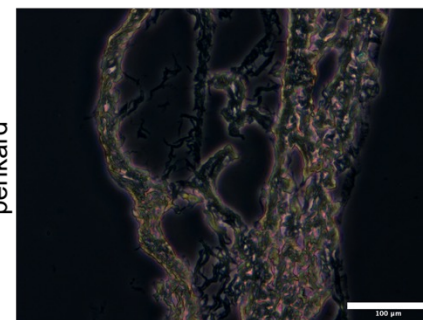
Nativní tkáň - kontrola  
(prasečí perikard)



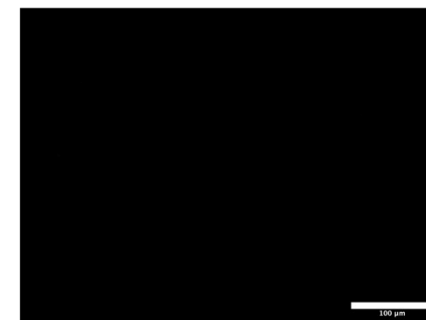
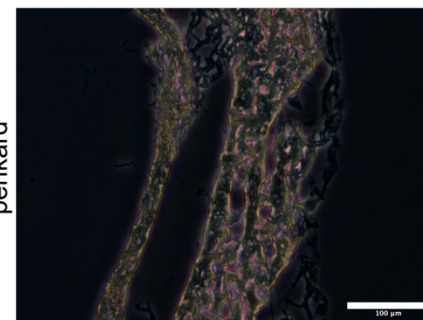
Fluorescenční snímek jader s DAPI



Decelularizovaný prasečí  
perikard



Decelularizovaný ovčí  
perikard

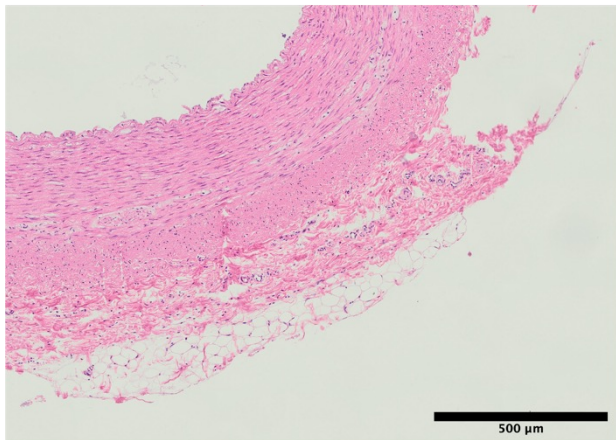




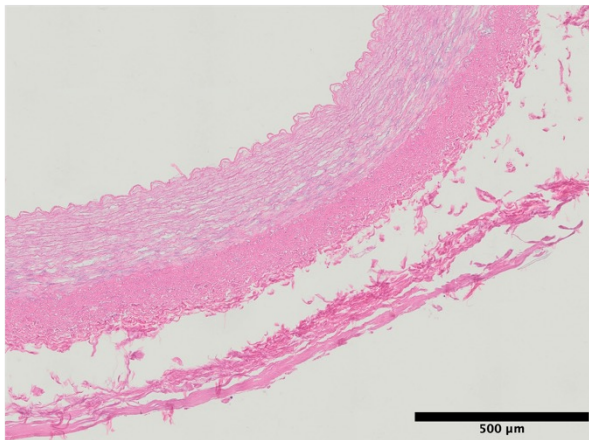


# Decelularizace tkání - céva

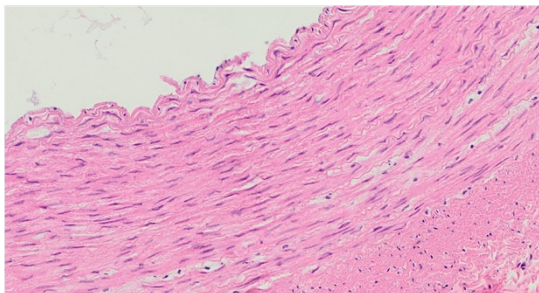
Prasečí *a. carotis* nativní



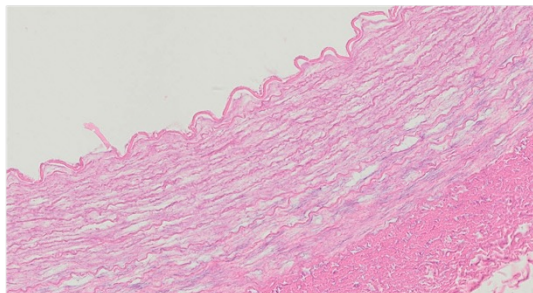
Prasečí *a. carotis* decelularizovaná



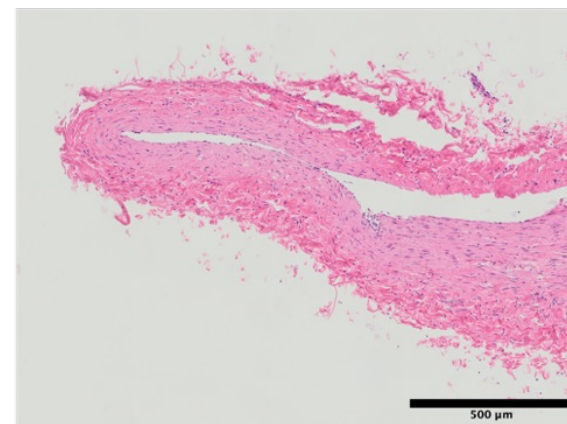
Detail stěny



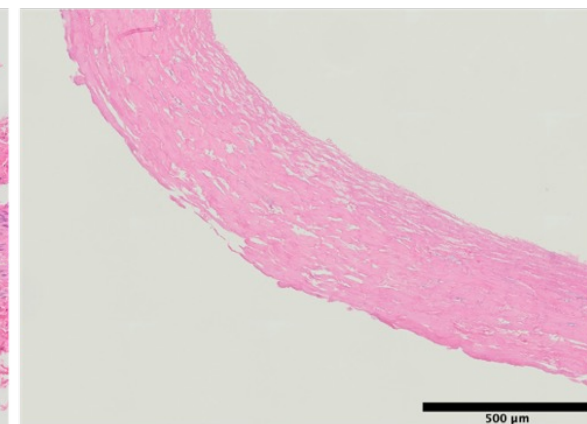
Detail stěny



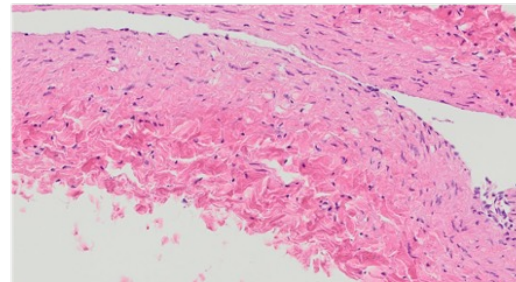
Prasečí *v. jugularis* nativní



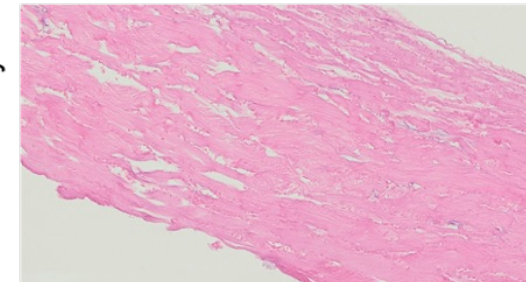
Prasečí *v. jugularis* decelularizovaná



Detail stěny



Detail stěny

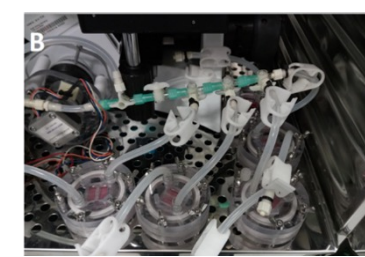
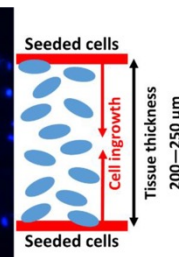
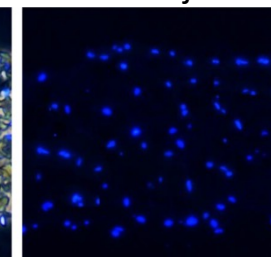
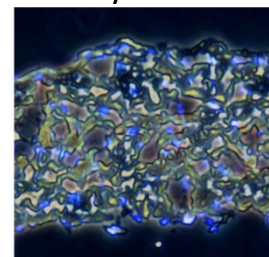
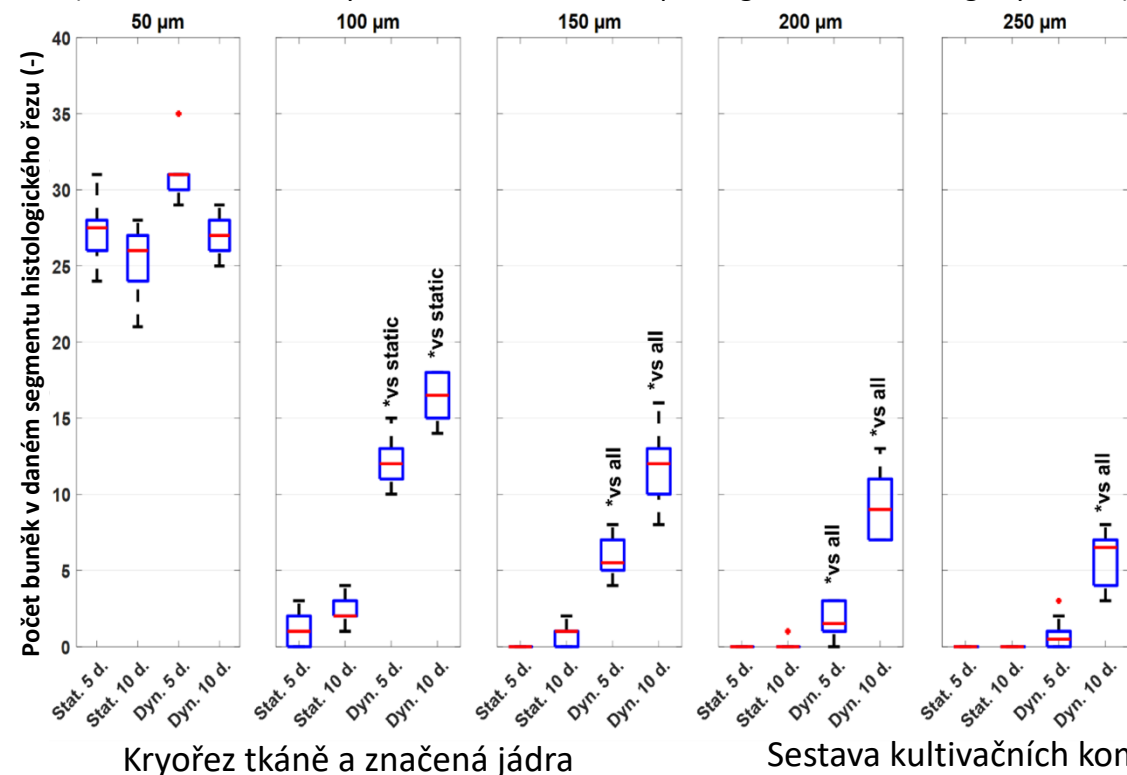


# Rekolonizace decelularizovaných tkání v reaktoru

- Uchycení decelularizované tkáně v kultivační komoře
- Stimulační systém - mikroperfúze se zátěží 15.9/10 kPa (120/80 mmHg), při 1 Hz
- Prasečí stromální buňky z tukové tkáně pASC a z pupečníků (Wortonova rosolu) pWJC
- Podpora proliferace diferenciaci do fenotypu hladkého svaly
- Zrychlená penetrace a rekolonizace tkáně 5 – 7 dní
- Limitace pro větší substrát >20x20 mm
  - nehomogenita osazení

Optimalizace  
osazení a  
rekolonizace v  
reaktoru za 5 dní

Schopnost penetrace buněk do decelularizované tkáně  
(srovnání statické a dynamické kultivace, v 50μm segmentech histologických řezů)

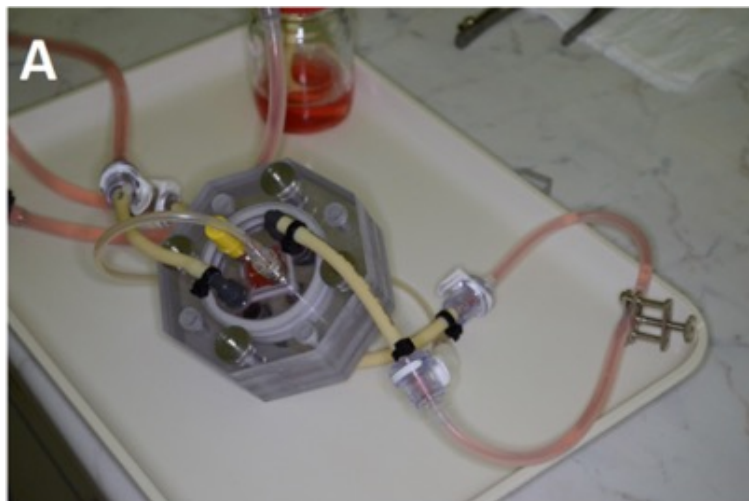


MATEJKA, R., KONARIK, M., STEPANOVSKA J., LIPENSKY J., CHLUPAC J., TUREK D., PRAZAK S. et al. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. Applied Sciences-Basel, 2020, 10(16).

Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, P. KNEPPO P., E. BRYNDA, T. RIEDEL et. al. Užitený vzor 30705  
Mikroperfúzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK Užitený vzor 33917

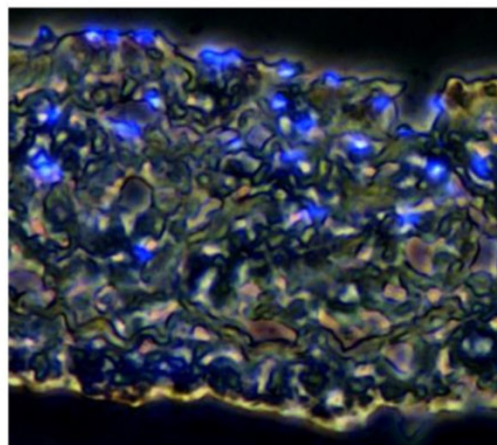


# Rekolonizace v tlakovém reaktoru

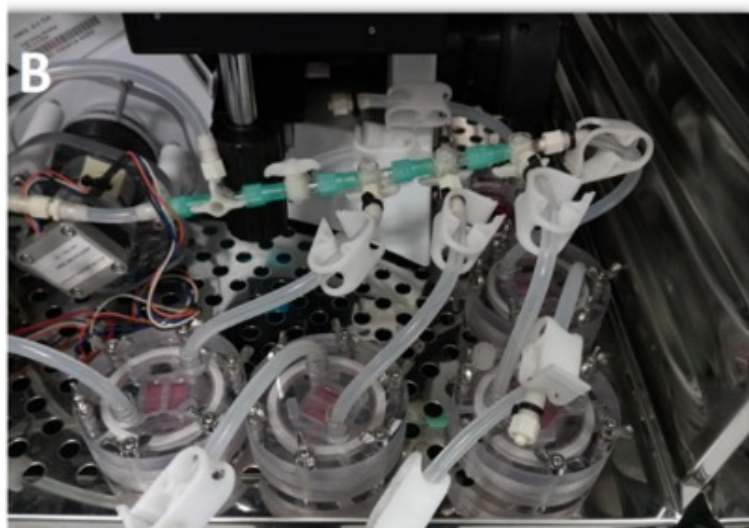
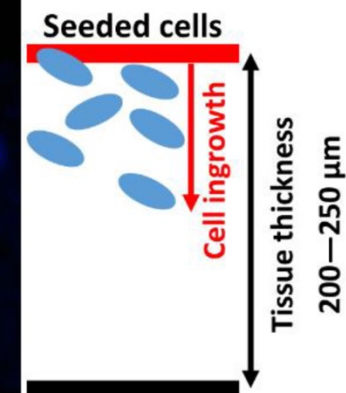
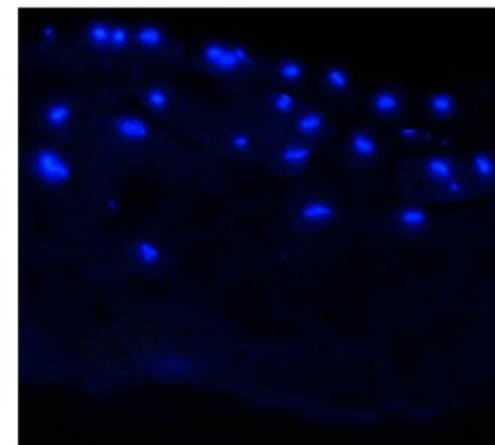


Single side cell  
seeding procedure

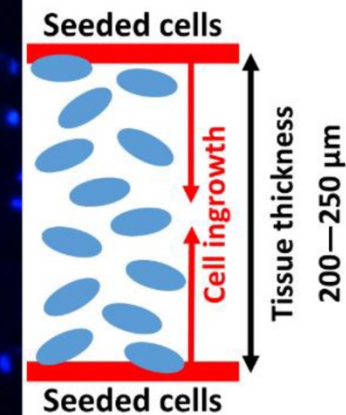
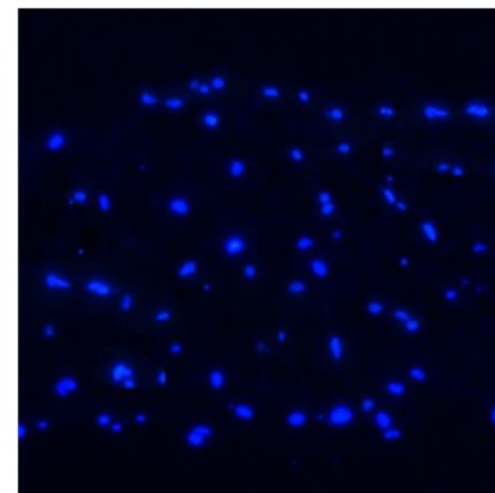
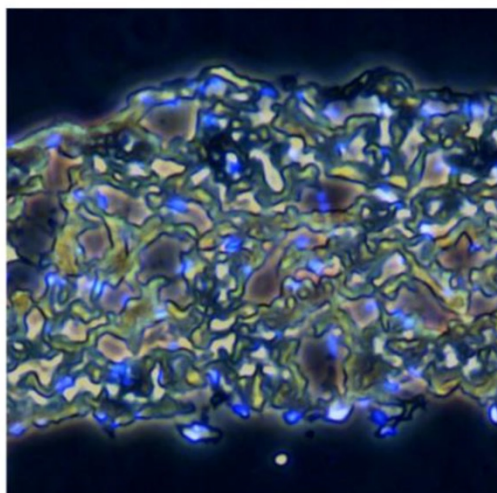
Combined brightfield with DAPI



DAPI only



Both side cell  
seeding procedure

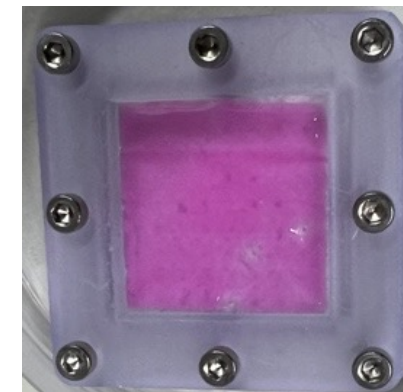




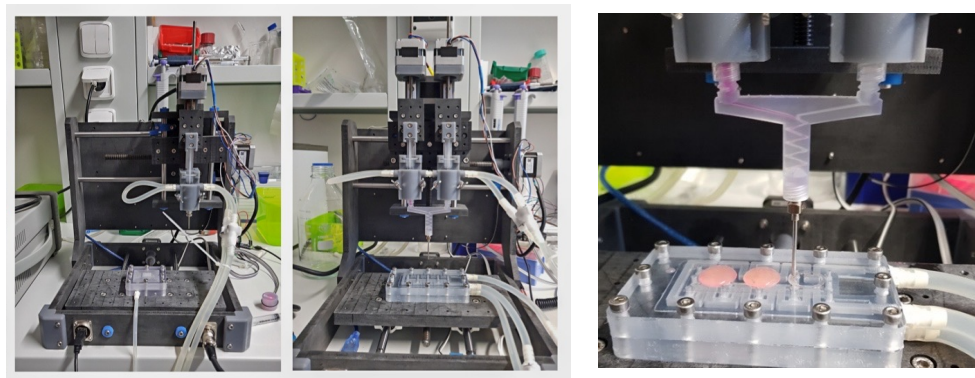
# Použití 3D biotisku pro rekolonizaci tkání

- Lyofilizace tkáně pro zvýšení schopnosti adheze gelu na substrát
- Vytvoření systému pro uchycení substrátu
  - Vakuová fixace vzorků – zajištění roviny při tisku
  - Vyhřívaná základna se sterilizovatelnou vložkou
  - Chlazený extruder s kartuší bioinkoustu
- Systém směšování kolagenu a buněčná suspenze
  - Minimalizace degradace bioinkoustu

50 x 50 mm<sup>2</sup>



Příprava konstruktu

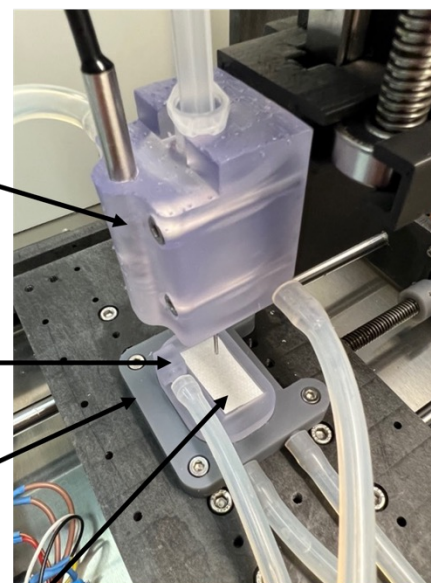


Směšovač kolagenu a buněčné suspenze

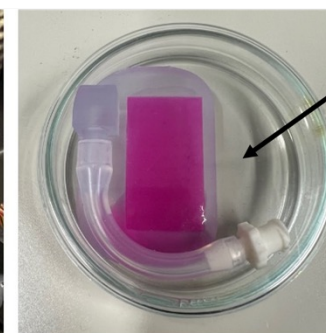
Chlazený extrudér

Vložka do základny  
s kanálky pro  
uchycení pomocí  
vakua

Vyhřívaná základna



Decelularizovaný (+lyofilizovaný)  
substrát



Vložka se substrátem a  
vrstvou kolagenu s  
buněčnou kulturou, pro  
iniciální gelování  
přenesena sterilně do  
inkubátoru

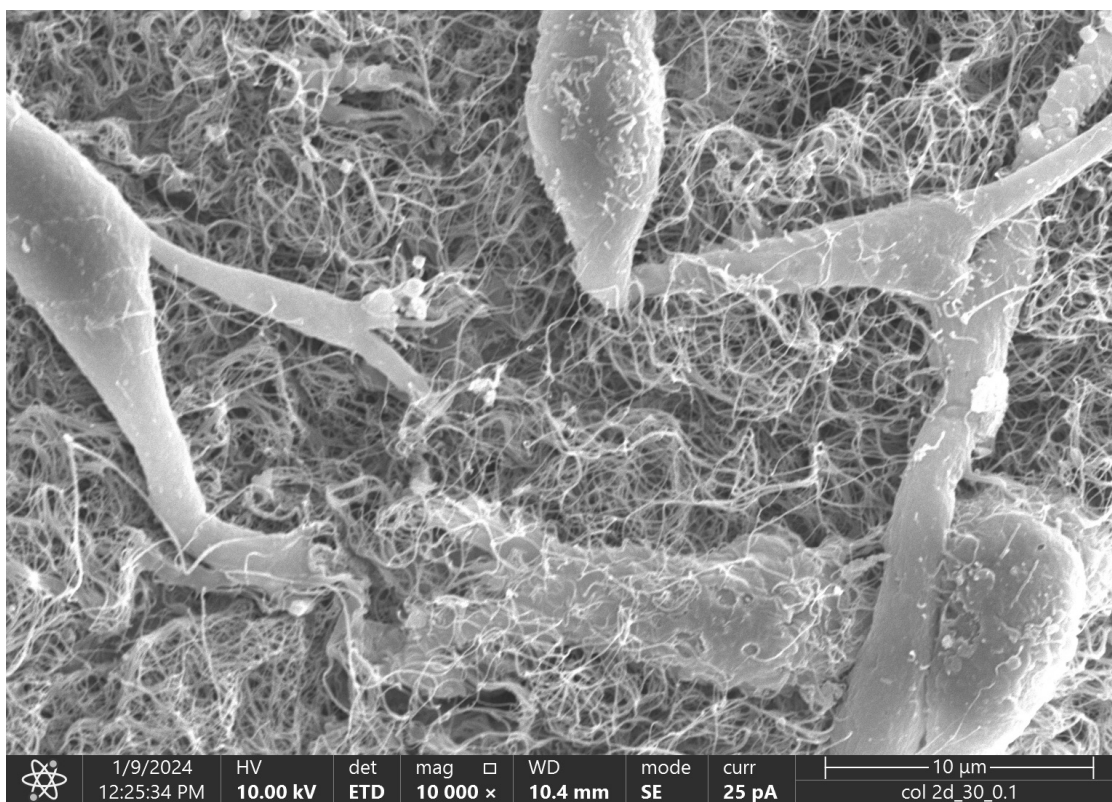


Vrstva s buněčnou  
kulturou v kolagenu  
připravena pro  
uchycení v komoře  
reaktoru

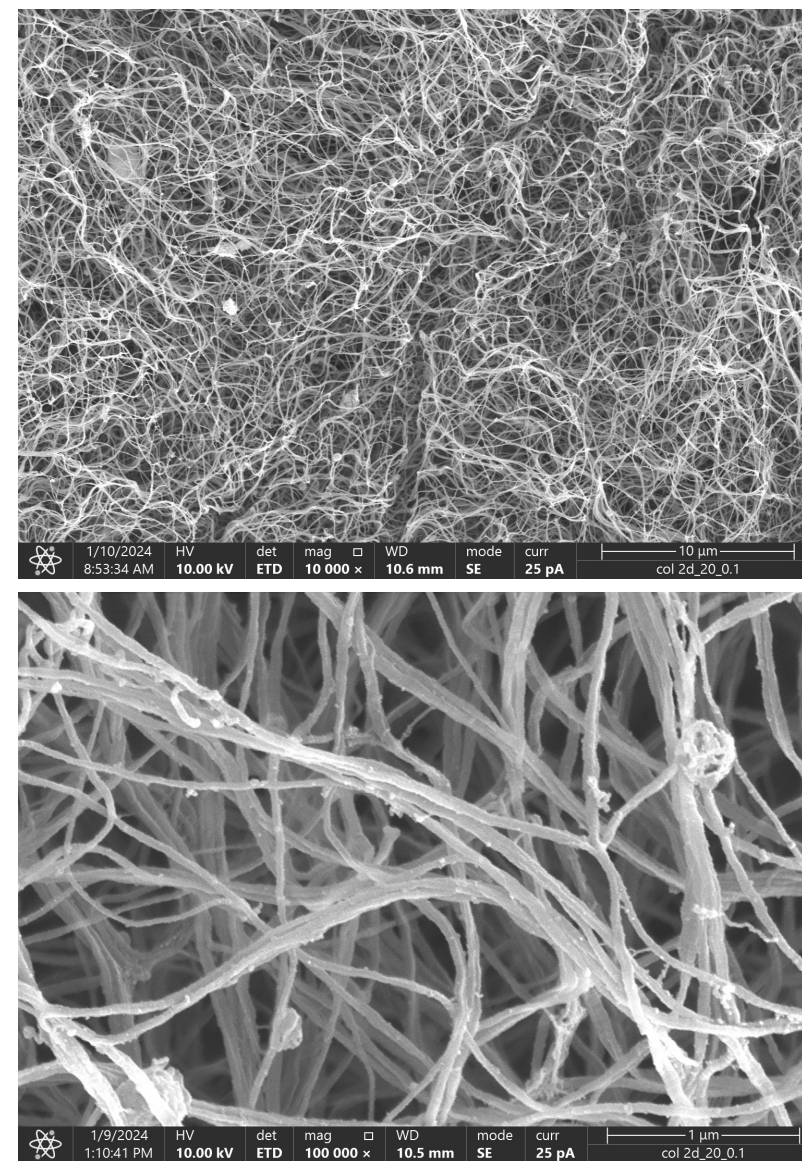


# Kolagenové hydrogely

- Základní stavební materiál ECM
- Tvorba vláknitých struktur
- Možnost depolymerace a repolymerace – 3D biotisk



Stromální buňky rostoucí ve kolagenovém hydrogelu

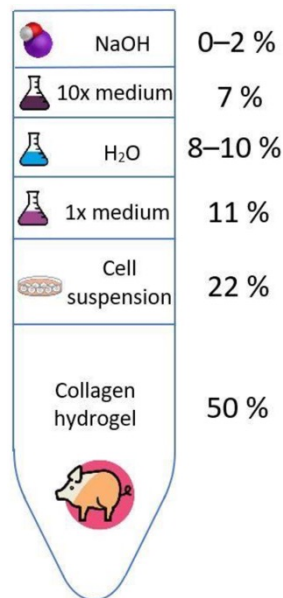


SEM strukturální snímek

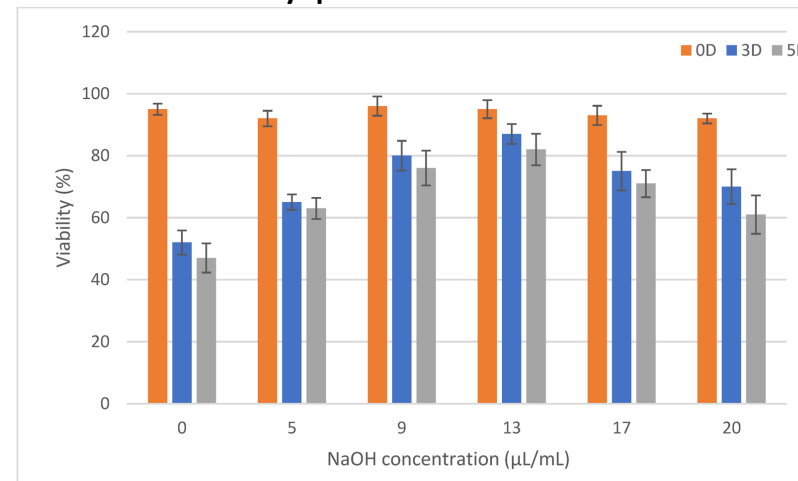
# Modifikace 3D biotisku pomocí kolagenu

- Použití kolagenu jako nosného substrátu
  - Izolace z prasečí kůže, příprava v kys. octové
  - Gelování zajištěno změnou pH a teploty – bez použití aktivátorů
- Modifikace složení gelu a kultivačního média
  - Kolagen tvoří 50 % objemu -> změna koncentrací média a pH
  - Buněčná viabilita
- Modifikace nastavení 3D biotiskárny
  - Rychlost tisku a velikost trysky
  - Iniclace gelování na povrchu
  - Stabilizace bioinkoustu po dobu tisku

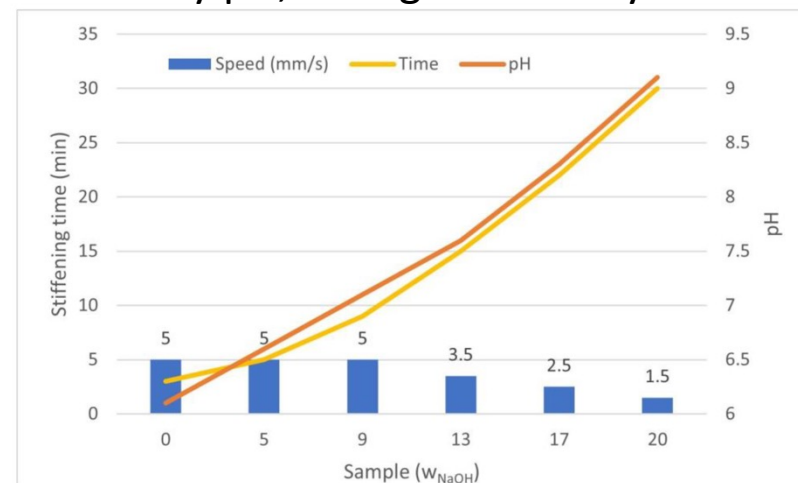
## Optimalizované složení bioinkoustu



## Vliv změny pH na viabilitu buněk



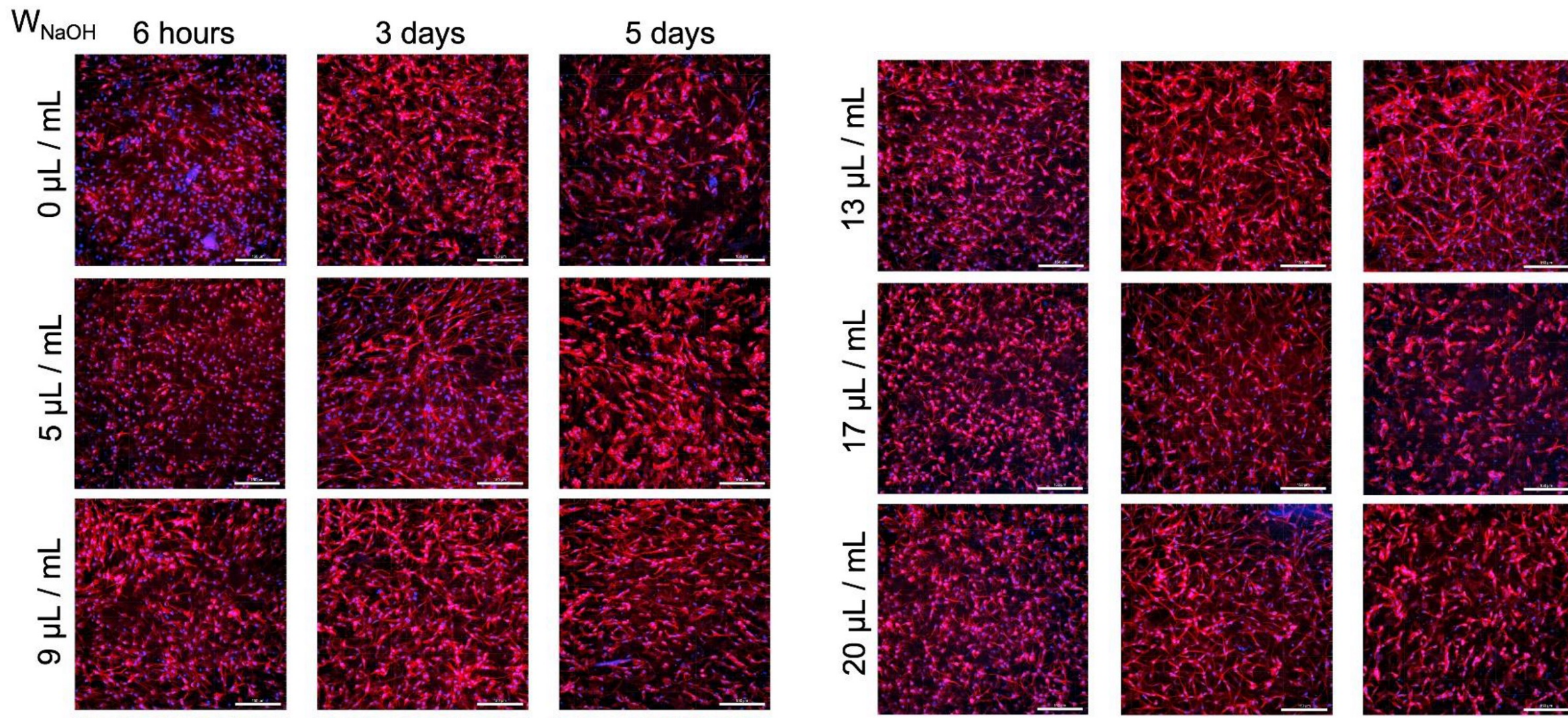
## Vliv změny pH, času gelování a rychlosti tisku







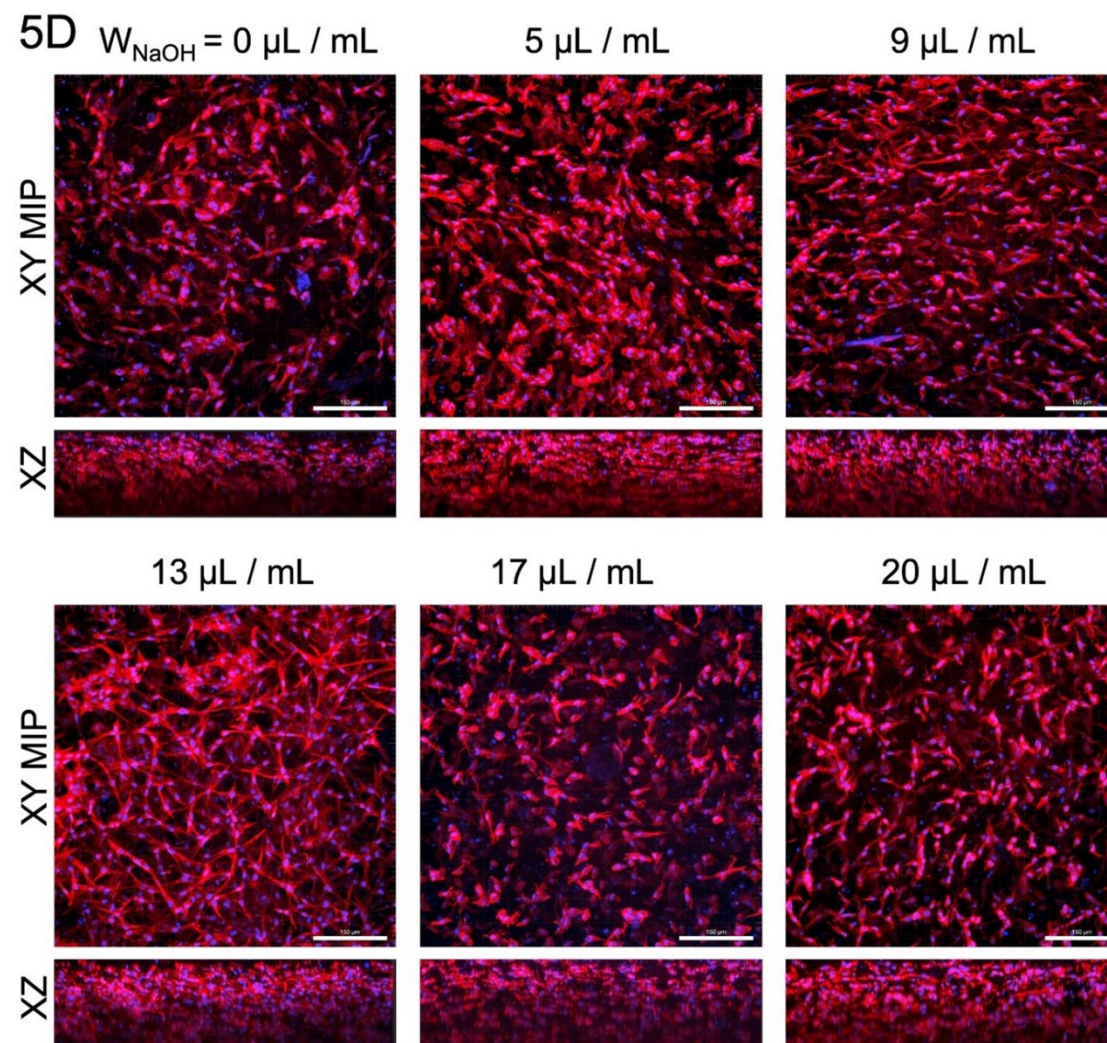
# Konfokální snímky buněk optimalizovaného bioinku





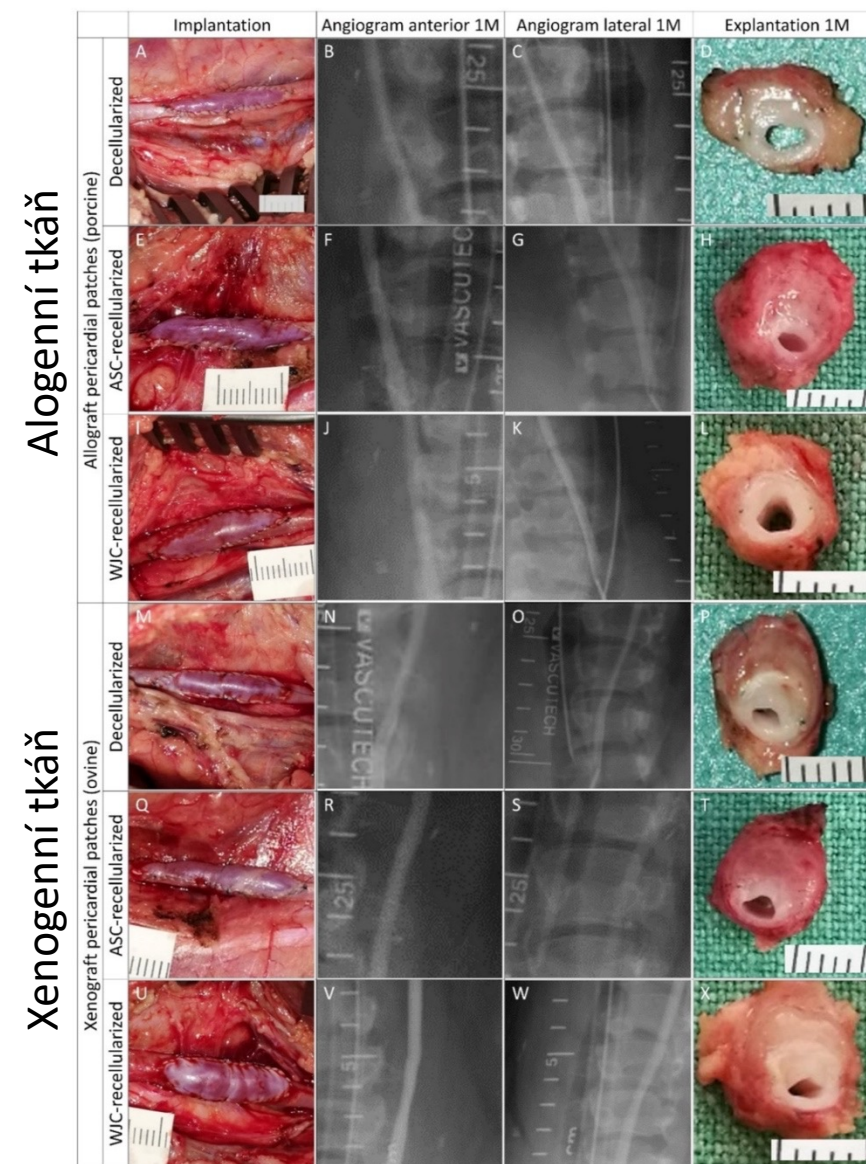


# Konfokální snímky buněk optimalizovaného bioinku



# Kardiovaskulární záplaty v animálním modelu

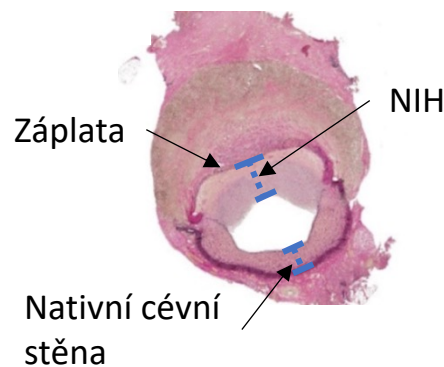
- Implantace kardiovaskulárních záplat na umělý defekt na *a.carotis* u prasete domácího
- Decelularizovaná allogenní tkáň – prasečí perikard
- Decelularizovaná xenogenní tkáň – ovčí perikard
- Osídlení autologními buňkami – prasečí stromální buňky z tukové tkáňě (pASC)
- Osídlení imunoprivilegované alogenní buňky – prasečí kmenové buňky z Wortonova rosolu (pWJC)
- Kontrolní skupina
  - ePTFE Propaten, PET Vascutek
  - XenoSure, BioIntegral NoReact
- Observace 1 měsíc



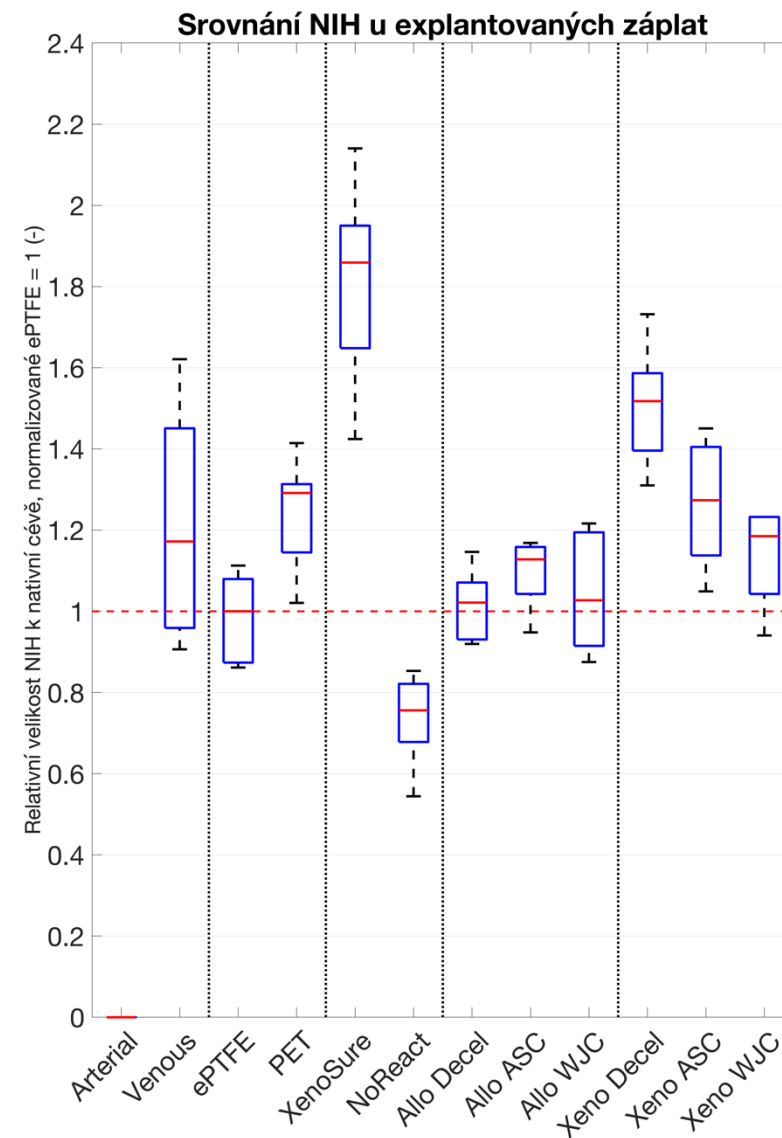
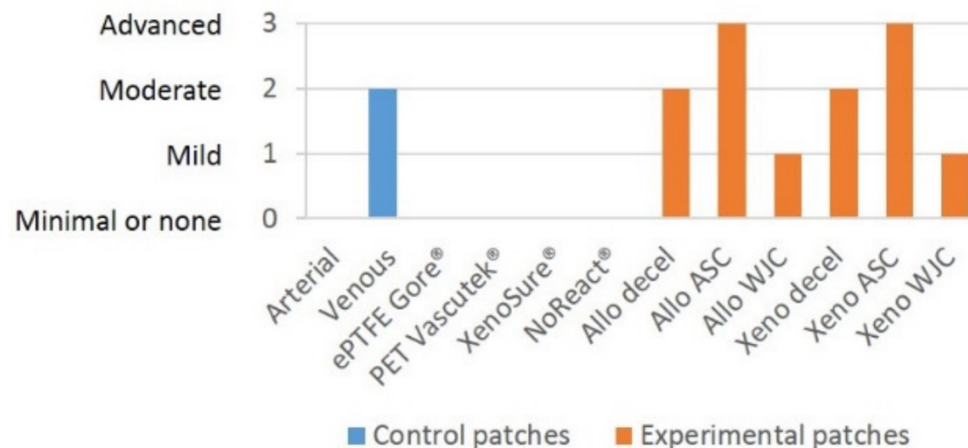


# Kardiovaskulární záplaty – hodnocení explantátů

- Průchodnost záplat
- Tvorba initimální hyperplazie (NIH)
- Formování endotelové vrstvy
- Histologické hodnocení
  - pASC pozorována zvýšena resorpce a schopnost remodelace
  - pWJC pozorována imunomodulace zvláště u xenogenní tkáně.

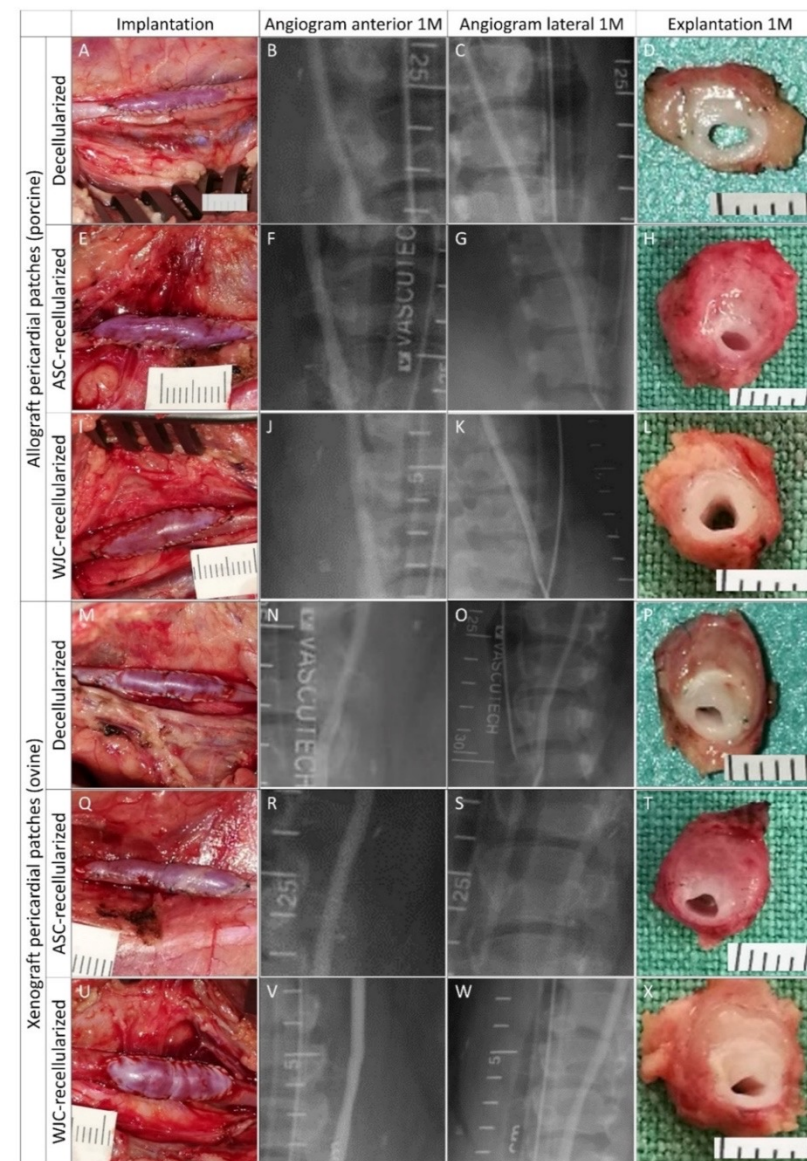
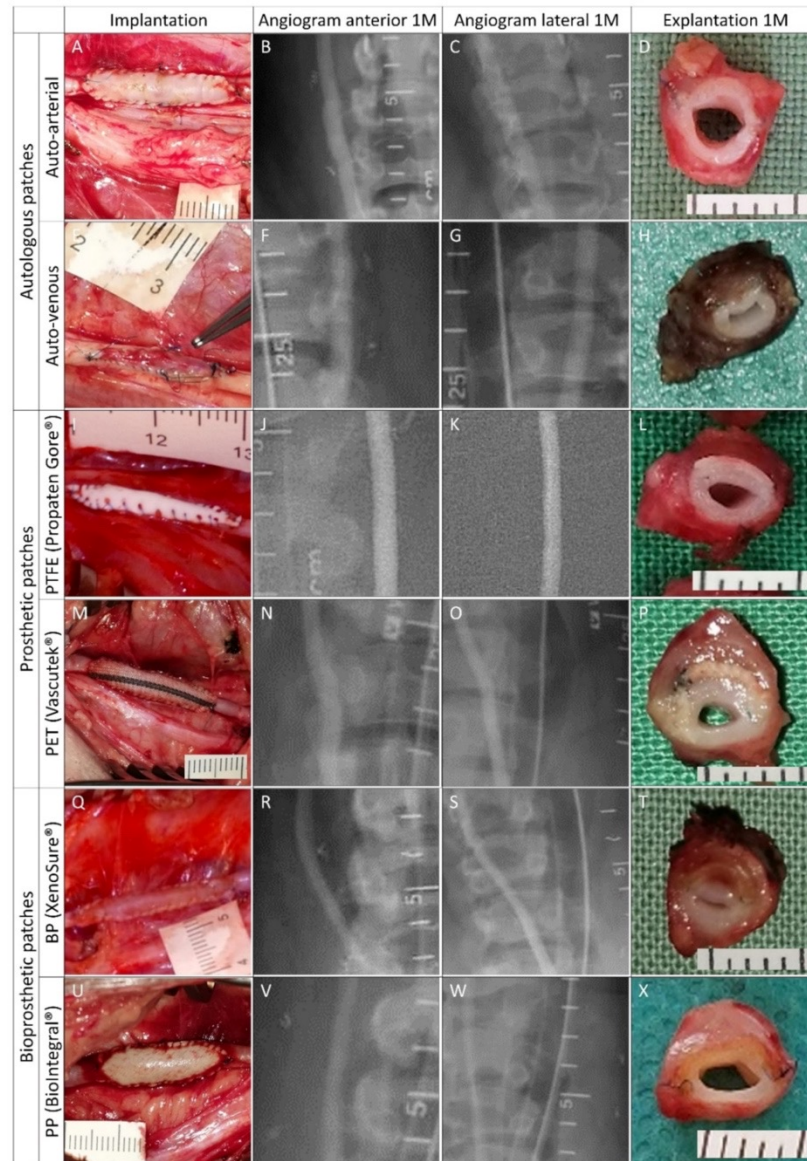


Hodnocení histologický řezů explantátů a jejich resorpce (škála 0 – 3)





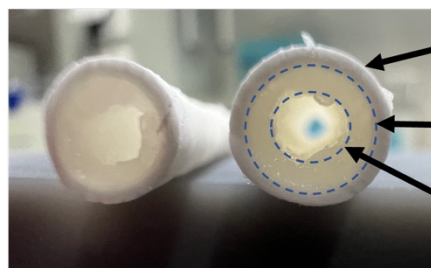
# Kontrolní a připravené implantáty





# Příprava cévních náhrad

- Decelularizované tepenné nebo žilní tkáně
- Problém homogenního osazení tkáně buněčnou kulturou
  - Rotační osazení – vyžaduje substrát bez mikrotrhlin
  - Lyofilizace a extruze kolagenu
- Osídlení pASC a pWJC a kultivace reaktoru generující průtok a tlak
  - Stimulace formování struktury endotelu
- V současné době probíhá animální studie
  - Modifikace chirurgické techniky
  - Použití externí podpory u žilních graftů

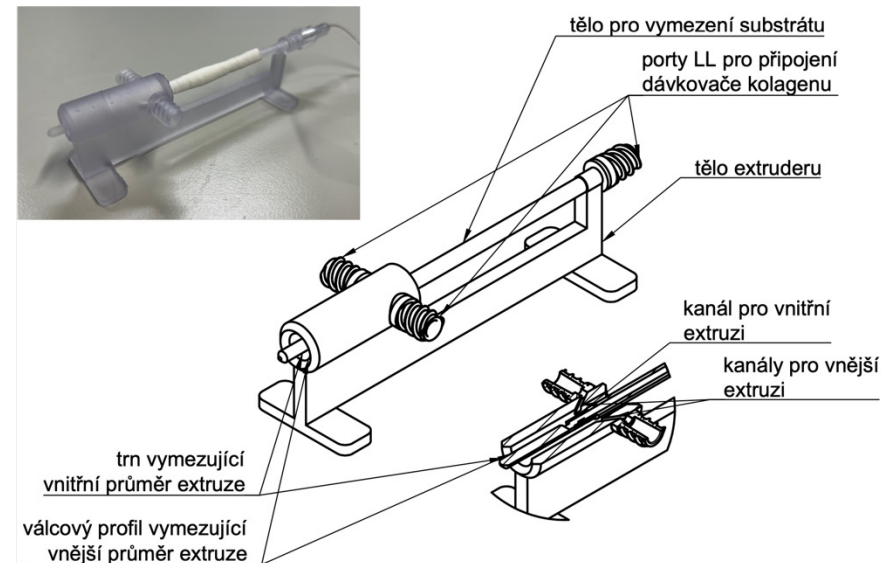


Decelularizovaný a lyofilizovaný substrát

Vnitřní stěna substrátu

Kolagen s heparinem

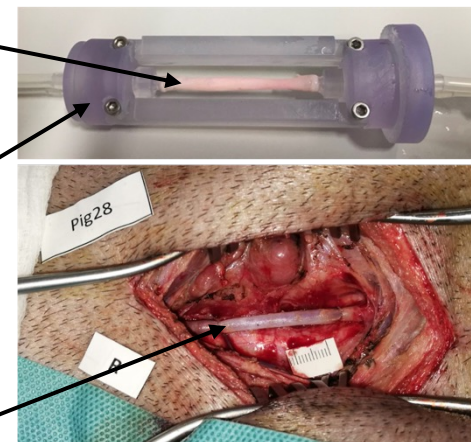
## Sestava pro extruzi kolagenu do cévní náhrady



Tkáň osídlená  
buněčnou kulturou

Kultivační komora  
modulující proudění  
a tlakovou zátěž

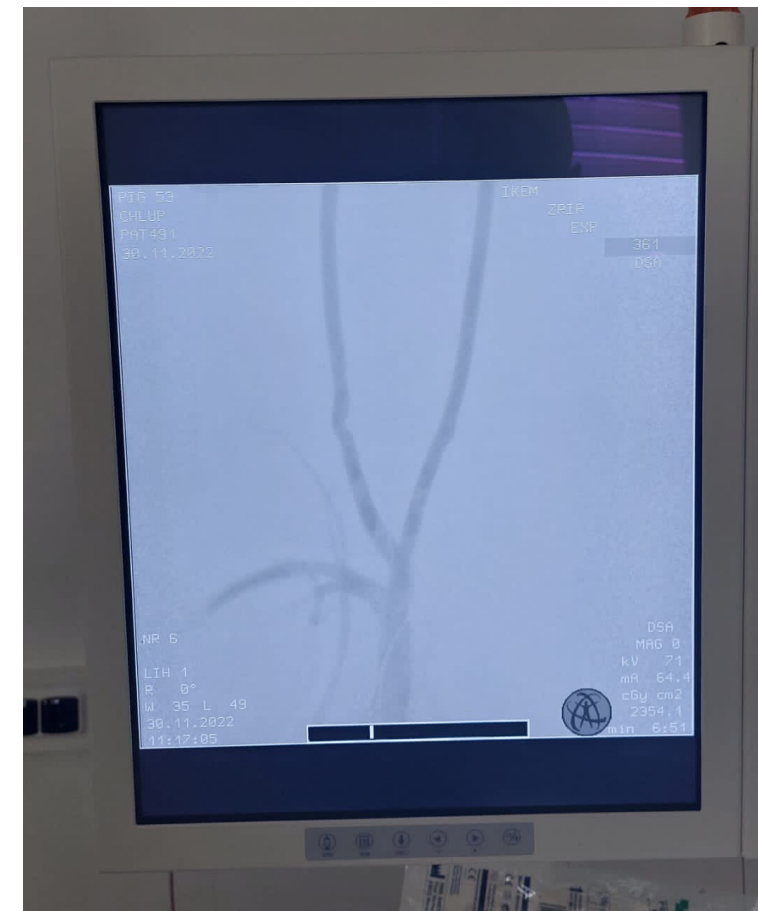
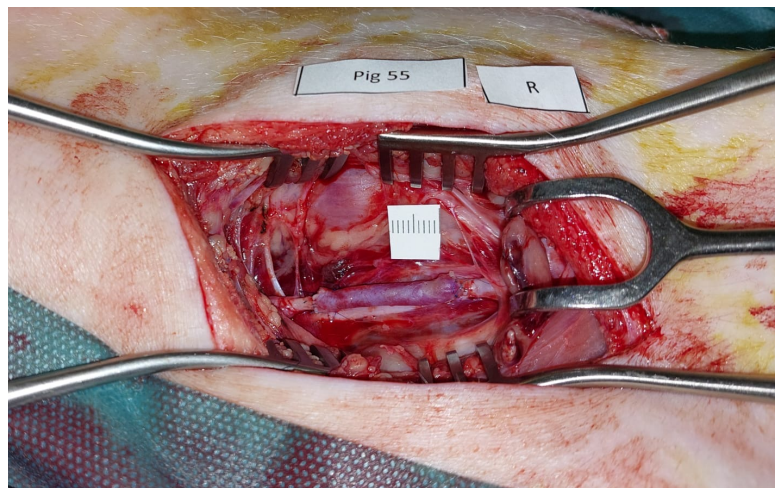
Implantovaná  
náhrada do povodí  
*a. carotis*







# Explantace cévních náhrad





Děkuji za pozornost