

# Buňka, tkáň, orgán, tkáňové inženýrství a kultivační reaktory, biokompatibilita

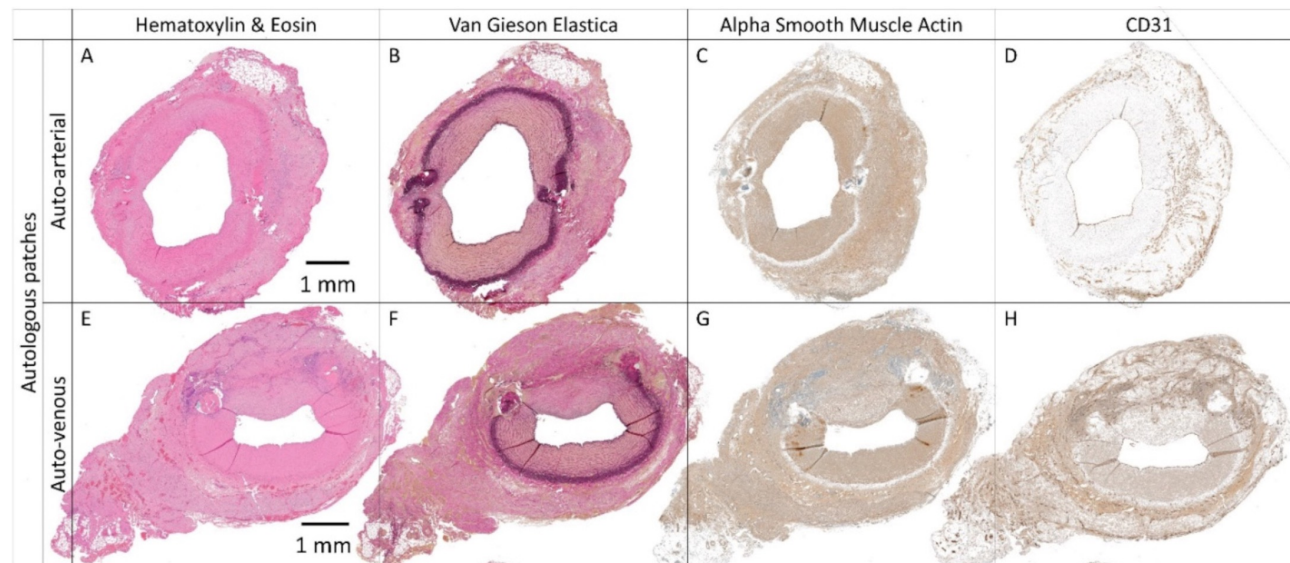
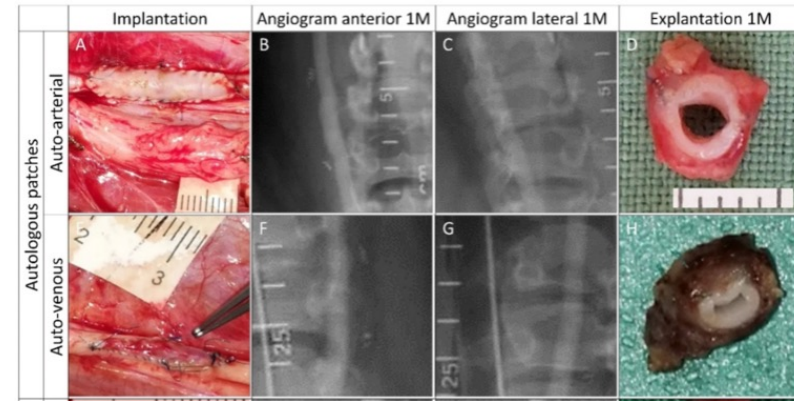
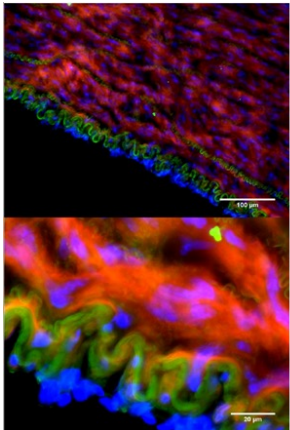
BSC – Biosystém člověka

Doc. Ing. Roman Matějka, Ph.D.

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

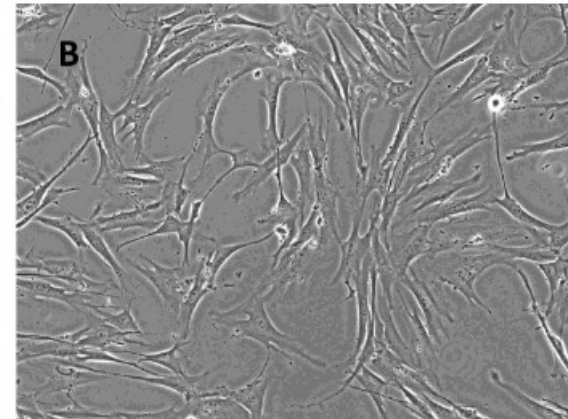
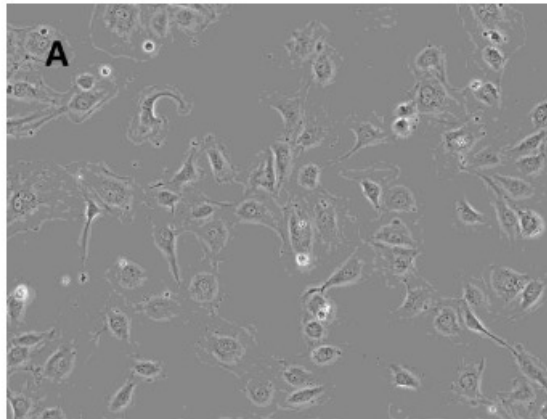
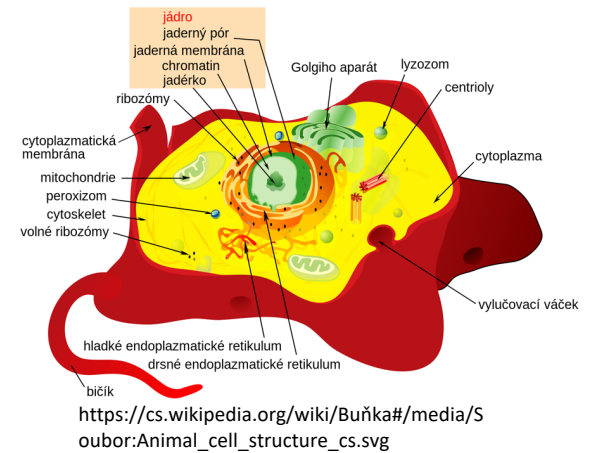
# Tkáň

- Soubor morfologicky podobných buněk
- Buněčná a mezibuněčná složka
- Rozdělení tkání
  - Epitelová
  - Pojivová
  - Svalová
  - Nervová
  - Trofická (tekutá)



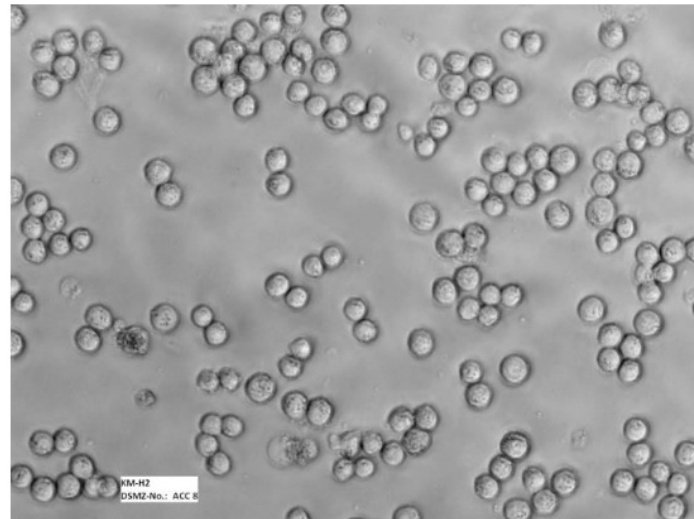
# Buňka

- Základní funkční jednotka
- Prokaryotická / Eukariotická buňka
- Fyziologie
  - Osmotické jevy
  - Buněčný cyklus
  - Metabolismus
  - Tvorba proteinů



# Morfologie buněčných kultur

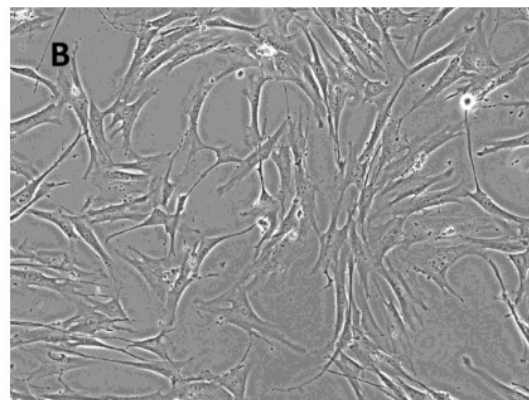
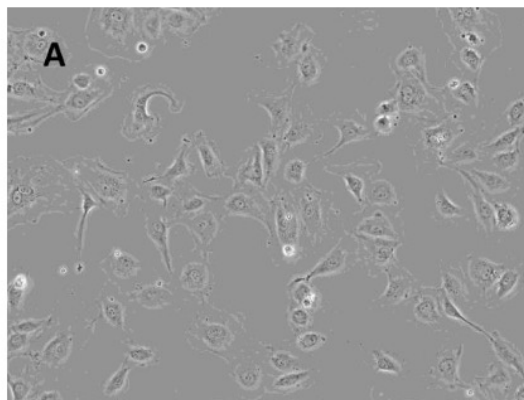
- Buňky suspenzní
  - Buňky „kulovitého“ tvaru – homogenně v kultivačním médiu - suspenze
  - Rotační bioreaktory, třepačky apod.
  - Hematopoetické buňky





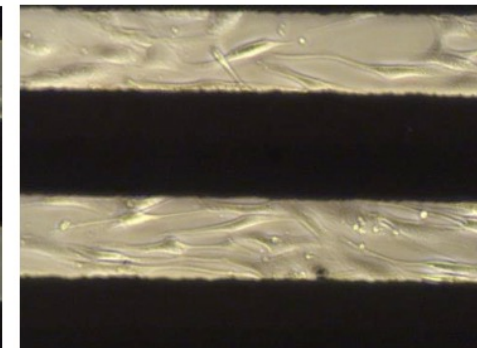
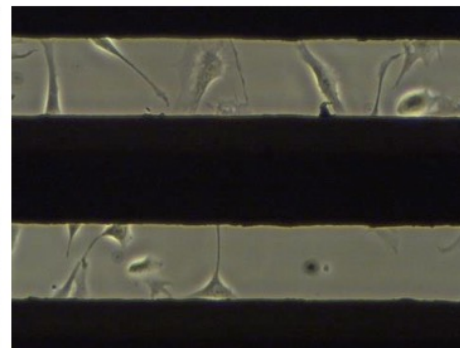
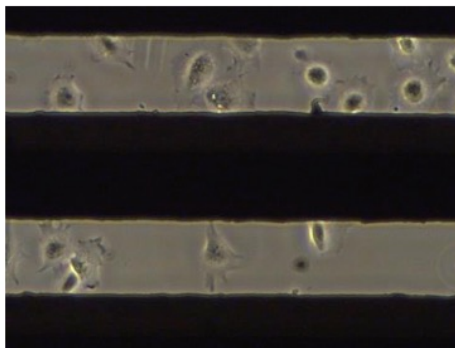
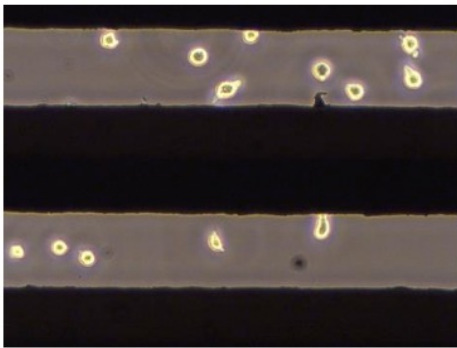
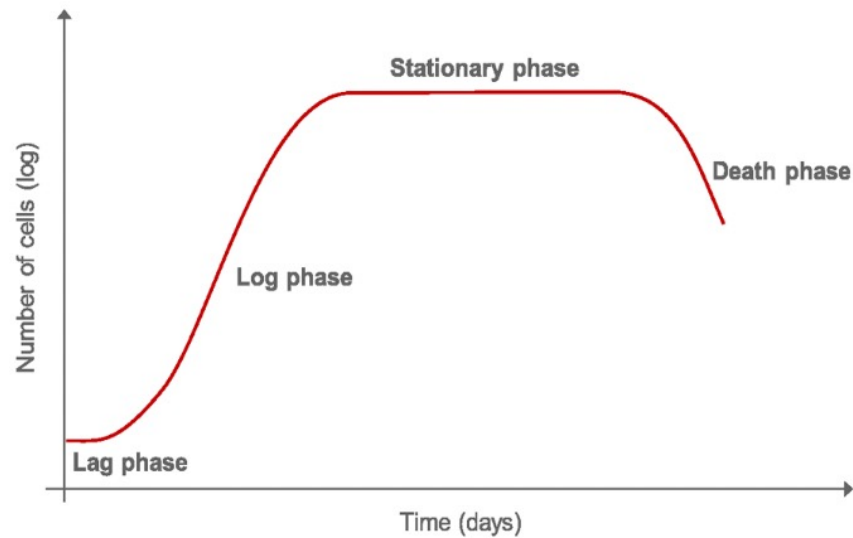
# Morfologie buněčných kultur

- Buňky adherentní (přisedlé)
  - Růst na povrchu – adheze na povrch
  - Vyžadují kontakt s mezibuněčnou hmotou – dno kultivační nádoby
  - V případě že nemůžou adherovat dochází k apoptóze (anoikis – bezdomova)
  - Rozdílný tvar pro různé buněčné typy



# Růst buněk - proliferace

- Růstová křivka buněk 3 (resp. 4 fáze)



# Růst buněk - proliferace

- **LAG-FÁZE:** ahdeze buněk na povrch, rozprostření
  - U linií ca do 30 minut
  - U primokultur může doba výrazně delší – hodiny až dny
- **LOG-FÁZE:** buňky se množí geometrickou řadou. Růst probíhá tou nejvyšší rychlostí, časem dochází k vyčerpání živin z prostředí, rychlost růstu se zpomaluje.
- **STACIONÁRNÍ FÁZE:** živiny jsou vyčerpány, dochází k hromadění metabolitů; je pozastaven růst –bakterie se nemnoží, ale ani nehynou, udržují bazální metabolismus.

# Podmínky pro růst buněk in-vitro

- Snaha je vytvořit fyziologické podmínky
- Teplota 37 °C
- Atmosféra obohacená o 5 % CO<sub>2</sub> – odpovídá poměrům extracelulární tekutiny, udržení pH, uhličitanový pufr
- Relativní vlhkost >90 % - omezení odparu kultivačního média a změny osmotických poměrů
- Buněčné inkubátory



# Kultivační médium

- Izotonický roztok, pH 7,4 optimálně, 280-320 mOsm
- Anorganické ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ),
- Glukózu nebo vyšší cukry jako zdroj energie
- Aminokyseliny a vitamíny, antibiotika, antimikotika
- Fetální hovězí sérum – zdroj růstových faktorů, hormonů, proteiny umožňující adhezy
  - Rozdílné šarže
  - Bezssérová média
- Indikace pH – fenolová červeň
- alfa-MEM, DMEM, EBM2 (EGM2).....





# Význam tkáňových/buněčných kultur

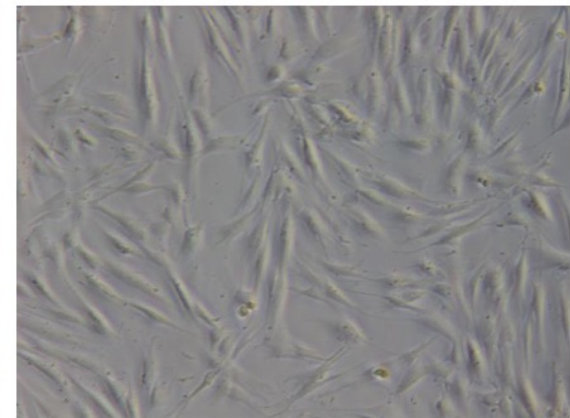
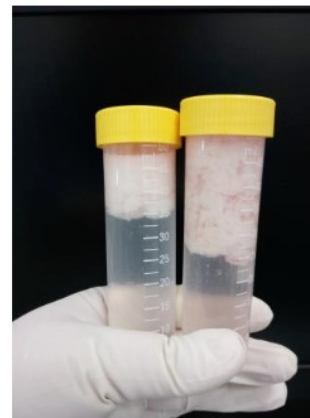
- Snaha je minimalizace pokusech na zvířatech
- Buněčná kultura vytváří modelový – izolovaný – systém
  - Planární podmínky růstu
  - Dediferenciace kultury – změna chování buněk
  - Není možné zajistit komplexní podmínky in-vivo systému
- Regenerativní medicína a tkáňové inženýrství
  - Funkcionalizované náhrady tkání a orgánů
  - Funkcionalizované léčiva

# Historie

- 1885 Wilhelm Roux – tkáň kuřecího embrya
  - Teplý solný roztok
  - Udržel tkáň při životě několik dní
- Ross Granville Harrison – nervové buňky z žabího rárodu
  - Problém s kontaminací → aseptická práce, autoklávování
  - Udržel buňky při životě více než 5 týdnů
- 1910 Montrose Burrows a Alexis Carrel – zavedení kultivace in-vitro
  - Kultivační médium
  - Kultivační substráty

# Získání buněčné kultury

- Izolace buněčného typu z rostliny nebo živočicha
  - Mechanické rozvolnění tkáně
  - Enzymatické natrávení tkáně - kolagenáza, elastáza nebo trypsin
  - Gradientní centrifugace – separace složek
- Primokultura – fenotypizované buňky
- Kmenové buňky – „univerzální“ buňky
- Buněčná proliferace
  - → konfluentní stav
  - → pasážování

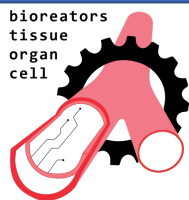


# Buněčné linie

- Postupným dělením dochází ke zkracování telomer
- Hayflickův limit – ca. 50 dělení – senescentní buňky, buněčná smrt
- Nádorové, imortalizované buňky
  - Kontinuální buněčná linie
  - Neomezený počet dělení
  - 1951 – Henrieta Lacks – HeLa karcinom děložního čípku

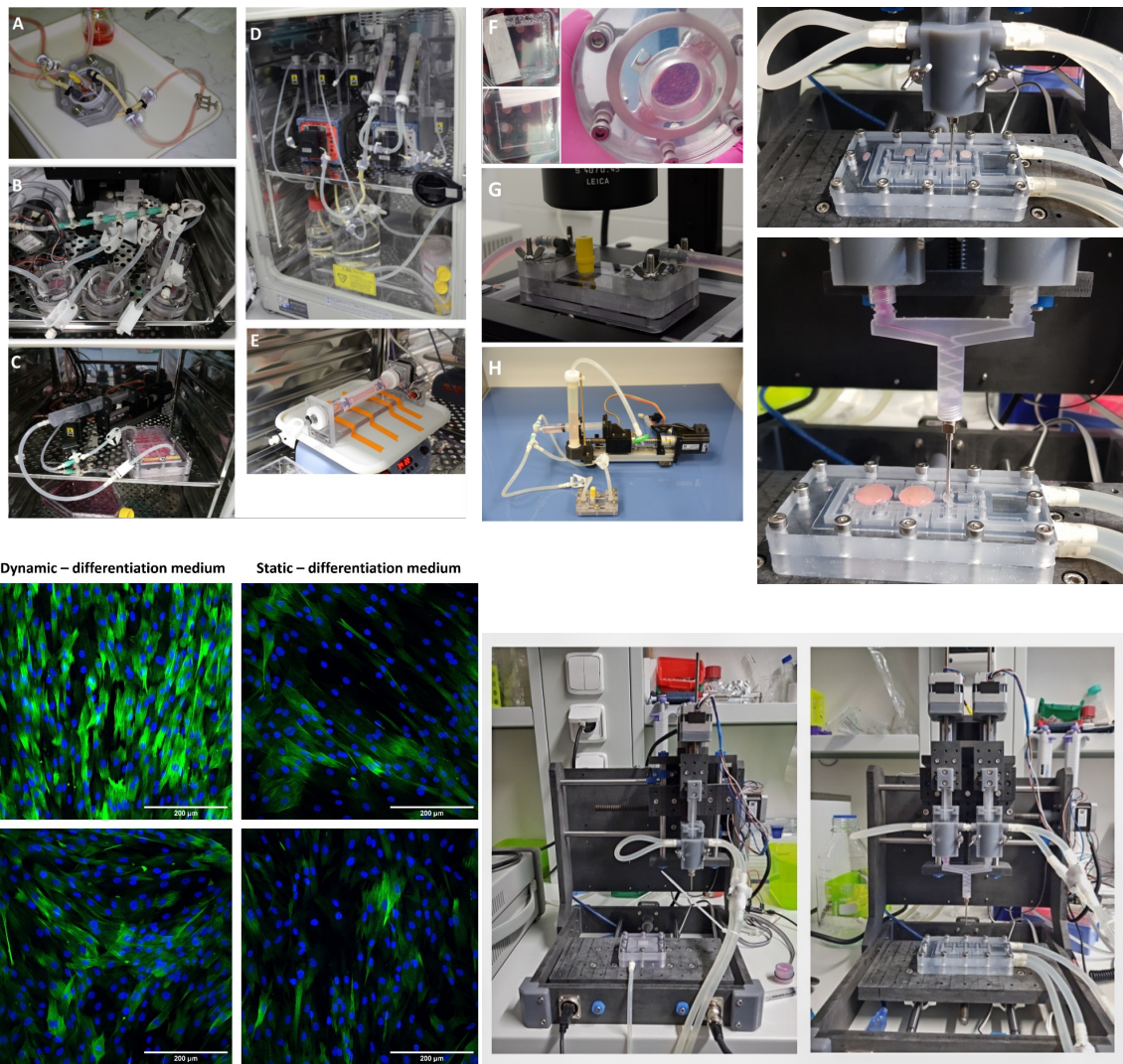






# Kultivační systémy, bioreaktory a 3D biotisk

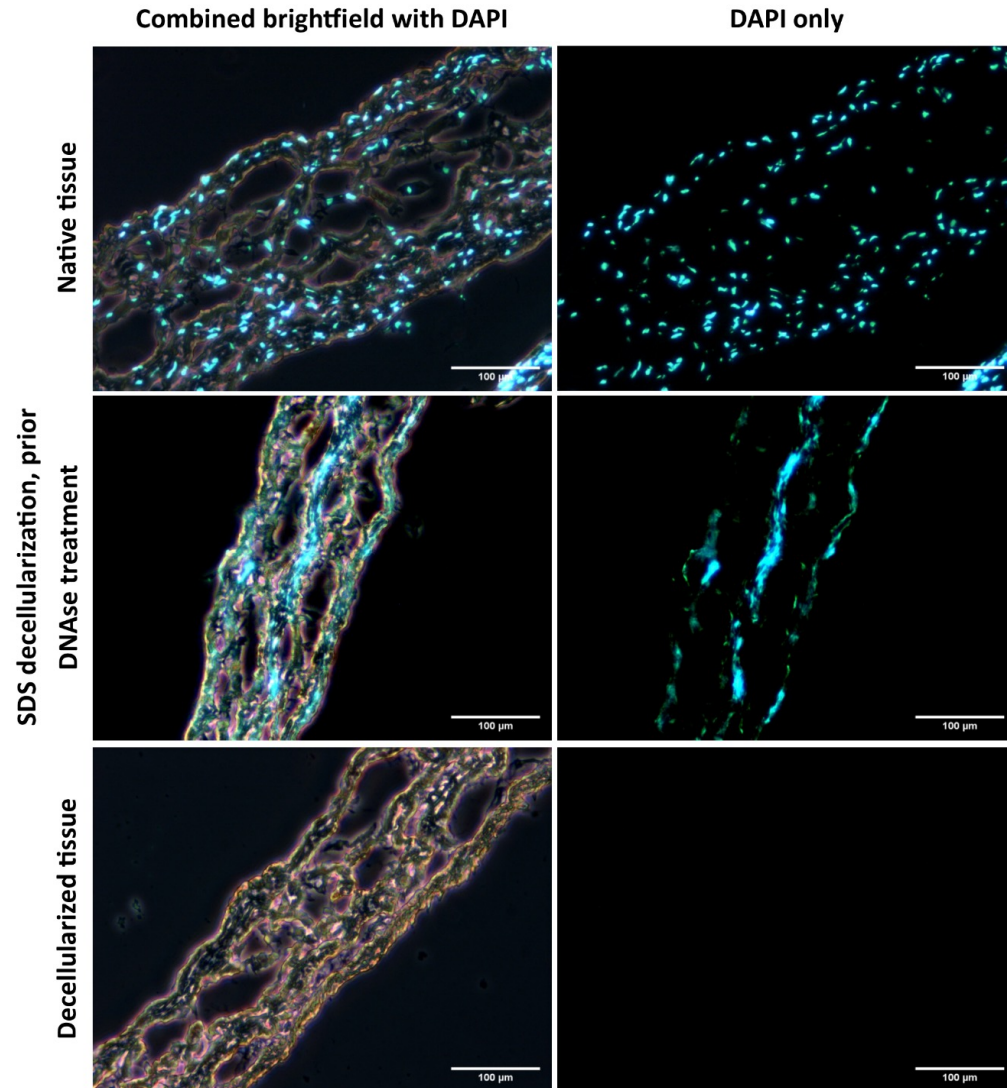
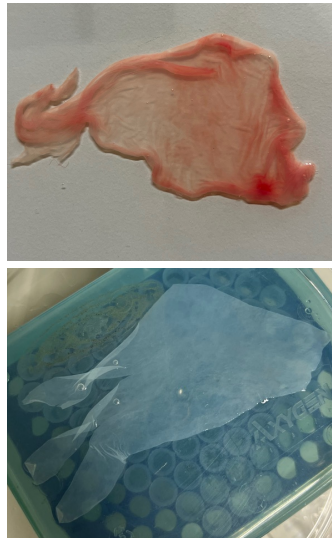
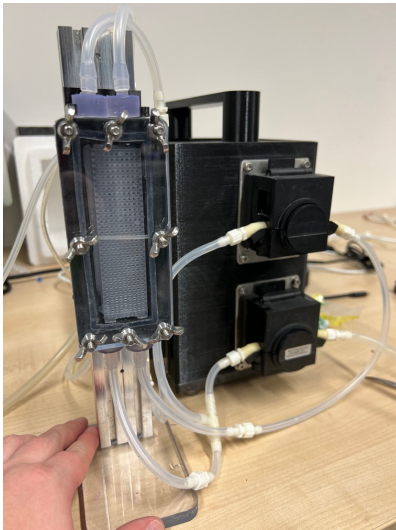
- Kultivační systémy
  - Simulace fyziologických podmínek
  - Kombinace mechanické a chemické stimulace buněk
  - Podpora proliferace diferenciac buněk
- Automatizovaná funkce systémů
  - Funkce v režimu 24/7
  - Vzdálená správa
- Decelularizace tkání pro přípravu substrátů
- 3D biotisk umožňující přípravu strukturovaných substrátů včetně inkorporovaných buněk





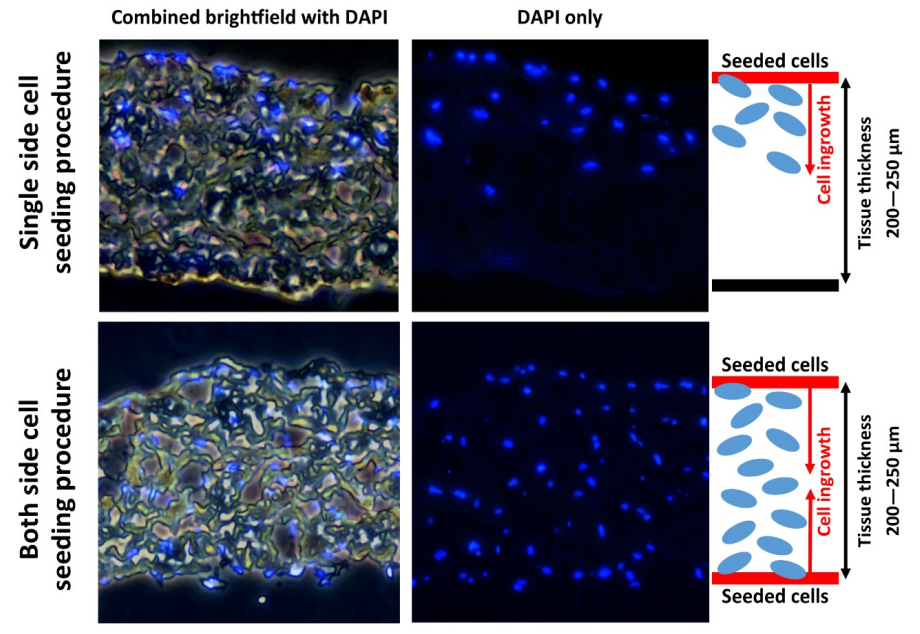
# Automatizovaná decelularizace

- Reprodukovatelná metoda decelularizace tkáně
  - Cévy, perikardy, periferní nervy
- Čištění amniových membrán
- Automatizovaný postup bez nutnosti zásahu



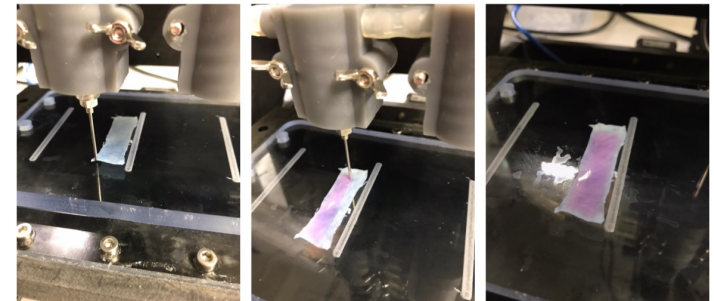
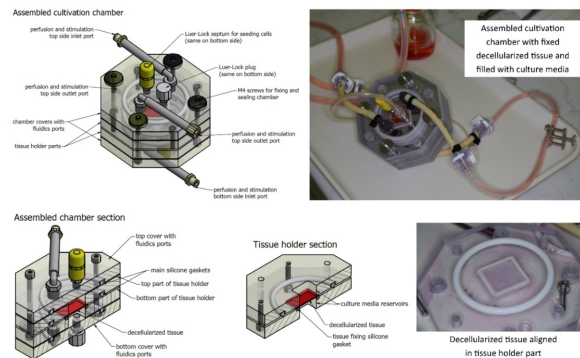
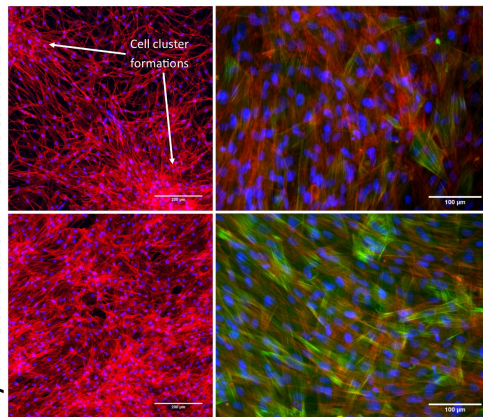
# Příprava cévních záplat na bázi decelularizovaných tkání

- Recelularizace pomocí stromálních a kmenových buněk z pupečníku (auto-, allo)
- 3D tisk pro homogenitu
- Prekultivace v reaktoru pro podporu rekolonizace a diferenciaci do SMC



**Overall growth**  
(F-actin and DAPI)

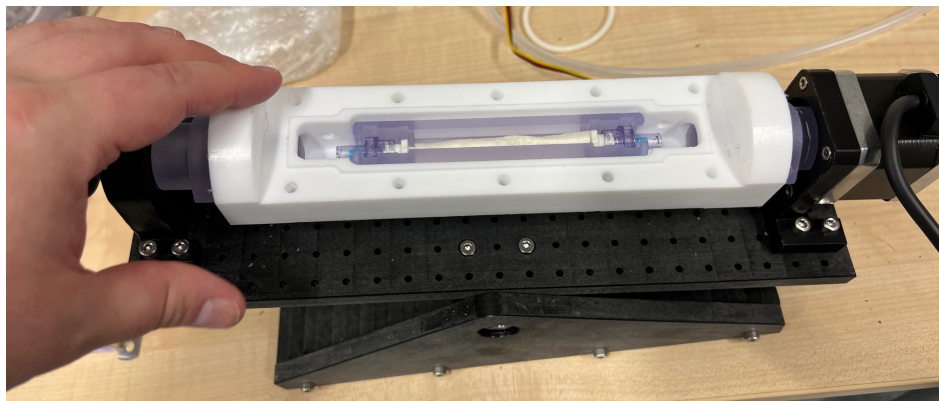
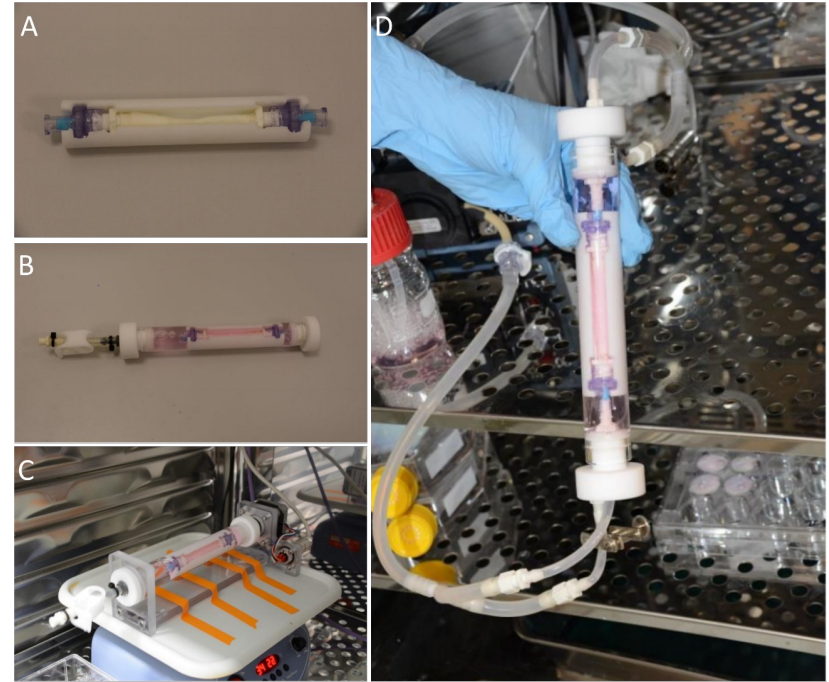
**Differentiation into SMC**  
(Calponin, F-actin and DAPI)





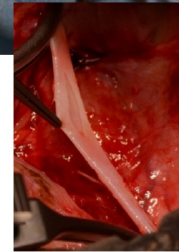
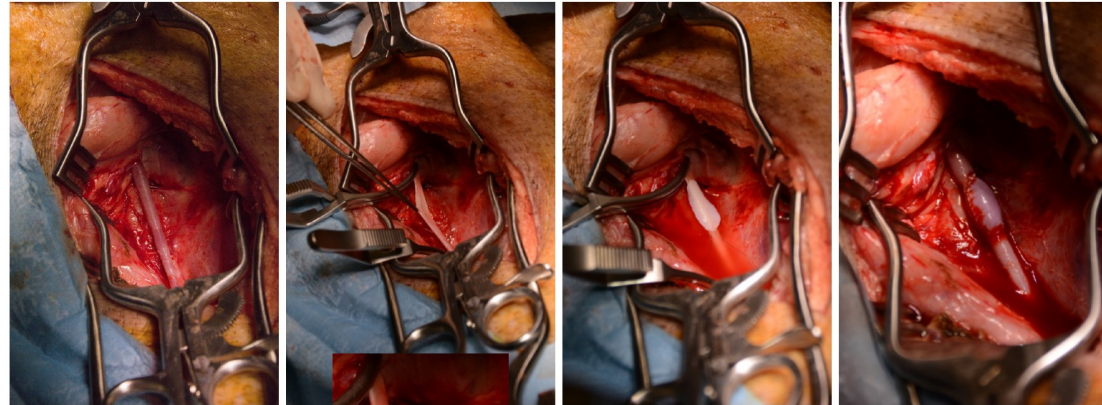
# Příprava cévních náhrad na bázi decelularizovaných tkání

- Systémy uzpůsobené pro tubulární tkáň
- Rotační osazení nebo využití impregnace hydrogelem
- Kombinovaná stimulace laminárním prouděním a pulzatilním tlakem
  - Podpora růstu buněk a penetrace do tkáně
  - Diferenciace směrem k hladkému svalu
  - “Pre-endotelizace”

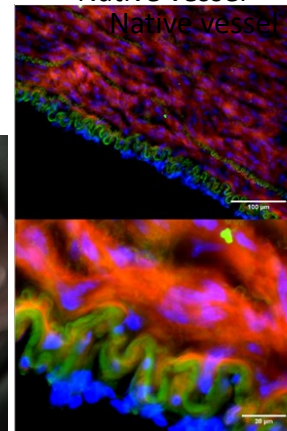


# Verifikace ve zvířecím modelu decelularizované tkáně s buněčnou rekolonizací

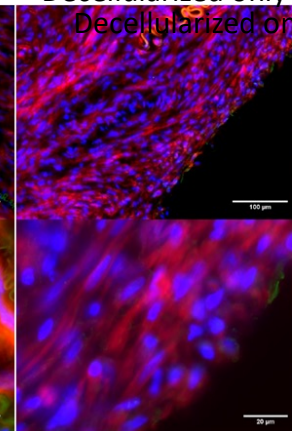
- Implantace do karotického povodí prasete domácího
- Využití allo a xeno tkáně pro decel.
- Observace 1 a 6 měsíců



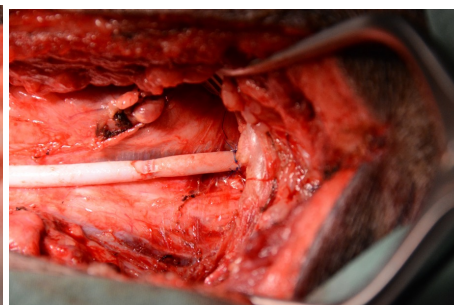
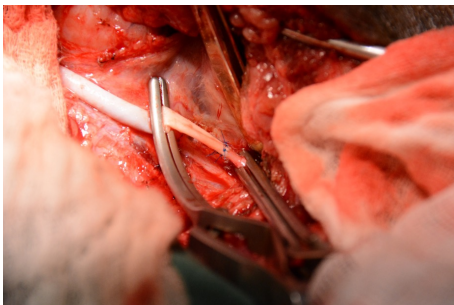
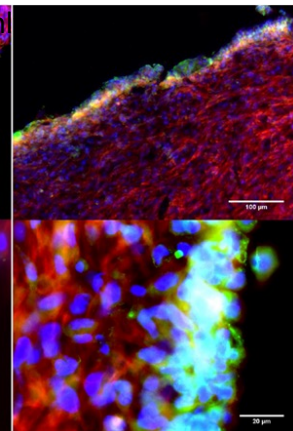
Native vessel  
Native vessel



Decellularized only  
Decellularized only



Recolonized with  
autologous cells





# Příprava cévních náhrad na bázi kolagenových nano a mikrovláken a hydrogelů

- Kompozitní materiály pro tvorbu substrátů
  - PCL, kolagen, lyofilizované decel. tkáně
- Impregnace hydrogelem s buněčným substrátem
- 3D tisk substrátů
- Kultivace v reaktorech pro integraci buněk do substrátů a zvýšení mechanické odolnosti

